

Povrchová saprofytická mykoflóra pivovarských sladov

JUDITA ŠEPITKOVÁ – ZDENKA JESENSKÁ

Súhrn. Práca uvádza výsledky mykologického sledovania frekvencie výskytu saprofytických vlákňitých mikromycét na povrchu pivovarských sladov vyšetrovaním oplachovej vody. Mykologické analýzy ukázali, že až 90 % vyšetrených vzoriek bolo silne kontaminovaných mikroskopickými vlákňitými hubami.

Z našich výsledkov vyplýva, že v súčasnosti nemožno z aspektu mikrobiálnej kontaminácie uvažovať o znovuvyužívaní máčacích vôd v sladovníckej technológii.

Niektoré kmene vlákňitých mikromycét sú producentmi toxických sekundárnych metabolitov – mykotoxínov, ktoré ohrozujú zdravie človeka i zvierat. Obilné zrná patria k substrátom, ktoré za určitej teploty a vlhkosti poskytujú mikromycétam takmer ideálne podmienky pre rast a produkciu mykotoxínov. K najznámejším mykotoxínom, ktoré boli detegované v cereáliách, patria aflatoxíny, ochratoxín A, toxíny fuzárií a iné [1]. Tak ako obilné zrná aj zrná sladovníckeho jačmeňa sú ešte v klase alebo aj počas skladovania kolonizované tzv. „poľnými“ a počas skladovania „skladiskovými“ mikromycétami. Z hľadiska sladovníctva a pivovarníctva treba v tejto súvislosti vziať do úvahy, že niektoré z mykotoxínov sa podarilo dokázať v pive, a to tak za pokusných, ako aj reálnych podmienok v praxi [2-4].

Doteraz sa nepodarilo detegovať aflatoxín, ochratoxín ani citrinín v pive, ktoré bolo vyrobené v Československu [5, 6], ale už to, že vzorky piva našej výroby pre tento účel analyzovali v Nemeckej spolkovej republike, naznačuje, že silná konkurencia na svetových trhoch so sladovníckym jačmeňom, sladom a pivom sa zostruje aj v tejto oblasti. V budúcnosti sa dá očakávať, že nielen domáci trh, ale najmä zahraniční zákazníci môžu svoje požiadavky na kvalitu pivovarských surovín a piva rozšíriť o limity mykotoxínov. Čo sa týka

RNDr. Judita Šepitková, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

MUDr. Zdenka Jesenská, CSc., Výskumný ústav preventívneho lekárstva, Limbová 14, 833 01 Bratislava.

mikromycét, v zahraničí sa v súčasnosti od subjektívnych metód hodnotenia surovín pivovarského priemyslu začína pristupovať k vyšetrovaniu a orientácii na viac objektívne parametre stanovovania výskytu frekvencie kontaminovaných zŕn jačmeňa a pivovarského sladu použitím mikrobiologických kultivačných metód [7].

V našich predchádzajúcich publikáciách [8, 9] sme sa zaoberali problematikou výskytu mikroskopických vláknitých mikromycét, ktorých zárodky parazitujú vo vnútri zŕn sladovníckeho jačmeňa a sladu v SSR.

Pivovarský slad, správne vysušený a dobre uskladnený, je významnou surovinou pre tuzemský pivovarský priemysel, ale zároveň aj veľmi významným exportným výrobkom najmä do ZSSR, NSR, Švajčiarska a do zámorských štátov, ako je Kuba, Japonsko, Venezuela, Brazília a Filipíny [10]. Počas skladovania, ale aj počas prepravy, a to najmä námornej, môže byť slad s hygroskopickými vlastnosťami vystavený rôznej vlhkosti a teplote, pričom sa zákonite môžu aktivizovať dormantné zárodky mikromycét, ktoré saprofytyujú na povrchu zŕn, môže dôjsť k tvorbe mycélia a prípadne aj k produkcii mykotoxínov.

V predkladanej práci sa venujeme sledovaniu výskytu, frekvencií a identifikácii vláknitých mikromycét, ktoré tvorili súčasť povrchovej saprofytyjúcej mikroflóry zŕn pivovarského sladu v SSR. V odbornej literatúre sme vyhľadali údaje o hodnotách teplôt a vlhkosti, ktoré umožňujú oživenie dormantných spór a tvorbu mycélia.

Materiál a metóda

Počas jesenných mesiacov roku 1985 a jarých mesiacov roku 1986 sme z 8 sladovní v SSR dostali postupne 62 vzoriek pivovarského sladu. Vzorky do nášho laboratória zasielali poštou.

10 g každej vzorky sme nasypali do sterilnej Erlenmayerovej banky, zaliali 50 ml sterilného fyziologického roztoku a 10 minút trepli na laboratórnej trepačke. Fyziologický roztok, t.j. oplachovanú vodu zo zŕn, sme potom riedili dĺučnou metódou sterilným fyziologickým roztokom v pomere 1:10 a 1:100.

„Oplachovanú vodu“ a jednotlivé riedenia sme potom v Petriho miskách očkovali po 0,5 ml na povrch Sabouraudovho agaru s chloramfenikolom a aj na povrch Sabouraudovho agaru so 7,5 % NaCl. Každú vzorku oplachovej vody a jej riedenia sme očkovali na celkový počet 24 Petriho misiek. Polovicu z naočkovaných Petriho misiek sme inkubovali pri teplote 37 °C a druhú polovicu pri teplote 28 °C. Po 5 až 7 dňoch inkubácie sme spočítali kolónie mikroskopických vláknitých húb a kmene identifikovali čo do rodu, prípadne druhu na základe ich makromorfológie a mikromorfológie.

Sabouraudov agar s chloramfenikolom: Sabouraudov agar IMUNA 1000,0 ml.
Chloramphenicol pro ing., SPOFA 0,05 g.

Výsledky

Z vyšetrovaných vzoriek „oplachovej vody“ sme izolovali a identifikovali celkovo 6171 kolónií mikromycét rodu *Moniliales*, okrem kmeňov rodu *Mucorales*, ktoré sa nedali spočítať, pretože väčšinou prerastali celú naočkovанú miskú so Sabouraudovým agarom s chloramfenikolom, ktorý bol inkubovaný pri teplote 28 °C.

Povrch pivovarských sladov bol kontaminovaný zárodkami *Rhizopus*, až 90 % zo 62 vzoriek, 67 % zárodkami *Penicillium* sp., 61 % zárodkami aspergilov skupiny *Aspergillus glaucus* a 40 % vzoriek zárodkami kmeňov *A. flavus*. Zárodky iných druhov, ako sú *Alternaria* sp., *Aspergillus wentii*, *Absidia* sp., *Geotrichum candidum*, *Cladosporium* sp., *Fusarium oxysporum*, zárodky aspergilov skupiny *A. niger*, *A. versicolor*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. can-*

T a b u l k a 1. Mikroskopické vlákňité huby saprofytujúce na povrchu pivovarských sladov
T a b l e 1. Microscopic filamentous fungi living like saprophytes at surfaces of brewer's malts

Huby ¹	Počet pozitívnych vzoriek ²	
	absolútny ³	relatívny ⁴ [%]
<i>Rhizopus</i> sp.	56	90,3
<i>Penicillium</i> sp.	42	67,7
<i>Mucor</i> sp.	40	64,5
aspergily sk. <i>A. glaucus</i>	38	61,2
<i>Aspergillus flavus</i>	25	40,3
<i>Alternaria</i> sp.	12	19,3
<i>Aspergillus wentii</i>	12	19,3
<i>Absidia</i> sp.	8	12,9
<i>Geotrichum candidum</i>	8	12,9
<i>Cladosporium</i> sp.	7	11,2
<i>Fusarium oxysporum</i>	7	11,2
aspergily sk. <i>A. niger</i>	4	6,4
<i>Aspergillus versicolor</i>	4	6,4
<i>Aspergillus clavatus</i>	3	4,8
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3	4,8
<i>Aspergillus candidus</i>	2	3,2
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	1,6
<i>Aureobasidium</i> sp.	1	1,6
<i>Paecilomyces varioti</i>	1	1,6
<i>Syncephalastrum</i> sp.	1	1,6

100 % = 62 vzoriek; 100 % = 62 samples.

¹Fungi; ²Number of positive samples; ³Absolute number; ⁴Relative number.

T a b u l k a 2. Vlákňité mikromycéty parazitujúce vo vnútri zŕn sladovníckeho jačmeňa a pivovarského sladu (A) a saprofytyjúce na povrchu zŕn pivovarského sladu (B)

T a b l e 2. Filamentous mycomycetes parasitizing within the corns of malting barley and brewer's malt (A) and living like saprophytes at the corn surface of malting barley (B)

Poradie výskytu ¹	A ^a		B
	Mikromycéty (výskyt kontaminovaných vzoriek) ² [%]		
	sladovnícky jačmeň ^{a3}	pivovarský slad ^{b4}	pivovarský slad ^{c4}
1	aspergily sk. <i>A. glaucus</i> (96 %)	aspergily sk. <i>A. glaucus</i> (100 %)	<i>Rhizopus</i> sp. (90 %)
2	<i>Penicillium</i> sp. (94 %)	<i>Penicillium</i> sp. (98 %)	<i>Penicillium</i> sp. (67 %)
3	<i>Alternaria</i> sp. (83 %)	<i>A. flavus</i> (74 %)	<i>Mucor</i> sp. (64 %)
4	<i>A. flavus</i> (49 %)	<i>Rhizopus</i> sp. (58 %)	aspergily sk. <i>A. glaucus</i> (61 %)
5	<i>A. versicolor</i> (41 %)	<i>Alternaria</i> sp. (54 %)	<i>A. flavus</i> (40 %)

^aPodľa [15], upravené. ^b100 % = 51 vzoriek, ^c100 % = 62 vzoriek oplachovej vody (priemyselne mycie vody).

^aAccording to [15], adjusted. ^b100 % = 51 samples, ^c100 % = 62 samples of rinse water (industrial washing waters).

¹Sequence of occurrence; ²Micromycetes (occurrence of contaminated samples); ³Malting barley; ⁴Brewer's malt.

didus, *A. nidulans*, *Aureobasidium pullulans*, *Paecilomyces varioti* a *Syncephalastrum* sp., sa vyskytovali v „oplachovej vode“ zriedkavejšie až ojedinele (tab. 1 a 2).

Diskusia

Sladovníctvo a pivovarníctvo sú dôležitými rezortmi nášho potravinárskeho priemyslu. Neustále sa zvyšujú nároky na kvalitu surovín, ktoré sú potrebné na výrobu piva, a súčasne s tým kladie veľký dôraz aj na možnosti tradičného exportu nášho kvalitného pivovarského sladu do mnohých krajín sveta [10].

Veľmi náročné podmienky nákupu sladovníckeho jačmeňa, výroby a skladovania sladu a výroby piva treba zosúladiť aj s najnovšími poznatkami o úlohe vláknitých mikromycét a ich toxických sekundárnych metabolitov.

V našej práci, ktorú sme rozdelili na niekoľko etáp, sme roku 1984 a 1985 sledovali výskyt mikroskopických vláknitých húb, ktoré parazitovali vo vnútri zŕn sladovníckeho jačmeňa a sladu v SSR [8, 9].

V tabuľke 2, ktorá je zostavená skrátené z našich predchádzajúcich výsledkov a terajších nálezov, možno zreteľne vidieť určitú dynamiku vo výskyte vláknitých mikromycét v parazitickej a saprofytickej fáze. Ukazuje sa, že zárodoky aspergilov skupiny *A. glaucus* sú významnými parazitmi skladovaného sladovníckeho jačmeňa aj sladu, zriedkavejšie však saprofytyjú na povrchu

zrn sladu. Zárodoky *Alternaria* sp. boli najčastejšie izolované z rastlinného tkaniva zrn sladovníckeho jačmeňa, zriedkavejšie zo zrn sladu, na povrchu sladu saprofytujú iba ojedinele. Významnými predstaviteľmi kolonizácie všetkých vyšetrovaných vzoriek sú kmene *Penicillium* sp. a *Aspergillus flavus*. Súčasťou povrchovej mykoflóry sladov sú predovšetkým zárodoky fykomycét – *Rhizopus* sp. a *Mucor* sp.

Výskyt a množstvo jednotlivých zárodokov mikromycét na obilninách je závislý od podmienok skladovania, od hodnôt aktivity vody (a_w), od možnosti spontánneho samozohrievania, od prevzdušňovania skládky zrn a pod. *Aspergillus restrictus* sa na zrnách jačmeňa rozrášťa pri $a_w = 0,65-0,70$. *Aspergillus* skupiny *A. glaucus* pri $a_w = 0,75-0,93$. Nad hodnotou $a_w = 0,85$ začína v skladovanom jačmeni proces samozohrievania a pri teplote $t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ dominujú v týchto vzorkách zárodoky druhov *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum*, *A. versicolor* a *A. candidus*. pri $a_w = 0,90-0,95$ a teplote $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ termotolerantné druhy *P. funiculosum*, *P. capsulatum*, *P. picum*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. fumigatus* a *Absidia corymbifera*. Nad hodnotou $a_w = 0,85$ a pri teplote $t = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ prevládajú druhy *Humicola lanuginosa* a *Rhizomucor pusillus*.

Fykomycéty rodov *Mucor* sp. a *Rhizopus* sp. sú v zrnách prítomné vtedy, ak je životaschopnosť zrn znížená alebo celkom zredukovaná, niektoré druhy týchto rodov si pre svoj rast vyžadujú pomerne vysoké hodnoty a_w ($0,90-0,95$). Dormantné zárodoky mikromycét majú pre svoju aktivizáciu osobitné požiadavky. Tak napr. pri teplote $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pH 6,5 kľčia spóry *A. repens* pri hodnote $a_w = 0,72$ *A. versicolor* pri $a_w = 0,77$, *A. amstelodami* pri $a_w = 0,73$, *A. candidus* pri $a_w = 0,76$. *Penicillium brevicompactum* a *P. verrucosum* var. *verrucosum* pri $a_w = 0,80$, *P. hordei* a *A. nidulans* pri $a_w = 0,82$, *P. roqueforti* pri $a_w = 0,83$, *P. piceum* pri $a_w = 0,84$, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* a *Cladosporium herbarum* pri $a_w = 0,86$, *Fusarium culmorum* pri $a_w = 0,87$ a *A. fumigatus* pri $a_w = 0,96$ [11–15].

Z uvedeného vyplýva, že sa dá takmer objektívnymi mikrobiologickými metódami objasniť, ako sa s jačmeňom a sladom narábalo pri zbere a po ňom, aká starostlivosť sa venovala skladovaniu týchto obilných zrn a v neposlednom rade sa dá takmer s istotou predpokladať, ktoré z toxických sekundárnych metabolitov mikromycét by sa mohli v týchto substrátoch vyskytovať.

Ak má slad, ktorý má iné zloženie ako zrná jačmeňa, možnosť adsorbovať z ovzdušia vlhkosť, začínajú sa pomnožovať predovšetkým aspergily zo skupiny *A. glaucus*, neskôr zárodoky druhov *A. candidus*, *A. versicolor*, potom *Penicillium* sp. [7]. Zistilo sa, že vzorky sladov z Dánska, Anglicka a Fínska sú kontaminované kmeňmi *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *A. fumigatus* a *A. amstelodami*, *A. flavus* sa vyskytovali sporadicky [12].

Z výsledkov našich mykologických analýz vyplýva, že na povrchu zrn tu-

zemských pivovarských sladov saprofytujú rôzne druhy zárodkov mikroskopických vlákňitých húb. Ak sú však slady skladované za podmienok, že vlhkosť zrna neprekročí viac ako 7 % (ČSN 56 6610), mali by všetky slady zachovať, čo do potenciálneho výskytu mykotoxínov, takú kvalitu, ako mala základná surovina – sladovnícky jačmeň, prípadne jačmeň počas technologického procesu sladovania. K plesniveniu zŕn pivovarského sladu by nemalo vôbec dochádzať. ČSN 56 6610 uvádza však ďalšie analytické znaky, napr. počet povolených plesnivých zŕn pri pivovarských sladoch. Tieto určené limity nezodpovedajú skutočnému stavu kontaminácie pivovarských sladov zárodkami mikroskopických vlákňitých húb. V záujme domáceho trhu, ale aj exportu kvalitných pivovarských sladov, bude treba v blízkej budúcnosti hľadať spôsob inkorporácie nových vedeckých poznatkov aj o problematike mikroskopických vlákňitých húb a mykotoxínov do praxe i štátnych noriem. Naša práca, v ktorej sme sa venovali saprofytickej mykoflóre pivovarských sladov, je iba prvým stupňom tohto potrebného procesu.

Literatúra

- [1] SPICHER, G., *Swiss Food*, 3, 1981, č. 9, s. 31.
- [2] CHU, F. S. – CHANG, C. C. – ASHOOR, S. H. – PRENTICE, N. *Appl. Microbiol.*, 29, 1975, č. 3, s. 313.
- [3] KROGH, P. – HALD, B. – GJERTSEN, P. – MYKEN, F., *Appl. Microbiol.*, 28, 1974, č. 1, s. 31.
- [4] PAYEN, J. – GIRARD, T. – GAILLARDIN, M. – LAFONT, P., *Microbiologia–Aliments–Nutrition*, 1, 1983 č. 2, s. 143.
- [5] MAJERUS, P. – WOLLER, R., *M Schr. Brauwiss.*, 36, 1983, č. 8, s. 335.
- [6] WOLLER, R. – MAJERUS, P., *M Schr. Brauwiss.*, 35, 1982, č. 4, s. 88.
- [7] FLANNIGAN, B. – OKAGBUE, R. N. – TECH, C. K., *Brewing et Distill. int.*, 12, 1982, č. 6, s. 31.
- [8] ŠEPITKOVÁ, J. – JESENSKÁ, Z., *Bull. PV*, 24 (4), 1985, č. 2–3, s. 143.
- [9] ŠEPITKOVÁ, J. – JESENSKÁ, Z., *Bull. PV*, 25 (5), 1986, č. 2, s. 141.
- [10] ŘEHÁK, J., *Kvasný Prům.*, 30, 1984, č. 12, s. 268.
- [11] CLARKE, J. H. – HILL, S. T., *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 77, 1981, č. 2, s. 557.
- [12] GYLLANG, H. – MARTINSON, E., *J. Inst. Brew.*, 82, 1976, č. 6, s. 350.
- [13] HILL, R. A. – LACEY, J., *Ann. appl. Biol.*, 102, 1983, č. 3, s. 467.
- [14] MAGAN, N. – LACEY, J., *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 82, 1984, č. 1, s. 71.
- [15] ŠEPITKOVÁ, J. – JESENSKÁ, Z.: K problematike vlákňitých mikromycét v potravinárskych surovinách, (v tlači).

Поверхностная сапрофитная микрофлора пивоваренных солодов

Резюме

В работе приведены результаты микологического исследования колебания встречаемости сапрофитных волокнистых микромицетов на поверхности пивоваренных солодов с помощью обследования промывной воды. Микологические анализы показали, что целых 90 % обследованных проб было загрязнено микроскопическими волокнистыми грибами.

Из наших результатов вытекает, что в нынешнее время немыслимо с точки зрения микробиального загрязнения рассуждать о возобновлении применения промывной воды в технологии производства солода.

Surface saprophytic mycoflora of brewer's malt

Summary

The investigation of the frequency of saprophytic filamentous mycomycete at the surface of brewer's malt is described in this paper. Properties of rinse water were studied. Mycological assays have shown that as many as 90 % of the investigated samples were highly contaminated with microscopic filamentous fungi.

Our results lead to the conclusion that it is not possible to count with reutilization of steep waters in malt technology.