



F1000094875B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT** 94875

(45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 03 11 1995

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 12C 1/04, A 23B 9/26, 9/28, A 23L 1/185, 1/186

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	930182
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	15.01.93
(24) Alkupäivä - Löpdag	15.01.93
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	16.07.94
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.07.95

(71) Hakija - Sökande

1. Oy Panimolaboratorio- Bryggerilaboratorium Ab, PL 192, 00121 Helsinki, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Haikara, Auli, Itälahdenkatu 8 C, 00210 Helsinki, (FI)
2. Mattila-Sandholm, Tiina, Ristinientie 32 G 33, 02320 Espoo, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Papula Rein Lahtela Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä elintarvikekäyttöön tarkoitetun teollisesti idätettävän siemenmateriaalin
käsittelymiseksi**
**Förfarande för behandling av för livsmedelsanvändning avsett industriellt grobart
frömaterial**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 7388 DSM
7389 DSM

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 20212 (C 12C 1/04), DE C 850884 (6 a 2), EP A 302300 (C 12N 1/20),
EP A 333056 (A 23L 3/34), EP B 162805 (A 23K 1/08), US A 4842871 (A 23B 9/00),
US A 4056637 (A 23L 1/172)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä idätettävän siemenmateriaalin käsittelymiseksi, jolloin siemenmateriaaliin lisätään idätysprosessin yhteydessä maitohappobakteerivalmistetta tai maitohappobakteerien tuottamaa valmistetta, jolla on mikrobien kasvua estävää vaikutusta.

Uppfinningen avser ett förfarande för behandling av frömaterial som skall låtas gro, varvid till frömaterial i samband med gröningsprocessen tillsätts ett mjölksyrebakteriepreparat eller ett av mjölksyrebakterier framställt preparat, vilket inverkar hämmande på mikrobernas tillväxt.

MENETELMÄ ELINTARVIKEKÄYTTÖÖN TARKOITETUN TEOLLISESTI
IDÄTETTÄVÄN SIEMENMATERIAALIN KÄSITTELEMISEKSI

Keksintö koskee menetelmää elintarvikekäyttöön
5 tarkoitettuna teollisesti idätettävän siemenmateriaalin
käsittelyä.

Idätysprosessilla tarkoitetaan tässä yhteydes-
sä yleisesti menetelmävaihteita, jotka tarvitaan idäte-
tyn tuotteen valmistamiseksi lähtien varastokuivasta
10 siemenestä. Esimerkiksi panimo- ja tislaamoteollisuu-
dessa idätysprosessia, so. mallastusprosessia, käyte-
tään oluen tai muiden alkoholijuomien tärkeän raaka-ai-
neen, viljamaltaan, kuten ohramaltaan, ruismaltaan tai
minkä tahansa maltaan tuottamiseksi. Idätysprosessia
15 käytetään lisäksi erilaisten kaupallisten itutuottei-
den, esim. pavunitujen tai minkä tahansa ihmisen ravin-
tona käytettävien itujen tuottamiseksi.

Idätysprosessit suoritetaan yleensä ei-asep-
tisissa olosuhteissa. Käsiteltävissä siemenissä esiin-
20 tyy mikrobeja, jotka ovat peräisin kasvuympäristöstä
tai varastoinnista. Idätysprosessin olosuhteet ovat
yleensä edullisia siemenessä esiintyville mikrobeille,
jotka tavallisesti lisääntyvät prosessin aikana. Mikro-
bit voivat vaikuttaa haitallisesti idätettyyn tuotteeseen
tai tuotteesta mahdollisesti valmistettavaan lop-
25 putuotteeseen, mutta niillä voi olla myös hyödyllistä
vaikutusta idätettävään tuotteeseen.

Oluen valmistuksen päävaiheet ovat mallastus,
vierteen valmistus, pää- ja varastokäyminen sekä jäl-
30 kikäsittely. Mallastuksen tarkoituksena on tuottaa
jyvässä entsyymejä, jotka mäsäyksessä hajottavat vil-
jan endospermin aineet vierteeseen liukenevaan muotoon.
Esimerkiksi ohrajuvien mallastusprosessiin kuuluu tun-
netusti kolme vaihetta, liotus, idätys ja kuivaus. Puh-
35 distetut ja seulotut ohrajuyvät liotetaan vedessä kunnes
haluttu kosteus on saavutettu, esim. suuruusluokkaa n.
43 - 44%. Osa liotuksesta voidaan suorittaa ns. kui-

valiotuksena. Ohra saa itää hallituissa olosuhteissa ja itänyt ohra kuivataan kuumassa ilmavirrassa, kunnes itäminen on loppunut. Kuivauksen päätteeksi maltaista poistetaan juuri-idut. Mallastuksen vaiheiden säätö
 5 perustuu lämpötilan, ilman virtauksen ja kosteuden säätämiseen.

Maltaan laatuun vaikuttaa mallastustekniikan ja -olosuhteiden lisäksi mallasviljan mikrobifloora, joka vaihtelee merkittävästi mm. viljalajikkeen, sää-
 10 olosuhteiden, kasvupaikan, kasvukauden pituuden ja varastointiolosuhteiden mukaan.

Mallastuksessa yleisimmin käytetty viljalaji on ohra. Ohran luonnollinen mikrobifloora voidaan ryhmitellä pelto- ja varastosieniin, bakteereihin ja hii-
 15 voihin. Ohran yleisimmät peltosienisuvut ovat Fusarium, Alternaria, Cladosporium, Cephalosporium, Epicoccum ja Helminthosporium. Homesienien esiintyminen on erilaista eri maissa ja eri vuosina. Kosteat sääolosuhteet viljan kasvu- ja etenkin korjuuaikana suosivat Fusarium-homeen
 20 kasvua. Sateisina kasvukausina Fusarium-kontaminaatio voi olla hyvin voimakas. Eräs viljan yleisimmistä bakteerilajeista on Enterobacter agglomerans. Muista bakteereista mainittakoon Escherichia coli sekä Pseudomonas-, Micrococcus- ja Bacillus-suvun bakteerit sekä
 25 maitohappobakteerit. Bakteerien määrä ohrassa on n. 10^6 - 10^8 pmy/g (pesäkkeitä muodostavia yksiköitä/g).

Ohran sisältämät homeet ja bakteerit lisääntyvät mallastuksen aikana ja huippupitoisuudet saavutetaan yleensä idätysvaiheen aikana. Voimakkaimmin
 30 lisääntyvät tällöin etenkin Fusarium-homeet ja maitohappobakteerit. Myös hiivat lisääntyvät mallastuksen aikana. Kuivausvaiheessa home-, hiiva- ja bakteeripitoisuudet taas yleensä laskevat. Osalla ohrassa esiintyvistä mikrobeista on hyödyllinen vaikutus mallastusta
 35 ja maltaasta valmistettua tuotetta esim. olutta ajatellen. On arvioitu, että joistakin maltaan entsyymeistä jopa 40 - 50 % on mikrobiperäisiä. Osalla mikrobeista

on vastaavasti epäedullinen vaikutus ohraan ja/tai maltaisiin.

Epäedullisista mikrobeista mainittakoon Fusarium-homeet, joiden on todettu aiheuttavan muita homeita useammin erityisen haitallista oluen ylikuohuntaa (gushing-ilmiö), jolloin homeiden tuottamat peptidit ovat alkioina kaasukuplille, jotka purkautuvat olutpullosta voimakkaana kuohuna. Kun mallastetuista jyvistä yli 50 % on Fusarium-homeilla kontaminoituneita, ylikuohumisriski lisääntyy selvästi.

Edelleen, ohran sisältämien gram-negatiivisten bakteerien, kuten Leuconostoc-, Pseudomonas- ja Flavobacterium-sukuihin kuuluvien lajien on todettu hidastavan maskein suodattavuutta vierteen suodatuksen yhteydessä. Ohrassa esiintyvät erilaiset mikrobit voivat aikaansaada myös muita epäedullisia vaikutuksia, esim. alentaa itävyyttä, aiheuttaa makuvirheitä tai epäedullisia muutoksia vierteen ja oluen analyysiarvoissa.

Mallasohran laatuvaatimukset voidaan määrittellä vuosittain vahvistetuissa viljelysopimus- ja hankintaehdoissa. Homeet ovat usein laatuvaatimuksissa mainittu mikrobiryhmä. Useat mallastamot ovat lisäksi asettaneet tietyille homeille ylärajan. Jos Fusarium-homeilla kontaminoitujen jyvien osuus on yli 65 % tai Aspergillus- ja Penicillium-homeiden vastaava osuus on yli 50 %, voidaan ohra luokitella huonolaatuiseksi tai jopa mallastukseen kelpaamattomaksi.

Homeiden aiheuttamaa ylikuohumista on pyritty ehkäisemään käyttämällä hyvälaatuista ohraa tai sekoittamalla ohra-, mallas- tai oluteriä. Sateisina vuosina lähes koko ohrasato saattaa olla huonolaatuista, jolloin hyvälaatuisten ohran saaminen voi olla mahdotonta. Myös mikrobisidisiä kemikaaleja on kokeiltu homeiden määrän vähentämiseksi, mutta mitään turvallista, yleisesti hyväksyttyä kemikaalia ei ole kyetty löytämään.

Myös idätysprosessi ravinnoksi tarkoitettujen itujen tuottamiseksi tarjoaa edulliset olosuhteet esim.

homeiden ja bakteerien lisääntymiselle. Tällaiset itu-
tuotteet pilaantuvat nopeasti. Edelleen siementen idä-
tyksen yhteydessä voi lisääntyä esim. ruokamyrkytyksiä
aiheuttavia elintarvikepatogeeneja, kuten Salmonella-,
5 Yersinia- ja/tai Listeria-bakteereita.

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on pois-
taa edellä mainitut epäkohdat.

Erityisesti keksinnön tarkoituksena on tuoda
esiin menetelmä, jolla mikrobiflooran määrää ja laatua
10 voidaan säädellä hallitusti idätysprosessin aikana vai-
kuttamatta kuitenkaan epäedullisesti idätetyn tuotteen
tai tuotteesta mahdollisesti valmistetun lopputuotteen
laatuun.

Keksinnölle tunnusomaisten seikkojen osalta
15 viitataan patenttivaatimuksiin.

Keksintö perustuu tutkimuksiin, joiden yhtey-
dessä on yllättäen havaittu, että maitohappobakteereja
voidaan käyttää idätettävän tuotteen laadun parantami-
seen. Keksinnön mukaisen valmisteen sisältämät ja/tai
20 tuottamat aineet, so. mikrobisidiset aineet, estävät
idätysprosessin yhteydessä esiintyvien haitallisten
mikrobien kasvua.

Maitohappobakteerien käyttö elintarvike- ja
rehuteollisuudessa on hyvin tunnettua. Ne tuottavat
25 fermentointiolosuhteissa tuotteiden koostumukseen ja
makuun vaikuttavia, mutta myös tuotteita pilaavien pa-
togeenisten mikrobien kasvua estäviä yhdisteitä. Mai-
tohappobakteereja on käytetty yleisesti maitotuotteis-
sa, lihatuotteissa, vihannesten fermentoinnissa ja
30 leipomotuotteissa sekä rehun säilönnässä.

Maitohappobakteeri- tai maitohappolisäystä on
käytetty erään mallastyypin, ns. Sauermalz'in, valmis-
tuksessa. Lisäys suoritetaan maltaaseen kuivausvaihees-
sa ennen mäskeystä tai mäskeyksen aikana. Lisäyksen
35 tarkoituksena on ainoastaan aikaansaada vierteen pH:n
alentuminen ja siten vaikuttaa mäskeysprosessin kulkuun
ja valmiin oluen laatuun. Maitohappobakteereja ei ole

kuitenkaan aiemmin käytetty keksinnön mukaisesti estämään ei-toivottua mikrobien kasvua idätysprosessin yhteydessä.

Keksinnön mukainen valmiste voidaan lisätä
5 idätettävään tuotteeseen missä tahansa idätysprosessin vaiheessa.

Eräässä erityisen edullisessa sovellutuksessa maitohappobakteerivalmistetta tai maitohappobakteerin tuottamaa valmistetta, jolla on mikrobien kasvua estävää vaikutusta, lisätään viljamateriaaliin kuten ohranjyviin mallastusprosessin aikana. Lisätty valmiste rajoittaa homeiden, erityisesti haitallisten Fusarium-homeiden, ja bakteerien kasvua, jonka seurauksena esim. Fusarium-homeesta johtuva oluen ylikuohuntariski pienee.
15 nee. Valmiste ei kuitenkaan vaikuta oleellisesti hyöty-mikrobiston toimintaan saadun maltaan tai siitä valmistetun oluen laatua ajatellen. Lisätyllä valmisteella ei ole myöskään havaittu haitallisia vaikutuksia maltaan laatuun eikä sen ole havaittu sisältävän tai tuottavan maltaan tai oluen kannalta haitallisia yhdistei-
20 tä.

Mallastusprosessissa maitohappobakteerivalmiste tai maitohappobakteerin tuottama valmiste voidaan lisätä ohranjyviin ennen liotusta, liotusvaiheessa tai
25 idätysvaiheessa. Lisäys suoritetaan edullisesti liotus- tai idätysvaiheessa. Mallastusprosessi voidaan suorittaa muilta osin sinänsä tunnetulla tavalla. Haluttaessa mallastettavaan ohraan voidaan lisätä esim. ravinteita tai olosuhteita voidaan säätää, esim. lisätä maitohappoa, maitohappobakteerien kasvuolosuhteiden optimoimiseksi.
30

Keksinnössä voidaan käyttää mitä tahansa yleisesti saatavaa maitohappobakteeria, jolla on mikrobien kasvua estävää vaikutusta. Käyttökelpoisista
35 maitohappobakteerisuvuista mainittakoon Lactococcus-, Leuconostoc-, Pediococcus- ja Lactobacillus-suvut. Edullisina lajeina mainittakoon Lactococcus lactis,

Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus damnosus, Pediococcus parvulus, Pediococcus pentosaceus, Lactobacillus curvatus ja Lactobacillus plantarum tai näiden seokset, joista erityisen edullisia ovat Lactobacillus plantarum ja Pediococcus pentosaceus tai näiden seokset. Myös geneettisesti muunneltujen maitohappobakteerien käyttö on mahdollista.

Maitohappobakteerivalmiste voi koostua kasvuliuksesta soluineen, soluista tai konsentroidusta kasvuliuksesta soluineen. Maitohappobakteerien tuottama valmiste voi koostua soluvapaasta kasvuliuksesta, konsentroidusta kasvuliuksesta, fraktioidusta kasvuliuksesta tai kokonaan tai osittain puhdistetusta mikrobisidisestä tuotteesta.

Erään erityisen edullisen sovellutuksen mukaan käsittely suoritetaan konsentroidulla tai fraktioidulla kasvuliuksella, joka voi olla soluvapaa tai sisältää soluja. Konsentointi voidaan suorittaa esim. lyofilisoimalla tai haihduttamalla. Kasvuliuos konsentroidaan esim. 2 - 20 - 40-kertaiseksi.

Fraktiointi, so. mikrobisidisten tuotteiden puhdistus, voidaan suorittaa sinänsä tunnettuun tapaan, esim. kromatografisten menetelmien avulla tai ultrasuodattamalla.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä siemenmateriaaliin lisättävän, maitohappobakteeria sisältävän valmisteiden tai maitohappobakteerin tuottaman valmisteiden mikrobien kasvua estävä aktiivisuus vastaa esim. kasvuliuosmäärää n. 10 - 10 000 ml/kg käsiteltävää siemenmateriaalia, sopivasti 30 - 7000 ml/kg käsiteltävää siemenmateriaalia, esim. 40 - 5000 ml/kg käsiteltävää siemenmateriaalia. Kasvuliuksien valmistusta on kuvattu esimerkkiosassa. On huomioitava, että valmisteiden aktiivisuus on määritelty tässä hakemuksessa käytettyjen kasvuliusten avulla. Alan ammattilaiselle on selvää, että keksinnön mukaisia valmisteita, joilla on vastaavanlainen mikrobien kasvua estävä aktiivisuus, voidaan

tuottaa myös muita kasvuliukuksia ja/tai -menetelmiä käyttäen.

Keksinnön mukaisesti valmiste sisältää mikrobisidisiä yhdisteitä tai valmiste tuottaa mikrobisidisiä yhdisteitä idätysprosessin aikana. Käytettäessä soluvalmistetta solujen kasvua voidaan tarvittaessa edistää esim. säätämällä olosuhteita idätysprosessin aikana tai lisäämällä ravinteita. Valmiste voi myös kiihdyttää idätettävässä materiaalissa esiintyvien muiden maitohappobakteerien kasvua.

Koska maitohappobakteereiden käyttö elintarvikkeissa on sallittua ja yleisesti hyväksyttyä, myös maitohappobakteerikasvatuksesta saatu valmiste on turvallista käyttää. Maitohappobakteerit kuuluvat tavallisesti idätettävien siemenien, kuten ohranjyvien, luonnolliseen mikrobiflooraan. Siten keksinnön mukainen menetelmä on mahdollisimman luonnonmukainen. Maitohappobakteerikantana voidaan myös käyttää siemenissä luonnostaan esiintyvää kantaa.

Keksinnön ansiosta esim. mallastuksessa voidaan vähentää Fusarium-kontaminaatioista aiheutuvia haittoja kuten oluen ylikuuhuntariskiä.

Keksinnön mukaisen menetelmän on lisäksi ylläyttäen havaittu parantavan suodattuvuutta oluen valmistusprosessissa. Tämän on todettu johtuvan siitä, että keksinnön mukainen valmiste rajoittaa myös mallastuksessa esiintyvien haitallisten, mäsikin suodattuvuutta hidastavien, esim. Leuconostoc-, Pseudomonas- ja Flavobacterium-sukuihin kuuluvien lajien määrää.

Erään toisen edullisen sovellutuksen mukaisesti maitohappobakteerivalmistetta tai maitohappobakteerin tuottamaa valmistetta lisätään siemenmateriaaliin tuotettaessa ravintona käytettäviä ituja.

Esillä olevan keksinnön ansiosta haitallisten mikrobien kasvua voidaan rajoittaa idätysprosessin yhteydessä. Keksintö mahdollistaa ensimmäistä kertaa biologisten keinojen käytön idätettävässä siemenessä

esiintyvien haitallisten mikrobien kasvun estämiseksi teollisen idätysprosessin aikana.

Keksinnön mukainen menetelmä parantaa yleensäkin idätysprosessin yleistä hygieniatasoa.

5 Seuraavassa keksintöä havainnollistetaan sovellutusesimerkein, jotka on tarkoitettu ainoastaan havainnollistamaan keksintöä rajoittamatta sitä näihin. Keksinnön mukaista käsittelyä voidaan soveltaa myös muunlaisiin idätysprosesseihin.

10 Kuva 1 esittää kuvaajaa maitohappobakteerin kasvuliuksessa olevasta mikrobisidisestä aktiivisuudesta turbidometrisellä menetelmällä määritettynä. Testiorganismien E. agglomerans E-396 normaali kasvukäyrä ja tuottokantojen L. plantarum E-76 ja P. pentosaceus
15 E-390 kasvuliusten estovaikutus testiorganismien kasvuun.

Kuvassa 2 on esitetty mallastusten eri vaiheisiin lisättyjen P. pentosaceus E-390-kasvuliusten vaikutus mallastuksen kokonaisbakteeripitoisuuksiin.

20 Kuvassa 3 on esitetty mallastusten eri vaiheisiin lisättyjen P. pentosaceus E-390-solujen vaikutus mallastuksen kokonaisbakteeripitoisuuksiin.

Kuvassa 4 on esitetty kokonaisbakteeripitoisuudet koemallastusten eri vaiheissa lisättäessä P. pentosaceus E-390 ja L. plantarum E-76 kasvuliuksia
25 tai konsentroituja kasvuliuksia ohran likoveteen.

Kuvassa 5 on esitetty kokonaisbakteeripitoisuudet koemallastusten eri vaiheissa lisättäessä P. pentosaceus E-390 ja L. plantarum E-76 kasvuliuksia
30 tai konsentroituja ja fraktioituja kasvuliuksia ohran likoveteen.

Kuvassa 6 on esitetty mallastukseen lisättyjen maitohappobakteeriviljelmien vaikutus mäskin suodattavuuteen (Tepral-suodatus).

35

Esimerkki 1: ERI MAITOHAPPOBAKTEERIKANTOJEN MIKROBISIDINEN VAIKUTUS MALLASTUKSESSA ESIINTYVIIN MIKROBEIHIN

Kokeessa tutkittiin eri maitohappobakteerikantojen tuottamien valmisteiden mikrobisidistä vaikutusta mallastuksessa esiintyviin mikrobeihin. Valmis- teina käytettiin steriilisuodatettua kasvuliuosta.

5 1. Tuottokannat:

Tuottokantoina käytettiin maitohappobakteerikantoja:

	<u>Lactobacillus lactis</u>	
	ssp. <u>lactis</u>	VTT-E-90414 (E-414)
10	ssp. <u>diacitilactis</u>	VTT-E-90423 (E-423)
	<u>Leuconostoc mesenteroides</u>	
	ssp. <u>mesenteroides</u>	VTT-E-90389 (E-389)
	ssp. <u>mesenteroides</u>	VTT-E-90415 (E-415)
	ssp. <u>mesenteroides</u>	VTT-E-90466 (E-466)
15	<u>Pediococcus damnosus</u>	VTT-E-76065 (E-65)
	<u>Pediococcus parvulus</u>	VTT-E-88315 (E-315)
	<u>Pediococcus pentosaceus</u>	VTT-E-76067 (E-67)
	<u>Pediococcus pentosaceus</u>	VTT-E-76068 (E-68)
	<u>Pediococcus pentosaceus</u>	VTT-E-88317 (E-317)
20	<u>Pediococcus pentosaceus</u>	VTT-E-90390 (E-390)
		(DSM talletus)
	<u>Lactobacillus curvatus</u>	VTT-E-90391 (E-391)
	<u>Lactobacillus plantarum</u>	VTT-E-78076 (E-76)
		(DSM talletus)
25	<u>Lactobacillus plantarum</u>	VTT-E-79098 (E-98)

! Kannat saatiin VTT:n biotekniikan laboratorion kantakokoelmasta.

2. Testikannat:

Testikantoina käytettiin mallastuksessa esiintyviä erilaisia haitallisia mikrobilajeja sekä mm. tuottokantoina käytettyjä maitohappobakteerikantoja.

Haitallisia homeita kokeessa edustivat oluen ylikuohuntaa aiheuttavat Fusarium-homeet [Gibberella avenacea (ent. Fusarium avenaceum) VTT-D-80141 (D-141) ja VTT-D-80147 (D-147) sekä Fusarium culmorum VTT-D-80148 (D-148) ja VTT-D-80149 (D-149), VTT:n biotekniikan laboratorion teollisuusmikrobikokoelma] sekä yksi

Aspergillus-laji.

Haitallisia gram-negatiivisia bakteereja edustivat kaksi kantaa Enterobacter-suvusta sekä yksi laji sekä Flavobacterium- että Pseudomonas-suvuista.

- 5 Maitohappobakteerit koostuivat tuottokantoina käytettyjen kantojen lisäksi kannasta Lactococcus sp. E-416.

3. Tuottokantojen kasvatus ja steriilisuodatetun kasvuliuoksen valmistus:

- 10 Maitohappobakteerit kasvatettiin MRS-liemessä (MRS BROTH, Oxoid). Pediococcus-suvun kannat E-65, E-67 ja E-68 kasvatettiin 25 °C:ssa aerobisesti ja muut tuottokannat 30 °C:ssa anaerobisesti kasvatusajan vaihdellessa 2 - 5 vrk. Sitten solut sentrifugoitiin ja
15 supernatantti steriilisuodatettiin.

4. Testikantojen kasvatus:

- Fusarium-homeiden kasvuliemestä tuotettiin itiösuspensiot kasvattamalla homekantaa CMC-liuoksessa (karboksimeetyyliselluloosa) 25°C:ssa, 5 - 6 vrk ravisteluviljelmänä, rikkomalla itiömuodostelmat TWEEN-liuoksessa, suodattamalla suspensio ja ottamalla saatu suodos talteen.

- Aspergillus-homeen itiösuspensio tuotettiin suoraan PD-agarille (25 °C, 3 vrk) (Potato dextrose, Difco).
25

Gram-negatiivisia bakteereita kasvatettiin aerobisesti NB-liemessä (Nutrient broth, Difco) 1 vrk, Enterobacter-kantaa 30 °C:ssa ja Flavobacterium- ja Pseudomonas-kantoja 25 °C:ssa.

- 30 Maitohappobakteereita kasvatettiin kohdassa 3. esitetyn mukaisesti.

5. Maitohappobakteerikantojen mikrobisidisen vaikutuksen tutkiminen:

- Mikrobisidinen aktiivisuus kasvuliuoksessa
35 määritettiin kiekkomenetelmällä tai turbidometrisesti.

5.1. Kiekkomenetelmä mikrobisidisen aktiivisuuden määrittämiseksi:

Steriilisuodatettua kasvuliuosta tai sen lai-

mennosta pipetoitiin suodatinpaperikiekolle (halkaisija 12,7 mm) 100 µl. Kiekot asetettiin Plate Count-agar-maljoille, joihin oli maljattu 0,3 ml testiorganismien laimennusta, 10^{-2} . Näytteitä kasvatettiin 24 h 30°C:ssa, jonka jälkeen muodostuneen estorenkkaan halkaisija ilmoitettiin millimetreinä.

5.2. Turbidometrinen sameudenmittausmenetelmä mikrobisidisen aktiivisuuden määrittämiseksi:

Menetelmässä käytettiin automaattista turbidometriä (Bioscreen, Labsystems).

Näyte sisälsi testiorganismia 10 til-% ja tuottokannan kasvatuksesta saatua steriilisuodatettua valmistetta 10 til-% näytteen tilavuudesta laskettuna sekä kasvatusalustaa. Kontrolleissa käytettiin steriilisuodosvalmisteen tilalla steriiliä vettä, jonka pH oli säädetty maitohapolla samalle tasolle kuin steriilisuodatetun valmisteen pH.

Kasvatusalustana käytettiin kunkin testikannan tapauksessa samaa alustaa kuin testikannan kasvatuksessa.

Fusarium-homeilla ja Aspergillus-kannalla kasvatusolosuhteet olivat 5 vrk, 25 °C ja voimakas ravistelu. Gram-negatiivisilla bakteereilla kasvatusolosuhteet olivat: Enterobacter-kanta 30 °C, muut 25 °C, 25 vrk ja ravistelu. Maitohappobakteereilla kasvatusolosuhteet olivat 3 vrk, 30 °C ja ravistelu.

Laitteisto määrittänyt näytteistä absorbanssin näkyvän valon aallonpituuksilla 420 - 580 nm. Kasvatuksen jälkeen voitiin muodostaa kunkin näytteen kasvukäyrä ja laskea kasvukäyrän pinta-ala.

Tuottokannan mikrobisidinen vaikutus testikannan kasvuun ilmaistiin inhibitioprosenttina, joka saatiin vertaamalla kontrollilla ja tuottokannan steriilisuodatetulla valmisteella saatua kasvualan kokoa.

6. Eräiden maitohappobakteerien fungisidisen vaikutuksen tutkiminen:

Kuuden maitohappobakteerikannan, E-76, E-98,

E-315, E-317, E-414 ja E-415, fungisidistä vaikutusta tutkittiin erikseen kaikkiin testikantoina käytettyihin Fusarium-homeisiin. Kokeessa tarkasteltiin visuaalisesti sameuden muodostumista homeviljelmissä, joihin
 5 oli lisätty kustakin maitohappobakteerikasvatuksesta saatua steriilisuodatettua valmistetta erilaisina, taulukossa 3 määriteltävinä laimennoksina.

Kontrolleissa käytettiin kasvuliuksen sijasta steriloitua Milli-Q-vettä ja maitohapolla pH 3,6:ksi
 10 säädettyä Milli-Q-vettä.

Kasvatus suoritettiin koeputkikasvatuksena CMC-liemessä, 25 °C:ssa, 5 vrk ajan. Tulokset luettiin visuaalisesti.

7. Tulokset:

15 Taulukossa 1 ja 2 sekä kuvassa 1 on esitetty eri maitohappobakteerikannoille kiekkomenetelmällä ja vast. turbidometrisellä menetelmällä määritetty mikrobisidinen aktiivisuus.

20 Taulukossa 3 on esitetty visuaalisesti määritetty fungisidinen aktiivisuus.

TAULUKKO 1. Maitohappobakteerikasvuliuosten mikrobisidinen aktiivisuus kiekkomenetelmällä.

:25	Maitohappobakteeri	Solumäärä PMY/ml	Kasvuliuos pH	Estorenkään halkaisija, mm
	E-76	$3,2 \times 10^8$	3,70	19
	E-98	$1,2 \times 10^8$	3,72	17
	E-315	$1,6 \times 10^8$	3,90	16
:30	E-317	$1,0 \times 10^8$	3,86	16
	E-390	$1,9 \times 10^8$	3,92	15

Testiorganismi E-396:n solumäärä $4,0 \times 10^7$ PMY/ml; maljal-
 la $1,2 \times 10^5$ PMY/ml

TAULUKKO 2. Maitohappobakteereiden mikrobisidinen vaikutus eri mikrobian kasvun.

Testikanta	Tuottokanta													solukons. pmy/ml		
	Lactococcus			Leuconostoc		Pediococcus									Lactobacillus	
	E-414	E-423	E-389	E466	E-65	E-315	E-67	E-68	E-317	E-390	E-391	E-76	E-98			
Homeet																
	<i>Aspergillus niger</i>	D-5	-28	-36	-39	-38	-16	-33	-21	-20	-24	-44	-39	-41	2,0x10 ⁴	
	<i>Fusarium avenaceum</i>	D-141 ^b	-36	-36	-49	-55	-33	-59	-42	-44	-52	-42	-79	-74	6,0x10 ¹	
	"	D-147 ^b	-12	-20	-36	-66	-8	-63	-27	-43	-50	-37	-70	-67	2,0x10 ⁴	
	"	D-148 ^b	-5	-17	-29	-26	-9	-25	-10	-16	-20	-21	-35	-30	2,5x10 ¹	
	"	D-149 ^b	3	-6	-20	-30	-10	-26	-18	-9	-20	-9	-39	-32	6,0x10 ²	
Gram-negatiiviset bakteerit																
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	E-396	-89	-92	-94	ei m.	-96	-92	-93	-96	-91	-93	-93	-93	6,0x10 ⁴	
	<i>Flavobacterium</i> sp.	E-399 ^b	-98	-99	-99	-98	-99	-97	-98	-98	-98	-99	-96	-97	2,6x10 ⁶	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	E-397 ^b	-98	-98	-97	-98	-97	-97	-98	-98	-97	-97	-98	-97	1,0x10 ⁴	
Maitohappobakteerit																
	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	E-414	-37	-33	-24	-47	-46	-57	-39	-48	-53	-44	-56	-56	5,0x10 ⁴	
	"	ssp. <i>diacetylactis</i>	E-423	-15	-29	-35	-28	-43	-39	-87	-37	-33	-43	-42	4,0x10 ⁴	
	<i>Lactococcus</i> sp.	E-416	-15	-23	-16	-61	-37	-41	-31	-35	-36	-41	-57	-58	2,0x10 ⁴	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	E-389 ^b	-19	-30	-26	-50	-39	-45	-11	-38	-47	-41	-57	-58	4,0x10 ⁴	
	<i>Pediococcus parvulus</i>	E-315	6	-6	-7	-7	-7	-8	-6	-23	-8	-7	-12	-12	1,0x10 ¹	
	"	<i>pentosaceus</i>	E-68	10	19	21	15	4	10	8	9	3	17	5	6,0x10 ⁴	
	"	"	E-390	0	-3	-1	-7	-6	-3	-6	-5	-8	-7	-9	2,0x10 ¹	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	E-76	-2	-6	-5	-12	-9	-14	-12	-10	-16	-14	-22	-22	2,0x10 ¹	
	"	"	E-98	-1	-3	-3	-8	-9	-10	-6	-4	-6	-8	-11	1,0x10 ¹	

ei m. : inhibiitiota ei määritetty; negat. luku : inhibiiti kasvun; posit. luku : stimuloiti kasvua

> 55 % voimakas inhibiiti; 35 - 55 % kohint. voimakas inhibiiti; 15 - 34 % kohint. heikko inhibiiti; 15 % heikko tai ei lainkaan inhibiitiota

^b todettu oluen yliköyhennän aiheuttajiksi^c todettu mäsän suodattavuutta estävä vaikutus

94875

TAULUKKO 3. Maitohappobakteerien kasvuliuksen estovaikutus oluen ylikuohuntaa aiheuttaviin *Fusarium*-sieniin. + selvä kasvu, - ei kasvua

D-141	Maitohappobakteerikanta	KASVULIUOS laimennus					
		1:6	2:6	3:6	4:6	5:6	6:6
	E-76	+	+	-	-	-	-
	E-98	+	+	-	-	-	-
	E-315	+	+	+	-	-	-
	E-317	+	+	+	-	-	-
	E-414	+	+	+	+	-	-
	E-415	+	+	+	-	-	-
	kontrolli	+					
	pH-kontrolli	+					

D-147	Maitohappobakteerikanta	KASVULIUOS laimennus					
		1:6	2:6	3:6	4:6	5:6	6:6
	E-76	+	+	-	-	-	-
	E-98	+	+	-	-	-	-
	E-315	+	+	+	-	-	-
	E-317	+	+	+	-	-	-
	E-414	+	+	+	+	-	-
	E-415	+	+	+	-	-	-
	kontrolli	+					
	pH-kontrolli	+					

D-148	Maitohappobakteerikanta	KASVULIUOS laimennus					
		1:6	2:6	3:6	4:6	5:6	6:6
	E-76	+	-	-	-	-	-
	E-98	+	+	-	-	-	-
	E-315	+	+	-	-	-	-
	E-317	+	+	-	-	-	-
	E-414	+	+	+	-	-	-
	E-415	+	+	-	-	-	-
	kontrolli	+					
	pH-kontrolli	+					

D-149	Maitohappobakteerikanta	KASVULIUOS laimennus					
		1:6	2:6	3:6	4:6	5:6	6:6
	E-76	+	+	-	-	-	-
	E-98	+	+	-	-	-	-
	E-315	+	+	+	-	-	-
	E-317	+	+	+	-	-	-
	E-414	+	+	+	-	-	-
	E-415	+	+	+	-	-	-
	kontrolli	+					
	pH-kontrolli	+					

Tuloksista nähdään, että mainitut maitohappobakteerikannat estävät haitallisten Fusarium-homeiden ja muiden mallastuksessa esiintyvien haitallisten mikrobien kasvua ollen vaikuttamatta oleellisesti hyötymikrobeihin. Tulokset osoittavat maitohappobakteerien käyttökelpoisuuden esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä.

Esimerkki 2: ERÄIDEN MAITOHAPPOBAKTEERIKANTOJEN MIKROBISIDINEN VAIKUTUS ELINTARVIKEPATOGEENEIHIN JA ELINTARVIKKEILLE HAITALLISIIN MIKROBEIHIN

Kokeessa tutkittiin Pediococcus pentosaceus VTT-E-90390 (E-390)- ja Lactobacillus plantarum VTT-E-78076 (E-76)- kannoilla tuotettujen valmisteiden mikrobisidistä vaikutusta elintarvikepatogeeneihin ja elintarvikkeille haitallisiin mikrobeihin. Testiorganismina käytettiin Bacillus-, Yersinia-, Listeria-, Pseudomonas-, Salmonella- ja Staphylococcus-sukuihin kuuluvia kantoja.

Valmisteena käytettiin maitohappobakteerien steriloitua kasvuliuosta, joka valmistettiin esimerkissä 1 esitetyn mukaisesti. Kaikkia muita testikantoja kasvatettiin 16 - 18 h Iso-sensitest-liemessä (Oxoid), paitsi Listeria-kanta, jota kasvatettiin tryptoosifosfaatti-liemessä. Kasvatuslämpötila oli 30 °C, paitsi Salmonella-, Listeria- ja Staphylococcus-kannoille 37 °C.

Mikrobisidinen aktiivisuus määritettiin turbidometrisellä menetelmällä, joka on kuvattu esimerkissä 1. Koe-olosuhteet turbidometrisessä määrittämisessä olivat kasvualustan ja lämpötilan suhteen edellä esitetyn mukaiset. Kasvatusaika oli 24 h, paitsi Bacillus- ja Yersinia-kannoille 48 h.

Tulokset on esitetty taulukossa 4, josta voidaan havaita, että keksinnön mukainen maitohappobakteerivalmisteen lisäys estää elintarvikepatogeenien ja elintarvikkeille haitallisten mikrobien kasvua.

TAULUKKO 4. *P. pentosaceus* E-390:n ja *L. plantarum* E-76:n aiheuttama kasvun esto.

Tuottokannat	E-390	E-76
Testiorganismit	Kasvun pinta-alan pieneneminen (%)	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC9139 *)	93	80
<i>Yersinia enterocolitica</i> ELI351 *)	85	54
<i>Listeria monocytogenes</i> KTL4126 *)	41	49
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ELI97	89	97
<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC4973	84	93
<i>Salmonella infantis</i> ELI5 *)	90	98
<i>Staphylococcus aureus</i> ELI200 *)	73	86

*) Elintarvikkeessa esiintyviä patogeeneja

ATCC: American Type Culture Collection

ELI: VTT, Elintarvikelaboratorio

KTL: Kansanterveyslaboratorio

Esimerkki 3: MAITOHAPPOBAKTEERIVALMISTEIDEN JA MAITOHAPPOBAKTEERIEN TUOTTAMIEN VALMISTEIDEN VAIKUTUS MALLASTUKSEN MIKROBIFLOORAAN JA MALTAAN LAATUUN

1. Käytetyt kannat:

5 Kokeessa käytettiin Pediococcus pentosaceus VTT-E-90390 (E-390)-maitohappobakteerikantaa.

Kasvuliuoksena käytettiin MRS-lientä. Viljelmät olivat tuoreita, kahdesti nuorennettuja. Nuorennuksissa bakteereita kasvatettiin 10 ml MRS-liemessä
10 anaerobisesti, lämpötila 30 °C. Siirrostilavuus oli 1 % kasvuliuoksen tilavuudesta.

2. Ohra:

Ohrana käytettiin satovuoden 1990 Kymppi-ohraa, jonka Fusarium-homeilla kontaminoitujen jyvien
15 osuus oli 55 %.

3. Mallastusprosessi:

1000 g ohraerät upotettiin huuhtelua varten 12 °C vesihauteeseen 1 h ajaksi. Huuhteluvesi vaihdettiin ensimmäiseksi likovedeksi, joka puolestaan vaihdettiin
20 5 h kuluttua toiseksi likovedeksi. Kuivaliko aloitettiin tästä 16 h kuluttua. Kuivalion tarkoituksena oli poistaa vesi jyvien pinnalta. Kuivaliko kesti 8 h. Ohra saavutti likojen aikana 44 % kosteuden. Ohria ilmastettiin koko liotuksen ajan.

25 Likoa seurasi idätys. Ohria idätettiin idätyskaapissa 6 vrk, 14 °C. Kosteuden pitämiseksi tasolla 44 % ohraeriä kostutettiin ja käännettiin päivittäin. Saatu vihermallas kuivattiin 21 h lämpötilaohjelmalla. Kuivauksen alussa lämpötila oli 50 °C 4,5 h ajan. Seuraavan 4,5 h aikana lämpötila nostettiin 60 °C:een,
30 jossa sitä pidettiin 4 h. Lämpötilaa nostettiin edelleen tasaisesti 5 h aikana 85 °C:een asti, jossa sitä pidettiin loput 3 h. Maltaan loppukosteudeksi tuli n. 4 %.
35 Lopuksi maltaista poistettiin juuri-idut mekaanisesti.

Kontrollikokeena käytettiin mallastusta ilman mitään lisäystä.

4. Maitohappobakteerivalmiste ja maitohappobakteerien tuottama valmiste:

Valmisteina käytettiin kasvuliuoksesta erotettuja maitohappobakteerisoluja ja mikrobisidisiä yhdisteitä sisältäviä kasvuliuoksia yhdessä ja erikseen. Kasvuliuosta soluineen lisättiin 120 ml/kg ohra tai solut erotettiin 120 ml:sta kasvuliuosta. Erotus suoritettiin kasvuliuoksesta sentrifugoimalla ja solut suspendoitiin veteen. Kasvuliuosta lisättäessä liuos käytettiin sellaisenaan. Lisättävien valmisteiden solumäärä oli suuruusluokkaa n. 10^8 - 10^9 pmy/ml.

5. Maitohappobakteerivalmistelisykset:

Maitohappobakteerivalmistelisykset suoritettiin joko ohraan, I lion alkuun, I ja II lion alkuun tai idätyksen alkuun.

6. Suoritetut analyysit:

Näytteitä otettiin kustakin mallastusvaiheesta.

6.1. Homeet määritettiin seuraavasti: Fusarium-homeilla kontaminoitujen jyvien prosenttiosuus määritettiin Fusarium-homeille selektiivisellä CZAPEK IPRODION DICLORAL-agarilla (CZID-agar) ja kostealla imupaperialustalla (IP, EBC-Analytica Microbiologica, osa II, 1987). Fusarium-homeet tunnistettiin tyypillisen pesäke- ja itiö morfologian ja punaisen värin perusteella.

Aspergillus- ja Penicillium-homeet määritettiin selektiivisellä mallassuola-agarilla (EBC-Analytica Microbiologica, osa II, 1987). Muut yleisimmät homesuvut määritettiin kostealla imupaperialustalla.

6.2. Maitohappobakteerit määritettiin MRS-agarilla sekä lisättävien viljelmien että mallastusnäytteiden tapauksessa.

6.3. Kokonaisbakteeripitoisuudet määritettiin Plate Count -agarilla (Difco).

6.4. Maltaan kemialliset ominaisuudet määritettiin mallastuksen yhteydestä tunnetuilla menetel-

millä (EBC-Analytica, 1987, 4.painos).

7. Tulokset:

Taulukossa 5 on esitetty Fusarium-homeiden sekä maitohappobakteerien pitoisuudet mallastuksen eri vaiheissa lisättäessä E-390-kasvuliuosta.

Kuvissa 2 ja 3 on esitetty kokonaisbakteeripitoisuudet mallastuksen eri vaiheissa E-390-kasvuliuoksille sekä E-390-soluille.

Taulukossa 6 on esitetty mal-
10 lasanalyysitulokset, kun mallastukseen on lisätty E-390-kasvuliuosta tai E-390- soluja.

⋮

TAULUKKO 5. Mallastuksen eri vaiheisiin lisätyn *P. pentosaceus* E-390 kasvuliuoksen vaikutus mallastuksen *Fusarium*-sienipitoisuuteen ja maitohappobakteerien määrään.

	<i>Fusarium</i> -homeet (kontaminoituneiden jyvien osuus, %)			
Lisäysvaihe	Ohra	Liko	Idätys	Mallas
Kontrolli	55	72	96	25
120 ml kasvuliuosta ohraan	3	6	77	3
120 ml kasvuliuosta 1. likoon	55	62	98	14
120 ml kasvuliuosta 1. + 2. likoon	55	42	90	9
120 ml kasvuliuosta idätykseen	55	78	91	3
	Maitohappobakteerit (solutiheys, pmy/g)			
Kontrolli	$6,0 \times 10^1$	$3,4 \times 10^2$	$2,2 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$
120 ml kasvuliuosta ohraa	$1,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
120 ml kasvuliuosta 1. likoon	$6,0 \times 10^1$	$3,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
120 ml kasvuliuosta 1. + 2. likoon	$6,0 \times 10^1$	$7,4 \times 10^7$	$8,3 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$
120 ml kasvuliuosta idätykseen	$6,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$

TAULUKKO 6. Mallastuksen eri vaiheisiin lisätyn *P. pentosaceus* E-390 kasvulioksen ja solujen vaikutus maltaan laatuun.

Näyte	Analyysi	β -glu- kaa- nit mg/l	Kos- teus %	Uute % k.a.	Rouhe % k.a.	Uute- ero % k.a.	Kirk- kaus	Suodat- tuminen, jauho ml/h	Soke- roitu- mis- aika	Visko- siteetti cP	FAN mg/l	Möy- hen- tynsi- syy %	Homo- geeni- suus %	α - amy- laasi- aktiivi- suus U/g	β - glu- kaasi- aktiivi- suus U/kg	Juuri- idut g/kg
Kontrolli		604	4,1	80,1	77,8	2,3	kirkas	300	<10	1,59	163	82	69	202	365	35
120 ml kasvuliosta ohraan		496	4,3	80,3	77,3	3,0	kirkas	305	<10	1,51	164	80	57	207	355	37
120 ml kasvuliosta 1. likoon		482	4,2	80,5	77,5	2,9	kirkas	310/56 min	<10	1,50	171	76	51	194	316	30
120 ml kasvuliosta 1. +2. likoon		482	4,3	80,0	76,9	3,1	kirkas	305	<10	1,49	168	80	64	186	360	31
120 ml kasvuliosta idätykseen		955	4,2	79,0	74,9	4,1	opal.	310	<10	1,68	129	69	59	159	386	21
Soluja (10^8 pmy/g) ohraan		606	4,3	80,3	77,4	2,9	kirkas	315/61 min	<10	1,54	167	79	59	223	359	38
Soluja (10^8 pmy/g) 1. likoon		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	79	59	187	376	39
Soluja (10^8 pmy/g) 1. +2. likoon		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81	67	178	353	36
Soluja (10^8 pmy/g) idätykseen		804	4,3	79,5	76,6	2,9	opal.	290	<10	1,63	148	81	69	179	392	35

- ei analysoitu

Saaduista tuloksista voidaan havaita, että keksinnön mukaiset käsittelyt vähentävät erityisesti Fusarium-homemäärää ja kokonaisbakteerimäärää mallastuksen eri vaiheissa.

5 Maitohappobakteerivalmisteen lisäys ei vaikuttanut haitallisesti maltaan laatuun. Päin vastoin, keksinnön mukainen käsittely paransi vierteestä saadun mäsikin suodattuvuutta ja alensi maltaan β -glukaanipitoisuutta.

10

Esimerkki 4: MAITOHAPPOBAKTEERIEIN TUOTTAMIEIN VALMISTEIEIN VALMISTUS

1. Konsentroidun kasvuliuksen valmistus:

15 Tuottokannat, Pediococcus pentosaceus VTT-E-90390 (E-390) ja Lactobacillus plantarum VTT-E-78076 (E-76), kasvatettiin fermentorissa 15 l tilavuudessa. Siirrostetilavuus oli 6 % - 7 %, kasvatus tehtiin MRS-alustassa, 30 °C:ssa, 2 vrk mikroaerofiilisissä olosuhteissa. Kasvuliukset konsentroitiin 10- ja 20 kertaisiksi lyofilisointi- ja haihdutusmenetelmällä. Konsentraattien mikrobisidinen aktiivisuus todettiin kiekko-

20 menetelmällä.

2. Puhdistetun, mikrobisidisiä yhdisteitä sisältävän liuksen valmistus:

25 Maitohappobakteerin kasvuliuos puhdistettiin geelikromatografisesti fraktioimalla molekyylikoon mukaan. Kiekkomenetelmällä ja turbidometrisesti mikrobisidisesti aktiivisiksi todetut fraktiot kerättiin ja ajettiin uudelleen geelipylvään läpi.

30

Esimerkki 5: MAITOHAPPOBAKTEERIVALMISTEIEIN JA MAITOHAPPOBAKTEERIEIN TUOTTAMIEIN VALMISTEIEIN VAIKUTUS MALLASTUKSEN MIKROBIFLOORAAN JA MALTAAN LAATUUN

35 1. Käytetyt kannat ja kannoista tuotetut valmisteet:

Käytettiin bakteerikantoja:

Lactobacillus plantarum VTT-E-78076 (E-76)

Pediococcus pentosaceus VTT-E-90390 (E-390)

Kannat saatiin VTT:n biotekniikan laboratorion kantakokoelmasta.

Valmisteet tehtiin esimerkissä 1, kohdassa 3.,
5 esimerkissä 3, kohdassa 1. ja 4. ja esimerkissä 4, kohdissa 1 ja 2, esitetyn mukaisesti.

2. Ohra:

Käytetty ohra oli satovuoden 1991 Kymppi-ohraa.

10 3. Mallastusprosessi:

Mallastus suoritettiin esimerkissä 3 esitetyn mukaisesti, mutta idätysvaihe kesti 8 vrk. Maltaan loppukosteudeksi tuli alle 5 %.

4. Mallastus:

15 Suoritettiin kaksi koemallastusta. Kontrollikokeena käytettiin mallastusta ilman lisäyksiä.

4.1. Ensimmäinen mallastus:

Koemallastuksessa valmisteina käytettiin 10-kertaiseksi konsentroituja kasvuliuoksia ilman soluja
20 ja käsittelemätöntä kasvuliuosta soluineen. Valmistetta lisättiin I lion alussa tai I ja II lion alussa. Mallastuskokeet 1 - 8, suoritettiin seuraavasti:

Koe nro 1: Kontrolli Kymppi-ohra 1991;

25 Koe nro 2: I ja II lion alussa lisätään 120 ml E-76 kasvuliuosta soluineen;

30 Koe nro 3: I lion alussa lisätään 120 ml 10-kertaiseksi konsentroitua E-76 kasvuliuosta;

Koe nro 4: I ja II lion alussa lisätään 120 ml 10-kertaiseksi konsentroitua E-76 kasvuliuosta;

35 Koe nro 5: I ja II lion alussa lisätään 120 ml E-390 kasvuliuosta soluineen;

Koe nro 6: I lion alussa lisätään 120 ml 10-kertaiseksi konsentroitua E-390 kasvuliuosta

40 Koe nro 7: I ja II lion alussa lisätään 120 ml 10-kertaiseksi konsentroitua E-390 kasvuliuosta;

Koe nro 8: I ja II lion alussa lisätään 60 ml E-76 kasvuliuosta soluineen ja 60 ml E-390 kasvuliuosta

soluineen.

4.2. Toinen mallastus:

Koemallastuksessa valmisteena käytettiin 20-kertaiseksi konsentroitua kasvuliukoja ilman soluja, puhdistettuja mikrobisidisiä fraktioita ilman soluja ja käsittelemätöntä kasvuliukoista soluineen. Likoveden pH:ta säädettiin. Valmistetta lisättiin I ja II lion alussa. Mallastuskokeet 9 - 16 suoritettiin seuraavasti:

- 10 Koe nro 9: Kontrolli Kymppi-ohra 1991;
Koe nro 10: I ja II lion alussa lisätään 120 ml vettä, pH 3,8;
Koe nro 11: I ja II lion alussa lisätään 120 ml E-76 kasvuliukoista soluineen;
15 Koe nro 12: I ja II lion alussa lisätään 120 ml E-76 fraktioitua konsentraattia, pH 3,8;
Koe nro 13: I ja II lion alussa lisätään 120 ml 20-kertaiseksi konsentroitua E-76 kasvuliukoista;
Koe nro 14: I ja II lion alussa lisätään 120 ml E-390
20 kasvuliukoista soluineen;
Koe nro 15: I ja II lion alussa lisätään 120 ml E-390 fraktioitua konsentraattia, pH 3,8;
Koe nro 16: I ja II lion alussa lisätään 120 ml 20-kertaiseksi konsentroitua E-390 kasvuliukoista.

25 5. Suoritetut analyysit:

Näytteitä otettiin kustakin mallastusvaiheesta.

Homeet, maitohappobakteerit, kokonaisbakteeripitoisuudet sekä maltaan fysikaaliset ja kemialliset
30 laatuominaisuudet määritettiin esimerkeissä 3 esitetyn mukaisesti.

6. Tulokset:

Kuvissa 4 ja 5 on esitetty kokonaisbakteeripitoisuudet mallastuksen eri vaiheissa käytettäessä maitohappobakteerien kasvuliukoista soluineen tai konsentroitua tai fraktioitua kasvuliukoista ilman soluja likovesissä.

Taulukoissa 7, 8, 9 ja 10 on esitetty Fusarium-homeiden ja muiden homeiden sekä maitohappobakteerien pitoisuudet mallastuksen eri vaiheissa molemmissa mallastuksissa.

- 5 Taulukoissa 11 ja 12 on esitetty mallasanalyysitulokset molemmista mallastuksista.

TAULUKKO 7. Mallastuksen homefloora lisättäessä *P. pentosaceus* E-390 ja *L. plantarum* E-76 valmisteita ohran likoveteen (tulokset ilmoitettu % kontaminoituneita jyviä). Näytteiden numerointi esimerkissä 5.

Näyte Homesuku	Ohra	Liko								Idäty								Mallas							
		1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Fusarium</i> IP	35	80	64	60	22	76	76	48	68	72	88	88	94	96	80	90	94	26	22	2	3	25	17	7	24
CZID	36	74	72	46	38	84	54	32	78	84	82	80	82	84	78	80	96	36	22	10	2	24	20	8	24
<i>Alternaria</i>	26	6	18	22	20	18	22	12	24	18	10	8	2	10	2	2	10	18	8	17	5	18	5	11	16
<i>Cephalosporium</i>	37	22	38	34	36	42	12	28	24	72	20	42	80	42	32	36	24	2	3	5	4	7	2	6	2
<i>Cladosporium</i>	17	4	20	6	56	34	10	44	20	6	6	30	52	14	10	36	4	2	0	4	1	1	1	1	0
<i>Rhizopus</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	48	13	0	11	0
<i>Mucor</i>	0	2	4	0	2	8	14	0	4	0	10	28	64	24	44	34	14	65	79	78	88	68	83	96	73
<i>Stemphylium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	1
<i>Epicoccum</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	1	1	0	0	3	0	1	3
<i>Helminthosporium</i>	10	26	46	10	10	36	16	14	30	48	64	60	42	50	54	38	58	28	26	14	3	11	23	8	20
<i>Acremonia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichothecium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Penicillium</i>	3	0	2	2	2	0	0	2	2	4	2	2	0	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Muut sienet	1	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

..

..

TAULUKKO 8. Mallastuksen maitohappobakteeripitoisuus (PMY/g) lisättäessä *P. pentosaceus* E-390 ja *L. plantarum* E-76 valmisteita ohran likoveteen. Näytteiden numerointi esimerkissä 5.

Näyte	Liotus	Idätys	Mallas
1	5.5×10^3	3.3×10^6	2.5×10^2
2	7.3×10^6	1.2×10^7	5.5×10^5
3	1.4×10^3	4.4×10^3	1.1×10^3
4	3.2×10^2	1.4×10^4	9.5×10^2
5	1.3×10^7	7.5×10^6	2.6×10^6
6	4.8×10^3	5.0×10^5	4.0×10^4
7	7.3×10^2	2.4×10^4	2.6×10^3
8	1.2×10^7	1.4×10^7	2.3×10^6

Ohran maitohappobakteeripitoisuus $7,5 \times 10^2$ PMY/g.

TAULUKKO 9. Mallastuksen homelloora lisätiäessä *P. pentosaceus* E-390 ja *L. plantarum* E-76 valmisteita ohran likoveteen (tulokset ilmoitettu % kontaminoituneita jyvii).
Näytteiden numerointi esimerkissä 5.

Näyte	Ohra	Liko										Idäty										Mallas									
		9	10	11	12	13	14	15	16	9	10	11	12	13	14	15	16	9	10	11	12	13	14	15	16						
Homesuku																															
<i>Fusarium</i> IP	35	78	84	32	30	0	44	36	28	98	86	94	98	59	96	94	72	23	28	37	14	1	16	65	13						
CZID	36	78	78	30	14	0	26	28	22	98	98	92	66	12	92	92	54	38	31	36	7	1	24	44	11						
<i>Alternaria</i>	26	6	2	34	10	10	24	20	14	8	2	14	24	0	0	14	6	17	16	25	13	2	19	27	3						
<i>Cephalosporium</i>	37	18	18	34	24	0	36	44	44	52	18	56	52	4	36	36	58	5	3	6	11	1	14	13	20						
<i>Cladosporium</i>	17	6	8	14	16	70	18	24	42	14	6	2	16	54	2	6	20	1	0	0	1	7	1	0	1						
<i>Rhizopus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	20	0	0	0	11	0							
<i>Mucor</i>	0	0	2	2	2	4	2	0	2	36	14	52	40	76	22	56	66	80	78	78	91	98	93	84	90						
<i>Stemphylium</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	4	4	1	0	3	2	0						
<i>Epitocum</i>	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0						
<i>Helminthosporium</i>	10	32	28	44	18	10	26	28	26	66	50	66	82	6	78	66	58	46	58	46	52	7	76	55	17						
<i>Acremoniella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
<i>Trichothecium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
<i>Aspergillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
<i>Penicillium</i>	3	2	2	0	2	0	0	2	0	0	0	10	16	30	4	4	10	0	1	0	0	0	0	0	0						
Muut sienet	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0						

TAULUKKO 10. Mallastuksen maitohappobakteeripitoisuus (PMY/g) lisättäessä *P. pentosaceus* E-390 ja *L. plantarum* E-76 valmisteita ohran likoveteen. Näytteiden numerointi esimerkissä 5.

Näyte	Liotus	Idätys	Mallas
9	8.0×10^2	4.2×10^6	8.0×10^3
10	8.0×10^2	5.0×10^6	5.6×10^6
11	2.7×10^7	2.1×10^7	8.5×10^5
12	2.2×10^3	3.4×10^5	2.5×10^3
13	1.2×10^3	1.4×10^7	2.3×10^3
14	4.1×10^7	3.5×10^7	1.1×10^6
15	4.8×10^3	4.8×10^6	3.9×10^5
16	3.5×10^2	2.1×10^5	1.7×10^6

Ohran maitohappobakteeripitoisuus $7,5 \times 10^2$ PMY/g.

TAULUKKO 11. Ohran likoveteen lisätyjen *P. pentosaceus* E-390 ja *L. plantarum* E-76 valmistaiden vaikutus maltaan laatuun. Näytteiden numerointi esimerkissä 5.

Analyysi	Näyte							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kosteus	3,6	3,6	3,5	3,7	3,7	3,6	3,9	3,9
Uutepitoisuus, jauho	81	80,8	80,6	80	81,2	81	80,7	81,2
Uutepitoisuus, rouhe	76,8	77	76,1	75,2	77	76,4	74,8	77,1
Uute-ero	4,2	3,8	4,5	4,9	4,3	4,7	5,9	4,1
Sokeritoimituminen	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10
Vierteen kirkkaus	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas
Suodattuminen, jauho	320/45	320/44	315/48	315/40	320/47	315/66	320/49	315/52
Suodattuminen, rouhe	260/86	265/64	270/59	255/73	260/68	260/76	255/90	275/120
Vierteen pH	5,93	5,88	5,86	5,86	5,86	5,86	5,97	5,99
Viskositeetti	1,69	1,57	1,59	1,57	1,55	1,58	1,59	1,58
β -glukaanit	784	659	705	736	610	696	822	657
Vapaa aminotyyppi	154	156	155	139	158	150	130	154
Möyhentyneisyys	74	72	73	73	72	75	77	76
Homogeenisuus	61	65	63	58	67	66	62	68
α -amylaasi	178	182	148	128	179	156	144	174
β -glukanaasi	434	420	360	360	442	412	361	425

TAULUKKO 12. Ohran likoveteen lisätyjen *P. pentosaceus* E-390 ja *L. plantarum* E-76 valmisteiden vaikutus maltaan laatuun. Näytteiden numerointi esimerkissä 5.

Analyysi	Näyte									
	9	10	11	12	13	14	15	16		
Kosteus	3,5	3,6	3,6	3,5	3,8	3,5	3,5	3,6		
Uutepitoisuus, jauho	80,5	80,5	81,2	80,5	80,3	81	81,1	80,4		
Uutepitoisuus, rouhe	78,4	77,9	77,4	73,3	73,5	77,6	76,6	75,1		
Uute-ero	2,1	2,6	3,7	7,2	6,8	3,4	4,5	5,4		
Sokeroituminen	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10	alle 10		
Vierteen kirkkaus	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas	kirkas		
Suodattuminen, jauho	320/40	315/47	320/44	315/42	320/55	315/49	330/40	320/40		
Suodattuminen, rouhe	290/120	270/76	260/51	265/120	245/120	285/68	305/120	265/12		
Vierteen pH	6,04	6,05	5,99	5,97	5,94	5,95	5,98	5,99		
Viskositeetti	1,54	1,65	1,51	1,53	1,5	1,49	1,49	1,52		
β -glukaanit	442	522	397	553	612	381	463	576		
Vapaa aminotyyppi	149	145	149	128	117	149	139	120		
Möyhentyneisyys	85	85	86	82	74	81	75	71		
Homogeenisuus	63	66	76	57	57	68	51	47		
α -amylaasi	161	172	161	123	72	148	125	101		
β -glukanaasi	365	375	365	282	282	371	342	308		

94875

Saaduista tuloksista voidaan havaita, että keksinnön mukaiset käsittelyt vähentävät erityisesti Fusarium-homeäärää ja kokonaisbakteerimäärää mallastuksen eri vaiheissa. Edelleen voidaan havaita, että
5 kasvuliuosten lisäksi erityisesti konsentroidut ja fraktioidut kasvuliuokset omaavat edullisen vaikutuksen esim. Fusarium-homeisiin nähden.

Mallasanalyyseistä voidaan päätellä, että kantojen E-76 ja E-390 kasvuliuoslisäykset vaikuttivat
10 maltaasta tehdyn vierteen suodattavuutta parantavasti, myös β -glukaanipitoisuudet ovat vastaavissa maltaissa pienempiä kuin kontrollimaltaassa.

ESIMERKKI 6: MALLASTUKSEEN LISÄTTYJEN MAITOHAPPOBAK-
15 TEERIEN TUOTTAMIEN VALMISTEIDEN VAIKUTUS MÄSKIN SUODAT-
TUVUUTEEN

Kuvassa 6 on kuvattu eri maitohappobakteerikannoista saaduilla valmisteilla suoritettun keksinnön mukaisen käsittelyn (120 ml kasvatusliuos/kg ohra)
20 vaikutusta käsitelystä maltaasta tuotetun mäskin suodattavuuteen.

Kokeessa käytettiin esimerkissä 1 mainittuja kantoja: E-390, E-416, E-98, E-317, E-390, E-76 ja E-315. Koe suoritettiin Tepral-suodatusmenetelmää käyttäen
25 (BIOS. 19, 1988, Grandclerc, J. et al., "Simplification de la méthode de filtration du brassin tepral description de la méthode", s. 88-92).

Tuloksista voidaan havaita, että keksinnön mukainen käsittely parantaa mäskin suodattavuutta.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä elintarvikekäyttöön tarkoitettun, teollisesti idätettävän siemenmateriaalin käsittely-
5 seksi, t u n n e t t u siitä, että siemenmateriaaliin lisätään idätysprosessin yhteydessä maitohappobakteeri- valmistetta tai maitohappobakteerien tuottamaa valmis- tetta, jolla on mikrobien kasvua estävää vaikutusta idätysprosessin aikana.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että maitohappobakteeri kuuluu Lactococcus-, Leuconostoc-, Pediococcus- tai Lactoba- cillus-sukuun.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen mene- telmä, t u n n e t t u siitä, että maitohappobaktee- rivalmiste tai maitohappobakteerin tuottama valmiste on saatu Lactococcus lactis-, Leuconostoc mesenteroides-, Pediococcus damnosus-, Pediococcus parvulus-, Pediococ- cus pentosaceus-, Lactobacillus curvatus- tai Lacto-
20 bacillus plantarum-lajista tai näiden seoksesta, edul- lisesti Lactobacillus plantarum- tai Pediococcus pen- tosaceus-lajista tai näiden seoksesta.
- 25 4. Jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ohranjyviin lisätään mallastusprosessin yhteydessä maitohappobak- teerivalmistetta tai maitohappobakteerien tuottamaa valmistetta, jolla on Fusarium-homeiden kasvua estävää vaikutusta.
- 30 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että maitohappobakteerivalmiste tai maitohappobakteerin tuottama valmiste lisätään liotus- tai idätysvaiheessa.
- 35 6. Jonkin patenttivaatimuksista 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että maitohappo- bakteerivalmistetta tai maitohappobakteerin tuottamaa valmistetta lisätään ravinnoksi tarkoitetuiksi iduiksi tuotettavaan siemenmateriaaliin.

PATENTKRAV

1. Förfarande för behandling av för livsmedelsanvändning avsett, industriellt grobart frömaterial, k ä n n e t e c k n a t därav, att till frömaterial
5 terialet tillsätts i samband med groningsprocessen ett mjölksyrebakteriepreparat eller ett av mjölksyrebakterier producerat preparat, vilket har en mikrobers tillväxt förhindrande aktivitet under groningsprocessen.

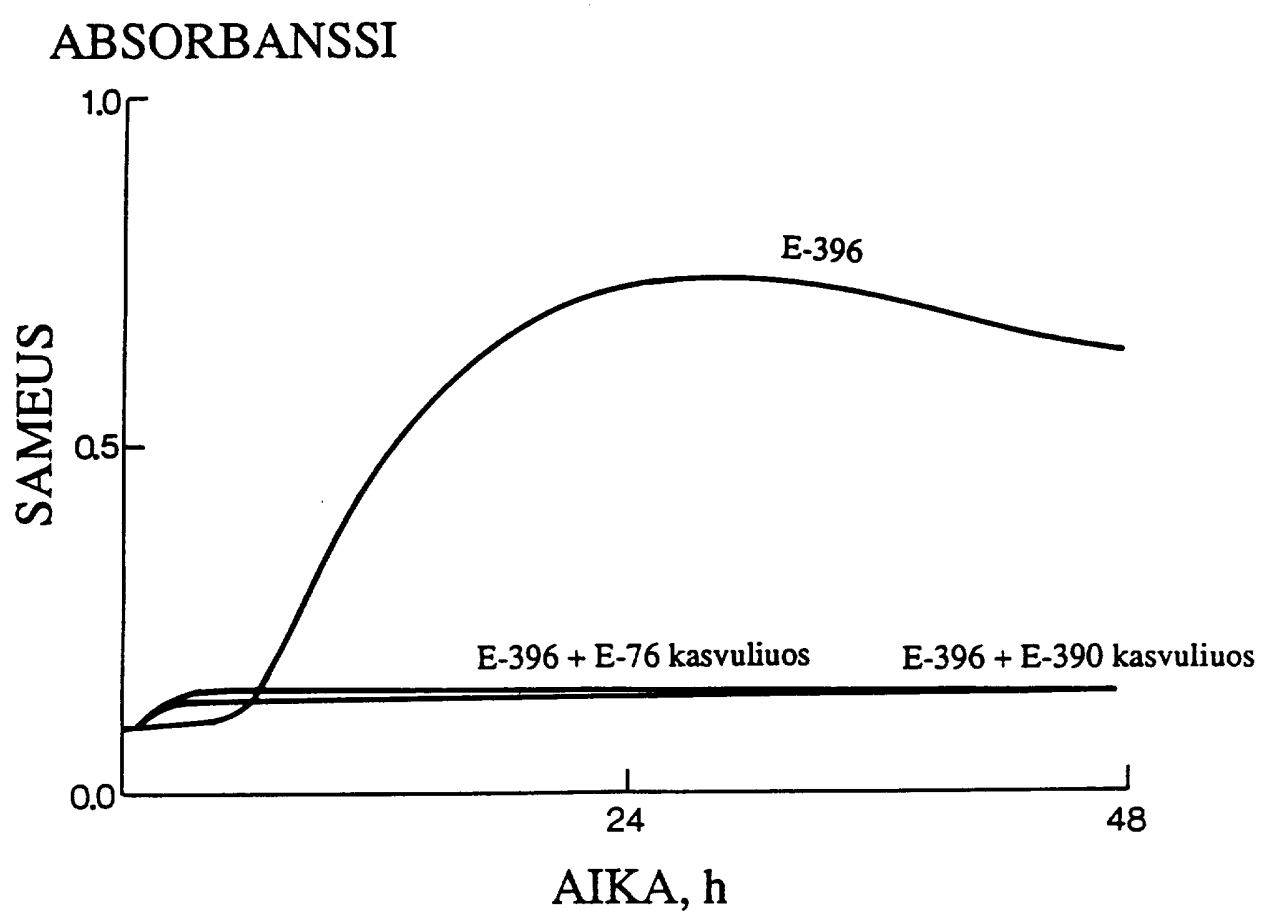
2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att mjölksyrebakterien hör
10 till Lactococcus-, Leuconostoc-, Pediococcus- eller Lactobacillus- släkten.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att mjölksyrebakteriepreparatet eller det av mjölksyrebakterier producerade
15 preparatet har erhållits från Lactococcus lactis-, Leuconostoc mesenteroides-, Pediococcus damnosus-, Pediococcus parvulus-, Pediococcus pentosaceus-, Lactobacillus curvatus- eller Lactobacillus plantarum- arten
20 eller av en blandning av dessa, fördelaktigt Lactobacillus plantarum- eller Pediococcus pentosaceus- arten eller en blandning av dessa.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att till korn av
25 korn tillsätts i samband med mältningsprocessen ett mjölksyrebakteriepreparat eller ett preperet producerat av mjölksyrebakterier, vilket har Fusarium-mögels tillväxt förhindrande aktivitet.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att mjölksyrebakteriepreparatet eller det av mjölksyrebakterier producerade prepa-
30 ratet sätts till i blötlägnings- eller groningsskedet.

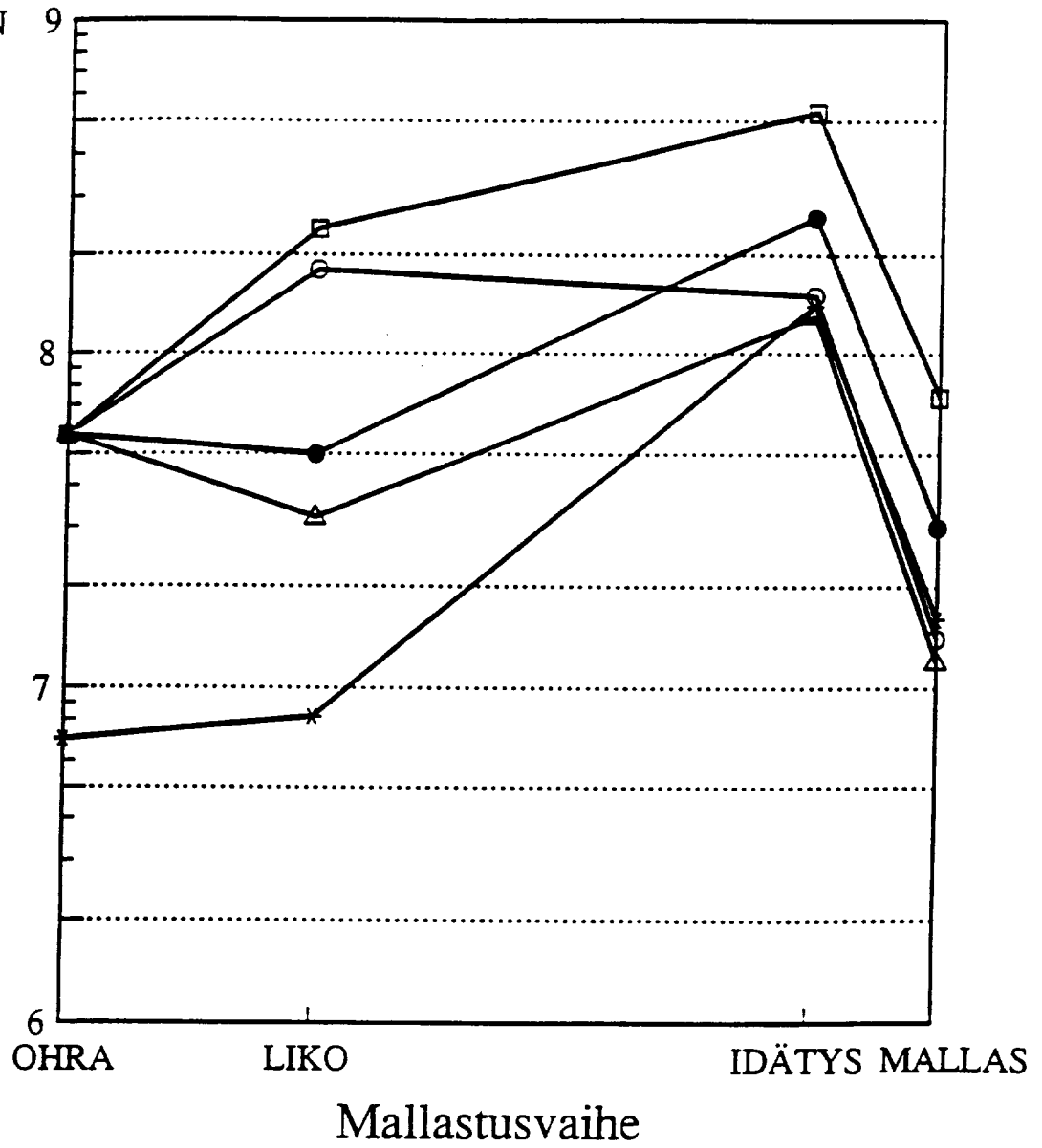
6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att mjölksyrebakteriepreparatet eller det av mjölksyrebakterierna produ-
35 cerade preparatet tillsätts i frömaterial som skall producera groddar avsedda som föda.



Kuva 1

Solutiheys pmy/g

LOGN

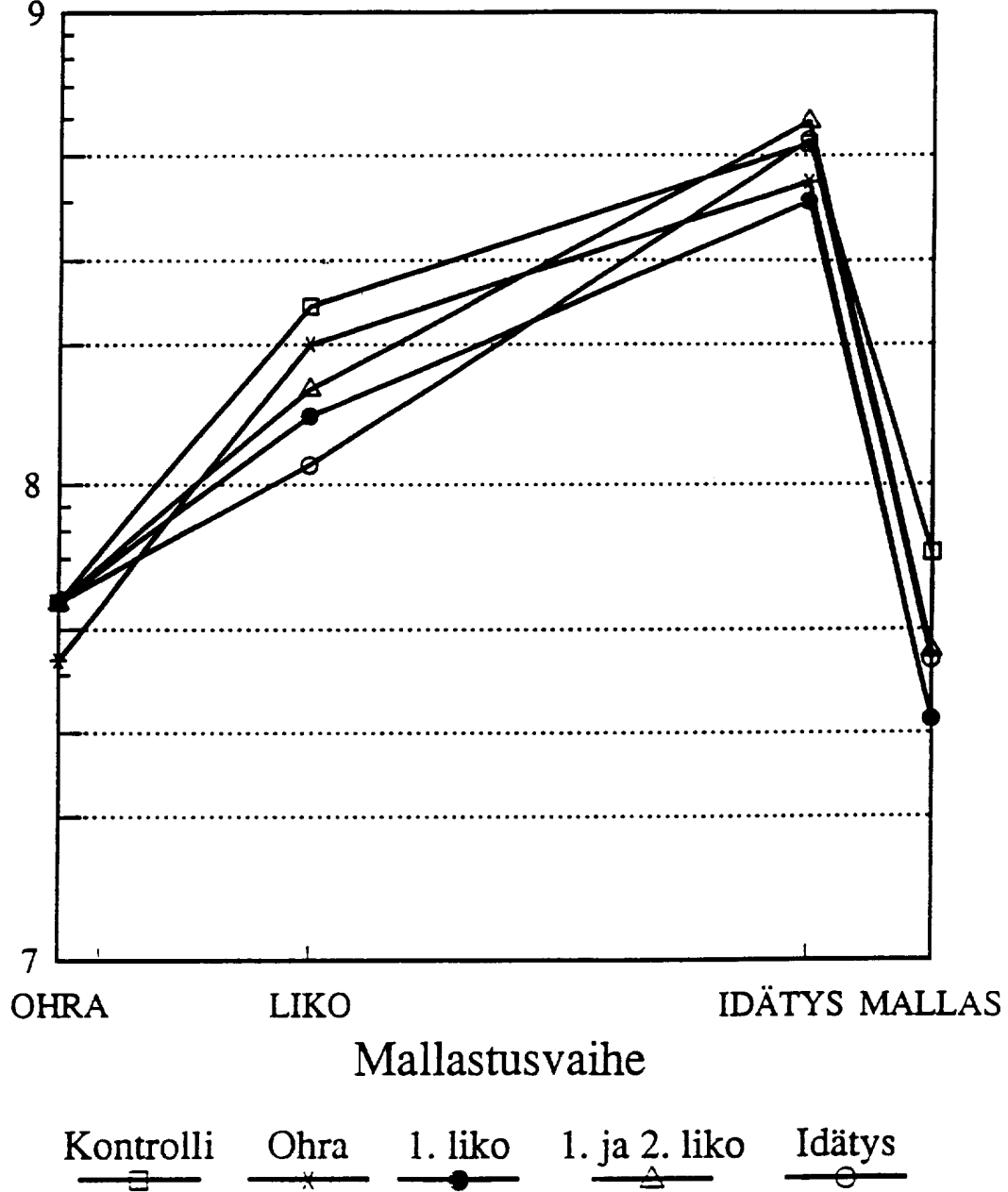


Kontrolli 120 ml ohra 120 ml 1. liko 120 ml 1. ja 2. liko 120 ml idätys

Kuva 2

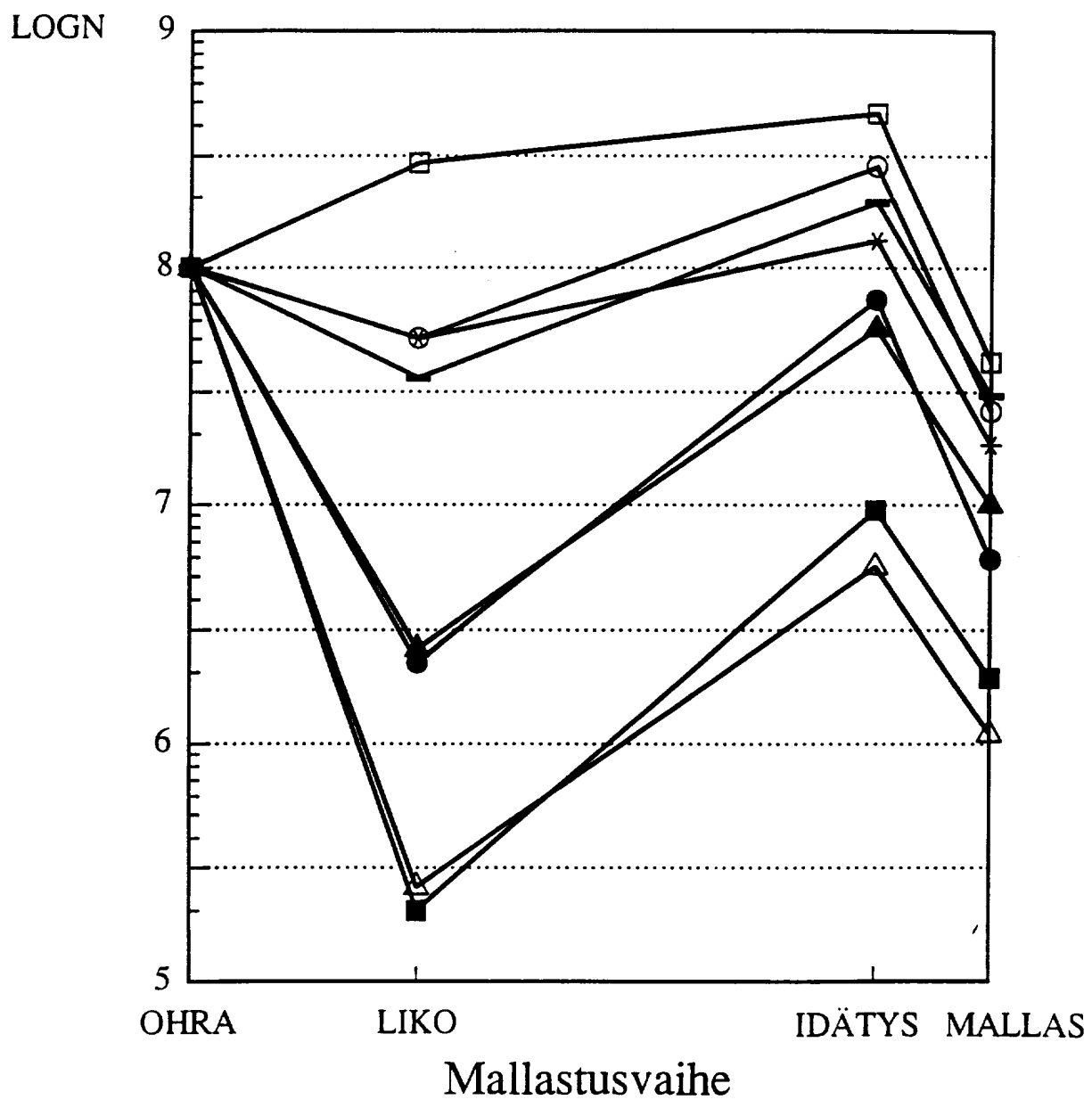
Solutiheys pmy/g

LOGN 9



Kuva 3

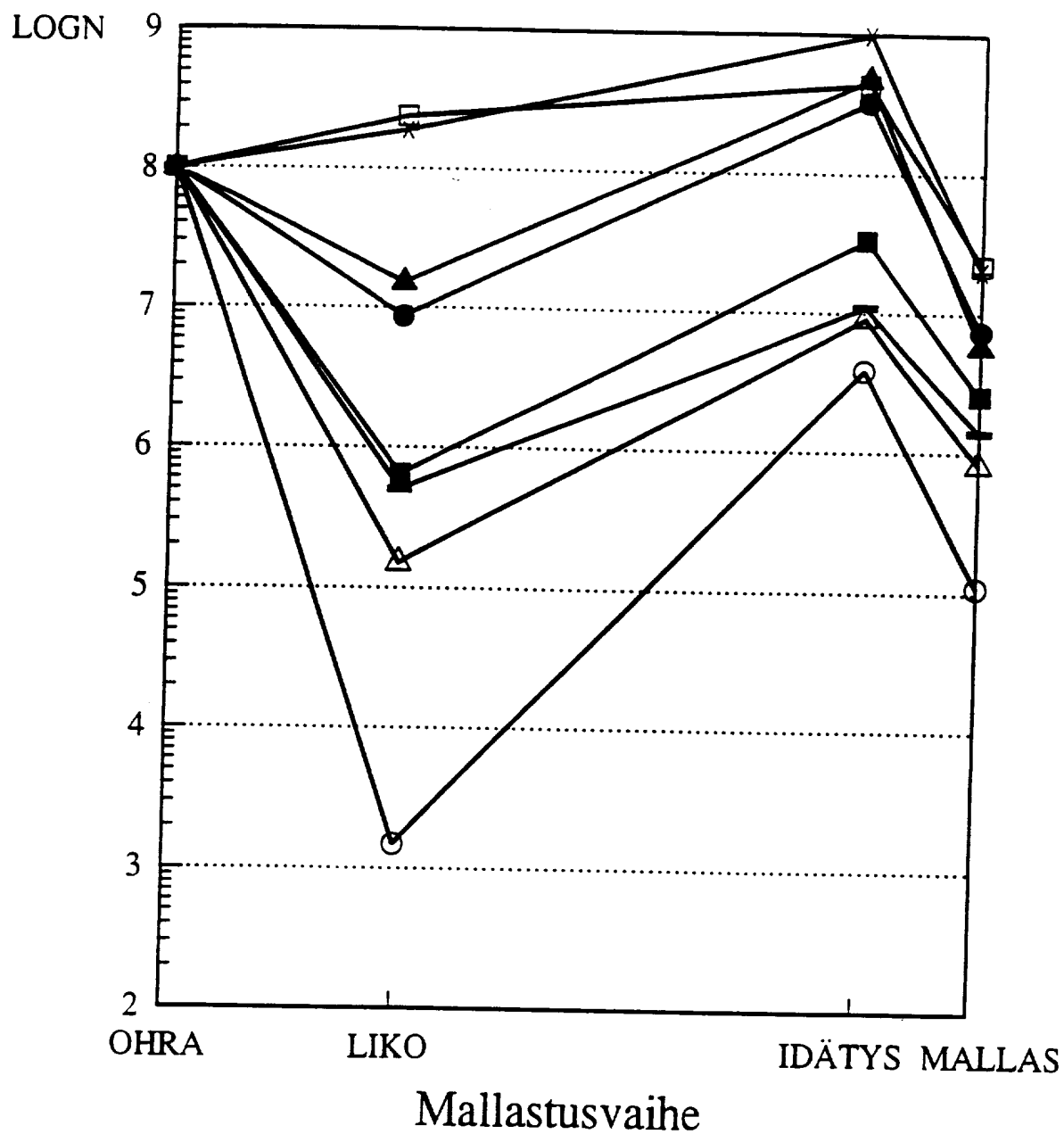
Solutiheys pmy/g



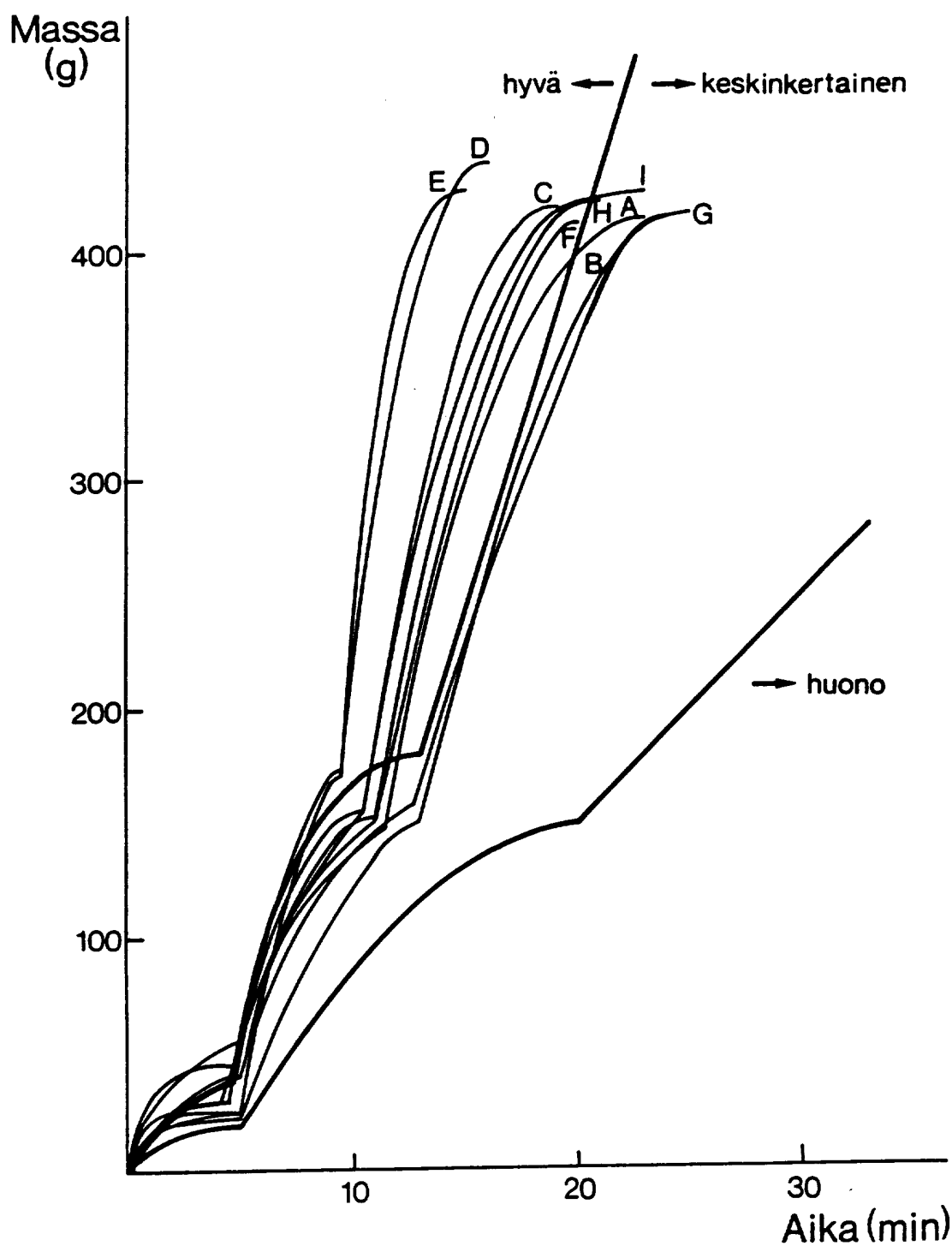
9. Kontrolli 10. E76 kl+solut 1&2. 11. E76 10xkons. 1. liko 12. E76 10xkons. 1&2.
 13. E390 kl.+solut 1&2 14. E390 10xkons. 1. liko 15. E390 10xkons. 1&2. 16. E76 ja E390 1&2.

Kuva 4

Solutiheys pmy/g



17. Kontrolli
—□—
18. H2O pH 3.8 1&2
—x—
19. E76 kl+solut 1&2.
—●—
20. E76 frakt. 1&2.
—△—
21. E76 20xkons. 1&2.
—○—
22. E390 kl&solut 1&2.
—▲—
23. E390 frakt. 1&2.
—■—
24. E390 20xkons. 1&2.
—▬—



- A: Kontrolli
 B: Kontrolli
 C: 120 ml E-390-kasvuliuosta idätykseen
 D: 120 ml E-390 kasvuliuosta 1. ja 2. likoon
 E: 120 ml E-416-kasvuliuosta 1. ja 2. likoon
 F: 120 ml E-76-kasvuliuosta idätykseen
 G: 120 ml E-98-kasvuliuosta idätykseen
 H: 120 ml E-315-kasvuliuosta idätykseen
 I: 120 ml E-317-kasvuliuosta idätykseen