

Problematika mikroorganismů ve sladařském průmyslu

II. Změny v mikroflóře ječmene během skladování a sladování

RNDr. KAREL KOSAŘ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, pracoviště Brno

SKLADIŠTNÍ MIKROFLÓRA

Faktory ovlivňující složení mikroflóry

Základními podmínkami pro rozvoj mikroorganismů v obilí jsou vlhkost a teplota, přístup vzduchu, stav semenných obalů a životní činnost zrna. Jiné podmínky jako světlo, reakce prostředí apod. mají daleko menší význam. Vliv na mikrobiologické procesy v obilí má množství mikroflóry, její druhové zastoupení a stav mikroorganismů. Obilí má poměrně stálou, slabě kyselou reakci $\text{pH} = 5,6-6,4$ (Trisvjatskij 1954); tento činitel málo omezuje možnost rozvoje mikroorganismů, jsou-li ostatní podmínky příznivé. V obilí silně napadeném mikroorganismy v aktivním stavu jsou již předpoklady pro rychlý rozvoj mikrobiologických procesů. Jak již bylo uvedeno, nejdůležitějšími podmínkami pro rozvoj mikroorganismů jsou přístup vzduchu, vlhkost a teplota.

Podle vztahu ke kyslíku se rozeznávají mikroorganismy:

1. aerobní (vyžadující kyslík),
2. fakultativně aerobní (přechodný typ),
3. anaerobní (nevyžadující kyslík).

Vzhledem k požadavkům na teplotu (Wallace 1973) se rozlišují mikroorganismy:

1. psychrofilní — minimum -8 až 0°C , optimum 10 až 20°C , maximum 25 až 30°C ,
2. mezofilní — minimum 5 až 25°C , optimum 20 až 40°C , maximum 40 až 45°C ,
3. termofilní — minimum 25 až 40°C , optimum 50 až 60°C , maximum 70 až 80°C .

Ve vztahu k vlhkosti se rozdělují mikroorganismy

1. na hydrofilní — minimum 90% rel. vlhkosti, optimum 100% rel. vlhkosti,
2. mezofilní — minimum 80 až 90% rel. vlhkosti, optimum 100% rel. vlhkosti,
3. xerofilní — minimum 70 až 75% rel. vlhkosti, optimum $90-100\%$ rel. vlhkosti.

Kyslík — převážná část mikroorganismů vyskytujících se na obilí patří mezi aerobní organismy.

Teplota — mikroflóra kontaminující skladované obilí je složena především z mezofilních druhů, psychrofilní skupina (některá fusaria, penicillia, cladosporia, moni-

lie apod.) je hojnější než termofilní (*Aspergillus fumigatus*, některá penicillia). Vliv teploty na rozvoj mikrofily je nutno posuzovat v kontextu působení ostatních faktorů, zejména relativní vlhkosti.

Vlhkost — obsah vody v zrna je v rovnováze s relativní vlhkostí vzduchu. Ječmen skladovaný při 20 °C a 70 % relativní vlhkosti obsahuje 15 % vody, při 60 % relativní vlhkosti 13 % vody a při 50 % relativní vlhkosti 11,5 % vody (Ulonska 1959; Trolle a Pedersen 1971; Burian 1977). Čím vyšší je vlhkost okolního prostředí, tím intenzivněji zpravidla probíhá výměna látek mezi buňkou a prostředím a tím lépe se mikroorganismy rozmnožují. Přibližná hranice minimální vlhkosti obilí, při které se mohou rozvíjet různé skupiny mikroorganismů, je 15 až 16 % pro „plísň“ a 16 až 18 % pro bakterie. Je obtížné přesně určit hranici vlhkosti, při které je možno zastavit rozvoj mikroorganismů; vlhkost je v obilí i v jednotlivých zrnech nestejnoměrně rozdělena. Uvedené hodnoty platí pro normální rozdělení vlhkosti v obilí. Jsou známy případy aktivního rozvoje mikroorganismů při vlhkosti 12,5 % (Trisvjatskij 1954).

Kapalná voda, která nejvíce napomáhá rozvoji mikroorganismů, se může vytvořit i bez vniknutí vody zvenčí; dýchání obilí a mikroorganismů vede ke značnému zvýšení relativní vlhkosti vzduchu v mezizrnných prostorech. Část vodních par snadno kondenzuje a usazuje se na povrchu zrn jako kapičky rosy. Tento proces „pocení“ je způsoben nestejnoměrným ohříváním nebo ochlazováním obilí, což je zvláště nebezpečné u čerstvě sklizeného obilí, které velmi intenzivně dýchá.

Stupeň kontaminace skladovaného obilí dále ovlivňuje kvalita sklizeného obilí (Trolle a Pedersen 1971). Mikroflóra obilí poškozených mechanizovanou sklizní se vyvíjí velmi rychle a tak vznikají ložiska kontaminace. Vznik těchto ložisek ovlivňuje i nerovnoměrné rozmístění zrn ve skladu, kde se při plnění tvoří oblasti zdravých těžkých zrn, lehkých zrn a příměsí. Uvedené faktory mohou být ovlivněny i konstrukcí skladu a použitím materiálu (Muir, Sinha a Wallace 1973).

Mikroflóra obilovin

Během skladování nastává pomalá nebo rychlá změna mikroflóry v závislosti na uvedených faktorech. Úbytek „polní“ mikroflóry je nahrazován „skladištními“ mikroorganismy.

Bakterie — při skladování ječmene s vlhkostí 11,1 až 17,1 % v relativní vlhkosti 65 % při 20 °C se celkový počet bakterií snížil z průměru $6 \times 10^7/g$ na $1 \times 10^7/g$. Pokles se týkal především bakterií *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, rodů *Pseudomonas* a různých gramnegativních bakterií, rodů *Micrococcus*, *Bacillus*. Počet dalších grampozitivních bakterií mírně stoupl z $5 \times 10^4/g$ na $9 \times 10^4/g$. Pokles množství *Enterobacter agglomerans* byl konstatován i jinými autory (Trisvjatskij 1954; Dohnal 1956). Hojný výskyt *E. agglomerans* je určitým ukazatelem „zdravotního“ stavu čerstvě uloženého ječmene. Ostatní mikroorganismy působí na tento druh antagonisticky. Sporadický výskyt nebo úplné vymizení svědčí o tom, že v hromadě obilí probíhají mikrobiologické procesy, nepříznivé pro správné skladování. Avšak otázkou je, zda zmenšování počtu této bakterie neovlivňuje nepřístup slunečního světla do hromady obilí.

Při anaerobním způsobu skladování obilí zůstane původní bakteriální mikroflóra stejná až do vyčerpání kyslíku. Původně hojně gramnegativní rody vymizí, takže se laktobacily mohou stát převažující složkou mikroflóry (Nichols a Leaver 1966).

Houby — pro pivovarsko-sladařský průmysl je ovšem nejdůležitější změna v mykoflóře skladovaného ječmene,

jejíž rychlost závisí na uvedených limitních faktorech. Například odrůdy pšenice necelé tři měsíce po sklizni byly kontaminovány převážně polní mikoflórou a jen menší podíl představovala skladištní mykoflóra (Tichá 1975b), zatímco v jiném pokusu po třech měsících skladování ječmene byly zaznamenány značné difference (Haikara, Mäkinen a Hakulinen 1977). Všeobecně lze říci, že nejmarkantnější změna v obsahu mykoflor je kvantitativní snižování rodů *Alternaria* a *Cladosporium* (popřípadě *Helminthosporium*, *Fusarium* atd.) a zvyšování zástupců rodů *Aspergillus* a *Penicillium* (popřípadě *Mucor*), jak bylo zjištěno řadou autorů (Lutey a Christensen 1963; Sinha a Wallace 1965; Andersen, Gjertsen a Trolle 1967; Wozna 1973; Tichá 1975b; Haikara, Mäkinen a Hakulinen 1977). Výskyt uvedených druhů hub a jejich kvantitativní zasoupení na skladovaných obilovinách, především na ječmenu, udává velký počet autorů (z posledních dob: Pedersen 1968; Flannigan 1969; Welling 1970; Flannigan 1970a, b; Pedersen, Pedersen a Glahn 1971; Lacey 1971; Lund, Pedersen a Sigsgaard 1971; Yoshida et al 1975; Mäkinen a Haikara 1976; Gylland a Martinson 1976; Wallace, Sinha a Mills 1976) na základě pokusů buď v experimentálních silech, nebo na vzorcích zrn z komerčních skladů.

Typickými „skladištními“ rody jsou především *Aspergillus* a *Penicillium*. Je známo, že řada druhů rodu *Aspergillus* je značně xerofilní — roste při poměrně nízkých relativních vlhkostech. To platí zejména o skupině *A. glaucus*, kde některé druhy jsou schopny růst i klíčit při 70 % rel. vlhkosti, např. *A. repens*, *A. chevalieri* při 65 %, *A. echinulatus* dokonce při 62 % rel. vlhkosti. Skupina *A. glaucus* je také mimořádně odolná vůči teplotě a roste v širokém spektru —8 až 41 °C. Z ostatních druhů rodu *Aspergillus* je rovněž málo náročný na vlhkost druh *A. restrictus*, který je schopen růst na obilí o vlhkosti 13,5 %, *A. flavus* vyžaduje 16 % a *A. niger* 19 až 20 % vody. Hlavní část rodu *Aspergillus* roste a sporuluje při teplotě 23 až 26 °C s výjimkami *A. echinulatus* a *A. niveo-glaucus* (teplota 20 °C). *A. repens*, *A. chevalieri* a *A. amstelodami* rostou rychleji při 30 °C, *A. fumigatus* dokonce při 45 až 50 °C (Thom a Raper 1945).

Druhy rodu *Penicillium* rostou v rozsahu 15 až 30 °C, především při 23 až 25 °C. Výjimkou je *P. gladioli* rostoucí při 14 až 15 °C, zatímco *P. duponti* je termofilní druh vyžadující 40 až 47 °C (Raper a Thom 1949). *Penicillium* roste na obilí s vyšším obsahem vody nad 20 % (Welling 1970), a je schopné se adaptovat společně s rody *Mucor* a *Monilia* i na velmi nízké teploty, až —5 °C (Elschansky 1939).

S těmito dvěma rody, které se často vyskytují na skladovaném ječmeni, se mohou vyskytovat i další skladištní houby jako *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus*, které rostou v teplotním rozsahu —3 až 60 °C a vyžadují minimální relativní vlhkost 88 % (Wallace 1973).

Mikroflóra sladu

Vzhledem k celkové problematice mikroflóry obilovin a zejména v porovnání s mikroflórou skladovaného obilí je mikroflóra sladu zatím málo propracovaná. Mikroorganismy, které se vyskytují na zeleném sladu, jsou různého původu. Především jde o mikroorganismy původní kontaminace ječmene, které kontaminovaly buď vrstvy pod pluchou, nebo zárodek a které nelze odstranit čištěním a praním ječmene. Dále je to mikroflóra, která lpí s prachem na povrchu zrna a v pluchách a která zůstala na ječmenu i po praní zrna při máčení. Zrno se může kontaminovat i při máčení biologicky závadnou vodou, na dopravních cestách, klíčící ječmen se může kontaminovat mikroflórou vyskytující se v prostoru humen či skříní (Andersen, Gjertsen a Trolle 1967)

a rostoucí i na keramických obkladech stěn (Green-shields a Rainbow 1959).

Běžná sladová mykoflóra může být rozdělena do 7 skupin (Sheneman a Hollenbeck 1960): aerogenní skupina, psychrofilní gramnegativní tyčinky, bakterie mléčné, aerobní sporulující, anaerobní sporulující bakterie, kvasinky a „plísně“.

Bakterie — z bakterií mléčných mohou být přítomny termofilní druhy (*Pediococcus acidilactici*; *Lactobacillus delbrückii*) i mezofilní (*Lactobacillus leichnamii*). Mezofilní druhy tvoří dominantní část celkové populace bakterií. Termofilní jsou přítomné jen v malém počtu. Vliv bakterií mléčných (pevného počtu) na kvalitu sladu se zretelem na pH rmotu je nevýznamný (Sheneman a Hollenbeck 1960). Do aerogenní skupiny patří především rod *Escherichia* a *Enterobacter*, které tvoří značnou část z celkového počtu bakterií ve sladu (Sheneman a Hollenbeck 1961). Druh *Enterobacter agglomerans* tvoří kolem 50 % bakteriální populace (Haikara, Mäkinen a Hakulinen 1977).

Během sladování se zvyšuje počet bakterií již při máčení, ale zejména při klíčení. Konečný počet bakterií po hvozdnění je samozřejmě nižší než před hvozdněním, ale hotový slad obsahuje více bakterií než původní ječmen (Follstad a Christensen 1962; Haikara, Mäkinen a Hakulinen 1977). Maximální počet bakterií se pohybuje od 10^6 do 10^9 /g v závislosti na počáteční kontaminaci (Sheneman a Hollenbeck 1960; Kotheimer a Christensen 1961; Follstad a Christensen 1962; Andersen, Gjertsen a Trolle 1967; Haikara, Mäkinen a Hakulinen 1977).

Během sladování se rozmnožují druhy rodu *Bacillus* (470krát), kvasinky (190krát). Množství aktinomycet se zvýšilo po máčení jen nepatrně, takže z původního množství 7×10^2 /g ječmene dosáhlo maxima 5×10^3 /g zeleného sladu.

Houby — během sladování se mění pozoruhodně skladba mykoflóry. Druhy *Fusaria* se značně rozmnožují, zejména po dobu máčení, kdy může být zaznamenáno až 90 % kontaminovaných zrn. Během hvozdnění (dotahovací teploty kolem 50 °C) se prudce zvýšilo množství druhů rodu *Rhizopus* a *Mucor*, pravděpodobně rychlým rozmnožením v počátečních teplotách. Množství *Alternaria* se zvyšovalo od počátku máčení až do počátku hvozdnění, kdy nastal mírný pokles. Jediné zaznamenané zmenšení počtu se týkalo *Cladosporium* sp., avšak s mírným nárůstem při hvozdnění, ačkoliv konečné množství této houby bylo nižší než na ječmenu. Dále byly nalezeny nevýznamné změny v množství rodu *Cephalosporium* (*Acremonium*), *Acremoniella*, *Stemphylium* a *Epicoccum*. Kromě jedné uvedené výjimky byl celkový počet různých rodů hub vyšší na odhvozděném sladu než na ječmenu (Haikara, Mäkinen a Hakulinen 1977). Je nutno vzít v úvahu nízkou teplotu při dotahování, kterou použili tyto autoři.

Při pokusech bylo rovněž zjištěno, že zastoupení kvalitativní a kvantitativní uvedené mykoflóry závisí na počátečním obsahu vody skladovaného ječmene a na antagonistických vztazích mezi rody (Lund, Pedersen a Sigsgaard 1971). Na zeleném sladu vyrobeném z ječmene s obsahem vody do 17 % je více *Alternarií* než na zeleném sladu vyrobeném z vlhčího ječmene. Naproti tomu *Penicillium* bylo často nalezeno na zeleném sladu, jestliže zeskladovaný ječmen měl obsah vody 22 až 26 %. Všeobecně lze konstatovat, že s výjimkou *Alternarie* jsou ostatní rody velice málo četné na zeleném sladu vyrobeném z ječmene o obsahu vody kolem 12 %.

Jestliže kontaminace ječmene *Aspergilem* byla nižší než 1 %, zůstávala relativně nízká během celého průběhu sladování. Pokud počáteční kontaminace ječmene

přesáhla 1 %, pomnožení této „plísně“ bylo značné (Haikara, Mäkinen a Hakulinen 1977).

Zajímavé jsou výsledky sledování kontaminace ječmene tímto rodem během sklizně, skladování, sladování a hvozdnění. Existuje jasná závislost různých druhů na obsahu vody ječmene. Skupina *A. glaucus* je převažující ve vzorcích s obsahem vody 13,2 až 15 %. Z více než 75 % kontaminace při sklizni se množství izolovaných druhů snižuje až do konce klíčení, odhvozděný slad však obsahuje vyšší počet této skupiny, zhruba stejný jako při namáčece. Naprosto opačný průběh má kontaminace *A. flavus* s maximálním vrcholem při klíčení, kdy zelený slad má značný obsah vody. *A. versicolor* vyžaduje obsah vody 15 %, jeho množství stoupá při máčení, klesá při klíčení a nepatrně se zvyšuje na odhvozděném sladu. *A. candidus* je zastoupen poměrně málo, s vrcholem při skladování (Haikara, Mäkinen a Hakulinen 1977).

Obdobné růstové křivky během sladování byly zaznamenány i jinými autory (Follstad a Christensen; Gylland a Martinson 1976). Zajímavé je srovnání mykoflóry různých sladů z celého světa (s výjimkou CSSR) dovážených do Japonska (Nishikawa a Kogho 1975) a některých evropských sladů (Gylland a Martinson 1976), z nichž vyplývá, že mykoflóra ječmenů evropských a amerických je podobná japonským (Amaha et al 1973).

Literatura

- [1] AMAHA, M., KITABATAKE, K., NAGAKAWA, A., YOSHIDA, J., HARADA, T.: Proc. Congres. Europ. Brew. Conv. Salzburg 1973, s. 381.
- [2] ANDERSEN, K., GJERTSEN, P., TROLLE, B.: Brew. Digest, **42**, 1967, s. 76.
- [3] BURIAN, O.: Aktivní větrání zrnin. ZNZP, Brno 1977.
- [4] DOHNAL, L.: Kvasný průmysl, **2**, 1956, s. 243.
- [5] ELSCHANSKY, V.: Pet. J. Brass., **47**, 1939, s. 1017; Ref. in: J. Inst. Brew., **46**, 1940, s. 50.
- [6] FLANNIGAN, B.: Trans. Br. mycol. Soc., **53**, 1969, s. 371.
- [7] FOLLSTAD, M. N., CHRISTENSEN, C. M.: Appl. Microbiology, **10**, 1962, s. 331.
- [8] GRAVES, R. R., ROGERS, R. F., LYONS, A. J., HESSELTINE, C. W.: Cereal Chem., **44**, 1967, s. 288.
- [9] GREENSHIELDS, R. N., RAINBOW, C.: J. Inst. Brew., **65**, 1959, s. 275.
- [10] GYLLAND, H., MARTINSON, E.: J. Inst. Brew., **82**, 1976, s. 350.
- [11] HAIKARA, A., MÄKINEN, V., HAKULINEN, R.: osobní sdělení 1977.
- [12] KOTHEIMER, J. B., CHRISTENSEN, C. M.: Wallerstein Lab. Commun., **24**, 1961, s. 21.
- [13] LACEY, J.: Ann. appl. Biol., **69**, 1971, s. 187.
- [14] LHOTSKÝ, A.: Technická kontrola sladařské a pivovarské výroby. SNTL, Praha, 1957.
- [15] LUND, A., PEDERSEN, H., SIGSGAARD, P.: J. Sci. Fd. Agric., **22**, 1971, s. 458.
- [16] LUTY, R. W., CHRISTENSEN, C. M.: Phytopathology, **53**, 1963, s. 713.
- [17] MÄKINEN, V., HAIKARA, A.: Bios, **7**, 1976, s. 17.
- [18] MUIR, W. E., SINHA, R. N., WALLACE, H. A. H.: Canad. Agric. Eng., **15**, 1973, s. 35.
- [19] NICHOLS, A. A., LEAVER, CH. W.: J. appl. Bact., **29**, 1966, s. 566.
- [20] NISHIKAWA, N., KOGHO, M.: Bull. Brew. Sci., **21**, 1975, s. 9.
- [21] PEDERSEN, H.: Process Biochem., Jan. 1968, s. 46; Ref. in: J. Inst. Brew., **74**, 1968, s. 313.
- [22] PEDERSEN, H., PEDERSEN, P. E., CLAHN, P. E.: J. Sci. Fd. Agric., **22**, 1971, s. 451.
- [23] RAPER, K. B., THOM, C.: A Manual of the Penicillia. The Williams and Wilkins, Baltimore 1949.
- [24] SHENEMAN, J. H., HOLLENBECK, C. M.: Proc. Amer. Soc. Brew. Chem. 1960, s. 22.
- [25] SHENEMAN, J. H., HOLLENBECK, C. M.: Proc. Amer. Soc. Brew. Chem. 1961, s. 93.
- [26] SINHA, R. N., WALLACE, H. A. H.: Canad. J. Plant. Sci., **45**, 1965, s. 48.
- [27] THOM, C., RAPER, K. B.: A Manual of the Aspergillii. The Williams and Wilkins, Baltimore 1945.
- [28] TICHÁ, J.: Mlýnsko-pekárenský průmysl, **21**, 1975 b, s. 377.
- [29] TRISVJATSKIJ, L. A.: Skladování obilí. SZN, Praha 1954.
- [30] TROLLE, B., PEDERSEN, H.: J. Inst. Brew., **77**, 1971, s. 338.
- [31] ULONSKA, E.: Die Braugerste. D. L. G. - Verlag, Frankfurt am Main 1959.
- [32] WALLACE, H. A. H.: Fungi and Other Organism Associated with Stored Grain, s. 71. In: Sinha, R. N., MUIR, W. E.: Grain

- Storage: Part of a System. The Avi Publishing Company, Westport, Connecticut 1973.
- [33] WALLACE, H. A. H., SINHA, R. N., MILLS, J. T.: *Canad. J. Botany*, **54**, 1976, s. 1332.
- [34] WELLING, B.: *Tidsskrift Planteavl*, **73**, 1970, s. 291.
- [35] WOZNA, J.: *Przegl. zboz. mlyn.*, **19**, 1975, s. 10.
- [36] YOSHIDA, J., NAKAGAWA, A., ETO, M., KOTABATAKE, K., AMAHA, H.: *J. Ferment Technol.*, **53**, 1975, s. 184.

Kosař, K.: Problematika mikroorganismů ve sladařském průmyslu II. Změny v mikroflóře ječmene při skladování a sladování. *Kvas. prům.* **25**, 1979, č. 10, s. 221—224.

Na specifikaci faktorů ovlivňujících mikroflóru ječmene navazuje popis změn ve složení se zřetelem k typickým „skladištním“ rodům. V další části se autor zabývá mikroflórou sladu a jejími změnami v jednotlivých fázích procesu sladování.

Косарж, К.: Проблематика микроорганизмов в солодильной промышленности. 2-ая часть Изменения микрофлоры ячменя в течение складирования и соложения. *Квас. прум.* **25**, 1979, № 10, стр. 221—224.

В первой части исследовательской работы рассматривались факторы, влияющие на микрофлору ячменя. Настоящая статья посвящена изменениям микрофлоры, вызываемым складированием ячменя, а также измене-

ниям, имеющим место в отдельных фазах процесса солодоращения.

Kosař, K.: Microorganisms Important for Malting Industry. Part II. Changes of Barley Microflora Taking Place in Storing and Malting Periods. *Kvas. prům.* **25**, 1979, No. 10, pp. 221—224.

In the first part of his study the author specified factors bearing upon the microflora of barley generally. The present article deals with kinds typical for barley during storing period, as well as with the microflora of malt and its changes in individual phases of malting process.

Kosař, K.: Die Problematik der Mikroorganismen in der Malzindustrie. II. Änderungen in der Gersten-Mikroflora während der Lagerung und des Mälzens. *Kvas. prům.* **25**, 1979, No. 10, S. 221—224.

Der Artikel enthält nach der Spezifikation der die Gersten-Mikroflora beeinflussenden Faktoren auch die Beschreibung der Änderungen in der Zusammensetzung mit Hinsicht zu den typischen Repräsentanten der Mikroflora der Gerstenlager. Im weiteren befaßt sich der Autor mit der Mikroflora des Malzes und ihren Änderungen in den einzelnen Phasen des Mälzungsprozesses.