

## STANOVENIE STUPŇA MIKROBIÁLNEJ KONTAMINÁCIE PRI EXTRAKCII SACHARÓZY POMOCOU ANALYZÁTORA *MICROZYM- L*

DANDÁR,<sup>1</sup>A., KOPECKÝ<sup>2</sup>J., ULIČNÁ<sup>1</sup>, K., PAWLOWSKI<sup>3</sup>, B.

<sup>1</sup>Chemickotechnologická fakulta STU Bratislava, <sup>2</sup>Jako, s.r.o. Libeznice

<sup>3</sup>Wasquehal, Francúzsko

Počas cukrovarníckej kampane 1999 a 2000 v Trnavskom cukrovare sa vykonávali merania na zisťovanie mikrobiálnej kontaminácie počas získavania difúznej šťavy extrakciou repy. Na dezinfekciu sa používali dezinfekčné prostriedky SUCAZUR 1410 a SUCAZUR 1451. Mikrobiálna kontaminácia sa sledovala meraním obsahu kyseliny mliečnej pomocou analyzátoru Microzym - L s enzýmovou elektródou. Dezinfekčný prostriedok a merací prístroj dodala francúzska americká spoločnosť Nalco (predtým Aquazur, predtým Degrémont Erpac). Výsledky meraní a prípadné zmeny v množstve dávkovaných dezinfekčných prostriedkov boli konzultované s firmou Jako, s. r. o. Libeznice.

V sladkých rezkoch dopravovaných na difúziu a najmä počas vylúhovania v difúzeroch prebiehajú nežiadúce mikrobiálne procesy, ktoré sú vážnym problémom pri kontinuálnej prevádzke extraktorov. Preto sa odporúča použiť vhodné dezinfekčné látky a použiť dostatočne vysoké teploty, aby sa vytvárali nepriaznivé podmienky pre činnosť mikroorganizmov. Mikrobiálnou aktivitou sa znižuje pH a zvyšuje sa obsah organických kyselín (1). Organické kyseliny sa dostávajú do surovej šťavy z repy a môžu vznikať aj počas spracovania. V repe sú obsiahnuté väčšinou v malých koncentráciách, ako prechodné alebo konečné produkty metabolizmu sacharidov. Medzi kyseliny, ktoré sa vyskytujú v cukrovej repe patrí kyselina citrónová, šťavelová, jablčná, jantárová, adipová, vinná, mliečna, octová, mravčia. Počas spracovania vznikajú v surovej šťave ďalšie organické kyseliny rozkladom sacharózy alebo invertu vplyvom pH a teploty činnosťou mikroorganizmov a rozkladom prítomných necukrov (2).

Podstatné zvýšenie je vidieť u kyseliny mliečnej, čo je dôsledkom bakteriálnej činnosti pri extrakcii (3). Kyselinu mliečnu tvoria tzv. kyselinotvorné baktérie rodu *Lactobacillus* a nepriamo sa jej tvorby zúčastňujú aj sacharolytické druhy baktérií rodu *Clostridium* (4). Prítomnosť dochádza k stratám sacharózy, ktoré zodpovedajú približne dvojnásobku množstva vzniknutej kyseliny mliečnej (5). Prey (6) uvádza, že podiel sacharózy, rozloženej cestou mliečného kvasenia je až 90% . Nickisch a Mauch (7) uvádzajú, že v extraktoroch sa straty cukru vyvolané látkovou výmenou termofilných baktérií, pohybujú medzi 0,05% až 0,5% na repu. Vznik kyseliny mliečnej vystihuje Lobry de Bruinova - van Ekensteinova schéma. V ďalších stupňoch výroby cukru vzniká v alkalickom prostredí za zvýšenej teploty primárne glukóza a fruktóza. Zdá sa, že tento rozklad je katalyzovaný kyselinou mliečnou, ktorá sa tvorí pri rozklade obidvoch hexóz. Ide teda o autokatalyzovanú reakciu (8). Z uvedených údajov je vidieť, že mikrobiálnou činnosťou dochádza k značným stratám sacharózy a tiež k zhoršeniu technologických parametrov, ako je pokles hodnoty pH, vzrast koncentrácie kyseliny mliečnej, dusitanov a polysacharidov v šťave. Tomu sa snažíme v cukrovarníckej technológii zabrániť dodržiavaním zásad pracovného postupu na difúzii a používaním vhodných dezinfekčných prostriedkov na spomalenie alebo zastavenie činnosti mikroorganizmov.

## Spôsoby detekcie mikrobiálnej kontaminácie v extraktoroch

Mikrobiálnu kontamináciu môžeme sledovať priamymi alebo nepriamymi metódami.

**Priame metódy** - klasické kultivačné metódy poskytujú výsledky za 24 - 48 hodín, u kvasiniek a plesní dokonca až za niekoľko dní. Umožňujú síce vedľa kvantitatívneho stanovenia aj kvalitatívne určenie mikrobiálnych druhov, sú však veľmi náročné na prevedenie a vybavenie laboratória. Okrem toho výsledky získané za tak dlhý čas sa nedajú využiť na riadenie dezinfekcie. Hlavne z týchto dôvodov boli hľadané metódy, ktoré by boli jednoduchšie a poskytovali by výsledky za kratší čas.

**Nepriame metódy** - nimi sú sledované zmeny v obsahu produktov mikrobiálneho metabolizmu alebo sú sledované fyzikálno chemické zmeny v médiu spôsobené činnosťou mikroorganizmov.

### a) mikroskopické metódy

Pre rýchle priame počítanie buniek sa využívajú bežné mikroskopické techniky (fázový kontrast, polarizačná mikroskopia) a rôzne postupy farbenia, prípadne počítacie komôrky (4). Bežné mikroskopické sledovanie odobraných vzoriek dáva pomerne rýchle obraz o mikrobiálnej kontaminácii, je však limitované rozlišovacími možnosťami medzi živými a mŕtvymi bakteriálnymi bunkami. Mikroskopický obraz je tiež rušený prítomnosťou repných častíc, preto si toto stanovenie vyžaduje určitú skúsenosť a môže sa uplatniť iba v laboratóriách, ktoré majú k dispozícii zaškoleného pracovníka.

### b) bakteriálna enzymatická aktivita

Populácia rastúcich baktérií vyvoláva v prostredí najprv zmeny na úrovni redukčno – oxidačných pochodov. Jedná sa o zvýšenú tvorbu enzýmov dehydrogenáz a pokles redoxpotenciálu. Tieto zmeny možno sledovať pomocou redoxindikátorových testov alebo meraním redox – potenciálu. U nás najpoužívanejší indikátor resazurín prechádza redukciou z modrého sfarbenia cez červený rezorufín až na bezfarebný dihydrorezorufín. Subjektívna chyba pri vizuálnom hodnotení môže byť eliminovaná modifikovanou metódou na spektrofotometrické meranie farby. Hlavnou nevýhodou je, že reakcia je rušená prítomnosťou redukujúcich látok (vplyv invertného cukru v repe sa prejavuje až pri množstve nad 5%, čo sa v zdravej repe nevyskytuje). Rušivo však môžu pôsobiť redukčné činidlá používané pri extrakcii ako prídavné látky. Jedná sa predovšetkým o oxid siričitý a z dekontaminačných prostriedkov napr. diťokarbamát Busan 881. Indikátor resazurín môže byť spoľahlivým detektorom kontaminácie iba v prípade, že je používaný v médiu bez rušivých redukčných látok (9).

### c) stanovenie mikrobiálnych metabolitov

Zo stanovení metabolitov vytvorených mikrobiálnou činnosťou je najbežnejšie sledovanie obsahu organických kyselín, najčastejšie kyseliny mliečnej, a to v súčasnej dobe najrýchlejšie a najpresnejšie enzymaticky alebo izotachoforeticky. Medzi najjednoduchšie a najstaršie spôsoby stanovenia zmien v obsahu organických kyselín patrí tiež sledovanie pH.. Meranie pH je najjednoduchšou metódou a poskytuje okamžité údaje. Samotné meranie pH nestačí na dostatočné hodnotenie mikrobiálnej úrovne. Pri meraní pH je nutné prihliadnuť na mnoho iných faktorov, ktoré ovplyvňujú hodnotu pH nezávisle na kontaminácii, ako napríklad prídavok dezinfekčných a ostatných látok, meniac sa hodnota pH čerstvej vody, kyslé produkty látkovej výmeny repy atď. (11).

Ďalšími z možných sledovaných metabolitov sú dusitanové ióny, ktoré možno sledovať spektrofotometricky alebo pomocou dusitanových papierikov (10). Dusitany vznikajú pri získavaní difúznej šťavy bakteriálnou redukciovou dusičnanov obsahnutých v repe. Za určitých predpokladov môže byť ich prítomnosť kritériom pre kontamináciu. Obmedzenie tohto stanovenia spočíva v tom, že intenzita zafarbenia nemusí byť vždy úmerná stupňu kontaminácie, pretože substrát sa nemusí kontamináciou obohacovať iba dusitanovými iónmi, môže tiež dochádzať k ich ďalšej redukcii. Niektoré mikroorganizmy sú schopné ďalej redukovať dusitan na amoniak, prípadne až na molekulový dusík, takže dusitan je v tomto prípade iba medziproduktom a negatívny výsledok môže znamenať, že redukcia je už za štádiom dusitanov (12).

Kyselina mliečna sa vyskytuje vo forme D – a L – optických izomérov. Väčšina autorov uvádza ako hlavný produkt degradácie sacharózy kyselinu L – mliečnu (13, 14). Na stanovenie kyseliny mliečnej je vo svete najviac využívaná enzymatická metóda. Umožňuje oddelené stanovenie D – a L – formy kyseliny mliečnej. Princípom spektrofotometrickej metódy je stanovenie redukovanej formy koenzýmu laktátdehydrogenázy, tj. nikotín-amidadenín-dinukleotidu (NADH), ktorý vzniká z oxidovanej formy (NAD) pri oxidácii kyseliny L – alebo D – mliečnej na pyruvát v prítomnosti enzýmu L – alebo D – laktát dehydrogenázy. Pre posunutie reakcie v prospech pyruvátu je tento následnou reakciou za prítomnosti L – glutamátu a za katalýzy enzýmom glutamátpyruváttransaminázou z prostredia odstraňovaný. Výsledné množstvo je v stechiometrickej rovnováhe s množstvom kyseliny L – alebo D – mliečnej a stanovuje sa na vhodnom spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 334, 340 alebo 365 nm (15).

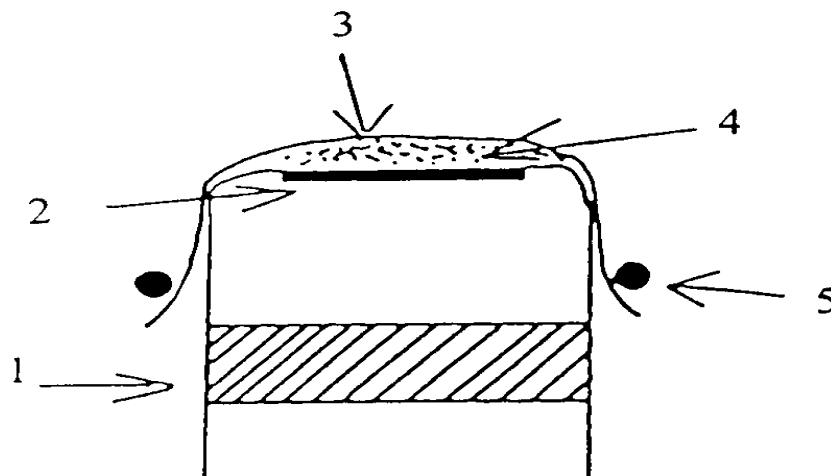
V poslednej dobe preniká do cukrovarníckej analytiky kapilárna izotachoforéza. Metóda je založená na rozdielnej pohyblivosti iónov v elektrickom poli. Možno pomocou nej stanoviť nielen celkový obsah kyseliny mliečnej, ale umožňuje tiež stanoviť prchavé kyseliny. Nemožno však rozlíšiť optické izoméry kyseliny D- a L- mliečnej. Vyznačuje sa prednosťami chromatografických metód, ako sú rýchlosť, jednoduchosť vlastného stanovenia, citlivosť, malá spotreba vzorky a súčasné stanovenie celej skupiny látok, príprava vzorky je jednoduchá a nie je potrebné odstraňovať sacharózu a látky, ktoré by rušili stanovenie (15, 16).

Výhľadovo ako perspektívne sa javia enzýmové elektródy na stanovenie kyseliny L- mliečnej. Princíp a výhody tejto metódy sú opísané v ďalšej časti článku.

### **Stanovenie obsahu kyseliny mliečnej pomocou analyzátora MicrozyM-L s enzýmovou elektródou**

Princíp merania na analyzátore Microzym (obr.1) spočíva v použití enzymatického senzora. Tento senzor je zložený vo vnútri svojej citlivej sekcie z dvoch platinových elektród. Plochá elektróda diskového prierezu je umiestnená na citlivej časti a nazýva sa pracovná elektróda. Druhá elektróda s prstencovitým prierezom je umiestnená v nižšej časti, nazýva sa pomocná elektróda (obr. 2). Keď je senzor pripravený, aplikuje sa naň enzým





Obr. 2. Meracia časť analyzátoru

1 – pomocná elektróda, 2 – pracovná elektróda, 3 – membrána  
4 – enzým, 5 – gumový prstenec

Meranie na prístroji Microzym je rýchle a jednoduché. Poskytuje výsledky v mg/l alebo v mmol/l. Vzorka sa pred meraním nemusí špeciálne upraviť, iba sa zriedi s fosfátovým pufróm na pH = 7,2. Pred meraním série vzoriek sa prístroj kalibruje štandardnými roztokmi kyseliny mliečnej (1,25 a 0,625 mmol). Roztok elektroaktívnej látky sa pripravuje rozpustením kryštalického ferikyanidu draselného vo fosfátovom pufrí (20 mmol). Po optrebovaní enzýmu (3-6 týždňov), čo závisí od frekvencie merania a obsahu kyseliny mliečnej vo vzorkách, je potrebné enzým vymeniť. Výmena enzýmu sa vykoná po odstránení membrány a vyčistení elektródy čistiacim roztokom. Fosfátový pufr, štandardné roztoky kyseliny mliečnej, ferikyanid draselný a čistiaci roztok sú dodávané spolu s prístrojom spoločnosťou Nalco.

### Experimentálna časť

V priebehu celej kampane 2000 a kampane 1999 (od 12.10. do 20.11. 1999) sa vykonávali merania na zisťovanie mikrobiálnej kontaminácie počas získavania difúznej šťavy. V pravidelných intervaloch (3 krát za týždeň) bol sledovaný obsah kyseliny mliečnej v sladkých rezkoch, šťave z extraktora, difúznej šťave a rezkolisovej vode. Pravidelne bola tiež sledovaná spotreba dezinfekčných prostriedkov. Na stanovenie obsahu kyseliny mliečnej bol použitý analyzátor Microzym - L. Odbery surovej šťavy z extraktora, rezkolisovej vody, difúznej šťavy a sladkých rezkov sa vykonali na štandardných miestach používaných prevádzkovým laboratóriom. Na dezinfekciu sa používal biocídny prostriedok SUCAZUR.

### *Charakteristika dezinfekčného prostriedku SUCAZUR a spôsob jeho dávkovania (17.)*

SUCAZUR 1410. Jedná sa o biocid, ktorý zabezpečuje dezinfekciu pri výrobe cukru a minimalizuje riziko infekcie v extraktore. Aktívnu zložku tvoria ditiokarbamáty. Prostriedok sa dávkuje pomocou čerpadla do extraktora a do rezkolisovej vody. Do extraktora typu Dds sa

prípravok dávkoval na dvoch miestach, a to do prvej a tretej komory. SUCAZUR 1410 dávkaný do nádrže s rezkolisovou vodou umožňuje zabrániť infekcii v tejto nádrži a súčasne obmedzuje zanášanie potenciálnej infekcie rezkolisovou vodou pri jej návrate do extraktora.

SUCAZUR 1451. Prípravok má bakteriostatické a baktericídne vlastnosti a bol špeciálne vyvinutý pre cukrovarnícky priemysel. Sucazur 1451 má dvojaký účinok: blokuje respiráciu buniek a pozmeňuje transport cez bunkovú membránu. Aktívnou zložkou sú kvartérne amóniové soli. Tento biocid bol dávkaný na vypranú repu po zriedení s vodou o teplote 70 °C. Táto zmes bola rozprašovaná pomocou trysiek na celú šírku dopravného pásu pred vstupom repy do násypky nad rezačkami. V kampani 2000 sa toto množstvo rozdelilo a prípravok sa tým istým spôsobom rozprašoval nielen na vypranú repu, ale aj na rezky dopravované do extraktora.

### *Výsledky sledovania mikrobiálnej kontaminácie*

Maximálne, minimálne a priemerné hodnoty obsahu kyseliny mliečnej pre rok 1999 a 2000 sú uvedené v tab.1 a 2 a priemerné spotreby dávkaných dezinfekčných prostriedkov.

Tab. 1. Maximálne, minimálne a priemerné hodnoty obsahu kyseliny mliečnej v kampani 1999 a 2000 .

Kyselina mliečna mg/l		Sladké rezky	1. komora extraktora	3. komora extraktora	Difúzna šťava	Rezkolisová voda
Kampaň 1999	max..	234,0	569,7	493,2	369,0	257,4
	min.	9,0	62,2	59,6	83,8	17,1
	priemer	63,94	303,9	221,95	223,92	82,7
Kampaň 2000	max.	84,6	769,5	503,1	500,4	171,0
	min.	5,4	38,7	33,3	58,5	16,2
	priemer	41,9	222,4	175,8	176,7	69,1

Tab. 2 Priemerné spotreby dávkaných dezinfekčných prostriedkov v cukrovare Trnava

	SUCAZUR 1451 g/t	SUCAZUR 1410 g/t
Kampaň 1999	3,60	17,82
Kampaň 2000	3,56	17,26

Kontinuálne dávkovanie SUCAZURU 1410 do extraktora a do rezkolisovej vody bolo najmä ku koncu kampane doplnené nárazovými dávkami formalínu, ktorý bol aplikovaný hlavne pri prerušení výroby a pri zvýšení kontaminácie z dôvodu extrémne zhoršenej kvality repy.

## Záver

V úvode článku sú uvedené základné a najpoužívanejšie metódy na stanovenie stupňa mikrobiálnej kontaminácie na úseku extrakcie repy a spomenuté sú ich hlavné nevýhody. V ďalšej časti je opísaný princíp merania obsahu kyseliny mliečnej ako indikátora bakteriálnej činnosti pomocou analyzátoru *MICROZYM-L* s enzýmovou elektródou. Uvedené sú aj výsledky meraní praktického využitia tohto prístroja pri riadení dezinfekcie v prevádzke cukrovaru. Výhoda enzýmového stanovenia na prístroji *MICROZYM-L* spočíva v jednoduchosti merania, nenáročnosti prípravy vzorky a rýchlom získaní výsledkov, čo umožňuje okamžitý zásah do procesu extrakcie sacharózy zo sladkých rezkov.

## Literatúra:

1. Arpai, J., Bartl, V.: Potravinárska mikrobiológia, ALFA, Bratislava, 1977, s. 226.
2. Bretschneider, R.: Technologie cukru, SNTL, ALFA, Praha, 1980.
3. Demeter, K. J., Kundrat, W., Neumann, H.: Zucker 9, 1956, s. 5.
4. Betina, V., Nemeč, P.: Všeobecná mikrobiológia, ALFA, Bratislava, 1977.
5. Carruthers, A., Callager, P.J., Oldfield, F.T.: Z. Zuckerind. 8, 1958, s. 541.
6. Prey, V., Braunsteiner, W.: Z. Zuckerind. 14, 1964. s. 205.
7. Nikisch, A., Mauch, W.: Zuckerind., 106, 1981, s. 521.
8. Valter, V.: Průmysl potravin, 16, 1965, s. 535.
9. Smolík, J.: Listy cukrov. a řep. 112, 1996, s. 267.
10. Smolík, J.: Listy cukrov. a řep. 112, 1996, s. 241.
11. Dziengel, A., Mauch, W.: Zuckerind., 104, 1979, s. 711.
12. Betina, V. a kol.: Mikrobiologické laboratorne metódy, ALFA, Bratislava 1988, s. 341.
13. Nystrand, R., Haskä G.: Zuckerind., 109, 1984, s. 1093.
14. Deruy, G., Ducatillon, J. P., Lescure, J. P.: Sucr. franc., 130, 1989, s. 96.
15. Čopíková, J., Kvasnička, F., Buriánková, T., Káš, J.: Listy cukrov. a řep. 105, 1989, s. 220.
16. Šlechtová, A., Kvasnička, F., Čopíková, J., Kadlec, P.: Listy cukrov. a řep. 101, 1985, s. 278.
17. Bubník, Z., Štarhová, H., Hinková, A., Pour, V., Kadlec, P.: Listy cukrov. a řep. 114, 1998, s. 151.