

Analýza mykoflóry sladovníckeho jačmeňa a sladu I. Poľné mikromycéty

JUDITA ŠEPITKOVÁ — ZDENKA JESENSKÁ

Súhrn. Práca prináša výsledky vyšetrení vnútornej mykoflóry zŕn sladovníckeho jačmeňa a sladu. Pozornosť sa zamerala najmä na výskyt tzv. poľných vláknitých húb, predovšetkým z rodu *Fusarium* sp. Výskyt zŕn, kontaminovaných poľnými mikromycétami z úrody obilia roku 1984 bol veľmi nízky, častejšie boli vzorky celkom negatívne. Navrhuje sa doplniť ukazovatele kvality sladovníckeho jačmeňa a sladov o mykologické vyšetrenie, perspektívne aj o analýzu týchto substrátov na mykotoxíny.

Zrná cereálií sú bohaté na škrob a slúžia na výživu človeka a zvierat. Vo svetovom meradle kryjú 50—65 % energetických potrieb človeka. Obilné zrná sú ideálnym prostredím pre rozvoj mikroorganizmov, pretože okrem škrobu obsahujú aj väčšie množstvo bielkovín, minerálnych látok a vitamínov.

K prvej kontaminácii zŕn mikroorganizmami dochádza na povrchu zŕn počas rastu obilní — je to tzv. epifytná alebo sprievodná mikroflóra. Živou pôdou tejto mikroflóry sú prirodzené metabolity látkovej výmeny rastlinných buniek a povrchové znečistenie, napr. prach. Dôležitou časťou týchto mikroorganizmov sú zárodky mikroskopických vláknitých húb, laicky sa tieto huby nazývajú plesňami. Niektoré z nich saprofytujú na povrchu zrna, iné sú však parazitmi a ich hýfy prerastajú viac alebo menej do vnútra zrna. Poľné huby z rodu *Alternaria* invadujú iba povrchové vrstvy zrna, a to takmer všetky zrná bez ohľadu na klimatické podmienky. Vysokopatogénne a invázivne kmene fuzárií napádajú v poľných podmienkach značnú časť úrody obilných zŕn najmä za daždičného a chladného počasia. Roku 1980 sa v určitých oblastiach SSR pri nepriaznivom počasí počas dozrievania obilia vyskytlo až 80 % zŕn napadnutých kmeňmi rodu *Fusarium* [1].

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.

Pri skladovaní obilných zrín dochádza postupne k úbytku životaschopných zárodkov poľných mikromycét, ale pomnožujú sa tzv. skladiskové mikroskopické vláknité huby. Tieto huby pri nedodržaní zodpovedajúcich technologických postupov pri skladovaní obilných zrín spôsobujú plesnivenie a potuchnutie zrna, rozklad stavebných štruktúr a v konečnom dôsledku vedú k znehodnote-niu úrody.

Zdravotného hľadiska je však dôležité, že mikroskopické vláknité huby sú významnými producentmi toxickej, rakovinotvorných, malformačných a teratogénnych metabolitov, tzv. mykotoxínov [2]. Týmto mykotoxínom sa v celosvetovom meradle venuje značná pozornosť [3]. Okrem iných mykotoxi-nov boli v prirodzené kontaminovaných cereáliách detegované najmä aflatoxíny, ochratoxín A, citriníny, sterigmatocystín, zearalenón a rôzne trichotecény (tab. 1) [4].

Zárodky poľných húb kmeňov rodu *Fusarium* produkujú za určitých pod-mienok značne toxicke mykotoxíny trichotecénovej štruktúry, ako sú napríklad toxín T-2, diacetoxyscirpenol, nivalenol, vomitoxín, fuzarenón a estrogénne pôsobiaci zearalenón (tab. 2) [1, 4]. Kmene rodu *Alternaria* sú známe ako pro-ducenti kyseliny tenuazónovej, ktorá sa však za experimentálnych podmienok javí ako stredne toxiciká. Táto kyselina bráni inkorporácii aminokyselín do novovznikajúcich proteínov na ribozómoch alebo interferuje s uvoľňovaním novovznikajúcich bielkovín z ribozómov, ovplyvňuje teda do značnej miery pro-teosyntézu [5].

Prepokladá sa, že počas II. svetovej vojny z toxínov fuzárií zapríčinil najmä toxín T-2 mnohé prípady intoxikácie ľudí v ZSSR po dlhodobejšom požívaní kontaminovaných cereálií, tzv. toxickej alimentárnej aleukiu [6, 7].

V praxi zatiaľ nepoznáme jednoduchý spôsob eliminácie mykotoxi-nov z kontaminovaných cereálií. Preto treba sústavne sledovať výskyt mikroskopických vláknitých húb v týchto substrátoch a usmerňovať poľnohospodársku vellkovýrobu a skladovanie obilia tak, aby sa zabránilo pomnožovaniu plesní na obil-ných zrnách a prenikaniu hubami napadnutých a poplesniveliých substrátov do potravinového reťazca. Zatiaľ iba tento jediný postup umožňuje chrániť zdravie konzumentov pred toxickejmi účinkami mykotoxi-nov.

Sledovanie mykoflóry sladovníckeho jačmeňa a sladu má značné dôsledky aj v ekonomickej oblasti, a to najmä v súvislosti s exportom nášho sladu na svetové trhy. V súčasnosti už mnoho vyspelých krajín je schopných, na základe analýz a stanovených limitov prípustného množstva mykotoxi-nov v potra-vinových substrátoch, zabrániť potenciálnemu riziku ohrozenia zdravia svojich občanov toxickejmi metabolitmi mikroskopických vláknitých húb [8].

Cieľom našej práce bolo urobiť prvý raz v SSR monitorovanie mykoflóry sladovníckeho jačmeňa a sladu. V tejto časti monitorovania sme sa zamerali najmä na vnútornú poľnú mykoflóru a podmienky kultivácie sme prispôsobili

izolácií poľných hub z rodu *Fusarium*. Okrem toho sme sledovali aj výskyt zín kontaminovaných kmeňmi rodu *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* a inými mikromycetami.

Tabuľka 1. Výskyt mykotoxínov v cereáliach (Spicher, 1981 — upravené)
Table 1. Incidence of mycotoxins in cereals (Spicher, 1981 — adjusted)

Mykotoxín ¹	Pšenica ¹²	Raž ¹³	Jačmeň ¹⁴	Ovos ¹⁵	Kukurica ¹⁶	Ryža ¹⁷	Proso ¹⁸
aflatoxín ²	+		+	+	+	+	+
citrinín ³	+	+	+	+			
kyselina kojová ⁴					+		
luteoskyrin ⁵					+		
ochratoxín A ⁶	+	+	+	+	+		
patulin ⁷	+						
kyselina					+		
penicílioová ⁸							
sterigmato-							
cystin ⁹	+					+	
trichotecény ¹⁰	+	+	+	+	+		+
zearalenón ¹¹	+	+	+	+	+		

¹Mycotoxin; ²Aflatoxin; ³Citrinin; ⁴Kojic acid; ⁵Luteoscyrin; ⁶Ochratoxin A; ⁷Patulin; ⁸Penicillio acid; ⁹Sterigmatocystin; ¹⁰Trichothecenes; ¹¹Zearalenone; ¹²Wheat; ¹³Rye; ¹⁴Barley; ¹⁵Oat; ¹⁶Maize; ¹⁷Rice; ¹⁸Millet.

Tabuľka 2. Najčastejšie sa vyskytujúce *Fusarium* sp. na cereáliach a ich schopnosť produkovať zearalenón a trichotecény (Spicher, 1981 — upravené)

Table 2. The most frequently occurring *Fusarium* sp. on cereals and their ability to produce zearalenone and trichothecenes (Spicher, 1981 — adjusted)

<i>Fusarium</i> sp.	T-toxín ¹	Diacetoxyscirpenol ²	Vomitoxín ³	Nivalenol ⁴	Zearalenón ⁵
<i>F. equiseti</i>		+			
<i>F. moniliforme</i>			+		+
<i>F. nivale</i>					+
<i>F. poae</i>	+	+			
<i>F. avenaceum</i>			+		+
<i>F. culmorum</i>					+
<i>F. graminearum</i>		+			+
<i>F. sporotrichioides</i>	+	+			+
<i>F. tricinctum</i>	+		+		+
<i>Fusarium</i> sp.				+	

¹T-toxin; ²Diacetoxyscirpenol; ³Vomitoxin; ⁴Nivalenol; ⁵Zearalenone.

Materiál a metodika

Od októbra do konca decembra 1984 sme zo sladovní SSR obdržali a experimentálne analyzovali 27 vzoriek sladovníckeho jačmeňa a 19 vzoriek sladu. Celkovo sme mykologicky vyšetrali 9200 obilných zŕn.

Ďalšie vzorky sladovníckeho jačmeňa a sladu sa v našom laboratóriu kontinuálne spracúvajú a analyzujú na tzv. skladiskové huby.

Zrná jačmeňa a sladu sme povrchovo sterilizovali v 5 % vodnom roztoku chlórrnanu sodného 5 minút a potom trikrát za sebou prepláchli sterilnou destilovanou vodou.

Vzorky jačmeňa a sladu — po 200 zrniek z každej vzorky — sme po 20 zrnkách rozložili na povrch zemiakového agaru s glukózou a chloramfenikolom (potato-dextrose agar Oxoid 1000 ml, Chloramphenicol pro inj. SPOFA 0,05 g) v 10 Petriho miskách.

Vzorky sladu — po 200 zrniek z každej vzorky — sme po 20 zrnkách rozložili na povrch Sabouraudového agaru (IMUNA) so 7,5 % NaCl v 10 Petriho miskách.

Naočkované sústavy sme inkubovali 10—14 dní pri laboratórnej teplote, potom stanovili počet kontaminovaných zŕn a reprezentatívne kolónie mikroskopických vláknitých húb sme identifikovali na základe ich morfológie. Počet kontaminovaných zŕn sme prepočítali na relatívne hodnoty (%).

Výsledky a diskusia

Hlavným zameraním našej experimentálnej práce bolo sledovať výskyt rodu *Fusarium* v sladovníckom jačmeni a slade z úrody roku 1984. Výskyt zŕn kontaminovaných týmto rodom bol veľmi nízky. Pri väčšine vzoriek boli výsledky izolácie negatívne. *Fusarium graminearum* kontaminovalo najviac 6 % zŕn vo vzorke sladovníckeho jačmeňa 6 a 4 % zŕn vo vzorke 2, *F. oxysporum*, ale najviac 55 % zŕn sladu vo vzorke 3. Okrem týchto druhov fuzárií boli ojedinele izolované kmene *F. culmorum* a *F. poae*. Kmene *Alternaria* sp. kontaminovali priemerne 78, 2 % zŕn sladovníckeho jačmeňa, ale priemerne iba 7,7 % z výšetrených zŕn sladu. Pri kmeňoch rodu *Penicillium* sp. mal tento vzťah opačný charakter, penicíliá sladovníckeho jačmeňa kontaminovali priemerne 6,0 % zŕn a sladu priemerne 25,2 % zŕn. Všetky zrná sladovníckeho jačmeňa vzorky 22 boli kontaminované spolu s alternáriami tiež penicíliami, zo 4 zŕn sme ešte naviac izolovali kmene *F. graminearum* a z 1 zrna aj *F. oxysporum*. Bol to názorný príklad toho, že zrno môže byť súčasne napadnuté viacerými druhmi

mikromycét. *Aspergillus flavus* invadoval až 46 % zrn sladu vzorky 18. Pri iných vzorkách bol jeho výskyt pomerne zriedkavý. Zo 4 vzoriek sladu sme veľmi často izolovali *A. clavatus* (26—55 % kontaminovaných zrn). Menej častý, až ojedinelý bol výskyt kmeňov *Geotrichum candidum*, *Epicoccum* sp., *Trichoderma* sp., *Aureobasidium* sp., *Aspergillus janus*, *A. wentii*, *A. versicolor*, aspergily skupiny *A. niger* a *Drechslera* sp. Nepríjemne sa na živných pôdach rozrastali kmene *Rhizopus* sp., pri niektorých vzorkách celkom zabránili možnosti stanoviť pomalšie rastúce mikromycéty (tab. 3, 4).

Tabuľka 3. Vnútorná mykoflóra sladového jačmeňa (žatva roku 1984)
Table 3. Internal mycoflora of malt barley (harvest of 1984)

Vzorka ¹	Mikroskopické vláknité huby ²						
	A	PNC	FC	FG	FP	FO	AF
	% kontaminovaných zrn ³						
1	100	1,5					
2	91,5			4		1,5	
3	94	4,5					
4	88,5	2					
5	82	0,5					
6	88,5	2,5					
7	96	3,5					
8	93	1					
9	93,5	2,5			0,5		
10	43,5	3				1	
11	39			6		1	
12	60	2					
13	74,5						
14	96	1					0,5
15	91	1					
16	74	2					
17	94						
18	38	23		1			0,5
19	35	7	1	1		3	2
20	76	2					
21	52			1,5			
22	100	100		.2		0,5	
23	44						4
24	87	3,5				1	5
25	99	0,5				0,5	1
26	83						2
27	99			2			0,5
\bar{x}	78,2	6,0		0,6		0,3	0,6

A — *Alternaria* sp., PNC — *Penicillium* sp., FC — *Fusarium culmorum*, FG — *F. graminearum*, FP — *F. Poae*, FO — *F. oxysporum*, AF — *Aspergillus flavus*.

Ojedinelý výskyt kmeňov — Sporadic incidence of the strains: *Trichoderma* sp., *Epicoccum* sp., *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus* skupiny — of the group *A. niger*, *Drechslera* sp.

Nespočitatelné množstvo — Countless number of: *Rhizopus* sp.

¹Sample; ²Microscopic filamentous fungi; ³Contaminated grains in %.

Tabuľka 4. Vnútorná mykoflóra sladov (žatva roku 1984)
Table 4. Internal mycoflora of malts (harvest of 1984)

Vzorka ¹	Mikroskopické vláknité huby ²					
	A	PNC	FO	FG	AF	AC
	% kontaminovaných zŕn ²					
1		19,5				
2		8				
3		23		55		
4		46				
5		100			0,5	
6		60				
7		45				26
8		34				40
9	30	20,5			1	38
10	8	7			2	2
11	67	88,5				1
12		9				55
13	19	20				
14a						
15a						
16a						
17a						
18	23	5			46	
19a						
\bar{x}	7,7	25,5			2,5	8,5

A — *Alternaria* sp., PNC — *Penicillium* sp., FO — *Fusarium oxysporum*, FG — *F. graminearum*, AF — *Aspergillus flavus*, AC — *A. clavatus*.

a — misky boli celkom prerastené kmeňmi *Rhizopus* sp.

a — the strains *Rhizopus* sp. have spread all over the dishes.

Ojedinelý výskyt kmeňov — Sporadic incidence of the strains: *Geotrichum candidum*, *Epicoccum* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus janus*, *Aureobasidium* sp.

^{1—3}See Table 3.

Celkovo sa dá na základe vyšetrených vzoriek rekapitulovať, že kvalita sladovníckeho jačmeňa a sladov získaných z jednotlivých sladovní SSR zo žatvy roku 1984 po stránke mykologickej bola vyhovujúca, a to z aspektu potenciálneho rizika ohrozenia zdravia konzumentov výrobkov z tohto substrátu toxic-kými metabolitmi tzv. poľných mikroskopických vláknitých hub z rodu *Fusarium*.

Čo sa týka sladov, oproti sladovníckemu jačmeňu zreteľne vidieť nárast kontaminácie zrniek najmä kmeňmi rodu *Penicillium* sp., t. j. skladiskovými mikromycétami, čo si bude vyžadovať ďalšie sledovanie najmä z hľadiska potenciálnej prítomnosti ochratoxínu A.

Obilné zrná sú pre človeka základnou potravinárskou surovinou. Ako sme uviedli, významnú súčasť mikroflóry zŕn tvoria mikroskopické huby. Zastúpenie jednotlivých druhov a rodov ovplyvňujú určité zákonitosti. Ako najdôleži-

tejšie sa rozlišujú dve hlavné skupiny mikromycét, a to mikromycéty poľné a mikromycéty skladiskové. Pretože toxické metabolity mikroskopických húb ohrozujú zdravie človeka, začína sa venovať týmto problémom pozornosť aj z aspektu výskumu kvality sladovníckeho jačmeňa a z neho vyrobeného sladu. Z technologického hľadiska ohrozenie nadmerné pomnoženie mikromycét okrem iného aj výsledky pracovného postupu v sladovníckom priemysle [9]. Hlavný podiel na nadmernom pomnožení húb na sladovníckom jačmeni majú dva základné faktory, a to sú vlhkosť a teplota. Rôzne druhy mikromycét počas skladovania reagujú značne na zdanlivo malé rozdiely napríklad v hodnotách aktivity vody (a_v). Pri hodnote $a_v = 0,65$ až $0,7$ sa na skladovanom jačmeni pomnožujú napríklad zárodky druhu *Aspergillus restrictus*, pri $a_v = 0,75$ aspergil by skupiny *A. glaucus*, pri hodnote $a_v = 0,85$ dochádza k samozohrievaniu zrín a pomnožujú sa termotolerantné a termofilné zárodky rôznych druhov aspergilov, penicílií, ako aj absídie. Pri $a_v = 0,95$ a teplote 65°C sú v jačmenných zrnach prítomné najmä zárodky kmeňov *Humicola lanuginosa* a *Rhizopus pussillus* a pod. [10].

V našej práci sme prvýkrát v SSR sledovali v sladovníckom jačmeni a slade výskyt tzv. poľných mikromycét, s hlavným zameraním na rod *Fusarium*. Štúdium sa bude kontinuálne v ďalšej práci zameriavať aj na tzv. skladiskové mikromycéty. Nadviazali sme na poznatky o výskyti fuzárií v obilných zrnach v SSR v rokoch 1980 a 1981 [1, 11].

Detailné štúdiu bolo treba vykonať v súvislosti so zistením, že v zahraničí analyzovali československé vzorky a výrobky pivovarníckeho priemyslu, a to zatiaľ na prítomnosť aflatoxínu, ochratoxínu a citrinínu. Výsledky boli zatiaľ negatívne [12, 13]. Pri vyšetrení vzoriek piva iného pôvodu sa však v tekutine zistil ochratoxín A ($110, 75, 35$ a $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), diacetoxyscirpenol (10 a $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) a toxín T-2 (42 a $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) [14]. Na základe uvedených výsledkov autori usudzujú, že množstvo mykotoxínov v pive neohrozuje zdravie konzumentov. Zo zahraničných informácií je však zreteľné, že rozsah potravín, sledovaných na prítomnosť mykotoxínov, rozšíril sa aj o pivo, a preto treba v tejto súvislosti zamerať pozornosť aj na mykoflóru a mykotoxíny v sladovníckom jačmeni a slade.

Uvádzá sa, že vo Veľkej Británii pracovníci sladovní doteraz hodnotili kvalitu jačmeňa a sladu čo do výskytu plesní iba vizuálne, ale od roku 1981 je už vypracovaná a odporúčaná metóda stanovenia tzv. MFI (mould frequency index — index plesňami kontaminovaných zrín). Na stanovenie tohto indexu treba kultivovať povrchovo sterilizované zrnká na mykologických živných pôdach [15—17]. K tejto hodnote MFI možno však mať určité pripomienky, napr., že zo zdravotného hľadiska nie je zanedbatelné, či sú zrnká kontaminované poľnými mykromycétami rodu *Alternaria* alebo rodom *Fusarium*, čo sa z hodnoty tohto indexu nedá zistiť.

V súvislosti s celosvetovým trendom ochrany komponentov stravy a nápojov človeka pred kontamináciou metabolitmi mikroskopických vláknitých hub bude treba aj u nás perspektívne uvažovať o doplnení, resp. stanovení nových ukazovateľov kvality sladovníckeho jačmeňa a sladov, o výsledok odborného mykologického vyšetrenia, v ďalšom stupni aj o analýzu na prítomnosť mykotoxinov. Tento postup je dôležitý nielen z hľadiska domáceho trhu, ale je mimoriadne dôležitý aj pri exporte, najmä do vyspelých štátov, kde je úroveň sledovania nezávadnosti potravín na vysokom stupni, vrátane mykotoxinov a stanovenia limitov pre mykotoxíny [8].

Z technologického hľadiska je dôležité uviesť poznatok, že prítomnosť mykotoxinov sa u kvasiniek neodržkadluje na produkciu alkoholu. Na tento proces nemajú negatívny vplyv ani aflatoxín, ochratoxín A, ale ani zearalenón [18].

Literatúra

1. JESENSKÁ, Z. — HAVRÁNEKOVÁ, D. — HRDINOVÁ, I.: Acta hyg. epid. microbiol., 12, 1982, č. 2, s. 7.
2. BETINA, V.: Mycotoxins. Production, Isolation, Separation and Purification. Amsterdam—Oxford—New York—Tokio, Elsevier 1984, s. 528.
3. REISS, J.: Mykotoxine in Lebensmitteln. Gustav Fischer Verlag 1981, s. 549.
4. SPICHER, G.: Swiss Food, 3, 1981, č. 9, s. 31.
5. TICHÁ, J. — LUČNÝ, M. — VESELÝ, D.: Mlýnsko-pekár. prům., 30, 1984, č. 6, s. 171.
6. JESENSKÁ, Z. — POLÁKOVÁ, O.: Lék. Obzor, 27, 1978, č. 1, s. 21.
7. HRDINOVÁ, I. — JESENSKÁ, Z.: Čs. Hyg., 27, 1982, č. 10, s. 568.
8. SCHULER, P. L. — van EGMOND, H. P.: In: Proc. Int. Symp. on Mycotoxins. Eds. Naguib, K., Naguib, M. N., Pork, D. L., Pohland, A. E. Dokki Cairo, National Research Centre 1983, s. 111.
9. FLANNIGAN, B. — OKAGBUES, R. N. — KHALID, R. — TECH, C. K.: Brewing Dest. int., 12, 1982, č. 6, s. 31, 37.
10. HILL, R. A. — LACEY, J.: Ann. appl. Biol., 102, 1983, č. 3, s. 467.
11. JESENSKÁ, Z. — HAVRÁNEKOVÁ, D. — ŠAJBIDOROVÁ, I.: Čs. Hyg., 28, 1983, č. 1, s. 11.
12. MAJERUS, P. — WOLLER, R.: Mschr. Brauwiss., 36, 1983, č. 8, s. 335.
13. WOLLER, R. — MAJERUS, P.: Brauwissenschaft, 35, 1982, č. 4, s. 88.
14. PAYEN, J. — GIRARD, T. — GAILLARDIN, M. — LAFONT, P.: Microbiol. Aliment.-Nutr., 1, 1983, č. 2, s. 143.
15. FLANNIGAN, B.: J. Inst. Brew., 88, 1982, č. 3, s. 133.
16. FLANNIGAN, B.: J. Inst. Brew., 89, 1983, č. 5, s. 354.
17. FLANNIGAN, B. — HEALY, R.: J. Int. Brew., 89, 1983, č. 5, s. 341.
18. HESSELTINE, C. W.: The Third International Mycological Congress, Tokyo 1983. Abstracts, s. 99.

Анализ микофлоры солодового ячменя и солода

I. Полевые микромицеты

Резюме

В работе приводятся результаты обследования внутренней микофлоры зерен солодового ячменя и солода. Внимание было направлено в основном на наличие так наз. полевых волокнистых грибов, прежде всего из рода *Fusarium* sp. Наличие зерен, контаминированных полевыми микромицетами из урожая зерна 1984 года, было очень низким, чаще образцы были полностью негативными. Вносится предложение дополнить показатели качества солодового ячменя микологическим обследованием, а в перспективе и анализом этих субстратов на микотоксины.

Analysis of the myeoflora of malt barley and malt

I. Field micromycetes

Summary

In this contribution results are presented of the investigated internal mycoflora of the grains of malt barley and malt. Special attention was paid in this respect to the incidence of the so-called field filamentous fungi, mainly those of the genus *Fusarium* sp. The incidence of grains contaminated by field micromyctes (crop from the harvest 1984) was very small; more frequently the samples were quite negative. Consequently, the authors recommend the quality parameters of malt barley be supplemented by mycologic studies and by an analysis of these substrates for mycotoxins in the future.