

Application of Plant-based Antimicrobials for the Growth Inhibition of Clostridia in Silage Production

Doctoral Thesis

Florian Emerstorfer

June 2011

Supervisor: Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Wolfgang Kneifel

Department of Food Science and Technology

Institute of Food Science

University of Natural Resources and Applied Life Sciences

Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kneifel danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit, vor allem für die Unterstützung bei den Publikationen.

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Dr. Walter Hein, der mich dazu ermuntert hat, das Projekt „Dissertation“ im Rahmen und neben meiner Arbeit in der Zuckerforschung Tulln anzugehen. Er stand mir immer mit gutem Rat zur Seite, wenn knifflige Fragen zu lösen waren, oder – was noch wichtiger ist – ich dringend aufmunternde Worte nötig hatte.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Univ. Doz. Dr. Erich M. Pötsch und Ing. Reinhard Resch vom LFZ Raumberg-Gumpenstein bedanken, die mich mit ihrer langjährigen Erfahrung in der Planung und Durchführung meiner Silierversuche unterstützt haben.

Weiters gilt mein Dank jenen Personen in der Zuckerforschung Tulln und an der Universität für Bodenkultur, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Simone bedanken, die mir immer dann geholfen hat, wenn mir meine Dissertation parallel zu allem Anderen zu viel zu werden drohte.

Table of contents

<u>Abstract</u>	<u>3</u>
------------------------	-----------------

<u>Zusammenfassung</u>	<u>5</u>
-------------------------------	-----------------

<u>Introduction</u>	<u>7</u>
----------------------------	-----------------

Hop acids	10
------------------	-----------

Silage production	23
--------------------------	-----------

References	29
-------------------	-----------

<u>Aim of the study</u>	<u>40</u>
--------------------------------	------------------

<u>Results</u>	<u>41</u>
-----------------------	------------------

Chapter one

Hein W, Pollach G and Emerstorfer F, 10 years' experience with natural antibacterials within Agrana. Sugar Industry 131: 477-491 (2006).

Chapter two

Emerstorfer F, Kneifel W and Hein W, The role of plant-based antimicrobials in food and feed production with special regard to silage fermentation. Die Bodenkultur 60 (3): 55-65 (2009).

Chapter three

Hein W and Emerstorfer F, Verfahren zur Silierung. Patent AT 594 593 B1 (2010).

Chapter four

Emerstorfer F, Hein W, Resch R, Poetsch EM, Zitz U and Kneifel W, Application of plant-based antimicrobials for the growth inhibition of clostridia in pressed beet pulp silage. Journal of the Science of Food and Agriculture (2011).

In press

Chapter five

Emerstorfer F, Hein W, Resch R, Poetsch EM and Kneifel W, Application of plant-based antimicrobials for the growth inhibition of clostridia in grass silage (2011).
Unpublished Manuscript

Discussion of results-----**107**

Conclusion and outlook-----**109**

Appendix-----**111**

Appendix 1

Emerstorfer F and Hein W, Application of natural antibacterials in pressed pulp silage production. Poster Presentation at the 13th International Conference Forage Conservation, Nitra. Proceedings pp. 124-125 (2008).

Appendix 2

Emerstorfer F, Hein W, Resch R, Poetsch EM und Kneifel W, Harz- und Hopfensaeuren als alternative biologische Konservierungsstoffe. 15. Alpenlaendisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, pp. 53-60 (2009).

Appendix 3

Emerstorfer F, Weisseisen B and Hein W, Application of natural antibacterials in pressed pulp silage production part II: Application of silage additives in organic pressed pulp silage. Poster Presentation at the 72nd IIRB Congress, Copenhagen. Proceedings pp. 116-120 (2010).

Curriculum vitae-----**130**

ABSTRACT

This doctoral thesis aims at the investigation of plant-based antimicrobials, based on hop β -acids and rosin acids, for the growth inhibition of clostridia in silage production.

In a first step, *in vitro* studies were carried out in order to determine the minimum inhibitory concentration of the plant-based antimicrobials by means of three microbial standard test methods on a range of microorganisms typically found in silage. Results indicated that β -acids and rosin acids were not very effective against Gram-negative bacteria, yeasts and moulds. On the contrary, Gram-positive bacteria could already be inhibited at very low concentrations. Interestingly, some representatives of the lactic acid bacteria group showed lower sensitivity towards the plant-based antimicrobials in comparison to spoilage microorganisms such as clostridia.

Based on these results, in a second step, a laboratory model was developed in which soil contamination was used to obtain pressed sugar beet pulp silages spoiled by clostridia. Typically, clostridial spoilage is represented by decreasing lactic acid concentrations and increasing pH-values over the progression of fermentation, as well as the development of high butyric acid concentrations in the finished silage. Preliminary trials demonstrated that both, β -acids and rosin acids could limit clostridial growth, thus forming the basis for the combined use of the antimicrobials and lactic acid bacteria to achieve an enhanced effect. Based on the data compiled thus far, a patent application for ensiling of plant raw materials using hop acids and rosin acids was filed. However, due to aspects concerning approval procedures for silage additives, subsequent experiments were focused on β -acids.

In the following systematic trials, pressed sugar beet pulp was mixed with soil for artificial contamination with clostridia. Laboratory silos were filled with the substrate and stored at 25°C for 90 days. The impact on clostridial growth during silage fermentation was monitored by determination of the pH-value and dry matter content, as well as chemical analysis of the fermentation products in specified time intervals. Throughout the experiments, the effect of β -acids was examined in combination with lactic acid bacteria and compared with commercial silage additives such as formic acid and silage inoculants. Results indicated that in contaminated silage samples, without any additives, high butyric acid contents

occurred due to clostridial growth. This spoilage could not be suppressed by the application of lactic acid bacteria alone. In contrast to that, the combined use of lactic acid bacteria and β -acids in the range of 50 to 100 mg kg⁻¹ demonstrated reduced butyric acid formation and limited clostridial growth.

In a third step, the investigations were extended to grass silages. In analogy to the ensiling experiments with pressed beet pulp, soil-contaminated grass was treated with the plant-based antimicrobials with and without lactic acid bacteria and stored at 25°C for 90 days. Additionally to pH, dry matter content and silage acids, the microbial composition of the laboratory silages was analysed at specified time intervals. Results indicated that the combined use of lactic acid bacteria and β -acids in the range of 50 to 100 mg kg⁻¹ inhibited clostridial growth, which was demonstrated by favourable organic acid composition and low butyric acid concentrations, owing predominantly to the contribution of the lactic acid bacteria.

Based on these results it can be concluded that the application of β -acids improves the overall preservation effect of lactic acid bacteria in suppressing clostridial growth in silages and thus demonstrates some potential for the combined use with lactic acid bacteria. However, further scientific effort is needed in order to optimise the efficacy of such a combined silage additive for different plant material sources.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Thema der vorliegenden Dissertation behandelt die Untersuchung natürlicher pflanzlicher Wirkstoffe auf Basis von Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren zur Wachstumshemmung von Clostridien in Silagen.

In der Arbeit wurden in einem ersten Schritt *in vitro* Studien mit im Silagebereich üblicherweise vorkommenden Mikroorganismen durchgeführt und die minimale Hemmkonzentration der Wirkstoffe mittels dreier mikrobiologischer Standardtestverfahren ermittelt. In den Ergebnissen zeigten die Substanzen lediglich geringe Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien, Hefen und Schimmelpilze. Im Gegensatz dazu wurde eine Hemmung grampositiver Bakterien aber bereits in sehr niedrigen Konzentrationen erzielt. Interessanterweise zeigten einige Vertreter aus der Gruppe der Milchsäurebakterien eine wesentlich geringere Empfindlichkeit gegen die pflanzlichen Wirkstoffe als Verderbskeime wie Clostridien.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde nun in einem zweiten Schritt ein Labormodell entwickelt, in welchem Rübenpressschnitzel mit Erde kontaminiert wurden, um Clostridienwachstum und somit Silageverderb reproduzierbar zu erzielen. Clostridienverderb äußert sich typischerweise in einem Abbau von Milchsäure verbunden mit einem pH-Wert-Anstieg über den Silierverlauf und hohen Buttersäuregehalten zu Silierende. In Vorversuchen mit diesem Labormodell zeigte sich, dass sowohl β -Säuren als auch Harzsäuren das Clostridienwachstum einschränken konnten, wobei ein verbesserter Effekt bei der gemeinsamen Verwendung der Wirkstoffe mit Milchsäurebakterien beobachtet werden konnte. Auf Basis dieser Untersuchungsergebnisse wurde ein Verfahren zur Silierung pflanzlicher Rohstoffe unter Verwendung von Hopfensäuren und Harzsäuren zum Patent angemeldet. Aufgrund einer Reihe anderer Aspekte in Bezug auf eine Siliermittelzulassung wurde der Fokus in den weiteren Untersuchungen aber auf Hopfen- β -Säuren gelegt.

In den darauffolgenden systematischen Versuchen wurden frische Pressschnitzel mit Erde kontaminiert, das Material in Einweckgläser gefüllt und anschließend 90 Tage bei 25°C im Klimaschrank gelagert. Zur Unterdrückung der Verderbsvorgänge wurden Hopfen- β -Säuren mit Milchsäurebakterien kombiniert und mit kommerziellen Silierhilfsmitteln wie Ameisensäure und Silagestarterkulturen verglichen. Eine Dokumentation des Silierverlaufs erfolgte in regelmäßigen Zeitabständen durch Öffnung von Laborsilos und Untersuchung der Silagen auf

pH-Wert, Trockensubstanzgehalt und Gär säurezusammensetzung. In den Ergebnissen zeigte sich, dass eine kombinierte Anwendung von Milchsäurebakterien und Hopfen- β -Säuren im Bereich von 50 bis 100 mg/kg das Wachstum von Clostridien und damit die Bildung von Buttersäure gut zu unterdrücken vermag. Im Gegensatz dazu lagen die Buttersäuregehalte bei der alleinigen Anwendung von Milchsäurebakterien auf einem signifikant höheren Level.

Im dritten Teil wurden die Untersuchungen schließlich auf Grassilagen ausgedehnt. Analog zu den Versuchsserien mit Pressschnitzeln wurde leicht angewelktes Gras mit Erde kontaminiert, mit den Wirkstoffen bzw. Silierzusätzen behandelt und in Einweckgläsern bei 25°C gelagert. Neben den bereits genannten Untersuchungsparametern wie pH-Wert, Trockensubstanzgehalt und Gär säurespektrum wurde auch die mikrobiologische Zusammensetzung der Silagen analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine kombinierte Anwendung von Milchsäurebakterien und Hopfen- β -Säuren das Wachstum von Clostridien und die Bildung von Buttersäure gut zu unterdrücken vermag, der Effekt offenbar aber überwiegend auf die Milchsäurebakterien zurückzuführen ist.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluß zu, dass die Anwendung von Hopfen- β -Säuren den konservierenden Effekt von Milchsäurebakterien zur Unterdrückung des Clostridienwachstums in Silagen entscheidend verbessern kann und zeigen Potential für kombinierte Siliermittel auf. Es ist jedoch weiterer Forschungsbedarf notwendig um die Wirksamkeit eines derartigen Kombinationsprodukts für verschiedene pflanzliche Rohstoffe zu optimieren.

INTRODUCTION

In the early 1990s the Austrian sugar industry voluntarily abstained from the use of formaldehyde for the control of bacterial infections in the extraction area. This was the starting point for a whole new approach to use natural plant-based products in a large scale industry (Pollach et al., 2004). The sugar producing company involved wanted to avoid being linked to a substance that was portrayed throughout the media as “bad” and “unhealthy” and in keeping with this decision, acceptance of various operational problems and financial losses were required. However, a remedy was underway: accidentally it was observed that bacteria, which are present in sugar raw juice, did not grow on a nutrient medium containing traces of hop bitter acids. A literature survey explained the discovery and indicated that the observed antiseptic properties of hop compounds were initially utilised to protect beer from bacterial spoilage in order to extend the shelf life of this alcoholic beverage. In view of these findings, sugar technologists, convinced of having experienced a remarkable discovery, pressed ahead with the vision of replacing an established, so-called “hard” chemical biocide with well known food compounds encompassing a positive image: hops. Upon establishing contact with the hop industry, large scale trials in sugar factories were performed with a by-product from the manufacture of hop extracts for brewing purposes. The trials successfully confirmed the aforementioned antiseptic effect. Eventually, the innovative method of using hop compounds for combating bacteria in sugar production was granted a patent in 1997 (Pollach, 1997). Since then, the marketing of a hop product based on β -acids, one of the major active compounds of the hop resin, became a profitable business in the worldwide sugar industry and all involved partners profited from the problem. The sugar company had an alternative product, which had the potential to rather stimulate curiosity than anxiety. The hop company was able to market an initially low-margin by-product in a whole new field where it was possible to achieve greater profits. The inventor company could participate through license agreements with the hop company. Additionally, there was the clear perspective to further expand into other fields of application and the awareness that this could be achieved more easily by cooperation.

Looking back at this particular piece of recent history, a role model can be derived, which demonstrates the general need for antimicrobial agents in food and feed production with a more sustainable approach, thus avoiding chemicals or

antibiotics. With increasing importance of bioethanol usage and thus more bioethanol plants, hop products were also tested and found suitable for bioethanol production – an industrial field of application, which was much closer to beer brewing than sugar production. In this context, the use of antibiotics to suppress lactic acid bacteria in order to minimise ethanol yield losses in yeast fermentation was very common. However, within the European Union, the use of antibiotics in bioethanol production was forbidden in order to avoid transfer of the substances to DDGS (dried distillers grains with solubles), a dried co-product from bioethanol production consisting of unfermented grain residues and concentrated thin stillage, which combined is an important feedstuff for farm livestock (Muthaiyan et al., 2011). This pre-requisite opened up the field for alternative substances, with hop based products again suitable for application (Rueckle & Senn, 2006). Also, antibiotics added to animal feed as growth promoters were constantly under debate and eventually banned within the EU on 1st January 2006 (OJEU, 2003; Narvaez et al., 2011). Due to this overuse of antibiotics, the spread of antibiotic resistance of animal and human pathogens became a major problem and therefore, in recent years, plant compounds have been increasingly considered as alternatives. Again, it is not surprising that there are numerous studies, which suggest the use of hops to positively influence the microbial composition in the digestive tract of livestock, all the more as hop extracts are approved as feed additives throughout the EU (OJEU, List of additives, 2011; Narvaez et al., 2011). However, the use of antibiotics for the latter mentioned purposes currently remains to be allowed in many countries, including the US and Brazil. Hop compounds have also been tested in animal hygiene as agents for udder and teat disinfection in order to replace common products based on iodine and chlorine, which are not particularly suitable for such sensitive tissue (Haas, 2006).

These examples illustrate that there is intensified reassessment taking place with respect to the use of antimicrobial substances. They also demonstrate that the origin for new approaches can emerge from different sources (the industry, consumer concerns, governing and legislative bodies, etc.), which are often closely interrelated.

Returning to the sugar industry, the hop compounds applied in the extraction area were found to be present in the resulting pressed pulp, which can be dried or ensiled for subsequent use as an animal feed. Due to the fact that inhibition of

undesired groups of microorganisms was reported in the course of ensiling, the positive effects were attributed to the hop remnants (Pollach et al., 1999). Together with earlier observations, which also indicated anticlostridial activity of β -acids (Pollach et al., 2002), it seemed reasonable to evaluate the potential of hop compounds in silage production, where clostridia are among the most important spoilage microorganisms. With respect to this, therefore, effective and reliable antimicrobials are in much demand (McDonald et al., 1991).

Thus, the subsequent chapters highlight the traditional use of hop compounds within the brewing industry, as this is the historic starting point of these additives in human nutrition and that which remains the most important sector for hops use. In addition, the current knowledge about the chemistry, the specific antimicrobial action and other uses for the hop compounds are discussed. Finally, the field of silage production with a special focus on clostridial spoilage problems and the economic impact for farmers and the dairy industry are outlined.

Hop acids

The hop plant

The hop plant *Humulus lupulus* L. is a climbing perennial plant which belongs to the family of *Cannabaceae*. It has separate male and female plants, and it is the female plant's unfertilised flowers, which occur in inflorescences and are referred to as cones upon maturity. The cones are composed of a central strig and of bracts and bracteoles, which contain the so-called lupulin glands (Fig.1). These yellow, golden-brown lupulin glands are the commercially relevant part of the plant as they incorporate essential oils, hop polyphenols and the hop resin (Rybacek, 1991; Neve, 1991; Heyerick, 2001). The major components of dried hop cones are summarized in Table 1.

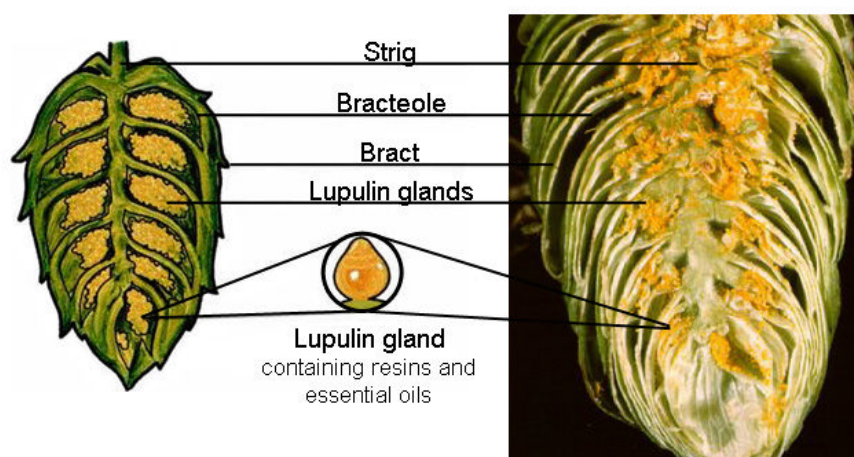


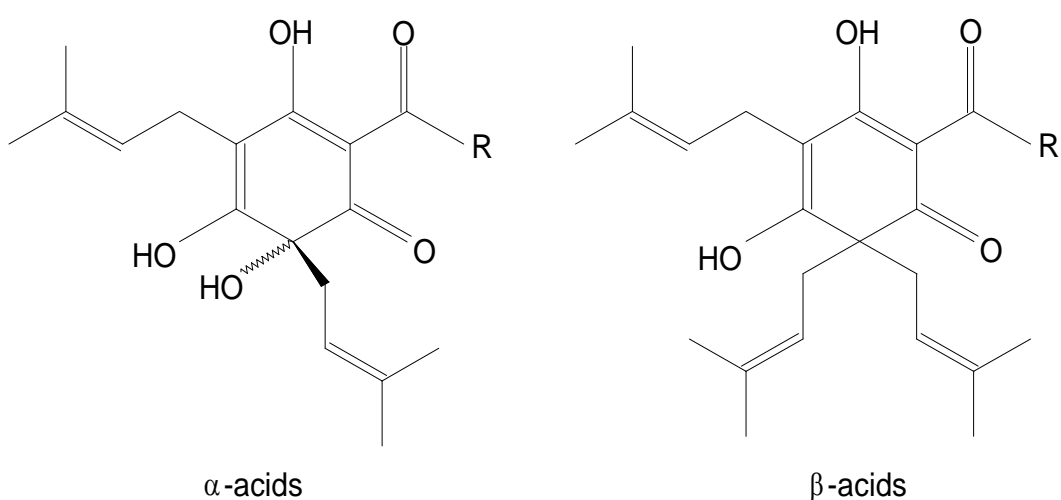
Figure 1: The essential parts of the hop cone (Eiken, 2011; USDA, 2011)

Table 1: Average composition of dried hop cones (Heyerick, 2001)

Nature	Percentage (w/w)
α -acids	2-19
β -acids	2-11
Essential oil	0.5-3.0 (v/w)
Polyphenols	3-6
Monosaccharides	2-3
Amino acids	0.1
Proteins	15
Lipids and fatty acids	1-5
Pectins	2
Ashes/salts	5-10
Cellulose-lignins	40-50
Water	8-12

Hop bitter acids

The hop resin contains two main groups of bitter acids, which can be both characterised as prenylated phloroglucinol derivatives: α -acids (humulones) and β -acids (lupulones) (Huavere, 2004). The α -acids are a mixture of humulone and its congeners cohumulone, adhumulone, prehumulone and posthumulone, which only differ in the nature of the acyl side chain "R" (Fig. 2). Accordingly, the β -acids are a mixture of lupulone and its congeners colupulone, adlupulone, prelupulone and postlupulone (Neve, 1991). Fig. 2 presents an overview of the chemical structure of α -acids and β -acids and their respective analogues (Verzele & De Keukeleire, 1991).



Hop α -acid	Hop β -acid	Acyl R
Humulone	Lupulone	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Cohumulone	Colupulone	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Adhumulone	Adlupulone	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
Prehumulone	Prelupulone	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Posthumulone	Postlupulone	CH_2CH_3

Figure 2: Structural formulas of the hop bitter acids

Hop acids are weak acids, which exhibit very poor water solubility and have almost no bitter taste in their native form. In their pure state they appear as pale-yellowish solids. α -acids have acidic, lipophilic, salt forming, and chelating

properties, which are comprised by a β -tricarbonyl functional group as the main structural feature and by the hydrophobic side chains. In contrast to α -acids, β -acids cannot form salts with lead(II) acetate and are less acidic than α -acids, because the tertiary alcohol function at C6 is replaced by an extra prenyl side chain. β -acids are extremely sensitive to oxidation, which is initiated by air (auto oxidation) (Van Cleemput et al., 2009). Both, the α - and β -acids, have common biochemical precursors, the 6-deoxy- α -acids. The relative proportions of α - and β -acids depend on the hop variety, the cultivation conditions and the time of harvesting (Benitez et al., 1997).

In the brewing industry the α -acids are considered the most valuable fraction of hops. The traditional brewing practice, according to beer purity laws, utilizes hops as whole cones or in the pelletized form at the stage of wort boiling, where the α -acids undergo a thermal isomerisation reaction (Fig. 3), thus forming iso- α -acids (occurring as *cis*- and *trans*-stereoisomers), which have increased water solubility and bitterness (Benitez et al., 1997; Moir, 2000). However, the yield typically does not exceed 30 % (Hughes, 2000). The β -acids are only sparingly water soluble and cannot undergo the same isomerisation processes as α -acids (Moir, 2000). Instead, the majority is lost in the brewing process due to precipitation reactions and adsorption to solids present in the wort. With the exception of a minor fraction that results in flavour active derivatives in beer, the β -acids are considered as compounds with a low brewing value (Benitez et al., 1997; Verhagen, 2010).

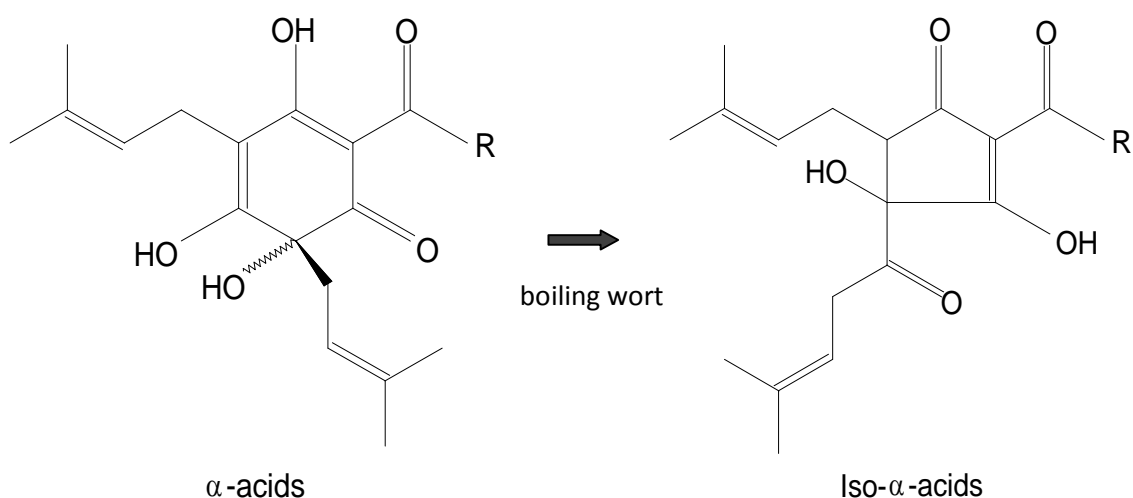


Figure 3: Isomerisation reaction of α -acids during wort boiling

A more progressive approach in brewing uses hop extraction by means of supercritical CO₂ or organic solvents to produce iso- α -acids and reduced iso- α -acid products. The reduced acids are more hydrophobic and even more bitter than the iso- α -acids. Additionally, they are light stable, in contrast to iso- α -acids. The extracts produced with this method can be added to the finished beer in order to adjust to the demanded bitterness, thus avoiding the α -acid yield losses, which occur in the traditional hops addition during the wort boil. The extraction and separation process applied to produce these products is outlined in Figure 4. A by-product of the process comprises the β -acid fraction which is available for utilisation in other fields of application (Benitez et al., 1997).

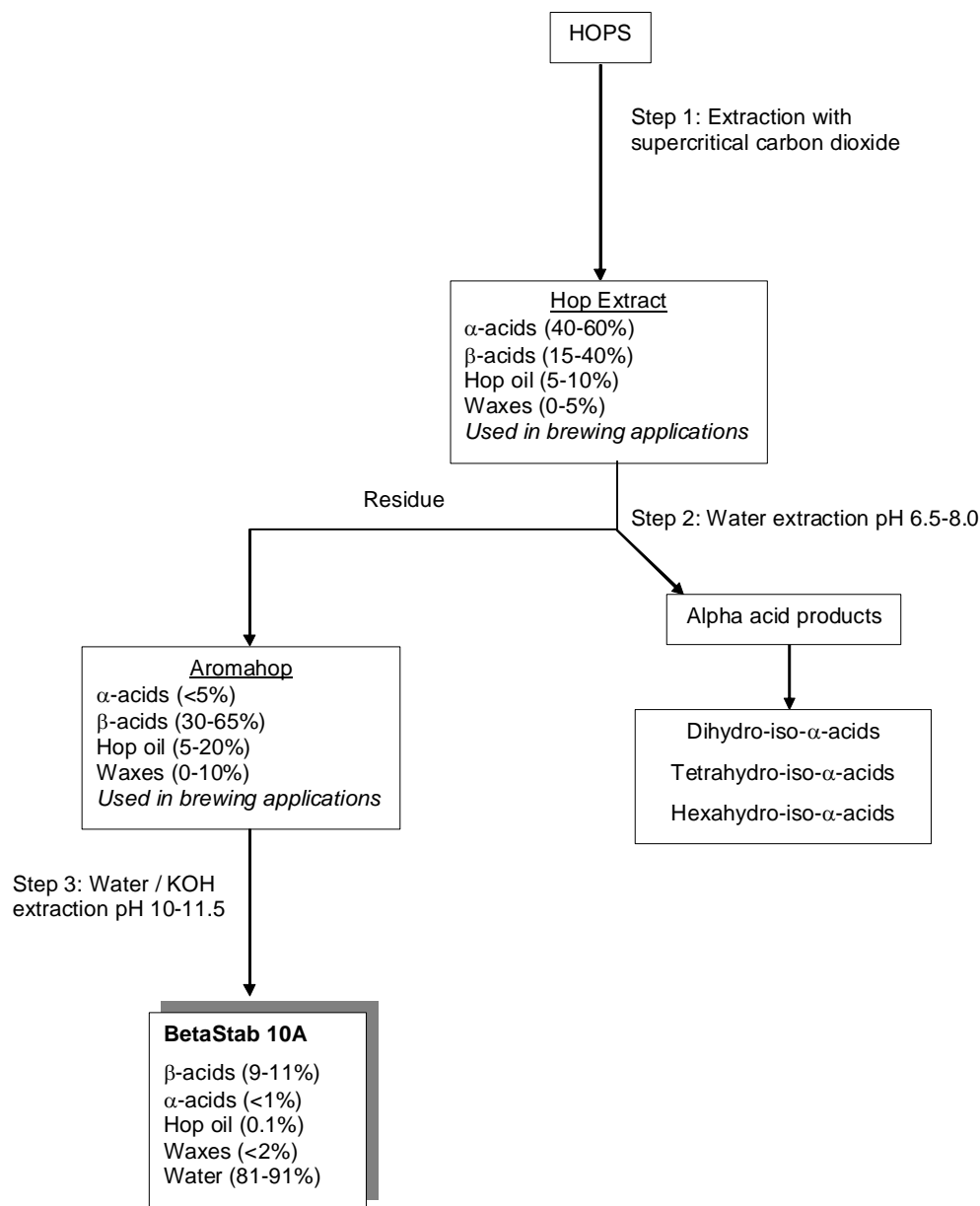


Figure 4: Flow chart for the production of hop extracts (BetaTec, 2011)

The relevance of hop bitter acids: a historic overview

The history of hop use and the utilization of its antibacterial properties are closely related to beer brewing. It might well be that the worldwide success of this alcoholic beverage would not have happened without the preservative properties of hops. In a time, when the technique of pasteurization was still unknown, hops ensured the storability and transportability of beer. *Vice versa*, the motivation to clarify the antiseptic properties of hops in the course of beer brewing was driven by the desire to improve the beverage. From today's view, the history of beer consumption by man is also an extraordinary long-lasting history of the consumption of an additive with unique properties. Having this in mind, it is worth considering the interrelation of both. Thus, Table 2 tries to identify important milestones and events in the history of hops use for beer preservation.

Table 2: Historic overview of hops use in brewing

TIME SCALE	EVENT
B.C. 7000 - B.C. 5000	Beer brewing was already known in ancient civilisations (Sumer, Babylon, Egypt), however it is very unlikely that hops were used;
A.D. 60	Pliny the Elder reports about the use of hops in salads and as a replacement for aparagus;
A.D. 600 - A.D. 800	First mention of hop gardens (768, near the monastery Weihestepan, Bavaria); Hop fruitlet finds in European areas are a supposed indicator for hop-use in brewing;
~A.D. 822	Abbot Adalhardus from the Monastery of Corvey (Germany) mentions the use of hops in brewing in a series of statutes;
A.D. 859 - A.D. 875	Cultivation of hops in humularia (hop gardens) at the monastery Weihestepan, however no cast-iron evidence for use in brewing;
A.D. 900 - A.D. 1000	Famous Graveney-boat find indicates that hops were already being traded, which can only be explained in the context of brewing; Earliest available records for hop in brewing relate to western Switzerland and France;
~A.D. 1150 - A.D. 1160	Hildegard of Bingen (1098-1179) remarks in her <i>Physica</i> the use of hops for beer brewing and appreciates its preservative effect;
A.D. 1100 - A.D. 1300	Use of hops becomes common outside of areas were sweet gale (<i>Myrica gale</i>) was used as a beer additive;
14 th century	Myrica beer is in decline in continental Europe as hops are increasingly used to flavor beer with the advantage of prolonged shelf-life;
A.D. 1400 - A.D. 1600	By rumor <i>M. gale</i> is said to be poisonous, thus brewing of Myrica beer is forbidden; 1516 the beer purity law comes into force in Germany; In England hop use is prohibited by law to protect Myrica beer in the 15th century; in 1554 legalization of hop growing by parliament;
A.D. 1800	Hops are the only flavoring compound allowed to be used in beer brewing;

Although it is well known that ancient civilizations in Egypt and Mesopotamia brewed beer, it is not certain if these peoples used hops as a flavoring additive (Hornsey, 2003). In the first century A.D., Pliny the Elder mentions the use of hops for salads and as a replacement for asparagus. He referred to it as the “wolf of the willows”, because the wild growing hop vine strangled willows, similar to wolves devouring sheep. This also explains the Latin name “*Lupus salictarius*”, from which the later name *Humulus lupulus* is derived (Verzele & De Keukeleire, 1991). The origin of the genus name *Humulus* may go back to a latinization of the Slav word “*hmelj*”, meaning head (Neve, 1991; Huavere, 2004).

In the Early Middle Ages, it was discovered that the plant’s flowers can be used to increase the shelf life of beer, because they inhibit microbial spoilage. However, it is not clear where in Europe this important discovery was made, as there are contradictory statements in the literature and written records are rare (Barth et al., 1994; Behre, 1999; Hornsey, 2003). The general use of hops in the era before 1000 A.D. could be traced back by fruitlet finds and by the mention of hop gardens, for example at the monastery Weihestephana in Bavaria 768 A.D. (Verzele & De Keukeleire, 1991; Behre, 1999; Hornsey, 2003). Most authors believe that the first mention of hops for brewing purposes was in 822 A.D., when Abbot Adalhardus from the monastery of Corvey in Germany refers to it in written statutes. The famous “Graveney-boat find” is seen as an indicator for brewing-related hops trade between continental Europe and England in the 10th century (Behre, 1999; Hornsey, 2003).

After 1000 A.D., the use of hops in beer brewing markedly increased, which is documented by numerous archeo-botanical evidence and written reports. In the 12th century, Hildegard of Bingen remarked in her “*Physica*” the use of hops for beer brewing and appreciated its preservative effect. But all in all, she actually depreciated hops due to supposed side effects and recommended sweet gale instead (Behre, 1999). Sweet gale (*Myrica gale*) was used together with other plants in so-called “gruits”, which represented the flavoring additive of choice for beer at that time. During the next centuries, both beer additives existed in parallel, contesting for the lead and favor among beer brewers and drinkers. However, the unique preservative character of the hop bitter acids made hops superior to sweet gale: hops as an additive was rapidly gaining ground and, supported by beer purity

laws in the 16th century, eventually prevailed over sweet gale, finally becoming the only beer flavouring additive allowed since the 18th century (Behre, 1999).

Antibacterial mechanism of hop acids

For more than 1000 years the use of hops was consequently propelled within the brewing industry for beer preservation. However, it remained unknown which hop compound was responsible for that effect (Piendl & Schneider, 1981). According to the literature, *Hayduck* in 1888 was the first to show that the antiseptic properties of hops were due to the soft resins (hop acids) (Sakamoto, 2002). With increasing knowledge of hop chemistry in the late 19th and the early 20th centuries (Stocker, 1962; Verzele & De Keukeleire, 1991), brewing microbiologists continued the quest to elucidate the antiseptic properties of hop constituents, which conferred microbial stability to beer. *Shimwell* (1937a, 1937b) stated that by 1922 the antiseptic potency of hops had long since become an unquestioned dogma in brewing: bacteria, which were able to grow in the presence of hop compounds were seen as exceptional cases owing their resistance to acquired immunity produced by a long contact with hop antiseptic under brewing conditions. However, on the basis of experiments with various Gram positive and Gram negative bacterial strains, *Shimwell* (1937a) postulated the “heretic” conception that hop antiseptic might be effective only towards Gram positive bacteria. In systematic studies he could demonstrate that this was indeed the case as there was a close connection between Gram staining and susceptibility of bacteria to hop acids.

Motivated by these studies, hop acids were tested against various microorganisms, first and foremost against Gram positive bacteria. The hop compounds were even considered as possible agents for the suppression of tuberculosis. *Chin et al.* (1949) confirmed previous findings and stated that the inhibitory power of hop acids against *S. aureus* and *M. tuberculosis* was greater with decreasing pH, independent of the growth medium. However, when human serum was present, the effect was reduced. In Germany, statistical investigations were conducted with the aim to find out if there is a connection between tuberculosis and the peoples’ occupational category. These studies were based on hints that among members of the brewing industry, who consumed more hop bitter acids through altered beer consumption, lower numbers of tuberculosis cases

could be observed. However, the results were not very pronounced (Boetzig, 1952; Rohne & Rische, 1952;). *Riedl* (1954) studied the effect of synthesized hop acids against *S. aureus* and *M. tuberculosis* and demonstrated that the inhibitory effect was associated with the length of the acyl side chains of the substances and increased with their hydrophobic properties. However, in spite of favorable *in vitro* effects against *M. tuberculosis*, the relevance of hops in this field diminished again as adverse physiological effects were reported and superior agents, other than hops, were successfully employed to fight tuberculosis (Piendl & Schneider, 1981).

Despite the striking evidence brought to light in the first half of the 20th century, the antimicrobial effect of hop acids in beer brewing remained doubtful. This was likely to be triggered by repeated observations of beer spoilage incidents associated with hop resistant Gram positive lactic acid bacteria (LAB). Though studies conducted by *Teuber* (1962) once more confirmed the effectiveness of hops against Gram positive bacteria and demonstrated that even actinomycetes were sensitive, although to a lesser extent as for example *B. subtilis*, it was concluded that the sensitivity of the substances towards oxidation and the negative influence of light and metal ions would limit the preservative effect. This view was even more emphasized by the outcome of a subsequent study, which compared the minimum inhibitory concentration (MIC) of humulone, lupulone and isohumulone (Teuber, 1970). Due to the fact that isohumulone demonstrated a far higher MIC than the common concentration of the substance in beer, it was concluded that the preservative effect exerted is not so significant. However, the influence of pH on the effectiveness of the substances was not taken into account as the MIC determination was performed at neutral pH values. In an attempt to clarify the mode and the site of action of hop acids in bacteria, co-workers *Teuber* and *Schmalreck* (1973) studied the effect of lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid on a *B. subtilis* strain. Since the antibacterial potencies of hop bitter resins were known to be higher in the least soluble lupulones, they supposed that the cell membrane might be the primary target in hop-sensitive bacteria and demonstrated that bactericidal concentrations of hop acids lead to membrane leakage accompanied with inhibition of nutrient transport into the cell. Concentrations below the MIC were found to be bacteriostatic, as they extended the lag phase of bacterial growth. A further study with 26 different hop acids also included several synthetic humulone and lupulone derivatives (Schmalreck et al.,

1975). Again, the cytoplasmic membrane of susceptible bacteria was supposed to be the site of action. As it seemed obvious that the inhibitory action was coupled with the hydrophobic properties of the hop acids, the authors concluded that the extremely low water solubility literally “forced the resins into the lipophilic membrane, thus leading to cell death”. However, the exact mechanism remained unknown.

The “molecular structure and antibacterial function of hop resin materials” was also investigated after 1990 (Simpson, 1991). Meticulous studies were carried out in order to clarify the mode of action that confers antibacterial activity to iso- α -acids, the predominant hop acid species found in beer. By using *L. brevis*, a hop resistant beer spoilage LAB, it was shown that pH is a decisive factor in the assessment of the MIC of hop acids, as their antibacterial effect is determined by the share of undissociated acid present. Thus, a concept using approximate or equilibrium pK_a -values was employed to explain the MIC-change for humulone, colupulone, *trans*-isohumulone and humulinic acid over a pH-range of 4-7, revealing that the MIC of colupulone, the β -acid, was highest and least affected by pH (Simpson & Smith, 1992). Potentiometric studies revealed that in an electroneutral process undissociated *trans*-isohumulone transports protons across the cell membrane and, after internal dissociation, leaves the cell through the formation of a complex with divalent cations such as Mn^{2+} . Concerning the bacterial cell, this process results in a decrease of the pH gradient across the membrane. In view of these results it was proposed that hop acids act as mobile carrier ionophores, which move protons across the cell membrane, thus effectively dissipating the transmembrane pH-gradient of the proton motive force and eventually causing inhibition of nutrient transport and ultimately cell death (Simpson, 1993a, 1993b; Simpson et al., 1993). More recent studies have principally confirmed the ionophoric activity of hop acids but have indicated further possible inhibitory mechanisms (Behr & Vogel, 2009).

As hop-resistant organisms are able to maintain a transmembrane gradient and ATP pool in the presence of *trans*-isohumulone, it was concluded that hop resistance of bacteria originated within the cell membrane (Simpson & Fernandez, 1994). Structural similarities among the hop acids suggested the idea that their antibacterial activity might also be similar. Consequently, sensitivity and resistance

patterns of LAB, which were demonstrated for *trans*-isohumulone, were found to be valid also for other hop acids (Fernandez & Simpson, 1993).

Parallel to that, growth inhibition of a thermophilic *Bacillus* sp. in recovered hopped wort was reported. Results showed no sporicidal activity but a limited extent of bacterial germination and an outgrowth at higher hop acid concentrations (Smith & Smith, 1993). Conversely, researchers found that *B. subtilis* was not sensitive to hop compounds and proposed that development of resistant strains could be easily obtained by repeatedly transferring bacterial cultures to a medium with higher hop compound concentrations (Haas & Barsoumian, 1994). To date the phenomenon of hop adaptation is generally accepted and seen as the reason why beer spoilage LAB can gradually acquire enhanced hop resistance (Suzuki et al., 2006).

Investigations into the mechanism of hop resistance among beer spoilage LAB continued and were found to be conferred to the bacteria by a number of processes (Sakamoto & Konings, 2003; Suzuki et al., 2006). These include extrusion of hop compounds from bacterial cells by an ATP dependent multidrug transporter (HorA) and a proton motive force dependent multidrug transporter (HorC), respectively (Sakamoto et al., 2002; Suzuki et al., 2002; Iijima et al., 2006). Furthermore, a proton translocating ATPase, the ATP production system, an altered cell wall composition and other factors were found to contribute to the hop resistance mechanisms in LAB (Simpson & Fernandez, 1994; Suzuki et al., 2006; Sakamoto et al., 2002; Behr et al., 2006). Due to the fact that hop resistance mechanisms in LAB are being related to genes, which are encoded on plasmid DNA (*horA*, *horC*), it was presumed that hop resistance patterns may be transferrable to other bacteria, and even pathogenic ones (Sakamoto, 2002). For LAB in particular, it was found to be evident that they acquired hop resistance through horizontal gene transfer (Suzuki et al., 2006).

Antimicrobial spectrum of hop acids

Since *Shimwell* demonstrated in 1937 that there is a close connection between Gram staining and the susceptibility of bacteria to hop acids, it has generally been accepted that hop compounds are inhibitory against Gram positive but not Gram negative bacteria (Teuber & Schmalreck, 1973; Van Cleemput et al., 2009). This remains valid nowadays, although there is a report concerning growth inhibition of

various *E. coli* strains caused by hop acids, thus suggesting a method to apply hop compounds also against Gram negative bacteria (Fukao et al., 2000). However, growth inhibition of *E. coli* was only obtained when hop acids were combined with other antibacterial agents. Antifungal activity for hop acids has been reported on several occasions (Chin et al., 1949; Mizobuchi & Sato, 1985). However, an inhibitory effect against yeasts has never been observed (Teuber & Schmalreck, 1973; Siragusa et al., 2008). Hop acids were also found to be effective against viruses and protozoa (Van Cleemput et al., 2009).

Perspectives of application

Apart from their use in the brewing industry, hop acids have been tested against various Gram positive bacteria in order to utilize their antimicrobial properties also in other fields of application. One of the earliest potential uses, which attracted interest, was against human pathogens such as *M. tuberculosis*, but practical relevance in this field was limited. Later studies showed inhibitory effects against *B. subtilis*. However, the aerobic bacterium had only low relevance in beer brewing (Teuber & Schmalreck, 1973; Simpson, 1993a). The authors noted in their literature review that hop acids had already been found to be effective against a wide range of Gram positive bacteria including the genera *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Micrococcus* and others. Piendl and Schneider, in 1981, extensively reviewed the literature for MIC studies of hop compounds against a wide range of microorganisms, including bacteria, yeasts and molds. However, follow-up studies to identify fields for practical utilization of the obtained knowledge were not subsequently undertaken.

At the beginning of the 1990s, when Simpson (1991) was able to provide substantial insights in the mode of action of hop acids against Gram positive bacteria, the focus gradually shifted away from beer brewing to other potential fields of application. These activities were also promoted by the hop producing companies, whom wanted to diversify their product application in order to avoid complete dependency on the brewing industry. Hop acids were the subject of various patent applications and publications for their use in foods to control clostridia and listeria (Millis & Schendel, 1994; Barney et al., 1995; Larson et al., 1996; Johnson & Haas, 1999; Shen & Sofos, 2008). Other investigations were carried out in such different fields as animal dietary supplements, pharmaceuticals,

veterinary hygiene, dental hygiene and others (Barney et al., 1994; Bhattacharya et al., 2003; Rigby & Seagal, 2005; Haas, 2006; Yamaguchi et al., 2009; Maye, 2010; Madsen et al., 2011). However, these findings and patents had no or only minimal commercial success.

Parallel to that, hop acids were introduced within the sugar industry at the beginning of the 1990s as an alternative to formaldehyde in order to control bacterial contamination in the extraction area (Pollach et al., 1996; Pollach 1997; Hein et al., 2006). Interestingly, continued studies also demonstrated an inhibitory effect of hop acids at alkaline pH values, where thick juice, an intermediate product of sugar production, could be protected from bacterial degradation during its storage (Hein et al., 2002; Justè et al., 2007). Subsequently, the search for industrial uses continued: in bio-ethanol production the hop compounds were introduced with the aim to replace antibiotics (Rueckle & Senn, 2006). Other authors suggested the use of hop compounds as a replacement for antibiotics in livestock in order to influence the microbial flora in the digestive tract, thus improving nutrient utilization and animal health (Rigby & Segal, 2005; Cornelison et al., 2006; Flythe, 2009; Maye, 2010; Narvaez et al., 2011). Recently, a patent has been granted for the use of hop acids in the field of maize starch production, with the aim to minimize microbial losses in wet maize storage and to replace SO₂ in maize steeping (Baczynski & Wirth, 2010). Thus, hop acids have increasingly become a true alternative to biocidal products, which are under debate because of negative effects induced on humans and animals. Today fields of application which have become economically important include worldwide acting industries like that of sugar, yeast and bio-ethanol production (Hein et al., 2006; Baczynski et al., 2007; Muthaiyan et al., 2011).

Generally, hop acids can be considered as effective agents in fields, where Gram positive bacteria require control. However, it is necessary to keep the compounds' main characteristics in mind in order to achieve optimum results. Table 3 was compiled to outline the pros and cons of hop acid use.

Table 3: The *pro's* and *con's* of hop acid use

Pro's of hop acid use

- + natural plant-derived products with GRAS (generally regarded as safe) status
- + Harmless towards humans & animals
- + Long safe history in beer brewing and human consumption
- + Effective against Gram-positive bacteria, including pathogens at very low inhibitory concentrations
- + Wide range of products (α -acids, β -acids and respective derivatives) with specific optimum pH-range
- + Positive image as an alternative agent compared to "hard" chemicals or antibiotics due to its long-time use in the food industry

Con's of hop acid use

- Prone to degradation and limited storability, sensitive to air (oxygen), light, humidity, temperature, metal ions (complex formation)
- Weak acids, effectiveness is pH-dependent
- Minor effect against fungi, no effect against Gram-negatives and yeasts
- Adaptations / resistance development in bacteria (LAB)
- Limited availability and price fluctuations due to volatile hop market
- More expensive than other biocidal substances (e.g. formaldehyde, antibiotics, SO₂;))
- Low water solubility and limited applicability due to bitter taste

Silage production

Silage production – a brief historic overview

The production of silage has a long historic tradition. According to the literature there is evidence that the preservation of plant materials as an animal feed was already known in ancient Egypt 1500 to 1000 B.C. Also the Greeks and the Romans appreciated silage production and from ancient writings from the Mediterranean it can be derived that air-tight sealing was seen as a precondition for successful silage preservation. However, a scientific approach in the process emerged only in the 19th century, when Grieswald, in 1842, recommended to fill pits with fresh grass as rapidly as possible, compact the material and seal off the contents in order to avoid entry of air. In 1877, a French farmer named Goffart published the first book on ensilage, which is seen as the practical modernisation of the procedure. This book was later translated and also served as the technical basis for silage production throughout the US and Europe (McDonald et al., 1991).

Although the basic principles of silage production have been applied for many centuries, the success story of silage was delayed until the 1950s, when more intensive animal production was demanded. The revival of this preservation method was also supported by the introduction of the forage harvester in Europe and North America in the 1960s (Wilkinson & Toivonen, 2003).

World silage production

Silage production, as a way to preserve animal feed, has increased over the years at the expense of hay, because its production is less dependent on sustained periods of dry weather. From a worldwide perspective of utilised area, the most important crops for ensilage are grass and maize, with grass being more important in Europe and maize in North America. Other crops for ensilage include corn varieties (e.g. wheat, barley), legumes and industrial by-products (sugar beet tops, pressed sugar beet pulp, brewers grains) (Wilkinson & Toivonen, 2003). In 2000, the estimated area of land harvested for silage in Western Europe was approximately 15 million hectares of which 10 million were grass, 4 million maize and 1 million others. Generally, the production of silage has markedly increased in Europe between 1975 and 1990 from approx. 50 to 100 million tonnes dry matter. Since the 1990s, the production has remained more or less static. Table 4

presents an overview of production figures for the five most important European countries and the US.

Table 4: Important countries for silage production (Wilkinson & Toivonen, 2003)

Estimated production in 2000 (million tonnes dry matter)				
Country	Grass	Maize	Other	Total
France	6.1	16.8	5.3	28.2
Germany	8.6	14.6	3.2	26.4
United Kingdom	9.4	1.1	0.4	10.9
Czech Republic	7.3	2.6	0.5	10.4
Italy	0.2	6.9	0.4	7.5
USA	1.7	32.4	9.0	43.1

In Austria, silage production on a dry matter basis in 2000 was estimated to be 1.6 million tonnes of grass, 1.2 million tonnes of maize and 0.2 million tonnes of other crops. More recent figures are available for 2009 with 2.8 million tonnes of grass, 1.1 million tonnes of maize and 0.5 million tonnes of legumes (BMLFUW, 2010; Resch, 2011). This data indicates that production in Austria has significantly increased over the last decade.

Goals in ensiling

Silage can be described as the material produced by controlled fermentation of a crop with high moisture content in order to preserve nutritional feeding value (McDonald et al., 1991). Thus, the main objectives in preserving crops by lactic acid fermentation include the rapid achievement of anaerobic conditions and the minimization of losses caused by spoilage microorganisms. In order to achieve these goals it is necessary to adhere to some essential points in silage production (Weissbach, 2002; DLG, 2006):

- Use only clean material in its optimum condition (harvester settings to min. cutting height of 5-7 cm, right harvesting time)
- Dry matter content with an optimum range between 30-40 %
- Optimum chopping length (< 4 cm), compaction of the material in the silo

- Quick filling and adequate sealing in order to achieve airtight conditions for the subsequent lactic acid fermentation
- Use silage additives to support the natural fermentation process and limit secondary fermentation

Clostridia – a major problem in silage production

Apart from yeasts and moulds, which are associated with aerobic spoilage, clostridia are one of the major disturbing factors in silage fermentation. Bacteria from the genus *Clostridium* are obligately anaerobic spore-formers and many of the species can ferment carbohydrates as well as proteins. *Clostridium* species typically associated with silage are *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* and *C. bifermentans* (McDonald et al., 1991). While the first two species are regarded as saccharolytic, the latter species are highly proteolytic, thus degrading proteins and amino acids. The resulting products have a negative impact on the feeding value of the ensiled material and on animal health (e.g. toxic biogenic amines) (Krizek, 1993; Van Os et al., 1996). Among the species described above, *C. tyrobutyricum* is the most problematic, as this bacterium is acid tolerant and capable of converting lactate to butyric acid, H₂ and CO₂. Abundant growth of *C. tyrobutyricum* in silage can lead to an increase in pH and subsequently to growth of less acid tolerant clostridia and even pathogenic microorganisms like *C. botulinum* (Notermans et al., 1979; Driehuis & Oude Elferink, 2000). Consequently, clostridial growth may not only cause severe nutrient losses in the silage but also represents a health hazard when the silage is fed to animals (Weissbach, 2004). Silages spoiled by clostridia are typically characterised by a high pH and an unpleasant smell caused by high contents of butyric acid, ammonia and amines.

In ensiling, the spoilage microorganisms are naturally suppressed by intense lactic acid fermentation under anaerobic conditions, which leads to a subsequent pH drop in the plant material. However, under practical conditions, several factors can negatively influence a successful preservation process. These factors are associated with insufficient raw material quality and improper ensiling management and can be summarized as follows (McDonald et al., 1991; Driehuis & Oude Elferink, 2000; DLG, 2006):

- Low dry matter content and thus high water activity a_w

- Low content of fermentable sugars
- High buffering capacity
- Improper lactic acid bacteria (LAB) and/or low initial cell counts of LAB
- Lack of inhibitory substances (nitrate)
- Soil contamination during harvesting or wilting

Although awareness concerning these issues is widespread among farmers and scientists alike, the problems with clostridial spoilage continue to persist. Consequently, silage additives have been developed in order to compensate unfavourable conditions in silage production, suppress growth of unwanted microorganisms and improve silage quality (Thaysen et al., 2007). However, according to the DLG (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft), only two of these additives are approved as being particularly effective against clostridial growth.

Probably the most effective silage additive for this purpose is based on a mixture of nitrite and hexamethylenetetramine (Weissbach, 2004). The utilization of nitrites against clostridia has a long tradition in curing salts for the preservation of meat products and sausages (O`Leary & Solberg, 1976). In silage, the pH decrease induced by LAB in the early phase of fermentation causes conversion of nitrite to nitrous gases which inhibit susceptible clostridia (Knicky, 2005; DLG, 2006). LAB, on the other hand, are not disturbed by these compounds and pH reduction continues. Hexamethylenetetramine, the second active ingredient of the combination, is hydrolysed during prolonged pH drop and liberates formaldehyde, thus delivering sustained protection against clostridial proliferation, also at later stages of the fermentation process (Lueck, 1985). Although the advantages of the additive are evident, there are pronounced health risks associated with nitrous gases since these compounds are highly toxic for humans and animals. Consequently, other approaches focused on less dangerous remedies, such as biological LAB starters. The application of selected lyophilised LAB at the onset of ensiling ensures a high initial number of LAB and therefore supports accelerated acidification through the conversion of plant sugars to organic acids. Consequently, the pH decreases to inhibitory levels for clostridia. However, there is only one commercial LAB starter available, which is attributed to have an inhibitory effect on clostridial growth (DLG, 2006; Hrnacek, 2009). Lactic acid starters may also be combined with other supplements such as enzymes or

molasses, which are added to increase the availability of fermentable substrate for the bacteria and achieve a further reduction in pH (McDonald et al., 1991; Thaysen et al., 2007).

During recent years, research efforts were undertaken in order to further improve the inhibitory effect of lactic acid starters against clostridia. The ability of LAB to synthesize bacteriocins was seen as a promising character to be utilised in silage production, as the method was already demonstrated to be effective in cheese and meat production (Okereke & Montville, 1991; Czech, 2003; Flythe et al., 2004; Tuerk, 2005; Tuma et al., 2008; Jones et al., 2008). However, until now, success with bacteriocin-synthesizing LAB in this field was limited and therefore additives on this basis have not been introduced to the market, yet. Other attempts for the combined use of anticlostridial substances and LAB for the suppression of clostridial growth are limited to only a few reports in the literature and did not trigger relevant follow-up studies (Bureenok et al., 2006).

Impact of clostridia in cheese production

With increased utilization of silage as forage for livestock, clostridial contamination of raw milk became a serious problem in the production of specialised cheeses (Heilmeyer, 1988; Jonsson, 1990). The spores of clostridia from silage are able to survive the digestive system of dairy cows and can then be transferred to the milk via faecal contamination of udders and teats (Vissers et al., 2006). Consequently, the presence of clostridial spores in milk not only impairs its quality but is also a health risk for consumers. The most relevant species for the dairy industry is *C. tyrobutyricum* (the Greek word “tyros” means “cheese”), which was first isolated from spoiled cheese samples (Heilmeyer, 1988). Its ability to ferment lactate is responsible for a cheese defect called “late-blowing”, which can be observed in hard and semi-hard cheeses such as Emmental, Grana, Gouda, and Parmesan (Driehuis & Oude Elferink, 2000; Julien et al., 2008). As a result, some countries with considerable production of these types of cheeses prohibited or discouraged the feeding of silage to dairy cows. In other areas, the use of silage additives has become mandatory in order to minimize clostridial growth in silages (Wilkinson & Toivonen, 2003). Other countermeasures, such as milk treatment prior to cheese production in order to separate the contaminants can help to

minimize the problem, but are expensive and decrease milk quality for further processing (Heilmeyer, 1988).

References

- Baczynski L, Beddie D and Wirth T, Process for the production of yeast. Patent Application WO 2007/131669 A1 (2007).
- Baczynski L and Wirth T, Method for the production of starch. European Patent 2 106 408 B1 (2010).
- Barney MC, Kot EJ Chicoye E, Jilek JK, Oral care compositions containing hop acids and method. US Patent 5 370 863 (1994).
- Barney MC, Lusc LT, Ting PL and Ryder DS, Method for inhibiting listeria. US Patent 5 455 038 (1995).
- Barth HJ, Klinke C and Schmidt C, *Der grosse Hopfenantlas*. Verlag Hans Carl, Nuremberg, pp. 25-28, 369 (1994).
- Behr J, Gaenzle MG and Vogel RF, Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6483-6492 (2006).
- Behr J and Vogel RF, Mechanisms of hop inhibition: hop ionophores. *J Agric Food Chem* **57**: 6074-6081 (2009).
- Behre KE, The history of beer additives in Europe – a review. *Veget Hist Archaeobot* **8**: 35-48 (1999).
- Benitez JL, Forster A, De Keukeleire D, Moir M, Sharpe FR, Verhagen LC and Westwood KT, *Hops and hop products (manual of good practice)*. European Brewery Convention (EBC), Zoeterwoode and Verlag Hans Carl, Nuremberg, pp. 3-11, 25-50 (1997).

- Bhattacharya S, Virani S, Zavro M and Haas GJ, Inhibition of *Streptococcus mutans* and other oral streptococci by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents. *Econ Bot* **57** (1): 118-125 (2003).
- Boeltzig K, Untersuchungen ueber die tuberkulostatische Wirkung einiger Hopfenbitterstoffe. *Brauwissenschaft* **1**: 217-221 (1952).
- BMLFUW (Bundesministerium fuer Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft), Gruener Bericht 2010. Bericht ueber die Situation der oesterreichischen Land- und Forstwirtschaft. BMLFUW, 336 pp. (2010).
- Bureenok S, Namihira T, Mizumachi S, Kawamoto Y and Nakada T, The effect of epiphytic lactic acid bacteria with or without different byproduct from defatted rice bran and green tea waste on napiergrass (*Pennisetum purpureum* Shumach) silage fermentation. *J Sci Food Agric* **86**: 1073-1077 (2006).
- Chin Y-C, Chang N-C and Anderson HH, Factors influencing the antibiotic activity of lupulon. *J Clin Investigation* **28**: 909-915 (1949).
- Cornelison JM, Yan F, Watkins SE, Rigby L, Segal JB and Waldroup PW, Evaluation of hops (*Humulus lupulus*) as an antimicrobial in broiler diets. *International Journal of Poultry Science* **5** (2): 134-136 (2006).
- Czech E, Effekt von Milchsaeurebakterien-Isolaten auf die Unterdrueckung von Clostridien in Silagen. Dissertation. Universitaet fuer Bodenkultur, Wien, 183 pp. (2003).
- DLG (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft), Praxishandbuch Futtermittelkonservierung. 7. Auflage. DLG-Verlag, Frankfurt (Main), 353 pp. (2006).
- Driehuis F and Oude Elferink SJWH, The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet Q* **22**: 212-216 (2000).

Eiken J, *Hops*, 4 pp., viewed on 01.04.2011.

<http://www.visitcarlsberg.dk/beer/BeerBrewing/ingredients/Pages/Hops.aspx>

Fernandez JL and Simpson WJ, Aspects of the resistance of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J Appl Bacteriol* **75**: 315-319 (1993).

Flythe MD and Russell JB, The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. *FEMS Microbiol Ecol* **47**: 215-222 (2004).

Flythe MD, The antimicrobials effects of hops (*Humulus lupulus* L.) on ruminal hyper ammonia-producing bacteria. *Let Appl Microbiol* **48**: 712-717 (2009).

Fukao T, Sawada H and Ohta Y, Combined effect of hop resins and sodium hexametaphosphate against certain strains of *Escherichia coli*. *J Food Prot* **63** (6): 735-740 (2000).

Haas GJ and Barsoumian R, Antimicrobial activity of hop resins. *J Food Protect* **57** (1): 59-61 (1994).

Haas GJ, Hop-based udder and teat dips and washes. US Patent 7 078 062 B2 (2006).

Heilmeyer J, Nachweismethoden fuer kaesereischaedliche Clostridien, insbesondere fuer *Clostridium tyrobutyricum*. Doctoral Thesis. Technische Universitaet Muenchen, 106 pp. (1988).

Hein W, Pollach G and Roesner G, Studies of microbiological activities during thick juice storage. *Sugar Ind* **127** (4): 243-257 (2002).

Hein W, Pollach G and Emerstorfer F, 10 years' experience with natural antibacterials within Agrana. *Sugar Ind* **131**: 477-491 (2006).

- Heyerick A, Unraveling the mechanism of the lightstruck flavor of beer. Doctoral Thesis. University of Gent, pp. 10-16 (2001).
- Hornsey I, *A history of beer and brewing*. RSC Publishing, Cambridge, pp. 61-63, 303-314, 534-537 (2003).
- Huavere K, Studies on the mechanism of formation of the lightstruck flavor in beer. Doctoral Thesis. University of Gent, pp. 3-15 (2004).
- Hughes P, The significance of iso- α -acids for beer quality. *J Inst Brew* **106** (5): 271-276 (2000).
- Hrnecek M, Development of a novel silage starter for inhibition of clostridia and determination of clostridia cells with fluorescence in situ hybridisation. Doctoral Thesis. Universitaet für Bodenkultur, Wien, 236 pp. (2009).
- Iijima K, Suzuki K, Ozaki K and Yamashita H, horC confers beer-spoilage ability on hop-sensitive *Lactobacillus brevis* ABBC45^{cc}. *J Appl Microbiol* **100**: 1282-1288 (2006).
- Johnson EA and Haas GJ, Antimicrobial activity of hop extracts against *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* and *Helicobacter pylori*. US Patent 6 251 461 B1 (2001).
- Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brightwell G and Tagg JR, Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiol* **25**: 228-234 (2008).
- Jonsson A, Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, D-cycloserine, and lactate dehydrogenase activity. *J Dairy Sci* **73**: 719-725 (1990).
- Julien M-C, Dion P, Lafreniere C, Antoun H and Drouin P, Sources of clostridia in raw milk on farms. *Appl Environ Microbiol* **74** (20): 6348-6357 (2008).

- Justé A, Krause MS, Lievens B, Klingeberg M, Michiels CW and Willems KA, Protective effect of hop β -acids on microbial degradation of thick juice during storage. *J Appl Microbiol* **104**: 51-59 (2008).
- Knicky M, Possibilities to improve silage conservation. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 34 pp. (2005).
- Krizek M, Biogenic amines in silage. 1. The occurrence of biogenic amines in silage. *Arch Tierernahr* **43** (2): 169-177 (1993).
- Larson AE, Yu RRY, Lee OA, Price S, Haas GJ and Johnson EA, Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Int J Food Microbiol* **33**: 195-207 (1996).
- Lueck E, *Chemische Lebensmittelkonservierung: Stoffe, Wirkungen, Methoden*. 2. Auflage. Springer-Verlag, New York Heidelberg Berlin Tokyo, pp. 82-87 (1985).
- Madsen KK, Bossert MM and Ono M, Compositions comprising and processes for producing inorganic salts of hop acids. Patent Application US 2011/0039927 A1 (2011).
- Maye JP, Hop acids as a replacement for antibiotics in animal feed. Patent Application US 2010/0247708 A1 (2010).
- McDonald P, Henderson AR and Heroen SJE, *The Biochemistry of Silage*. 2nd edition. Chalcombe Publications, Aberystwyth, pp. 108-122 (1991).
- Millis JR and Schendel MJ, Inhibition of food pathogens by hop acids. US Patent 5 286 506 (1994).
- Mizobushi S and Sato Y, Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agric Biol Chem* **49** (2): 399-403 (1985).

- Moir M, Hops – a millennium review. *J Am Soc Brew Chem* **58** (4): 131-146 (2000).
- Muthaiyan A, Limayem A and Ricke SC, Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Prog Energy Comb Sci* **37**: 351-370 (2011).
- Narvaez N, Wang Y, Xu Z and McAllister T, Effects of hops on *in vitro* ruminal fermentation of diets varying in forage content. *Livestock Science*, article in press (2011).
- Neve RA, *Hops*. 1st edition. Chapman and Hall, London, pp. 1-10, 25-45 (1991).
- Notermans S, Kozaki S and Van Schothorst M, Toxin production by *Clostridium botulinum* in grass. *Appl Environ Microbiol* **38** (5): 767-771 (1979).
- OJEU, Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition L268/36 (2003).
- OJEU, European Union Register of Feed Additives, pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, Appendixes 3b & 4. Annex: List of additives, Edition 116 released 14 April 2011: p. 365 (2011).
- Okereke A and Montville TJ, Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. *Appl Environ Microbiol* **57** (12): 3423-3428 (1991).
- O'Leary V and Solberg M, Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol groups and on the activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol* **31** (2): 208-212 (1976).
- Piendl A and Schneider G, Ueber die physiologischen Eigenschaften des Hopfens. *Brauwelt* **121**: 600-608, 724-734 (1981).

- Pollach G, Hein W and Hollaus F, Use of hop products as bacteriostaticum in the sugar industry. *Sugar Ind* **121**: 919-926 (1996).
- Pollach G, Process to stop the growth of thermophilic microorganism in an aqueous sugar containing medium. European Patent 0 681 029 B1 (1997).
- Pollach G, Hein W, and Roesner G, New findings towards solving microbial problems in sugar factories. *Sugar Ind* **124**: 622-637 (1999).
- Pollach G, Hein W, Leitner A and Zoellner P.: Detection and control of strictly anaerobic, spore forming bacteria in sugar beet extraction plants. *Sugar Ind* **127**: 530–537 (2002).
- Pollach G, Hein W and Beddie D, Application of hop beta acids and rosin acids in the sugar industry. *Sugar Ind* **127**: 921-930 (2002).
- Resch R, Gruenlandnettoertraege von Oesterreich im Jahr 2009 in Abhaengigkeit von Kulturart und Futterkonservierung. Schriftliche Mitteilung vom 02.05.2011.
- Riedl W, VI. Mitteilung ueber Hopfenbitterstoffe. Synthese einiger Lupulon-Analoga mit abgewandeltem Acyl-Rest. *Liebigs Ann Chem* **585**: 38-42 (1954).
- Rigby FL and Segal JB, Feeds containing hop acids and uses thereof as supplements in animal feeds. Patent Application WO 2005/089104 A2 (2005).
- Rohne K and Rische H, Ergebnisse experimenteller Untersuchungen ueber bacteriostatische Stoffe aus Hopfen. *Brauwissenschaft* **1**: 221-224 (1952).
- Rueckle L and Senn T, Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. *Int Sugar J* **108** (1287): 139-147 (2006).
- Rybacek V (ed.), *Developments in crop science 16: hop production*. Joint edition by Elsevier Science Publishers, Amsterdam and SZN State Agricultural Publishing House, Prague, pp. 52-57 (1991).

- Sakamoto K, Beer spoilage bacteria and hop resistance in *Lactobacillus brevis*.
Doctoral Thesis, University of Groningen, pp. 1-25, 59-61 (2002).
- Sakamoto K, Van Veen HW, Saito H, Kobayashi H and Konings WN, Membrane-bound ATPase contributes to hop resistance of *Lactobacillus brevis*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5374-5378 (2002).
- Sakamoto K and Konings WN, Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int J Food Microbiol* **89**: 105-124 (2003).
- Schmalreck AF, Teuber M, Reininger W and Hartl A, Structural features determining the antibiotic potencies of natural and synthetic hop bitter resins, their precursors and derivatives. *Can J Microbiol* **21**: 205-212 (1975).
- Shen C and Sofos JN, Antilisterial activity of hops beta acids in broth with or without other antimicrobials. *JFS* **73** (9): 438-442 (2008).
- Shimwell JL, On the relation between the staining properties of bacteria and their reaction towards hop antiseptic, part I. *J Inst Brew* **13**: 111-117 (1937).
- Shimwell JL, A suggested relationship between the molecular architecture of humulon and lupulon and their apparent specificity towards Gram-positive bacteria, part II. *J Inst Brew* **13**: 117-118 (1937).
- Simpson WJ, Molecular structure and antibacterial function of hop resin materials. PhD Thesis, Council for National Academic Awards, London, 256 pp. (1991).
- Simpson WJ and Smith ARW, Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *J Appl Bacteriol* **72**: 327-334 (1992).
- Simpson WJ, Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J Inst Brew* **99**: 405-411 (1993).

- Simpson WJ, Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. *J Gen Microbiol* **139**: 1041-1045 (1993).
- Simpson WJ, Fernandez JL, Hughes PS, Parker DK and Price AC, The chemistry of iso-alpha-acids: an explanation of their mode of action. European Brewery Convention, Proceedings of the 24th Congress. IRL Press, pp. 183-192 (1993).
- Simpson WJ and Fernandez JL, Mechanism of resistance of lactic acid bacteria to trans-isohumulone. *J Am Soc Brew Chem* **52** (1): 9-11 (1994).
- Siragusa GR, Haas GJ, Matthews PD, Smith RJ, Buhr RJ, Dale NM and Wise MG, Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract jejunum and caecum. *J Antimicrob Chemother* **61**: 853-858 (2008).
- Smith NA and Smith P, Antibacterial activity of hop bitter resins derived from recovered hopped wort. *J Inst Brew* **99**: 43-48 (1993).
- Stocker HR, Chemie und Technologie des Hopfens. 1. Mitteilung: Die Chemie der Humulopikrole. *Schweizer-Brauerei Rundschau* **73** (8): 139-146 (1962).
- Suzuki K, Sami M, Kadokura H, Nakajima H and Kitamoto K, Biochemical characterization of *horA*-independent hop resistance mechanism in *Lactobacillus* *Int J Food Microbiol* **76**: 223-230 (2002).
- Suzuki K, Iijima K, Sakamoto K, Sami M and Yamashita Y, A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *J Inst Brew* **112** (2): 173-191 (2006).
- Teuber M, Chromatographische Trennung von Hopfeninhaltsstoffen und deren Einfluss auf Mikroorganismen. Doctoral Thesis. Ludwig Maximilians-Universitaet, Munich 53 pp. (1962).

- Teuber M, Low antibiotic potency of isohumulone. *Appl Microbiol* **19** (5): 871 (1970).
- Teuber M and Schmalreck AF, Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. *Arch Microbiol* **94**: 159-171 (1973).
- Thaysen J, Honig H, Kalzendorf C, Spiekers H and Staudacher W: Siliermittel: Rechtliche Rahmenbedingungen, Wirksamkeit DLG-geprüfter Produkte und Einsatzempfehlungen. *Uebers Tierernaehrg* **35**: 55-91 (2007).
- Tuerk B, Einfluss verschiedener Kultivierungsbedingungen und Hemmstoffe auf die Entwicklung der vegetativen Zellen und Sporen von *Clostridium butyricum*, *C. sporogenes* und *C. tyrobutyricum*. Dissertation. Universitaet fuer Bodenkultur, Wien, 89 pp. (2005).
- Tuma S, Kucerova K and Plockova M, Isolation of anticlostridially active lactobacilli from semi-hard cheese. *Czech J Food Sci* **26** (5): 324-332 (2008).
- USDA, *Crop profile for hops in Washington* 12 pp. (2001), viewed on 01.04.2011 <http://www.ipmcenters.org/cropprofiles/docs/wahops.html>
- Van Cleemput M, Cattoor K, De Bosscher K, Haegemann G, De Keukeleire D and Heyerick A, Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *J Nat Prod* **72**: 1220-1230 (2009).
- Van Os M, van Wikselaar PG and Spoelstra SF, Formation of biogenic amines in well fermented grass silages. *JAS* **127**: 97-107 (1996).
- Verhagen LC, *Beer Flavor in Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology; Vol. 3: Development and Modification of Bioactivity*. 1st edition; Elsevier Ltd. Kislington, UK, pp. 967-997, (2010).

- Verzele M and De Keukeleire D, *Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 1-43, 201-213 (1991).
- Vissers MMM, Driehuis F, Te Giffel MC, De Jong P and Lankveld JMG, Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *J Dairy Sci* **89**: 850-858 (2006).
- Weissbach F, Grundlagen und Praxis der Produktion guter Grassilagen. 8. Alpenlaendisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, pp. 1-5 (2002).
- Weissbach F, Analyse der Ursachen und Moeglichkeiten zur Verminderung hoher Clostridien-Last im Grundfutter. *Tieraerztl Rundschau* **59**: 32-41 (2004).
- Wilkinson JM and Toivonen MI, *World Silage – a Survey of forage Conservation around the World*. Chalcombe Publications; Lincoln, United Kingdom, pp. 1-29 (2003).
- Yamaguchi N, Satho-Yamaguchi K and Ono M, *In vitro* evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. *Phytomedicine* **16**: 369-376 (2009).

AIM OF THE STUDY

The aim of this study is to evaluate the potential of plant-based antimicrobials for the growth inhibition of clostridial contaminants in the field of silage production. After the voluntary abdication of formaldehyde use in Austria, these so-called “natural antibacterials”, based on hop β -acids and rosin acids, were originally developed at Zuckerforschung Tulln GmbH in the 1990s in an effort to combat thermophilic bacteria in the extraction area of sugar production.

Already, in the 1990s, the developers and other authors reported that remnants of these substances have a certain influence on the fermentation process and the resulting properties of pressed beet pulp silage. Nevertheless, more in-depth studies were not conducted.

Therefore, as an initial step, the influence of these plant-based substances on the growth of typical silage microorganisms should be first investigated. These investigations were to be carried out on a laboratory-scale by means of different *in vitro* susceptibility testing methods.

In a second step, a laboratory ensiling model with pressed beet pulp should be developed in order to achieve silages, which have reproducibly undergone clostridial spoilage and contain typically high butyric acid concentrations.

Subsequently, systematic ensiling experiments should be conducted to evaluate the inhibitory effect of the plant-based antimicrobials on clostridial growth and the capabilities to secure silage quality despite clostridial contamination. In these experiments, commercial silage additives should be used for comparison purposes.

In a third step, the experiments should be extended to other plant raw materials with a special focus on the ensiling of grass, as in this field clostridial spoilage is a major problem and has a high economic impact. Again, commercial products should be used to compare the results.

To this day, Zuckerforschung Tulln GmbH has established a successful licensing model for “natural antibacterials” that are marketed throughout the worldwide sugar industry. Thus, the findings were to be evaluated for protection by patent applications in order to possibly extend the existing licensing model to the field of silage production.

Chapter one

10 years' experience with natural antibacterials within Agrana.

Walter Hein, Guenter Pollach and Florian Emerstorfer

Sugar Industry 131: 477-491 (2006)

10 years' experience with natural antibacterials within Agrana

Über 10 Jahre Erfahrung mit natürlichen Biostabilisatoren bei Agrana

Walter Hein*, Günter Pollach, Florian Emerstorfer

The first part of the paper gives an overview of the discovery of the effectiveness of various natural substances and their features for suppression of unwanted microbiological activities within sugar production. Starting with hop β -acids and carrying on to rosin acids and myristic acid, important steps between the discovery of the single substances and further development of marketable ready-to-use products are highlighted, including some insight on daily research activities as well as important hints on the optimized application of the products.

Furthermore information about product properties, effective concentrations, optimal dosage features and locations as well as injection systems are included. Also successful applications beyond the extraction area such as in the field of thick juice storage and within ion exchangers are reported. Finally, results derived from studies on the destination of residues of natural antibacterials during sugar production and the sensory influence on the taste of sugar are summarized as well.

The second part of the paper covers findings about the effectiveness of natural antibacterials against mesophilic slime-forming bacteria. After trials on the laboratory scale in which hop β -acid and rosin acids were found to be highly effective against pure strains of *Leuconostoc*, results from applications in cooling water circuits and from trials in the field of beet storage are reported.

Key words: natural antibacterials, hop β -acids, rosin acids, myristic acid, extraction, thick juice storage, ion exchanger, dextran, mesophilic slime-forming bacteria, cooling water circuit, beet storage

Die Arbeit gibt im ersten Teil einen Überblick über die Entdeckung der Wirksamkeit von verschiedenen natürlichen Substanzen bei der Bekämpfung bzw. Begrenzung von unerwünschten mikrobiologischen Aktivitäten bei der Zuckergewinnung. Beginnend mit Hopfen- β -Säuren über Harzsäuren bis zur Myristinsäure wird auf wichtige Schritte bei der Entdeckung der Wirksamkeit dieser Substanzen bzw. bei der Entwicklung von vermarktbareren Produkten eingegangen. Dies gibt nicht nur einen Einblick in den Forschungsalltag, sondern enthält auch wichtige Hinweise zum optimalen Einsatz der Produkte. So werden Informationen zu Produkteigenschaften, notwendigen Mengen, optimalen Dosierformen bzw. -stellen und Einbringungssysteme gegeben. Des Weiteren wird über erfolgreiche Einsätze außerhalb des Bereiches von Extraktionsanlagen, wie Dicksaftlagerung und Ionenaustauschanlagen berichtet. Letztlich werden auch Ergebnisse von Untersuchungen zum Verbleib der Produkte in Zuge der Zuckerherstellung und der sensorischen Beeinflussung von Zucker präsentiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Wirksamkeit der Produkte zur Bekämpfung von mesophilen schleimbildenden Mikroorganismen behandelt. Nachdem sich in Laborversuchen vor allem Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren gegen verschiedene Reinzuchtstämmen der Spezies *Leuconostoc* als äußerst wirksam erwiesen, wird über den Einsatz der Produkte in Kühlwassersystemen und auch über erste Versuche bei der Rübenlagerung berichtet.

Stichwörter: natürliche Biostabilisatoren, Hopfen- β -Säuren, Harzsäuren, Myristinsäure, Extraktion, Dicksaftlagerung, Ionenaustauschanlagen, Dextran, mesophile schleimbildende Mikroorganismen, Kühlwassersystem, Rübenlagerung

1 Introduction

When Agrana in 1991 voluntarily abstained from using formalin to control bacteria in beet extraction, a completely new situation for the factories as well as for sugar technologists doing scientific research arose within the company. During the last few earlier campaigns some factories had already performed tests in which no disinfectant was applied for reduction of microbial activity for certain periods within the extraction area. Raised lactic acid values in the juices deriving from heavier microbial activity resulted in better pressability of the exhausted cossettes which finally led to energy savings during pulp drying. Under special conditions it was pos-

* Revised version of the lectures presented by W. Hein at the VDZ/FZÖ Sommertagung in Wien 2004 and the Meeting of the CITS Scientific Committee in Copenhagen 2005.

1 Einleitung

Als man sich 1991 bei Agrana entschloss, aus Imagegründen freiwillig auf den Einsatz von Formalin zur Bekämpfung von Mikroorganismen bei der Zuckergewinnung zu verzichten, ergab sich sowohl für die Produktion als auch für die Forschung eine völlig neue Situation. Bereits in den Jahren zuvor wurde in einzelnen Werken bzw. in unterschiedlich langen Kampagnenphasen auf den Einsatz eines Desinfektionsmittels im Extraktionsbereich verzichtet. Auf Grund der dadurch bedingten höheren Milchsäurewerte in den Säften als Folge von verstärkter Mikroorganismenaktivität wurde die Abpressbarkeit der extrahierten Schnitzel verbessert, was letztend-

* Modifizierte Fassung der Vorträge von W. Hein, gehalten bei der VDZ/FZÖ-Sommertagung in Wien 2004 und der Sitzung des Wissenschaftlichen Komitees der CITS in Kopenhagen 2005.

sible to compensate for resultant sugar losses through these energy savings.

At that time a procedure was developed at the sugar research institute in Fuchsenbigl, Austria, which was capable of performing a compromise between an operational mode with complete suppression of microorganisms and controlled growth of lactic acid bacteria, via dosage of formalin in the lower parts of the extraction tower. This was achieved through a special way of formalin injection. The results were published in 1986 [1].

After the ban on formalin for image reasons, the search for alternative substances capable of inhibiting thermophilic bacteria was started. During studies concerning the utilization of monosaccharide-degradation for improvement of pressability of exhausted cossettes [2, 3] the key observations occurred. The bacteriostatic features of hops, which have been traditionally utilized for more than 800 years to expand the storage life of beer, can also suppress microbial activities within sugar production [4].

After this breakthrough other substances such as rosin acids and myristic acid, respectively, were discovered and applied against thermophilic bacteria [5, 6]. In the following, important milestones are worked out in detail beginning with the discovery, leading over to the development of practical solutions of these alternative products and finalizing with future perspectives.

2 Hop β -acids

Detailed information on the essential constituents of hops can be found in the corresponding literature [7]. Shortly summarized the following facts are very much worth mentioning: within the syncarpies of female hop plants – ripe unfertilized inflorescences called umbels or cones – two highly interesting substance classes are present: α -acids or humulones, which are used for bittering of beer and β -acids or lupulones having bacteriostatic properties [8, 9].

A decisive advantage of applying hop-products is based on the fact that these products have been constituents of food for centuries and are regarded as harmless for human beings and mammals. Important milestones concerning hop β -acids are listed in Table 1.

As already mentioned above, the effectiveness of hop products against thermophilic lactate bacteria in sugar production was discovered in 1993. In 1994 systematic laboratory trials started in

lich zu einer Energieeinsparung bei der Trocknung führte. Durch diese Energieeinsparung können unter gewissen Rahmenbedingungen die auftretenden Zuckerverluste kompensiert werden.

Im Zuckerforschungsinstitut Fuchsenbigl wurde zu dieser Zeit ein Verfahren entwickelt, bei dem durch Dosierung von Formalin im unteren Bereich von Extraktionstürmen ein Kompromiss zwischen einer Betriebsweise mit vollständiger Unterdrückung bzw. Zulassung von mikrobiologischer Milchsäurebildung erzielt werden sollte. Dies wurde durch eine spezielle Form der Formalineinbringung im unteren Bereich des Extraktionsturms möglich. Die Ergebnisse wurden 1986 publiziert [1].

Bei Studien zur Nutzung des Monosaccharidabbaus zwecks Verbesserung der Schnitzelabpressbarkeit [2, 3] wurde schließlich die entscheidende Beobachtung gemacht: Die bakteriostatische Kraft des Hopfens, die schon seit über 800 Jahren bei der Verbesserung der Lagerfähigkeit von Bier genutzt wird, kann auch erfolgreich zur Bekämpfung von mikrobiologischen Aktivitäten bei der Zuckergewinnung genutzt werden [4].

In der Folge konnten dann auch Harzsäuren bzw. Myristinsäure erfolgreich zur Bekämpfung von thermophilen Mikroorganismen eingesetzt werden [5, 6]. Im Folgenden werden einige wichtige Stationen der Entdeckung bzw. der Entwicklung dieser alternativen Produkte dargestellt.

2 Hopfen- β -Säuren

Bezüglich Details zu Hopfeninhaltsstoffen sei auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen [7]. Kurz zusammengefasst kann folgendes festgehalten werden: In den Fruchtständen der weiblichen Hopfenpflanzen – gereifte unbefruchtete Blütenstände, auch Dolden oder Zapfen genannt – findet man 2 interessante Stoffgruppen: α -Säuren oder Humulone, welche die angenehme Bittere des Biers bewirken und daneben β -Säuren oder Lupulone, die maßgeblich für die bakteriostatischen Eigenschaften verantwortlich sind [8, 9].

Entscheidender Vorteil für einen Einsatz von Hopfenprodukten war die Tatsache, dass Hopfenprodukte schon sehr lange in Lebensmitteln eingesetzt werden und sich damit kaum eine Diskussion über schädliche Nebenwirkungen dieser Substanzen entzünden könnte.

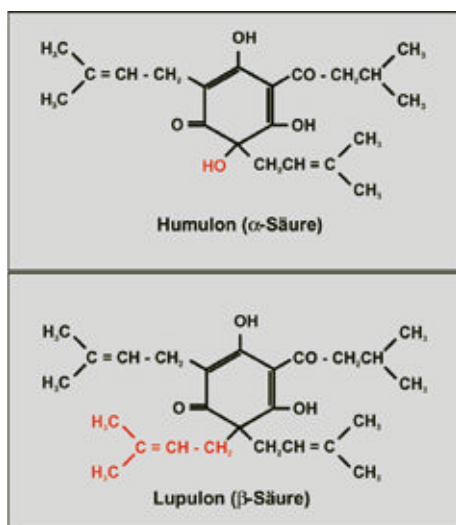


Fig. 1: Hop acids (above: humulone acid; below: lupulone acid)

Abb. 1: Hopfensäuren

Table 1: Important steps in the context of the use of hop products in sugar manufacture

Tab. 1: Wichtige Schritte im Zusammenhang mit der Nutzung von Hopfenprodukten bei der Zuckergewinnung

1991	Voluntary abdication of formalin at Agrana Freiwilliger Verzicht auf Formalin bei Agrana
1993	Discovery of the bacteriostatic features of hops for the sugar industry Entdeckung der bakteriostatischen Kraft des Hopfens für die Zuckerindustrie
1994	Systematic trials with the so-called "mini fermenter" Systematische Versuche im „Kleinfärmenter“
1994	Trials with base extract on a technical scale Versuche mit Baseextrakt im technischen Maßstab
1995	Optimization of dosing Optimierung der Dosierung
1995	Discovery of new fields of application Entdeckung weiterer Einsatzgebiete
1997	Foundation of BetaTec Inc.; development of BetaStab 10A® Gründung der Fa. BetaTec; Entwicklung von BetaStab 10A®

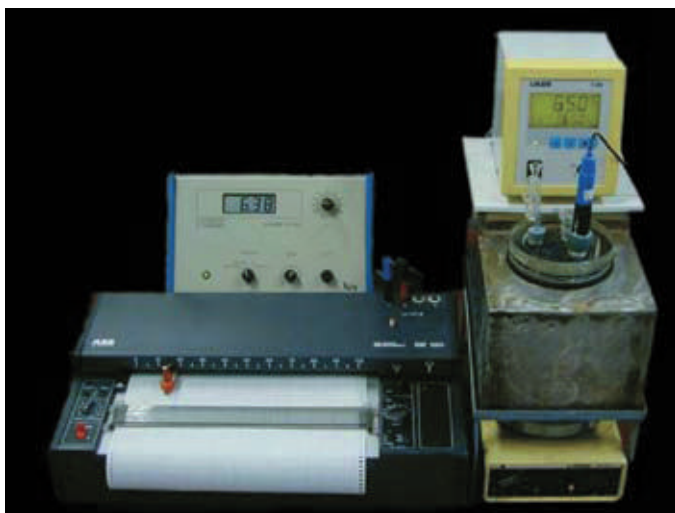


Fig. 2: Equipment for laboratory trials: "mini fermenter"

Abb. 2: Versuchsanordnung für Laborversuche: „Kleinfärmenter“

which a simple, but very efficient test arrangement, the so-called "mini fermenter" was used (Fig. 2).

This special test arrangement contains a small glass vessel and installations for slow magnetic stirring, temperature control and pH value recording. Raw juice (fresh or previously stored in a deep freezer) was used for inoculation and added to the clear liquid nutrients at the beginning of the test. After addition of the substance under investigation data about changing pH values due to microbial activity was collected. Successive dosing of small amounts of the substance then exhibits the minimum inhibitory concentration for the current experiment. Another important outcome is obtainable from the length of periods in which no further drop in pH value occurs.

This simple test arrangement, practically unmodified since the beginning of the first trials, was used throughout the whole study: from the beginning with pre-trials with various hop products in 1994 up to studies on the mode of action of the effective substances which, in 2003, yielded interesting findings.

The main problem in this phase of development was the creation of a product which complies with the requirements of containing a high concentration of effective substance as well as fitting economical expectations (a low-cost alternative to conventional substances in the sugar industry).

Good cooperation with the hop industry offered the authors an opportunity to test a so-called "baseextract". This product originates from making iso-extract, a soluble hop-product which is added to finished beer for achieving a standardized bitter taste. Baseextract is a highly viscous, dark green and sticky paste containing roughly 50% of β -acids and having an unpleasant smell. The first full scale trials with this product were conducted in the Tulln sugar factory in 1994. Results of this trial are given in Figure 3.

Baseextract was originally applied as an alcoholic solution or in its melted shape, later on trials with emulsions have also been carried out. The impact of continuous dosing over 4 h on the lactate content of raw juice is shown in Figure 3. An influence on the lactate content is clearly visible.

At this point it should be mentioned that due to the available pressing and drying capacities Austrian sugar factories needed to have lactate-values in raw juice between 300–400 mg/kg, to meet with specifications of dried pulp during phases of high beet processing capacity. This made trials with products of unknown effectiveness especially critical.

Wichtige Ereignisse im Zusammenhang mit Hopfen- β -Säuren, so genannte Meilensteine, sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Die Wirksamkeit von Hopfenprodukten gegen thermophile Milchsäurebildner bei der Zuckergewinnung wurde, wie eingangs bereits erwähnt, 1993 entdeckt. 1994 wurde mit systematischen Versuchen im Labormaßstab begonnen, wobei eine einfache, aber sehr effiziente Versuchsanordnung, der so genannte Kleinfärmenter, zum Einsatz kam (Abb. 2).

Diese Versuchsanordnung besteht aus einem temperier- und rührbaren Glasgefäß mit pH-Wert-Registrierung. Beobachtet wird dabei der Verlauf des pH-Werts nach Beimpfen des flüssigen Nährmediums, meist mit Rohsaft (frisch oder nach Gefrierlagerung) bzw. nach Zusatz der zu testenden Substanz. Die portionsweise Zugabe der zu testenden Substanz lässt dabei Rückschlüsse auf die minimal wirksame Konzentrationen zu. Eine weitere wichtige Aussage kann aus der Länge der Phase, in der es zu keinem weiteren pH-Wert-Abfall kommt, gezogen werden.

Mit dieser einfachen Versuchsanordnung, die seit den ersten Versuchen praktisch unverändert blieb, wurden im Prinzip alle wesentlichen Versuche durchgeführt: beginnend mit ersten Tests mit verschiedenen Hopfenprodukten 1994 bis hin zu Studien zur Wirkungsweise der Produkte, die 2003 sehr interessante Ergebnisse lieferten.

Hauptproblem in der frühen Entwicklungsphase war es, ein Produkt zu finden, das sowohl wirksam als auch preiswert ist. Die von Beginn an gute Zusammenarbeit mit der Hopfenindustrie führte dazu, dass die Autoren auf den so genannten Baseextrakt aufmerksam gemacht wurden. Dabei handelt es sich um ein Nebenprodukt, das bei der Herstellung von Isoextrakt – einem löslichen Hopfenprodukt, das dem fertigen Bier zur Standardisierung des Bittergeschmacks zugesetzt werden kann – anfällt. Baseextrakt ist eine hochviskose, dunkelgrüne klebrige Paste mit einem β -Säuregehalt von ca. 50 %, die einen unangenehmen Geruch aufweist. Mit diesem Produkt wurden im Werk Tulln in der Kampagne 1994 erste großtechnische Versuche durchgeführt (Ergebnisse s. Abb. 3).

Baseextrakt wurde anfänglich als alkoholische Lösung oder in geschmolzener Form eingesetzt, später wurden auch Versuche mit Emulsionen durchgeführt. In Abbildung 3 ist die Auswirkung einer kontinuierlichen Dosierung über 4 h auf den Rohsaft-Milchsäuregehalt dargestellt. Der Einfluss auf den Milchsäuregehalt ist eindeutig gegeben.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass in den österreichischen Werken auf Grund der vorhandenen Pressen- und Trocknungskapazität ein Milchsäuregehalt im Rohsaft von 300–400 mg/kg zu-

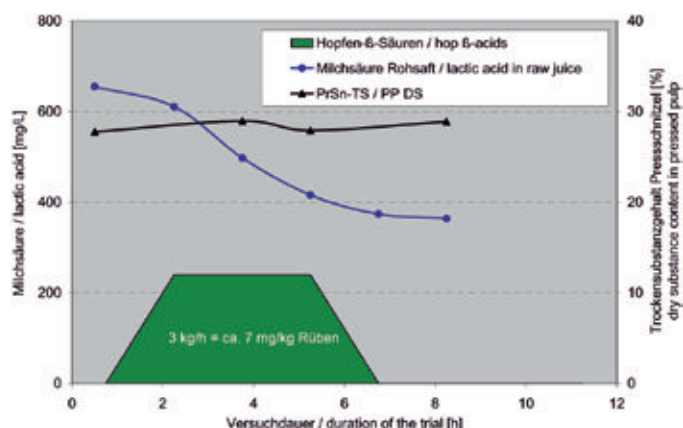


Fig. 3: Results of the first full-scale trial with hop β -acids

Abb. 3: Ergebnisse des ersten großtechnischen Versuchs mit Hopfen- β -Säuren

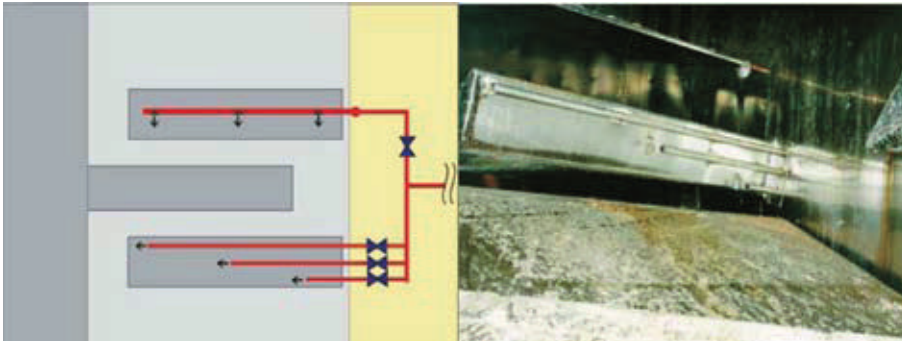


Fig. 4: Injection systems for extraction towers

Abb. 4: Einspeisesysteme für Extraktionstürme

The next task was to find an optimal way of injection of the bacteriostat in order to achieve best performance of the active substance. In this case many degrees of freedom need to be considered: the necessary amount of active substance, the type of injection (continuous or shock dosing), the location of injection (countercurrent mixer or extraction tower – mid-tower or lower part of the tower) and finally the choice of injection system. Trials of an optimal method of injection started in 1995 (Table 1). During the years useful information has been obtained in this field whereas there is still potential for substantial improvements due to diverse technical details and regional distinctions of individual factory locations.

Under the circumstances of the Tulln factory (3 countercurrent mixers, one extraction tower) it was asserted that shock dosing in four hourly intervals via a mid-tower located injection system was most effective. Applied concentrations of the active substance ranged from 3–5 mg/kg, calculated on the daily beet processing capacity. Figure 4 shows a dosing-scheme with an installation for preparation of baseextract and with two injection options into the extraction tower as used in the Tulln factory at the end of the 1990s.

Figure 4 shows the early standard equipment for extraction towers consisting of one lance with 3 vents and below an injection system which was developed at Zuckerforschung Tulln (ZFT), equipped with three lances varying in their length.

Periodical shifting of three magnetic valves ensures that the injected products are distributed over the whole cross section of the extraction tower. The image in Figure 4 (right) shows this new system. The so-called accurate-dosing-system very quickly proved its advantages over the conventional system.

gelassen werden muss, um bei hoher Verarbeitungsleistung die Spezifikationen für die Trockenschnitzel einhalten zu können. Dies erfordert bei Versuchen mit Produkten unbekannter Wirksamkeit eine besonders vorsichtige Vorgangsweise.

Die nächste Aufgabe bestand in einer optimalen Einbringung des Produkts, um die bestmögliche Wirkung zu erzielen. Hier gibt es eine große Zahl von Freiheitsgraden: notwendige Menge an Wirkstoff, Art der Dosierung (kontinuierlich oder stoßweise), die Dosierstelle (Gegenstrom-Schnitzelmaische oder Extraktionsturm bzw. Stellen im Extraktionsturm) und letztlich auch das

Einspeisesystem. Versuche zur optimalen Einbringung des Produkts begannen 1995 (Tab. 1). Wenngleich in diesem Bereich viele entscheidende Erkenntnisse gewonnen werden konnten [10], kann auf Grund der Fülle an zu berücksichtigenden technischen Details und Besonderheiten einzelner Fabrikstandorte durchaus mit weiteren substanziellen Verbesserungen gerechnet werden.

Für die Verhältnisse im Werk Tulln (3 Gegenstrom-Schnitzelmaschinen, ein Extraktionsturm) wurde festgestellt, dass Stoßdosierungen im Abstand von 4 h über eine Dosierstelle im mittleren Turmbereich am effektivsten sind. Die eingesetzten Mengen an Wirkstoff lagen dabei im Bereich von 3–5 mg/kg, berechnet auf die tägliche Rübenverarbeitung.

Besonders wichtig schien die Art der Einbringung zu sein. Abbildung 4 zeigt ein Schema der Dosierung, mit einer Aufbereitungsanlage für Baseextrakt und mit zwei Einspeisungsmöglichkeiten in den Extraktionsturm, wie sie Ende der 1990er Jahre im Werk Tulln eingesetzt wurden.

In der Abbildung ist einerseits die frühere Standardausrüstung von Extraktionstürmen, bestehend aus einer Lanze mit drei Öffnungen, und darunter das in der Zuckerforschung Tulln Ges.m.b.H. (ZFT) entwickelte Einbringsystem [1] mit drei verschiedenen langen Lanzen dargestellt. Durch periodisches Umschalten von drei Magnetventilen wird bei diesem System sichergestellt, dass die Produkte gleichmäßig über den gesamten Turmquerschnitt verteilt werden (Abb. 4, rechte Seite). Bald konnte gezeigt werden, dass das so genannte Exakt-Dosiersystem eindeutige Vorteile gegenüber dem herkömmlichen System hatte.

Die prinzipiell bekannte Tatsache, dass stoßweise Dosierungen mit kurzfristig hohen lokalen Konzentrationen wirksamer sind als kontinuierliche Dosierungen, konnten bei Versuchen im Werk Hohen-

Table 2: Discovery of various fields of application for hop β -acids

Tab 2: Entdeckung verschiedener Einsatzgebiete für Hopfen- β -Säuren

	Successful suppression of: / Erfolgreiche Bekämpfung von:
1995	Nitrite formation in ion exchangers Nitritbildung in Ionenaustauschern (Leopoldsdorf)
1996	Gas formation in extraction plants Gasbildung im Extraktionsbereich (Tulln)
1998	pH value-drop in stored thick juice (pilot trial) pH-Wert-Abfall in Lagerdicksaft (Pilotversuch)
1998	Butyric acid / H_2 formation in press water circuit Buttersäure- / H_2 -Bildung im Presswasserkreislauf (Hohenau)
1999	Dextran formation in the cold raw juice area Dextranbildung im kalten Rohsaftbereich (Hrusovany)

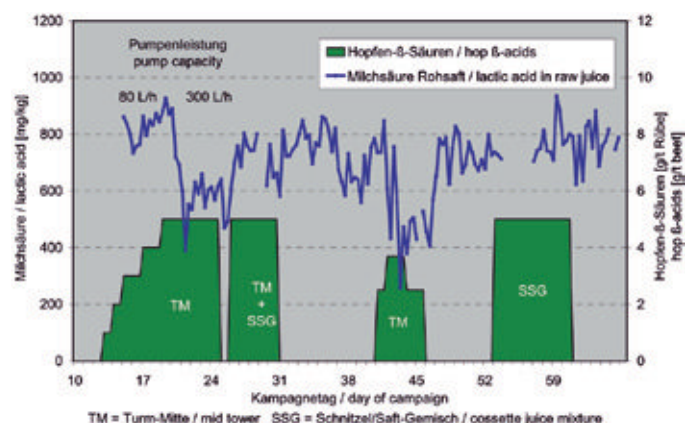


Fig. 5: Experiences with active substance injection (Hohenau)

Abb. 5: Erkenntnisse bei der Wirkstoffeinbringung (Hohenau)

In principle it is a well known fact that shock dosing with its high concentrations in the short-term is much more effective than continuous dosing: this was again demonstrated very impressively during trials in the Hohenau factory (Fig. 5).

As one can see from Figure 5 an according effect was not achieved until the pump capacity had been increased (replacement of the pump). The faster the product can be injected the higher is the short-time concentration and the better the effect. Furthermore dosages into an extraction plant as shown (one countercurrent mixer, one extraction tower) gave best results when injected into mid-tower. Observations about diverse fields of application varied as did the results concerning the application technique. Table 2 gives an overview of various fields of application for hop β -acids.

One of the first confirmation messages about successful implementation of hop β -acids outside of the extraction area came from the Leopoldsdorf factory, where a nitrite-forming infection within the ion exchanger was suppressed successfully [11].

An effect against gas-forming bacteria within the countercurrent mixer has been observed in Tulln as well. The operating conditions were improved by addition of natural antibacterials to the cossette-juice mixture and the consumption of antifoaming agents was sustainably reduced, respectively.

Impressive results were also achieved in thick juice storage. Formation of invert sugar and a drop in pH value were notably retarded and the effectiveness against mesophilic bacteria was observed for the first time [12].

In the Hohenau factory, hydrogen formation stemming from *Clostridia* infection was suppressed by dosage of hop β -acids at the head of the extraction tower. Continuous injection of small amounts had no negative influence on the pressability of the exhausted cossettes [13].

Moreover in the Czech sugar factory at Hrusovany an infection with *Leuconostoc* bacteria in the pre-liming trough was suppressed successfully [5]. Repeated reporting on the effectiveness of hop β -acid against mesophilic bacteria eventually led to systematic investigations (see section 6).

Another milestone consisted in the foundation of a subsidiary company (BetaTec, Hop Products) by a renowned hop company. With this company's broad experience within the hop business a product was developed which can be easily dosed and applied. This product, an alkaline solution with a hop β -acid content of 10% was named BetaStab®10A. This product represents the basis for the commercial success of hops in the sugar industry.

As early as 1995 a patent had been filed by Zuckerforschung Tulln Ges.m.b.H. (ZFT) with the title: Application of hop products for inhibition of thermophilic microorganisms in the presence of sugar containing aqueous media [14].

Hence close cooperation continued: production of the solution, marketing and sales as well as on-site user consulting was carried out by personnel of the hop company. On the part of ZFT know-how was passed on and training in sugar technology for employees were held. In the meantime the product has been sold in various countries in Europe, USA and Japan.

Through good cooperation in the analytical sector it was possible to show relatively rapidly that hop residues in sugar were below sensory recognition [15]. During another study in 2005 these earlier findings were confirmed (see section 4, Table 6).

au nochmals eindrucksvoll demonstriert werden (Abb. 5).

Wie aus Abbildung 5 zu erkennen ist, konnte erst nach Steigerung der Pumpenleistung (Austausch der Dosierpumpe) eine entsprechende Wirkung erzielt werden. Je schneller das Produkt eingebracht werden kann, desto höher ist kurzfristig die Konzentration und um so besser ist auch die Wirkung. Aus der Abbildung 5 ist darüber hinaus ersichtlich, dass auch im Falle dieser Extraktionsanlage (eine Maische, ein Extraktionsturm) Dosierungen im Bereich Turmmitte einen größeren Effekt zeigen.

Ähnlich vielfältig wie die Erkenntnisse zur Anwendungstechnik waren auch Beobachtungen zu verschiedenen Einsatzmöglichkeiten. Tabelle 2 gibt einen Überblick über verschiedene Einsatzgebiete von Hopfen- β -Säuren.

Eine der ersten Erfolgsmeldungen außerhalb des Extraktionsbereichs kam aus dem Werk Leopoldsdorf, wo eine nitritbildende Infektion im Bereich der Ionenaustauscher erfolgreich bekämpft werden konnte [11].

Eine Wirkung gegen gasbildende Mikroorganismen im Bereich der Gegenstrom-Schnitzelmaische wurde in Tulln beobachtet. Die Maischarbeit konnte durch Dosierungen ins Schnitzel-Saft-Gemisch verbessert und der Verbrauch an Schaumdämpfungsmittel gesenkt werden.

Interessante Ergebnisse wurden auch bei der Dicksaftlagerung gefunden: Invertzuckerbildung und pH-Wert-Abfall in tieferen Dicksaftsichten konnten deutlich verzögert und dadurch erstmals eine Wirksamkeit gegen mesophile Mikroorganismen beobachtet werden [12].

Im Werk Hohenau gelang es durch kontinuierliche Dosierung von relativ geringen Mengen Hopfen- β -Säuren eine Clostridien-Infektion im oberen Turmbereich und die damit verbundene Wasserstoffbildung zu unterdrücken. Durch die geringen Mengen und die kontinuierliche Dosierung wurde die Milchsäurebildung und damit die Abpressbarkeit der Extraktionsrückstände nicht negativ beeinflusst [13].

Im tschechischen Werk Hrusovany schließlich konnte eine *Leuconostoc*-Infektion im Bereich der kalten Vorkalkung erfolgreich bekämpft werden [5]. Diese erneute Beobachtung einer erfolgreichen Anwendung im Bereich mesophiler Mikroorganismen führte in weiterer Folge zu systematischen Untersuchungen (siehe Abs. 6). Ein Meilenstein war 1997 die Gründung einer Tochterfirma (BetaTec, Hop Products) durch eine renommierte Firma der Hopfenbranche. Unter Ausnutzung der vorhandenen Erfahrungen auf dem Hopfensektor wurde ein einfach und bequem anzuwendendes Produkt, eine alkalische Lösung mit einem Hopfen- β -Säure-Gehalt von ca. 10 % (BetaStab 10A) entwickelt, die als Grundlage für den kommerziellen Erfolg angesehen werden kann. Für den Einsatz von Hopfenprodukten zur Hemmung von thermophilen Mikroorganismen in Gegenwart zuckerhaltiger wässriger Medien wurde der ZFT bereits 1995 ein Patent erteilt [14].

In der Folge kam es zu einer sehr erfolgreichen Arbeitsteilung. Produktion der Lösung, Marketing und Verkauf sowie die Anwendungsberatung vor Ort übernahmen die Mitarbeiter der Firma BetaTec. Seitens der ZFT wurde das bisher erarbeitete Know-how weitergegeben sowie die zuckertechnologische Schulung der Mitarbeiter durchgeführt. Unterdessen wird das Produkt in verschiedenen Ländern Europas, in den USA und Japan vermarktet.

Der guten Zusammenarbeit auf dem analytischen Sektor war es zu verdanken, dass relativ rasch gezeigt werden konnte, dass die im Zucker verbleibenden Hopfenmengen sehr gering und sensorisch unbedeutend sind [15]. Bei einer 2005 nochmals in Auftrag gegebenen Studie konnten diese frühen Ergebnisse einmal mehr im vollen Umfang bestätigt werden (s. Abs. 4, Tab. 6).

3 Rosin acids

However, the application of hop β -acids in the sugar industry was also accompanied by unsuccessful experiences. Particularly during longer periods of application, microorganisms were capable of adapting to the effective substance and higher concentrations had to be used to achieve equal effects. This fact triggered efforts to discover another, easily manageable product with a similar definite positive image. Due to analogue conclusions tree resins were soon receiving a great deal of attention, particularly pine gum stemming from the Aleppo-pine, whose gums have been used for more than 2000 years for conservation purposes in the Greek wine named Retsina. This traditional preservation-technique even tops the long history of hopped beer. Table 3 gives an overview of critical progression steps in connection with the development of a second product.

Since the analogue conclusion from hop β -acids to "rosin acids" (or "resin acids") was rather close, further progress to gain a second product depended more on checking out the idea thoroughly and filing a patent. As one can see from Table 3 almost all important milestones occurred during the year 2000 beginning with the first laboratory trials with Greek pine gums, establishing contact with Austrian rosin farmers and investigations of rosins from different origins leading to the first trials on a technical scale. Experiences from trials with hop products were mainly responsible for this quick progress. The good effectiveness of rosin products was very soon confirmed with the available laboratory equipment. Furthermore it was figured out that the effectiveness comes from rosin acids – abietic acid, its isomers and dehydro-abietic acid, respectively – which are located in colophony. Colophony results from the dry distillation of rosin in which volatile turpentine oils are separated (Fig. 6).

The assignation of a patent for the use of rosin acids in the sugar industry was also achieved in 2000 [16]. For trials on a technical scale a soap solution of rosin acids was produced which contained 20% of the effective substance. Figure 7 gives a good insight into these first trials with rosin acids in the Tulln factory during the 2000 campaign.

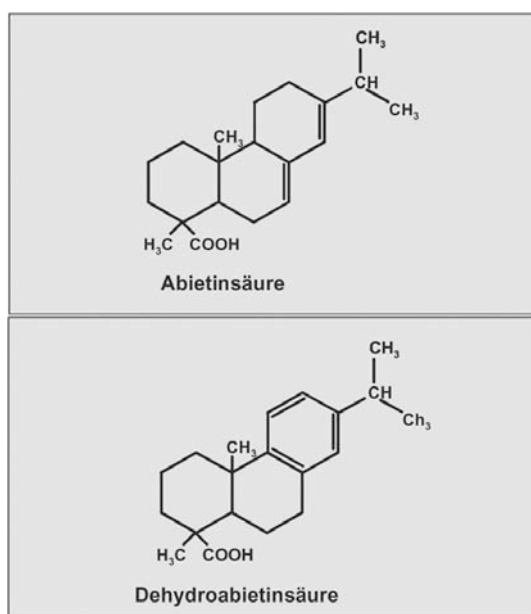


Fig. 6: Rosin acids (above: abietic acid; below: dihydro-abietic acid)

Abb. 6: Harzsäuren

3 Harzsäuren

Der Einsatz von Hopfen- β -Säuren war jedoch nicht nur von Erfolg begleitet. Vor allem bei längerer Anwendung kam es zeitweise zu Adaptionerscheinungen bei den bekämpften Mikroorganismen und es mussten immer höhere Mengen zur Erzielung der gleichen Wirkung eingesetzt werden. So wurde mit der Suche nach einem weiteren, ähnlich handzuhabenden und mit positivem Image versehenen Produkt begonnen. Auf Grund von Analogieschlüssen fiel das Interesse relativ bald auf Baumharze, im Speziellen das Harz der Aleppo-Pinie, dessen Verwendung zu Konservierungszwecken im geharzten Wein, dem griechischen Retsina, geschichtlich sogar noch weiter zurückreicht als dies bei Hopfeninhaltsstoffen im Bier der Fall ist.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über wesentliche Entwicklungsschritte im Zusammenhang mit der Entwicklung eines zweiten Produkts.

Table 3: Important steps in the context of the use of rosin acids for sugar manufacture

Tab. 3: Wichtige Schritte im Zusammenhang mit der Nutzung von Harzsäuren bei der Zuckergewinnung

2000	Acquiring rosins from Greece Beschaffung eines griechischen Harzmusters
2000	Contact with Austrian rosin farmers Kontakt zu heimischen Pechern
2000	First laboratory trials with rosin acids Erste Laborversuche mit Harzen
2000	First full-scale trials with rosin acids Erste großtechnische Versuche mit Harzsäuren
2001	Indices for complementary effects of the products Hinweise auf ergänzende Wirkung der Produkte

Da der Analogieschluss von Hopfen- β -Säuren zu Harzsäuren relativ nahe lag, kam es im Falle des zweiten Produkts vor allem darauf an, die Idee möglichst schnell zu überprüfen und gegebenenfalls eine Patentanmeldung anzustreben. Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich, gelang es im Jahr 2000, ausgehend von ersten Labortests mit griechischem Harz, über Kontakte zu heimischen Pechern und der Untersuchung von Harzen verschiedenster Herkunft, bis zu ersten großtechnischen Versuchen zu kommen. Dabei kamen selbstverständlich die Erfahrungen, die im Rahmen der Versuche mit Hopfenprodukten erzielt worden waren, zum Tragen. Die gute Wirkung von Harzprodukten konnte mit der vorhandenen Laborausstattung bald bestätigt werden. Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass die Wirkung von den Harzsäuren – Abietinsäure, deren Isomere bzw. Dehydroabietinsäure – ausgeht, die im Kolophonium (dem Rückstand aus der trockenen Destillation des Harzes, bei der Terpentinöl gewonnen wird) verbleiben (Abb. 6).

Die Erteilung eines Patentbeschlusses erfolgte ebenfalls noch im Jahr 2000 [16]. Für großtechnische Versuche wurde eine Harzseifenlösung hergestellt, die bei entsprechender Zubereitung einen Wirkstoffgehalt von 20 % aufweist. Abbildung 7 zeigt Ergebnisse dieser ersten Versuche mit Harzsäuren im Werk Tulln in der Kampagne 2000.

Auch im Großversuch waren Harzsäurelösungen eindeutig wirksam. Erwähnt werden muss in diesem Zusammenhang, dass die Wirksamkeit der Harzsäuren ca. 5-mal geringer ist als jene der Hopfen- β -Säuren, die Harzlösungen aber entsprechend billiger

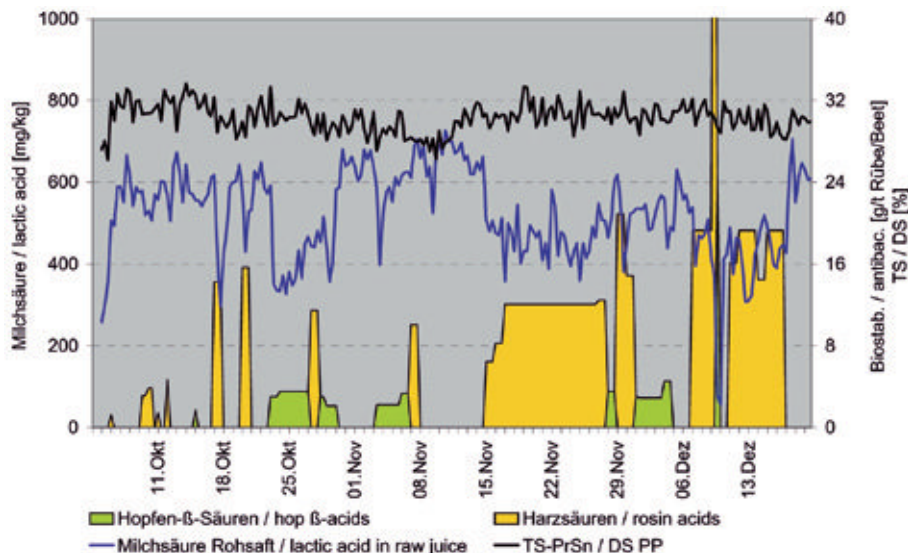


Fig. 7: Full-scale trials with rosin acids (Tulln, 2000 campaign)

Abb. 7: Großtechnische Versuche mit Harzsäuren (Tulln, Kampagne 2000)

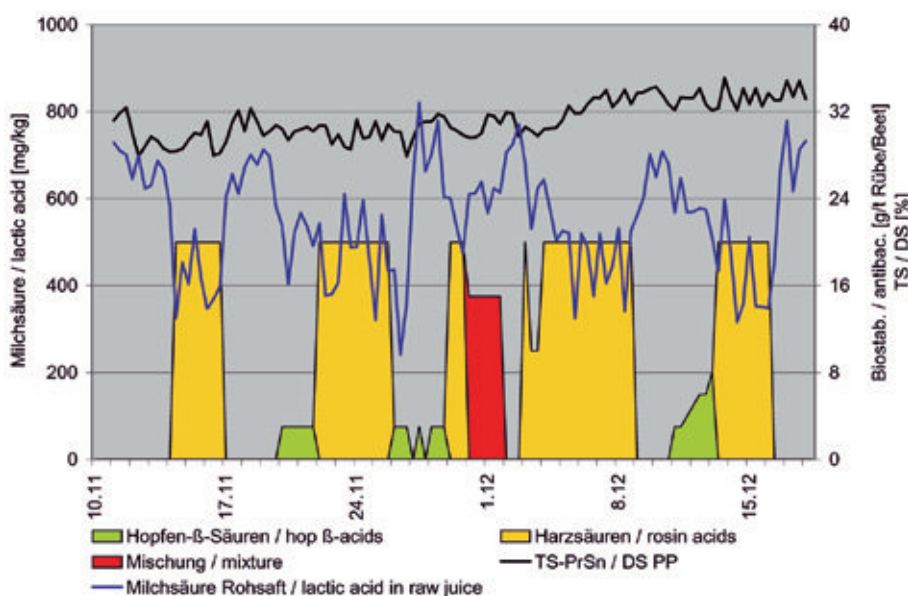


Fig. 8: Application of hop β -acids and rosin acids (Tulln, 2001 campaign)

Abb. 8: Anwendung von Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren (Tulln, Kampagne 2001)

These trials impressively confirmed the effectiveness of solutions of rosin acids. In this context it is necessary to mention that rosin acids are approximately five times less effective than hop β -acids. On the other hand the production of the applicable rosin solution is accordingly cheaper so that the costs for the two products for similar effect are on a similar level. Figure 7 positively explains the fact that the two products are not competitors but complement one another perfectly, which means that advantageous effects are achieved by alternating use of the products. A great deal of evidence which indicated advantageous effects by alternating application of the products were an essential point of observation during trials conducted in 2001. As shown in Figure 8, at least a short-term boost in effectiveness is observed practically after every change of the product. This is described in particular at the end of the campaign, where increasing dosage amounts of hop β -acids did not result in lower lactic acid contents in raw juice, but a change to resin acids did.

hergestellt werden können, so dass die Kosten für gleiche Wirkung auf etwa gleichem Niveau liegen. Aus Abbildung 7 lässt sich ebenfalls bereits erkennen, dass die beiden Produkte keine Konkurrenz sondern eine Ergänzung zueinander darstellen, also ein vorteilhafter Effekt durch das Abwechseln der Produkte erzielt werden kann. Die Demonstration, dass der abwechselnde Einsatz der Produkte Vorteile mit sich bringt, war in weiterer Folge ein wesentlicher Punkt der Versuche in der Kampagne 2001. In Abbildung 8 zeigt sich praktisch nach jedem Produktwechsel zumindest kurzfristig eine bessere Wirksamkeit. Besonders deutlich ist dies zu Kampagneende zu sehen, wo eine Erhöhung der dosierten Menge an Hopfen- β -Säuren keinen, der Wechsel des Produkts jedoch sehr wohl einen Erfolg brachte. Eine Zusammenfassung über Ergebnisse bezüglich der Anwendung von Harzsäuren in der Zuckerindustrie wurde 2002 publiziert [5].

4 Fettsäuren

Das vorläufig 3. Produkt der Gruppe wurde auf einem anderen Weg gefunden. Bei Überlegungen zur Aufklärung der Wirkungsweise der Produkte stieß man auf die Frage, ob die Wirksamkeit in unbekannten Wechselwirkungen zwischen Substanz und Zellwand der Bakterien in der komplexen Struktur der Moleküle von Hopfen- β -Säuren oder Harzsäuren begründet liegt, oder ob die Wirksamkeit in einer bestimmten Kombination von hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften des Wirkstoffmoleküls zu sehen ist. In systematischen Laborversuchen wurden zur Untersuchung der genannten Überlegungen Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge auf ihre Wirksamkeit gegen thermophile Mikroorganismen aus dem Extraktionsbereich von

Zuckerfabriken im Kleinfermenter getestet. In der Fachliteratur findet man eine Vielzahl von Hinweisen auf die bakteriozide Wirkung von Fettsäuren, einen Überblick findet man in der bereits eingangs zitierten Arbeit [6]. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zusammengefasst.

Wie aus Tabelle 4, in der neben der wirksamen Konzentration auch die Dauer der Wirkung angegeben ist, ersichtlich, geht die beste Wirkung von Myristinsäure aus. Längere Fettsäuren zeigten keine Wirkung bzw. die Wirkung war nicht so lange anhaltend, bei kürzerkettigen Fettsäuren waren höhere Dosierungen notwendig. Die Wirksamkeit könnte mit der Löslichkeit in Zusammenhang stehen. Fast nebenbei konnte bei diesen Versuchsserien demonstriert werden, dass die Wirksamkeit der Produkte auf einer Destabilisierung bakterieller Zellwände beruht und dadurch zu einer Lyse der Bakterienzellen führt. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass schon kurze Zeit nach der Dosierung des Produkts im mikroskopischen Präparat praktisch keine Bakterienzellen nach-

A summary of the results relating to the use of rosin acids in the sugar industry was published in 2002 [5].

4 Fatty acids

The third product within this group was found in a different way. During considerations on the mode of action a fundamental question arose: Is there a special chemical interaction between bacterial cell walls and the complex structures of the active substances or is the effectiveness simply depending on combinations of hydrophilic and hydrophobic properties of the molecules of the active substances. For studying these theoretical considerations systematic trials with fatty acids, bearing various numbers of carbon atoms, and their effectiveness against thermophilic bacteria from the extraction area of sugar factories were carried out in the laboratory in the previously used “mini fermenters”. The technical literature includes a great deal of evidence on the bactericidal properties of fatty acids. An overview of these papers is given in the already mentioned study [6].

In Table 4 data about effective concentrations as well as the duration of the effectiveness are given and it is easily seen that myristic acid performed the best. Fatty acids which consisted of longer chains had either no effect or the effect did not last very long. Rather short-chained fatty acids had to be applied in higher concentrations and it is considered that there is a direct connection between their effectiveness and their solubility. In these investigations it was furthermore possible to demonstrate the mode of action of the active substance: it disintegrates bacterial cell walls and leads to lysis of the respective cells. Investigations under the microscope revealed that a very short time span after dosing of the product no cells in the preparation were detectable. The same mode of action was also found for the other two products [6]. Further important steps in

Table 4: Results from laboratory trials with fatty acids

Tab. 4: Ergebnisse von Laborversuchen mit Fettsäuren

Fatty acids (alcoholic solution) Fettsäuren (alkoholische Lösung)	Symbol Symbol	Minimal effective concentration (mg/L) Minimale effektive Konzentration (mg/L)	Duration of effect (h) Dauer des Effekts (h)
Arachidonic acid / Arachidonsäure	C20	No effect at 150 / Kein Effekt bei 150	
Stearic acid / Stearinsäure	C18	10	1,5
Oleic acid / Ölsäure	C18:1	10	0,75
Palmitic acid / Palmitinsäure	C16	10	1,5
Myristic acid / Myristinsäure	C14	10	> 9
Lauric acid / Laurinsäure	C12	30	> 6
Undecanoic acid / Undecansäure	C11	40	> 8
Decanoic acid / Decansäure	C10	150	> 9
Sorbic acid / Sorbinsäure	C6:2	No effect at 150 / Kein Effekt bei 150	

Table 5: Important steps in the context of the use of fatty acids for sugar production

Tab. 5: Wichtige Schritte im Zusammenhang mit der Nutzung von Fettsäuren bei der Zuckergewinnung

2000	Consideration: hop rosins – rosin soaps – soap solutions Überlegung: Hopfenharze – Harzseifen – Seifenlösungen
2002	Trials with fatty acids on the laboratory scale Versuche mit Fettsäuren im Labormaßstab
2002	Investigations on the mode of action Untersuchungen zur Wirkungsweise
2002	First trials on a technical scale Erste Versuche im technischen Maßstab
2003	Full-scale trials in all Austrian factories Großtechnische Versuche in allen drei österreichischen Werken
2003	Trials with alternate application of the products Versuche zum abwechselnden Einsatz der Produkte

weisbar waren. Dieser Mechanismus konnte auch für die beiden anderen Produkte bestätigt werden [6].

Weitere wichtige Schritte im Zusammenhang mit der Nutzung von

Fettsäuren zur Bekämpfung von Mikroorganismen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Nach den erfolgreichen Versuchen im Labormaßstab konnte die Wirksamkeit der Myristinsäure erstmals in der Kampagne 2002 auch im großtechnischen Maßstab im Werk Tulln bestätigt werden (Ergebnisse s. Abb. 9).

In der ersten Kampagnenhälfte wurden neben Harzsäuren die beiden Fettsäuren Myristinsäure und Palmitinsäure getestet, die beide in Form von alkalischen Lösungen eingesetzt wurden. Aus der Abbildung 9 wird die gute Wirksamkeit sowohl von Myristinsäure als auch der Harzsäuren ersichtlich, praktisch keine Wirkung konnte mit Palmitinsäure erzielt werden. Die erforderlichen Wirkstoffmengen im Falle der Myristinsäure lagen für die Verhältnisse im Werk Tulln zwischen 15 und 20 g/t R und damit im Bereich der Einsatzmengen für Harzsäuren. Auch in dieser Kampagnephase

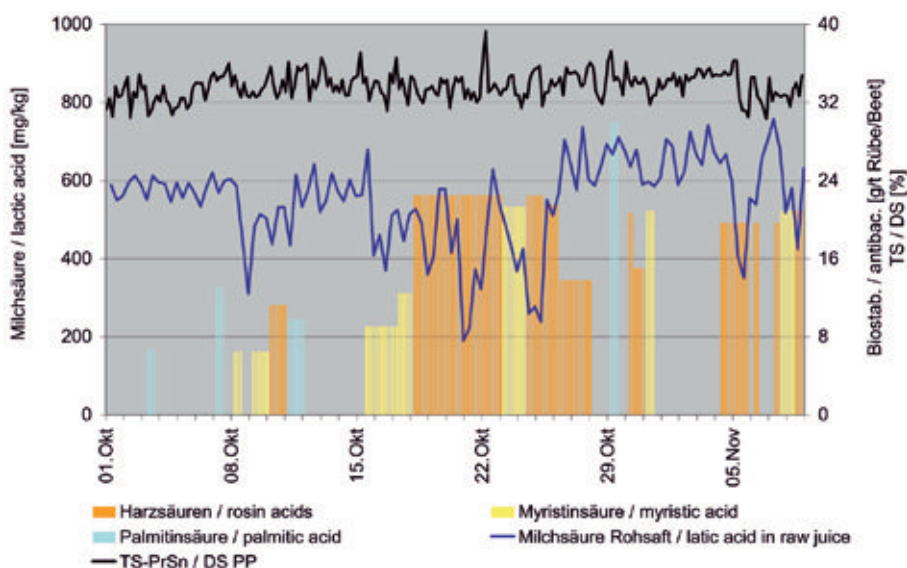


Fig. 9: Full scale trials with rosin acids and fatty acids (Tulln, 2002 campaign)

Abb. 9: Großtechnische Versuche mit Harzsäuren und Fettsäuren (Tulln, Kampagne 2002)

connection with the utilization of fatty acids for the suppression of microorganisms are shown in Table 5.

After successful trials on the laboratory scale the effectiveness of myristic acid was confirmed in large scale trials throughout the 2002 campaign in the Tulln factory. In Figure 9 results from these trials are illustrated.

Besides the rosin acids the two fatty acids myristic acid and palmitic acid, both applied as alkaline solutions, were tested during the first half of the campaign. Figure 9 indicates good results for myristic acid and rosin acids as well, but practically no effect during periods when palmitic acid was used. Effective concentrations of myristic acid ranged from 15 to 20 g/t beet which was also a common concentration for rosin acids. In this phase of the campaign the advantageous effects of a product change are well demonstrated. The positive effect of an alternating application of the products was exhibited in the Tulln factory once more during the campaign 2004. The results are shown in Figure 10.

This Figure clearly illustrates that practically every product change entails an additive drop in lactic acid values in the raw juice. Figure 10 also shows that it is not possible to achieve this effect just by increasing the concentration of the product especially if one focuses on the start of the last third of the campaign. It was most gratifying that, compared to the beginning of the campaign, identical or even better effects were achieved with the same dosing rate at the end of the campaign.

At the latest from the end of the 2004 campaign, all 3 alternative substances have proved their effectiveness and capabilities in comparison with conventional bacteriostats in the sugar industry. All these substances have been labelled as natural antibacterials. The name indicates their origin from natural sources because hop β -acids come from the hop plant, rosin acids from pine gums and myristic acids from palm kernels. Their special field of application is also indicated.

All three products are constituents of foods or cosmetics and have therefore no harmful effects on humans or mammals. Furthermore all these substances form slightly soluble salts with calcium and are therefore extensively separated during juice purification.

All sorts of analytical investigations document that only traces of the substances are detected in the two end-products sugar and molasses (Table 6). A study finished in 2006 revealed that the residues of natural antibacterials do not have any sensory effect on the taste of white sugar. Sensory detection limits were determined for the individual effective substances. The results of the study are compiled in Table 6.

Even in case of bitter hop β -acids the threshold vastly exceeds the detectable amounts in white sugar. For rosin acids and myristic acid the thresholds are even higher because these substances have a neutral taste.

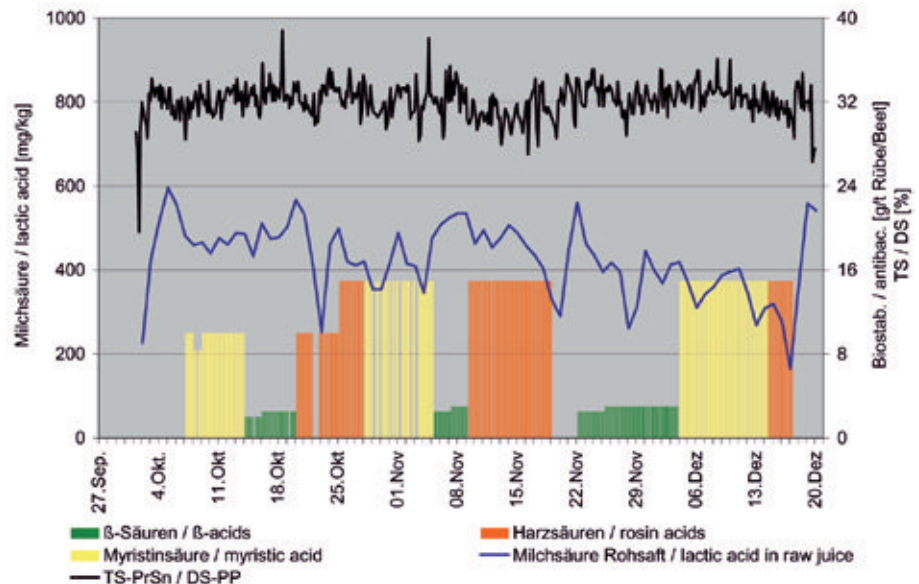


Fig. 10: Alternating application of three natural antibacterials (Tulln, 2004 campaign)

Abb. 10: Abwechselnder Einsatz von 3 natürlichen Biostabilisatoren (Tulln, Kampagne 2004)

se fällt wiederum der positive Effekt eines Produktwechsels auf. Dieser positive Effekt konnte beim Einsatz im Werk Tulln in der Kampagne 2004 nochmals eindrucksvoll bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 zusammengefasst.

Aus der Abbildung 10 geht anschaulich hervor, dass praktisch jeder Produktwechsel zu einem zusätzlichen Abfall der Milchsäuregehalte im Rohsaft führte. Zu Beginn des letzten Kampagnedrittels ist außerdem erkennbar, dass dies alleine durch Erhöhung der dosierten Menge des gleichen Produkts nicht möglich war. Besonders erfreulich ist zusätzlich, dass am Kampagneende mit den gleichen Mengen wie zu Kampagnebeginn, derselbe, wenn nicht sogar ein besserer Effekt erzielt werden konnte.

Spätestens nach der Kampagne 2004 konnte man alle drei Produkte als echte Alternative zu konventionellen Desinfektionsmitteln ansehen. Als Gruppenbezeichnung entschied man sich für „natürliche Biostabilisatoren“, wobei der Begriff natürlich für die Herkunft der Wirkstoffe steht – β -Säuren aus der Hopfenpflanze, Harzsäuren aus Baumharzen und Myristinsäure aus Palmkernöl. Der Begriff Biostabilisatoren leitet sich von der Funktion ab, technische Prozesse bezüglich biologischer Vorgänge – wie die Bildung von verschiedenen Stoffwechselprodukten – zu stabilisieren. Alle drei Produkte sind Bestandteile von Lebensmitteln oder Kosmetikprodukten und somit in keiner Weise ernährungsphysiologisch bedenklich. Des Weiteren bilden alle Produkte bzw. deren Inhaltsstoffe mit Calcium schwer lösliche Salze, so dass es im Zuge der Saftreinigung zu einer weitgehenden Abtrennung kommt.

Wie verschiedenste analytische Untersuchungen zeigten, treten in den Endprodukten Zucker und Melasse nur Spuren der Biostabilisatoren auf (Tab. 6). Eine 2006 abgeschlossene Studie zeigte, dass diese Spuren zu keiner sensorischen Beeinflussung des Weißzuckers führen. In dieser Untersuchung wurden Grenzkonzentrationen für die sensorische Wahrnehmbarkeit der einzelnen Wirkstoffe ermittelt. Die Ergebnisse dieser Studie sind ebenfalls in Tabelle 6 eingetragen. Man sieht, dass selbst im Falle der bitter schmeckenden Hopfen- β -Säuren die Reizschwelle für einen Geschmackseindruck bei einem Vielfachen der in Weißzucker nachweisbaren Mengen liegt. Noch höher liegen die Schwellenwerte für die an und für sich geschmacksneutralen Produkte Harzsäuren und Myristinsäure.

Table 6: Summary of results on studies about the determination of residues of natural antibacterials (in mg/kg product)**Tab. 6:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen zum Verbleib der natürlichen Biostabilisatoren (in mg/kg Produkt)

Product / Produkt	Hop β -acids / Hopfen- β -Säuren	Rosin acids / Harzsäuren	Myristic acid / Myristinsäure
Pressed pulp / Pressschnitzel	3–4	40–50	20–30
Raw juice / Rohsaft	0,5–1	2–4	3–5
Thin juice / Dünnsaft	0,2–0,3	0,8–1,0	0,9–1,2
Thick juice / Dicksaft	1,0–1,5	3,5–4,0	3,5–4,0
Molasses / Melasse	5,0–10,0	20–25	20–25
White sugar / Weißzucker	0,03–0,05	0,07–0,10	0,10–0,25
Threshold* / Schwellenwert*	30	120	100

* mg of active substance per kg white sugar, investigated as an aqueous solution (sugar content = 10%) / mg Wirkstoff pro kg Weißzucker, getestet in Form einer wässrigen Lösung (Zuckergehalt = 10 %)

5 Application technique

Further developments in the field of natural antibacterials concerned optimizations in the application technique. Alkaline solutions of rosin acids and myristic acid have limited solubility and therefore solid precipitations occur after some storage time. It is possible to dissolve these precipitations by heating but this requires additional equipment on site. Systematic trials about the solubility performance conducted in the laboratory revealed that mixtures of rosin acids and myristic acid show increased solubility. Regarding these findings, mixtures with a ratio ranging from 40:60 to 60:40 can be produced up to a dry substance content of 30% and are stable for longer periods even at temperatures below +4 °C. This is one of the key advantages compared with two separate solutions that contain either rosin acids or myristic acid. Positive performance of the mixture in large scale tests during the 2005 campaign led to consultations with the partner company; it was decided to offer two products in the future, hop β -acids and a mixture of rosin acids and myristic acid. This decision simplifies the product strategy and the advantage of an alternating application of two products is preserved as well.

6 Effectiveness against mesophilic slime-forming bacteria

Besides efforts for an optimization of the application of natural antibacterials in the extraction area, systematic studies on the effectiveness of the products against mesophilic slime-forming bacteria were started in 2003. The motive for these investigations has been already mentioned *i.e.* observations that dosages of hop β -acid in the Czech sugar factory Hrusovany eliminated operational difficulties in the pre-liming trough (Fig. 11).

In laboratory experiments which were conducted within the scope of a Diploma thesis [17], all products were tested against various defined pure strains of the genus *Leuconostoc*, ordered from the 'German Collection of Microorganisms and Cell Cultures': L193 = *L. pseudomesenteroides*, L343 = *L. mesenteroides mesenteroides*, L484 = *L. dextranicum*. The bacteria were cultivated in submerge cultures, according to trials for determination of minimal inhibitory concentrations. Cell concentrations (optical density at 600 nm), pH values as well as the contents of lactic acid (L and D), dextran, glucose and fructose were followed up. As practically all parameters showed the same results concerning the effectiveness of the applied

5 Anwendungstechnik

Die letzte Weiterentwicklung auf dem Gebiet der natürlichen Biostabilisatoren betraf die Anwendungstechnik. Schon bei Harzsäuren-, aber vor allem bei Myristinsäurelösungen kommt es auf Grund der begrenzten Löslichkeit der Alkaliseifen zu einem Ausfällen von Wirkstoffen. Diese sich absetzenden Feststoffe können zwar durch einfaches Erwärmen wieder in Lösung gebracht werden, was aber wiederum eine zusätzliche apparative Ausrüstung beim Anwender erfordert.

Systematische Untersuchungen zum Löslichkeitsverhalten von Kombinationen von Biostabilisatoren zeigten, dass eine Mischung von Harzsäuren und Myristinsäure deutlich bessere Löslicheitseigenschaften aufweist als die Einzelkomponenten. In Mischungsverhältnissen von 40:60 bis 60:40 kann man Lösungen bis zu 30 % Wirkstoffgehalt herstellen, in denen es auch bei Temperaturen bis zu +4 °C zu keinem Ausfällen von Wirkstoffen kommt. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber der getrennten Verwendung von Harzsäuren- und Myristinsäurelösungen dar. Nachdem auch die großtechnischen Tests mit der Mischung in der Kampagne 2005 zur vollsten Zufriedenheit ausfielen, wurde in Absprache mit der Partnerfirma beschlossen, in Zukunft nur zwei Produkte anzubieten: Hopfen- β -Säuren und eine Mischung aus Harzsäuren und Myristinsäure. Dies vereinfacht einerseits die Produktstrategie, der Vorteil eines abwechselnden Einsatzes verschiedener Produkte bleibt jedoch erhalten.

6 Wirksamkeit gegen mesophile Schleimbildner

Neben der Optimierung der Anwendung natürlicher Biostabilisatoren im Extraktionsbereich wurde 2003 mit der systematischen Untersuchung der Wirksamkeit der Produkte gegen mesophile schleimbildende Bakterien begonnen. Anlass dafür war die bereits erwähnte Beobachtung, dass durch Dosierung von Hopfen- β -Säuren im tschechischen Werk Hrusovany die durch Dextranbildung hervorgerufenen Schwierigkeiten im Bereich der Vorkalkung beseitigt werden konnten (Abb. 11).

In Laboruntersuchungen, die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurden [17], wurden alle Produkte an verschiedenen Rein- zuchtstämmen der Gattung *Leuconostoc* bezogen über die 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' (DSMZ) getestet. Folgende Reinzuchtstämmen wurden untersucht: L193 = *L. pseudomesenteroides*, L343 = *L. mesenteroides mesenteroides*,



Fig. 11: Removal of dextran pellets (Hrusovany, 1999 campaign)

Abb. 11: Entfernung von Dextranablagerungen (Hrusovany, Kampagne 1999)

substances – only in some few cases dextran formation was inhibited by lower substance concentration than acid formation – the results are summarized in Table 7.

Hop β -acids were effective in concentrations ranging from 5 to 10 mg/L for 24 h. For a stabilizing effect during 72 h of incubation time 20 to 40 mg/L dependent on the observed strain were sufficient. Rosin acids had to be applied at higher concentrations compared to hop β -acids: for an incubation time of 24 h 10 to 15 mg/L inhibited microbiological growth. After 72 h of incubation the effective concentration was similar to the hop β -acids. Myristic acid had to be applied at much higher concentrations compared to the other two substances. For a stabilizing effect of 24 h 100 to 200 mg/L were necessary – for 72 h more than 300 mg/L had to be added to the medium to completely suppress microbial activity. Further investigations were carried out with an undefined mixture of microorganisms derived from a bacterial slime sample collected in the washhouse area of the Tulln sugar factory. The results of the trials with this mixed culture were very similar to those with the pure strains.

Summing up the results, these laboratory trials revealed effectiveness of at least two of the three natural antibacterials against mesophilic slime-forming bacteria. Based on these results interesting aspects arise for practical use in modern sugar processing: the application of natural antibacterials in the “cold” raw juice area, prevention of microbial activity in the cooling water circuit and finally a great potential for the products in the field of beet storage.

From the “cold” raw juice area mostly practical observations exist. Microorganisms often form gas, mainly CO_2 through heterofermentative lactic acid fermentation. This gas formation often causes massive dysfunctions in the countercurrent mixer (losses in heat

L484 = *L. dextranicum*. Die Versuche wurden im Sinne von Tests zur Erfassung der minimalen Hemmkonzentration in Submerskultur durchgeführt. Als Zielgrößen wurden die Keimdichte (Trübung der Lösung), der pH-Wert, der Gehalt an L- und D-Milchsäure, der Dextrangehalt so wie die Monosaccharide Glucose und Fructose festgelegt. Da praktisch alle Parameter zu den gleichen Ergebnissen bezüglich der Wirksamkeit der Produkte führten – nur in einigen Fällen konnte die Dextranbildung im Vergleich zur Säurebildung mit geringeren Konzentrationen gestoppt werden –, lassen sich die Ergebnisse in gestraffter Form in Tabelle 7 zusammenfassen.

Hopfen- β -Säuren sind bereits in Konzentrationen von 5–10 mg/L über 24 h wirksam, für eine Stabilität über 72 h sind 20–40 mg/L je nach Stamm ausreichend. Im Falle der Harzsäuren sind die wirksamen Konzentrationen für 24 h etwas höher, diese Konzentrationen reichen aber dafür auch über 72 h. Am wenigsten wirksam ist Myristinsäure, über 24 h kann man mit 100–200 mg/L eine Stabilisierung erreichen, über 72 h sind dazu Mengen >300 mg/L erforderlich. Neben den Reinzuchtstämmen wurde auch eine im Bereich des Rübenwaschhauses gewonnene „Mischkultur“ in die Untersuchungen einbezogen. Die Ergebnisse waren denen, die mit den Reinkulturen erzielt wurden, sehr ähnlich.

Durch die in den Laborversuchen bestätigte gute Wirksamkeit von zumindest zwei der drei natürlichen Biostabilisatoren ergaben sich nun einige interessante Aspekte für die Praxis. Probleme durch mesophile Mikroorganismen treten bei der modernen Zuckergewinnung hauptsächlich im so genannten „kalten“ Rohsaftbereich, in Kühlwassersystemen und bei der Rübenlagerung auf.

Zum kalten Rohsaftbereich liegen vor allem Beobachtungen aus der Praxis vor. Da die Mikroorganismen mitunter auch Gas bilden (CO_2 ; heterofermentative Milchsäuregärung), kann es zu massiven Störungen in der Gegenstrom-Schnitzelmalsche kommen (Niveauschwankungen, schlechter Wärmeaustausch). Über die erfolgreiche Beseitigung derartiger Schwierigkeiten nach Applikation von natürlichen Biostabilisatoren wurde bereits im ersten Teil der Arbeit berichtet. Vor allem auch der Wechsel der Produkte führte in den heimischen Fabriken zur Verbesserung der Situation.

Filtrationsprobleme nach der 2. Carbonatation im Werk Hohenau in der Kampagne 2004, hervorgerufen durch Dextranablagerungen auf den Filtertüchern, waren ebenfalls auf mikrobiologische Aktivitäten im kalten Rohsaftbereich zurückzuführen. Eine Dosierung von Biostabilisatoren konnte eine Verbesserung der Situation herbeiführen.

Ein speziell für Österreich interessantes Einsatzgebiet stellen Kühlwassersysteme dar. Auf Grund einer in nächster Zeit zu erwartenden Gesetzesänderung, bei welcher der Einsatz von chlorabspaltenden Verbindungen durch verschärfte Auflagen deutlich erschwert werden wird (Nachweis der AOX(adsorbierbare organische Halogene)-Freiheit; keine Ausnahme für Chlordioxid), wurde die Wirksamkeit der Produkte in den letzten Kampagnen getestet. Über laufende Verbesserungen bei der Saftabscheidung kommt es in österreichischen Werken nur vereinzelt zu Problemen durch

Table 7: Summary of results from laboratory trials for inhibition of growth (in mg/L of natural antibacterials)

Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Laborversuche zur Unterdrückung des Wachstums (in mg natürliche Biostabilisatoren/L)

Product / Produkt	Hop β -acids / Hopfen- β -Säure			Rosin acids / Harzsäuren			Myristic acid / Myristinsäure		
Hours / Stunden	24	48	72	24	48	72	24	48	72
L193	5	10	20	15	15	40	100	120	180
L343	4	40	40	10	20	20	180	>300	>300
L484	5	10	40	10	15	40	200	>300	>300
Mixed culture / Mischkultur	5	5	60	10	10	20	80	100	200

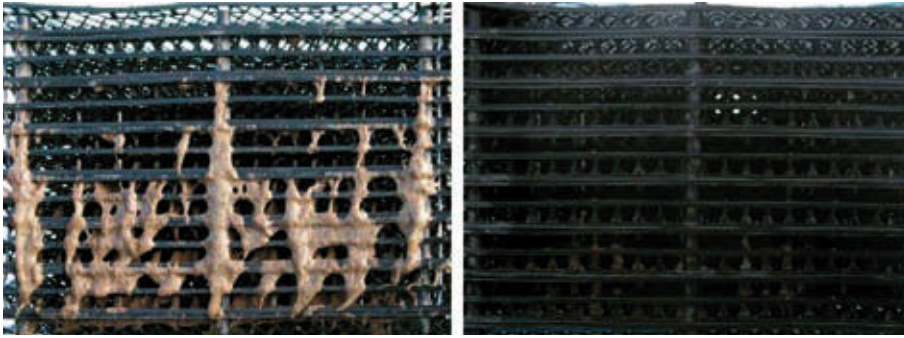


Fig. 12: Removable percolating filter parts before (left) and after (right) application of myristic acid

Abb. 12: Herausnehmbare Tropfkörper vor (links) und nach (rechts) Dosierung von Myristinsäure

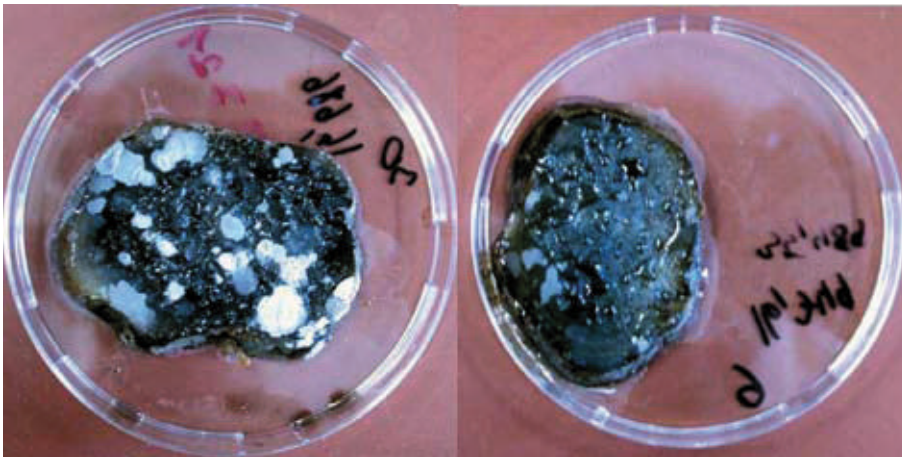


Fig. 13: Beet slices with (right) and without (left) treatment with rosin acids

Abb. 13: Rübenscheiben mit (rechts) und ohne (links) Behandlung durch Harzsäuren



Fig. 14: Storage of deteriorated beets with (right) and without (left) treatment with rosin acids

Abb. 14: Lagerung von alterierten Rüben mit (rechts) und ohne (links) Behandlung durch Harzsäuren

exchange, level variation, etc.). The elimination of such troubles by application of natural antibacterials has been reported on several times in the past. The common method in Austrian sugar factories to alternate the products has been very successful in this area.

During the 2004 campaign filtration problems caused by dextran pellets on filter cloths after the second carbonatation appeared in Hohenau sugar factory. It was possible to reduce these troubles with dosing of natural antibacterials. Austrian sugar factories are especially interested in possibilities for application of natural antibacterials in the cooling water circuit. Due to changes to the Law in the near future, which massively complicate an application of chemical compounds which split off chlorine (verification of AOX(adsorbable organic halogens)-free sewage, no exemption for chlorine dioxide), the effectiveness of the three products has been tested in the 2003 and 2004 campaigns.

Because of steadily ongoing optimizations in the juice separation area, problems with slime coverings on percolating filter parts occurred only sporadically in the cooling water circuits of local sugar factories. During a few periods in the last two years, when slime coverings appeared, it was possible to investigate the effectiveness of all three products. Surprisingly, myristic acid and rosin acids showed the best effects in these tests.

The formation of slime and the effectiveness of products against it have been documented via removable percolating filter parts. In the tests against the slime coverings, shock dosing was much more effective and easier to perform. The applied amount of substances was calculated considering the costs of hypochlorite. The application of 6 dosages over a period of 24 h was sufficient to practically clear off the bacterial coverings (see Fig. 12).

The suppression of microbial activities in the field of beet storage would represent a further interesting field of application for natural antibacterials. Pre-trials have been performed with beet slices on the laboratory scale. After a deep freezing period of several days the beet slices were defrosted and dipped into dilutions of natural antibacterials. Afterwards the slices were incubated at 25 °C for 72 h. The experiment was performed to simulate extreme settings for the storage of deteriorated sugarbeets. Established criteria were optical changes in the beet slices (superficial growth of microorganisms) as well as a

drop in the pH value of the homogenized beet material. The application of hop β -acids and rosin acids slowed down superficial growth of bacteria and moulds. Figure 13 shows the effectiveness of rosin acids.

The promising findings in these experiments led to trials on a technical scale which were carried out during campaign 2004: Whole beets were stored in boxes in a deep freezing room (7 days, -22°C) and were sprayed after thawing with differently concentrated dilutions of natural antibacterials (active substance concentration ranging from 100 to 500 mg/kg). Again, the main criteria were superficial changes on sprayed sugarbeets in comparison with untreated beets. After an incubation time of 16 days it was possible to observe definite differences between treated and untreated beets. An impression of the superficial differences is shown in Figure 14.

For the 2006 campaign, beet storage trials are planned in which the amount of beets will be extended to small and medium-sized beet piles. Calculations of economic savings led to the following results: The prevention of a drop in beet processing capacity of a sugar factory during the last week of beet campaign, e.g. from 12,000 t/d to 10,000 t/d, results in a shorter campaign due to the unaffected processing rate. Financial savings from shortening the campaign would justify an application of natural antibacterials. The results of preliminary trials are promising under this economic aspect.

7 Conclusions and future aspects

Initially starting with hop β -acids, other substances such as rosin acids and myristic acid were discovered as effective against bacterial infections in Austrian sugar factories during the last few years. Among clearly mechanical and thermal measures an application of natural antibacterials represents the only possibility for suppression of bacterial growth in Austrian factories.

Due to special conditions in Austria it is mostly necessary to operate with controlled bacterial growth in the extraction area to obtain lactic acid concentrations in raw juice of about 300–400 mg/L. Raised lactic acid values in the juices, deriving from heavier microbial activity, result in better pressability of the exhausted cossettes and finally meet with demanded specifications for pulp drying. For that purpose natural antibacterials are applied via shock dosing into the middle and lower parts of extraction towers and necessary concentrations for hop β -acids amount to 3–5 g of active substance per tonne of processed beet. Rosin acids and myristic acid and the mixture of both components have to be applied in concentrations of 10 to 15 g/t processed beet. The optimal interval between two shocks is between three and five hours, whereas pH value dependent dosages (continuous measurement of extraction tower pH values) have already been applied by way of trial. Further optimizations are still ongoing. An advantageous effect can be obtained by alternating use of the products whereas hop β -acids and a mixture of rosin acids and myristic acid have been used recently. This mixture is even storable at low temperatures, no precipitations of solids occur and heating before application is not necessary.

Further findings revealed a good effect with single dosages (once or twice a day) into the countercurrent mixer which assumingly result in inhibition of heterofermentative lactic acid formation and better running of the countercurrent mixer.

Besides applications in extraction, natural antibacterials were successfully applied in fields such as thick juice storage, ion exchangers and in the cold raw juice area.

Recent findings led to systematic investigations on the effectiveness of natural antibacterials against mesophilic slime-forming bacteria.

Schleimablagerungen an Tropfkörpern in Kühlwassersystemen. In diesen wenigen Fällen konnten in den Kampagnen 2003 und 2004 alle drei Produkte getestet werden. Interessanterweise konnten dabei mit Harzsäuren und Myristinsäure die besseren Ergebnisse erzielt werden. Schleimbildung und die Wirkung der Produkte wurden anhand eines herausnehmbaren Tropfkörpers verfolgt. Frühzeitig erwies sich auch in diesem Fall eine Schockdosierung gegenüber einer kontinuierlichen Dosierung als wirksamer. Die eingesetzten Mengen orientierten sich dabei an den Kosten, mit denen bei Verwendung von Hypochlorit gerechnet werden muss. Die Verabreichung von beispielsweise 6 Stößen innerhalb von 24 h führte praktisch zur vollständigen Entfernung der Beläge an den Tropfkörpern (Abb. 12).

Ein weiteres interessantes Einsatzgebiet könnte die Rübenlagerung darstellen. Erste Versuche wurden im Labormaßstab mit Rübenscheiben durchgeführt. Diese Rübenscheiben wurden tiefgefroren und nach dem Auftauen in eine entsprechende Lösung eines Biostabilisators getaucht. Im Anschluss wurden sie bei 25°C bis zu 72 h gelagert. Diese Vorbehandlung sollte den Extremfall der Lagerung von alterierten Rüben darstellen. Beurteilungskriterium war oberflächliches Mikroorganismenwachstum sowie der pH-Wert des homogenisierten Rübenmaterials. Dieses Wachstum konnte sowohl mit Hopfen- β -Säuren als auch mit Harzsäuren deutlich vermindert werden. In Abbildung 13 ist die Wirkung von Harzsäuren ersichtlich.

Die guten Ergebnisse dieser Vorversuche während der Kampagne 2004 konnten im Anschluss im nächstgrößeren Maßstab bestätigt werden. Dazu wurden ganze Rüben in Kisten eingefroren (7 Tage bei -22°C) und nach dem Auftauen mit verschiedenen konzentrierten Biostablösungen besprüht (100–500 mg/kg). Die Beurteilung erfolgte wiederum auf Grund von Veränderungen an der Oberfläche im Vergleich zu unbehandelten Rüben. Auch bei dieser Versuchsanordnung konnte nach einer Lagerungsdauer von 16 Tagen ein deutlicher Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Rüben gefunden werden. Einen Eindruck zur Wirkung liefert Abbildung 14.

Die Ergebnisse waren so vielversprechend, dass für die Kampagne 2006 Versuche mit Kleinmieten geplant sind. Eine Abschätzung der Wirtschaftlichkeit ergab, dass durch Verhinderung des Einbruchs der Verarbeitungsleistung in der letzten Kampagnenwoche von 12 000 auf 10 000 t/d und die damit in Verbindung stehende kürzere Kampagnedauer eine Einsparung entsteht, die den Einsatz von Biostabilisatoren durchaus wirtschaftlich erscheinen lässt. In den bisherigen Versuchen lagen die wirksamen Mengen in dieser Größenordnung.

7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ausgehend von Hopfen- β -Säuren wurde in den letzten Jahren in Österreich die Wirksamkeit von Harzsäuren und Myristinsäure zur Bekämpfung bzw. Begrenzung von Infektionen entdeckt.

Wie o.a. stellt der Einsatz von natürlichen Biostabilisatoren in Österreich neben rein mechanischen oder thermischen Maßnahmen die einzige Möglichkeit zur Bekämpfung bzw. zur Begrenzung von mikrobiologischen Aktivitäten dar. In Österreich ist es meist notwendig, im Extraktionsbereich die Bildung von Milchsäure bis zu einer Höhe von 300 bis 400 mg/kg Rohsaft zuzulassen, um die für die Trocknung notwendige Ausgangstrockensubstanz in den Pressschnitzeln zu erreichen. Dazu werden die Biostabilisatoren stoßweise in den mittleren oder unteren Bereich der Extraktionstürme dosiert, die Mengen betragen im Falle der Hopfen- β -Säuren 3–5 g

In laboratory experiments hop β -acids and rosin acids were more effective than myristic acid. In practice positive effects in the cold raw juice area were repeatedly confirmed. In cooling water circuits rosin acids and, surprisingly, myristic acid performed the best. Applications of the products, especially hop β -acids and rosin acids, demonstrated clear inhibition of superficially growing microorganisms in the field of beet storage.

Considerations of applications outside the sugar industry have also been reflected but are not within the scope of this paper.

References / Literatur

- Hollaus, F.; Pollach, G. (1986): Verbesserung der Schnitzelabpressung durch gesteuerte Infektion. Zuckerind. 111, 1025–1030
- Pollach, G.; Hollaus, F. (1988): Nutzung Monosaccharid-abbauender Infektionen in der Extraktion zwecks Verbesserung der Schnitzelabpressung. Zuckerind. 113, 132–136
- Hollaus, F.; Pollach, G. (1993): Untersuchungen über den Monosaccharid-Abbau während der Rübenextraktion. Zuckerind. 118, 169–179
- Pollach, G.; Hein, W.; Hollaus, F. (1996): Einsatz von Hopfenprodukten als Bakteriostaticum in der Zuckerindustrie (Use of hop products as bacteriostaticum in the sugar industry). Zuckerind. 121, 919–926
- Pollach, G.; Hein, W.; Beddie, D. (2002): Application of hop beta acids and rosin acids in the sugar industry. Zuckerind. 127, 921–930
- Pollach, G.; Hein, W.; Beddie, D. (2004): The concept of different natural antibacterials for the sugar industry (Ein Konzept mit verschiedenen natürlichen antibakteriellen Hilfsstoffen für die Zuckerindustrie). Zuckerind. 129, 555–564
- Clerk, J. de (1964): Lehrbuch der Brauerei, Band 1: Rohstoffe, Herstellung, Einrichtung. 2. Auflage, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin, 75–108
- Shimwell, J.L. (1937): On the relation between the staining properties of bacteria and their reaction towards hop antiseptic. J. Inst. Brewing 43, 111–118 & 191–195
- Simpson, W.J. (1991): Molecular structure and antibacterial function of hop resin materials. Ph.D. Thesis, Council for National Academic Awards, UK
- Hein, W.; Pollach, G. (1997): Neue Erkenntnisse beim Einsatz von Hopfenprodukten in der Zuckerindustrie. Zuckerind. 122, 940–949
- Hollaus, F.; Hein, W.; Pollach, G.; Scheberl, A.; Messner, P. (1997): Nitrifizierung im Dünnsaftbereich durch Thermus-Arten. Zuckerind. 122, 365–369
- Hein, W.; Pollach, G.; Rösner, G. (2002): Studien zu mikrobiologischen Aktivitäten bei der Dicksaftlagerung. Zuckerindustrie 127, 243–257
- Pollach, G.; Hein, W.; Leitner, A.; Zöllner, P. (2002): Detection and control of strictly anaerobic, spore forming bacteria in sugar beet extraction plants. Zuckerind. 127, 530–537
- 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.; Rösner, G. (1999): Neue Erkenntnisse zur Lösung mikrobieller Probleme in Zuckerfabriken. Zuckerind. 124, 622–637
- Pollach, G.; Hein, W. (2001): Verfahren zur Herstellung von Zucker oder zuckerhaltigen Produkten aus zuckerhaltigen pflanzlichen Rohstoffen. PCT Patent Application WO 01/88205 A1
- Emerstorfer, F. (2005): Wirksamkeit von natürlichen Biostabilisatoren gegen mesophile schleimbildende Bakterien. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur, Wien

Plus de 10 ans d'expérience avec des biostabilisateurs naturels chez Agrana (Résumé)

Ce travail donne, dans une première partie, un aperçu de la découverte de l'efficacité de différentes substances naturelles pour la lutte ou la limitation des activités microbiologiques indésirables lors de la production de sucre. En commençant par les acides β du houblon et en passant par les acides résineux jusqu'à l'acide myristique, on aborde les avancées importantes depuis la découverte de l'efficacité de ces substances ou lors du développement de ces produits commercialisables. Cela ne donne pas seulement un aperçu dans le quotidien de la recherche, mais contient aussi des avis importants pour l'utilisation optimale de ces produits. C'est ainsi que sont données des informations sur les propriétés des produits, les quantités nécessaires, les formes de dosage optimales et les systèmes d'introduction. En outre, on traite des utilisations

Wirkstoff pro t verarbeiteter Rüben. Beim Einsatz von Harzsäuren, Myristinsäure oder einer Mischung der beiden Substanzen sind Mengen zwischen 10 und 15 g/t verarbeiteter Rüben notwendig. Der optimale Abstand zwischen zwei Stößen liegt zwischen 3 und 5 h, wobei eine pH-Wert-abhängige Dosierung (kontinuierliche Messung des Turmsaft-pH-Wertes) bereits versuchsweise eingesetzt wurde. An der weiteren Optimierung wird noch gearbeitet. Vorteilhaft wirkt sich ein Wechsel der Produkte aus, wobei in letzter Zeit neben Hopfen- β -Säuren eine Mischung aus Harzsäuren und Myristinsäure eingesetzt wurde. Diese Mischung ist auch in der Kälte lagerfähig, es kommt zu keiner Ausfällung von Wirkstoffen, ein Anwärmen vor der Verwendung ist nicht erforderlich.

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass ein- bis zweimal täglich vorgenommene Dosierungen in die Gegenstrom-Schnitzelmaische zu einer Verbesserung der Maisarbeit führen, was auf die Unterdrückung einer heterofermentativen Milchsäuregärung zurückzuführen sein dürfte.

Neben dem Einsatz in Extraktionsanlagen konnten auch an verschiedenen anderen Stellen mikrobiologische Aktivitäten unterdrückt werden. Beispiele dafür sind die Dicksaftlagerung, Ionenaustauscher und der Bereich von kalten Vorkalkungen.

Die letzte Beobachtung führte zur systematischen Untersuchung der Wirksamkeit gegen mesophile schleimbildende Bakterien. In Laborversuchen zeigten Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren gegenüber Myristinsäure die bessere Wirkung. In der Praxis konnte ein positiver Effekt im kalten Rohsaftbereich mehrfach bestätigt werden. Im Bereich von Kühlwassersystemen zeigte neben den Harzsäuren überraschenderweise Myristinsäure eine gute Wirksamkeit. Im Zusammenhang mit der Rübenlagerung konnten die Produkte, vor allem Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren, das oberflächliche Mikroorganismenwachstum deutlich zurückdrängen.

Überlegungen zum Einsatz der Produkte außerhalb der Rübenzuckerproduktion wurden ebenfalls angestellt, sind aber im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Agrana: más de 10 años de experiencias con bioestabilizadores naturales (Resumen)

En la primera parte de este trabajo se da un resumen sobre el descubrimiento de la eficacia de varias sustancias naturales para el control y la limitación de actividades microbiológicas no deseadas durante la producción de azúcar. Desde los ácidos- β de lúpulo, los ácidos de resinas hasta el ácido mirístico se informa sobre la eficacia de estas sustancias y el desarrollo de productos comerciables. Se da una noción general de la investigación común y se dan instrucciones para el empleo óptimo de los productos, informaciones acerca de las propiedades de los productos, las cantidades necesarias, la dosis óptima, el mejor punto y sistemas de dosificación. Además se informa sobre el empleo eficaz fuera del sector de las plantas de extracción como en el almacenamiento del jugo denso y en instalaciones de cambio iónico. Finalmente se presentan resultados de investigaciones acerca de la permanencia de los productos en el curso de la producción de azúcar y de la influencia sensorial del azúcar. En la segunda parte de este trabajo se trata la eficacia de los productos para el control de microorganismos mesofílicos mucosos. Puesto que en ensayos de laboratorio se destacaron por su gran eficacia especialmente los ácidos- β de lúpulo y los ácidos de resina en el control de varias especies de *Leuconostoc*, se los aplica también en sistemas de enfriamiento y en primeros ensayos a nivel del almacenamiento de remolachas.

couronnées de succès en dehors du domaine des installations de diffusion ainsi que pour le stockage du jus dense et des stations d'échangeurs d'ions. Finalement, on présente aussi des résultats des analyses sur la rémanence du produits dans la chaîne de production du sucre et son influence sur les qualités sensorielles du sucre. Dans la deuxième partie de ce travail, on traite de l'efficacité des produits dans la lutte contre les microorganismes mésophiles formant des glaires. Ensuite des essais de laboratoire ont montré que, surtout, les acides β du houblon et les acides résineux se sont révélés très efficaces contre différentes souches pures de l'espèce *Leuconostoc* et on fait rapport sur l'adoption du produit dans les systèmes d'eau de refroidissement ainsi que sur les premiers essais pour le stockage de betteraves.

Authors' address / Anschrift der Autoren: Dr. *Walter Hein*, DI *Florian Emerstorfer*, Zuckerforschung Tulln Ges.m.b.H., Josef-Reither-Str. 21–23, A-3430 Tulln, Austria; email: walter-hein@zuckerforschung.at; Dr. *Günter Pollach*, Kastanienallee 27, A-2301 Groß-Enzersdorf, Austria.

Chapter two

The role of plant based antimicrobials in food and feed production with special regard to silage fermentation.

Florian Emerstorfer, Wolfgang Kneifel and Walter Hein

Die Bodenkultur 60 (3): 55-65 (2009)

The role of plant-based antimicrobials in food and feed production with special regard to silage fermentation

F. Emerstorfer, W. Kneifel and W. Hein

Die Bedeutung antimikrobieller Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs in der Lebens- und Futtermittelherstellung mit besonderer Betrachtung der Silageherstellung

1 Introduction

1.1 Plant-based Antimicrobials in Sugar Production

Since the early 1990ies plant components have been used under practical conditions for the control of infections in the extraction area of sugar factories. Due to several reasons, the industry voluntarily abstained from using formaldehyde, which was the most commonly used biocidal sub-

stance in sugar production at that time. However, in the first years after the ban of formalin, the sugar factories had to accept reduced yield along with operational problems in the extraction area caused by contaminating thermophilic lactic acid bacteria. At that time, it was discovered that higher lactic acid levels in the processed juices lead to better pressability of the beet pulp and eventually to savings in energy consumption (HOLLAUS et al., 1986; POLLACH et al., 1988). Also, some alternative substances to formalin were

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration natürlicher pflanzlicher Wirkstoffe gegen üblicherweise bei der Silageherstellung vorkommende Mikroorganismen mittels dreier mikrobiologischer Standardtestverfahren.

In den Ergebnissen zeigen die Wirkstoffe auf Basis von Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren lediglich geringe Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien, Hefen und Schimmelpilze. Im Gegensatz dazu wurde eine Hemmung grampositiver Bakterien bereits in sehr niedrigen Konzentrationen erzielt. Interessanterweise zeigen einige Vertreter aus der Gruppe der Milchsäurebakterien eine wesentlich geringere Empfindlichkeit gegen die pflanzlichen Wirkstoffe als Verderbskeime wie Clostridien. Diese Ergebnisse bieten möglicherweise Potential für den Einsatz von Hopfen- β -Säuren und Harzsäuren als Silierzusätze, da sie offensichtlich in der Lage sind, bakteriellen Silageverderb zu hemmen ohne das Wachstum von Milchsäurebakterienstarterkulturen negativ zu beeinflussen.

Schlagnworte: Antimikrobielle Wirkstoffe, Silageverderb, Hopfensäuren, Harzsäuren, minimale Hemmkonzentration.

Summary

The aim of this study was to determine the minimum inhibitory concentration of plant-based antimicrobials by means of three microbial standard test methods on a range of micro-organisms usually found in silage.

Results indicate that hop beta acids and rosin acids were not very effective against Gram-negative bacteria, yeasts and moulds. On the contrary, Gram-positive bacteria could be inhibited at very low concentrations. Interestingly, some representatives of the lactic acid bacteria group showed lower sensitivity against the plant-based antimicrobials than spoilage micro-organisms such as clostridia. This result offers some potential to apply hop beta acids and rosin acids as silage additives, as they are capable of inhibiting bacterial spoilage without negatively affecting the growth of lactic acid bacterial starters.

Key words: Antimicrobials, silage spoilage, hop acids, rosin acids, minimum inhibitory concentration.

considered to be of interest but were not effective enough or economically applicable. Subsequently, during continued studies on the improvement of the pressability of the beet pulp, in order to further reduce energy costs, interesting observations were made. It was discovered, that hop components can be utilised for the control of microbial activity in the sugar extraction (POLLACH et al., 1996; HEIN and POLLACH, 1997). These substances offered some major advantages to formalin as they were well known for their antimicrobial effect and possess a long history in the brewing industry. Furthermore, they are regarded as harmless for humans and animals. Rosin acids play a similar role as hop acids in the brewing industry, as they are used to prevent the spoilage of Retsina, a typical Greek wine. Fatty acids, on the other hand, are commonly found in plant oils, dairy products etc. and many applications have indicated their beneficial properties (NARZIß, 1986; BROCKMANN et al., 1987; JOHNSON et al., 1973; HORNSEY, 2007; BEUCHAT and GOLDEN, 1989; SÖDERBERG, 1990).

A milestone in the development of a marketable and easy-to-use product was achieved when cooperation was established with a well known hop company. Gradually, the application technique of the plant substances could be improved, thus finally resulting in an innovative “concept of natural antibacterials for the sugar industry”. Corresponding details can be found in the studies by Pollach and Hein (POLLACH, 1995; POLLACH and HEIN, 2001; POLLACH et al. 2001, 2002, 2004; HEIN et al., 2006).

Meanwhile, the main focus of the application had shifted from combating thermophilic micro-organisms in the extraction area to other steps of the sugar production. In Hrusovany, a Czech sugar factory, operational problems due to heavy dextran formation caused by bacteria of the genus *Leuconostoc*, could be solved by the application of hop beta acids. Further, hop beta acids were successfully applied to repel a clostridia infection in an Austrian sugar factory thus establishing the wanted flora of lactic acid bacteria in that area. These observations as well as experiences in cooling water circuits, in the storage of thick juice and in beet storage trials have demonstrated that mesophilic micro-organisms can be also inhibited by applying these natural antibacterials (EMERSTORFER, 2005; HEIN et al. 2006).

Until that time, investigations have almost exclusively been focusing on solving problems of microbial contaminations in the process and on questions concerning intermediate and end-products of the sugar production such as white sugar, molasses, and thick juice (POLLACH et al., 1999; HEIN et al., 2002). Expectedly, there was some need

to ensure that an application of hop bitter acids does not interfere with the taste of white sugar. Thus, sensory tests were carried out to dispel these concerns. Results from residual studies also indicated no negative effects on the subsequent application of molasses in fermentation. At the same time it was assumed that the major part of the products applied in the extraction area finally ends up in the pressed beet pulp. Due to the fact that farmers did not report about problems with the antibacterial remnants in the pressed pulp in the course of silage production, no further research activities were needed in this direction. However, already in 1999, Pollach et al. assumed positive effects linked to the substance-remnants in the pressed pulp as inhibition of unwanted groups of micro-organisms was observed (POLLACH et al. 1999, POLLACH, 2002; GUDMUNDSON, 1998).

Against this background, considerations to expand the fields of application for the substances concentrated on repeatedly observed effectiveness of hop beta acids on clostridia. Several studies on “natural antibacterials” revealed that Gram-positive bacteria – obviously due to their specific cell wall structure – can be inhibited even at low concentrations, while Gram-negatives, yeasts, and moulds are rather resistant. As a matter of fact, research activities concentrated on areas where Gram-positive contaminants need to be eliminated or even pathogens of this group may cause some economic impact. For example, bacterial sources of mastitis in dairy cattle and the production of silages as a feed stock could be identified as promising fields of application (WILKINSON and TOIVONEN, 2003; DEUTZ et al., 2004). The latter topic will be dealt with in this study.

1.2 Plant-based Antimicrobials in Silage Fermentation

Apart from yeasts and moulds – which are not discussed in detail in this study – clostridia are one of the major disturbing factors in silage fermentation, especially in the field of grass silage. The individual properties of the plant raw material exert some pronounced influence on the development of the microbial ecology in silage. Practically, it is absolutely necessary to comply with certain rules in silage making (DLG, 2006).

It is well-known that inhibition of clostridial growth during the ensilage process is achieved if a fast decline in pH can be obtained by a strong metabolic activity of lactic acid bacteria that naturally occur in the plant material. In silage production, different minimum pH-values are needed to stabilise the silage, depending on the dry matter content

(WEISSBACH, 2002). Under certain circumstances (contamination with soil during harvesting, low initial cell counts of lactic acid bacteria in the source material, low carbohydrate content and high buffering capacity, low dry matter content, lack of natural inhibitory substances, etc.) the desired pH-reduction will be delayed leading to instable conditions during fermentation. In such a case, clostridia can proliferate and spoilage of the silage by these anaerobes is induced.

As stated in several studies the nitrate content in the plant raw material also strongly influences the fermentation process (POLIP, 2001; WEISS, 2000). In case of a slow decrease in pH and in presence of nitrate in the initial phase of the process, formed lactic acid is rather converted to acetic acid in a first step, and after complete reduction of nitrate, further metabolised to butyric acid. Inhibition of clostridia by nitrate depends on the fermentation coefficient (FC-value) of the feedstock. German authors specify a minimum nitrate concentration of 1.3 – 5.8 g/kg dry matter necessary in order to get sustained suppression of clostridial growth in grass silage (DLG, 2006). If no nitrate is present in the plant raw material, lactic acid is directly converted to butyric acid immediately after start of the fermentation – an issue that has increasingly been observed in the last years due to reduced use of nitrogen fertilizer, even though silages contain rather high dry matter contents. This malfermentation leads to increased pH-values and to extensive production losses due to subsequent proteolysis by clostridia. These silages can be regarded as spoiled and do not meet the qualitative requirements of animal feeds.

Apart from the above described spoilage problems, silages containing butyric acid also bear another hygiene problem. Associated with clostridia, diverse pathogenic bacteria may be found in such products as there is insufficient acidity to inhibit this micro-flora (DRIEHUIS et al., 2000). Contaminated silage therefore may, for example, subsequently contaminate the milk in primary production, and contaminated milk is an improper source for the production of dairy products, even if several steps of processing and heating are applied. It is a well-known fact that Swiss-type cheese can only be produced from raw milk of high quality and free of clostridial endospores. Otherwise quality problems as well as economic losses will result for farmers as well as the dairy industry (WILKINSON and TOIVONEN, 2003; ERNST, 2005; ROBINSON and WILBEY, 1998; ADLER, 2002).

Under practical conditions, the plant material available is not always of optimum quality, it may lack fermentable sugars, also high buffering capacity or low dry matter concentration are of disadvantage. To support the natural preser-

vation process, silage additives are increasingly used in order to prevent the development of unwanted contaminants. A commonly used method directly applies organic acids (e.g., formic acid) in order to rapidly achieve a low pH-value that forms a barrier for clostridial growth. However, the application of acids bears some disadvantages like aggressiveness, corrosion of equipment and safety measures for the user. As a consequence, neutral silage additives such as salts and salt solutions have gained in importance over the years. These products exert inhibitory effects not only due to their ability to reduce the pH of the silage material, but also – depending on the achieved pH-level and the number of carbon atoms of the applied substance – to a bacteriostatic or even microbicidal effect which originates from the undissociated proportion of the acid.

A biological alternative is the use of lactic acid bacteria as silage additives to intensify the natural production of lactic acid, especially in the crucial stages of the fermentation. The application of lyophilised starter cultures ensures a high initial number of lactic acid bacteria and an accelerated conversion of plant sugars to organic acids. Concomitantly the pH falls to disadvantageous levels for clostridia species and many pathogens. In practice, combined silage inoculants containing homo- and heterofermentative strains are very common, whereas the latter are intended to form acetic acid which has an antimycotic effect (KRAMER, 2002). Lactic acid starters can also be combined with other supplements to achieve a further drop in pH, for example with enzymes that are added to support the generation of fermentable substrate for the bacteria. Also, additives such as molasses have been widely applied in the past. Common to these measures is the aim to raise the content of fermentable sugars in the plant material that can be converted to organic acids by active lactic acid bacteria (DLG, 2006; THAYSEN et al., 2007).

One of the most effective and commercially available silage additives is based on nitrite and hexamethylenetetramine. In sausage manufacture, nitrite is part of the curing salt mixture which is well-known for its clostridia-inhibiting properties. In silage, nitrite is converted to nitrous gases in the early phase of fermentation where especially clostridia species are inhibited. Lactic acid bacteria, on the other hand, are not negatively affected by nitrous gases although they are highly toxic to animals and humans. Therefore, appropriate precautions have to be taken during handling. Hexamethylenetetramine, the second active ingredient of the combination, is hydrolysed during pH drop progression, liberates formaldehyde and therefore delivers

sustained protection against clostridia proliferation, also at later stages of the fermentation process (LÜCK, 1985).

More recent studies suggest the combination of starter cultures with active ingredients of various origins for inhibiting clostridia. For example, bacteriocin-synthesizing bacteria can be seen as a promising alternative to nitrite. However, only limited effort has been made so far to implement these strains in commercial products (CZECH, 2003; TÜRK, 2005; FLYTHE et. al, 2004; KRAMER, 2002).

The objective of this work was to assess the inhibition characteristics of naturally derived plant ingredients (hop beta acids, rosin acids, myristic acid) against a selection of practically relevant micro-organisms common in silage production (SZALAY, 2007).

2 Materials and Methods

2.1 Test Methods for the Assessment of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Microbial strains

In Table 1 the microbial strains tested in this study are summarized. The table features the origin, isolation source and cultivation conditions of the investigated bacteria, yeasts and moulds.

Antimicrobial Plant Components and Standard Solutions

BetaStab 10A® produced by BetaTec GmbH (Nuremberg, Germany), provided by Zuckerforschung Tulln GmbH; an aqueous, alkaline solution (pH 10.0–11.5) containing approx. 10 % (w/w) of a mixture of resins and resin acids of hops, principle component being hop beta acids (lupulone) (BETATEC, 2005).

PineStab 20A, provided by Zuckerforschung Tulln GmbH (Tulln, Austria); an aqueous, alkaline solution (pH 10.0–11.5) containing approx. 20 % (w/w) of a mixture of pine resin acids, principle components being isomers of abietic acid and dehydroabietic acid (ZFT, 2004).

PileStab 20A, provided by Zuckerforschung Tulln GmbH (Tulln, Austria); an aqueous, alkaline solution (pH 10.0–11.5) containing approx. 12 % (w/w) of a mixture of pine resin acids, principle components being isomers of abietic acid and dehydroabietic acid and 8 % (w/w) of myristic acid (ZFT, 2004).

Hydrogen peroxide, caustic potash solution: In the experiments dilutions of a 3 % (v/v) H₂O₂ stock solution were used as a reference for the plant components (dilution

series were freshly prepared every two weeks using distilled water);

KOH (pH 13) was used as a control to ensure that micro-organisms were inhibited by the active ingredients and not by acidity.

Culture Media

Broth Media

Tryptic Soy Broth (Oxoid CM 129), RCM Broth (Reinforced Clostridial Medium) (Merck 1.05411), Brain Heart Infusion Broth (Oxoid C 0225), M17 Broth acc. to Terzaghi (Merck 1.15029), MRS Broth (Lactobacillus Broth acc. to de Man, Rogosa and Sharpe) (Merck 1.10661.500), Wort Broth (Merck 1.05449), Meat Broth (typical composition).

Agar Media

Tryptic Soy Agar (Oxoid CM 0131), Brain Heart Infusion Agar (Oxoid CM 0375), Wort Agar (Merck 1.05447), M17 Agar acc. to Terzaghi (Merck 1.15108), Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid CM 0619), MRS Agar (Lactobacillus agar acc. to de Man, Rogosa and Sharpe) (Merck 1.10660.0500), YGC Agar (Yeast Extract – Glucose – Chloramphenicol Agar) (Merck 1.16000.0500).

Other Agents and Media

Agar Bacteriological (Agar No. 1) (Oxoid LP 0011), Lab. Lemco Powder (Oxoid L 29).

Neutralized Bact. Peptone (Oxoid L 34), distilled water, Glycerol (Merck 1.04093), Sodium Chloride.

Microbiological Test Methods

Trials were performed using conventional laboratory equipment and a Laminar Flow (Steril Gemini) anaerobic workstation (MACS-VA 500 micro-aerophilic Workstation).

Well Diffusion Assay

The well diffusion assay is used to evaluate the effectiveness of a test substance on the surface of an agar medium. The test substance is pipetted into wells where the agar has been displaced and diffuses into the agar. Micro-organisms grow on the agar surface, but not in the surroundings of wells which at least contain the inhibitory concentration of the substance (TAGG and MCGIVEN, 1971, TAGG et al., 1976).

After solidification of the agar medium in the Petri dish, 0.1 mL of cell suspension (24-h culture in nutrient broth) are evenly distributed on the agar surface. Afterwards, agar holes are punched out with the back end of a sterile Pasteur

Table 1: Bacteria, yeasts and moulds used in this study (for further explanations see text)

Tabelle 1: Übersicht über untersuchte Bakterien, Hefen und Schimmelpilze (weitere Erläuterungen im Text)

Internal Code	Strain	Collection	Official Code	Culture Conditions
G Lb 35	<i>Lactobacillus brevis</i>	DSMZ ^a	DSM 2647	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 129	<i>Lactobacillus brevis</i>	IFA ^b	LAC172, IFA508	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 128	<i>Lactobacillus brevis</i>	IFA	LAC280, IFA599	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 37	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Medipharm ^c	ATCC7469, M2	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 120	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	IFA/Lactosan ^d	LAC259, IFA589	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 121	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	IFA/Lactosan	LAC161, IFA496	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 77	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lactosan	DSM 12837	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 69	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Medipharm	LSI	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 143	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ	DSM 2648	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 180	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Lactosan	DSM 12856	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 170	<i>Lactobacillus coryneformis</i>	Medipharm	S 13	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 74	<i>Lactobacillus coryneformis coryneformis</i>	DSMZ	DSM 20001	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lb 75	<i>Lactobacillus coryneformis coryneformis</i>	DSMZ	DSM 20007	MRS, 37 °C, anaerobic
G Lc 4	<i>Lactococcus lactis</i>	Medipharm	SR 3.54 555	MRS, 37 °C, aerobic
G Lc 12	<i>Lactococcus lactis</i>	Lactosan	NCIMB 30160 Wcb5/12/01	MRS, 37 °C, aerobic
G Pd 17	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Lactosan	DSM 16244 Lac 973	MRS, 30 °C, aerobic
G Pd 18	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Lactosan	DSM 16243 Lac 055	MRS, 30 °C, aerobic
G En 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	DSMZ	DSM 20478 ATCC 19433	BHI, 37 °C, aerobic
G En 61	<i>Enterococcus faecium</i>	Medipharm	M 74	BHI, 37 °C, aerobic
G En 24	<i>Enterococcus faecium</i>	Lactosan	DSM 7134	BHI, 37 °C, aerobic
G En 19	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DSMZ	DSM 20680 ATCC 25788	BHI, 37 °C, aerobic
G Bc 6	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSMZ	DSM 13 ATCC 14580	TS broth, 37 °C, aerobic
G Bc 7	<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ	DSM 10 ATCC 6051	TS broth, 37 °C, aerobic
G Bc 45	<i>Bacillus cereus</i>	SLALW ^e	(498) wild	TS broth, 37 °C, aerobic
G Bc 46	<i>Bacillus pumilus</i>	DFST ^f	-	TS broth, 30 °C, aerobic
G Li 1	<i>Listeria innocua</i>	DFST	BCCM LMG 11387 ATCC 33090	BHI broth, 30 °C, aerobic
G Li 2	<i>Listeria ivanovii</i>	DFST	BCCM	BHI broth, 30 °C, aerobic
G Li 3	<i>Listeria monocytogenes</i>	DFST	BCCM	BHI broth, 30 °C, aerobic
G Cl 2	<i>Clostridium butyricum</i>	DFST	University Graz 8260	RCM broth 37 °C, anaerobic
G Cl 3	<i>Clostridium beijerinckii</i>	DFST	NCDO 1759	RCM broth 37 °C, anaerobic
G Ec 1	<i>Escherichia coli</i>	DSMZ	DSM 613 ATCC 11303	TS broth, 37 °C, aerobic
G Ec 11	<i>Escherichia coli</i>	DFST	-	TS broth, 37 °C, aerobic
Ps 1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DFST	-	TS broth, 30 °C, aerobic
Ps 2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DFST	-	TS broth, 30 °C, aerobic
Ps 3	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	DFST	-	TS broth 30 °C, aerobic
Ps 4	<i>Pseudomonas marginalis</i>	DSMZ	DSM 50276	TS broth, 30 °C, aerobic
K 66	<i>Pichia fermentans</i>	DFST	-	wort broth, 25 °C, aerobic
M 136	<i>Candida parapsilosis</i>	DFST	-	wort broth, 25 °C, aerobic
Sy 17	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	DFST	-	wort broth, 25 °C, aerobic
F 104	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DFST	-	wort broth, 25 °C, aerobic
Z 12	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	DSMZ	DSM 70841	wort broth, 25 °C, aerobic
AS 1	<i>Aspergillus niger</i>	DFST	-	YGC agar, 25 °C, aerobic
Mu 1	<i>Mucor</i>	DFST	-	YGC agar, 25 °C, aerobic
Pe 1	<i>Penicillium roqueforti</i>	DFST	-	YGC agar, 25 °C, aerobic
Rh 1	<i>Rhizopus</i>	DFST	-	YGC agar, 25 °C, aerobic

a: DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany;

b: IFA Tulln, Department for Agrobiotechnology, Tulln, Austria;

c: Medipharm AB, Kageröd, Sweden;

d: Lactosan GmbH & Co. KG, Kapfenberg, Austria;

e: SLALW: Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, Fachbereich Landwirtschaftliche Untersuchungen (LUVA), Leipzig, Germany;

f: DFST Department of Food Science and Technology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

pipette and 15 µL of the test substance are pipetted into the resulting wells. The testing procedure for each strain was carried out in triplicate. After incubation for 24 h at optimum temperature, the zone of inhibition was measured.

Spot Test

The spot test is a method in which the test substance is dotted onto the agar surface and then diffuses into the agar. Influenced micro-organisms grow on the surface, but not on the dotted spots that contain at least the minimum inhibitory concentration of the test substance (DE VUYST et al., 1996).

After solidification of the agar medium in the Petri dish, 5 µL portions of each test substance are dotted onto 5 spots on the agar surface. Afterwards, 0.3 µL of cell suspension (24-h culture in nutrient broth) are evenly distributed on the agar surface. The testing procedure for each strain was carried out in triplicate. After incubation for 24 h at optimum temperature, the zone of inhibition was measured.

Micro-dilution Test

This submerge test is used to determine the growth behaviour of micro-organisms in nutrient broth containing the inhibitory test substance at different concentrations. The growth progression is determined via optical density measurements in a photometer in standardised time intervals (Spectronic Genesys 10 Bio, Thermo Electron Corporation). All readings were carried out by means of a microtiter plate reader (Bioscreen C), with the exception of clostridial strains, which were incubated in test tubes (JORGENSEN and FERRARO, 1998; WHITE et al., 2001).

150 µL of the test substance and 150 µL of diluted cell suspension (1:10 or 1:100) with adjusted optical density (based on McFarland 0.5) as well as blanks and controls are pipetted into the wells of a microtiter plate and placed into the apparatus for recording of growth curves. Test settings for the experiments were as follows: pre-heating 15 min; temperature 25°C/30°C/37°C, depending on the micro-organisms; time interval 1 d (bacteria)/2 d (yeasts, *Listeria*); measurement intervals 30 min (1 d), 50 min (2 d); shaking before measurement 20 s; wave length 420-580 nm; The micro-dilution test was carried out in five replicates for each strain. Optical density values for growth curves were measured in 12-hour intervals.

For the tests with clostridia an anaerobic working bench was used. As these strains did not grow in the small well volumes of the microtiter plates, clostridial tests were performed in larger test tubes. 2 mL of the substance and 2 mL

of bacteria suspension were pipetted into each vial. The bacteria suspension was diluted by 1:10 with RCM broth and adjusted to a McFarland value of 3.0 which is equivalent to an optical density of 0.480–0.700 at 625 nm. For measurement of bacterial growth based on optical density, an aliquot of 200 µL of each test tube was pipetted into the wells of a microtiter plate and placed into the optical reader at 620 nm. The testing procedure was carried out in five replicates for each strain. Optical density values for the growth curve were measured in 12-hour intervals.

3 Results and Discussion

The results of the inhibitory experiments are depicted according to the groups of micro-organisms. The minimum inhibitory concentrations (MIC) shown in the tables refer to the active plant-based ingredient and are displayed in mg substance per kg solvent (distilled water). MIC-values for the spot test and well diffusion assay were calculated from arithmetical mean values of zones of inhibition from triplicates. MIC-values for the micro-dilution test were calculated from arithmetical mean values of five growth curve replicates. MIC variations were within the expected range of ± 1 dilution variation of MICs. According to CLSI (2009) this variation is intrinsic to the microbiological testing systems used. MIC-values exceeding 10.000 mg/kg indicate no inhibition and therefore are referred to *n. i.* (no inhibition).

Main attention is paid to results achieved from the micro-dilution test rather than to results from the two surface tests (well diffusion assay, spot test) as this test method is better reproducible and as the cell suspensions used were always adjusted to standardised McFarland values. In addition OD-measurement was performed automatically. For the surface tests, 24-h old cultures in nutrient broth were used, which may have slightly differed in their micro-population density.

Table 2 summarises the results of Gram-positive bacteria that are found and/or used in silage production. Generally, all investigated Gram-positives were sensitive to the tested plant antimicrobials. In comparison to the spot test and well diffusion assay, very low MIC-values were found in the micro-dilution test, which is obviously due to an optimum distribution of the plant antimicrobial in the test format.

All testing procedures have shown that hop beta acids (B) were most effective, followed by rosin acids (R) and the mixture of rosin acids and myristic acid (R/M). In the

Table 2: Inhibitory test results obtained with Gram-positive bacteria; mean values derived from triplicates (spot test, well diffusion assay) or five replicates (micro-dilution test); minimum inhibitory concentrations displayed as mg/kg of active ingredient: B ... hop beta acids, R ... rosin acids, R/M ... mixture of rosin acids/myristic acid, H₂O₂ ... hydrogen peroxide; n.i. = no inhibition at 10,000 mg/kg; for strain codes see Table 1.

Tabelle 2: Hemmwirkungsergebnisse bei grampositiven Bakterien; Mittelwerte gebildet aus 3 (Well Diffusion Test, Tüpfeltest) bzw. 5 Wiederholungen (Microdilution-Test); minimale Hemmkonzentration angegeben in mg/kg Wirkstoff: B ... Hopfen- β -Säuren, R ... Harzsäuren, R/M ... Mischung aus Harzsäuren/Myristinsäure, H₂O₂ ... Wasserstoffperoxyd; n.i. = keine Hemmung bei 10.000 mg/kg; Stammbezeichnungen in Tabelle 1.

Strain	Micro-dilution Test				Spot Test				Well Diffusion Assay			
	B	R	R / M	H ₂ O ₂	B	R	R / M	H ₂ O ₂	B	R	R / M	H ₂ O ₂
G Lb 35	10	100	100	150	400	6000	5000	n.i.	40	3000	4000	3000
G Lb 129	15	300	250	150	500	5000	9000	n.i.	150	5000	5000	3000
G Lb 128	12.5	100	200	150	600	4000	5000	n.i.	50	7000	1000	3000
G Lb 37	5	100	100	150	400	5000	6000	n.i.	40	3000	900	3000
G Lb 120	5	100	100	150	300	5000	8000	n.i.	150	3000	1500	3000
G Lb 121	5	100	100	150	400	5000	4000	n.i.	20	800	5000	3000
G Lb 77	10	400	400	150	1000	5000	7000	n.i.	150	4000	3000	3000
G Lb 69	15	200	250	150	500	9000	n.i.	n.i.	80	4000	600	3000
G Lb 143	10	100	200	150	300	5000	6000	n.i.	150	4000	1500	3000
G Lb 180	15	50	200	150	800	n.i.	8000	n.i.	150	4000	5000	3000
G Lb 170	12.5	100	100	150	400	3000	6000	300	50	3000	4000	3000
G Lb 74	15	100	100	150	400	2000	4000	300	80	300	3000	3000
G Lb 75	20	200	100	150	300	6000	n.i.	n.i.	60	3000	1500	3000
G Lc 4	5	30	25	150	300	3000	4000	n.i.	150	500	4000	3000
G Lc 12	10	15	25	150	400	2000	4000	n.i.	200	600	800	3000
G Pd 17	2.5	200	450	150	500	n.i.	n.i.	n.i.	70	3000	1500	3000
G Pd 18	2.5	1000	1000	150	600	9000	n.i.	n.i.	50	8000	5000	3000
G En 2	50	25	250	1500	5000	4000	600	n.i.	200	600	900	3000
G En 61	15	250	250	1500	300	5000	2000	n.i.	400	600	900	3000
G En 24	10	150	200	1500	400	2000	2000	n.i.	90	200	800	3000
G En 19	35	25	250	1500	300	2000	3000	n.i.	70	600	900	3000
G Bc 6	5	15	15	150	100	1000	3000	n.i.	40	200	300	3000
G Bc 7	5	20	10	1500	80	500	1500	n.i.	20	300	500	3000
G Bc 45	5	10	10	150	200	1000	700	n.i.	30	200	200	3000
G Bc 46	5	10	25	1500	70	1500	900	n.i.	20	300	300	3000
G Li 1	0.25	20	35	1500	500	750	2000	3000	75	700	600	3000
G Li 2	0.25	20	30	150	300	900	4000	3000	60	500	900	3000
G Li 3	0.25	20	35	1500	300	800	3000	3000	45	300	1000	3000
G Cl 2	10	10	15	150	800	500	900	3000	150	50	300	3000
G Cl 3	5	10	10	150	400	800	600	3000	250	300	90	3000

micro-dilution test, H₂O₂ inhibits lactobacilli, lactococci and pediococci even at lower MICs than R and R/M except for enterococci, bacilli, listeriae and clostridia. In the well diffusion assay a similar pattern for H₂O₂, R and R/M was obtained. With the spot test, the plant antimicrobials as well as H₂O₂ gave much higher MIC-values than with the other two testing procedures, whereas for H₂O₂, Gram-positives were able to grow at the highest concentration tested (10,000 mg/kg).

Among the bacteria tested, *Listeria* strains show a very low MIC (0.25 mg/kg) for B (micro-dilution test). Also R and R/M show low MIC-values ranging from 20–35 mg/kg. The efficacy of B against *Listeria monocytogenes* has previ-

ously been reported. (LARSON et al.). The authors found very low concentrations of a range of hop acid preparations to be effective in trypticase soy broth. The best effect was achieved with a preparation containing 41 % (w/w) beta acids, which revealed a MIC of 10 mg/L for the given test settings.

Clostridia, which are frequently responsible for silage spoilage, were inhibited at MIC-values ranging from 5–10 mg/kg by B and 10–15 mg/kg by R and R/M. The effect of B against clostridial strains is also subject of a patent application (JOHNSON and HAAS, 1999). Bacilli were inhibited at 5 mg/kg by B and at 10–25 mg/kg by R and R/M. It should be noted that lactic acid bacteria are inhibited by B at

roughly the same MIC-levels as silage-spoiling or pathogenic bacteria but not by R and R/M. These plant antimicrobials inhibit clostridia, listeriae, and bacilli at a concentration which is 5 to 10 times lower than that observed with lactic acid bacteria.

Table 3 shows the results collected with Gram-negative bacteria common for silage production. In contrast to the above described Gram-positives, MIC-values of hop beta acids (B), rosin acids (R) and the mixture of rosin acids/myristic acid (R/M) were much higher or could not be determined, especially with the micro-dilution test. Although B is most effective, the lowest MIC-values achieved in the micro-dilution test were at least 1,000 mg/kg, which is much higher than observed with H₂O₂ as the reference substance. Both surface tests have shown that all bacterial strains tested were able to grow at concentrations exceeding 10,000 mg/kg. This observation differs largely from the results obtained with the Gram-positives.

Table 4 summarises results of the inhibitory tests of the plant antimicrobials against yeast strains commonly found in silage. Similarly to the Gram-negative bacteria – MIC-values of yeasts were only detectable when B and R/M were applied in the micro-dilution test. In contrast to R, the R/M mixture may have had an effect, probably due to the myristic acid, which is known to have some antifungal properties (BEUCHAT and GOLDEN, 1989). Again, hop beta acids (B) were shown to be most effective, although they do not display similar MIC-values as H₂O₂. The surface tests did not indicate any inhibition even at the highest concentration of plant antimicrobials tested (10,000 mg/kg). Hence, it must be stated that in this case the substances were simply ineffective. These results are not surprising, since hop acids and rosin acids were originally introduced to beer and Retsina production as additives to allow alcoholic fermentation by yeasts and prevent the spoilage by bacteria.

Table 5 gives an overview on the effectiveness of hop beta acids, rosin acids and the mixture of rosin acids/myristic acid

Table 3: Inhibitory test results obtained with Gram-negative bacteria; mean values derived from triplicates (spot test, well diffusion assay) or five replicates (micro-dilution test); minimum inhibitory concentrations displayed as mg/kg of active ingredient: B ... hop beta acids, R ... rosin acids, R/M ... mixture of rosin acids/myristic acid, H₂O₂ ... hydrogen peroxide; n.i. = no inhibition at 10,000 mg/kg; for strain codes see Table 1.

Tabelle 3: Hemmwirkungsergebnisse bei gramnegativen Bakterien; Mittelwerte gebildet aus 3 (Well Diffusion Test, Tüpfeltest) bzw. 5 Wiederholungen (Microdilution-Test); minimale Hemmkonzentration angegeben in mg/kg Wirkstoff: B...Hopfen-β-Säuren, R ... Harzsäuren, R/M ... Mischung aus Harzsäuren/Myristinsäure, H₂O₂ ... Wasserstoffperoxyd; n.i. = keine Hemmung bei 10.000 mg/kg; Stammbezeichnungen in Tabelle 1.

Strain	Micro-dilution Test				Spot Test				Well Diffusion Assay			
	B	R	R / M	H ₂ O ₂	B	R	R / M	H ₂ O ₂	B	R	R / M	H ₂ O ₂
G Ec 1	1000	n.i.	2500	150	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
G Ec 11	1000	n.i.	2500	150	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Ps 1	1000	n.i.	n.i.	150	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000
Ps 2	1000	n.i.	n.i.	150	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000
Ps 3	1000	n.i.	n.i.	150	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000
Ps 4	1000	n.i.	n.i.	150	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000

Table 4: Inhibitory test results obtained with yeasts; mean values derived from triplicates (spot test, well diffusion assay) or five replicates (micro-dilution test); minimum inhibitory concentrations displayed as mg/kg of active ingredient: B ... hop beta acids, R ... rosin acids, R/M ... mixture of rosin acids/myristic acid, H₂O₂ ... hydrogen peroxide; n.i. = no inhibition at 10,000 mg/kg; for strain codes see Table 1.

Tabelle 4: Hemmwirkungsergebnisse bei Hefen; Mittelwerte gebildet aus 3 (Well Diffusion Test, Tüpfeltest) bzw. 5 Wiederholungen (Microdilution-Test); minimale Hemmkonzentration angegeben in mg/kg Wirkstoff: B ... Hopfen-β-Säuren, R ... Harzsäuren, R/M ... Mischung aus Harzsäuren/Myristinsäure, H₂O₂ ... Wasserstoffperoxyd; n.i. = keine Hemmung bei 10.000 mg/kg; Stammbezeichnungen in Tabelle 1.

Strain	Micro-dilution Test				Spot Test				Well Diffusion Assay			
	B	R	R / M	H ₂ O ₂	B	R	R / M	H ₂ O ₂	B	R	R / M	H ₂ O ₂
K 66	1000	n.i.	5000	150	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000
M 136	1000	n.i.	5000	1500	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000
Sy 17	1000	n.i.	5000	150	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000
F 104	1000	n.i.	5000	1500	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000
Z 12	1000	n.i.	5000	1500	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000

Table 5: Inhibitory test results obtained with moulds; mean values derived from triplicates (spot test, well diffusion assay) or five replicates (micro-dilution test); minimum inhibitory concentrations displayed as mg/kg of active ingredient: B ... hop beta acids, R ... rosin acids, R/M ... mixture of rosin acids/myristic acid, H₂O₂ ... hydrogen peroxide; n.i. = no inhibition at 10,000 mg/kg; for strain codes see Table 1.

Tabelle 5: Hemmwirkungsergebnisse bei Schimmelpilzen; Mittelwerte gebildet aus 3 (Well Diffusion Test, Tüpfeltest) bzw. 5 Wiederholungen (Microdilution-Test); minimale Hemmkonzentration angegeben in mg/kg Wirkstoff: B...Hopfen-β-Säuren, R ... Harzsäuren, R/M ... Mischung aus Harzsäuren/Myristinsäure, H₂O₂ ... Wasserstoffperoxyd; n.i. = keine Hemmung bei 10.000 mg/kg; Stammbezeichnungen in Tabelle 1.

Strain	Micro-dilution Test				Spot Test				Well Diffusion Assay			
	B	R	R / M	H ₂ O ₂	B	R	R / M	H ₂ O ₂	B	R	R / M	H ₂ O ₂
AS 1	-	-	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3000
Mu 1	-	-	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Pe 1	-	-	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Rh 1	-	-	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

against typical moulds relevant to silage production. In these test series, the micro-dilution test as a submerge test procedure was not applicable and therefore excluded. The MIC-values for the spot test and the well diffusion assay could not be clearly determined as the moulds considered even grew at the highest concentration tested (10,000 mg/kg). Also, H₂O₂ did not yield interpretable results. Moulds are obviously not inhibited by the plant antimicrobials applied.

The inhibitory effect of hop beta acids and rosin acids found in this study is very congruent with findings of the application of plant antimicrobials in food production where they are known to sustainably inhibit Gram-positive bacteria, but only seldom Gram-negatives, yeasts and moulds.

Rosin acids from pine trees have been used for more than two-thousand years in the production of the traditional Greek wine Retsina in order to prevent wine spoilage by acetic acid fermentation under Mediterranean climate conditions. However, the results obtained indicate that lactic acid bacteria are less susceptible to rosin acids than clostridia or listeriae. Therefore, they could be useful to suppress spoilage bacteria in silage fermentation without affecting lactic acid starter cultures. The mixture of rosin acids and myristic acid was included in the test series because it is known from the sugar industry that the combination of the two plant components exerts technical advantages. Minor addition of myristic acid improves the solubility of the concentrated alkaline rosin acids solution, even at low temperatures and this eases handling of the mixture. Also, myristic acid is known to possess some antimicrobial effect, mainly against Gram-positives but also yeasts (BEUCHAT and GOLDEN, 1989).

The antimicrobial properties of hop bitter acids (alpha acids/humulones and beta acids/lupulones and both their corresponding homologues) have been used in beer brew-

ing for centuries. Naturally, many publications in brewing science deal with the antimicrobial properties of hop compounds (SIMPSON, 1991; SIMPSON and SMITH, 1992). Results obtained in this study indicate that hop acids seem to be unsuitable as supplements to silage production, as they affect the growth of lactic acid bacteria. However, there are several reports about lactic acid bacteria in brewing that have developed resistance mechanisms protecting them from the actions of hop bitter acids (SAKAMOTO and KONINGS, 2003; SUZUKI et al, 2006). Consequently, the hop beta acids may be applicable in silage production in combination with hop resistant lactic acid bacterial strains to inhibit spoilage bacteria such as clostridia.

The development of nature-based supplements is therefore an interesting alternative to commonly used but disputed substances like formaldehyde in sugar industry on the one hand and to nitrite and hexamethylenetetramine for silage production on the other.

4 References

- ADLER, A. (2002): Qualität von Futterkonserven und mikrobielle Kontamination. 8. Alpenländisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, 17–25.
- BETATEC (2005): Produkt-Sicherheitsdatenblatt Beta-Stab 10A®. Firmenschrift der BetaTec Hopfenprodukte GmbH, Nürnberg.
- 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, 245–276.

- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (2009): Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters: Approved guideline – third edition. M23-A3, Vol. 28 No. 27, Wayne, Pennsylvania, USA. 64.
- CZECH, E. (2003): Effekt von Milchsäurebakterien-Isolaten auf die Unterdrückung von Clostridien in Silagen. Dissertation. Universität für Bodenkultur, Wien, 183.
- DEUTZ, A., FRUHSTORFER, M., HARTL, J., LUGER, K., OBRITZHAUSER, W., PODSTATZKY, L., STOCKINGER, M., STÖGER, E., WEBER, J. and M. WÖCKINGER (2004): Eutergesundheit. LFI – Ländliches Fortbildungsinstitut, Denkmayr Druck 65.
- DE VUYST, L., CALLEWAERT, R. and B. POT (1996): Characterisation of the antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 and large scale isolation of its bacteriocin Amylovorin L471. System. Appl. Microbiol. 19, 9–20.
- DLG – Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (2006): Praxishandbuch Futterkonservierung. 7. Auflage, DLG-Verlag Frankfurt (Main), 353.
- DRIEHUIS, F. and S. J. W. H. OUDE ELFERINK (2000): The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. The Veterinary Quarterly 22, 212–216.
- EMERSTORFER, F. (2005): Wirksamkeit von natürlichen Biostabilisatoren gegen mesophile schleimbildende Bakterien. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur, Vienna, 116.
- ERNST, J. (2005): Buttersäureblähung – noch immer aktuell. Diskussionsgruppen Emmentaler, Agroscope Liebefeld-Posieux, Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere und Milchwirtschaft – ALP, Bern, 18.
- FLYTHER, M. D. and J. B. RUSSELL (2004): The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. FEMS Microbiology Ecology 47, 215–222.
- 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 wine-making. 1st Edition. RSC-Publishing. Cambridge, 457.
- JOHNSON, E. A. and G. J. HAAS (1999): Use of hop extracts against botulism. UK Patent Application No. 9821923.1.
- JOHNSON, H. and A. KRÜGER (1973): Das große Buch vom Wein. Erweiterte Neuauflage. Gräfe und Unzer Verlag, München 403.
- JORGENSEN, J. H. and M. J. FERRARO (1998): Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases 26, 973–980.
- KRAMER, W. (2002): Neue Entwicklungen und Strategien im Bereich der Silierzusätze. 8. Alpenländisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, 17–25.
- LARSON, A. E., YU, R. R. Y., LEE, O. A., PRICE, S., HAAS, G. J. and E. A. JOHNSON (1996): Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. International Journal of Food Microbiology 33, 195–207.
- LÜCK, E. (1985): Chemische Lebensmittelkonservierung: Stoffe, Wirkungen, Methoden. 2. Auflage. Springer-Verlag New York Heidelberg Berlin Tokyo, 123–125.
- NARZIß, L. (1986): Abriss der Bierbrauerei. 5. ergänzte Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 40.
- POLIP, I. (2001): Untersuchungen zur Unterbindung von Buttersäuregärung und Clostridienaktivität in Silagen aus nitratarmem Grünfutter. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 127.
- POLLACH, G. and F. HOLLAUS (1988): Nutzung Monosaccharid-abbauender 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 B1, 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 Herstel-

- lung von Zucker oder zuckerhaltigen Produkten aus zuckerhaltigen pflanzlichen Rohstoffen. EP 1 282 731 B1, 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.
- ROBINSON, R. K. and R. A. WILBEY (1998): *Cheesemaking Practice*. 3rd Edition, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 449.
- SAKAMOTO, K. and W. N. KONINGS (2003): Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology* 89, 105–124.
- SIMPSON, W. J. (1991): Molecular structure and antibacterial function of hop resin materials. Ph.D. Thesis, Council for National Academic Awards, London, United Kingdom, 256.
- 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.
- SUZUKI, K., IJIMA, K., SAKAMOTO, K., SAMI, M. and H. YAMASHITA (2006): A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. of Brew.* 112 (2), 173–191.
- SZALAY, E.-M. (2007): Zur antimikrobiellen Wirkung von Biostabilisatoren pflanzlichen Ursprungs im Hinblick auf Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Lebensmittelkette. Diplomarbeit, Universität Wien, Vienna, 109.
- TAGG, J. R. and A. R. MCGIVEN (1971): Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* 21 (5), 943.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S. and L. W. WANNAMAKER (1976): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40 (3), 722–756.
- THAYSEN, J., HONIG, H., KALZENDORF, C., SPIEKERS, H. and W. STAUDACHER (2007): Siliermittel: Rechtliche Rahmenbedingungen, Wirksamkeit DLG-Geprüfter Produkte und Einsatzempfehlungen. Übers. Tierernährg. 35, 55–91.
- TÜRK, B. (2005): Einfluss verschiedener Kultivierungsbedingungen und Hemmstoffe auf die Entwicklung der vegetativen Zellen und Sporen von *Clostridium butyricum*, *C. sporogenes* und *C. tyrobutyricum*. Dissertation. Universität für Bodenkultur, Wien, 89.
- WEISSBACH, F. (2002): Grundlagen und Praxis der Produktion guter Grassilagen. 8. Alpenländisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, 1–5.
- WEISS, K. (2000): Gärungsverlauf und Gärqualität von Silagen aus nitratarmem Grünfutter. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 159.
- WHITE, D. G., ACAR, J., ANTHONY, F., FRANKLIN, A., GUPTA, R., NICHOLLS, T., TAMURA, Y., THOMPSON, S., THRELFALL, E. J., VOSE, D., VAN VUUREN, M., WEGENER, H. C. and M. L. COSTARRICA (2001): Antimicrobial resistance: standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 20 (3), 849–858.
- WILKINSON, J. M. and M. I. TOIVONEN (2003): *World silage – a survey of forage conservation around the world*. Chalcombe Publications; Lincoln, United Kingdom, 205.
- ZFT – Zuckerforschung Tulln (2004): Produkt-Sicherheitsdatenblatt PileStab 20A sowie Produkt-Sicherheitsdatenblatt PineStab 20A. Firmenschrift der Agrana Zucker GmbH, Tulln.

Address of authors

DI Florian Emerstorfer, DI Dr. Walter Hein, Zuckerforschung Tulln GmbH, Josef-Reither-Straße 21–23, 3430 Tulln, Austria, E-mail: florian.emerstorfer@zuckerforschung.at, walter.hein@zuckerforschung.at

Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Wolfgang Kneifel, Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und Lebensmitteltechnologie, Muthgasse 18, 1190 Wien, Austria; E-mail: wolfgang.kneifel@boku.ac.at

Eingelangt am 2. Februar 2009

Angenommen am 21. Oktober 2009

Chapter three

Verfahren zur Silierung. / Method for ensiling.

Walter Hein and Florian Emerstorfer

Patent AT 594 593 B1 (2010)

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 2016/2006
(22) Anmeldetag: 05.12.2006
(45) Veröffentlicht am: 15.06.2010

(51) Int. Cl. 8: **A23K 3/03** (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
WO 1998/003066A1
EP 0473126A1 EP 1036511A2

(73) Patentinhaber:
ZUCKERFORSCHUNG TULLN
GESELLSCHAFT M.B.H.
A-3430 TULLN (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR SILIERUNG**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Silierung und Konservierung von pflanzlichen Rohstoffen und Rohstoffgemischen, wobei die Silierung und Konservierung zumindest teilweise in Anwesenheit von mindestens einer zugesetzten Hopfensäure und/oder deren Salz durchgeführt wird.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Silierung und Konservierung von pflanzlichen Rohstoffen.

[0002] In der Landwirtschaft werden bei der Herstellung von Silagen Silierhilfsmittel eingesetzt um unerwünschte Mikroorganismen an ihrer Entwicklung zu behindern, auf diese Weise den mikrobiologischen Stoffabbau und den Verlust an Nährstoffen einzuschränken und damit die Futterqualität zu erhalten. Als Folge eines wesentlich verbesserten Konservierungserfolges beim Einsatz von Silierhilfsmitteln kann außerdem mit einer Verbesserung der Futteraufnahme, der Verdaulichkeit und des Nährstoff- und Energiegehaltes und damit einer potenziellen Steigerung der tierischen Leistungen gerechnet werden. Ein bedeutsames Risiko bei der Bereitung von Silagen und dem Konservierungserfolg besteht im Falle von Fehlgärungen. Diese Fehlgärungen werden vor allem von Hefen und Bakterien verursacht. Bei den Bakterien sind vor allem Clostridien von Bedeutung. Folgen schlechter Gärqualität der Silage äußern sich in hohem Schadkeimgehalt, Eiweißzersetzung, Buttersäurebildung und Nährstoffverlusten. Zur Unterbindung von Fehlgärungen gibt es verschiedenste Produktgruppen, die als Silierhilfsmittel eingesetzt werden. Derartige Silierhilfsmittel sind Siliersalze, Siliersäuren sowie Bakterienpräparate mit lebenden Milchsäurebakterien. Diese Wirkstoffe bzw. Mischungen haben nun den Zweck, über eine Absenkung des pH-Wertes Milchsäurebakterien einen Wachstumsvorteil im Wettbewerb um den zur Verfügung stehenden Zucker gegenüber Gärschädlingen zu verschaffen. Milchsäurebakterien, wie Lactobacillen, Pediococcen, Enterococcen usw., sind zumeist in ausreichender Zahl bereits im zu vergärenden Rohstoff (Gras, Mais, Pressschnitzel etc.) enthalten, können aber bei unvorteilhaften Bedingungen (geringer Trockenmassegehalt des Siliergutes, Mangel an vergärbaren Zuckern etc.) durch zusätzliche Beimpfung beim Anstellen (bei Fermentationsbeginn) eingebracht werden.

[0003] Um eine optimale Wirkung einzelner Produkte oder Produktkombinationen zu erzielen, ist nicht zuletzt auch die Einbringungsart und die erzielte Verteilung im Gut von großer Bedeutung. Neben der pH-Wert-Absenkung weisen manche Wirkstoffe unter den Siliersäuren (z.B. Propionsäure, Sorbinsäure) auch bakterizide Effekte auf.

[0004] Siliersäuren und Siliersalze entfalten ihre Hemmwirkung gegenüber unerwünschten Mikroorganismen primär über eine Absenkung des pH-Wertes und seltener über direkte bakterizide Effekte. Diese pH-Wert-Absenkung begünstigt das Wachstum von Milchsäurebakterien, welche den vorhandenen Zucker verwerten und im Zuge ihres Wachstums über die Freisetzung von Milchsäure, Essigsäure und andere Stoffwechselprodukte den pH-Wert weiter absenken. Auf diese Weise ist es Gärschädlingen, die gegen tiefe pH-Werte sehr empfindlich sind, wesentlich erschwert sich im Siliergut zu vermehren und als Konkurrenten bei der Zuckerverwertung aufzutreten. Weitere Silierhilfsmittel, die zur Bekämpfung insbesondere von Colibakterien, Mikrokokken, Clostridien und Listerien eingesetzt werden, sind Präparate auf Nitritbasis. Siliertes Pflanzenmaterial, welches mit derartigen Präparaten versetzt wurde, kann aufgrund der Toxizität nicht direkt als Futtermittel eingesetzt werden und muss vor Verfütterung ca. 1 Monat gelagert werden, bis schließlich der Nitritgehalt eine Konzentration erreicht, die nicht mehr schädlich ist.

[0005] Ein Überblick über Silierverfahren wird im „Praxishandbuch Futterkonservierung. Silagebereitung, Siliermittel, Dosiergeräte, Silofolien“ (DLG-Verlags-GmbH, 7. Auflage 2006, ISBN 3-7690-0677-1) gegeben.

[0006] In der WO 98/03066 A1 werden antimikrobielle Zusammensetzungen geoffenbart, die u.a. eine organische Säure mit einer C₅-C₂₂ Alkyl- oder Aryl-Gruppe aufweisen. In diesen Zusammensetzungen sind weiters unsubstituierte oder substituierte C₁-C₄ Monokarboxylsäuren und antimikrobiell wirkende kationische organische Stickstoffverbindungen vorgesehen. Die in der WO 98/03066 A1 geoffenbarten Verbindungen können dazu verwendet werden, pflanzliches oder tierisches Material, welches als Futtermittel verwendet wird, zu konservieren. Ferner kann die darin geoffenbarte Zusammensetzung auch zum Silisieren eingesetzt werden.

[0007] In der EP 0 473 126 A1 werden Zusammensetzungen als Siliermittel geoffenbart, mit deren Hilfe ein zu silierendes Grünfutter eingesäuert wird, um anaerobe Abbauvorgänge zu verhindern. Dabei werden neben Milchsäure-erzeugenden Bakterien auch Alkalisalze aliphatischer Fettsäuren mit insgesamt bis acht C-Atomen verwendet.

[0008] In der EP 1 036 511 A2 wird ein Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln, Futtermitteln etc. beschrieben, bei dem organische Säuren zugesetzt werden können. Diese organischen Säuren können gemäß der EP 1 036 511 A2 gesättigte oder ungesättigte Kohlen-säuren mit 1-14 bzw. 1-12 C-Atomen sein.

[0009] Die Herstellung von hochwertigem siliertem Futtermittel ist in der Landwirtschaft von entscheidender Bedeutung. Es ist insbesondere für die Qualität von Milch und Fleisch wichtig die Tiere mit Futtermittel hoher Qualität zu versorgen. Um die Silierung zu steuern werden zumeist Silierhilfsmittel, insbesondere Siliersäuren, eingesetzt. Diese sorgen in der Regel dafür, dass der pH-Wert in der Silage auf ein Niveau gebracht wird, bei dem sich beispielsweise Milchsäurebakterien optimal vermehren können, und in der Silage nicht erwünschte Organismen im Wachstum gehemmt werden. Diese Hilfsmittel haben jedoch teilweise auch auf das Wachstum von in der Silage erwünschten Bakterien einen negativen Einfluss. Ferner ist es mit dem Einsatz derartiger Mittel nicht möglich im Silierungsprozess unerwünschte Mikroorganismen (wie z.B. Clostridien) gezielt zu hemmen ohne das Wachstum erwünschter Mikroorganismen (z.B. Milchsäurebakterien) im Wesentlichen nicht zu beeinflussen bzw. zu fördern.

[0010] Daher ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung Silierhilfsmittel zur Verfügung zu stellen, die insbesondere eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber Mikroorganismen aufweisen, die in der Silage nicht erwünscht sind, und vorteilhafterweise das Wachstum der für eine Silage erforderlichen Mikroorganismen nicht beeinflussen bzw. deren Wachstum fördern.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Silierung und Konservierung von pflanzlichen Rohstoffen und Rohstoffgemischen, wobei die Silierung und Konservierung zumindest teilweise in Anwesenheit von mindestens einer zugesetzten Hopfensäure und/oder deren Salz durchgeführt wird.

[0012] Die vorliegende Erfindung stellt Mittel zur Unterstützung der konservierenden Prozesse während der Herstellung hochqualitativer Silagen zur Verfütterung an Nutztiere zur Verfügung. Insbesondere ermöglicht dieses Verfahren die Silagequalität mindernden oder für Nutztiere pathogenen Mikroorganismen in der Silageherstellung zu unterdrücken. Einerseits auf dem Wege diese unerwünschten Mikroorganismen direkt über die Wirkstoffe zu bekämpfen und andererseits sie soweit in ihrer Aktivität einzuschränken, dass es zu einer verstärkten Vermehrung weniger Wirkstoffempfindlicher Mikroorganismen kommen kann, welche die erforderlichen konservierenden pH-Verhältnisse über die Bildung von Milchsäure schaffen.

[0013] Es hat sich überraschend herausgestellt, dass mit Hilfe des Einsatzes von Hopfensäuren und gegebenenfalls organischen Säuren, die mindestens 10 Kohlenstoffatome aufweisen, silierte bzw. konservierte und zum Teil vergorene pflanzliche Rohstoffe bzw. Rohstoffgemische in kontrollierter, verbesserter Weise hergestellt werden können. Die organischen Säuren können entweder vor oder während der aeroben Phase im Silierprozess (vor der Hauptgärphase, bei der die pflanzenhaltigen Rohstoffe luftdicht abgeschlossen, verdichtet und gelagert werden) hinzugegeben werden. Die erfindungsgemäß eingesetzten Stoffe bewirken dabei eine selektive Unterdrückung vornehmlich bakterieller Gärschädlinge.

[0014] Erfindungsgemäß wird im Verfahren zumindest eine organische Säure eingesetzt. Selbstverständlich ist es auch möglich, Kombinationen von organischen Säuren (zumindest zwei, drei, vier, fünf oder zehn Säuren) und anderen Substanzen vorzusehen. Die erfindungsgemäßen Säuren ermöglichen jedenfalls die kontrollierte Silierung von pflanzlichen Rohstoffen, da diese gezielt gegen Mikroorganismen wirksam sind, die im Silierungsprozess unerwünscht sind.

[0015] Erfindungsgemäß eignet sich neben Hopfensäure jede Carbonsäure dazu, um als Hilfsmittel bei der Silierung und Konservierung von pflanzlichen Rohstoffen eingesetzt zu werden,

vorausgesetzt diese ist in der Lage, das Wachstum von in einer Silage nicht erwünschten Mikroorganismen signifikant zu beeinträchtigen.

[0016] Inhaltsstoffe der unbefruchteten Blütenstände weiblicher Hopfenpflanzen, die so genannten Hopfensäuren, weisen bakterizide Eigenschaften auf. Diese bitter schmeckenden Hopfenbestandteile werden seit Jahrhunderten zur Herstellung von lagerfähigem Bier genutzt und haben somit sogar in die menschliche Ernährung Eingang gefunden. Vor diesem Hintergrund kann von einer gesundheitlichen Unbedenklichkeit für Tiere bei Aufnahme geringster Mengen mit der Nahrung ausgegangen werden.

[0017] Die Hopfenpflanze *Humulus lupulus* gehört zur botanischen Familie der Cannabiaceae; Hopfen wird in vielen Ländern kultiviert und bei der Herstellung von Bier verwendet. Unbefruchtete weibliche Hopfenpflanzen bilden die so genannten Hopfendolden, in denen das Hopfenharz vorliegt. Das Hopfenharz wiederum enthält verschiedenste bakterizid wirksame Substanzen. Die Hopfenbestandteile können mit Hilfe von Ethanol oder überkritischem CO₂ extrahiert werden.

[0018] Die aus dem Hopfenharz gewinnbaren Hopfenbitterstoffe beinhalten verschiedene Fraktionen, wie Humulone (alpha-Säuren) und Lupulone (beta-Säuren). Diese Substanzen weisen mikrobiologische Hemmwirkung auf und können durch Erhitzen in ihre Isoformen überführt werden, wodurch bessere Wasserlöslichkeit bei nach wie vor vorhandener Hemmwirkung auf Mikroorganismen gegeben ist.

[0019] Beispiele von geeigneten Hopfensäuren finden sich in der US 2003/015480. Neben isolierten Hopfensäuren können bei der Silierung erfindungsgemäß auch Hopfenextrakte verwendet werden.

[0020] Die Carbonsäure ist vorzugsweise eine aliphatische, aromatische oder heterocyclische Carbonsäure, wobei die aliphatische Carbonsäure ungesättigt oder gesättigt sein kann. Die Carbonsäure ist vorzugsweise eine Monocarbonsäure, eine Dicarbonsäure oder eine Tricarbonsäure.

[0021] Als besonders geeignete Carbonsäuren, die im erfindungsgemäßen Siliervorgang eingesetzt werden können, haben sich Fettsäuren bzw. Harzsäuren erwiesen.

[0022] Da es sich bei vielen Fettsäure-Verbindungen um physiologisch unbedenkliche Naturprodukte handelt, eignen sich diese insbesondere um im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt zu werden. Die Fettsäure-Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung können auch Fettalkohole oder Fettaldehyde sein. Die Fettsäure-Verbindungen können dabei auch modifiziert, etwa durch den Einbau von funktionellen Gruppen, wie -OH, -SH, -NH₂, -F, -Cl, -Br, -I u. dgl. sein (ausgenommen solche Derivate, die toxisch oder lebensmitteltechnisch nicht anwendbar sind); auch aliphatische Seitenketten und/oder ein oder mehrere (insbesondere zwei oder drei) (ungesättigte) Doppelbindungen sind möglich, solange die physiko-chemischen Eigenschaften der (aliphatischen) Grundkette, insbesondere die Löslichkeit in antimikrobiellen Konzentrationen, sowie die Struktur am Cl-Atom erhalten bleiben.

[0023] Die Möglichkeit einer keimhemmenden Wirkung von Fettsäuren ist zwar für manche Gebiete bekannt oder in der Vergangenheit postuliert worden, jedoch haben sich diese Fettsäuren in der Praxis als Desinfektionsmittel für Mischkulturen, wie sie beispielsweise in einer Silage vorkommen, nicht bewährt.

[0024] Es zeigt sich auch, dass sich die postulierte keimhemmende Wirkung von Fettsäure-Verbindungen im Laufe der Zeit als nicht belegbar herausgestellt hat und zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht mehr als gegeben oder gar industriell nutzbar erachtet wird: Während in der 3. Auflage von Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie (1954, Bd. 5, Desinfektion und Sterilisation, S. 753) noch über Fettsäuren als Desinfektionsmittel referiert wird (in den 40er Jahren war man relativ optimistisch in Bezug auf die desinfizierende Wirkung von Fettsäuren in der Medizin), ist dieses Kapitel in der 4. Auflage (1975, Bd. 10, S.47-48) im Kapitel "Desinfektionsmittel" stark gekürzt ("Das Wirkungsmaximum von Fettsäuren soll bei C11 bis C12 liegen..." bzw. "Über die Bakterizidie der Seifen liegen stark widersprechende Befunde vor....") und in der

5. Auflage (1987, Vol. A8) wird im Kapitel "Disinfectants" nicht mehr darüber berichtet. Daraus ist ersichtlich, dass es bei normalen Temperaturen zu viele Fettsäureunempfindliche Mikroorganismenstämme gibt und dass man Fettsäuren heute nicht mehr zu den Desinfektionsmitteln zählt. Um so überraschender war es, dass sich gerade bei einem Verfahren zur Silierung bzw. Konservierung von pflanzenhaltigen Rohstoffen besonders gut organische Säure, wie Fettsäuren bzw. Fettsäureverbindungen, eignet. Dabei kommt den Fettsäuren besondere Bedeutung zu, da diese als technischer Hilfsstoff auch dazu dienen können, beispielsweise die Löslichkeit etwaig dazugegebener Harzsäuren zu erhöhen.

[0025] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die Fettsäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Kaprinsäure, Undecylensäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Margarinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure, Behensäure, Lignocerinsäure, Cerotinsäure, Palmitleinsäure, Ölsäure, Elaidinsäure, Vaccensäure, Icosensäure, Cetoleinsäure, Erucasäure, Nervensäure, Linolsäure, Linolensäure, Arachidonsäure, Timnodonsäure, Clupanodonsäure und Cervonsäure, wobei sich aber insbesondere die Myristinsäure als geeignetes Silierhilfsmittel herausgestellt hat.

[0026] Die Myristinsäure bzw. -seife hat sich erfindungsgemäß besonders bewährt, vor allem was ihre Eigenschaft anbelangt, die Löslichkeit von Harzsäuren zu verbessern. Ferner dient Myristinsäure auch zur Verbesserung der Lagerfähigkeit der Harzsäuren (bei kühleren Temperaturen, z.B., kommt es zur teilweisen Bildung von Niederschlägen). In einigen Fällen können zwar auch Myristinester antimikrobielle Wirkung zeigen, wobei jedoch nur Methylmyristat, nicht jedoch Ethyl- und Propylmyristat, mit einer Hemmkonzentration von ungefähr 100 mg/mL als äquivalent zu den erfindungsgemäßen Verbindungen angesehen werden kann.

[0027] Die Harzsäure ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pimarsäure, Neoabietinsäure, Abietinsäure, Levopimarsäure und Palustrinsäure.

[0028] Die Harzsäuren können erfindungsgemäß als von weiteren Harzbestandteilen isolierte Säuren zugesetzt werden, oder aber in Form eines Harzes oder Harzextraktes, vorzugsweise eines natürlichen Harzes.

[0029] Baumharze von Pinien/Kiefern beispielsweise sowie das daraus durch Destillation gewonnene Kolophonium, welches zum größten Teil aus Harzsäuren besteht, weisen bakterizide Eigenschaften auf, welche für die menschliche Ernährung bereits seit Jahrhunderten genutzt werden. Eine gesundheitliche Gefährdung von Nutztieren durch Nahrungsaufnahme kann somit ausgeschlossen werden.

[0030] Vorzugsweise werden die Harzsäuren bzw. das Harz aus Kiefern gewonnen. Kiefern, wie die österreichische Schwarzföhre *Pinus nigra Austriaca*, gehören zur botanischen Familie der Kieferngewächse oder Pinaceae; sie sind vornehmlich auf der Nordhalbkugel weit verbreitet und ihre Harze haben bei der Herstellung von Retsina, dem griechischen geharzten Wein, eine lange Tradition. Zur Gewinnung der antibakteriell wirksamen Bestandteile wird das Kiefernharz mittels Destillation in die beiden Fraktionen Terpentinöl und Kolophonium aufgetrennt. Im Kolophonium liegen nun die wirksamen Bestandteile, ein Gemisch aus Harzsäuren, vor. Diese können mit Alkalien zu Alkali-Resinaten gelöst werden.

[0031] Kolophonium ist ein Gemisch aus aromatischen Verbindungen wie Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und deren Isomere. Diese so genannten Harzsäuren, welche in Form von festen Kolophoniumblöcken kommerziell erwerbbar sind, entfalten zu unterschiedlichen Graden antibakterielle Aktivität und können als wasserlösliche Alkali-Resinate eingesetzt werden. Zur Erhöhung der Löslichkeit und Verhinderung der Niederschlagsbildung der Harzseife bei der Lagerung ist es günstig Myristinsäure zu geringen Anteilen als technischen Hilfsstoff bereits bei der Herstellung beizugeben.

[0032] Erfindungsgemäß können sämtliche lebensmittelkompatiblen Harze, wie sie beispielsweise in "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", Vol. A 23 (1993), Seiten 73-88, beschrieben sind, eingesetzt werden, wie beispielsweise Baumharze, insbesondere Balsame, wie z.B. Benzoe, Kiefern balsam, Myrrhe und Tolubalsam. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit

werden erfindungsgemäß vor allem Kolophonium-Produkte und Derivate bevorzugt. Derartige Produkte sind beispielsweise in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 23 (1993), auf den Seiten 79-88 (hierin durch Bezugnahme ausdrücklich eingeschlossen) beschrieben.

[0033] Bevorzugterweise werden erfindungsgemäß vor allem die ebendort beschriebenen Kolophonium(-Präparate) oder Kolophoniumderivate als natürliche Harze eingesetzt. Vorzugsweise wird dabei ein gelöstes, emulgiertes bzw. dispergiertes oder pastöses Kiefernharzprodukt eingesetzt, vorzugsweise auf Basis von Kiefernharz, Kiefern balsam, Kiefernharzsäuren, Salzen der Kiefernharzsäuren (Harzseifen), nicht-denaturierten Derivaten von Kiefernharzen (i. e. Derivate, die ohne Einfluss von starken Säuren oder Basen erhalten werden), eingesetzt. Als Kolophoniumderivate werden erfindungsgemäß auch chemisch-synthetisierte oder aus Kolophoniumprodukten isolierte Einzelkomponenten des Kolophoniums verstanden, wie beispielsweise Levopimarsäure, Neoabietinsäure, Palustrinsäure, Abietinsäure, Dehydroabietinsäure, Tetrahydroabietinsäure, Dihydroabietinsäure, Pimarsäure und Isopimarsäure. Die Derivatisierung von Kolophonium kann weiters die Hydrierung, Polymerisierung, Additionsreaktionen, Veresterung, Nitrilierung, Aminierung, etc. vorsehen.

[0034] Die Hopfensäure ist somit vorzugsweise eine alpha-Hopfensäure, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Humulon, Isohumulon, Cohumulon, Adhumulon, Prähumulon, Posthumulon, Tetrahydroisohumulon und Tetrahydrodeoxyhumulon, oder eine beta-Hopfensäure, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Lupulon, Colupulon, Adlupulon, Prälupulon, Postlupulon, Hexahydrocolupulon und Hexahydrolupulon.

[0035] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die organische Säure als salzhaltige Lösung oder Suspension zugesetzt, vorzugsweise als Kaliumsalzlösung, insbesondere als 0,5 bis 35%ige Kaliumsalzlösung, oder als Natriumsalzlösung, insbesondere als 0,5 bis 35%ige Natriumsalzlösung.

[0036] Diese Mengenverhältnisse beziehen sich nicht nur auf die freien Säuren, sondern auch auf Extrakte und Harze, die diese Säuren umfassen.

[0037] Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die organische Säure als alkoholische Lösung oder Suspension, vorzugsweise als eine 1 bis 95%ige, insbesondere als eine 10 bis 80%ige Ethanollösung, zugesetzt.

[0038] Vor und/oder während dem Silieren und Konservieren wird vorzugsweise zumindest ein zuckerhaltiges Substrat zugesetzt.

[0039] Mit der Zugabe von leicht vergärbaren Kohlenhydratquellen, wie z.B. Melasse, wird den in den zu silierenden Rohstoffen befindlichen Mikroorganismen das für die Fermentation notwendige Substrat zur Verfügung gestellt. Dadurch kann beispielsweise mehr Säure, insbesondere Milchsäure, gebildet werden, was sich auf die weitere Abnahme und die Hemmung von Gär schädlingen auswirkt.

[0040] Das zuckerhaltige Substrat ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Melasse, Dicksaft, Dünnsaft, Zuckerrübenschnitzel und Kombinationen davon.

[0041] Insbesondere diese Kohlenhydratquellen stellen den Mikroorganismen einerseits leicht vergärbare Zucker zur Verfügung und sind andererseits als Neben- und Zwischenprodukte im Rahmen der industriellen Zuckerherstellung in großen Mengen und günstig erhältlich. Der Zusatz von z.B. Melasse führt zu einer erhöhten Menge an Milchsäure, Gärsäuren allgemein, einem niedrigeren pH-Wert, einem reduzierten Buttersäuregehalt und zu einer verbesserten Stabilität des hergestellten Produkts.

[0042] Das zuckerhaltige Substrat wird dem pflanzlichen Rohstoff oder Rohstoffgemisch vorzugsweise in einer Menge von 0,1% bis 10%, vorzugsweise in einer Menge von 0,5% bis 8%, noch mehr bevorzugt in einer Menge von 1% bis 6%, zugesetzt.

[0043] Es hat sich in der Praxis herausgestellt, dass insbesondere im hier angeführten Konzentrationsbereich eine effiziente Silierung und somit Konservierung von pflanzlichen Rohstoff-

fen erfolgen kann. Die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Mengen hängen insbesondere auch davon ab, wie der Rohstoff selbst vergärbar ist.

[0044] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die mindestens eine Hopfensäure und/oder Fettsäure und/oder Harzsäure und/oder deren Salz, Alkohol und Aldehyd dem pflanzlichen Rohstoff oder Rohstoffgemisch in einer Menge von 0,001% bis 2%, vorzugsweise in einer Menge von 0,005% bis 1%, noch mehr bevorzugt in einer Menge von 0,01% bis 0,5%, zugesetzt.

[0045] Die Silierung und Konservierung wird vorzugsweise zumindest teilweise in Anwesenheit mindestens eines weiteren antimikrobiellen Wirkstoffs und/oder Stabilisators durchgeführt.

[0046] Der Einsatz von weiteren antimikrobiellen Wirkstoffen erlaubt eine weitergehende Hemmung von unerwünschten Gärkeimen zur Unterstützung der ohnehin bereits eingesetzten erfindungsgemäßen organischen Säuren. Erfindungsgemäß eignen sich alle im Stand der Technik bekannten antimikrobiellen Wirkstoffe, die auch in Futtermitteln und Nahrungsmitteln regelmäßig und unbedenklich eingesetzt werden können (z.B. Benzoate, Natriumnitrit, Hexamethylentramin usw.).

[0047] Weitere Zusatzstoffe, die erfindungsgemäß eingesetzt werden können, sind Rohfaser-spaltende Enzyme (z.B. Cellulasen, Hemi-cellulasen, Xylanasen), Stärke (als zusätzliche Kohlenstoffquelle), Zucker und Mineral- und Spurenelemente.

[0048] Vorzugsweise eingesetzte antimikrobielle Wirkstoffe und Stabilisatoren sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Essigsäure, Propionsäure, Benzoesäure, Sorbinsäure, Ameisensäure und deren Salzen.

[0049] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Silierung und Konservierung zumindest teilweise in Anwesenheit von zugesetzten Mikroorganismen, vorzugsweise prokaryotischen Mikroorganismen, insbesondere von Milchsäurebakterien, durchgeführt. Dabei werden bevorzugt *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus buchneri* und *Pediococcus pentosaceus* eingesetzt.

[0050] Durch den Zusatz von z.B. Milchsäurebakterien (homo- und heterofermentative Bakterien) kann der Gärungsverlauf an sich gesteuert werden. Homofermentative Milchsäurebakterien beschleunigen zu Beginn der Silierung die Bildung von Milchsäure und tragen somit zu einer rascheren Senkung des pH-Werts bei. Heterofermentative Milchsäurebakterien, die in der Lage sind neben Milchsäure auch Essigsäure zu bilden, senken ebenfalls den pH-Wert und sind insbesondere aufgrund der Essigsäurebildung für die Hemmung von Hefen verantwortlich. Darüber hinaus besitzen heterofermentative Milchsäurebakterien, wie *Lactobacillus buchneri*, die Fähigkeit Milchsäure nach Verbrauch der Zucker als Kohlenstoffquelle zu verwerten und sie zu Essigsäure umzubauen, wodurch eine zusätzliche Absenkung des pH-Werts und eine verbesserte aerobe Stabilität erreicht werden.

[0051] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können pflanzliche Rohstoffe jeglicher Art siliert und konserviert werden. Insbesondere sind die Rohstoffe ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Getreide, vorzugsweise Roggen, Weizen und Mais, Leguminosen, Gras, Zuckerrüben, Früchten, vorzugsweise Traubentrester, Schlempe, Pressschnitzel, Treber, Maische und Teilen und Kombinationen davon.

[0052] Im Hinblick auf das große Spektrum an Rohmaterialien (Gras, Mais, Pressschnitzel, Schlempe der Bier- bzw. Ethanol- und Spirituosenherstellung usw.) und ihren jeweiligen Eigenschaften, was Trockensubstanz, Art der Keimbelastung, Gehalt an vergärbaren Zuckern usw. betrifft, ist es für die Bereitung von Silagen, von Vorteil, gegebenenfalls den kombinierten Einsatz der beschriebenen Substanzen mit anderen Silierzusätzen, wie Salzen und/oder Säuren, in Erwägung zu ziehen. Darüber hinaus kann es notwendig sein, ein Substrat für die Milchsäuregärung im Siliergut über die Zugabe von Melasse oder anderer Zuckerquellen bereitzustellen. Auch die Zugabe von Starterkulturen (meist *Lactobacillen*) bei zu geringen Ausgangskeimzahlen der erwünschten Milchsäurebakterien ist möglich.

[0053] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen silierten und konservierten pflanzlichen Rohstoff bzw. ein entsprechendes Rohstoffgemisch erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

[0054] Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich pflanzliche Rohstoffe derart aufzubereiten, dass u.a. Futtermittel hergestellt werden können, die eine verbesserte Lagerfähigkeit aufweisen (längere Lagerdauer möglich), zu einer verbesserten Verdaubarkeit des Futtermittels in den gefütterten Tieren führen und keine das Tier belastenden Stoffe aufweisen, da die im hierin beschriebenen Verfahren eingesetzten organischen Säuren lebensmittelrechtlich unbedenklich sind. Aufgrund der erhöhten Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Silierhilfsmittel gegen z.B. Clostridien und Listerien kommt es aufgrund eines erhöhten Selektionsdrucks zur vermehrten Bildung gewünschter Milchsäurebakterien, da diese weniger empfindlich gegenüber den Wirkstoffen sind als die unerwünschten Keime.

[0055] Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein Futtermittel, umfassend silierten und konservierten pflanzlichen Rohstoff oder ein Rohstoffgemisch gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0056] Insbesondere werden erfindungsgemäß organische Säuren eingesetzt, die aufgrund ihrer Eigenschaften kein Gesundheitsrisiko für Nutztiere, die mit siliertem Futter gefüttert werden, darstellen. Viele Studien belegen die Unbedenklichkeit natürlicher Biostabilisatoren (wie z.B. Harzsäuren, Fettsäuren und Hopfensäuren) zumal sie sogar in der menschlichen Ernährung Verwendung finden. Vor diesem Hintergrund zieht eine möglicherweise auftretende Verschleppung kleinster Substanzmengen in Bereiche der menschlichen Ernährung keine gesundheitliche Gefährdung nach sich. Daher stellen die erfindungsgemäßen Säuren eine optimale Alternative oder Ergänzung zu bisher verwendeten Silierhilfsmitteln, wie Konservierungsmitteln (z.B. Benzoate), die bekannterweise über das Futtermittel in die menschliche Nahrungskette gelangen können, dar.

[0057] Die vorliegende Erfindung wird weiters durch die folgenden Beispiele dargelegt, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

BEISPIELE:

[0058] Die folgenden Beispiele zeigen auf, insbesondere am Beispiel von Rübenpressschnitzeln, dass bei Einsatz der erfindungsgemäßen Wirksubstanzen eine verminderte Buttersäurebildung (auch unter suboptimalen Temperaturbedingungen) und damit Verminderung der Aktivität von Clostridien erreicht wird. Darüber hinaus wurde die Wirksamkeit sowie die mindestens notwendige Einsatzkonzentration in mikrobiologischen Standardverfahren (minimale Hemmkonzentration in Hemmhofstests) für Clostridien und Listerien (u.a.) ermittelt:

[0059] Hopfen- β -Säuren gegen Listerien: 0,25 ppm

[0060] Clostridien: 10 ppm

[0061] Harzsäuren gegen Listerien: 35 ppm

[0062] Clostridien: 20 ppm

[0063] Da die notwendige Mindestkonzentration an den erfindungsgemäßen Wirksubstanzen u.a. von zu hemmenden Organismen abhängt, können die oben angeführten Werte natürlich bei anderen Organismen unterschiedlich sein. Die notwendige Mindestkonzentration kann beispielsweise durch Hemmtests ermittelt werden.

BEISPIEL 1:

[0064] Ein Silierhilfsmittel auf Hopfensäurenbasis für eine zu silierende Frischmasse (FM) von 1.000 kg lässt sich über die Verdünnung einer kommerziell erwerbbaren Lösung (BetaStab 10A; Mischung aus Harzen und Säureharzen von Hopfen: Wasser 80-90%, natürliche Beta-Säuren 9-11%, Kaliumhydroxide 1-3% und andere Hopfenkomponenten 1-5% mit 10%igem Hopfen- β -Säuren Gehalt herstellen. Dazu werden 250 g dieser Lösung mit Wasser auf 500 g aufgefüllt.

Diese Lösung mit dann 5%igem Wirkstoffgehalt ist für die sofortige Verwendung geeignet. Die Einbringung sollte über geeignete Sprühsysteme - wie sie beispielsweise für Ballenpressen der jeweiligen Hersteller angeboten werden - erfolgen. Für Ansätze in größerem Maßstab ist die vorzubereitende Menge dieses Silierhilfsmittels hochzurechnen.

BEISPIEL 2:

[0065] Ein Silierhilfsmittel auf Hopfensäurenbasis für eine zu silierende Frischmasse (FM) von 1.000 kg, welches einen zu geringen Gehalt an vergärbaren Zuckern aufweist, lässt sich folgendermaßen herstellen: 265 g BetaStab 10A werden in 30 bis 50 kg Melasse (je nach vorliegendem Zuckergehalt des Rohmaterials) eingerührt. Diese Mischung lässt sich nun sofort verwenden. Die Einbringung in das Siliergut sollte über geeignete Sprühsysteme - wie sie beispielsweise für Ballenpressen der jeweiligen Hersteller angeboten werden - erfolgen. Für Ansätze in größerem Maßstab ist die vorzubereitende Menge dieses Silierhilfsmittels hochzurechnen.

BEISPIEL 3:

[0066] Ein kombiniertes Silierhilfsmittel auf Hopfensäurenbasis für eine zu silierende Frischmasse (FM) von 1.000 kg, welches einen zu geringen Gehalt an vergärbaren Zuckern aufweist, lässt sich folgendermaßen herstellen: 265 g BetaStab 10A werden in 30 bis 50 kg Melasse (je nach vorliegendem Zuckergehalt des Rohmaterials) eingerührt. Zur zusätzlichen Unterdrückung von Hefen und zur Erhöhung der aeroben Stabilität kann die Beimengung von 2 bis 4 kg Propionsäure erfolgen. Diese Mischung lässt sich nun sofort verwenden. Die Einbringung in das Siliergut sollte über geeignete Sprühsysteme erfolgen. Für Ansätze in größerem Maßstab ist die vorzubereitende Menge dieses Silierhilfsmittels hochzurechnen.

BEISPIEL 4:

[0067] Ein Silierhilfsmittel auf Hopfensäurenbasis oder eine Kombination zweier Wirkstofftypen auf Hopfensäurebasis und Harzsäurebasis für eine zu silierende Frischmasse (FM) von 1.000 kg, welches einen zu geringen Gehalt an vergärbaren Zuckern aufweist, lässt sich folgendermaßen herstellen: 330 g PiStab 20A werden in 30 bis 50 kg Melasse (je nach vorliegendem Zuckergehalt des Rohmaterials) eingerührt. Zur zusätzlichen Unterdrückung von Hefen und oder anderen Mikroorganismen zur Erhöhung der aeroben Stabilität kann die Beimengung von Propionsäure/Essigsäure/Ameisensäure/Benzoesäure/Sorbinsäure oder den jeweiligen Salzen erfolgen. Diese Mischung lässt sich nun sofort verwenden. Die Einbringung in das Siliergut sollte über geeignete Sprühsysteme erfolgen. Für Ansätze in größerem Maßstab ist die vorzubereitende Menge dieses Silierhilfsmittels hochzurechnen.

BEISPIEL 5:

[0068] Silierhilfsmittel können in ähnlicher Zusammensetzung wie in den Beispielen 1 bis 7 angegeben, allerdings mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen von Hopfensäuren und anderen Silierhilfsmitteln, formuliert werden. Darüber hinaus ist es möglich parallel zum Siliermitteleinsatz auf Hopfen bzw. Harzbasis Milchsäure- oder Propionsäurebakterien in das Siliergut einzubringen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Silierung und Konservierung von pflanzlichen Rohstoffen und Rohstoffgemischen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Silierung und Konservierung zumindest teilweise in Anwesenheit von mindestens einer zugesetzten Hopfensäure und/oder deren Salz durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Silierung und Konservierung zusätzlich in Anwesenheit von zumindest einer Fettsäure und/oder Harzsäure und/oder deren Salz, Alkohol und Aldehyd durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fettsäure ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kaprinsäure, Undecylensäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Margarinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure, Behensäure, Lignocerinsäure, Cerotinsäure, Palmitoleinsäure, Ölsäure, Elaidinsäure, Vaccensäure, Icosensäure, Ceto-leinsäure, Erucasäure, Nervonsäure, Linolsäure, Linolensäure, Arachidonsäure, Timno-donsäure, Clupanodonsäure und Cervonsäure.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Harzsäure aus-
gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pimarsäure, Neoabietinsäure, Abietinsäure, Le-
vopimarsäure und Palustrinsäure.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Harz-
säure in Form eines Harzes, vorzugsweise eines natürlichen Harzes, noch mehr bevorzugt
in Form von Kolophonium, zugesetzt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Harz-
säure und/oder Fettsäure als salzhaltige Lösung oder Suspension zugesetzt wird, vor-
zugsweise als Kaliumsalzlösung, insbesondere als 0,5 bis 35%ige Kaliumsalzlösung.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Harz als alkoholi-
sche Lösung oder Suspension, vorzugsweise als eine 1 bis 95%ige, insbesondere als eine
10 bis 80%ige Ethanollösung, zugesetzt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hopfen-
säure eine alpha-Hopfensäure ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Humulon,
Isohumulon, Cohumulon, Adhumulon, Prähumulon, Posthumulon, Tetrahydroisohumulon
und Tetrahydrodeoxyhumulon oder eine beta-Hopfensäure ausgewählt ist aus der Gruppe
bestehend aus Lupulon, Colupulon, Adlupulon, Prälupulon, Postlupulon, Hexahydrocolupu-
lon und Hexahydrolupulon.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hopfen-
säure in Form eines Hopfenextrakts zugesetzt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass vor
und/oder während dem Silieren und Konservieren zumindest ein zuckerhaltiges Substrat
zugesetzt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass das zuckerhaltige Substrat
ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Melasse, Dicksaft, Dünnsaft und Kombinati-
onen davon.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass das zuckerhaltige
Substrat dem pflanzlichen Rohstoff oder Rohstoffgemisch in einer Menge von 0,1% bis
10%, vorzugsweise in einer Menge von 0,5% bis 8%, noch mehr bevorzugt in einer Menge
von 1% bis 6%, zugesetzt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die min-
destens eine Hopfensäure und/oder Fettsäure und/oder Harzsäure und/oder deren Salz,
Alkohol und Aldehyd dem pflanzlichen Rohstoff oder Rohstoffgemisch in einer Menge von
0,0001% bis 2%, vorzugsweise in einer Menge von 0,0005% bis 1%, noch mehr bevorzugt
in einer Menge von 0,001% bis 0,5%, zugesetzt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Silie-
rung und Konservierung zumindest teilweise in Anwesenheit mindestens eines weiteren
antimikrobiellen Wirkstoffs und/oder Stabilisators durchgeführt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass der antimikrobielle Wirkstoff
und Stabilisator ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Essigsäure, Propionsäure,
Benzoessäure, Sorbinsäure, Ameisensäure und deren Salze.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Silierung und Konservierung zumindest teilweise in Anwesenheit von zugesetzten Mikroorganismen, vorzugsweise prokaryotischen Mikroorganismen, insbesondere von Milchsäurebakterien, durchgeführt wird.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass der pflanzliche Rohstoff ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Getreide, vorzugsweise Roggen, Weizen und Mais, Leguminosen, Gras, Zuckerrüben, Früchten, vorzugsweise Traubentrester, Schlempe, Treber, Pressschnitzel, Maische und Teilen und Kombinationen davon.
18. Silierter und konservierter pflanzlicher Rohstoff oder Rohstoffgemisch erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17.
19. Futtermittel umfassend silierten und konservierten pflanzlichen Rohstoff oder Rohstoffgemisch nach Anspruch 18.

Hierzu keine Zeichnungen

Chapter four

Application of plant-based antimicrobials for the growth inhibition of clostridia in pressed beet pulp silage.

Florian Emerstorfer, Walter Hein, Reinhard Resch, Erich M. Poetsch, Ulrike Zitz and Wolfgang Kneifel

Journal of the Science of Food and Agriculture (2011)
(*in press*)

Application of plant-based antimicrobials for the growth inhibition of clostridia in pressed beet pulp silage

Florian Emerstorfer,^{a*} Walter Hein,^a Reinhard Resch,^b Erich M Poetsch,^b Ulrike Zitz^c and Wolfgang Kneifel^c

Abstract

BACKGROUND: In this study the inhibition of hop beta acids on the growth of clostridia in soil-contaminated pressed sugar beet pulp silages was investigated. Hop beta acids are natural substances which display their effect at low concentrations. Fresh pressed beet pulp material was mixed with soil to artificially contaminate it with clostridia. Laboratory silos were filled with the substrate, stored at 25 °C and opened for sampling at 0, 2, 8, 15, 30, 60, and 90 days. The impact on clostridial growth during silage fermentation was monitored by determination of the pH value and dry matter content, as well as chemical analysis of the fermentation products. Throughout the experiments, the effect of a commercial silage inoculant based on lactic acid bacteria (LAB) and hop-resistant LAB were examined with and without the combination of plant-based antimicrobials.

RESULTS: Results indicate that in contaminated silage samples without any additives high butyric acid contents occurred due to clostridial growth. This spoilage could not be suppressed by the application of LAB, whereas the combined application of LAB and hop beta acids significantly improved silage quality, which was reflected by favourable organic acid composition ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The experimental data indicate that the application of hop beta acids improves the preservation effect of LAB in suppressing clostridial growth in silages and thus demonstrates some potential for the combined use of plant-based antimicrobials and LAB.

© 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: antimicrobials; silage spoilage; hop beta acids; clostridia; butyric acid

INTRODUCTION

In the early 1990s plant-based antimicrobials were introduced in the sugar industry as an alternative to formaldehyde, in order to combat thermophilic bacteria within the sugar production process. Hop beta acids were found to be a suitable application for the control of microbial growth in the sugar extraction area, as they are well known for their antimicrobial effect and also their proven safe history in the brewing industry.^{1–3} Similarly, rosin acids also act as preservatives and have been used to prevent the spoilage of retsina, a typical Greek wine. In addition, fatty acids, commonly found in plant oils and dairy products, have demonstrated their beneficial properties in a variety of applications.^{4–9} Owing to the beneficial attributes exhibited by such natural antibacterials, innovative concepts for their application became evident in other areas of sugar production, where, for example, slime-forming bacteria and clostridia could be inhibited.¹⁰ Throughout subsequent studies, it was discovered that a major proportion of the substances applied in the extraction area were present in the final pressed beet pulp.^{11,12} Although no problems have been reported in relation to residual traces of antibacterials in the pressed pulp in the course of silage production, no further research activities were carried out in

this direction. However, already in 1999, Pollach *et al.* assumed that positive effects could be linked to substance remnants in the pressed pulp, as inhibition of unwanted groups of microorganisms was reported.^{13,14} Results from preliminary studies with plant based antimicrobials confirmed such expectations and indicated improved inhibitory effects when combined with bacterial silage inoculants.

Taking into consideration these findings, the present study was carried out to further examine the potential of plant-based antimicrobials in the field of silage production, as it has become evident that clostridia are sensitive towards these substances owing to their cell wall structure. Furthermore, clostridia are

* Correspondence to: Florian Emerstorfer, Zuckerforschung Tulln GmbH, Josef-Reither-Strasse 21–23, 3430 Tulln, Austria.
E-mail: florian.emerstorfer@zuckerforschung.at

a Zuckerforschung Tulln GmbH, 3430 Tulln, Austria

b Agricultural Research and Education Centre Raumberg-Gumpenstein, Raumberg 38, 8952 Irdning, Austria

c University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria

Table 1. Treatment combinations prepared in the silage experiment

	Treatment	Abbreviation
1	Untreated pressed pulp	UPP
2	Soil-contaminated pressed pulp	SCPP
3	Soil-contaminated pressed pulp + formic acid	SCPP + FA
4	Soil-contaminated pressed pulp + Bonsilage forte	SCPP + Bf
5	Soil-contaminated pressed pulp + Bonsilage forte + 50 mg kg ⁻¹ hop beta acids	SCPP + Bf + 50 HBA
6	Soil-contaminated pressed pulp + Bonsilage forte + 100 mg kg ⁻¹ hop beta acids	SCPP + Bf + 100 HBA
7	Soil-contaminated pressed pulp + hop-resistant LAB	SCPP + hrLAB
8	Soil-contaminated pressed pulp + hop-resistant LAB + 50 mg kg ⁻¹ hop beta acids	SCPP + hrLAB + 50 HBA
9	Soil-contaminated pressed pulp + hop-resistant LAB + 100 mg kg ⁻¹ hop beta acids	SCPP + hrLAB + 100 HBA

among the most important spoilage microorganisms in silage production and therefore effective and reliable antimicrobials are in much demand.^{15–17}

EXPERIMENTAL

Soil for contamination

Clostridial contamination was achieved by admixing defined portions of soil to the pressed beet pulp. The soil material was collected from the premises of the sugar factory, in Tulln (Austria), several weeks prior to the trial and carefully dried in a drying oven at 50 °C. Subsequently, the material was sieved to render a fine structure suitable for proper mixing. Prior to the microbial monitoring trial, the soil was mixed and sampled (5 × 100 g) and the clostridial spore counts were determined.

Silage preparation

Silages were prepared with conventional sugar beet pulp originating from the sugar factory, in Tulln, in November 2008. At the onset of the trial, fresh material was collected directly from the pulp presses, mixed thoroughly, sampled and was immediately subjected to chemical analysis.

The mixing of pressed pulp and the addition of soil and additives was performed in a conventional concrete mixer. First, soil with clostridial contaminants was added to the pressed pulp (6.25 g kg⁻¹ fresh matter), and then the silage additives and plant antimicrobial solutions were sprayed onto the pressed pulp by means of sprayer bottles (15 g kg⁻¹ fresh matter). In the case of combined treatments the plant antimicrobial solutions and lactic acid bacteria (LAB) were pre-mixed before application. The treated materials were then placed in 1 L glass jars (850 g pressed pulp each). After anaerobic sealing, the glass jars were weighed and stored in a climatic chamber for 90 days at 25 °C. For monitoring the fermentation process in the laboratory silos of the experiment, three replicate glass jars per negative control (untreated pressed pulp = UPP), positive control (soil-contaminated pressed pulp = SCPP) and all treated variants (SCPP + additives) were weighed, opened and analysed at 0, 2, 8, 15, 30, 60 and 90 days after ensiling. The lactic acid bacterial additives used in the experiment were Bonsilage forte (Bf), a commercial silage inoculant, and defined hop-resistant LAB (hrLAB). Bf and hrLAB were applied with and without the combination of hop beta acids (HBA). For reference purposes, formic acid (FA) was used as a standard silage additive. A total of nine treatment combinations were prepared in the experiment (Table 1).

Antimicrobial plant components, silage additives, hrLAB

Silage additives were prepared and used according to the recommendations of the producers. BetaStab 10A®, produced by BetaTec GmbH (Nuremberg, Germany), was provided by Zuckerforschung Tulln GmbH: an aqueous, alkaline solution (pH 10.0–11.5) containing a ~10% (w/w) of a mixture of resins and resin acids of hops, with the principal component being HBA (lupulone). Bonsilage forte is a mixture of homofermentative LAB: *Pediococcus acidilactici*, DSM 16 243; *Lactobacillus paracasei*, DSM 16 245; *Lactococcus lactis*, NCIMB 30 160 (H. Wilhelm Schaumann GmbH & Co. KG, Wiener Neudorf, Austria). An aqueous bacterial suspension was prepared to yield ~10⁵ colony-forming units (CFU) g⁻¹ fresh matter. FA, 85% (w/w), was applied to achieve a concentration of ~0.25% FA on fresh matter. Hop-resistant strains of LAB isolated from spoiled beer samples were provided by Prof. Rudi Vogel, University of Weihenstephan, Munich: *Lactobacillus brevis*, TMW 1.316 (heterofermentative), *Pediococcus damnosus*, TMW 2.61 (homofermentative). Bacteria were activated in MRS broth (de Man, Rogosa and Sharpe; Merck KgaA, Darmstadt, Germany), and 24 h cultures of a 50:50 combination of both strains was applied to yield ~10⁵ CFU hrLAB g⁻¹ fresh matter.

Analyses

The silage fermentation process was characterized by the determination of silage acids, pH value and dry matter content at time zero and after 2, 8, 15, 30, 60 and 90 days of ensiling. Sugars were analysed at the beginning and at the end of the trial, after 90 days of storage. For fresh pressed pulp and silages, dry matter (DM) was determined by oven drying at 105 °C for 48 h. The enumeration of clostridial spores was carried out in the soil used for contamination as well as in the positive control (SCPP) at the beginning of the trial. The content of clostridial spores in soil, fresh materials and silages was determined using the most probable number (MPN) method at 37 °C for 72 h, according to VDLUFA M7.18.4.¹⁸ The incubation was carried out in test tubes using DRCM broth (Differential Reinforced Clostridial Medium, Merck KgaA) after pasteurization. Air exclusion was achieved by using paraffin layers. Fresh materials and silages (20 g) were macerated in 200 g distilled water in a blender (Mixer AB, Ingenieursfirma Nils Weibull, Malmo, Sweden) for 3 min at 3000 min⁻¹ and then filtered over filter papers (MN 206, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Germany) to separate coarse material. The pH value of the filtered solution was measured with a glass rod electrode pH meter (SenTix 81, Inolab Terminal Level 3, WTW GmbH, Weilheim, Germany), then centrifuged at 11 340 × g (MiniSpin, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), filtered through 0.45 µm filter

Table 2. Chemical composition of fresh pressed beet pulp

Start of trial	Properties of the fresh material
pH	5.89
DM (g kg ⁻¹)	293
Lactic acid (g kg ⁻¹) DM	5.3
Acetic acid (g kg ⁻¹) DM	2.8
Butyric acid (g kg ⁻¹) DM	ND
Total acids (g kg ⁻¹) DM	8.1
Ethanol (g kg ⁻¹) DM	ND
Sucrose (g kg ⁻¹) DM	108.1
Glucose (g kg ⁻¹) DM	1.9
Fructose (g kg ⁻¹) DM	0.6
Mean values of duplicate analysis. DM, dry matter; Total acids, sum of lactic acid, acetic acid, butyric acid; ND, not detected.	

discs (Bulk GHP acrodisc 25 mm syringe filters, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) and pipetted into glass vials (No. 548-0003, VWR International, Vienna, Austria) for subsequent analysis of sugars and silage acids. The latter were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) using an Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm i.d., Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). Throughout the chromatographic process, the temperature of the column remained constant at 65 °C. A wavelength of 210 nm was used for refractive index (RI)/UV detection of the organic acids (RI detector Shodex RI-71, Showa Denko KK, Tokyo, Japan; UV-visible detector UVD 340U, Dionex Corporation).^{19,20} The mobile phase used was 5 mmol L⁻¹ H₂SO₄ (Fixanal 38 290, Honeywell Specialty Chemicals, Seelze, Germany). For standards and sample extracts, the injection volumes were 20 µL, with a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ and a runtime of 30 min. Standards of DL-lactic acid (L1500), propionic acid (81 910) and butyric acid (19 210) were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Absolute ethanol (100 983) was purchased from Merck. Stock solutions (10 g L⁻¹) were prepared in ultra-pure water (Milli-Q water system; Millipore Corp., Billerica, MA, USA) and stored in darkness at 5 °C. Total organic acids were calculated by the sum of lactic acid, acetic acid and butyric acid to indicate the progression of fermentation.

The determination of sugars was performed using the same apparatus as in the organic acid determination, but in this case with RI detection (Showa Denko KK).²¹ The separation was carried out using an Aminex HPX-87K column (300 × 7.8 mm i.d.) from Biorad Laboratories, under the same conditions as mentioned above, except for a runtime of 35 min. The mobile phase used was 15 mmol L⁻¹ K₂SO₄ (221 325 ACS reagent), purchased from Sigma-Aldrich. Standards of glucose monohydrate (49 158) and fructose (47 739) were obtained from Sigma-Aldrich; sucrose (107 687) was purchased from Merck. Stock solutions (10 g L⁻¹) were prepared in ultra-pure water (Milli-Q water system) and stored at 5 °C.

Statistical analysis

The data were analysed for homogeneity of variance and normality of distribution. Subsequently, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison was used to determine significant differences of means between treatments. These analyses were performed using Statgraphics plus (version 5.0, Statistical Graphics Corp., Manguistics Inc., Rockville, MD, USA).

Table 3. Initial clostridial counts (MPN g⁻¹) in soil and soil-contaminated pressed pulp

Start of trial	Anaerobic spore-forming bacteria	
	Gas formation in DRCM medium	Sulfite reduction of DRCM medium
Soil used in the experiment		
Sample 1	1 500	4600
Sample 2	95	430
Sample 3	360	430
Sample 4	11 000	930
Sample 5	1 500	1500
Soil-contaminated material used in the experiment		
SCPP A	93	23
SCPP B	210	15
SCPP C	150	15
SCPP D	75	7.4
SCPP E	43	3.6
SCPP, soil-contaminated pressed pulp.		

RESULTS

The chemical composition of fresh pressed sugar beet pulp is presented in Table 2. While silage acid concentrations were relatively low, DM and sucrose concentrations were relatively high according to practical experience.

Table 3 presents an overview of clostridial counts in the soil that was used for the various treatment combinations throughout the experiment, and also the resulting clostridial counts in variant SCPP. Clostridial counts in the soil were widely scattered (samples 1–5) and admixing of soil to pressed pulp in order to simulate clostridial contamination was reflected by countable and reproducible results (samples A–E). An average MPN count of 2.9×10^3 CFU of gas-forming clostridia in the soil yielded an average 1.1×10^2 CFU of gas-forming clostridia in the variant SCPP at the beginning of the trial.

Silage fermentation

Fermentation characteristics of the silages in the experiment after 90 days of ensiling are displayed in Table 4. Silage produced with formic acid and UPP showed low pH values, high lactic acid and acetic acid but low butyric acid concentrations. Concerning DM, FA exhibited very low losses in DM due to the direct influence on pH and therefore limited microbial activity. In comparison to the other variants, no significant differences were detected. In SCPP, the pH value was significantly higher than its respective counterparts. Lactic acid and acetic acid concentrations were lower and butyric acid levels were very high. It is evident that in SCPP clostridia were capable of metabolizing nutrients to produce butyric acid. The addition of LAB resulted in lower pH levels compared to SCPP but silage acid concentrations were not significantly affected. In fact, the application of Bf and hrLAB was not sufficient to exert an inhibitory effect on clostridial growth, and this is well demonstrated through high butyric acid values of 24.0 g kg⁻¹ DM and 23.8 g kg⁻¹ DM, respectively. Addition of HBA resulted in lower pH levels compared to the individual use of Bf and hrLAB. Also, lactic acid and acetic acid concentrations were higher, while butyric acid levels were significantly lower. Higher HBA addition resulted in lower butyric acid concentrations. With regard to ethanol concentration, FA showed very low values, while

Table 4. Fermentation characteristics of treated pressed beet pulp silages after ensiling for 90 days at 25 °C

Treatment	pH	DM (g kg ⁻¹)	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	Total acids (g kg ⁻¹) DM	Ethanol	Sucrose	Glucose	Fructose
UPP	3.73a	278a (0.03)	54.8d (1.6)	16.1d (0.5)	1.7ab (0.8)	72.7c (1.3)	14.8b (0.2)	ND	ND	ND
SCPP	4.28d (0.04)	278a (0.04)	14.2a (2.8)	6.5a (3.5)	28.6c (2.3)	49.3a (8.0)	12.8b (0.4)	ND	ND	ND
SCPP + FA	3.68a (0.01)	288b (0.01)	54.8d (4.1)	14.0cd (2.0)	0.3a (0.2)	69.0bc (5.7)	1.6a (1.3)	ND	13.8b (2.6)	19.8b (4.8)
SCPP + Bf	4.19bcd (0.11)	271a (0.11)	20.9ab (8.5)	7.3ab (0.5)	24.0c (5.5)	52.1a (2.9)	14.9b (1.3)	ND	0.1a (0.1)	ND
SCPP + Bf + 50 HBA	4.03bc (0.01)	273a (0.01)	32.0bc (0.9)	11.3bc (0.7)	9.3b (0.4)	52.6a (0.5)	22.1cd (0.5)	ND	ND	ND
SCPP + Bf + 100 HBA	4.03bc (0.02)	271a (0.02)	36.0c (2.5)	12.8cd (1.3)	6.1ab (1.1)	55.0a (2.8)	23.6de (0.2)	ND	ND	ND
SCPP + hrLAB	4.23cd (0.03)	274a (0.03)	18.4ab (2.2)	4.6a (0.4)	23.8c (1.5)	46.8a (0.6)	13.8b (0.8)	ND	ND	ND
SCPP + hrLAB + 50 HBA	4.01b (0.13)	272a (0.13)	36.3c (7.6)	13.3cd (0.8)	8.1b (2.9)	57.8ab (5.5)	21.5c (0.3)	ND	ND	ND
SCPP + hrLAB + 100 HBA	4.00b (0.12)	274a (0.12)	37.1c (8.6)	14.4cd (2.1)	5.8ab (4.1)	57.4ab (6.6)	25.4e (0.7)	ND	ND	ND

UPP, untreated pressed pulp; SCPP, soil-contaminated pressed pulp; FA, formic acid; Bf, Bonsilage forte; HBA, hop beta acids; hrLAB, hop-resistant LAB; DM, dry matter; Total acids, sum of lactic acid, acetic acid, butyric acid; ND, not detected; mean values of triplicate silos; Standard deviations (SD) for each parameter are given in parentheses. Means followed by different letters in a column are significantly different (Tukey's HSD test, $P < 0.05$).

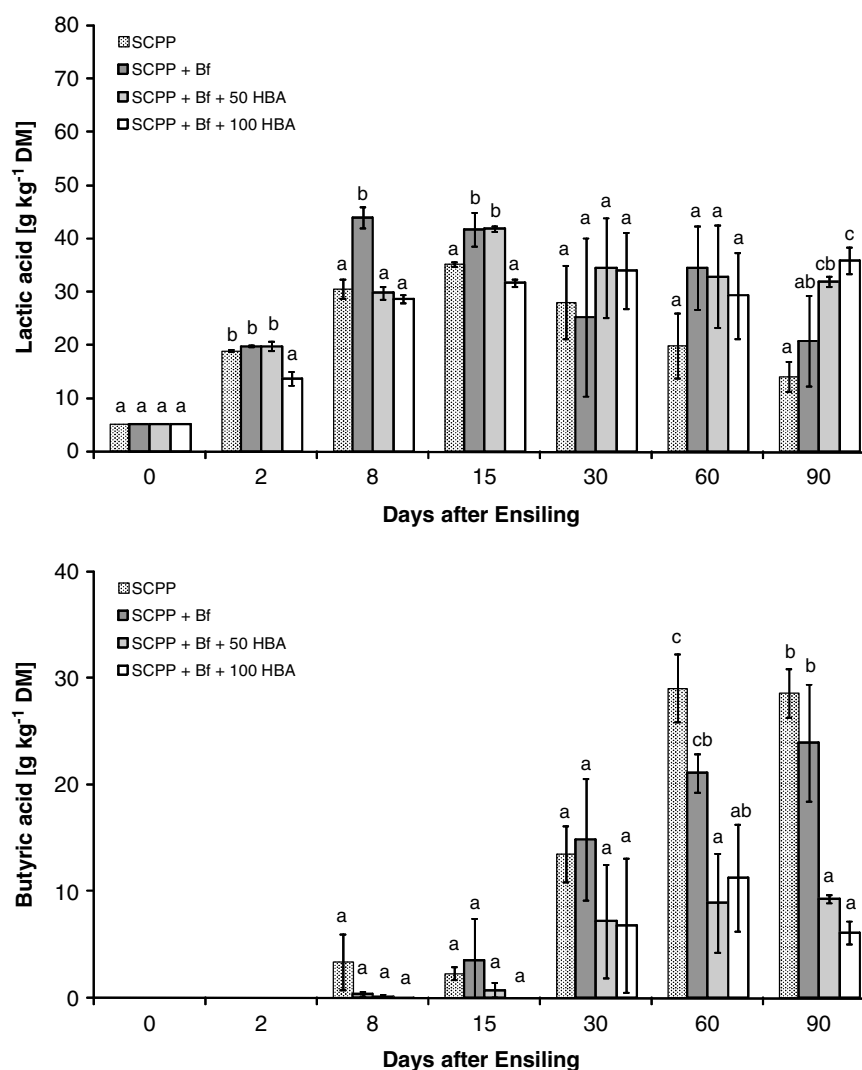


Figure 1. Changes in lactic acid and butyric acid content in soil-contaminated pressed pulp silages (SCPP), added Bonsilage forte (Bf) and hop beta acids (HBA). Bars indicate mean values of triplicate silos with standard deviations represented by vertical bars. Means followed by different letters are significantly different (Tukey's HSD test, $P < 0.05$).

SCPP and LAB addition resulted in relatively high ethanol levels. Conversely, variants treated with the combination of LAB and HBA showed higher ethanol concentrations, indicating that HBA addition exerted an effect on ethanol fermentation. This effect may be due to a certain selection of yeasts and heterofermentative LAB in the laboratory silages. Concerning sugars, FA treatment resulted in incomplete fermentation results and showed higher glucose and fructose concentrations. This may cause problems with yeasts in the case of aerobic stress, as acetic acid levels were also very low in the FA treatment.¹⁷

Progression of silage fermentation

In the following, silages added with Bf and HBA (Fig. 1) as well as hrLAB and HBA (Fig. 2) are compared with SCPP to clarify the role of the different treatments on the development of lactic acid and butyric acid concentrations throughout the observation period. Starting at $5.3 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$, the lactic acid content in the laboratory silages almost quadrupled within 2 days, except Bf + $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ HBA}$, which showed a lower lactic acid concentration of only $13.8 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$ (Fig. 1). Butyric acid

was not detected during the early phase (Figs 1 and 2). On day 8, the lactic acid content in the variants further increased to levels of $\sim 30 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$ with the exception of Bf and hrLAB, showing significantly higher values of more than $40 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$. Low levels of butyric acid were found in all treatments, with SCPP showing the highest concentration of $3.4 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$. From day 15 onwards, the lactic acid level in SCPP showed a clear downward trend until the end of the experiment. In contrast, butyric acid concentrations increased immensely, indicating that lactic acid was microbiologically converted to butyric acid. For Bf and hrLAB, this trend was not so pronounced, but lactic acid concentrations also decreased from earlier peak levels, while butyric acid concentrations increased. In contrast to that, HBA addition to Bf and hrLAB resulted in retarded lactic acid peaks with a downward trend at later stages and limited butyric acid concentrations. The progression of lactic acid and butyric acid for combinations of LAB and HBA indicates that the antimicrobial addition exerted an inhibitory effect on lactic acid formation at the beginning of the silage fermentation, but then prevented the acid from being utilized by microorganisms.

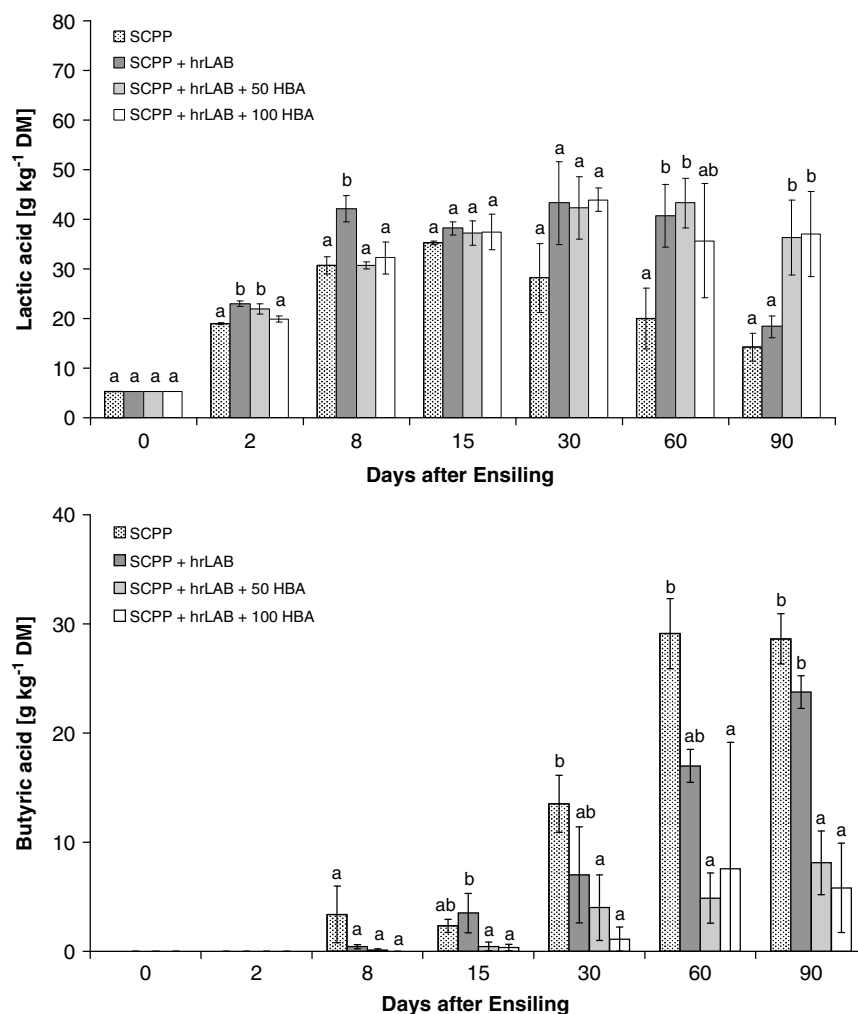


Figure 2. Changes in lactic acid and butyric acid content in soil-contaminated pressed pulp silages (SCPP), added hop-resistant LAB (hrLAB) and hop beta acids (HBA). Bars indicate mean values of triplicate silos with standard deviations represented by vertical bars. Means followed by different letters are significantly different (Tukey's HSD test, $P < 0.05$).

DISCUSSION

Results indicate that the admixed amount of soil in pressed sugar beet pulp clearly influenced the progression of fermentation and drastically lowered silage quality after 90 days of ensiling. Clostridia usually grow if acidification of the silage is retarded or if inhibitory substances like nitrate are lacking.^{15,17} In the experiments, clostridial activity was not only detected in the later stages but also at the beginning of fermentation. This was particularly demonstrated for product series SCPP, where lactic acid content steadily decreased while butyric acid content increased during the observation period. Eventually, the majority of previously formed lactic acid underwent conversion to butyric acid. This effect has been reported by several authors for grass silages, as the nitrate content in the plant raw material strongly influences the fermentation process. In the event that no or low levels of nitrate are present in the plant raw material, lactic acid is directly converted into butyric acid immediately after the fermentation commences. In the case of a slow decrease in pH and presence of nitrate in the initial phase of the fermentation process, the formed lactic acid is converted to acetic acid in a first step, and then, after complete reduction of nitrate, further metabolized to butyric acid.^{22,23}

Lactic acid bacteria were added to the soil-contaminated pressed pulp to accelerate lactic acid formation and a decrease in pH. Data indicate that the preservative effect was not sufficient, as the lactic acid produced was converted to butyric acid in the later stages of the experiment. This may be due to the fact that the pH value was not reduced below levels where growth inhibition of clostridia may occur. However, the effect strongly depends on the DM content of the raw material.²⁴ This observation is especially remarkable for the application of Bonsilage forte, as this product is attributed to have an inhibitory effect on clostridial growth.¹⁷

While the pure use of LAB did not sustainably inhibit butyric acid formation, the additional application of hop beta acids led to pronounced improvements and avoided further conversion of lactic acid to butyric acid. Hop compounds are known to exert some antimicrobial effect, especially on Gram-positive bacteria.^{4,25,26} As with many other preservatives, hop beta acids are weak acids which are most effective against bacteria in their undissociated form.²⁷ It is well known in the brewing industry that LAB can develop resistance mechanisms against hop-derived compounds.^{28,29} This experience could be explained by the following mechanism: as LAB are lowering the pH value at the beginning of silage fermentation, HBA are increasingly transformed to their undissociated form and

can be resorbed by the bacterial cell. There, HBA dissociate again and dissipate the transmembrane potential necessary for energy generation.^{30,31} In contrast to the hop-resistant LAB, vegetative clostridial cells – which are also immediately active from the onset of the experiment – obviously do not bear mechanisms to protect themselves from the antimicrobial activity of HBA and thus are inhibited by the hop compounds.

Data clearly indicate that not only hop-resistant LAB derived from spoiled beer samples were able to grow in the presence of HBA, but also LAB components of a commercially available silage additive for which hop resistance has not been reported. In fact, the combined use of LAB from a silage inoculant and HBA resulted in lower butyric acid levels and led to improved quality parameters of the silage, although pH values were comparable to laboratory silages to which only LAB or no additive was added.

As expected, formic acid proved to be most effective in preserving the plant material, as the pH decreased immediately and clostridial growth was thus inhibited. However, FA treatment leads to significant monosaccharide residuals in the laboratory silages, which can be converted by yeasts or moulds in the case of aerobic stress.¹⁷ Also, the application of acids bears some disadvantages like aggressiveness, corrosion of equipment and safety measures for the user. As a consequence, alternative silage additives such as salts, salt solutions and inoculants have gained increased importance over the years.

CONCLUSION

Results from laboratory experiments with soil-contaminated pressed sugar beet pulp indicate that the single use of lactic acid bacteria may not guarantee low butyric acid content. However, the complementary use of hop beta acids in the range of 50–100 mg on fresh matter and lactic acid bacteria may lead to silages with low butyric acid concentrations, thus resulting in improved quality.

REFERENCES

- Pollach G, Hein W and Hollaus F, Use of hop products as bacteriostaticum in the sugar industry. *Sugar Ind* **121**:919–926 (1996).
- Hein W and Pollach G, New findings with the use of hop products in the sugar industry. *Sugar Ind* **122**:940–949 (1997).
- Pollach G, Process to stop the growth of thermophilic microorganism in an aqueous sugar containing medium. European Patent 0 681 029 B1 (1997).
- Narziss L, *Abriss der Bierbrauerei*, 5. ergaenzte Auflage. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 110–114 (1986).
- Brockmann R, Demmering G, Kreutzer U, Lindemann M, Plachenka J and Steinberger U, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A10 (5th edn). VCH-Verlag, Weinheim, pp. 245–276 (1987).
- Johnson EA and Haas GJ, Antimicrobial activity of hop extract against *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* and *Helicobacter pylori*. US patent 6 251 461 B1 (2001).
- Hornsey I, *The Chemistry and Biology of Winemaking* (1st edn). RSC Publishing, Cambridge, UK (2007).
- Beuchat LR and Golden DA, Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol* **43**:134–142 (1989).
- Soederberg TA, Gref R, Holm S, Elmros T and Hallmans G, Antibacterial activity of rosin and resin acids *in vitro*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* **24**:199–205 (1990).
- Pollach G, Hein W and Beddie D, The concept of different natural antibacterials for the sugar industry. *Sugar Ind* **129**:555–564 (2004).
- Hein W, Pollach G and Emerstorfer F, 10 years' experience with natural antibacterials within Agrana. *Sugar Ind* **131**:477–491 (2006).
- Pollach G, Hein W and Beddie D, Application of hop beta acids and rosin acids in the sugar industry. *Sugar Ind* **127**:921–930 (2002).
- Pollach G, Hein W and Roesner G, New findings towards solving microbial problems in sugar factories. *Sugar Ind* **124**:622–637 (1999).
- Gudmundson C, Danisco Sugar's experience with hops extracts as alternative for formaldehyde. Presented at the General Assembly of German Sugar Technologists (VDZ). Dresden. Ref. in *Sugar Ind* **123**:456 (1998).
- McDonald P, Henderson AR and Heroen SJE, *The Biochemistry of Silage* (2nd edn). Chalcorn Publications, Aberystwyth, UK, pp. 108–122 (1991).
- Driehuis F and Oude Elferink SJWH, The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet Q* **22**:212–216 (2000).
- DLG (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft), *Praxishandbuch Futterkonservierung*, 7. Auflage. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, pp. 15–20, 257 (2006).
- VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), *Chemische, physikalische und mikrobiologische Untersuchungsverfahren fuer Milch, Milchprodukte und Molkereihilfsstoffe Methodenbuch Band VI, M7.18.4, 6*. Ergaenzung. VDLUFA-Verlag, Darmstadt (2003).
- Canale A, Valente ME and Ciotti A, Determination of volatile carboxylic acids (C₁–C₅) and lactic acid in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. *J Sci Food Agric* **35**:1178–1182 (1984).
- Kubadinow N, Zur Bestimmung von organischen Saeuren in Pressschnitzsilagen. *Zuckerindustrie* **107**:1107–1110 (1982).
- Klein H and Leubolt R, Ion-exchange high-performance liquid chromatography in the brewing industry. *J Chromatogr* **640**:259–270 (1993).
- Polip I, *Untersuchungen zur Unterbindung von Buttersaeuregaerung und Clostridienaktivitaet in Silagen aus nitratarem Gruenfutter*. Dissertation, Humboldt-Universitaet, Berlin (2001).
- Weiss K, *Gaerungsverlauf und Gaerqualitaet von Silagen aus nitratarem Gruenfutter*. Dissertation, Humboldt-Universitaet, Berlin (2000).
- Weissbach F, *Grundlagen und Praxis der Produktion guter Grassilagen*, 8. Alpenlaendisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, pp. 1–5 (2002).
- Simpson WJ, *Molecular structure and antibacterial function of hop resin materials*. PhD thesis, Council for National Academic Awards, London (1991).
- Emerstorfer F, Kneifel W and Hein W, The role of plant-based antimicrobials in food and feed production with special regard to silage fermentation. *Die Bodenkultur* **60**:55–65 (2009).
- Knorr F and Kremkow C, *Chemie und Technologie des Hopfens*. Verlag Hans Carl, Nuremberg, pp. 83–84 (1972).
- Sakamoto K and Konings WN, Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int J Food Microbiol* **89**:105–124 (2003).
- Suzuki K, Iijima K, Sakamoto K, Sami M and Yamashita H, A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *J Inst Brew* **112**:173–191 (2006).
- Sakamoto K, van Veen HW, Saito H, Kobayashi H and Konings WN, Membrane-bound ATPase contributes to hop resistance of *Lactobacillus brevis*. *Appl Environ Microbiol* **68**:5374–5378 (2002).
- Behr J, Gaenzle MG and Vogel RF, Characterization of highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl Environ Microbiol* **72**:6483–6492 (2006).

Chapter five

Application of plant-based antimicrobials for the growth inhibition of clostridia in grass silage.

Florian Emerstorfer, Walter Hein, Reinhard Resch, Erich M. Poetsch and Wolfgang Kneifel

Unpublished manuscript (2011)

Application of Plant-based Antimicrobials for the Growth Inhibition of Clostridia in Grass Silage

F. EMERSTORFER, W. HEIN, R. RESCH, E. M. POETSCH, W. KNEIFEL

ABSTRACT

BACKGROUND: In this study, the inhibitory effect of hop beta acids on the growth of clostridia in soil-contaminated grass silages was investigated. Hop beta acids are natural substances, which have displayed anticlostridial effects in soil-contaminated pressed pulp silage from sugar beet at low concentrations. Fresh grass material was mixed with soil to artificially contaminate it with clostridia. Laboratory silos were filled with the substrate, stored at 25°C and opened for sampling at 0, 30, 60, and 90 days. The impact on clostridial growth during silage fermentation was monitored by the determination of the pH-value, dry matter content, chemical analysis of the fermentation products and microbial composition. Throughout the experiments, the effect of a commercial silage inoculant based on lactic acid bacteria (LAB) was examined with and without the combination of plant-based antimicrobials.

RESULTS: Results indicate that in silage samples without any additives high butyric acid concentrations occurred due to clostridial growth. This spoilage could be suppressed by the application of LAB, but not with pure hop beta acids. However, the combined application of LAB and hop beta acids improved silage quality, which was reflected by favourable organic acid composition.

CONCLUSIONS: The experimental data indicates that the application of hop beta acids supports the effect of LAB for clostridial growth inhibition and thus demonstrates potential for the combined use of plant-based antimicrobials and LAB in grass silages.

Keywords: antimicrobials, silage spoilage, hop beta acids, clostridia, butyric acid;

INTRODUCTION

Plant-based antimicrobials were introduced to the sugar industry during the 1990s and are regarded as natural alternatives to commonly used biocidal substances, such as formaldehyde.^{1,2} Hop beta acids, rosin acids and myristic acid were found to be suitable applications for combatting thermophilic bacteria in the extraction area of the sugar production process, as they are well known for their antimicrobial effect and also their proven safe history throughout the food industry.³⁻⁷ Following residual studies, it was discovered that the major proportion of the substances applied in the extraction area finally ends up in the pressed beet pulp.^{8,9} In 1999, authors assumed positive effects linked to the substance-remnants in the pressed pulp, as inhibition of unwanted groups of microorganisms in the course of ensiling was reported.¹⁰ Owing to this, own in-depth studies were started in 2005 to examine the potential of the plant-based antimicrobials for the field of silage production, as it has become evident that clostridia are sensitive against these substances owing to their specific cell wall structure.¹¹⁻¹⁴

Aside from yeasts and moulds, clostridia are among the most important spoilage microorganisms in silage fermentation, especially in the field of grass silage.¹⁵ During the ensiling process, these bacteria are usually inhibited by intense lactic acid fermentation, which causes a rapid pH-decrease in the silage. However, under practical conditions, the raw material used for ensiling is frequently of insufficient quality: soil-contamination during harvesting, low initial cell counts of lactic acid bacteria (LAB), low dry matter and sugar content accompanied with high buffering capacity and the lack of inhibitory substances often lead to delayed pH-reduction and instable conditions during fermentation. Consequently, clostridia can proliferate and induce microbial spoilage of the silage.¹⁶ As a consequence, countermeasure strategies were developed to minimize the risk of silage spoilage by secondary fermentation. Scientific progress aided in a better understanding of microbial fermentation processes during ensiling, thus enabling farmers to optimize their ensiling management.^{17,18} Additionally, various silage additives were developed to support the preservation process and to inhibit undesired microorganisms. Organic acids and neutral salt-mixtures were applied to restrict the total extent of fermentation and to lower the pH-value, directly at the beginning of the ensiling process, to inhibitory levels for clostridial growth. Depending on the achieved pH-value, salt mixtures additionally exert an antimicrobial effect which

originates from the undissociated proportion of the acid. With a decrease in pH, additives containing nitrite form nitrous gases. These compounds have a strong inhibitory effect on clostridia.¹⁹ However, the application of these products bears some disadvantages including aggressiveness, promotion of corrosion of equipment and may also be potentially hazardous for the user. As an alternative, biological inoculants have been increasingly introduced. The application of lyophilised starter cultures ensures a high initial number of LAB and therefore supports accelerated acidification through the conversion of plant sugars to organic acids during the early stages of fermentation. Concomitantly, the pH decreases to inhibitory levels for clostridia and many pathogens. Lactic acid starters can also be combined with other supplements to achieve a further drop in pH, for example with enzymes or molasses, which are added to increase the availability of fermentable substrate for the bacteria.²⁰ In the last years, several authors have adopted this kind of a “two track strategy” for clostridial growth inhibition by using LAB and inhibitory substances at the same time.²¹⁻²⁵ Own ensiling experiments with soil-contaminated pressed pulp from sugar beet showed reduced butyric acid formation upon application of the hop beta acids. Further improvements, with respect to organic acid composition and clostridial growth inhibition, were achieved when hop beta acids and LAB were applied in tandem.²⁶ Consequently, the present study was carried out to evaluate the potential of a silage additive based on LAB and hop beta acids for clostridial growth inhibition in the field of grass silage production.

EXPERIMENTAL

Soil for contamination

Clostridial contamination was achieved by admixing defined portions of soil to the grass. The soil material was collected from the premises of the sugar factory, in Tulln (Austria), several weeks prior to the trial and carefully dried in a drying oven at 50°C. Subsequently, the material was sieved to render a fine structure suitable for proper mixing.

Silage preparation

Silages were prepared with grass of the third cut, which was harvested on 12th August 2008 at 11 o'clock during humid conditions on a meadow at AREC Raumberg-Gumpenstein in Styria, Austria. After a wilting period of 2 hours, the grass was chopped to 2 – 4 cm length using a laboratory-scale cutter (System Weiherstephan, Bavarian Institute for Agricultural Engineering and Animal Husbandry, Freising-Weiherstephan, Germany), then sampled and used for silage preparation. Grass samples were sealed in plastic bags and stored in a freezer for subsequent chemical and microbial investigation. Samples for clostridia and LAB determination were prepared using anaerobic sealing and storage (GENbag with clip seals bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The mixing of plant material and silage additives was done in a conventional concrete mixer. Firstly, soil with clostridial contaminants was added to the grass (6.25 g per kg fresh matter). Afterwards, silage additives and plant antimicrobial solutions were sprayed onto the grass by means of sprayer bottles (15 g per kg fresh matter). For the combined treatments, the plant antimicrobial solutions and LAB were mixed prior to application. The lactic acid bacterial additive used was Bonsilage forte (Bf), a commercial silage inoculant. Bf was applied with and without the combination of hop beta acids (HBA). For reference purposes, formic acid (FA) was used as a standard silage additive. The treated materials were then placed in 1 L glass jars containing 500 g grass in each. After anaerobic sealing, the glass jars were weighed and stored in a climatic chamber for 90 days at 25°C. For monitoring the fermentation process in the laboratory silos, triplicate glass jars per treatment were weighed, opened, blended and mixed for analysis at time 0, 30, 60 and 90 days after ensiling. A total of 8 treatment combinations were prepared in the experiment (Table 1).

Table 1: Treatment combinations prepared in the silage experiment

Treatments	Abbreviations
1 Grass	UG
2 Soil-contaminated grass	SCG
3 Soil-contaminated grass + formic acid	SCG + FA
4 Soil-contaminated grass + Bonsilage forte	SCG + Bf
5 Soil-contaminated grass + Bonsilage forte + 50 ppm hop beta acids	SCG + Bf + 50 HBA
6 Soil-contaminated grass + 50 % Bonsilage forte + 50 ppm hop beta acids	SCG + 1/2 Bf + 50 HBA
7 Soil-contaminated grass + 50 % Bonsilage forte + 100 ppm hop beta acids	SCG + 1/2 Bf + 100 HBA
8 Soil-contaminated grass + 50 ppm hop beta acids	SCG + 50 HBA

Antimicrobial plant components and silage additives

Silage additives were prepared and used according to the recommendations of the producers. BetaStab 10A[®], produced by BetaTec GmbH (Nuremberg, Germany), was provided by Zuckerforschung Tulln GmbH: an aqueous, alkaline solution (pH 10.0 – 11.5) containing approx. 10 % (w/w) of a mixture of resins and resin acids of hops, with the principle component being HBA (lupulone). Bonsilage forte (Bf) is a mixture of homofermentative LAB: *Pediococcus acidilactici*, DSM 16243; *Lactobacillus paracasei*, DSM 16245; *Lactococcus lactis*, NCIMB 30160 (H. Wilhelm Schaumann GmbH & Co KG, Wiener Neudorf, Austria). An aqueous bacterial suspension was prepared to yield approx. 10⁵ CFU (colony forming units) per g fresh matter. Formic acid, 85 % (w/w) was applied to achieve a concentration of approx. 0.25 % formic acid on fresh matter.

Analyses

The silage fermentation process was characterised by the determination of silage acids, pH-value and dry matter content at the beginning and after 30, 60, 90 days of ensiling. For fresh plant material and silages, dry matter (DM) was determined by oven drying at 105°C for 48 h. Reducing sugars and sucrose were analysed at the beginning and at the end of the trial by the Luff-Schoorl method according to VDLUFA 7.1.1.²⁷ Crude ash was determined gravimetrically in a muffle type furnace (Nabertherm B150, Nabertherm GmbH, Lilienthal, Germany) at 550°C. Fresh materials and silages (20 g) were macerated in 200 g distilled water in a blender (Mixer AB, Ingenieursfirma Nils Weibull, Malmo, Sweden) for 3 min at 3,000 min⁻¹ and then filtered over filter papers (MN 206, Macherey-Nagel GmbH &

Co. KG, Dueren, Germany) to separate coarse material. The pH of the filtered solution was measured with a glass rod electrode pH-meter (SenTix 81, Inolab Terminal Level 3, WTW GmbH, Weilheim, Germany), then centrifuged at 11,340 x g (MiniSpin, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), filtered through 0.45 µm filter discs (Bulk GHP acrodisc 25 mm syringe filters, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) and pipetted into glass vials (No. 548-0003, VWR International, Vienna, Austria) for subsequent analysis. Silage acids were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) using an Aminex HPX-87H column (300 x 7.8 mm I.D., Biorad Laboratories, Hercules, CA, US). Throughout the chromatographic process, the temperature of the column remained constant at 65°C. A wavelength of 210 nm was used for RI/UV detection of the organic acids (RI-detector Shodex RI-71, Showa Denko KK, Tokyo, Japan; UV/VIS-detector UVD 340U, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA).^{28,29} The mobile phase used was 5 mmol L⁻¹ H₂SO₄ (Fixanal 38290, Honeywell Specialty Chemicals, Seelze, Germany). For standards and sample extracts, the injection volumes were 20 µL, with a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ and a runtime of 30 min. Standards of DL-lactic acid (L1500), propionic acid (81910) and butyric acid (19210) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Absolute ethanol (100983) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Stock solutions (10 g L⁻¹) were prepared in ultra-pure water (Milli-Q water system; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and stored in darkness at 5°C. Total organic acids were calculated by the sum of lactic acid, acetic acid and butyric acid to indicate the progression of fermentation.

Microbial examination was carried out on fresh material at the beginning of the trial as well as in silages after 90 days of storage. 40 g of sample material were filled into stomacher bags with inner bag filter (Seward Medical UAC House, London, UK), to which 360 mL 25% strength Ringer solution (Merck) was added and samples were homogenised using a stomacher (Seward) for 3 minutes. Total aerobic mesophilic viable count (TVC), yeasts and moulds were enumerated on Plate Count Agar (Merck) and MAE Agar (Malt Extract Agar, Merck) using the classical spread plate technique according to VDLUFA M28.1.2.³⁰ The incubation for TVC was carried out aerobically for 48 h at 37°C and for yeasts and moulds for 96 h at 30°C. In the case of unclear results for the latter, incubation time was extended to 120 h. Enterobacteria were enumerated by Koch's pour plate method

on VRB-Agar (Violet Red Bile Agar, Merck) according to VDLUFA M28.1.2.³⁰ The incubation was carried out aerobically for 48 h at 37°C. LAB were enumerated by the plate count technique with reference to VDLUFA M7.9.2³¹, but using MRS-agar (Lactobacillus agar according to De Man, Rogosa, Sharpe) obtained from Merck. The incubation was carried out anaerobically for 72 h at 37°C. The enumeration of clostridial spores was carried out in fresh grass, in grass directly after soil-contamination, and in silages using the most probable number (MPN) method for 72 h at 37°C, according to VDLUFA M7.18.4.³² The incubation was carried out in test tubes using DRCM broth (Differential Reinforced Clostridial Medium, Merck) after pasteurisation (80°C for 10 min). Air exclusion was achieved by using paraffin layers. *Listeria* spp. were determined according to EN 11290 using a VIDAS LDUO Kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The first enrichment was carried out in half-concentrated Fraser broth (Merck) for 24 h at 30°C. The second enrichment was carried out in Fraser broth for 24 h at 30°C. Afterwards, 500 µL were transferred to the test strip with subsequent detection using the automated qualitative ELFA (enzyme-linked immunofluorescent assay ELFA) system (bioMérieux). Positively assessed samples were confirmed on *Listeria monocytogenes* selective Chromogenic Medium (OCLA Agar, Oxoid, Wesel, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

The chemical and microbial composition of fresh grass is presented in Tables 2 and 3. While silage acid concentrations were very low, DM and sucrose concentrations were within the expected range, for the third cut of grass, according to practical experience. Addition of soil to the grass elevated the crude ash content to more than 100 g kg⁻¹ DM, which is a crucial threshold for clostridial contamination in grass silages according to practical experience.³³ While *Listeria* were detected in fresh as well as in soil-contaminated grass, soil-contamination did not yield higher clostridial MPN-counts. Other microbial contaminants were nearly on the same level in both variants.

Table 2: Chemical composition of fresh grass and soil-contaminated grass

Start of trial	Fresh grass	Soil-contaminated grass
pH	5.92	6.01
DM (g kg ⁻¹)	266	271
Lactic Acid (g kg ⁻¹) DM	ND	ND
Acetic Acid (g kg ⁻¹) DM	1.5	1.1
Butyric Acid (g kg ⁻¹) DM	ND	ND
Total Acids (g kg ⁻¹) DM	1.5	1.1
Ethanol (g kg ⁻¹) DM	1.7	1.7
Sugar (g kg ⁻¹) DM	100.0	95.0
Crude ash (g kg ⁻¹) DM	94.0	107.0

Mean values of duplicate analysis. DM = dry matter, Total acids = sum of lactic acid, acetic acid, butyric acid, ND = not detected;

Table 3: Microbial composition of fresh grass and soil-contaminated grass

Start of trial	Fresh grass	Soil-contaminated grass
LAB	2.60E+04	1.30E+05
ASFB-g*	4.30E+02	1.50E+02
ASFB-s**	1.50E+02	2.00E+02
Listeriae	(+)	(+)
Yeasts	<10	<10
Moulds	1.00E+04	1.70E+02
Enterobacteriaceae	5.90E+05	2.10E+05
Total viable count	1.12E+07	1.85E+07

Mean values of duplicate analysis. LAB = lactic acid bacteria, ASFB-g* = anaerobic spore forming bacteria MPNg⁻¹ with gas formation in DRCM medium, ASFB-s** = anaerobic spore forming bacteria MPNg⁻¹ with sulphite reduction of DRCM medium, (+), (-) = verification of contaminant, no quantification;

Silage fermentation

Fermentation characteristics of the silages in the experiment after 30, 60 and 90 days of ensiling are displayed in Tables 4-6. Ensiling of grass (UG) and soil-contaminated grass (SCG) without additives displayed clearly higher pH-values throughout the experiment. Additionally, lactic acid concentrations were much lower compared to the treated variants indicating that the acid was consumed by clostridia and converted into butyric acid. On the other hand, soil-contaminated

grass treated with formic acid (FA) showed the lowest butyric acid concentrations accompanied with high values for lactic acid and total acids after 30, 60 and 90 days of ensiling. Obviously, the decrease of the pH-value by FA treatment protected other organic acids from being further metabolized by the spoilage bacteria. Variants which were added with LAB alone and with LAB in combination with HBA showed the highest lactic acid concentrations after 30 days of ensiling. This indicates that HBA did neither inhibit the growth of LAB nor acidification. However, in the later stages of fermentation lactic acid was increasingly converted into acetic acid. This effect is attributed to heterofermentative LAB originating from the samples at the beginning of the trial, prior to any treatment. A certain proportion of lactic acid is also converted into butyric acid, with the highest values in the variant SCG + $\frac{1}{2}$ Bf + 50 mg kg⁻¹ HBA. Eventually, the accumulation of the weaker organic acids leads to higher pH-values, thus weakening the pH-barrier for clostridial growth. With respect to butyric acid, silages added with the combination of LAB and HBA showed slightly higher concentrations than those with pure use of LAB. However, silages treated with 50% LAB showed better results when used in combination with the higher hop beta acids concentration (100 mg kg⁻¹ HBA). The single use of 50 mg kg⁻¹ HBA had only minimal influence on organic acid composition. In fact, the values for butyric acid after 90 days of ensiling were at a similar level as for UG and SCG. Treatment with 50 mg kg⁻¹ HBA shows delayed acidification and pH-reduction similar to the controls. This means that cell counts of the LAB, which were originally on the grass, were either too low or the LAB were not suitable to achieve a fast acidification and clostridial growth inhibition. HBA alone therefore fail to effectively suppress clostridial growth, unless the plant-based antimicrobials are combined with LAB for parallel lactic acid fermentation and pH-reduction like has previously been shown in soil-contaminated pressed pulp silages.²⁶

Table 4: Fermentation characteristics of treated grass silages after ensiling for 30 days at 25°C

Treatment	pH	DM (gkg ⁻¹)	Lactic Acid	Acetic Acid	Butyric Acid	Total Acids	Ethanol
					(gkg ⁻¹) DM		
UG	5.04	259	12.6	24.2	61.2	98.0	13.7
SCG	5.07	237	10.5	23.5	74.6	108.6	14.9
SCG + FA	4.30	260	70.2	58.3	ND	128.5	15.4
SCG + Bf	4.10	260	118.7	21.0	0.4	140.1	3.6
SCG + Bf + 50 HBA	4.12	243	121.9	22.6	0.7	145.3	3.8
SCG + 1/2 Bf + 50 HBA	4.11	257	117.1	24.2	1.1	142.4	3.8
SCG + 1/2 Bf + 100 HBA	4.11	248	123.5	22.5	0.6	146.6	3.9
SCG + 50 HBA	4.71	252	51.8	23.9	40.5	116.2	5.5

Mean values of duplicate analysis. UG = untreated grass, SCG = soil-contaminated grass, FA = formic acid, Bf = Bonsilage forte, ½ Bf = ½ Bonsilage forte, HBA = hop beta acids, DM = dry matter, Total acids = sum of lactic acid, acetic acid, butyric acid, ND = not detected;

Table 5: Fermentation characteristics of treated grass silages after ensiling for 60 days at 25°C

Treatment	pH	DM (gkg ⁻¹)	Lactic Acid	Acetic Acid	Butyric Acid	Total Acids	Ethanol
					(gkg ⁻¹) DM		
UG	5.14	238	10.4	36.2	66.9	113.5	14.9
SCG	5.14	234	11.9	33.7	70.5	116.1	15.2
SCG + FA	4.41	250	72.6	71.0	1.6	145.2	13.1
SCG + Bf	4.41	235	96.6	57.4	1.9	155.9	5.3
SCG + Bf + 50 HBA	4.42	238	90.9	55.8	5.6	152.2	5.6
SCG + 1/2 Bf + 50 HBA	4.49	251	76.0	61.8	8.5	146.3	6.4
SCG + 1/2 Bf + 100 HBA	4.35	237	106.3	57.0	2.7	165.9	5.3
SCG + 50 HBA	5.07	240	29.2	35.3	59.0	123.4	6.3

Mean values of duplicate analysis. UG = untreated grass, SCG = soil-contaminated grass, FA = formic acid, Bf = Bonsilage forte, ½ Bf = ½ Bonsilage forte, HBA = hop beta acids, DM = dry matter, Total acids = sum of lactic acid, acetic acid, butyric acid, ND = not detected;

Table 6: Fermentation characteristics of treated grass silages after ensiling for 90 days at 25°C

Treatment	pH	DM (gkg ⁻¹)	Lactic Acid	Acetic Acid	Butyric Acid (gkg ⁻¹) DM	Total Acids	Ethanol
UG	5.01	263	11.7	38.9	70.4	121.0	15.2
SCG	5.13	242	6.8	34.7	82.6	124.1	15.6
SCG + FA	4.40	254	77.6	79.2	ND	156.8	11.1
SCG + Bf	4.54	246	61.2	77.9	3.0	142.1	9.2
SCG + Bf + 50 HBA	4.52	238	67.8	75.0	6.1	149.8	9.6
SCG + 1/2 Bf + 50 HBA	4.62	257	61.0	77.8	12.9	151.7	9.4
SCG + 1/2 Bf + 100 HBA	4.51	247	78.8	71.8	6.1	156.7	8.5
SCG + 50 HBA	4.94	249	27.0	41.8	65.6	134.3	6.7

Mean values of duplicate analysis. UG = untreated grass, SCG = soil-contaminated grass, FA = formic acid, Bf = Bonsilage forte, ½ Bf = ½ Bonsilage forte, HBA = hop beta acids, DM = dry matter, Total acids = sum of lactic acid, acetic acid, butyric acid, ND = not detected;

Table 7 presents the microbial composition of the silages after 90 days of ensiling. LAB counts were found to be very similar in all silages and also did not differ significantly compared to the level detected at the onset of the trial. Generally, differences between the variants with regard to clostridial spore counts and other microbial contaminants are only marginally pronounced. Even the controls with high butyric acid concentrations did not show high MPN-counts of clostridial spores at the end of the experiment. This has also been found in other studies, where several authors have discussed the problem of a low correlation between butyric acid concentration and clostridial endospore counts in silages.^{34,35} In fact, the mechanism of sporulation in silage is not yet fully understood. However, high butyric acid concentrations are clearly associated with silage spoilage through clostridial growth.³⁶ Consequently, these bacteria need to be avoided in animal feeding stuffs as they represent a hygienic threat for the animals.³⁷ Moreover, clostridia are well-known high-risk contaminants in the dairy industry impairing the quality of several dairy products. *Clostridium tyrobutyricum* is known to cause the so-called late blowing of hard cheeses, a process that deforms the cheese and imparts an off-flavour to the product.^{38,39} As a result, some countries with considerable hard cheese production prohibited or discouraged the feeding of dairy cows on silage.⁴⁰ Other countermeasures, such as milk pre-treatment to separate the contaminants can help to minimize the problem but are expensive and decrease milk quality for further processing.

At the end of the experiment, yeasts and moulds were represented only by low cell counts. Compared to the start of the experiment, the number of these contaminants heavily decreased during silage fermentation. *Listeria* were found in the grass at the beginning, but not in any of the silages after 90 days of ensiling, which indicates that the bacteria were successfully inactivated by the fermentation process. Also, numbers for total viable count decreased during the experiment and were only detectable at moderate levels in all silages after 90 days of ensiling.

Table 7: Microbial composition of treated grass silages after ensiling for 90 days at 25°C

Treatment	LAB	ASFB-g*	ASFB-s**	Listeriae	Yeasts	Moulds	EB	TVC
UG	1.00E+05	4.20E+02	3.60E+01	(-)	<10	2.00E+01	<10	1.28E+04
SCG	4.00E+05	3.30E+02	1.50E+03	(-)	<10	5.00E+01	<10	3.02E+04
SCG + FA	1.10E+05	4.20E+02	9.20E+01	(-)	<10	2.80E+02	<10	2.31E+04
SCG + Bf	4.50E+04	3.50E+02	2.80E+02	(-)	<10	1.10E+02	<10	1.05E+04
SCG + Bf + 50 HBA	2.00E+04	2.10E+04	2.10E+02	(-)	<10	4.00E+01	<10	1.66E+04
SCG + 1/2 Bf + 50 HBA	1.60E+05	1.50E+04	2.30E+03	(-)	<10	2.00E+01	<10	1.10E+04
SCG + 1/2 Bf + 100 HBA	1.40E+05	5.80E+01	7.40E+01	(-)	<10	5.00E+01	<10	1.26E+04
SCG + 50 HBA	2.20E+05	1.10E+04	2.90E+02	(-)	<10	5.00E+01	<10	1.21E+04

Mean values of duplicate analysis. UG = untreated grass, SCG = soil-contaminated grass, FA = formic acid, Bf = Bonsilage forte, 1/2 Bf = 1/2 Bonsilage forte, HBA = hop beta acids; ASFB-g* = anaerobic spore forming bacteria MPNg⁻¹ with gas formation in DRCM medium, ASFB-s** = anaerobic spore forming bacteria MPNg⁻¹ with sulphite reduction of DRCM medium, EB = enterobacteriaceae, TVC = total viable count, (+), (-) = verification of contaminant, no quantification;

CONCLUSION

Results from laboratory ensiling experiments with soil-contaminated grass indicate that the single application of hop beta acids induces relatively insignificant inhibitory effects on clostridial growth and butyric acid formation. However, in contrast the combined use of hop beta acids in the range of 50 – 100 mg on fresh matter with lactic acid bacteria significantly improves silage quality with regard to fermentation products.

REFERENCES

- 1 Pollach G, Hein W and Hollaus F, Use of hop products as bacteriostaticum in the sugar industry. *Sugar Industry* **121**: 919-926 (1996).
- 2 Hein W and Pollach G, New findings with the use of hop products in the sugar industry. *Sugar Industry* **122**: 940-949 (1997).
- 3 Narziss L, *Abriss der Bierbrauerei*. 5. ergaenzte Auflage. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, pp. 110-114 (1986).
- 4 Brockmann R, Demmering G, Kreutzer U, Lindemann M, Plachenka J and Steinberner U, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5th edition. VCH-Verlag Weinheim, **Vol. A10**, pp. 245-276 (1987).
- 5 Hornsey I, *The Chemistry and Biology of Winemaking*. 1st edition. RSC-Publishing, Cambridge, pp. 42 (2007).
- 6 Beuchat LR and Golden DA, Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology* **43** (1): 134-142 (1989).
- 7 Soederberg TA, Gref R, Holm S, Elmros T and Hallmans G, Antibacterial activity of rosin and resin acids in vitro. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* **24**: 199-205 (1990).
- 8 Pollach G, Hein W and Roesner G, New findings towards solving microbial problems in sugar factories. *Sugar Industry* **124**: 622-637 (1999).
- 9 Pollach G, Hein W and Beddie D, Application of hop beta acids and rosin acids in the sugar industry. *Sugar Industry* **127**: 921-930 (2002).
- 10 Gudmundson C, Danisco Sugar's experience with hops extracts as alternative for formaldehyde. Presented at the General Assembly of German Sugar Technologists (VDZ). Dresden, ref. in *Sugar Industry* **123**: 456 (1998).

- 11 Simpson WJ, Molecular structure and antibacterial function of hop resin materials. PhD Thesis, Council for National Academic Awards, London, 256 pp. (1991).
- 12 Hein W, Pollach G and Emerstorfer F, 10 years' experience with natural antibacterials within Agrana. *Sugar Industry* **131**: 477-491 (2006).
- 13 Hein W and Emerstorfer F, Verfahren zur Silierung. AT 594 593 B1 (2010).
- 14 Emerstorfer F, Kneifel W and Hein W, The role of plant based antimicrobials in food and feed production with special regard to silage fermentation. *Die Bodenkultur* **60** (3): 55-65 (2009).
- 15 McDonald P, Henderson AR and Heroen SJE, *The Biochemistry of Silage*. 2nd edition. Chalcombe Publications, Aberystwyth, pp. 108-122 (1991).
- 16 DLG (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft), *Praxishandbuch Futterkonservierung*. 7. Auflage. DLG-Verlag, Frankfurt (Main), pp. 15-20, 257 (2006).
- 17 Weissbach F, Grundlagen und Praxis der Produktion guter Grassilagen. 8. Alpenlaendisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, pp. 1-5 (2002).
- 18 Wilkinson JM, *Silage*. 1st edition. Chalcombe Publications; Lincoln, United Kingdom, pp. 1-40 (2005).
- 19 Lueck E, *Chemische Lebensmittelkonservierung: Stoffe, Wirkungen, Methoden*. 2. Auflage. Springer-Verlag, New York Heidelberg Berlin Tokyo, pp. 82-87 (1985).
- 20 Thaysen J, Honig H, Kalzendorf C, Spiekers H and Staudacher W: Siliermittel: Rechtliche Rahmenbedingungen, Wirksamkeit DLG-gepruefter Produkte und Einsatzempfehlungen. *Uebers Tierernaehrg* **35**: 55-91 (2007).

- 21 Kramer W, Neue Entwicklungen und Strategien im Bereich der Silierzusaetze. 8. Alpenlaendisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, pp. 27-30 (2002).

- 22 Czech E, Effekt von Milchsaeurebakterien-Isolaten auf die Unterdrueckung von Clostridien in Silagen. Dissertation. Universitaet fuer Bodenkultur, Wien, 183 pp. (2003).

- 23 Flythe MD and Russell JB, The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. *FEMS Microbiol Ecol* **47**, 215-222 (2004).

- 24 Tuerk B, Einfluss verschiedener Kultivierungsbedingungen und Hemmstoffe auf die Entwicklung der vegetativen Zellen und Sporen von *Clostridium butyricum*, *C. sporogenes* und *C. tyrobutyricum*. Dissertation. Universitaet fuer Bodenkultur, Wien, 89 pp. (2005).

- 25 Bureenok S, Namihira T, Mizumachi S, Kawamoto Y and Nakada T, The effect of epiphytic lactic acid bacteria with or without different byproduct from defatted rice bran and green tea waste on napiergrass (*Pennisetum purpureum* Shumach) silage fermentation. *J Sci Food Agric* **86**: 1073-1077 (2006).

- 26 Emerstorfer F, Hein W, Resch R, Poetsch EM, Zitz U and Kneifel W, Application of plant-based antimicrobials for the growth inhibition of clostridia in pressed beet pulp silage. *J Sci Food Agric* in press (2011).

- 27 VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), *Die chemische Untersuchung von Futtermitteln Methodenbuch Band III, 7.1.1. 1. Ergaenzung*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt (1983).

- 28 Canale A, Valente ME and Ciotti A, Determination of volatile carboxylic acids (C₁-C_{5i}) and lactic acid in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. *J Sci Food Agric* **35**:1178-1182 (1984).
- 29 Kubadinow N, Zur Bestimmung von organischen Saeuren in Pressschnitzelsilagen. *Zuckerindustrie* **107**: 1107-1110 (1982).
- 30 VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), *Die chemische Untersuchung von Futtermitteln Methodenbuch Band III, M28.1.2. 7. Ergaenzung*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt (2007).
- 31 VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), *Chemische, physikalische und mikrobiologische Untersuchungsverfahren fuer Milch, Milchprodukte und Molkereihilfsstoffe Methodenbuch Band VI, M7.9.2. 6. Ergaenzung*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt (2003).
- 32 VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), *Chemische, physikalische und mikrobiologische Untersuchungsverfahren fuer Milch, Milchprodukte und Molkereihilfsstoffe Methodenbuch Band VI, M7.18.4. 6. Ergaenzung*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt (2003).
- 33 Poetsch EM, Resch R and Buchgraber K, Forage conservation in mountainous regions – results of the Austrian silage monitoring project. 14th International Symposium “Forage Conservation”. Brno, Czech Republic, pp. 4-11 (2010).
- 34 Polip I, Untersuchungen zur Unterbindung von Buttersaeuregaerung und Clostridienaktivitaet in Silagen aus nitratarmem Gruenfutter. Dissertation, Humboldt-Universitaet zu Berlin, 127 pp. (2001).

- 35 Weiss K, Gaerungsverlauf und Gaerqualitaet von Silagen aus nitratarmem Gruenfutter. Dissertation, Humboldt-Universitaet zu Berlin, 159 pp. (2000).
- 36 Adler A, Qualitaet von Futterkonserven und mikrobielle Kontamination. 8. Alpenlaendisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, pp. 17-25 (2002).
- 37 Driehuis F and Oude Elferink SJWH, The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet Q* **22**: 212-216 (2000).
- 38 Robinson RK and RA Wilbey, *Cheesemaking Practice*. 3rd edition, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, pp. 68-80, 296 (1998).
- 39 Ernst J, Buttersaeureblaehung – noch immer aktuell. Diskussionsgruppen Emmentaler, Agroscope Liebefeld-Posieux, Eidgenoessische Forschungsanstalt fuer Nutztiere und Milchwirtschaft – ALP, Bern, 18 pp. (2005).
- 40 Wilkinson JM and Toivonen MI, *World Silage – a Survey of Forage Conservation around the World*. Chalcombe Publications; Lincoln, United Kingdom, pp. 17-20 (2003)

DISCUSSION OF RESULTS

This doctoral thesis was undertaken with the aim to determine new fields of application for plant-based antimicrobials (hop β -acids and rosin acids), which have been successfully marketed for combating bacterial infections in sugar production for many years ([Chapter 1](#)). Derived from a successful licensing model established within the sugar industry, together with a partner company from the hop sector, one goal was that such a potential field of application should ideally be protectable via patent applications. Additionally, it should be viable from an economic point of view, in order to raise financial income through the marketing of the resulting commercial products.

The starting points for investigations in the direction of silage production were findings, which indicated inhibitory effects of the aforementioned substances on clostridial growth and observations, that substance remnants in pressed sugar beet pulp did not negatively affect subsequent ensiling. Consequently, it was evident to take a step forward and to systematically investigate the potential of the compounds for the field of silage production.

When the minimum inhibitory concentration (MIC) of the chosen substances on a range of microorganisms relevant in silage production was investigated, the whole range of antimicrobials (hop β -acids, rosin acids, myristic acid) used in the sugar industry was included ([Chapter 2](#)). At this stage, results for rosin acids proved to be more promising than those for hop β -acids, because with rosin acids there was a larger difference between the MIC of lactic acid bacteria and clostridia. Contrary to that, the MICs of β -acids against both groups of bacteria were almost on the same level and thus it was unclear whether the substances would interfere with lactic acid fermentation, which is necessary for pH decrease and silage preservation.

However, there were additional factors to be considered: Concerning the patent application ([Chapter 3](#)), components of rosin acids (for example abietic acid) had already been mentioned in the context of ensiling. As a consequence, this would have prevented a successful patent grant. Additionally, hop extracts were found to be approved as feed additives within the EU, while rosin acids were not. Thus, it seemed favourable to focus on the use of hop β -acids, and consider rosin acids only in form of combined applications with β -acids ([Appendix 1 & 2](#)). Hop acids, however, had never been suggested for their use in silage fermentation, obviously

because the products are well known to inhibit Gram-positive bacteria in general and this was thought to be also applicable to lactic acid bacteria.

Yet, another aspect appeared to be a possible remedy in the anticipated problem with hop β -acid application in silage production. There was the experience from the sugar industry that during prolonged application of β -acids in the extraction area, bacteria became unsusceptible and were able to grow in the presence of hop compounds. Thus, in order to achieve sustained bacterial inhibition, β -acid concentrations needed to be gradually increased for suppressing such adapted microorganisms. While in the year 2000 this fact was the original reason for devoting further research activities to the subsequent development of other plant-based antimicrobials (rosin acids, myristic acid) for the sugar industry, it induced an important idea in the current situation, which was also supported by literature findings from the brewing sector. In brewing, hop resistance in lactic acid bacteria is a major problem regarding beer spoilage. Consequently, extensive scientific studies were performed, which elucidated the phenomenon of hop resistance, thus identifying several resistance mechanisms in lactic acid bacteria. Owing to this point of view, it seemed very promising to assess the effect of the combined use of hop-resistant lactic acid bacteria and hop β -acids for an enhanced suppression of clostridial growth. After a series of pre-trials, the effect of the combined application of hop-resistant and other LAB together with β -acids was systematically investigated in soil-contaminated pressed sugar beet pulp. Interestingly, positive effects with regard to organic acid composition and silage preservation were found not only for hop-resistant lactic acid bacteria, but also for a commercial silage starter culture ([Chapter 4; Appendix 3](#)). Obviously, the starter culture contained one or more bacterial strains with pronounced hop resistance. In view of these results it was concluded that β -acids can fortify the preservation effect of LAB due to their direct inhibitory action on clostridia, which do neither bear nor develop hop-resistance mechanisms.

However, without fast acidification and subsequent pH reduction caused by lactic acid bacteria hop β -acids only have a limited effect ([Chapter 5](#)). In ensiling trials with soil-contaminated grass, it was observed that hop β -acids retard clostridial growth in the starting phase, but cannot sustainably suppress the spoilage bacteria without concomitant pH reduction provided by lactic acid bacterial activity.

CONCLUSION AND OUTLOOK

Based on the results obtained in this study it can be concluded that hop β -acids exhibit a strong inhibitory effect on clostridial growth *in vitro*. Within the field of silage production, the substances may be used to enhance the preservative effect of LAB in order to prevent clostridial spoilage. Consequently, the combination of plant-based antimicrobials and LAB demonstrates potential as a suitable silage additive to control problems associated with clostridia in silage and a safe alternative to products based on nitrite and hexamethylenetetramine.

Future aspects

There are several aspects which could not be investigated in this study but may be a starting point for further investigations:

- It may be useful to screen for lactic acid bacterial strains relevant in the field of silage production with stronger hop-resistance mechanisms. Thus, it would be possible to apply a combined product with an elevated inhibitory effect on clostridial growth in the ensiling process.
- Aside from hop resistance, a further criterion to screen for among lactic acid bacteria could be the capability to synthesize bacteriocins. Such special characteristics in lactic acid bacteria could help to establish another hurdle against clostridial growth in addition to those already applied in silage production.
- The mode of action of hop acids on susceptible bacterial cells has already been explained for lactic acid bacteria on a cellular basis. Thus, it would be interesting to investigate the mode of action on clostridia and clarify if these bacteria are capable of developing resistance mechanisms under certain conditions similar to lactic acid bacteria.
- In this thesis, no attempt was made to determine the concentration of residual hop compounds in finished silages, but it can be expected that the concentration of such residuals is on a very low level. In addition, the compounds are approved as feed additives and therefore a negative impact on livestock can be excluded. However, it could be necessary to consider the transfer of hop compounds to milk or meat and the subsequent effect in the processing of these products.

- The concept of the combined use of hop acids and lactic acid bacteria may not be limited to silage production. It could also be applied in other fields, where Gram positive spoilage bacteria or pathogens need to be suppressed.

Appendix one

Application of natural antibacterials in pressed pulp silage production.

Florian Emerstorfer and Walter Hein

Poster Presentation at the 13th International Conference Forage Conservation, Nitra. Proceedings pp. 124-125 (2008)

Application of Natural Antibacterials in Pressed Pulp Silage Production

EMERSTORFER F. and HEIN W.

Zuckerforschung Tulln Ges.m.b.H.

During the application of natural antibacterials - products based on hop components, tree resins and fatty acids - used in the extraction area of sugar factories, it was observed that these substances are effective against clostridia in very low concentrations. With suitable dosage applications it was possible to suppress a clostridia infection without negatively affecting the favoured flora of lactic acid bacteria. These results led to first considerations to apply natural antibacterials for preventing silage spoilage, especially caused by clostridia.

The **aim of the study** was to develop a laboratory model to determine the effectiveness of natural antibacterials against clostridia in pressed beet pulp silage in order to evaluate the general potential of the substances in the field of silage production.

MATERIALS AND METHODS

Carrying out of trials

For the laboratory trials pressed pulp was collected during the 2006 campaign in Tulln and stored in a deep freezer. The application of soil, natural antibacterials and commercial silage additives (by means of a sprayer) and, for some variants, carbonate, was done in a concrete mixer. After careful mixing the treated material was transferred into 1 L glass jars and incubated at 25 °C. Samples were taken after 0, 2, 7, 14, 30, 60 and 90 days and analysed for the parameters: dry matter, pH and organic acids by means of HPLC.

Investigated substances

50:50 mixture of hop beta acids & rosin acids ("natural antibacterials": Zuckerforschung Tulln GmbH, A- Tulln)
Silage additives [applied according to the recommendations of the producer]

- LagroSil pH Granulat: mixture of lactic acid bacteria (Garant Tierernährung GesmbH, A- Pöchlarn)
- Bonsilage Forte Flüssig: mixture of lactic acid bacteria (H. Wilhelm Schaumann GmbH & Co KG, A- Brunn am Gebirge)

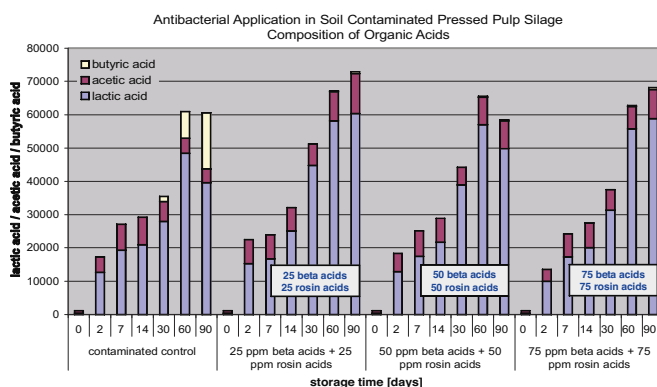


Fig. 1: Content of organic acids [mg/kg DM] in soil contaminated pressed pulp silage

RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 1 shows lactic acid, acetic acid and butyric acid contents in soil contaminated pressed pulp silages to which 50:50 mixtures of hop beta acids and rosin acids (ppm on fresh matter) were applied. Despite rather high butyric acid contents in the control, treated variants are nearly free of butyric acid.

Fig. 2 depicts the content of organic acids in soil contaminated pressed pulp silages to which natural antibacterials and commercial silage additives (with known effectiveness against clostridia) were applied. The silages were additionally treated with carbonate (1 % on dry substance) for pH buffering. The control contains large amounts of butyric acid, also variants treated with LAB silage starters. Natural antibacterial treated variants limited butyric acid formation and clostridia growth.

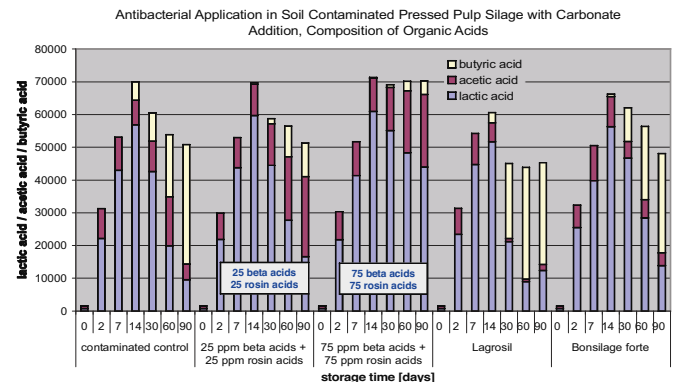


Fig. 2: Content of organic acids [mg/kg DM] in soil contaminated and carbonate buffered pressed pulp silage

Fig. 3 shows the content of organic acids in soil contaminated pressed pulp with carbonate (2 % on fresh matter) addition. Natural antibacterials were combined with silage starters, reducing the commercial products to 50 % of the recommended dosage. Results indicate that clostridia growth has taken place, mostly in the control but also in the variants with 50 % use of the silage starters. On the other hand, the combined use of 50 % of the silage starter cultures and natural antibacterials showed reduced contents of butyric acid indicating suppressed clostridia growth.

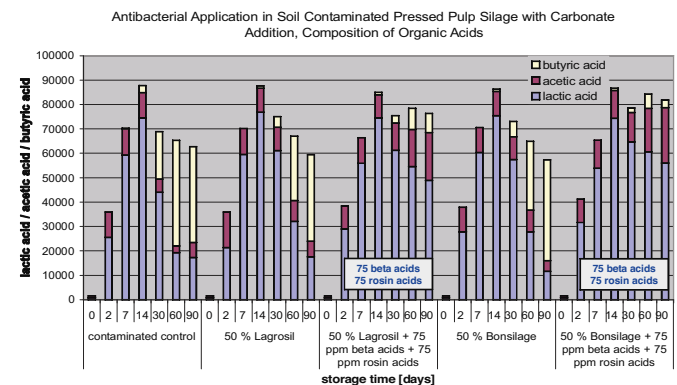


Fig. 3: Content of organic acids [mg/kg DM] in soil contaminated and carbonate buffered pressed pulp silage

OUTCOME AND FUTURE ASPECTS

The outcome of the experiments indicates that additions of natural antibacterials to soil contaminated laboratory silages result in drastically lowered butyric acid contents compared to untreated silages. On the other hand, the fermentation activity of lactic acid bacteria was not restricted. Based on these results so far, it can be concluded that natural antibacterials support a rapid drop in pH for silage conservation parallel to a selective growth-inhibition of clostridia. Further test series also indicate equal effectiveness to commercial silage starter products and even support their efficacy. Due to the fact that soil contamination is of special importance in the field of grass silage, and particularly in the field of organic farming, a strong potential is seen in this field.

APPLICATION OF NATURAL ANTIBACTERIALS IN PRESSED PULP SILAGE PRODUCTION

EMERSTORFER, F., HEIN, W.

Zuckerforschung Tulln Ges.m.b.H, Josef-Reither-Strasse 21-23, A-3430 Tulln, Tel: +43-2272-602-11434, E-mail: florian.emerstorfer@zuckerforschung.at

ABSTRACT

During the application of natural antibacterials – products based on hop components, tree resins and fatty acids – in the extraction area of sugar factories, it was observed that these substances are effective against clostridia in very low concentrations. These findings led to considerations to apply natural antibacterials for preventing silage spoilage caused by clostridia. In systematic laboratory test series with pressed pulp and grass, the plant material was contaminated with clostridia by soil addition. The outcome was that additions of natural antibacterials to contaminated laboratory silages result in drastically lowered butyric acid contents compared to untreated silages. On the other hand, the activity of lactic acid bacteria was not restricted. Based on these results it can be concluded that natural antibacterials support a rapid drop in pH for silage conservation parallel to a selective growth-inhibition of clostridia.

INTRODUCTION

During the application of natural antibacterials – products based on hop components, tree resins and fatty acids – used in the extraction area of sugar factories, it was observed that these substances are effective against clostridia in very low concentrations. With suitable dosage applications it was possible to suppress a clostridia infection without negatively affecting the favoured flora of lactic acid bacteria (Pollach et al, 2002, Hein et al, 2006). These results led to first considerations to apply natural antibacterials for preventing silage spoilage, especially caused by clostridia (DLG, 2006).

The aim of the study was to develop a laboratory model to determine the effectiveness of natural antibacterials against clostridia in pressed beet pulp silage in order to evaluate the general potential of the substances in the field of silage production.

MATERIALS AND METHODS

For the laboratory trials pressed pulp was collected during the 2006 campaign in Tulln and stored in a deep freezer. The application of soil, natural antibacterials and commercial silage additives (by means of a sprayer) and, for some variants, carbonate, was done in a concrete mixer. After careful mixing the treated material was transferred into 1 L glass jars and incubated at 25 °C. Variants were prepared in duplets for every sampling date. Samples were taken after 0, 2, 7, 14, 30, 60 and 90 days and analysed for the parameters dry matter, pH and organic acids by means of HPLC. Sampling was performed in duplets from every glass jar for a specific incubation time. Mean values in the figures are based on 4 single-values of two glass jars of each variant at a specific incubation time and are calculated on dry matter. Standard error for pH-determinations is ± 1 %, for HPLC-determinations ± 5 %.

Investigated substances

50:50 mixture of hop beta acids & rosin acids prepared of the following products:

- Hop beta acids: BetaStab 10A (BetaTec Hopfenprodukte GmbH, D - Nuremberg)
- Rosin acids: PileStab 20A (Zuckerforschung Tulln GmbH, A - Tulln)

Silage additives [applied according to the recommendations of the producer]

- LagroSil pH Granulat: mixture of lactic acid bacteria (Garant Tierernährung GesmbH, A - Pöchlarn)
- Bonsilage Forte Flüssig: mixture of lactic acid bacteria (H. Wilhelm Schaumann GmbH & Co KG, A - Brunn am Gebirge)

RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 1 shows lactic acid, acetic acid and butyric acid contents in soil contaminated pressed pulp silages to which 50:50 mixtures of hop beta acids and rosin acids (ppm on fresh matter) were applied. Despite rather high butyric acid contents in the control, treated variants are nearly free of butyric acid. Fig. 2 depicts the content of organic acids in soil contaminated pressed pulp silages to which natural antibacterials and commercial silage additives (one of them with known effectiveness against clostridia) were applied. The silages were additionally treated with carbonate (10 g/kg dry matter) for pH buffering. The control contains large amounts of butyric acid – also variants treated with silage starter cultures show rather high butyric acid contents. Natural antibacterial treated variants limited butyric acid formation and obviously clostridia growth.

CONCLUSION

Additions of natural antibacterials to soil contaminated laboratory silages result in drastically lowered butyric acid contents compared to untreated silages. On the other hand, the fermentation activity of lactic acid bacteria was not

restricted. Based on these results so far, it can be concluded that natural antibacterials support a rapid drop in pH for silage conservation parallel to a selective growth-inhibition of clostridia. Further test series also indicate equal effectiveness to commercial silage starter products. Due to the fact that soil contamination is of special importance in the field of grass silage, and particularly in the field of organic farming, a strong potential is seen in this field.

Figure 1. Content of organic acids in soil contaminated pressed pulp silage

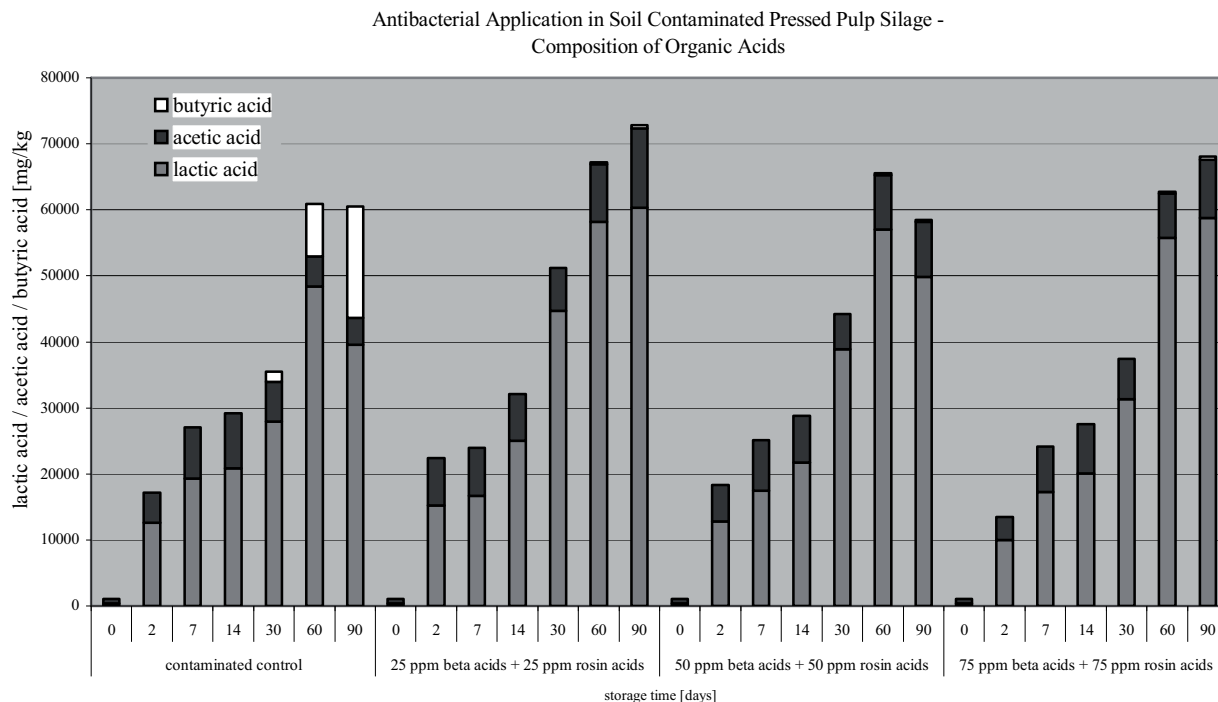
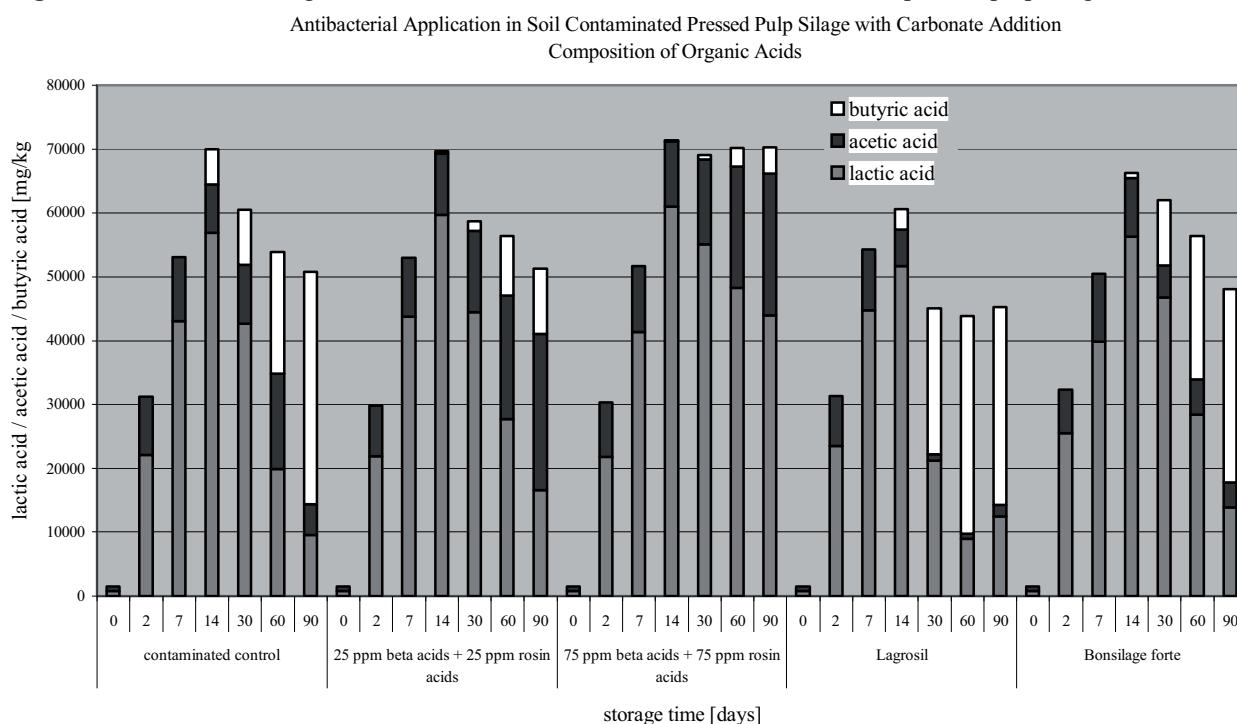


Figure 2. Content of organic acids in soil contaminated and carbonate buffered pressed pulp silage



REFERENCES

- AUTORENKOLLEKTIV (2006): Praxishandbuch Futterkonservierung. [Handbook of forage conservation practice.] DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main, 7. überarbeitete Auflage, 2006.
- HEIN, W., POLLACH, G., EMERSTORFER, F. (2006): 10 years experience with natural antibacterials within Agrana. Zuckerindustrie 131 (2006) Nr. 7, pp. 477-491.
- POLLACH, G., HEIN, W., LEITNER, A., ZÖLLNER, P. (2002): Detection and control of strictly anaerobic, sporeforming bacteria in sugar beet extraction plants. Zuckerindustrie 127 (2002), pp. 530-537.

Appendix two

Harz- und Hopfensäuren als alternative biologische Konservierungsmittel.

Florian Emerstorfer, Walter Hein, Reinhard Resch, Erich M. Poetsch and Wolfgang Kneifel

15. Alpenländisches Expertenforum, Bericht. BAL Gumpenstein, pp. 53-60 (2009)

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 Gärsäuren 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 Clostridienfehlgärungen 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 Irnding

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 Stoffeintrbringung 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 Pressschnitzsilagen 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 Pressschnitzsilagen, vorgenommen. In der Auswertung der Gärssäuren 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 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, Spannring) 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, Gärssäurenspektrum (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 Gärssäurenspektren.

Stresstests in Rübenpressschnitzsilagen 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-

End 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 Silierverslaufs 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 Clostridiensporengelhalt hin untersucht. Die Ergebnisse der Zuckerbestimmungen und Clostridiensporengelhalte 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 Analysenmethoden:

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-/Rispenstadium. 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 Buttersäurefäulnisgärung 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.

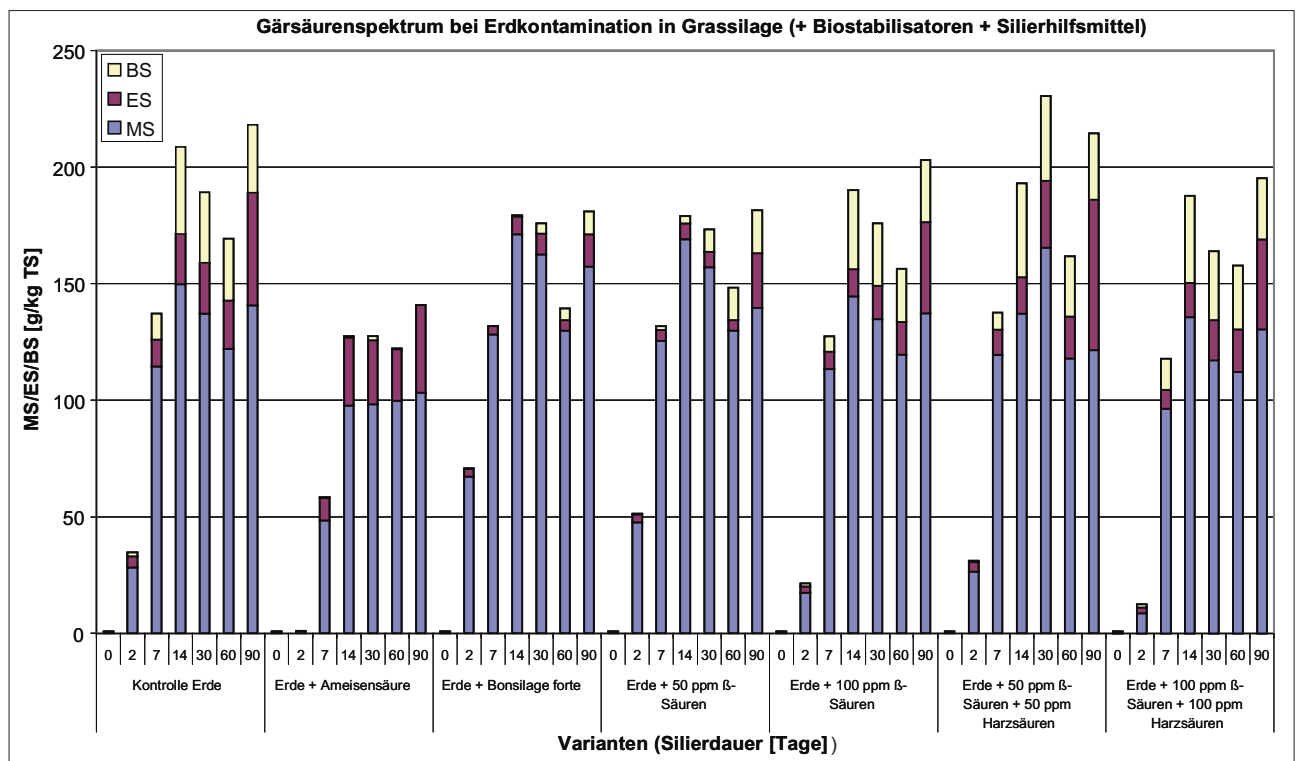


Abbildung 1: Gär säurenmuster von ausgewählten Varianten im Grassilageversuch; BS = Buttersäure, ES = Essigsäure, MS = Milchsäure

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 Gär säuren 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 Rübenpressschnittsilagen mit Clostridien

Abbildung 2 bietet einen ersten optischen Eindruck für ausgewählte Varianten des Pressschnittversuchs 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 Pressschnittversuch weniger Gesamtsäure gebildet.

In Tabelle 2 sind pH-Werte, Trockensubstanzen und die Gär säurezusammensetzung der Varianten des Pressschnittversuchs 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 Gär säurezusammensetzung wider. Im Folgenden soll auf die Buttersäuregehalte als dem wichtigsten Parameter in den Untersuchungen näher eingegangen werden.

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

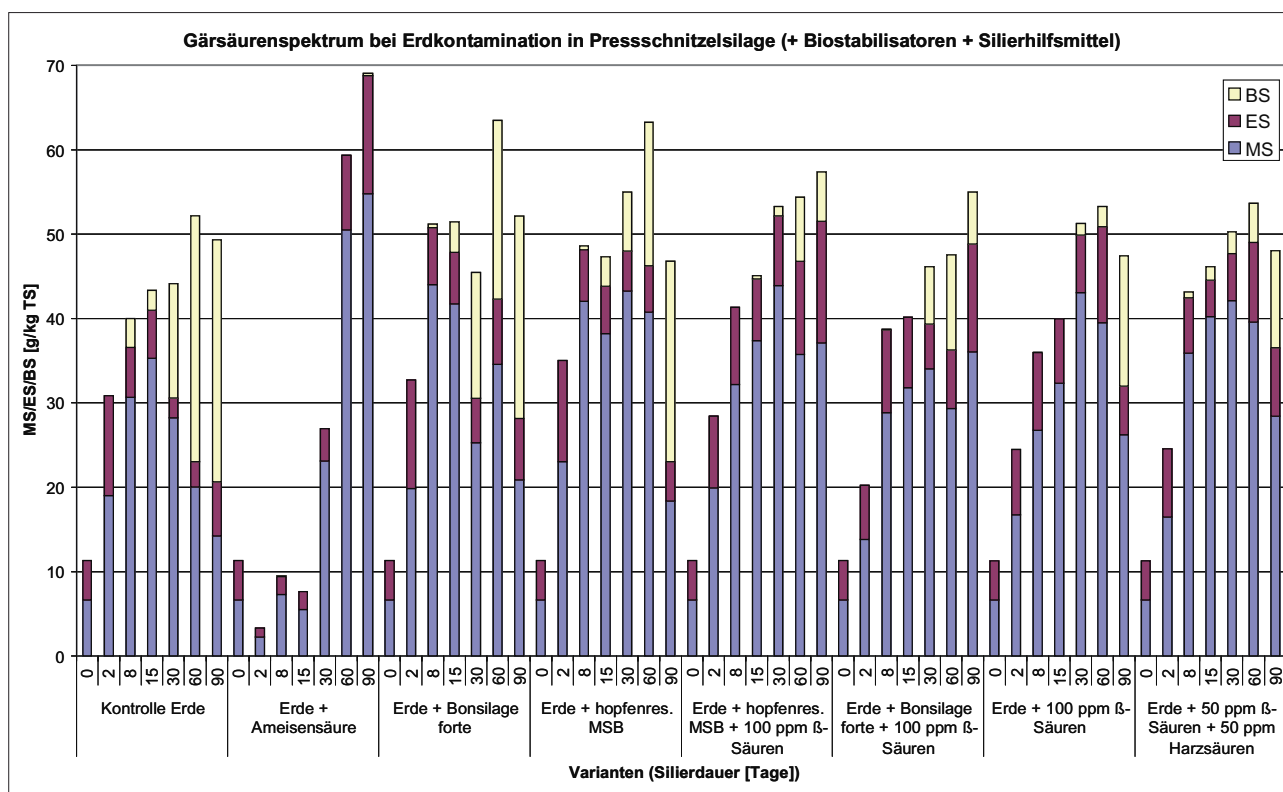


Abbildung 2: Gärssäurenmuster von ausgewählten Varianten im Pressschnitzelversuch; BS = Buttersäure, ES = Essigsäure, MS = Milchsäure

Tabelle 2: Multipler Mittelwertvergleich der Varianten des Pressschnitzelversuchs nach 90 Tagen Silierdauer; Angaben der Gärssäuren 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 ^c	14,90 ^d
5	27,40 ^a	4,23 ^{def}	18,37 ^{ab}	4,63 ^a	23,76 ^c	13,80 ^c
6	27,25 ^a	4,01 ^b	36,33 ^c	13,35 ^{ef}	8,11 ^{bc}	21,51 ^{fg}
7	27,38 ^a	4,00 ^b	37,12 ^c	14,42 ^{fg}	5,82 ^b	25,41 ⁱ
8	27,28 ^a	4,03 ^{bc}	32,00 ^{de}	11,27 ^{de}	9,33 ^{bc}	22,08 ^g
9	27,10 ^a	4,03 ^b	36,05 ^c	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 Futterkonservierung. 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.
- GUDEMUNDSON, C. (1998): Danisco Sugar's experience with hops extracts as alternative for formaldehyde. VZD 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., GREIF, 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.

Appendix three

Application of natural antibacterials in pressed pulp silage production part II: Application of silage additives in organic pressed pulp silage.

Florian Emerstorfer, Barbara Weisseisen and Walter Hein

Poster Presentation at the 72nd IIRB Congress, Copenhagen. Proceedings pp. 116-120 (2010)

In the second organic sugar campaign at AGRANA in 2009 organic sugar beets from Austrian farmers were processed in Hrusovany factory to produce organic sugar. During beet processing low dry matter organic pressed pulp was produced as a by-product. Due to limited dryer capacity, an amount of 500 t of organic pressed pulp was ensiled in round bales added with clover silage. A number of bales were treated with combinations of a commercial silage inoculant and hop beta acids as previous studies had shown good effects for combined natural antibacterial and lactic acid bacteria application. Parallel to that, a systematic laboratory trial was carried out to evaluate changes to quality relevant parameters over the observed time.

The **aim of the study** was to ensile low dry matter organic pressed pulp added with clover silage for raising the protein content. Silage additives were used to enhance lactic acid fermentation and to investigate the potential for further silage quality improvements.

Production of baled silages

28 t of organic pressed pulp were mixed with 1 t of clover silage prior to baling. Silage bales were prepared using an Orkel round baler. Additives were applied by means of a Stihl backpack sprayer on the rubberized belt. Every treatment was prepared in duplicate.

Silage additives [applied according to the recommendations of the producer]

- Bonsilage forte (Bf): mixture of homofermentative lactic acid bacteria
- Hop beta acids (HBA): BetaStab 10A with 10 % (w/w) active ingredient

Treatments

- Organic pressed pulp + clover silage
- Organic pressed pulp + clover silage + Bf
- Organic pressed pulp + clover silage + Bf + 50 ppm HBA
- Organic pressed pulp + clover silage + Bf + 100 ppm HBA

Bales were sampled and analyzed on dry matter, pH-value and volatile fatty acids using HPLC after 5 months of indoor storage.

Results for baled silages

Table 1 displays results for baled silages stored for 5 months. All treatments show well preserved silages with low pH-values, high lactic acid and acetic acid levels, and low butyric acid concentrations. Combined application of hop beta acids and Bonsilage forte resulted in further improvements and complete inhibition of butyric acid formation.

Table 1: Results for baled silage with organic pressed pulp mixed with clover silage and treated with silage additives

Treatment	DM [gkg ⁻¹]	pH	LA [gkg ⁻¹ DM]	AA [gkg ⁻¹ DM]	BA [gkg ⁻¹ DM]	TA [gkg ⁻¹ DM]	EtOH [gkg ⁻¹ DM]
org. PP + CS	17.09	3.96	33.84	62.10	0.59	96.54	20.31
org. PP + CS + Bf	17.74	3.89	55.17	52.72	0.71	108.60	16.77
org. PP + CS + Bf + 50 ppm HBA	18.05	3.91	44.12	53.16	0.00	97.28	19.93
org. PP + CS + Bf + 100 ppm HBA	17.26	4.06	24.33	65.10	0.00	89.43	22.34

Mean values of duplicate analysis. Org. PP = Organic pressed pulp, CS = Clover silage, DM = Dry matter, LA = Lactic acid, AA = Acetic acid, BA = Butyric acid, TA = Total acids (sum of LA + AA + BA), EtOH = Ethanol, Bf = Bonsilage forte, HBA = Hop beta acids;



Figure 1: Production of baled silages

Preparation of laboratory silages

For laboratory silages preparation organic pressed pulp and clover silage were mixed in a concrete mixer in a 28:1 proportion. Afterwards, silage additives were applied using a sprayer bottle. The treated material then was packed into 1 L glass jars and maintained at 25°C in a climatic chamber. 5 replicates of each treatment were opened after 15, 45 and 90 days and analyzed for dry matter, pH-value and volatile fatty acids using HPLC.

Silage additives [applied according to the recommendations of the producer]

- Bonsilage forte (Bf): mixture of homofermentative lactic acid bacteria
- Hop beta acids (HBA): BetaStab 10A with 10 % (w/w) active ingredient

Treatments (prepared in 5 replicates)

- Organic pressed pulp
- Organic pressed pulp + clover silage
- Organic pressed pulp + clover silage + Bf
- Organic pressed pulp + clover silage + Bf + 50 ppm HBA
- Organic pressed pulp + clover silage + Bf + 100 ppm HBA

Results for laboratory silages

Figure 2 displays the progression of organic acid concentrations in laboratory silages over the observed time. Silages without hop beta acids addition show moderate butyric acid concentrations in the later stages of fermentation. In contrast to that, combined Bonsilage forte and hop beta acids application exhibits practically complete suppression of butyric acid formation.

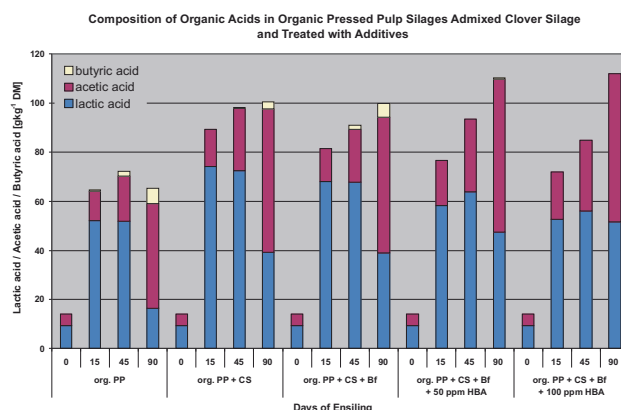


Figure 2: Progression of organic acid concentrations in treated laboratory silages

Results for laboratory silages after 90 days of ensiling are shown in Table 2. Data were analyzed using one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) Test with $P < 0.05$ to determine significant differences of means between treatments. These analyses were performed using Statgraphics plus, version 5.0.

Table 2: Fermentation characteristics of treated laboratory silages after 90 days of ensiling

Treatment	DM [gkg ⁻¹]	SD	pH	SD	LA [gkg ⁻¹ DM]	SD	AA [gkg ⁻¹ DM]	SD	BA [gkg ⁻¹ DM]	SD	TA [gkg ⁻¹ DM]	SD	EtOH [gkg ⁻¹ DM]	SD
org. PP	16.94 ^a	0.37	4.17 ^b	0.04	16.32 ^a	3.06	42.61 ^a	2.28	6.46 ^c	3.00	65.39 ^a	3.07	19.67 ^b	0.55
org. PP + CS	16.97 ^a	0.28	3.92 ^a	0.03	39.05 ^b	3.87	58.62 ^b	6.21	2.94 ^{abc}	2.79	100.61 ^b	8.38	14.17 ^a	0.81
org. PP + CS + Bf	16.62 ^a	0.13	3.91 ^a	0.05	38.79 ^b	5.12	55.40 ^b	4.88	5.60 ^{bc}	4.55	99.79 ^b	4.94	14.17 ^a	0.79
org. PP + CS + Bf + 50 ppm HBA	16.70 ^a	0.45	3.91 ^a	0.10	47.50 ^c	5.91	62.31 ^b	6.79	0.50 ^a	1.13	110.31 ^b	8.52	24.48 ^c	3.51
org. PP + CS + Bf + 100 ppm HBA	16.58 ^a	0.32	3.86 ^a	0.02	51.61 ^c	3.08	60.42 ^b	3.59	0.00 ^a	0.00	112.03 ^b	6.54	32.24 ^d	2.29

Org. PP = Organic pressed pulp, CS = Clover silage, DM = Dry matter, LA = Lactic acid, AA = Acetic acid, BA = Butyric acid, TA = Total acids (sum of LA + AA + BA), EtOH = Ethanol, Bf = Bonsilage forte, HBA = Hop beta acids; Tukey's HSD Test, $P < 0.05$, $n = 5$, SD = Standard deviation; ^{a, b, c, ...} mean values followed by different letters in a column are significantly different;

Summary and outlook

Results from ensiling trials with organic pressed pulp mixed with clover silage show that silage additives can selectively inhibit unwanted micro-organisms such as clostridia. However, the use of lactic acid bacteria alone does not guarantee for low butyric acid contents. The additional use of hop beta acids supports the activity of lactic acid bacteria and helps to achieve silages with low butyric acid content in order to provide high quality feeding stuff suitable for organic farming.

APPLICATION OF NATURAL ANTIBACTERIALS IN PRESSED PULP SILAGE PRODUCTION PART II: APPLICATION OF SILAGE ADDITIVES IN ORGANIC PRESSED PULP SILAGE

FLORIAN EMERSTORFER¹, BARBARA WEISSEISEN², WALTER HEIN¹

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

²*Agrana Zucker GmbH, Josef-Reither-Strasse 21-23, A-3430 Tulln*

ABSTRACT

During the application of natural antibacterials – products based on hop components, tree resins and fatty acids – used in the extraction area of sugar factories, it was observed that these substances are effective against clostridia in very low concentrations. With suitable dosage applications it was possible to suppress clostridia infections without negatively affecting the favoured flora of lactic acid bacteria. These results led to first considerations to apply natural antibacterials for preventing silage spoilage, especially caused by clostridia. In the first part of the work it was shown that an economical application of the substances in artificially soil contaminated pressed pulp resulted in significantly lowered butyric acid formation and improved silage quality. The second part of the work evaluates the question of a combined use of natural antibacterials and silage starter cultures based on lactic acid bacteria, since pre-trials indicated further improvements with respect to clostridial inhibition. The application of both combines the growth-inhibiting effect of a fast pH-decrease caused by lactic acid bacteria at the start of the ensilaging process and the direct action of hop acids on living spoilage bacterial cells, respectively. The study was carried out with low dry matter organic pressed pulp to which clover silage was added. The combined use of hop beta acids and silage inoculants results in clear improvements with respect to organic acids composition in bale and laboratory silages.

UTILISATION DE BIOSTABILISATEURS NATURELS DANS LES ENSILAGES DE PULPE SURPRESSEE PARTIE II: UTILISATION D'ADDITIFS POUR ENSILAGE DANS LES ENSILAGES DE PULPE BIO SURPRESSEE

RESUME

L'utilisation de biostabilisateurs naturels, produits à base de houblon respectivement de résines d'arbres et d'acides gras, dans les unités d'extraction de sucre a démontré l'efficacité de ces substances actives contre les infections clostridiennes, même en très faible quantités. Avec un dosage approprié, il était possible de combattre une infection clostridienne sans impact négatif sur la flore de lactobacilles nécessaires. Cette observation a mené aux premiers travaux dans lesquels des biostabilisateurs naturels ont été utilisés pour combattre les fermentations clostridiennes dans les procédés d'ensilage. Dans la première partie des travaux, il a pu être démontré qu'une utilisation économique des substances actives dans des ensilages de pulpe surpressée artificiellement souillés de terre mène à une production d'acide butyrique moindre et ainsi à une qualité améliorée de l'ensilage. Dans la présente 2ème partie des travaux a été explorée la question de la combinabilité de biostabilisateurs naturels et de ferments d'ensilage sur la base de bactérie d'acide lactique, une amélioration de la suppression du clostridium ayant pu être observée au cours des essais préliminaires. L'avantage d'une utilisation combinée contre le clostridium est d'une part l'action inhibitrice sur la croissance par la baisse rapide du pH due aux bactéries d'acide lactique en début d'ensilage, et d'autre part l'attaque directe des acides de houblon sur des cellules vivantes des germes destructeurs. Au cours des recherches, de la pulpe bio surpressée à faible taux de matière sèche a été mélangée à de l'ensilage de trèfle. Les résultats montrent que l'utilisation générale

d'acides de houblon- β et de ferments d'ensilage améliore sensiblement la composition des acides de fermentation dans les ensilages de balles et les ensilages de laboratoire.

EINSATZ NATÜRLICHER BIOSTABILISATOREN BEI DER HERSTELLUNG VON PRESSSCHNITZELSILAGEN TEIL II: EINSATZ VON SILIERHILFSMITTELN IN BIOPRESSSCHNITZELSILAGE

KURZFASSUNG

Beim Einsatz natürlicher Biostabilisatoren - Produkten auf Basis Hopfen bzw. Baumharzen und Fettsäuren – in Extraktionsanlagen der Zuckerproduktion – konnte beobachtet werden, dass diese Wirkstoffe schon in sehr geringen Mengen gegen Clostridien wirksam sind. Bei entsprechender Dosierung war es möglich, Clostridieninfektionen zu bekämpfen ohne die gewünschte Milchsäureflora negativ zu beeinflussen. Diese Ergebnisse führten zu ersten Arbeiten, natürliche Biostabilisatoren zur Bekämpfung von durch Clostridien hervorgerufenen Fehlgärungen bei Silageprozessen einzusetzen. Im 1. Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein ökonomischer Einsatz der Wirkstoffe in künstlich erdverschmutzten Pressschnittsilagen zu wesentlich verminderter Buttersäurebildung und damit verbesserter Silagequalität führt. Im vorliegenden 2. Teil der Arbeit wurde die Frage der Kombinierbarkeit natürlicher Biostabilisatoren mit Silagestarterkulturen auf Basis von Milchsäurebakterien untersucht, da in Vorversuchen eine weitere Verbesserung der Clostridienunterdrückung beobachtet werden konnte. Der Vorteil einer kombinierten Anwendung gegen Clostridien liegt einerseits in der wachstumshemmenden Wirkung einer raschen pH-Absenkung durch die Milchsäurebakterien zu Silierbeginn und andererseits dem direkten Angriff der Hopfensäuren auf lebende Zellen der Verderbskeime. In den Untersuchungen wurden Biopressschnittsilage mit niedrigem Trockensubstanzgehalt mit Kleesilage gemischt. Ergebnisse zeigen, dass die gemeinsame Anwendung von Hopfen- β -Säuren und Silagestarterkulturen eine wesentliche Verbesserung der Gärzusammensetzung in Ballensilagen und Laborsilagen bewirkt.

INTRODUCTION

In the second organic sugar campaign at AGRANA in 2009 organic sugar beets from Austrian farmers were processed in Hrusovany factory to produce organic sugar. During processing low dry matter organic pressed pulp was produced as a by-product. Due to limited dryer capacity, an amount of 500 t of organic pressed pulp was ensiled in round bales with minor additions of clover silage. A number of bales were treated with combinations of a commercial silage inoculant and hop beta acids as previous studies had shown good effects for combined natural antibacterial and lactic acid bacteria application [1]. Parallel to that a systematic laboratory trial was carried out to evaluate changes to quality relevant parameters over the observed time.

The aim of the study was to ensile low dry matter organic pressed pulp added (org. PP) with clover silage (CS) to increase protein content. Silage additives were used to enhance lactic acid fermentation and to investigate the potential for further silage quality improvements.

MATERIALS AND METHODS

Silage additives

[applied according to the recommendations of the producer]

Bonsilage forte (Bf): mixture of homofermentative lactic acid bacteria

Hop beta acids (HBA): BetaStab 10A with 10% (w/w) hop beta acid concentration

Treatments

Organic pressed pulp
Organic pressed pulp + clover silage
Organic pressed pulp + clover silage + Bf
Organic pressed pulp + clover silage + Bf + 50 ppm HBA
Organic pressed pulp + clover silage + Bf + 100 ppm HBA

Production of baled silages

Baled silages were prepared using an Orkel round baler, whereas 28 t of organic pressed pulp was mixed with 1 t clover silage. Additives were applied by means of a Stihl backpack sprayer on the rubberized belt. Every treatment was prepared in duplicate. Bales were sampled and analyzed on dry matter, pH-value and volatile fatty acids concentrations after 5 months of indoor storage.

Preparation of laboratory silages

For laboratory silages organic pressed pulp and clover silage were mixed in a concrete mixer in a 28:1 proportion. Afterwards, silage additives were applied using a sprayer bottle. The treated material then was packed into 1 L glass jars and maintained at 25°C in a climatic chamber. Five replicates of each treatment were opened at 0, 15, 45 and 90 days and analyzed for dry matter, pH-value and volatile fatty acids concentration using HPLC.

Data from laboratory silages were analyzed using one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) Test with $P < 0.05$ to determine significant differences of means between treatments. These analyses were performed using Statgraphics plus, version 5.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Results for baled silages

Table 1 displays results for baled silages stored for 5 months. All treatments show well preserved silages with low pH-values, high lactic acid and acetic acid levels and low butyric acid concentrations. Combined application of hop beta acids and Bonsilage forte leads to further improvements and silages which are free from butyric acid.

Table 1: Results for baled silage with organic pressed pulp and clover silage and treated with additive

Treatment	DM [gkg ⁻¹]	pH	LA [gkg ⁻¹ DM]	AA [gkg ⁻¹ DM]	BA [gkg ⁻¹ DM]	TA [gkg ⁻¹ DM]	EtOH [gkg ⁻¹ DM]
org. PP + CS	17.09	3.96	33.84	62.10	0.59	96.54	20.31
org. PP + CS + Bf	17.74	3.89	55.17	52.72	0.71	108.60	16.77
org. PP + CS + Bf + 50 ppm HBA	18.05	3.91	44.12	53.16	0.00	97.28	19.93
org. PP + CS + Bf + 100 ppm HBA	17.26	4.06	24.33	65.10	0.00	89.43	22.34

Mean values of duplicate analysis. Org. PP = Organic pressed pulp, CS = Clover silage, DM = Dry matter, LA = Lactic acid, AA = Acetic acid, BA = Butyric acid, TA = Total acids (sum of LA + AA + BA), EtOH = Ethanol, Bf = Bonsilage forte, HBA = Hop beta acids;

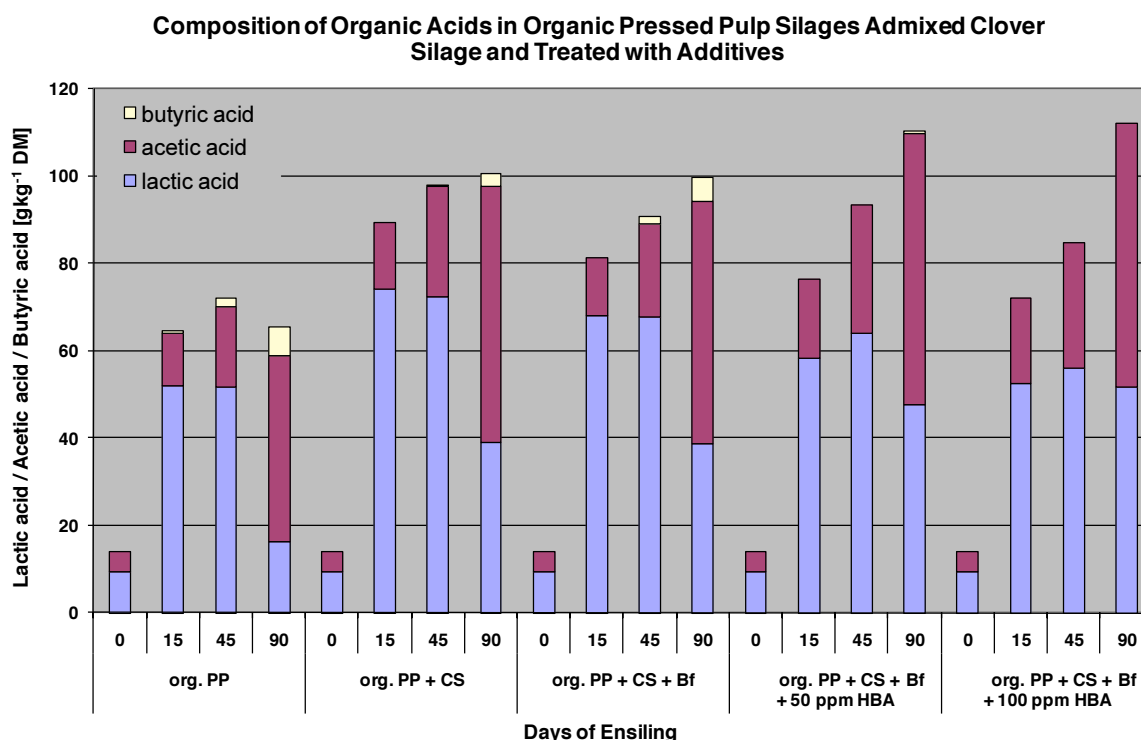


Figure 1: Progression of organic acid concentrations in treated laboratory silages

Results for laboratory silages

Fig. 2 displays the progression of organic acids composition over the observed time. Results of laboratory silages after 90 days of ensiling are summarized in Table 2. Silages without hop beta acids addition show moderate butyric acid concentrations in the later stages of fermentation. In contrast to that combined Bonsilage forte and hop beta acids application exhibits significant improvements (Table 2) and practically complete suppression of butyric acid formation after 90 days of ensiling.

Table 2: Fermentation characteristics of treated laboratory silages after 90 days of ensiling

Treatment	DM [gkg ⁻¹]	SD	pH	SD	LA [gkg ⁻¹ DM]	SD	AA [gkg ⁻¹ DM]	SD	BA [gkg ⁻¹ DM]	SD	TA [gkg ⁻¹ DM]	SD	EtOH [gkg ⁻¹ DM]	SD
org. PP	16.94 ^a	0.37	4.17 ^b	0.04	16.32 ^a	3.06	42.61 ^a	2.28	6.46 ^c	3.00	65.39 ^a	3.07	19.67 ^b	0.55
org. PP + CS	16.97 ^a	0.28	3.92 ^a	0.03	39.05 ^b	3.87	58.62 ^b	6.21	2.94 ^{abc}	2.79	100.61 ^b	8.38	14.17 ^a	0.81
org. PP + CS + Bf	16.62 ^a	0.13	3.91 ^a	0.05	38.79 ^b	5.12	55.40 ^b	4.88	5.60 ^{bc}	4.55	99.79 ^b	4.94	14.17 ^a	0.79
org. PP + CS + Bf + 50 ppm HBA	16.70 ^a	0.45	3.91 ^a	0.10	47.50 ^c	5.91	62.31 ^b	6.79	0.50 ^a	1.13	110.31 ^b	8.52	24.48 ^c	3.51
org. PP + CS + Bf + 100 ppm HBA	16.58 ^a	0.32	3.86 ^a	0.02	51.61 ^c	3.08	60.42 ^b	3.59	0.00 ^a	0.00	112.03 ^b	6.54	32.24 ^d	2.29

Org. PP = Organic pressed pulp, CS = Clover silage, DM = Dry matter, LA = Lactic acid, AA = Acetic acid, BA = Butyric acid, TA = Total acids (sum of LA + AA + BA), EtOH = Ethanol, Bf = Bonsilage forte, HBA = Hop beta acids; Tukey's HSD-Test, $p < 0.05$, $n = 5$, SD = Standard deviation; a, b, c... mean values followed by different letters in a column are significantly different;

CONCLUSION

Ensiling trials with organic pressed pulp mixed with clover silage show that silage additives can selectively suppress unwanted micro-organisms such as clostridia. However, the use of lactic acid bacteria alone does not guarantee for low butyric acid contents. The additional use of hop beta acids supports the activity of lactic acid bacteria and helps to achieve silages with low butyric acid content in order to provide high quality feeding stuff suitable for organic farming

REFERENCES

EMERSTORFER, F. & HEIN, W.: Application of natural antibacterials in pressed pulp silage production. Poster Presentation, 71st IIRB Congress in Brussels, 13-14/02/2008.

Curriculum vitae

PERSONAL DATA

Name: Florian Emerstorfer
Date of birth: 29th November 1978
Address: Kundmanngasse 4/7, A-1030 Vienna
Contact: florian.emerstorfer@zuckerforschung.at

EDUCATION

Oct. 2005 – June 2011	PhD thesis at the Department of Food Science and Technology; Supervisor: Prof. Wolfgang Kneifel
June 2005	Graduation (DI) in Food Science and Biotechnology at the University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna
Nov. 2003 – April 2005	Diploma thesis at the Department of Food Science and Technology; Supervisor: Prof. Klaus Dieter Kulbe
October 1998	University entry at the University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna (Studies of Food and Biotechnology)
May 1997	Final examination in Steyr (BRG Steyr Michaelerplatz)

EMPLOYMENT

Sept. 2004 -	Zuckerforschung Tulln GmbH, Department of Sugar Technology; Josef-Reither-Strasse 21-23, A-3430 Tulln
--------------	---