

Harz- und Hopfensäuren als alternative, biologische Konservierungsstoffe

Florian Emerstorfer^{1*}, Walter Hein¹, Reinhard Resch², Wolfgang Kneifel³ und Erich M. Pötsch²

Zusammenfassung

Die in der Zuckerindustrie seit Jahren erfolgreich eingesetzten natürlichen Wirkstoffe Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren wurden in Laborsilagen mit Gras und Rübenpressschnitzeln getestet. Dabei wurde die Frage untersucht inwieweit die Möglichkeit besteht, eine Vermehrung von Clostridien unter Laborbedingungen zu unterdrücken. Die Kontamination des Ausgangsmaterials in den Stresstests erfolgte dabei über den Zusatz von Erde. Das Ausmaß des Clostridienwachstums wurde über die Parameter pH-Wert und Gärssäuren über den Silierverlauf von 90 Tagen beurteilt, wobei das Abschneiden der Wirkstoffe mit Ameisensäure und einem biologischen Silagestarter (Bonsilage forte) verglichen wurde.

In den Grassilagen zeigte sich dabei, dass eine Unterdrückung im getesteten Konzentrationsbereich im Vergleich zum Silagestarter und Ameisensäure weniger gut gelingt und die optimalen Einsatzkonzentrationen noch nicht gefunden werden konnten. In den Rübenpressschnitzelsilagen andererseits konnte ein eindeutiger Verbesserungseffekt über den Zusatz der Wirkstoffe gegenüber der Anwendung des Silagestarters erzielt werden. Die gemeinsame Anwendung der Wirkstoffe mit der Silagestarterkultur führte zu einer deutlichen Reduktion von Buttersäure in den Stresstests und zu einer Verbesserung des Gärsäurenusters nach 90 Tagen Silierdauer. Schließlich wurde die Idee zur Kombination hopfenresistenter Milchsäurebakterien und Hopfen- β -Säuren getestet und als erfolgreichste Variante identifiziert.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen das Potential für natürliche Biostabilisatoren wie Hopfen- β -Säuren die Entwicklung von Clostridien zu unterdrücken und zeigen darüber hinaus Möglichkeiten zur Kombination der Wirkstoffe mit Milchsäurebakterien auf. Für die erfolgreiche Unterdrückung von Clostridienföhlgärungen in Silagen könnte somit mit Hopfen- β -Säuren ein neuer natürlicher und gesundheitlich unbedenklicher Wirkstoff gefunden worden sein.

Abstract

Natural antibacterials based on hop beta acids and rosin acids have been successfully applied in the sugar industry to combat microorganisms for years. In this study the substances were tested in silages with grass and pressed sugar beet pulp to reveal their potential in suppressing clostridia growth. The clostridia contamination in the challenge tests was done by admixing soil to fresh material. The impact on clostridia growth during silage fermentation in laboratory silos was assessed by determination of pH - value and organic acids composition over 90 days. For comparison, silage additives such as formic acid and a biological silage starter (Bonsilage forte), were included in the trials.

In grass silages results indicate that natural antibacterials were less effective than formic acid and the silage starter. In pressed sugar beet pulp natural antibacterials showed significantly better results than the silage starter culture. A combined application of natural antibacterials and the silage starter lead to further improvements with respect to organic acids composition and butyric acid content. Eventually, the idea to use a combination of hop-resistant lactic acid bacteria and hop beta acids was tested and revealed best results.

The outcome of this study indicates that natural antibacterials, such as hop beta, acids can suppress clostridia growth in silages and demonstrates some possibilities for the combined use of natural antibacterials and lactic acid bacteria. Consequently, these naturally derived plant ingredients may provide a new silage additive for successful suppression of clostridia in silage fermentation.

¹ Zuckerforschung Tulln GmbH, Josef-Reither-Strasse 21-23, A-3430 Tulln

² LFZ Raumberg-Gumpenstein, Referat für Futterkonservierung und Futterbewertung; Abteilung für Grünlandmanagement und Kulturlandschaft, Raumberg 38, A-8952 Irdning

³ Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und Lebensmitteltechnologie, Muthgasse 18, A-1190 Wien

* Ansprechpartner: DI Florian Emerstorfer, email: florian.emerstorfer@zuckerforschung.at

1. Einleitung

Seit Beginn der 1990er Jahre werden in Österreich alternative Produkte zur Bekämpfung von Mikroorganismen in der Zuckerproduktion eingesetzt. Davor verzichtete man aus Imagegründen freiwillig auf den im Extraktionsbereich üblichen Einsatz von Formalin. In den Zuckerfabriken musste man nun allerdings mit einer verstärkt auftretenden Aktivität von Mikroorganismen, und damit verbunden, höheren Konzentrationen an mikrobiologischen Stoffwechselprodukten (in erster Linie Milchsäure) in den verarbeiteten Säften fertig werden. Dies führte interessanterweise zu einer Verbesserung der Abpressbarkeit der extrahierten Schnitzel sowie letztendlich zu einer Energieeinsparung bei der Trocknung der Extraktionsrückstände, brachte aber im Prozess neben Zuckerverlusten verschiedene Probleme mit sich (HOLLAUS und POLLACH, 1986; POLLACH und HOLLAUS, 1988). Fortgesetzte Studien zur Verbesserung der Schnitzelabpressbarkeit bildeten nun die Grundlage für entscheidende Beobachtungen: Man erkannte, dass die bakterizide Wirkung von Inhaltsstoffen des Hopfens auch zur Bekämpfung mikrobiologischer Aktivität bei der Zuckergewinnung genutzt werden kann (POLLACH et al., 1996; HEIN und POLLACH, 1997). In der Brauereiindustrie seit Jahrhunderten eingesetzt, boten diese antimikrobiellen Substanzen entscheidende Vorteile gegenüber Formalin, da sie als ungefährlich für Mensch und Tier angesehen werden. In weiterer Folge wurden auch Harzsäuren und Fettsäuren (Myristinsäure) erfolgreich eingesetzt. Erstere spielen bei der Herstellung von Retsina, dem typischen geharzten griechischen Wein, eine ähnliche Rolle wie Hopfensäuren bei der Herstellung von Bier. Fettsäuren wiederum sind natürliche Bestandteile von pflanzlichen Ölen und Milchprodukten. Die vorteilhaften Eigenschaften der Wirkstoffe wurden für verschiedene Anwendungsbereichen genauer untersucht. (NARZIß, 1986; BROCKMANN et al., 1987; JOHNSON et al., 1973; HORNSEY, 2007; BEUCHAT und GOLDEN, 1989; SÖDERBERG, 1990).

Ein entscheidender Schritt zur Vermarktung dieser alternativen Produkte lag dann vor allem in der Zusammenarbeit mit einer auf dem Hopfensektor tätigen Partnerfirma. Gemeinsam mit diesem Partnerunternehmen wurden die Anwendungsmöglichkeiten der Wirkstoffe verfeinert und das „Konzept der natürlichen Biostabilisatoren für die Zuckerindustrie“ entwickelt (POLLACH, 1995; POLLACH und HEIN, 2001; POLLACH et al., 2002, 2004; HEIN et al., 2006).

Über die Jahre des erfolgreichen Einsatzes der Wirkstoffe blieben die Anwendungsgebiete allerdings nicht alleine auf die Bekämpfung von thermophilen Mikroorganismen im Extraktionsbereich beschränkt. Vielmehr konnten auch in verschiedenen anderen Abschnitten der Zuckerherstellung, wie z.B. in Enthärtungsanlagen, bei der Dicksaftlagerung sowie Rübenlagerung erfolgreich Mikroorganismen bekämpft werden. Zudem gelang es wiederholt Clostridieninfektionen mit Hilfe von Hopfen- β -Säuren wirkungsvoll zurückzudrängen und in eine erwünschte Milchsäuregärung umzuwandeln (EMERSTORFER, 2005; HEIN et al., 2002; HEIN et al., 2006).

In Verbleibstudien mit den bitter schmeckenden Hopfensäuren wurde wiederum nachgewiesen, dass kaum Reste

im Weißzucker feststellbar sind, ein großer Anteil der in der Extraktion eingesetzten Produkte aber während der Extraktion in die Pressschnitzel gelangt (HEIN et al., 2006). Man gab sich hier einstweilen damit zufrieden, dass negative Rückmeldungen vonseiten der Bauern, die die Pressschnitzel entweder frisch oder nach Silierung als Tierfutter verwenden, ausblieben. Allerdings wurden bereits im Jahr 1999 von Pollach Vermutungen über mögliche positive Effekte in den Extraktionsrückständen durch Unterdrückung bestimmter unerwünschter Mikroorganismengruppen angestellt (POLLACH et al. 1999; POLLACH, 2002; GUDMUNDSON, 1998).

Im Bestreben die Einsatzgebiete für die Wirkstoffe auf Bereiche auch außerhalb der Zuckerindustrie zu erweitern wurden diese Überlegungen nun wieder aufgegriffen. Aus der intensiven wissenschaftlichen Beschäftigung mit den „natürlichen Biostabilisatoren“ war bekannt, dass grampositive Bakterien – aufgrund ihrer Zellwandstruktur – bereits mit geringen Einsatzkonzentrationen der Wirkstoffe bekämpft werden können, wohingegen gramnegative Bakterien, Hefen und Schimmelpilze eher unempfindlich sind. Insbesondere die mehrfach beobachtete Effektivität von Hopfen- β -Säuren gegen Clostridien erschien viel versprechend. Aus diesem Grund wurde das Hauptaugenmerk auf Bereiche gerichtet in denen gram-positive Schadkeime wie Clostridien eine übergeordnete Rolle spielen und deren wirtschaftliche Bedeutung als beträchtlich angesehen werden kann. Dabei konnte mit der Herstellung von Silagen zur Tierfütterung ein interessanter Bereich identifiziert werden (WILKINSON und TOIVONEN, 2003; DLG, 2006;)

In einem ersten Schritt wurden nun im Rahmen einer Diplomarbeit an der Universität für Bodenkultur Daten zur minimalen Hemmkonzentration von Leitkeimen aus dem Silagebereich in 3 mikrobiologischen Testverfahren gegen natürliche Biostabilisatoren (Hopfen- β -Säuren, Harzsäuren und Myristinsäure) gesammelt (SZALAY, 2007). Die erzielten Testergebnisse bestätigten erneut die hervorragende Wirksamkeit von Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren gegen Clostridien. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden nun Untersuchungen gestartet um die Hemmwirkung natürlicher Biostabilisatoren gegen Clostridien in Silagen zu testen um das Potential der Wirkstoffe für diesen Bereich ausloten zu können.

In Vorarbeiten 2007 und 2008 wurden Rübenpressschnitzel aus der Zuckerfabrik Tulln im Labormaßstab siliert und nach 0, 7, 14, 30, 60 und 90 Tagen Silierdauer untersucht. Zur Charakterisierung der Silagen wurden Trockensubstanzwerte, pH-Werte und Gärsäurespektren ermittelt.

Das Hauptaugenmerk wurde in diesen Vorversuchen auf Möglichkeiten zur Clostridienkontamination (Erde, Clostridien sporenzusatz) und die Erzielung von Fehlgärungen in unterschiedlichen Belastungsstufen (Erd- bzw. Sporenzusatz, Pufferung mittels Natriumcarbonat, Erhöhung des Feuchtigkeitsgehalts, usw.) gelegt. In den Vorversuchen wurden auch erste Erkenntnisse zur Wirkstoffeinbringung und zu wirksamen Konzentrationen von Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren gesammelt und der Hemmeffekt der Wirkstoffe im Vergleich zu clostridienhemmenden Silierhilfsmitteln (Ameisensäure, biologische Starterkulturen, Nitrit/Hexamethylentetramin) untersucht.

Darüber hinaus wurden Kombinationsmöglichkeiten von Biostabilisatoren mit biologischen Starterkulturen (MSB) getestet sowie erste Tests zur Kombination hopfenresistenter Milchsäurebakterien mit Hopfen- β -Säuren durchgeführt.

In den Ergebnissen zeigten sich in erdkontaminierten Pressschnitzelsilagen regelmäßig hohe Buttersäurewerte, wohingegen der Zusatz von Clostridien sporen nicht die erhoffte Fehlgärung hervorzurufen vermochte. In den erdkontaminierten Silagen konnten über den Zusatz von Hopfen- β -Säuren sowie Mischungen von Hopfen- β -Säuren mit Harzsäuren in der Größenordnung von 50 bis 100 ppm Buttersäurewerte gering gehalten werden. Die Wirkstoffe schnitten dabei ähnlich gut ab wie clostridienhemmende biologische Silagestarter. Auch Kombinationen von Hopfen- β -Säuren mit biologischen Silagestartern zeigten im Vergleich zu Varianten mit alleiniger Anwendung von Starterkulturen niedrigere Buttersäurewerte und somit offenbar bessere Hemmeffekte auf Clostridien, insbesondere traf dies auf Kombinationen von Hopfen- β -Säuren mit hopfenresistenten Milchsäurebakterien zu.

Ebenso wurde im Sommer 2007 ein erster Vorversuch mit Gras in Zusammenarbeit mit dem LFZ Raumberg-Gumpenstein analog zu den Pressschnitzelvorversuchen durchgeführt. Hier wurde die Kontamination des Materials allerdings nicht über Erdzusatz, sondern über eine Clostridien sporensuspension, angereichert aus buttersäurehaltigen Pressschnitzelsilagen, vorgenommen. In der Auswertung der Gär säuren konnte aber trotz Zusatz von Clostridien sporen in keiner der untersuchten Varianten eine Buttersäurefehlgärung gefunden werden.

Die Erkenntnisse aus den oben beschriebenen Vorversuchen mit Pressschnitzel- und Grassilagen bildeten die Grundlage für die Planung der Hauptversuche.

2. Material und Methoden

Silierhilfsmittel und Biostabilisatorlösungen

- BetaStab 10A: Hopfen- β -Säuren in wässriger alkalischer Lösung, Wirkstoffkonzentration 10 % (w/w), BetaTec GmbH, Nürnberg;
- PileStab 20A: Harzsäuren in wässriger alkalischer Lösung, Wirkstoffkonzentration 16 % (w/w), Zuckerforschung Tulln GmbH, Tulln;
- Bonsilage forte: Mischung homo- und heterofermentativer Milchsäurebakterien, H. Wilhelm Schauman GmbH & Co KG, Brunn am Gebirge.
- Ameisensäure 85 %
- Hopfenresistente Milchsäurebakterien:
Stamm 1464: *Lactobacillus brevis* TMW 1.316 (Heterofermenter);
Stamm 1466: *Pediococcus damnosus* TMW 2.61 (Homofermenter)
zur Verfügung gestellt von Prof. Rudi Vogel, Universität zu Weihenstephan, München; Vorzucht in MRS-Medium, Verwendung von 24-h alten Kulturen, Einbringung von rund 10^5 KBE (*Lactobacillen* + *Pediococcen*) pro g FM;

Stresstests in Grassilagen mit Clostridien

Im Frühjahr und Sommer 2008 wurden in Zusammenarbeit mit dem LFZ Raumberg-Gumpenstein Versuche mit Gras durchgeführt. Für die die Kontamination des Materials mit Clostridien wurde auf den Zusatz von Erde (6,25 g pro kg Frischmasse) zurückgegriffen. Zielsetzung im Ablauf war jeweils eine relativ kurze Anwelkzeit nach dem Grasschnitt, um die Chancen für eine Clostridienfehlgärung zu erhöhen, darüber hinaus wurde die Füllmenge pro Glas auf 500 g beschränkt um keine zu starke Verdichtung zu erhalten. Die Versuchsdurchführung selbst erfolgte in einer Mischmaschine. Die benötigte Menge an vorzerkleinertem Gras wurde eingewogen und in die Mischmaschine gefüllt. Anschließend erfolgte unter ständigem Mischen das Einbringen von Erde (6,25 g pro kg Frischmasse) und der jeweiligen Zusätze. Die Silierhilfsmittel wurden nach Herstellerangabe vorbereitet und mit Hilfe von Sprühfläschchen eingesprüht, wobei pro kg Frischmasse 15 g der jeweiligen Lösung (Silierhilfsmittel, Biostabilisatoren) eingebracht wurden. Nach einer Gesamtmischdauer von 15 min wurde das Material ausgekippt und anschließend in die Gläser gestopft. Nach luftdichtem Verschließen der Gläser (Dichtung, Spanning) erfolgte der Transport nach Tulln und die Lagerung in einem Klimaschrank bei 25°C.

Zur Beobachtung des Silierverlaufs wurden je 3 Gläser pro Zusatzvariante nach 2, 7, 14, 30, 60 und 90 Tagen geöffnet. Das Material der Gläser einer jeden Kontrolle bzw. Variante wurde zum jeweiligen Auslagerungszeitpunkt zu einem Mischmuster vereint und für die Untersuchungen verwendet. Für die untersuchten Parameter Trockensubstanz, Gär säurenspektrum (HPLC) und pH-Werte erfolgten Doppelbestimmungen aus den jeweiligen Mischmustern. Das frische Ausgangsmaterial wurde in analoger Weise auf die genannten Parameter hin untersucht. Darüber hinaus erfolgte eine mikrobiologische Charakterisierung an der Zuckerforschung Tulln, Abteilung Mikrobiologie; und der Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie sowie Nährstoffuntersuchungen am Futtermittellabor Rosenau. Die letztgenannten Parameter werden hier aus Platzgründen nicht genauer abgehandelt. Eine Beurteilung der eingesetzten Wirkstoffe und Silierhilfsmittel erfolgt über die erzielten pH-Werte und Gär säurespektren.

Stresstests in Rübenpressschnitzelsilagen mit Clostridien

Für systematische Versuche wurden im November 2008 konventionelle Rübenpressschnitzel aus der Zuckerfabrik Tulln bezogen. Diese Pressschnitzel wurden in der Zuckerforschung Tulln unmittelbar nach Transport verwendet. Ausreichend Erdmaterial zur Kontamination der Pressschnitzel wurde vom Gelände der Zuckerfabrik Tulln gesammelt, im Trockenschrank bei 70°C getrocknet und anschließend gesiebt um feines, rieselfähiges und damit besser einmischbares Material zu erhalten.

Die Versuchsdurchführung selbst erfolgte in einer Mischmaschine. Die benötigte Menge an Pressschnitzeln wurde eingewogen und in die Mischmaschine gefüllt. Anschlie-

ßend erfolgte unter ständigem Mischen das Einbringen von Erde (6,25 g pro kg Frischmasse) und der jeweiligen Zusätze. Die Silierhilfsmittel wurden nach Herstellerangabe vorbereitet und mit Hilfe von Sprühfläschchen eingesprüht, wobei pro kg Frischmasse 15 g der jeweiligen Lösung (Silierhilfsmittel, Biostabilisatoren) eingebracht wurden. Nach einer Gesamtmischdauer von 15 min wurde das Material ausgekippt und anschließend in die Gläser gestopft, wobei 850 g Material pro Glas verwendet wurden. Nach luftdichtem Verschließen der Gläser (Dichtung, Spannring) erfolgte die Verbringung in den Klimaschrank und Bebrütung bei 25°C.

Zur Beobachtung des Silierverlaufs in den Versuchen mit Pressschnitzeln, erfolgten Öffnungen von je 3 Gläsern pro Variante nach 2, 7, 14, 30, 60 und 90 Tagen, wobei zu allen Zeitpunkten Trockensubstanz, Gär säurenspektrum (HPLC) und pH-Werte bestimmt wurden. Darüber hinaus zu Versuchsbeginn und -ende die eben genannten Parameter sowie der Zuckergehalt (Saccharose, Glucose, Fructose) mittels HPLC. Schließlich wurde die verwendete Erde auf ihren Clostridiensporengehalt hin untersucht. Die Ergebnisse der Zuckerbestimmungen und Clostridiensporengehalte werden in dieser Arbeit jedoch nicht genauer abgehandelt. Eine Beurteilung der eingesetzten Wirkstoffe und Silierhilfsmittel erfolgt über die ermittelten pH-Werte und Gär säurespektren.

Probenvorbereitung und Analysemethoden:

Trockenmasse: 24 Stunden bei 105°C im Trockenschrank, zum Abkühlen Verbringung in Exsiccator, anschließend Auswaage.

pH und Gär säurespektrum: Die analytischen Untersuchungen zur Bestimmung des pH-Werts und der Gär säuren wurden in wässrigen Digeraten vorgenommen. Einwaage von 20 g Probenmaterial in einem Mixbecher und Auffüllen mit Deionat auf 200 g. Anschließend Zerkleinerung (3 min) in einem Mixer (Modell AB der Ingenieursfirma Weibull) und abfiltrieren über Faltenfilter. Im Falle von Gras erfolgte, wenn notwendig, eine Vorzerkleinerung mit einer Schere. Ein Teil des Digerats wurde direkt für die pH-Messung herangezogen, der Rest zentrifugiert und zur Analyse mittels HPLC in Vials abgefüllt.

HPLC-Analytik: Die Bestimmung von Milchsäure, Essigsäure, Buttersäure, Propionsäure, Ameisensäure und Ethanol erfolgte mittels HPLC direkt aus dem zuvor durch Zentrifugation gereinigten Digerat. Bedingungen für die HPLC: Laufmittel 5 mMol H₂SO₄, Säule Biorad Aminex® H, Flussrate 0,6 mL/min, Laufzeit 30 min, Temperatur 65 °C, Detektion RI/UV bei 210 nm;

Statistische Auswertung der Stresstests in Rübenpressschnitzelsilagen mit Clostridien

Laut Versuchsplan wurden in den Stresstests mit in Rübenpressschnitzeln mit Clostridien für jede der Kontrollen sowie für jede der Varianten 3 Gläser pro Öffnungszeitpunkt vorgesehen. Für die beiden Kontrollen „unbehandelte Pressschnitzel“ und „erdkontaminierte Pressschnitzel“

wurden folgend pro Glas 3 Proben gezogen und Digerate hergestellt. Aus den resultierenden 3 Digeraten erfolgte die Bestimmung der pH-Werte, zudem wurden pro Digerat 3 Vials für die HPLC-Analytik abgefüllt. Für die Kontrollen wurden somit pro Glas 3 Trockensubstanzwerte, 3 pH-Werte und 9 HPLC-Werte erhalten.

Für die einzelnen Varianten (Zusätze von Silierhilfsmitteln, Biostabilisatoren, Kombinationen) wurden pro Glas 2 Proben gezogen und Digerate hergestellt. Aus den einzelnen Digeraten erfolgte die Bestimmung der pH-Werte, zudem wurden pro Digerat 2 Vials für die HPLC-Analytik abgefüllt. Für die einzelnen Varianten wurden somit pro Glas 1 Trockensubstanzwert, 2 pH-Werte und 4 HPLC-Werte erhalten.

Die statistische Auswertung der Daten aus den beiden Pressschnitzelversuchen wurde mittels General Linear Model (GLM), Statgraphics 5.0 vorgenommen. Zur Gegenüberstellung der Ergebnisse zum Ende der Silierdauer nach 90 Tagen wurde ein multipler Mittelwertvergleich herangezogen. Als Testverfahren wurde Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von P < 0,01 gewählt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden soll exemplarisch auf je einen Versuch mit Rübenpressschnitzeln und je einen Versuch mit Gras näher eingegangen werden. Aufgrund ihrer Bedeutung in der Qualitätsbeurteilung von Silagen nach DLG (DLG, 2006) werden die Ergebnisse aus der Bestimmung der Gär säuren genauer betrachtet, um Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten darzustellen. Auf eine detaillierte Auswertung von mikrobiologischen Untersuchungen sowie Nährstoffanalysen wird aus Platzgründen und zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

Ergebnisse aus Stresstests in Grassilagen mit Clostridien

Der Pflanzenbestand in diesem Versuch setzte sich zusammen aus 56 % Gräsern, 27 % Leguminosen und 23 % Kräutern (Angaben in Gewichtsprozent). Es handelte sich um Material vom 1. Aufwuchs im Ähren-/Rispenstadien. Das Material wurde bei feuchtem Wetter am 14. Mai 2008 um 11:00 geerntet und für den Versuch um 13:30 verwendet. Die erzielte Trockensubstanz im Versuch lag bei etwa 23 % und damit relativ tief. Eine Buttersäurefehlgärung war damit sehr wahrscheinlich.

Abbildung 1 bietet einen ersten optischen Eindruck für ausgewählte Varianten des Grassilageversuchs über den Silierverlauf.

In *Tabelle 1* sind pH-Werte, Trockensubstanzen und die Gär säurezusammensetzung der Varianten des Grassilageversuchs nach 90 Tagen Silierdauer zusammengefasst. Die Trockensubstanzen zu Versuchsende sind relativ homogen bei etwa 21 bis 22 %. Die Variante mit Ameisensäurezusatz weist den höchsten Trockensubstanzwert auf, was wohl auf die rasche pH-Absenkung durch die organische Säure und damit verringerte Stoffwechselaktivität von im Siliergut enthaltenen Mikroorganismen zurückzuführen ist.

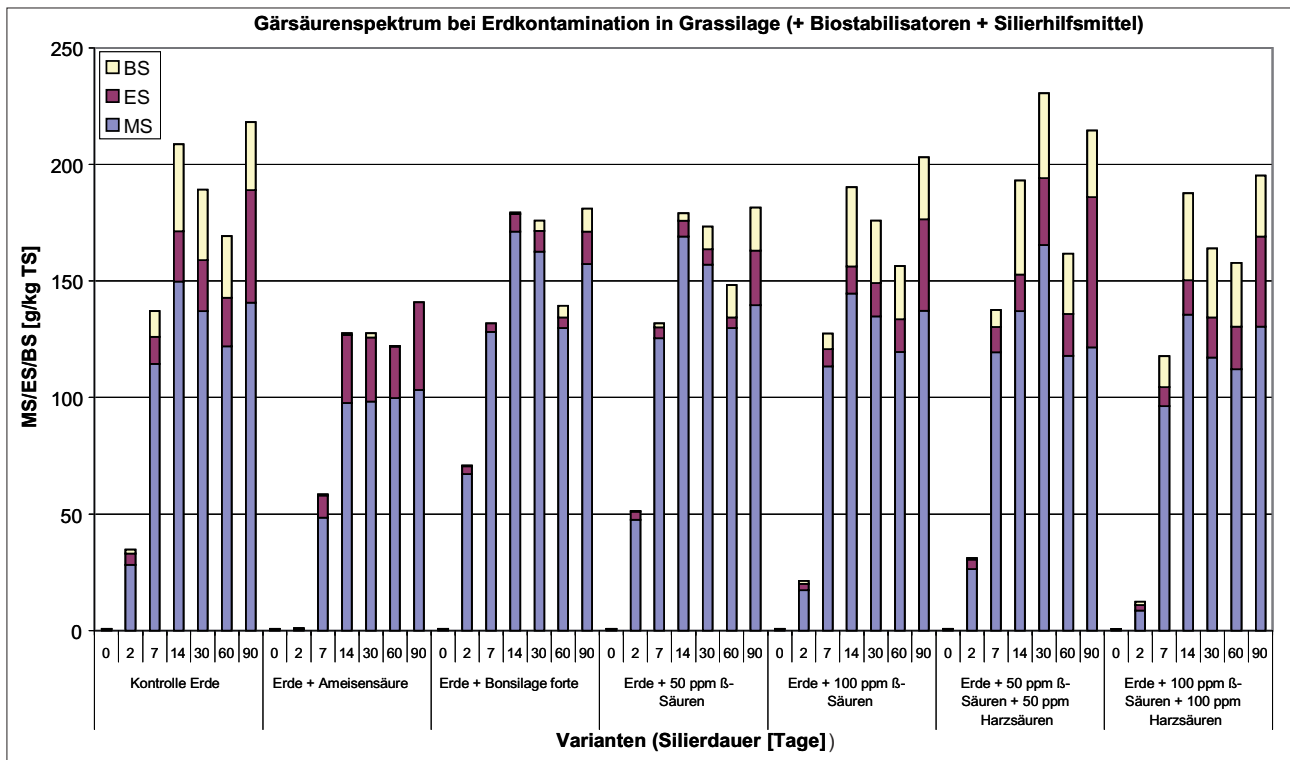


Abbildung 1: Gärsäurenmuster von ausgewählten Varianten im Grassilageversuch; BS = Buttersäure, ES = Essigsäure, MS = Milchsäure

Bei den pH-Werten liegen die Varianten Ameisensäure (Var. 3) und Bonsilage forte (Var. 4) nach 90 Tagen jeweils unter pH 4, allerdings ist nur die Variante mit Ameisenzusatz buttersäurefrei. Die Varianten mit Zusatz an Hopfen-β-Säuren (Var. 5, 6) zeigen in der niedrigeren der beiden Konzentrationen (50 ppm Hopfen-β-Säuren) eine Verbesserung zum erdkontaminierten Gras. Die höhere Konzentration sowie die beiden Varianten in der Kombination aus Hopfen-β-Säuren und Harzsäuren zeigen im Buttersäuregehalt keine entscheidende Verbesserung.

Tabelle 1: Ergebnisse in den Varianten des Grassilageversuchs nach 90 Tagen Silierdauer, Angaben der Gärsäuren in mg/kg TS; MS = Milchsäure, ES = Essigsäure, BS = Buttersäure, EtOH = Ethanol;

Var.	TS	pH	MS	ES	BS	EtOH
1	21,87	4,06	130,38	48,71	27,28	9,41
2	21,22	4,07	140,61	48,37	29,04	9,41
3	23,24	3,99	103,26	37,52	0,00	8,13
4	22,38	3,93	157,21	13,87	9,92	3,45
5	21,19	4,08	139,68	23,28	18,49	7,02
6	20,93	4,05	137,23	39,27	26,52	7,67
7	20,57	4,18	121,44	64,51	28,59	8,03
8	22,01	4,09	130,40	38,71	26,14	7,80

1...Gras unbehandelt; 2...Gras erdkontaminiert; 3...erdkontaminiert + Ameisensäure; 4...erdkontaminiert + Bonsilage forte; 5...erdkontaminiert + 50 ppm Hopfen-β-Säuren; 6...erdkontaminiert + 100 ppm Hopfen-β-Säuren; 7...erdkontaminiert + 50 ppm Hopfen-β-Säuren + 50 ppm Harzsäuren; 8... erdkontaminiert + 100 ppm Hopfen-β-Säuren + 100 ppm Harzsäuren;

Ergebnisse aus Stresstests in Rübenpressschnitzelsilagen mit Clostridien

Abbildung 2 bietet einen ersten optischen Eindruck für ausgewählte Varianten des Pressschnitzelversuchs über den gesamten Silierverlauf. In dieser Darstellung kann vor allem die zumeist nach 15 Tagen Silierdauer beginnende Dynamik des Milchsäureabbaus zu Buttersäure beobachtet werden. Im Vergleich zum Grassilageversuch wurde im Pressschnitzelversuch weniger Gesamtsäure gebildet.

In Tabelle 2 sind pH-Werte, Trockensubstanzen und die Gärsäurezusammensetzung der Varianten des Pressschnitzelversuchs nach 90 Tagen Silierdauer zusammengefasst. In diesem Versuch sind die ermittelten Trockensubstanzen sehr homogen, ein signifikanter Unterschied ist aber bei der Variante mit Ameisensäurezusatz erkennbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die rasche pH-Absenkung eine verringerte Stoffwechselaktivität von im Siliergut enthaltenen Mikroorganismen und damit geringere Trockensubstanzverluste bewirkt.

Im Gegensatz dazu können bei den pH-Werten nach 90 Tagen deutliche Unterschiede zwischen den Varianten festgestellt werden. Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der Gärsäurezusammensetzung wider. Im Folgenden soll auf die Buttersäuregehalte als dem wichtigsten Parameter in den Untersuchungen näher eingegangen werden.

Während in unbehandelten Pressschnitzeln (Var. 1) kaum Buttersäure gefunden werden konnte, zeigten sich in erdkontaminierten Pressschnitzeln (Var. 2) nach 90 Tagen Silierdauer sehr hohe Werte. Demnach erfolgte über den

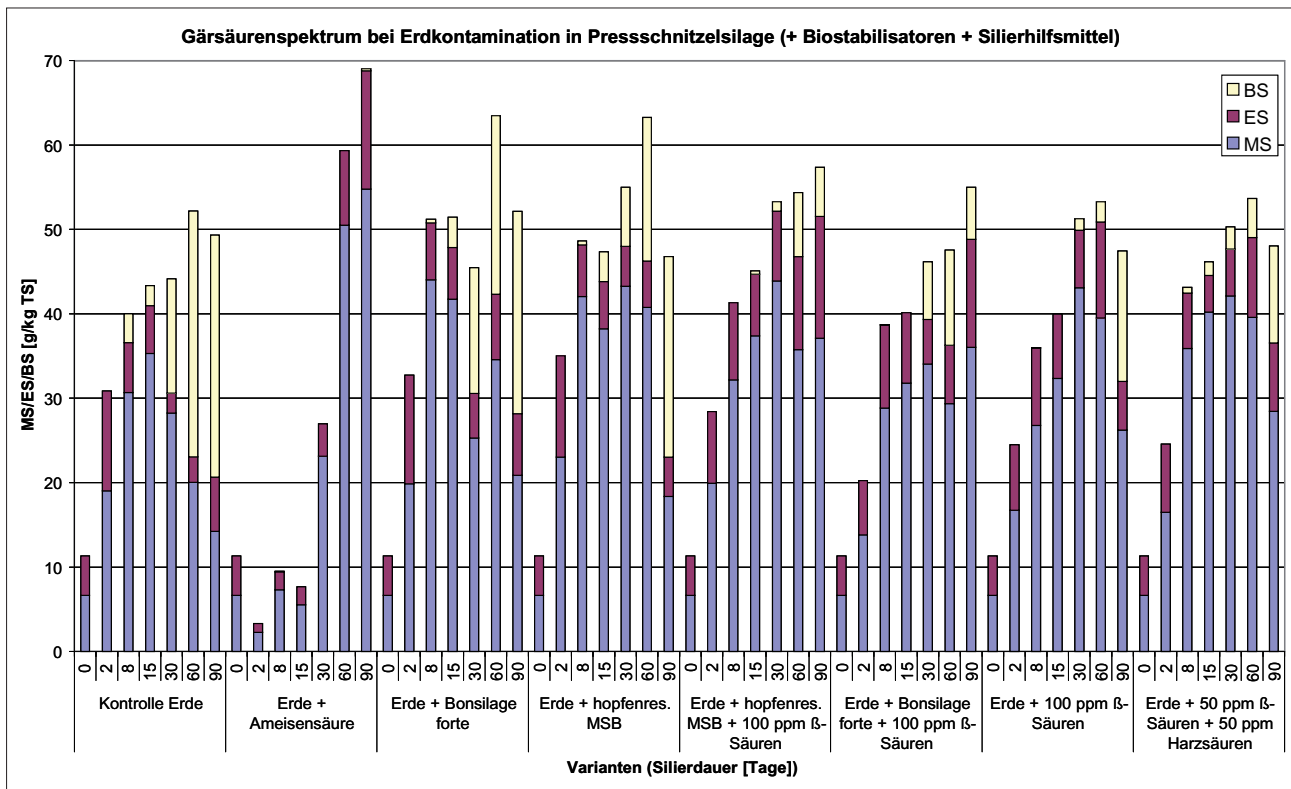


Abbildung 2: Gärsäurenmuster von ausgewählten Varianten im Pressschnitzelversuch; BS = Buttersäure, ES = Essigsäure, MS = Milchsäure

Tabelle 2: Multipler Mittelwertvergleich der Varianten des Pressschnitzelversuchs nach 90 Tagen Silierdauer, Angaben der Gärsäuren in mg/kg TS; Testverfahren: Tukey's HSD Test mit Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,01$; Var. = Variante, MS = Milchsäure, ES = Essigsäure, BS = Buttersäure, EtOH = Ethanol;

Var.	TS	pH	MS	ES	BS	EtOH
1	27,79 ^a	3,73 ^a	54,82 ^f	16,15 ^g	1,71 ^a	14,81 ^d
2	27,80 ^a	4,28 ^{ef}	14,22 ^a	6,45 ^{ab}	28,64 ^f	12,85 ^b
3	28,80 ^b	3,68 ^a	54,76 ^f	14,02 ^{fg}	0,26 ^a	1,52 ^a
4	27,13 ^a	4,19 ^{cde}	20,88 ^{bc}	7,27 ^{ab}	23,98 ^e	14,90 ^d
5	27,40 ^a	4,23 ^{def}	18,37 ^{ab}	4,63 ^a	23,76 ^e	13,80 ^c
6	27,25 ^a	4,01 ^b	36,33 ^e	13,35 ^{ef}	8,11 ^{bc}	21,51 ^{fg}
7	27,38 ^a	4,00 ^b	37,12 ^e	14,42 ^{fg}	5,82 ^b	25,41 ⁱ
8	27,28 ^a	4,03 ^b	32,00 ^{de}	11,27 ^{de}	9,33 ^{bc}	22,08 ^g
9	27,10 ^a	4,03 ^b	36,05 ^e	12,79 ^{def}	6,13 ^b	23,64 ^h
10	27,34 ^a	4,10 ^{bcd}	31,72 ^{de}	10,69 ^{cd}	9,66 ^{bc}	21,46 ^{fg}
11	27,58 ^a	4,30 ^{ef}	26,24 ^{cd}	5,77 ^{ab}	15,43 ^d	20,78 ^f
12	27,40 ^a	4,37 ^f	15,48 ^{ab}	6,13 ^{ab}	26,32 ^{ef}	16,86 ^e
13	27,05 ^a	4,15 ^{bcd}	28,45 ^d	8,11 ^{bc}	11,46 ^{cd}	21,62 ^{fg}

1...unbehandelte Pressschnitzel; 2...erdkontaminierte Pressschnitzel; 3...erdkontaminiert + Ameisensäure; 4...erdkontaminiert + Bonsilage forte; 5...erdkontaminiert + hopfenresistente MSB; 6... erdkontaminiert + hopfenresistente MSB + 50 ppm Hopfen- β -Säuren; 7...erdkontaminiert + hopfenresistente MSB + 100 ppm Hopfen- β -Säuren; 8...erdkontaminiert + Bonsilage forte + 50 ppm Hopfen- β -Säuren; 9...erdkontaminiert + Bonsilage forte + 100 ppm Hopfen- β -Säuren; 10...erdkontaminiert + 50 ppm Hopfen- β -Säuren; 11...erdkontaminiert + 100 ppm Hopfen- β -Säuren; 12...erdkontaminiert + 25 ppm Hopfen- β -Säuren + 25 ppm Harzsäuren; 13...erdkontaminiert + 50 ppm Hopfen- β -Säuren + 50 ppm Harzsäuren;

Erdzusatz ein massiver Eintrag von Clostridien und eine dementsprechende Buttersäurefehlgärung.

Ameisensäure (Var. 3) andererseits unterdrückt Buttersäurebildung beinahe vollständig. Demgegenüber konnte mit einem biologischer Silagestarter bei empfohlener Einsatzkonzentration (Var. 4, Bonsilage forte) bzw. hopfenresistenten Milchsäurebakterien bei 10^5 KBE (Var. 5) kaum ein Effekt erzielt werden. Mit Biostabilisatoren behandelte erdkontaminierte Pressschnitzel, mit Ausnahme von Variante 12 „erdkontaminiert + 25 ppm Hopfen- β -Säuren“, zeigen im Gegensatz dazu signifikant geringere Buttersäurewerte.

Die gemeinsame Anwendung von Milchsäurebakterien (Bonsilage forte, hopfenresistente MSB) mit Hopfen- β -Säuren (Var. 6, 7, 8, 9) führt zu einer weiteren Verbesserung, insbesondere in der jeweils höheren der beiden getesteten Hopfen- β -Säuren Konzentrationen. Die Tatsache, dass hopfenresistente MSB mit Hopfen- β -Säuren etwas besser abschneiden als die Kombination aus Bonsilage forte und Hopfen- β -Säuren mag neben der an ihnen bestimmten Hopfenresistenz an der Verwendung von stoffwechselaktiven 24-h-Kulturen der hopfenresistenten Keime liegen. Andererseits sind diese aus dem Braubereich stammenden Mikroorganismen kaum an die Bedingungen in Silagen adaptiert. Interessanterweise können auch die in Bonsilage forte enthaltenen Milchsäurebakterien bei höheren Konzentrationen an Hopfen- β -Säuren im Siliergut wachsen und auf diese Weise den Abbau von Milchsäure zu Buttersäure verhindern. Ein Ergebnis das aufgrund von eigenen Beobachtungen in Vorversuchen nicht ganz unerwartet ist. Dies

sogar obwohl bewusst darauf geachtet wurde, die Milchsäurebakterien gleichzeitig mit den Wirkstoffen zu applizieren. Insgesamt werden Clostridien in Pressschnitzelsilagen, behandelt mit Kombinationen aus Milchsäurebakterien und Hopfen- β -Säuren, wesentlich besser unterdrückt als bei alleiniger Anwendung eines der beiden Präparate.

Vergleicht man nun die Trends aus den Tests mit Gras- und Pressschnitzelsilagen, so treten bei den Pressschnitzelsilagen erwartungsgemäß mit zunehmender Konzentration an Hopfen- β -Säuren auch geringere Buttersäuregehalte auf (dies trifft auch auf die kombinierte Anwendung mit Milchsäurebakterien zu). In der Planung der Grassilageversuche wurde auf Erfahrungen zum Einsatz der Wirkstoffe in Vorversuchen in Pressschnitzeln zurückgegriffen. Im Grassilageversuch lieferte dann jedoch überraschenderweise die niedrigste Hopfen- β -Säuren Konzentration bessere Ergebnisse. Dies deutet auf eine Überdosierung der Wirkstoffe und eine Beeinträchtigung der Milchsäuregärung hin und zeigt, dass es für die beiden Materialien (Pressschnitzel und Gras) unterschiedliche optimale Wirkstoffkonzentration gibt.

4. Literatur

- BEUCHAT, L.R. and D.A. GOLDEN (1989): Antimicrobials Occurring Naturally in Foods. *Food Technology* 43 (1), 134-142
- BROCKMANN, R., DEMMERING, G., KREUTZER, U., LINDEMANN, M., PLACHENKA, J. and U. STEINBERNER (1987): Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th Edition, VCH-Verlag Weinheim, Vol. A10, pp. 245-276
- DLG (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft) (2006): Praxishandbuch Futtermittelkonservierung. 7. Auflage, DLG-Verlag Frankfurt (Main), 353 pp.
- EMERSTORFER, F. (2005): Wirksamkeit von natürlichen Biostabilisatoren gegen mesophile schleimbildende Bakterien. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur, Vienna, 116 pp.
- GUDMUNDSON, C. (1998): Danisco Sugar's experience with hops extracts as alternative for formaldehyde. VDZ Hauptversammlung. Dresden. Bericht Zuckerindustrie 123, 456
- HEIN, W. and G. POLLACH (1997): Neue Erkenntnisse beim Einsatz von Hopfenprodukten in der Zuckerindustrie. *Zuckerindustrie* 122, 940-949
- HEIN, W., POLLACH, G. and G. RÖSNER (2002): Studien zu mikrobiologischen Aktivitäten bei der Dicksaftlagerung. *Zuckerindustrie* 127, 243-257
- HEIN, W., POLLACH, G. and F. EMERSTORFER (2006): 10 years' experience with natural antibacterials within Agrana. *Sugar Industry* 131, 477-491
- HOLLAUS, F. and G. POLLACH (1986): Verbesserung der Schnitzelabpressung durch gesteuerte Infektion. *Zuckerindustrie* 111, 1025-1030
- HORNSEY, I. (2007): The chemistry and biology of winemaking. 1st Edition. RSC-Publishing. Cambridge, 457 pp.
- JOHNSON, H. and A. KRÜGER (1973): Das große Buch vom Wein. Erweiterte Neuauflage. Gräfe und Unzer Verlag, München 403 pp.
- NARZIB, L. (1986): Abriss der Bierbrauerei. 5. ergänzte Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 404 pp.
- POLLACH, G. and F. HOLLAUS (1988): Nutzung Monosaccharidabbauender Infektionen in der Extraktion zwecks Verbesserung der Schnitzelabpressung. *Zuckerindustrie* 113, 132-136
- POLLACH, G. (1995): Verfahren zur Hemmung thermophiler Mikroorganismen in Gegenwart zuckerhaltiger, wässriger Medien. EP 0 681 029 A2, Zuckerforschung Tulln GmbH
- POLLACH, G., HEIN, W. and F. HOLLAUS (1996): Use of hop products as bacteriostaticum in the sugar industry. *Sugar Industry* 121, 919-926
- POLLACH, G., HEIN, W. and G. RÖSNER (1999): Neue Erkenntnisse zur Lösung mikrobieller Probleme in Zuckerfabriken. *Zuckerindustrie* 124, 622-637
- POLLACH, G. and W. HEIN (2001): Verfahren zur Herstellung von Zucker oder zuckerhaltigen Produkten aus zuckerhaltigen pflanzlichen Rohstoffen. PCT Patent Application WO 01/88205 A1, Zuckerforschung Tulln GmbH
- POLLACH, G., HEIN, W. and D. BEDDIE (2002): Application of hop beta acids and rosin acids in the sugar industry. *Sugar Industry* 127, 921-930
- POLLACH, G. (2002): Personal communication, lecture documents as presented at the SPRI-conference in Atlanta (US) in 2002;
- POLLACH, G., HEIN, W. and D. BEDDIE (2004): The concept of different natural antibacterials for the sugar industry. *Sugar Industry* 129, 555-564
- SÖDERBERG, T.A., GREF, R., HOLM, S., ELMROS and G. HALLMANS (1990): Antibacterial activity of rosin and resin acids in vitro. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand. Surg.* 24, 199-205
- SZALAY, E.-V. (2007): Zur antimikrobiellen Wirkung von Biostabilisatoren pflanzlichen Ursprungs im Hinblick auf Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Lebensmittelkette. Diplomarbeit, Universität Wien, Vienna, 109 pp.
- WILKINSON, J.M. and M.I. TOIVONEN (2003): World silage – a survey of forage conservation around the world. Chalcombe Publications; Lincoln, United Kingdom, 205 pp.