

Szigeti, J., Varga, L., Ásványi, B. & Sipos-Kozma, Zs. (2008) Élelmiszerekben előforduló anaerob spórások kíméletes hőkezelése. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 6 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

## ÉLELMISZEREKBE ELŐFORDULÓ ANAEROB SPÓRÁSOK KÍMÉLETES HŐKEZELÉSE

SZIGETI J. – VARGA L. – ÁSVÁNYI B. – SIPOS-KOZMA ZS.

Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Intézet  
9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 15-17.

### Mild heat treatment of anaerobic foodborne sporeformers

#### Abstract

The purpose of this study was to determine whether thermal treatments below 100°C are capable of reducing spore populations of *Clostridium sordellii* and *C. perfringens* by 2 log cycles. With varying holding times, the temperatures tested ranged from 80°C to 95°C. As for the trials conducted with *C. sordellii* at 90°C and 95°C, decreases of three and four orders of magnitude in spore counts were observed after 60 min and 36 min, respectively. For this reason, it was recommended that heat treatment of semi-preserved foods be done at these temperature–time combinations. In the case of *C. perfringens*, heating at 85°C, 90°C and 95°C resulted in a decrease of 2 log cycles in spore counts after 30 min, 10 min and 9,6 min, respectively. In conclusion, as compared to *C. sordellii* spores, decreased temperature may be applied for the effective destruction of *C. perfringens* spores.

#### BEVEZETÉS

Kísérletünk során a *Clostridium sordellii* és a *Clostridium perfringens* anaerob, patogén mikroorganizmusok spóráinak hőtűrését vizsgáltuk. Ehhez növelni kellett a két mikroorganizmus spóratermelését. A szakirodalomban leírt több spóráztató levest hasonlítottunk össze és ezek közül választottuk ki a legalkalmasabbat

Vizsgálataink célja megállapítani, az előállított *Clostridium sordellii* és *Clostridium perfringens* spórák 100 °C alatti hőkezelések alkalmazásával milyen hőtartási idővel pusztíthatók el.

#### ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM), valamint a Pasteur intézettől beszerzett *Clostridium perfringens* (NCAIM-B-01417), illetve *Clostridium sordellii* (ATCC 9314) törzsekkel végeztük a hőkezelési vizsgálatokat.

A fagyasztva szárított, vákuumzárásos, dupla ampullában lévő törzseket Reinforced Clostridial Medium (RCM) (Merck KgaA, Darmstadt) táplevesben élesztettük fel és inkubáltuk anaerob körülmények között 37 °C-on 7 napig.

Az inkubálási idő lejártá után tömény szuszpenziót állítottunk elő centrifugálással. Az RCM táplevesben lévő tenyészetet 30 cm<sup>3</sup>-es centrifugacsövekbe adagoltuk steril

Szigeti, J., Varga, L., Ásványi, B. & Sipos-Kozma, Zs. (2008) Élelmiszerekben előforduló anaerob spórások kíméletes hőkezelése. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 6 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

körülmények között és 5000 fordulat/perc sebességgel, 4500 G-n, 15 percig temperált körülmények között centrifugáltuk (10 °C).

A centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, majd 1/4 -es erősségű Ringer oldattal való többszöri mosatás után tiszta szuszpenziót állítottunk elő.

#### *Vegetatív sejtszám és spóraszám meghatározása*

A tisztítást követően meghatároztuk a vegetatív sejtszámot és a kezdeti spóraszámot. A vegetatív sejtszám meghatározásnál a mintát hőkezelés nélkül leoltottuk Plate Count Agar (PC) táptalajra, illetve Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC) táptalajra, valamint a kezdeti spóraszám meghatározáshoz a minta 80 °C-on 10 percig tartó hőkezelése után végeztük el a leoltást a két említett táptalajra (PC és TSC), a lemezeket anaerob körülmények között inkubáltuk.

A spórázás elősegítése érdekében egy-egy centrifugacső tartalmát *Clostridium sordellii* esetében 500 cm<sup>3</sup> Norris és Ribbons (1971), míg *Clostridium perfringens* esetében 500 cm<sup>3</sup> Duncan és Strong (1968) által ajánlott és azóta is alkalmazott (Byrne és mtsai, 2006) spóráztató táplevesbe helyeztük. Három napig 37 °C-on, anaerob körülmények között inkubáltuk és az inkubációs idő lejártá után egy napra 4 °C-os hűtőszekrénybe helyeztük.

#### *Hőkezelési vizsgálatok*

A spóraszám meghatározása céljából a mintákat 80 °C-on 10 percig tartó hőkezelésnek vetettük alá. A hőkezelési kísérletek során a *Clostridium sordellii* és a *Clostridium perfringens* spóraszuszpenzió 10-10 cm<sup>3</sup>-ét 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C hőmérsékletű vízfürdőben hőkezeltük, különböző hőntartási idők mellett.

A hőkezelt spóraszuszpenzióból adott időpontokban lemezöntéses módszerrel PC táptalajon meghatároztuk a spóraszámot anaerob körülmények között 37 °C-on, 2 napig. Az inkubációs idő lejártá után a csíraszámot az értékelésbe bevont lemezeken megszámlált telepszámok súlyozott átlagaként adtuk meg a hígítási fok figyelembe vételével.

## **EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK**

### **Vegetatív sejtszám és spóraszám eredmények**

Felszaporításkor a vegetatív sejtszám az **1. és 2. táblázat** szerint alakult:

**1. táblázat** *Clostridium sordellii* vegetatív sejt és spóraszám felélesztés után

| <i>Clostridium sordellii</i>          | PC táptalaj          | TSC táptalaj        |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------|
| Vegetatív sejt (CFU/cm <sup>3</sup> ) | 7,72x10 <sup>3</sup> | 6,8x10 <sup>3</sup> |
| Spóraszám (CFU/cm <sup>3</sup> )      | <1x10 <sup>0</sup>   | <1x10 <sup>0</sup>  |

**2. táblázat** *Clostridium perfringens* vegetatív sejt és spóraszám felélesztés után

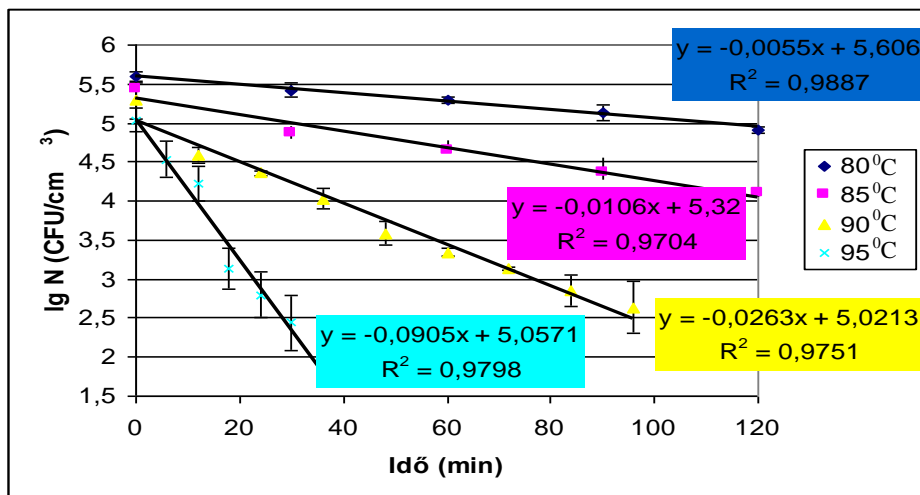
| <i>Clostridium perfringens</i>        | PC táptalaj          | TSC táptalaj         |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Vegetatív sejt (CFU/cm <sup>3</sup> ) | 1,62x10 <sup>3</sup> | 1,51x10 <sup>3</sup> |
| Spóraszám (CFU/cm <sup>3</sup> )      | <1x10 <sup>0</sup>   | <1x10 <sup>0</sup>   |

Szigeti, J., Varga, L., Ásványi, B. & Sipos-Kozma, Zs. (2008) Élelmiszerekben előforduló anaerob spórások kíméletes hőkezelése. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 6 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

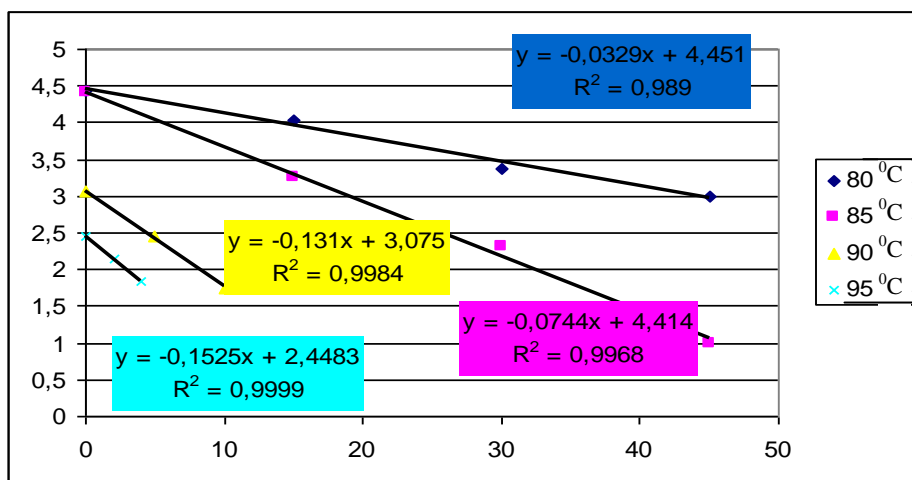
A spóráztatás után elért *Clostridium sordellii* spóraszám  $4,21 \times 10^5$  CFU/cm<sup>3</sup>, a *Clostridium perfringens* spóraszám  $1,97 \times 10^4$  CFU/cm<sup>3</sup>. volt

Hőkezelési kísérletek eredményei

A hőkezelési kísérletek eredményei az 1. és 2. ábrán láthatók:



1. ábra *Clostridium sordellii* összesített túlélési görbéje 80, 85, 90, 95 °C-on



2. ábra *Clostridium perfringens* összesített túlélési görbéje 80, 85, 90, 95 °C-on

A *Clostridium sordellii* és a *Clostridium perfringens* tizedre csökkenési idejét a 3. és a 4. táblázatban foglaltuk össze:

3. táblázat *Clostridium sordellii* tizedelési, lg D és lg t értékei

| Hőkezelés hőmérséklete (°C) | Tizedelési idő-D (min) | lg D | lg t  |
|-----------------------------|------------------------|------|-------|
| 80 °C                       | 173,91                 | 2,24 | 3,319 |
| 85 °C                       | 90,22                  | 1,95 | 3,029 |
| 90 °C                       | 36,22                  | 1,55 | 2,629 |
| 95 °C                       | 1,25                   | 1,05 | 2,129 |

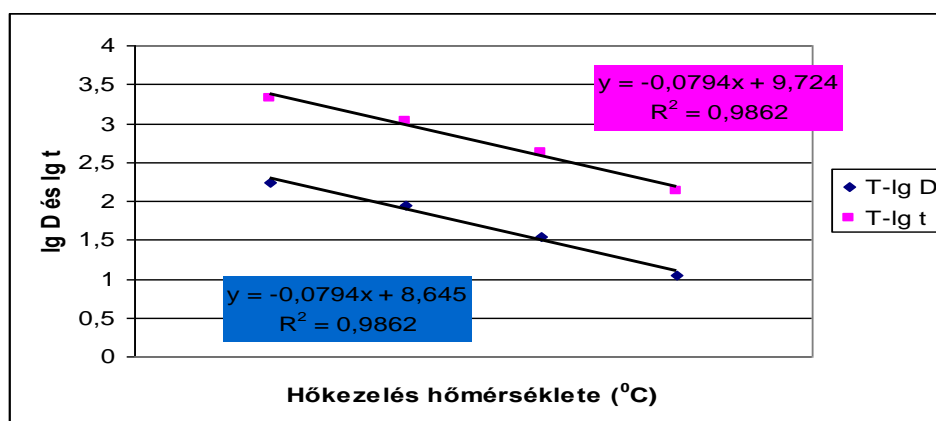
Szigeti, J., Varga, L., Ásványi, B. & Sipos-Kozma, Zs. (2008) Élelmiszerekben előforduló anaerob spórások kíméletes hőkezelése. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 6 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

**4. táblázat** *Clostridium perfringens* tizedelési, lg D és lg t értékei

| Hőkezelés hőmérséklete (°C) | Tizedelési idő-D (min) | lg D | lg t  |
|-----------------------------|------------------------|------|-------|
| 80 °C                       | 83,92                  | 1,92 | 2,999 |
| 85 °C                       | 35,3                   | 1,54 | 2,619 |
| 90 °C                       | 7,63                   | 0,88 | 1,959 |
| 95 °C                       | 6,55                   | 0,81 | 1,889 |

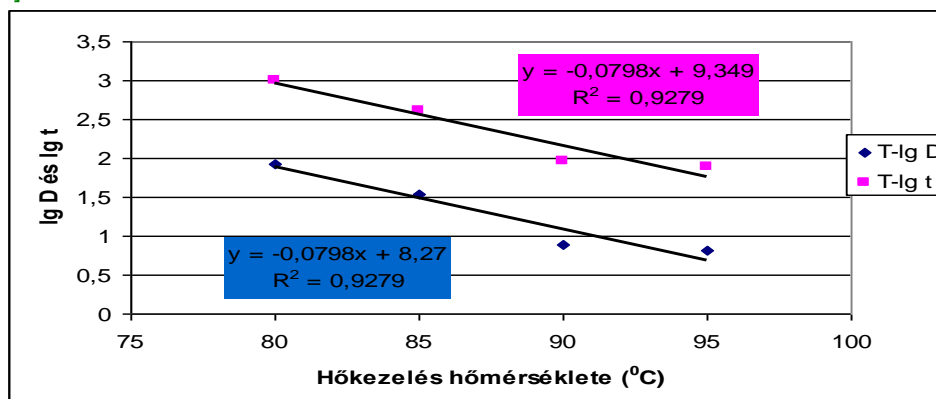
Labbe (2001) szerint a hőtűrő *Clostridium perfringens* spórák 100 °C-on 60 percig tartó hőkezelést is túléltek. A D-érték *Cl. perfringens* spórák esetében vizsgálataink szerint 83,92 min ( $D_{80}$ ) és 6,55 min ( $D_{90}$ ) értékek között alakult. Byrne és mtsai (2006) magasabb D értékeket határoztak meg, 30,6min ( $D_{90}$ ) és 1,9min ( $D_{100}$ ) közötti eredményeket kaptak több törzs keverttenyészetét vizsgálva. Bradshaw és mtsai (1977) által publikált D érték levesben 0,5 és 0,95 min ( $D_{110}$ ), Sarker és mtsai (2000) szerint a D érték 124 és 30 min között alakult ( $D_{100}$ ) levesben, Juneja és mtsai (2003) D értékbeli eredménye 15,5 és 28,1 min között van ( $D_{100}$ ) marhahúslében. Az eltérő D értékek a *Cl. perfringens* spórák hőellenállására ható tényezőknek köszönhetőek, amelyek lehetnek a törzsek közti különbségek, a környezeti tényezők (pl.: tenyésztési hőmérséklet, tápközeg, korábbi hőstressz, stb.), a mátrix összetétele a hőkezelés során (szénhidrátok, fehérjék, zsírok mennyisége), a vízkaktivitás ( $a_w$ ), a pH, a hozzáadott tartósítószer (salétromok, nitritek, só) és a kísérleti terv (Juneja, 2000).

A tizedelési idők logaritmikus transzformációját követően azokat a hőkezelés hőmérsékletének függvényében ábrázoltuk, és így kaptuk meg a rezisztencia és a többségi pusztulási görbét (3. és 4. ábra).



**3. ábra** *Clostridium sordellii* rezisztencia és a többségi pusztulási görbéje

Szigeti, J., Varga, L., Ásványi, B. & Sipos-Kozma, Zs. (2008) Élelmiszerekben előforduló anaerob spórások kíméletes hőkezelése. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 6 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]



4. ábra *Clostridium perfringens* rezisztencia és a többségi pusztulási

A 3. és 4. ábrán látható többségi pusztulási görbe egyenesének egyenletéből meghatározott meredekség alapján a  $z$ , a  $Q_{10}$  és az  $F$  értékek kiszámíthatóak. A számított  $z$  érték *Clostridium sordellii* esetében  $12,59\text{ °C}$ , amiből megállapítható, hogy a hőpusztulási idő egy nagyságrenddel történő csökkenéséhez  $12,59\text{ °C}$  hőmérséklet emelkedés szükséges. A *Clostridium sordellii*  $Q_{10}$  értéke  $6,22$ , azaz a hőmérséklet  $10\text{ °C}$ -kal való emelése  $6,22$  szerezésre növeli a pusztulási sebességet. *Clostridium perfringens* esetében a  $z$  érték  $12,53$ , míg a  $Q_{10}$  érték  $6,28$ . Byrne és mtsai (2006) ennél alacsonyabb  $z$  értékről számolt be:  $8,3\text{ °C}$ , míg Asselt és Zwietering (2006) eredménye szerint  $16,8\text{ °C}$  a *Clostridium perfringens*  $z$  értéke. A kiszámított „ $z$ ” értékből meghatározható a hőkezelési hőmérsékletekhez tartozó relatív pusztulási sebesség (RPS).

A *Clostridium sordellii* és a *Clostridium perfringens* relatív pusztulási sebességét (RPS) és relatív pusztulási idejét (RPI) az 5. és a 6. táblázatban foglaltuk össze:

5. táblázat *Clostridium sordellii* relatív pusztulási sebessége és ideje

| Hőkezelés hőmérséklete (°C) | Relatív pusztulási sebesség (RPS) | Relatív pusztulási idő (RPI) (min) |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 80 °C                       | 0,000549                          | 1821                               |
| 85 °C                       | 0,00138                           | 725                                |
| 90 °C                       | 0,00338                           | 296                                |
| 95 °C                       | 0,00851                           | 118                                |

6. táblázat *Clostridium perfringens* relatív pusztulási sebessége és ideje

| Hőkezelés hőmérséklete (°C) | Relatív pusztulási sebesség (RPS) | Relatív pusztulási idő (RPI) (min) |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 80 °C                       | 0,000525                          | 1905                               |
| 85 °C                       | 0,001318                          | 759                                |
| 90 °C                       | 0,003311                          | 302                                |
| 95 °C                       | 0,00826                           | 121                                |

Az 5. táblázatból megállapítható, hogy a *Clostridium sordellii* esetében  $90\text{ °C}$ -on az  $RPS=0,00338$ , míg az  $RPI=296$ , ami azt jelenti, hogy  $90\text{ °C}$  -on a mikrobapusztítás sebessége  $0,00338$ -ad része a  $121\text{ °C}$ -on mérhetőnek, így ahhoz, hogy azonos mértékű pusztítást érjünk

Szigeti, J., Varga, L., Ásványi, B. & Sipos-Kozma, Zs. (2008) Élelmiszerekben előforduló anaerob spórások kíméletes hőkezelése. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 6 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

el, 296 percet kell hőntartani. *Clostridium perfringens* esetében az RPS érték 90 °C-on 0,003311, tehát 302 percet kell hőntartani, hogy azonos értékű pusztítást érjünk el, mint 121 °C-on.

## KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Munkánk során választ kívántunk kapni arra a kérdésre, hogy 100 °C-alatti hőkezeléssel belátható behatási idő alatt a *Clostridium sordellii* é a *Clostridium perfringens* spóraszám két nagyságrenddel csökkenthető-e.

Az elvégzett vizsgálatokból és eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy *Clostridium sordellii* esetében 80 °C -on a biztonságos spórapusztításhoz nem elegendő a 120 percig tartó hőntartási idő. Ugyanez vonatkozik a 85 °C -on végzett vizsgálatra, tehát ezeken a hőntartási hőmérsékleten nincs értelme a hőkezelési vizsgálatoknak a *Clostridium sordellii* spórák rendkívül nagy hőmérséklettel szembeni ellenállósága miatt.

A *Clostridium sordellii* spórák esetében 90 °C-on a 60. perc után három nagyságrendnyi spórapusztulás következett be, míg 95 °C -on a 36. percnél a spóraszám lecsökkent négy nagyságrendet, ezért javasoljuk ezeken a hőmérsékleteken végezni a félkonzervek hőkezelését.

*Clostridium perfringens* esetében 85 °C -on a 30. perc után, 90 °C -on a 10. perc után, míg 95 °C -on pedig már a 6. perc után sikerült elérni a két nagyságrendnyi spórapusztulást, ezért ennél a mikroorganizmusnál lehetséges az alacsonyabb hőkezelési hőmérséklet alkalmazása a biztonságos spórapusztítás elérésére.

## IRODALOMJEGYZÉK

**ASSELT, E.D. & ZWIETERING, M.H. (2006):** A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens International Journal of Food Microbiology 107 (2006) 73 – 82.

**BRADSHAW, J.G., PEELER, J.T. & TWEDT, R.M. (1977):** Thermal inactivation of ileal loop-reactive *Clostridium perfringens* type A strains in phosphate buffer and beef gravy. Appl. Environ. Microbiol. 34, 280–284.

**BYRNE, B., DUNNE, G. & BOLTON, D.J. (2006):** Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll Food Microbiology 23 (2006) 803–808

**DUNCAN, C.L. & STONG, D.H (1968):** Improved Medium for sporulation of *Clostridium perfringens* Appl. Microbiol. 16, pp. 67–89.

**JUNEJA, V.K. (2000):** Thermal inactivation of microorganisms. In: Juneja, V.K., Sofos, J.N. (Eds.), Control of Foodborne Microorganisms, firsted. Marcel Dekker, New York, pp. 13–52.

**JUNEJA, V.K., NOVAK, J.S., HUANG, L. & EBLEN, B.S., (2003):** Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. Food Control 14, 163–168.

**LABBE, R.G. (2001):** *Clostridium perfringens*. In: Downs, F.P., Ito, K.(Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, American Public Health Association, pp. 325–330.

**NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W. (1971):** Methods in Microbiology. Academic Press, London and New York

**SARKER, M.R., SHIVERS, R.P., SPARKS, S.G., JUNEJA, V.K. & MCCLANE, B.A. (2000):** Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3234–3240.