

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI INTÉZET

UJHELYI IMRE ÁLLATTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola-vezető:
Prof. Dr. Benedek Pál DSc

Az állati eredetű termékek feldolgozása és minőségbiztosítása program

Programvezető:
Prof. Dr. habil. Szigeti Jenő CSc

Tudományos vezetők:
Prof. Dr. habil. Szigeti Jenő CSc

Dr. Ásványi Balázs PhD

KACSAMÁJ KÉSZÍTMÉNYEK HŐKEZELÉSÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA

Készítette:
SIPOS-KOZMA ZSÓFIA

Mosonmagyaróvár
2010

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

1.1. Bevezetés

A dolgozatban a víziszárnyas májakban előforduló és a konzerv stabilitás szempontjából döntő fontosságú *Clostridium (C.) perfringens* és *Clostridium sordellii* spórák, továbbá a félkonzerv eltarthatóság szempontjából indikátor organizmusnak tekinthető *Enterococcus (Ec.) faecalis* élősejtek hőtüró képességét vizsgáltuk különböző hőmérsékleteken. Sor került ezen adatok felhasználásával egy speciális ízesítésű kacsamáj félkonzerv gyártástechnológiájának kifejlesztésére.

1.2. Célkitűzések

1. A felhasznált kacsamáj mikrobiológiai állapotának meghatározása és összevetése a 4/1998 EüM rendelet (hatályos: 2007.11.06.) előírásaival.

2. Irodalmi adatok és saját vizsgálatok alapján meghatározni nyers hízott kacsamáj jellemző leghőtűrőbb mikroorganizmusait, illetve előfordulásuk gyakoriságát.

3. Táplévesek kiválasztása *Clostridium perfringens* (NCAIM-B-01417 és NCTC 1265) és *Clostridium sordellii* ATCC 9714 törzsek optimális spóratermeléséhez, valamint egy *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 törzs legintenzívebb szaporodásához. Spóráztatási kísérletek segítségével kiválasztani a nagyobb mennyiségben spórát termelő *Clostridium perfringens* törzset.

4. Előzetes vizsgálatok alapján meghatározni 100 °C alatti hőmérsékleten az optimális hőkezelési hőmérsékletet és hőtartási időt, egyrészt a leghőtűrőbb nem spórázó ubiquiter mikroflóra vezéralakjának az

Enterococcus faecalis-nak és a félkonzerv, illetve a *Clostridium* fajok esetében a háromnegyed vagy teljes konzerv előállításához.

5. A hazai és a nemzetközi termékpalettát alapul véve egy kacsamáj félkonzerv gyártástechnológiájának kidolgozása.

6. Mesterségesen, mikrobákkal (*Clostridium* és *Enterococcus* fajok) befertőzött kacsamáj félkonzervben hőpusztítási vizsgálatok elvégzése.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokra a Nyugat-magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kara Élelmiszertudományi Intézetének Deutsche Gesellschaft für Akkreditierung mbH által akkreditált mikrobiológiai laboratóriumában került sor.

2.1. A nyers kacsamáj mikrobiológiai állapotának ellenőrzése

A szerző a vizsgálatokhoz hazai termelőktől származó 20 mulardkacsa máját használta fel, amelyek mikrobiológiai állapotának ellenőrzését a 4/1998 EüM rendelet (1. táblázat) előírásai szerint végezte.

1. táblázat Az élelmiszer-előállítás belső minőségellenőrzését szolgáló mikrobiológiai vizsgálatok és ajánlott határértékek (4/1998 EüM rendelet)

Megnevezés	Vizsgálat	n	c	m	M
Nyershús, hústermékek					
Darabolt hús, belsőség, darált hús, baromfi (nyers, egész és darabolt)	<i>Salmonella</i>	5	-	-	0/25g
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	50/g	5x10 ²
	Mikrobaszám	5	3	10 ⁶	10 ⁷

n: elemi minta száma

c: az "m" értéket elérő vagy meghaladó elemi minták eltűrhető száma

"m": megfelelőség határértéke

"M": visszautasítás határértéke

A rendelet alapján meghatározásra került a mezofil aerob élősejtszám, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, valamint az *Escherichia coli* mellett a mezofil szulfitredukáló klosztridiumok, ezen belül a *Clostridium perfringens*, a *Clostridium sordellii*, valamint az *Enterococcus faecalis* és az *Enterococcus faecium* mikroorganizmusok is.

2.2. A kísérletbe bevont törzsek spóráztatása

A liofilezett, vákuumzárásos, dupla ampullában lévő *C. perfringens* (NCAIM-B-01417 és NCTC 1265) és *C. sordellii* ATCC 9714 törzsek Reinforced Clostridial Medium (RCM) (Merck KGaA, Darmstadt) tápvelesben kerültek felélesztésre és az inkubálás anaerob körülmények között 37 ± 1 °C-on 7 napig történt. Az inkubálási idő lejárta után tömény szuszpenzió került előállításra: az RCM tápvelesben lévő tenyészet 30 cm^3 -es steril centrifugacsövekbe történő adagolását követően temperált körülmények között (10 °C) Sigma 3K12 centrifugában (Sigma GmbH, Osterode, Németország) került sor a centrifugálásra. A centrifugálás után a felülúszót eltávolítva 1/4-es erősségű Ringer oldattal való többszöri átmosást követően tiszta szuszpenzió előállítására került sor.

A liofilezett *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 törzset 10 cm^3 agyszív tápvelesben (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) élesztette fel a szerző. Az inkubálás 37 ± 1 °C-on 2 napig történt aerob körülmények között.

A *Clostridium perfringens* (NCAIM-B-01417 és NCTC 1265) törzsek spóráztatására szakirodalmi közlések alapján Ellner (1956), Kim és munkatársai (1967), valamint Duncan és Strong (1968) által ajánlott spóráztató tápvelesek kerültek kiválasztásra.

Szakirodalmi közlemények hiányában a *Clostridium sordellii* 9714 spóráztatására Schaeffer és munkatársai (1963) által javasolt spóráztató tápveles került felhasználásra.

A szerző a spóráztató tápvelesek $100\text{-}100\text{ cm}^3$ -ébe a centrifugálás után nyert törzssuszpenzió $10\text{-}10\text{ cm}^3$ -ét helyezte, majd az inkubálást anaerob körülmények között 3 napig 37 ± 1 °C-on végezte. Az inkubálási idő lejárta után egy napos 4 ± 3 °C-os hűtőszekrénybe történő hűtést követően,

meghatározásra került a spóraszám Plate Count (PC) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) táptalaj segítségével a minta 80 °C-on 10 percig tartó hőkezelése után.

2.3. Hőtűrési vizsgálatok

A szerző a *Clostridium sordellii* ATCC 9714 és a *Clostridium perfringens* NCTC 1265 spóraszuszpenzió 10-10 cm³-ét steril kémcsőbe pipettázta és 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C hőmérsékletű vízfürdőben (1003; Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgnedel, Németország) elvégezte a hőkezelést. *Clostridium sordellii* ATCC 9714 esetében 80 °C és 85 °C-on 120 percig 30 percenkénti, 90 °C-on és 95 °C-on 12, illetve 6 percenkénti leoltásokat alkalmazva. A *Clostridium perfringens* törzssel 80 °C-on 120 percig, 85 °C-on 60 percig végezte a hőkezelést 15 percenkénti leoltásokkal, 90 °C-on 14, míg 95 °C-on 8 percig tartottak a hőkezelési vizsgálatok 2 percenkénti leoltásokkal. A spóraszuszpenzióból a leoltási időpontokban kivett mintát jegesvizes fürdőbe helyezte, majd lemezöntéssel módszerrel Plate Count (PC) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) táptalajon határozta meg a spóraszámot anaerob körülmények között 37±1 °C-on, 3 napig inkubálva.

Az *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 esetében is sor került a hőkezelési vizsgálatokra 60 °C, 62 °C, 65 °C és 70 °C-on. Az alacsonyabb hőmérsékletek kiválasztása azért volt szükséges, mivel a félkonzervek esetében nem cél az endospórák elpusztítása. 60 °C-on egy órán keresztül történt a hőkezelés, kezdetben 10 percenkénti, majd a hőkezelés 30. percétől 5 percenkénti leoltásokkal. 62 °C-on a hőkezelési vizsgálat 25 percen keresztül zajlott 5 percenkénti leoltásokkal, míg 65 °C és 70 °C-on 5 percig történt a hőkezelés fél percenkénti leoltásokkal. A hőkezelt szuszpenzióból

Citrate Azide Tween Carbonate (CATC) tápagar (Merck) felszínén 0,1-0,1 cm³ minta került elszélesztésre és az inkubáció 48 órán keresztül 37±1 °C-on történt. Minden hőkezelési vizsgálat 3-3 ismétlésben, 2-2 független párhuzamossal zajlott.

2.4. A kacsamáj félkonzervvel végzett hőtűrési vizsgálatok

A termékfejlesztés során a szerző közreműködött kereskedelmi forgalomban már kapható kacsamáj félkonzerv gyártástechnológiájának kidolgozásában. A Magyarországon gyártott félkonzerveknél cél, hogy élvezeti értékben megközelítsék és versenyképesek legyenek a hasonló francia termékekkel szemben. A félkonzervek 200 és 400 g-os kiszerelésben készültek, amelyek mind a magánháztartások, mind pedig a vendéglátóipar igényeit maradéktalanul kielégítik. A 200 g-os félkonzervet 105 °C-on 35 percig tartó hőkezelésnek vetik alá. Ebben az esetben nem kell számolni az enterokokkuszos túlélésével, viszont az organoleptikus tulajdonságok romlanak, ezért a hőkezelés hőmérsékletét 100 °C alá kell csökkenteni. A 400 g-os termék esetében 62 °C-on 120 percig tartott a hőkezelés.

Az elkészített kacsamáj félkonzerv mesterséges befertőzésére került sor *Clostridium sordellii* ATCC 9714 és *Clostridium perfringens* (NCTC 1265) spóraszuszpenzióval, valamint *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 törzssuszpenzióval. A hőkezelési kísérletek célja annak vizsgálata, hogy milyen hosszú behatási idő szükséges a félkonzervben jelenlévő *C. perfringens* NCTC 1265 és *C. sordellii* ATCC 9714 spóráinak elpusztítására magasabb (80-95 °C), illetve az *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 esetében alacsonyabb, 60-65 °C-on történő két nagyságrendnyi sejtszám csökkentéséhez. A hőtűrési vizsgálatok vízfürdőben (1003; Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgnedel, Németország) zajlottak, a modell

tápközegben elvégzett hőtűrési vizsgálatokhoz hasonlóan azonos hőkezelési hőmérsékleteket és hőtartási időket alkalmazva (**2.3. fejezet**). A termék maghőmérsékletének folyamatos nyomonkövetésére zárt rendszerű, kétcsatornás „Testo” hőmérsékletgyűjtő rendszert alkalmazva fél percenként történt a maghőmérséklet ellenőrzése. A hőkezelési vizsgálatok 3-3 ismétlésben, 2-2 független párhuzamossal történtek.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. Kacsamáj mikrobiológiai vizsgálatának eredményei

A vizsgált nyers kacsamáj minták mikrobiológiai szempontból megfelelőek, de nem kifogástalan a minőségük. Az összes élő sejtszám egyik esetben sem haladta meg a 4/1998 EüM rendeletben előírt határértéket. Az *Escherichia coli* esetében 3 minta, *Staphylococcus aureus* vonatkozásában 2 minta haladta meg az „m” értéket, de a „M” értéket nem érte el, így a májminőség valóban megfelelőnek mondható. A rendeletben foglaltakon kívül meghatározása került még a mezofil szulfitredukáló *Clostridium*, ezen belül a *Clostridium perfringens* és a *Clostridium sordellii* mikroorganizmusok, valamint az *Enterococcus faecalis* és az *Enterococcus faecium* baktériumok száma. 13 májminta tartalmazott mezofil szulfitredukáló klosztridiumot. A pozitív minták nem tartalmaztak *Clostridium sordellii*-t ($<1,0 \times 10^1$ CFU/g), de *C. perfringens*-t mind a 13 mintából sikerült izolálni és azonosítani. A nyers kacsamáj minták egyike sem tartalmazott, *Enterococcus faecalis* és *Enterococcus faecium* baktériumot az alkalmazott kimutatási határérték felett ($<1,0 \times 10^1$ CFU/g).

3.2. *Clostridium* spóráztatási kísérletek eredményei

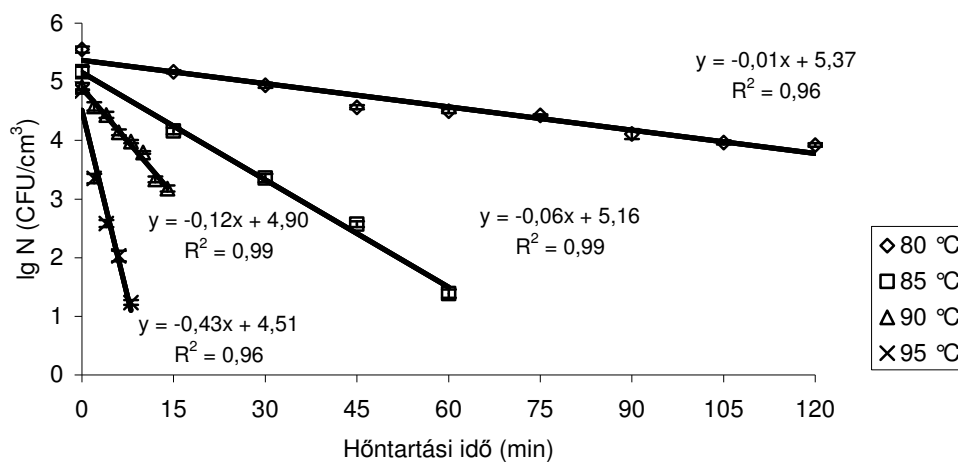
A spóráztatás eredményeként elmondható, hogy mindkét *C. perfringens* törzs (NCAIM-B-01417 és NCTC 1265) esetében a kapott spóramennyiségek között a Duncan és Strong (1968) által ajánlott spóráztató táplevessel termelődött szignifikánsan ($P < 0,05$) magasabb spóra. A két *C. perfringens* törzs közül az NCTC 1265 törzsszel sikerült szignifikánsan ($P < 0,05$) jobb eredményt ($4,1 \times 10^5$ CFU/cm³) elérni. A *Clostridium sordellii* ATCC 9714 esetében Ellner (1956), Kim és munkatársai (1967), valamint Duncan és Stong (1968) által javasolt spóráztató táplevesek nem bizonyultak

megfelelőnek, mivel ezekben a táplevesekben a *Clostridium sordellii* ATCC 9714 nem spórázott. Schaeffer és munkatársai (1963) által alkalmazott tápleves segítségével viszont $4,1 \times 10^5$ CFU/cm³ mennyiségben termelődött spóra, amely elegendőnek bizonyult a hőkezelési kísérletek elvégzéséhez.

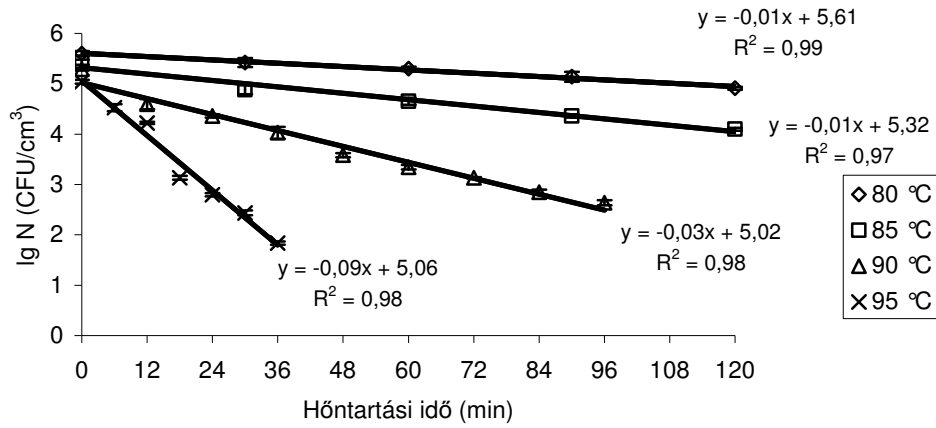
3.3. Hőtűrési vizsgálatok eredményei

A vizsgált törzsek (*Clostridium perfringens* NCTC 1265, *Clostridium sordellii* ATCC 9714, *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171) hőkezelés hatására bekövetkező spóraszám, illetve sejtszám változásának alakulását az

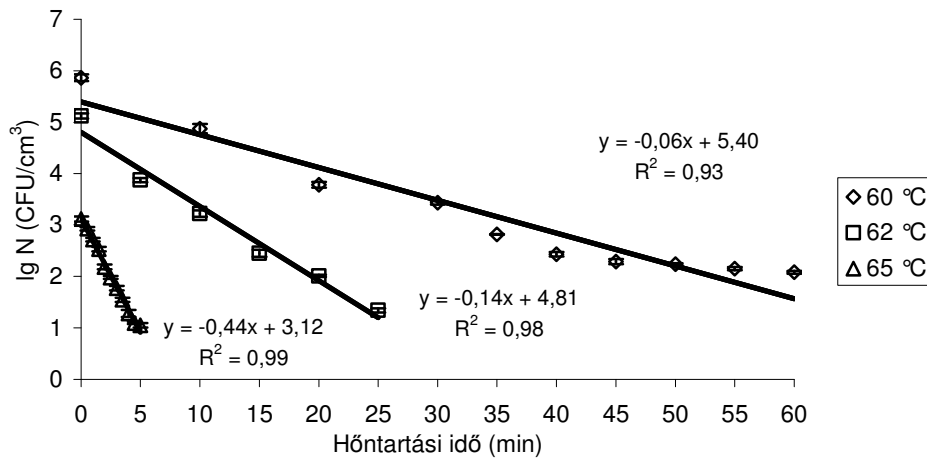
1.-3. ábra szemlélteti.



1. ábra *Clostridium perfringens* NCTC 1265 túlélési görbéje 80 °C, 85 °C, 90 °C és 95 °C -on (az adatok 6 vizsgálat átlag±szórását jelölik)



2. ábra *Clostridium sordellii* ATCC 9714 túlélési görbéje 80 °C, 85 °C, 90 °C és 95 °C-on (az adatok 6 vizsgálat átlag±szórását jelölik)

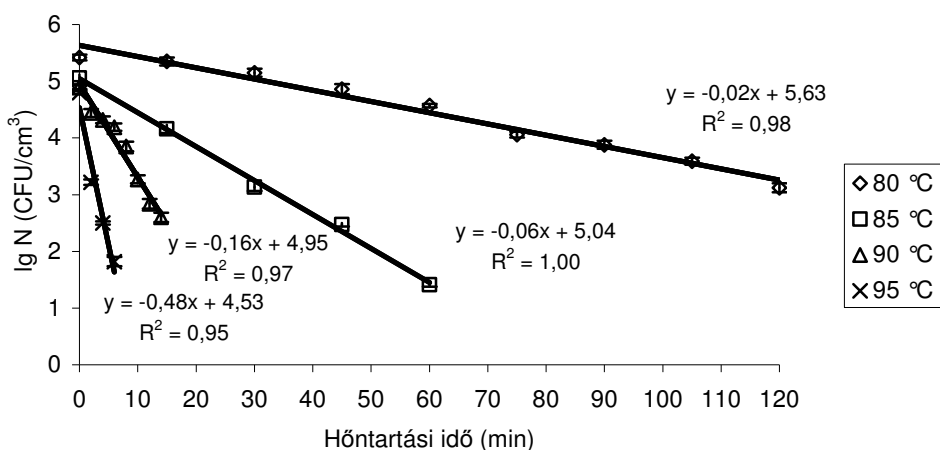


3. ábra *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 túlélési görbéje 60 °C, 62 °C és 65 °C-on (az adatok 6 vizsgálat átlag±szórását jelölik)

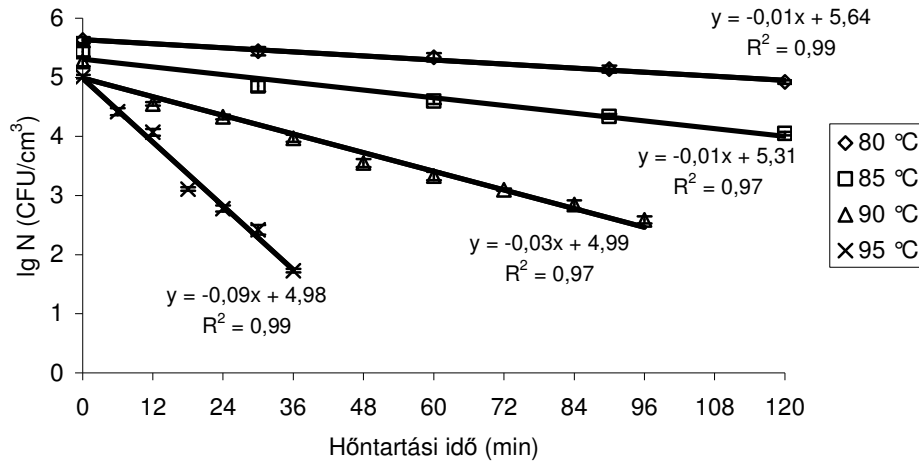
A tizedelési idők (D) a túlélési görbék egyenesének meredekségéből számíthatók ki. A tizedelési idő (D) a *C. perfringens* NCTC 1265 spórák esetében vizsgálataim szerint 75,2 perc (D_{80}) és 2,3 perc (D_{95}) között, *C. sordellii* ATCC esetében 181,8 (D_{80}) és 11,0 (D_{95}) perc között változott. Az *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 hőkezelési hőmérsékletekhez tartozó tizedelési ideje 15,7 perc (D_{60}) és 2,3 perc (D_{65}) között változott.

3.4. A kacsamáj félkonzervvel végzett hőkezelési kísérlet mikrobiológiai eredményei

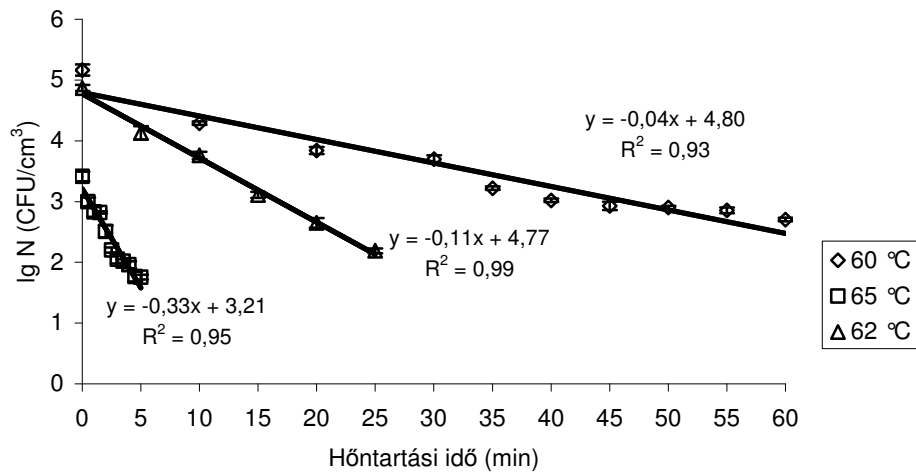
A *Clostridium perfringens* NCTC 1265, a *Clostridium sordellii* ATCC 9714 spóraszuszpenzióval, valamint az *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 élősejt szuszpenzióval mesterségesen befertőzött kacsamáj félkonzervvel végzett hőtűrési vizsgálatok eredményeit a **4.-6. ábra** segítségével mutatja be a szerző.



4. ábra *Clostridium perfringens* NCTC 1265 túlélési görbéje kacsamáj félkonzervvel végzett hőkezelési kísérletek eredményei alapján (az adatok 6 vizsgálat átlag±szórását jelölik)



5. ábra *Clostridium sordellii* ATCC 9714 túlélési görbéje kacsamáj félkonzervvel végzett hőkezelési kísérletek eredményei alapján (az adatok 6 vizsgálat átlag \pm szórását jelölik)



6. ábra *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 túlélési görbéje kacsamáj félkonzervvel végzett hőkezelési kísérletek eredményei alapján (az adatok 6 vizsgálat átlag \pm szórását jelölik)

A hőtűrési vizsgálatok eredményei alapján a *C. perfringens* NCTC 1265 spórák tizedelési ideje 50,5 perc (D_{80}) és 2,2 perc (D_{95}) között alakult kacsamáj félkonzervben, míg a *Clostridium sordellii* ATCC 9714 számított tizedelési ideje 175,4 perc $D_{(80)}$ és 11,1 perc $D_{(95)}$ volt. A hőkezelés során kapott túlélési görbékről leolvasott tizedelési idő *Enterococcus faecalis* HNCMB 80171 esetében 25,9 (D_{95}) és 3,1 (D_{95}) perc között változott.

Összességében, a hőtűrési vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a modell tápközegben a hőkezelés hatékonysága szignifikánsan ($P < 0,05$) nem különbözött a félkonzervben elvégzett hőkezelési kísérletek eredményeitől.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

AZ előző fejezetek alapján az elért új és újszerű kutatási eredmények összefoglalva a következők:

1. A hazai nyers víziszárnyas májak mikrobiológiai minősítése-amennyiben félkonzerv gyártási szempontokat is figyelembe veszünk-nem megfelelő. A vizsgálatokat a német szabvány (ASU L 00.00-20) szerinti szalmonella meghatározáshoz alkalmazott mintavételi módszer felhasználásával anaerob spórás mikrobaszám meghatározásra is ki kell terjeszteni.
2. A *Clostridium perfringens* (NCAIM-B-01417 és NCTC 1265) spóráztatására kiválasztott Duncan és Strong (1968), Ellner (1956), valamint Kim és munkatársai (1967) által javasolt táplevesek közül a Duncan és Strong (1968) által ajánlott tápleves segítségével sikerült szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb mennyiségben endospórákat előállítani. A *Clostridium sordellii* ATCC 9714 törzs endospóra termelésének elősegítésére Schaeffer és munkatársai (1963) által javasolt tápleves bizonyult a legalkalmasabbnak.
3. Irodalmi hivatkozások hiányában meghatároztam víziszárnyas készítményekben fellelhető *Clostridium sordellii* ATCC 9714 100 °C alatti hőpusztításának lehetőségeit. Megállapítottam, hogy a félkonzerv 100 °C alatti hőkezelése esetén, 90 °C-on 76,0 perc, 95 °C-on 22,2 perc alatt csökkenthető a vizsgált törzs endospóra száma a biztonságos májkészítmények előállításához szükséges 2 nagyságrenddel. Irodalmi adatok alapján hasonló spóraszám csökkenés ezzel a hődózissal a *Clostridium botulinum* E esetén is

elérhető. A *C. sordellii* ATCC 9714 számított z értéke 12,6 °C.

4. A *Clostridium perfringens* NCTC 1265 törzs tizedelési ideje kacsamáj félkonzervben 50,5 perc (D_{80}) és 2,2 perc (D_{95}) között alakult. Irodalmi adatokkal összehasonlítva megállapítható, hogy az általam mért tizedelési idők rövidebbek, mint a szakirodalomban feltüntetettek. A *C. perfringens* NCTC 1265 z értéke 11,1 °C volt, míg más szerzők 8,3 °C – 16,8 °C közötti értékekről számoltak be.
5. A modell tápközegbe és a kacsamáj félkonzervbe injektált, általam vizsgált mikroorganizmusok (*Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterococcus faecalis*) hőpusztulása között nem találtam szignifikáns ($P < 0,05$) eltérést.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK

LEKTORÁLT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK (PEER REVIEWED PAPERS)

Angolul (In English)

Zs. Sipos-Kozma, J. Szigeti, L. Varga, B. Ásványi, N. Ásványi-Molnár, Zs. Turcsán (2008) Determining the parameters of mild heat treatment destroying *Clostridium perfringens*. *Hungarian Agricultural Engineering* **21**, 70-72.

Zs. Kozma-Sipos, J. Szigeti, B. Ásványi, L. Varga (2009) Heat resistance of *Clostridium sordellii* spores. *Anaerobe* (benyújtva, lektorálva)

Magyarul

Sipos-Kozma, Zs., Ásványi, B., Szigeti, J., Varga, L. (2009) Spórás baktériumok hőpusztulása 100 °C alatti hőkezelés esetében. *Acta Agronomica Óváriensis* (megjelenés alatt)

Sipos-Kozma Zs., Szigeti, J., Varga, L., Ásványi, B. (2009) *Clostridium perfringens* spórák hőtűrésének vizsgálata. *Acta Agraria Kaposváriensis* (megjelenés alatt)

TUDOMÁNYOS KONFERENCIÁK TELJES TERJEDELEMBEN MEGJELENT ANYAGAI (PAPERS PUBLISHED IN PROCEEDINGS)

Angolul (In English)

Sipos-Kozma, Zs., Szigeti, J., Ásványi, B. (2008) Reducing spore counts in foods by mild heat treatment. International Conference on Science and Technique in the Agri-Food Business (ICoSTAF 2008), ISBN 978-963-482-908-9, November 5-6, 2008 Szeged pp. 170-176.

Magyarul (In Hungarian)

Szigeti, J., Varga, L., Ásványi, B. és **Sipos-Kozma, Zs.** (2008) Élelmiszerekben előforduló anaerob spórások kíméletes hőkezelése (Mild heat treatment of anaerobic foodborne sporeformers). *XXXII. Óvári Tudományos Napok „Élelmiszergazdaságunk Kérdőjelei Napjainkban”* ISBN 978-963-9883-05-5. Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai, Élelmiszer-tudományi Szekció, Mosonmagyaróvár, Compact Disc. (Az előadások és poszterek összefoglaló anyaga, Élelmiszer-tudományi Szekció, Mosonmagyaróvár) pp.1-6.