

WOJCIECH DONDESKI, SYLWIA BONIN^{*)}Zakład Mikrobiologii Wód i Biotechnologii, UMK, Toruń; ^{*)}Katedra Biotechnologii Żywności, SGGW, Warszawa

Mikroflora słodu badanego w różnych porach roku

Obecność mikroflory zarówno na jęczmieniu, jak i na słodzie wpływa na jakość otrzymanego produktu. Proces słodowania jęczmienia stwarza warunki dla rozwoju niekorzystnej mikroflory, którą stanowią bakterie, drożdże i grzyby strzępkowe. Celem badań było określenie zakażenia słodu jasnego używanego do produkcji piwa. Badania przeprowadzono w okresie roku – od jesieni do lata. Oznaczono liczebność poszczególnych grup mikroorganizmów w drodze wysiewu na różne podłoża i przeprowadzono ich identyfikację na podstawie *Bergey's Manual* [2] i opracowania autorów Burbianki, Pliszki, Burzyńskiej [4]. Stwierdzono, że bakterie występowały w największej liczbie ogólnie w okresie lata. Zidentyfikowano 6 rodzajów bakterii i zanotowano obecność niezidentyfikowanych pałeczek Gram ujemnych. Przeważały bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, z wyjątkiem okresu jesiennego, kiedy dominowały bakterie z rodzaju *Clostridium*. Średnia liczebność bakterii wynosiła $9,4 \cdot 10^6$ /g słodu. Liczebność drożdży wahała się w badanych okresach w granicach $1,3 \cdot 10^5$ - $1,6 \cdot 10^6$ /g słodu. Wśród drożdży przeważały rodzaje *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* i *Torulopsis*. Najniższy stopień porażenia słodu przez grzyby strzępkowe stwierdzono jesienią – liczebność $1,4 \cdot 10^3$ /g słodu, a najwyższy latem – $1,1 \cdot 10^4$ /g słodu. We wszystkich okresach zanotowano stałą obecność grzybów z rodzajów *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Mucor* i *Rhizopus*. Wiosną stwierdzono też obecność „grzybów polowych” z rodzaju *Fusarium* i *Cladosporium*. W podsumowaniu stwierdzono, że należy przestrzegać zasad prawidłowego magazynowania jęczmienia i słodu, gdyż warunki przechowywania rzutują na rozwój drobnoustrojów. Ważna jest też jakość jęczmienia używanego do produkcji słodu, gdyż proces słodowania nie wpływa ujemnie na obniżenie liczby mikroorganizmów.

Microflora of the malt in different seasons

Malting process of the barley creates the conditions for increasing of injurious microflora. There are bacteria, yeast and moulds. The aim of these researches was to define the infection of light malt. The researches were performed in the time of the year – since autumn till summer. There was signified the multitude of particular groups of microorganisms on the way of seeding on different media. Identification of microbes was performed basing on *Bergey's Manual* [2] and Burbianka, Pliszka, Burzyńska [4]. Bacteria were present in the highest number in the summer. There were identified 6 kinds of bacteria and some unidentified rod-bacterium Gram(-). There were the most of *Enterobacteriaceae* but in the autumn *Clostridium* was in majority. Middle multitude of bacteria was $9.4 \cdot 10^6$ by 1 gramme of malt. The multitude of yeast was between $1.3 \cdot 10^5$ and $1.6 \cdot 10^6$. *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* and *Torulopsis* were in majority among all yeast. The lowest degree of infection by the moulds had the place in the autumn – $1.4 \cdot 10^3$ by 1 gramme of malt. The highest infection was in the summer – $1.1 \cdot 10^4$. *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Mucor* and *Rhizopus* were present in the all periods. In the spring there were notified the presence of „field moulds” *Fusarium* and *Cladosporium*. In the summary there was asserted that the right storage of the barley should be observed. The conditions of storage have the influence on the microbes increasing. The quality of the barley is important as well because malting process have not the negative influence on reduction of number of microbes.

Mikroflora słodu, na którą składają się: bakterie, drożdże i grzyby strzępkowe różni się od mikroflory jęczmienia, co spowodowane jest procesem słodowania. Podczas moczenia i kielkowania ziarna powstają warunki bardzo korzystne do rozwoju mikroorganizmów, a wysoka temperatura podczas suszenia nie powoduje zmniejszenia liczby drobnoustrojów [19].

Zanieczyszczenia słodu stanowią mikroorganizmy z części okołozarodkowej ziarna i mikroorganizmy z powierzchni ziaren, których nie udało się usunąć w czasie mycia i suszenia oraz zanieczyszczenia zewnętrzne pochodzące z wody, kadzi za-

lewnych, płyt do suszenia, ścian, a także wnoszone przez ludzi [16].

Bakterie stanowią najliczniejszą grupę mikroorganizmów, przy czym we wszystkich etapach procesu słodowania dominują bakterie mezofilne. Ich liczba w zielonym słodzie jest 85-600 razy większa niż w suchym jęczmieniu, jednak po procesie suszenia ilość bakterii stanowi mniej niż 50% pierwotnego poziomu zakażenia [11]. Wśród bakterii Gram(-) na słodzie stwierdzono występowanie rodzajów: *Serratia*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, natomiast z Gram dodatnich: *Arthrobacter*, *Clavi-*

bacterium, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus* [3, 16].

Podczas słodowania obserwuje się znaczny wzrost liczebności drożdży. Szczególnie widoczny jest on w okresie kielkowania ziaren. Liczba drożdży wzrasta wówczas nawet 1000-krotnie w stosunku do liczby drożdży na suchym jęczmieniu. Proces suszenia słodu powoduje redukcję tych organizmów, mimo to ich ilość jest o rząd wielkości większa niż na ziarnach przed słodowaniem [3, 11, 17]. Na wysuszonym słodzie występują drożdże z rodzajów *Rhodotorula*, *Candida*, *Sporobolomyces* [19].

Pod względem ilościowym najmniejszą grupę stanowią grzyby strzępkowe. Odgrywają one jednak ważną rolę w zanieczyszczeniach mikrobiologicznych. W mikroflorze słodu dominują „grzyby przechowalnicze” z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*, przy czym głównie są to gatunki z grupy *Aspergillus glaucus* [1, 15]. Niektórzy z autorów zauważyli jednak tendencję do utrzymywania się w czasie całego procesu słodowania i na słodzie grzybów uważanych za typowo „polowe”, a mianowicie z rodzajów: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium* [6, 19].

Obecność mikroflory zarówno na jęczmieniu, jak i na słodzie wpływa na jakość otrzymanego produktu. Ziarno jęczmienia zakażone „grzybami polowymi i/lub silosowymi” sprawia problemy słodownikom. Rozwój grzybów powoduje rozmiękanie ziaren i ubytek suchej masy. Użycie do produkcji słodu jęczmienia nawet lekko zainfekowanego grzybami z rodzaju *Fusarium* może przyczynić się do powstawania niekontrolowanego wypieniania się piwa nazwanego „gushing/spouting” [1, 19]. Według innych autorów, „gushing” powodują także produkty przemiany materii pleśni *Penicillium*, *Aspergillus* i *Rhizopus*. [6, 9]. Należy również wziąć pod uwagę fakt, że z obecnością pleśni wiąże się niejednokrotnie obecność mikotoksyn o negatywnym oddziaływaniu na zdrowie człowieka. Mikotoksyny są wytwarzane zarówno przez grzyby „przechowalnicze”, jak i „polowe”. Należą one do związków o wysokiej termooporności i niekiedy stwierdzano ich obecność w piwie [23].

Ogólnie wysoki poziom mikroorganizmów powoduje zmniejszenie zdolności i energii kielkowania oraz obniżenie żywotności ziaren. Następuje także wzrost aktywności α -amylazy, obniżenie ekstraktywności słodu i zmniejszenie lepkości brzezki. Substancje produkowane przez mikroorganizmy podczas procesu słodowania przy-

czynią się do wzrostu zawartości rozpuszczalnych związków azotowych w brzeczce i piwie. Drożdże i pleśnie odpowiedzialne są za zwiększenie poziomu enzymu β -glukanazy, który, degradując polimery ścian komórkowych, powoduje wzrost intensywności barwy brzeczki [3, 10, 13, 14].

Cel i metodyka pracy

Celem pracy było określenie stopnia zakażenia słołu jasnego używanego do produkcji piwa w jednym z browarów. Badania prowadzono wiosną, latem, jesienią i zimą.

Oznaczano liczebność bakterii i grzybów oraz przeprowadzano ich identyfikację. W tym celu 10 g słołu wytrąsano przez 15 min w 90 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej, a następnie przygotowywano jego 10-krotne rozcieńczenia. Wysiewy wykonywano metodą płytek lanych.

Ogólną liczbę bakterii heterotroficznych (CFV) w badanych próbkach oznaczano używając jako podłoża agar wzbogacony (BTL – Łódź). Do wykrywania bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* używano podłoża MacConkey'a (BTL – Łódź). Hodowle inkubowano przez 72 h w temp. 30°C, po czym otrzymane wyniki przeliczano na 1 g słołu. Po określeniu na szalkach liczby kolonii bakteryjnych na agarze wzbogaconym odszczepiano losowo różniące się morfologicznie kolonie, które przeszczepiano na pożywkę półpłynną i następnie zidentyfikowano je co do rodzaju wg Bergey's Manual oraz Burbianki, Pliszki i Burzyńskiej [2, 4].

Do wykrywania grzybów używano agar słodowy – Malt Extract Agar (Difco), podłożo Czapska – Doxa (Difco) oraz pożywkę Martina (BTL – Łódź), do której dodawano 40 mg/ml streptomycyny w celu zahamowania wzrostu bakterii. Płytki inkubowano w temp. 20°C oraz 25°C, a w okresie zimowym ponadto w temp. 30°C przez okres 7 dni, licząc od drugiego dnia wzrostu w tym czasie kolonie. Dla grzybów z rodzaju *Fusarium* czas hodowli wynosił ok. 4 tygodnie, co było podyktowane długim okresem wytwarzania zarodników (mikro- i makrokonidiów) przez te grzyby. Określenie grzybów pleśniowych prowadzono na podstawie prac następujących autorów: Fassatiowa [12], Kwaśna i wsp. [18], Raper, Fennell [20], Raper, Thom [21], Skirgiełło i wsp. [22].

Omówienie i dyskusja wyników

Wyniki z badań ogólnej liczby bakterii i bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* przedstawiono w tabeli 1. Największą

ogólną liczbę bakterii stwierdzono latem, a najmniejszą – wiosną. Średnio liczba bakterii w 1 g słołu wynosiła $9,4 \cdot 10^6$. Najmniej bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* stwierdzono wiosną – $7,1 \cdot 10^3$ /g słołu, w pozostałych okresach badań ich ilość pozostawała na zbliżonym poziomie.

Skład rodzajowy bakterii występujących w słodzie przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 2. Procentowy udział stwierdzonych bakterii w 1 g słołu w badanych okresach

Drobnoustroje	Wiosna	Lato	Jesień	Zima
<i>Enterobacteriaceae</i>	80	33	20	90
<i>Pseudomonas</i>	-	20	-	-
Nieoznaczone pałeczki G(-)	-	7	-	-
<i>Micrococcus</i>	20	13	-	10
<i>Clostridium</i>	-	20	50	-
<i>Bacillus</i>	-	-	10	-
<i>Lactobacillus</i>	-	7	20	-

Wynika z niej, że drobnoustrojami, które dominowały w trzech badanych okresach były bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*. W okresie jesiennym stwierdzono dominację bakterii z rodzaju *Clostridium* (50%), których obecność odnotowano także latem (20%). W obu tych okresach badań mikroflora słołu była najbardziej zróżnicowana. Ogółem zidentyfikowano wówczas 6 rodzajów bakterii oraz stwierdzono obecność niezidentyfikowanych pałeczek Gram(-). Kieninger i wsp. [15] podają, że na słodach niemieckich stwierdzono średnio $6 \cdot 10^7$ bakterii/g, a na słodach zagranicznych $8 \cdot 10^6$. Petters i wsp. [19] zanotowali natomiast $5,5 \cdot 10^6$ bakterii. Dominującymi rodzajami, według tych autorów, były bakterie z rodzaju *Erwinia* i *Serratia*. Bol i Huis in't Veld [3] zaobserwowali na słodzie dominację bakterii Gram(-). Autorzy ci w swych badaniach oraz cytowani przez nich badacze nie donoszą o obecności na słodzie bakterii z rodzaju *Clostridium*. Bakterie te, jak podają Beuchat [1], a także Wzorek i Laškiewicz [24] są jednak często obecne na ziarnie jęczmienia.

Jak wynika z tabeli 1, liczebność drożdży i grzybów drożdżopodobnych w badanych okresach wahała się w granicach $1,3 \cdot 10^5$ – $1,6 \cdot 10^6$ /g słołu. Petters i wsp. [19] podają wartość $1,8 \cdot 10^4$. Natomiast Kotheimer i Christensen [17] badając mikroflorę jęczmienia stwierdzili, że liczebność drożdży wahała się w granicach od $1 \cdot 10^3$ do $1,4 \cdot 10^4$ /g. Przyjmując, jak wspomniano we wstępie, że liczba drożdży podczas procesu słodowania wzrasta, otrzymane wyniki wydają się odpowiadać możliwej ilości tych mikroorganizmów na słodzie. Na podstawie badań morfologicznych wśród tych organizmów wstępnie wyróżniono w pracy rodzaje: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*.

Najwyższy stopień porażenia słołu grzybami strzępkowymi zanotowano latem ($1,1 \cdot 10^4$), najmniejszy jesienią ($1,4 \cdot 10^3$). Średnia liczebność grzybów strzępkowych w badanych okresach wynosiła $5,9 \cdot 10^3$ /g słołu (tab. 1). Kieninger i wsp. [15] podają, że w badanych przez nich słodach niemieckich ilość grzybów strzępkowych wynosiła $7 \cdot 10^4$ /g, a w zagranicznych $1 \cdot 10^3$. Petters i wsp. [19] w swych doświadczeniach otrzymali wynik $8,3 \cdot 10^2$.

W badaniach, będących przedmiotem tej pracy, nie zaobserwowano podanej przez Kotheimer i Christensen [17] zależności spadku liczby bakterii wraz ze wzrostem liczby grzybów strzępkowych. Latem odnotowano największą ogólną liczbę bakterii i grzybów. Stwierdzono natomiast, zgodnie z danymi w piśmiennictwie, dominację bakterii mezofilnych oraz proporcjonalnie mniejszy udział drożdży i grzybów pleśniowych [13, 15, 16, 19].

W ciągu całego okresu badań stwierdzono ogółem występowanie 11 rodzajów grzybów. Skład jakościowy grzybów w poszczególnych okresach badań był zróżnicowany i zmieniał się w zależności od okresu badań (przedstawienie dokładnych wyników badań wymaga oddzielnego artykułu). We wszystkich okresach kontroli zanotowano stałą obecność grzybów z rodzajów: *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, przy czym stwierdzono różnice ilościowo-jakościowe w występowaniu tych grzybów. *Aureobasidium* było spotykane najczęściej w okresie jesiennym i zimowym. Rodzaj *Penicillium*, należący do „grzybów przechowalniczych”, był najliczniej reprezentowany wiosną, co wiąże się z długim okresem przechowywania ziaren. Szczególnie silnym zróżnicowaniem w występowaniu charakteryzowały się grzyby z rodziny *Mucoraceae*. W okresie jesiennym i zimowym rodzaj *Mucor* reprezentowany był sporadycznie, natomiast wiosną grzyby z rodziny *Mucoraceae* były grupą dominującą. Bol i Huis in't Veld [3] podają, że podczas procesu słodowania następuje znaczny wzrost grzybów z rodzaju *Mucor* i *Rhizopus*, a w badaniach Chełkowskiego i Trojanowskiej [7] pleśnie z rodzaju *Mucor* przeważały w kilku próbkach jęczmienia. W niniejszej pracy wiosną zaobserwowano także obecność „grzybów polowych” z rodzaju *Fusarium* i *Cladosporium*, co świadczy o znacznej przeżywalności tych organizmów na ziarnach jęczmienia i podczas procesu słodowania. Latem stwierdzono porażenie słołu w znacznym stopniu przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Znaczny udział grzybów z rodzaju *Aspergillus* latem spowodował zapewne zubożenie mikroflory słołu, ponieważ, jak podają Chel-

TABELA 1. Liczba drobnoustrojów w 1 g słołu w poszczególnych okresach kontroli

Mikroorganizmy	Wiosna	Lato	Jesień	Zima	Średnio
Ogólna liczba bakterii	$1,2 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^6$	$8,3 \cdot 10^6$	$9,4 \cdot 10^6$
<i>Enterobacteriaceae</i>	$7,1 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$7,8 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$
Pleśnie	$8,2 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$
Drożdże	$1,6 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$

TABELA 3. Występowanie poszczególnych rodzajów grzybów w badanych okresach

Rodzaj	Jesień	Zima	Wiosna	Lato
<i>Alternaria</i>	+	+	-	-
<i>Aspergillus</i>	+	+	-	+
<i>Aureobasidium</i>	+	+	+	+
<i>Cladosporium</i>	+	+	+	-
<i>Fusarium</i>	+	+	+	-
<i>Helminthosporium</i>	+	+	-	-
<i>Mucor</i>	+	+	+	+
<i>Penicillium</i>	+	+	+	+
<i>Rhizopus</i>	+	+	+	+

kowski i Trojanowska [8], im więcej zarodników *Aspergillus* i *Penicillium*, tym mniejszy udział innych grzybów. Jesienią i zimą w mikoflorze słoðu zaobserwowano przewagę „grzybów polowych”. Rodzajem, który dominował w tym okresie, było *Fusarium*, licznie występowała również *Alternaria*, która stanowiła ok. 1/3 ilości grzybów z rodzaju *Fusarium*. Znaczny stopień porażenia słoðu w naszych badaniach grzybami z rodzaju *Fusarium* może wiązać się z warunkami pogodowymi, gdyż grzyby te atakują ziarno jęczmienia szczególnie w latach mokrych. Chelkowski i wsp. [5] w latach 1977-1978 nie stwierdzili na ziarnach jęczmienia obecności grzybów z rodzaju *Fusarium*, natomiast w 1979 r. występowanie tych grzybów było bardzo liczne. Ze słoðów *Fusarium* izolowali Kieninger i wsp. [15].

Wnioski

Podsumowując badania stwierdzono, że liczebność drożdży ulegała małym wahaniom we wszystkich badanych okresach. Liczebność grzybów strzępkowych wzrastała w trakcie okresu przechowywania i największa była latem. W tym okresie zaobserwowano także największą ogólną liczbę bakterii. Dominowały bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Ze względu na to, że obecność mikroorganizmów na słoðzie może wpływać niekorzystnie na cechy jakościowe piwa, a warunki przechowywania rzutują na rozwój drobnoustrojów – należy prze-

strzegać zasad prawidłowego magazynowania jęczmienia i słoðu. Ważna jest także jakość jęczmienia używanego do produkcji słoðu, gdyż proces słoðowania nie wpływa ujemnie na obniżenie liczby mikroorganizmów.

Literatura

- [1] *Beuchat L. R.*: Food and beverage mycology, avii Book, New York 1987.
- [2] *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore 1986.
- [3] *Bol J., Huis in't Veld J. H. J.*: The occurrence of fungi on barley in raw materials and in the maltose: prevention and consequences of infection. Louvain Brewing Letters 1988, 1, 4-9.
- [4] *Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.*: Mikrobiologia żywności, PZWL, Warszawa 1983.
- [5] *Chelkowski J., Bogacz J., Kaczmarek T.*: Ocena mikrobiologiczna jęczmieni browarowych ze zbiorów 1978 r. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny 1979, 23, 8, 6-7.
- [6] *Chelkowski J., Tobiasz W., Karwowska W.*: Charakterystyka mikoflory jęczmieni i słoðów. PFiOW 1980, 24, 12, 6-8.
- [7] *Chelkowski J., Trojanowska K.*: Ocena mikrobiologiczna jęczmieni browarowych. PFiOW 1979, 23, 4, 4-5.
- [8] *Chelkowski J., Trojanowska K.*: Ocena jakości jęczmienia browarowego na podstawie analizy mikrobiologicznej. PFiOW 1983, 27, 1, 5-7.
- [9] *Czajkowska D.*: Szkodliwe mikroorganizmy w przemyśle piwowarskim. PFiOW 1996, 40, 12, 12-13.
- [10] *Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A.*: Mikrobiologia w przemyśle piwowarskim – kurs praktyczny. IBPRS, Warszawa 1995.
- [11] *Douglas P. E., Flannigan B.*: A microbiological evaluation of barley malt production. Journal of the Institute of Brewing 1988, 94, 2, 85-88.
- [12] *Fassatiowa O.*: Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej. WNT, Warszawa 1983.
- [13] *Göpp K., Zaake S., Hertzsch V.*: Der Einfluß von Mikroorganismen auf die Lagerung und Vermälzung von Braugerste. Monatschrift für Brauerei 1971, 24, 6, 153-160.
- [14] *Kelly L., Briggs D. E.*: The influence of the grain microflora on the germinative physiology of barley. Journal of the Institute of Brewing 1992, 98, 5, 395-400.
- [15] *Kieninger H., Harbich I., Parsche I.*: Über die Mikroflora des Malzes. Brauwelt 1983, 22, 935-942.
- [16] *Kosař K.*: Problematika mikroorganizmů ve sladovském průmyslu, Změny v mikrofloře ječmene během skladování a słoðování. Kvasný Průmysl 1979, 25, 10, 221-224.
- [17] *Kotheimer J. B., Christensen C. M.*: Microflora of barley kernels. Wallerstein Laboratories Communications 1961, 83, 24, 21-28.
- [18] *Kwaśna H., Chelkowski J., Zajkowski P.*: Grzyby niedoskonałe (*Deuteromycetes*) – Sierpik (*Fusarium*), Flora Polska – Grzyby t. 22, Warszawa-Kraków 1991.
- [19] *Petters H. I., Flanning B., Austin B.*: Quantitative and qualitative studies of the microflora of barley kernels. Journal of Applied Bacteriology 1988, 65, 279-297.
- [20] *Raper K. B., Fennel D. J.*: The genus *Aspergillus*, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1965.
- [21] *Raper K. B., Thom Ch.*: A manual of Penicillia, Hafner Publishing Company, New York and London 1968.
- [22] *Skirgiello A., Zadara M., Ławrynowicz M.*: Glonowce (*Phycomycetes*), Pleśniakowe (*Mucorales*), Flora Polska – Grzyby t. 10, Warszawa-Kraków 1979.
- [23] *Spicher G.*: Schimmelpilze an Getreide und Ihre Bedeutung für die Qualität unter Besonderer Berücksichtigung der Braugerste. Monatschrift für Brauwissenschaft 1989, 2, 68-77.
- [24] *Wzorek W., Laśkiewicz A.*: Zakażenia mikrobiologiczne w procesie produkcji piwa. PFiOW 1990, 34, 8-9, 3-4.