

# Alkohol v silážích – dieteticky nežádoucí minoritní fermentační produkt?

Alkohol se v silážích vyskytuje v minoritním zastoupení a je produktem mikrobiálně biochemických přeměn. Klíčem kvality konzervovaných krmiv je vedle dodržování technologických zásad a doporučení, také složení epifytní mikroflóry, která je velmi variabilní co do počtu i druhové skladby. Jeho větší výskyt byl v minulosti spojován s kukuřičnými silážemi, někdy i v silážích z vlhkého mechanicky upraveného zrna, nebo při konzervaci krmné cukrovky.

**V**krmivech, kde převládla dominantní a konkurenčně silnější mikroflóra, zejména populace enterobakterií a kvasinek nad populací bakterií mléčného kvašení, které jsou při zahájení fermentačních procesů v minoritním postavení, mohou konkurenčně silnější rody nežádoucích bakterií při nevhodném uskladnění způsobovat výrazné poškození výsledné kvality siláží nejen alkoholovým zápacem, ale také velkými ztrátami živin, zejména energie. Tvorba alkoholu bývá častým důsledkem fermentace s masivní účastí enterobakterií, zvláště v silážovaných pícninách s nízkým obsahem sušiny a nedostatečným obsahem fermentovatelných sacharidů. Nevezniká pouze etanol, ale nebezpečná je produkce vyšších alkoholů (butanolu, propanolu, acetonu a dalších). Celkový obsah alkoholu v silážích může být mnohdy vyšší než 1 %, zatímco obvyklá mez se pohybuje od 0,1 do 0,4 %. Pokud se nepodaří utlumit aktivitu enterobakterií rychlým okyselením a vytvořením dokonalé anaerobiozy již v první respirační fázi, pak vzniká riziko znehodnocení výsledné siláže s vysokými ztrátami živin.

## Jaký je průběh vzniku alkoholu v silážích?

Masivní úloha v produkci alkoholu přísluší zejména kvasinkám, které současně siláže poškozují i tepelně. Při kvašení dochází k přeměně sacharidů na etanol a oxid uhličitý. Dekarboxylací kyseliny pyrohroznové dochází k produkci dalších fermentačních produktů, jako např. kyselina octová, kyselina mléčná a mravenčí, dikarboxylová kyselina, kyselina citronová, kyselina acetooctová, acetaldehyd, aceton, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub> apod. Acetaldehyd je akceptorem aktivovaného vodíku a tímto je redukován na etanol. Dýchání a kvašení probíhají u některých kvasinek stejnoměrně, zatímco u jiných může jeden pochod převládat nad druhým. Rody *Saccharomyces* a *Torulopsis* dokážou produkovat alkohol i za nepřítomnosti vzduchu (v anaerobních podmínkách). Kvasinky při přechodu z anaerobního do aerobního prostředí (po otevření žlabu, PE vaku) vlivem přítomnosti kyslíku omezují kvašení (tzv. Pasteurův efekt). Za přítomnosti vzduchu produkují alkohol hlavně rody *Candida* a *Hansenula*. V přítomnosti některých pro enzymy inhibičních látek zkvašují kvasinky hexózy přednostně na

etanol i za aerobních podmínek, což lze již považovat za krmivářský problém! S aktivitou kvasinek je spojena i zvýšená produkce tepla, takže dochází k plošnému tepelnému poškození uskladněných siláží a snížení výživné hodnoty. Při vyšší koncentraci kvasinek v silážované biomase oxidační procesy klesají na úkor procesů fermentačních.

## Diskutovaný minoritní fermentační produkt siláži – alkohol

Alkohol je v silážích produktem zejména kvasinek, jež se intenzivně rozmnožují za přítomnosti kyslíku, který je v nedostatečně udusaných silážích nebo při jejich zkrmování, kdy je opět přístupný kyslík. Produkty kvasinek nejsou pro přežívání kavice nežádoucí, ale jejich rozvoj je spojen s vysokými ztrátami živin a energie. Kvasinky fermentují nejen sacharidy, ale také vzniklou kyselinu mléčnou, a proto by jejich počet v kvalitní siláži neměl přesáhnout  $1 \times 10^5$  KJ/g. V silážích z těžce a velmi těžce silážovatelných pícnin je alkoholu většinou méně, zatímco v silážích z lehce silážovatelných pícnin by neměl být jeho obsah vyšší než 2 % v 1 kg sušiny. Také Mitrík konstatuje, že obsah



Ukázkové zakrytí sila

Foto archiv autorů



Nesprávný odběr a provzdušnění siláže způsobují nejen zahřívání siláže, ale i tvorbu alkoholu, odbourávání kyseliny mléčné a pomnožení plísní

Foto archiv autorů

**Tab. 1 – Fermentační charakteristiky kukuřičné siláže s obsahem sušiny nad 33 % odebrané v silázním žlabu ve středu a spodní části žlabu (v 1 kg sušiny)**

Kvalitativní uka-zatele siláže	Levá polovina žlabu (střed)	Pravá polovina žlabu (střed)	Spodní polo-vina žlabu
Sušina (g/kg sušiny)	331,50	334,50	336,70
pH	3,75	3,75	3,76
KVV (mg KOH/100 g)	2 240,0	2 210,0	2 230,0
Kys. mléčná (g)	69,98	69,66	68,61
Kys. octová (g)	20,81	20,03	20,79
Σ kyselin v sušině (g)	90,79	89,69	89,40
%podíl kys. mléč-né/Σ kyselin	77,08	77,67	76,74
Kys. máselná (g)	0	0	0
Kys. propionová (g)	0	0	0
Kys. valerová	0	0	0
Metanol (g)	0,90	0,60	0,59
Etanol (g)	3,62	4,48	3,86
1-propanol (g)	0	0	0
2-propanol (g)	0,60	0,29	0,30
2-butanol (g)	0,90	0,89	0,59

**Tab. 2 – Fermentační charakteristiky kukuřičné siláže s obsahem sušiny do 29 % odebrané v silázním žlabu ve středu a vrchní části silázního žlabu (v 1 kg sušiny)**

Kvalitativní uka-zatele siláže	Levá polovina žlabu (vrch)	Pravá polovina žlabu (vrch)	Vrchní polo-vina žlabu
Sušina (g/kg sušiny)	287,90	280,50	285,20
pH	3,77	3,76	3,76
KVV (mg KOH/100 g)	2 050,0	2 140,0	2 090,0
Kys. mléčná (g)	69,82	80,57	78,19
Kys. octová (g)	30,22	24,96	26,30
Σ kyselin v sušině (g)	100,39	106,23	104,84
%podíl kys. mléč-né/Σ kyselin	69,55	75,84	74,58
Kys. máselná (g)	0	0	0
Kys. propionová (g)	0,35	0,70	0,35
Kys. valerová	0	0	0
Metanol (g)	2,78	1,43	1,75
Etanol (g)	7,29	5,35	7,01
1-propanol (g)	0	0	0
2-propanol (g)	0,35	0	0,35
2-butanol (g)	1,39	2,14	1,75

etanolu v množství <1–2 % v 1 kg sušiny je akceptovatelný, což představuje hodnotu <0,3–0,6 % v původní hmotě. Obsah etanolu v siláži do 0,6 % má kladný vliv na chutnost siláže. Vyšší množství alkoholu (nad 2 %) již může negativně ovlivnit nejen příjem a je proto v siláži už nežádoucí. Pak je z dietetického pohledu nezbytné omezit dávkování takto poškozených fermentovaných krmiv na úroveň 6–8 kg na kus a den. V TMR pro dojnice by alkohol neměl překročit koncentraci 0,1–0,2 %. Alkohol, který vzniká v uvedeném množství, v siláži nezájistí ještě potřebný konzervační efekt, protože s nadměrnou produkcí alkoholu je možné počítat pouze u krmiv s vysokou koncentrací vodorozpustných sacharidů

(nevyloučené cukrovarské řízky, krmná řepa, cukrovka, hlízy topinamburu atd.), kde může vzniknout okolo 2 % i více alkoholu. Takové siláže jsou z dietetického hlediska ke krmení nevhodné, protože působí negativně na bachorovou mikroflóru. V praxi je proto snaha omezit tvorbu alkoholu nejen dodržováním technologického postupu a zásad dobré výrobní praxe, ale také aplikací účinných konzervačních aditiv. Při ověřování vlivu biologických a biochemických aditiv na výslednou kvalitu, hygienickou jakost a fermentační charakteristiky silážovaného vlnkového mačkaného zrna kukuřice Bíro a kol. (2009b) nejzjistili žádné zvýšení hladin alkoholu v silážích. Pokusné varianty měly hodnoty alkoholu v rozmezí 1,77–2,34 g/kg

sušiny, zatímco neošetřená kontrolní siláž měla hodnotu alkoholu neprůkazně vyšší ( $2,61 \pm 0,166$  g/kg sušiny.) Je zřejmé, že mikrobiální stimulace silážní fermentace měla pozitivní efekt na snížení alkoholového kvašení a aktivitu enterobakterií. Proto se v praxi doporučuje i při konzervaci silážní kukuřice aplikovat vhodná mikrobiální aditiva. V tabulkách 1 a 2 jsou uvedeny fermentační charakteristiky kukuřičných siláží s rozdílným obsahem sušiny. Z výsledků vyplývá, že hodnoty alkoholu jsou vyšší zpravidla u kukuřičných siláží s nižším obsahem sušiny (méně než 30 %), zatímco u dalších vzorků byly hodnoty jen mírně zvýšené. Velký význam má i způsob uskladnění a intenzita udusání, neboť v horních partiích silážního žlabu je patrná tendence vyšší produkce alkoholu vlivem horšího udusání a větší poréznosti siláže. Alkoholový pach v silážích je zpravidla způsoben vyšším obsahem alkoholu (nad 0,8 %, resp. nad 1 %), vyšší výskyt kvasinek, nepravých BMK, vlivem rozsáhlého provzdušnění při špatném způsobu odběru a při uchování a zbytkových sacharidů.

## Kvasinky a jejich metabolismus

Kvasinky patří mezi mikroskopické houby. Za kvasinky se všeobecně pokládají i ty mikroorganismy, které tvoří spory ve vřeckách, tedy zástupci hub vřeckovýtrusných. Jedná se o eukaryotní, fakultativně anaerobní mikroorganismy. Za anaerobních podmínek způsobují alkoholové kvašení. Kvasinky nemají orgány umožňující pohyb, nejsou tedy schopny aktivního pohybu. Kolonie mají různý povrch – hladký, drsný nebo slizovitý s většinou krémovým zbarvením. Metabolismus kvasinek zahrnuje biosyntézu látek neboli asimilační proces, na které potřebuje buňka energii; nebo rozkladné procesy – degradaci neboli katabolismus – disimilační proces, při tomto procesu naopak buňka energii uvolňuje. Katabolismus je regulován především hladinou ATP a NADH v buňce, anabolismus je řízen především množstvím produktů jeho drah. Katabolismus a anabolismus probíhají odděleně v různých částech buňky. Energie uvolněná při katabolismu se může využít na uskutečnění anabolického procesu, avšak energie uvolněná z katabolického procesu se nikdy zcela nespotřebuje při asimilačním procesu a uvolní se ve formě tepla do prostředí. Z celkové volné energie se použije na biosyntetické procesy v buňce okolo 29 %. Obsah sacharidů a dostupnost kyslíku jsou hlavní podmínky prostředí pro metabolismus kvasinek.

## Téma I: Výroba konzervovaných krmiv

### Kvasinky a alkoholové kvašení

Při kvašení neboli fermentaci dochází k přeměně sacharidů na etanol a oxid uhličitý. Samotnému kvašení předchází fosforylace, a to až po tvorbě kyseliny pyrohroznové. Dekarboxylací kyseliny pyrohroznové dochází k produkci fermentačních produktů, jako např. acetaldehyd, kyselina octová, kyselina mléčná a mravenčí, dikarboxylová kyselina, kyselina citronová, kyselina acetocitová, aceton,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2$  apod. Acetyldehyd je akceptorem aktivovaného vodíku a tímto je redukován na etanol. Výsledkem jsou dva moly etanolu a dva moly  $\text{CO}_2$ .

### Fermentace glukózy

Také kvasinky vážně konkuruje mléčným bakteriím a jsou původci mikrobiálního poškození a alkoholového kvašení. Vyznačují se vysokou mikrobiální a enzymatickou aktivitou. Jsou aerobní (až fakultativně anaerobní povahy), takže mohou růst i při relativně nízké koncentraci kyslíku (uvnitř silážního žlabu). Jsou silně acidotolerantní a jejich aktivita je inhibována až při pH 3,2, zatímco BMK končí aktivitu při pH > 3,6. Z hlediska silážování jsou důležité rady *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* nebo *Hansenula*. Za anaerobních podmínek fermentují vodorozpustné sacharidy na etanol a  $\text{CO}_2$  při snížení obsahu energie asi o 0,2 % v závislosti na obsahu sušiny siláže. Masivní pomnožení kvasinek způsobuje nejen samozářev a následnou destabilizaci siláží, ale zkrmování takových siláží může být příčinou výrazných průjmu v skotu. Kvasinky představují velmi četnou skupinu epifytní mikroflóry, která je schopná perzistence v kvasém procesu. Některé druhy kvasinek (*Pichia* a *Candida*) sachározu nezvraší a jen 3 % ze všech druhů kvasinek (např. *Candida*) zkvašuje celobízu. U většiny kvasinek je zjištěna horší schopnost fermentovat i různé disacharidy, i přesto, že disacharidy jsou利用ovány na monosacharidy, které jsou dále fermentovány. Rady *Candida* a *Hansenula* produkují alkohol i za přítomnosti vzduchu! Naproti tomu rady *Saccharomyces* a *Torulopsis* dokážou produkovat alkohol i za nepřítomnosti vzduchu, tedy v anaerobních podmínkách u dobře zakrytých siláží. Za aerobních podmínek fermentují kvasinky zbytkové sacharidy siláže, popř. vytvořenou kyselinu mléčnou, čímž dochází k velké ztrátě energie zahříváním, uvolnění volné vody a výraznému pomnožení zárodků. Fermentace glukó-

zy na etanol je tak provázena zvýšením teploty a vysokou ztrátou sušiny (48 %). Kvasinky jsou proto považovány za hlavní příčinu aerobní nestability siláží. Alkoholové kvašení není pro silážování vhodné, protože nevzniká žádná kyselina, a navíc dochází ke ztrátám uhlíku, navíc některé acidotolerantní kvasinky, jako jsou kandidy, mohou sekundárně fermentovat i kyselinu mléčnou. Po otevření sila kvasinky oxidují kyselinu mléčnou na vodu a oxid uhličitý, a tak v důsledku stoupajícího pH připravují půdu pro kažení siláže dalšími mikroorganismy. V přítomnosti některých enzymových jedů zkvašují kvasinky hexózy na etanol i za aerobních podmínek, což představuje velký krmivářský problém! Při vyšší koncentraci kvasinek oxidační procesy postupně klesají na úkor procesů fermentačních. Kvasinky jsou zodpovědné za tvorbu alkoholu v silážích.

### Jaké jsou technologické možnosti k omezení aktivity kvasinek a tvorby alkoholu v silážích?

- Technologicky zlepšit silážovatelnost pícnin
- Faktor odlišného složení epifytní mikroflóry
- Obsah nečistot a způsob sklizně (měl by být pod 3 %)
- Výška strniště (min. 8–10 cm vysoké u TTP)
- Doba sečení (ne za rosy)
- Obsah sušin silážované biomasy a způsob jeho úpravy (problém vysokých sušin – nad 50 %, při kterých je jen asi 10 % BMK aktivních)
- Čistota silážních prostor
- Způsob a rychlosť naskladňování, rozhrnování, dusání a zakrytí
- Aplikace silážních aditiv
- Způsob odběru a zapřavení siláží do TMR.
- Vliv poškozeného krmiva kvasinkovým metabolismem na zdravotní stav zvířat
- Kvasinky jako mikroorganismy nepředstavují pro zdraví zvířat přímé riziko, neboť se vyskytují v životním prostředí zvířat zcela běžně. Problém ale nastává až při jejich přemnožení a jejich výskytu v množství  $10^{12}/\text{g}$  a jejich rozsáhlé metabolizaci živin konzervovaných krmiv.
- Narušená konzervovaná píce pak následně negativně ovlivňuje: fermentaci v bachoru, způsobuje indigesce, záněty sliznic trávicího ústrojí, dystrofie a záněty jater.
- Příčinou toho je i špatná utilizace amoniaku v bachorové tekutině přežvýkavců.

- Nedostatečně jsou využívány NL a mikrobiální protein je tvořen v malém množství, což negativně ovlivňuje produkci mléka.
- Metabolity vytvořené během aerobní fermentace způsobují snížení chutnosti siláží a jsou důvodem snížení příjmu sušiny až o 30 %.
- Kvasinky jsou zodpovědné za zvýšenou tvorbu etanolu, čímž je negativně ovlivněna chutnost krmiv;
- Takto mikrobiálně narušená siláž znehodnocuje celou TMR a obtížně se dekontaminuje;
- Aerobně narušená siláž představuje riziko pro zkrmování zvířatům, i vzhledem k výskytu nežádoucích mikroorganismů v siláži = především plísně.
- Tepelně poškozené siláže zvýšenou aktivitou kvasinek mají negativní vliv na užitkovost zvířat (N-ADF); snižují stravitelnost organické hmoty a takové siláže mají i horší konverzi živin.

### Závěr

Alkohol, nejen etanol, ale zejména 1-propanol, 2-propanol či 2-butanol jsou minoritními produkty kvasného procesu v siláží s výšším obsahem jednoduchých sacharidů. Při jejich větším zastoupení působí dieteticky rušivě na trávení, omezují stravitelnost a produkci TMK, jakož i proteosyntézu mikrobiálního proteinu. Ve snaze omezit ztráty energie v siláži s větším zastoupením alkoholu, je nezbytné dodržovat technologické zásady a přídavek účinných silážních aditiv. Produkce alkoholu v silážích by proto měla být rutinní záležitostí všech laboratoří, které analyzují krmiva před jejich zařazením do krmných dávek vysokoužitkových dojnic.

*Prof. MVDr. Ing. Petr Doležal, CSc.,*

*MVDr. Ing. Jan Dvořáček<sup>1</sup>,*

*Ing. Jan Pazdera<sup>2,3</sup>,*

*doc. Dr. Zdeněk Havlíček,*

*dr. hab. Inž. Katarzyna*

*Szwedziak, prof. uczalny<sup>4</sup>,*

*prof. Ing. Miroslav Juráček, Ph.D.<sup>5</sup>*

*Ústav výživy zvířat a pícninářství,*

*Mendelova univerzita v Brně*

*<sup>1</sup>Sdružení odborných služeb*

*Skalice nad Svitavou, s. r. o.*

*<sup>2</sup>Ústav agronomických vied,*

*FAPZ, SPU v Nitre,*

*<sup>3</sup>KWS OSIVA s. r. o.*

*<sup>4</sup>Uniwersytet przyrodniczy we Wrocławiu*

*<sup>5</sup>Fakulta agrobiologie a potravinových*

*zdrojov, SPU v Nitre*

*Kontakt: petr.dolezal@mendelu.cz*