

Analýza manitolu ako indikátora bakteriálnej infekcie v trstinových a repných cukrovaroch

ANALYSIS OF MANNITOL, AS TRACER OF BACTERIAL INFECTIONS IN CANE AND BEET SUGAR FACTORIES

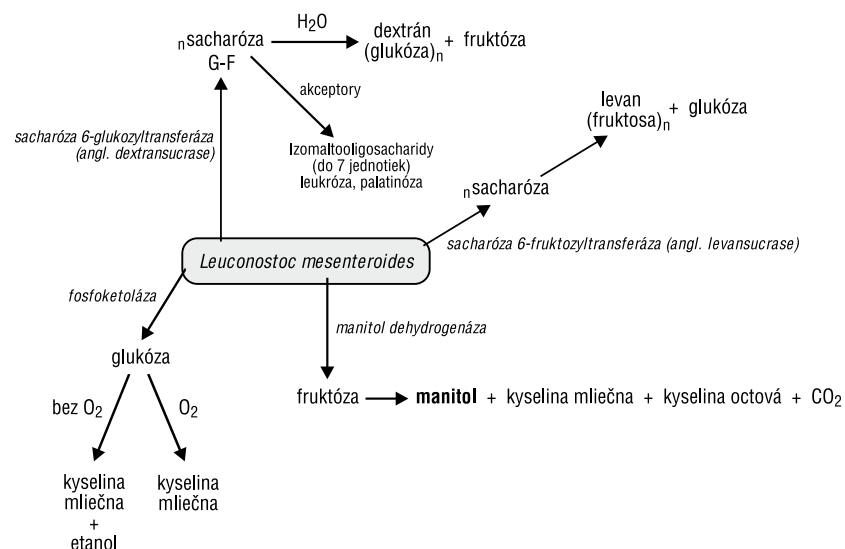
Gillian Eggleston – USDA-ARS-Southern Regional Research Center, New Orleans, USA

Dodávky alterovanej cukrovej trstiny alebo repy do cukrovarov môžu škodlivo ovplyvniť množstvo technologických operácií a dokonca viesť k odstávke cukrovaru. Až do obdobia posledných niekoľko rokov neexistovala overená, spoľahlivá, rýchla, jednoduchá a nie drahá metóda na meranie zhoršovania kvality práce cukrovaru. To znamenalo, že pracovníci cukrovaru neboli schopní preverovať jednotlivé dodávky cukrovej trstiny alebo repy a teda nevedeli, ktoré dodávky škodlivo ovplyvnia spracovanie a neboli schopní nevhodné dodávky neprijat'. Navyše, čo sa týka cukrovej trstiny, v súčasnosti je celosvetový dôraz na dodávanie vysokokvalitnej trstiny do cukrovarov. Následne výpočty platieb za cukrovú trstinu, ktoré obsahujú parameter zhoršenej kvality, môžu slúžiť na odstránenie pred dodávkami príliš alterovanej cukrovej trstiny, zlepšiť spracovanie a zabezpečiť lepšie hospodárenie s trstinou.

Hlavnou (ale nie jedinou) príčinou kazení sa cukrovej trstiny v USA a mnohých iných krajinách, najmä ak prevládajú teplé a vlhké podmienky, je infekcia baktériou *Leuconostoc mesenteroides*. Obdobne trpí za podobných podmienok infekciou baktériou *Leuconostoc* aj cukrová repa. Faktormi, ktoré ovplyvňujú infekciu, sú teplota a vlhkosť prostredia, množstvo zrážok a blata, poškodenie trstinovej stonky alebo repnej buľvy, veľký časový rozdiel medzi sberom a spracovaním a hygiena prevádzky.

Cukrovarnícky priemysel považoval skôr dextrans, viskózne glukopolysacharidy, za hlavný produkt kazení sa vplyvom infekcie baktériou *Leuconostoc* (obr. 1.).

Obr. 1. Hlavné metabolity baktérie *Leuconostoc* s významom v cukrovej trstine a repe (4): polysacharid levan je viac prevládajúci v alterovanej cukrovej repe



Vysoké koncentrácie dextrans (>1000 ppm na sušinu) môžu znížiť rýchlosť odparovania a kryštalizácie a surovárny môžu byť penalizované zo strany rafinérií pre nadnormatívny obsah dextransu v surovom cukre. Súčasné metódy stanovenia dextransu sú však buď príliš časovo náročné a komplikované [ASI enzymatická metóda (13)], nedostatočne špecifické [metóda zákalu (2)], príliš drahé [protilátková metóda (12)], príliš nepresné [protilátková metóda (12)] alebo príliš ťažké na interpretáciu výsledkov [metóda zákalu (2)]. Navyše ani jedna z týchto metód sa nedá použiť v platobnom systéme pestovateľov. Je známe, že manitol, cukorný alkohol, je tiež významným degradačným produktom kazení sa cukrovej trstiny vplyvom baktérie *Leuconostoc* (3, 4, 5, 6), kazení sa cukrovej repy (14, 15), a tiež bakteriálnej kontaminácie palivového alkoholu vyrábaného z cukrovej trstiny (7). Manitol je produkovaný aj baktériami *Lactobacillus*, napriek tomu je *Leuconostoc* najväčším producentom (7). Tento článok posudzuje analýzu manitolu ako indikátora bakteriálnej infekcie v trstinových a repných cukrovaroch.

Výsledky a diskusia

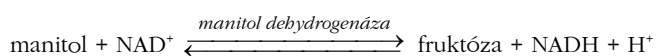
Trstinové cukrovary

V roku 2002 Egglestonová prvýkrát označila manitol za významný produkt kazení sa cukrovej trstiny. Manitol bol meraný za použitia iónovej chromatografie s integrovanou pulznou ampérometrickou detekciou (= IC-IPAD), čo ilustruje obr. 2. Aj keď oligosacharidy, ako palatinóza, leukróza a izomaltotrióza sú indikátormi silného kazení sa baktériou *Leuconostoc* (sú akceptorovými produktami pri akceptorových reakciách sacharóza 6-glukozyltransferázy počas tvorby dextransu – pozri obr. 1.), avšak je ťažké ich stanoviť v cukrovaroch bez použitia drahej sofistikovanej chromatografickej techniky. EGGLESTONOVÁ (3) ukázala v laboratórnom výskume, že existuje výborná korelácia ($R^2 = 0,98$) medzi obsahom manitolu a dextransu (merané ASI-II enzymatickou metódou). Neskôr v prevádzkovom výskume EGGLESTONOVÁ ET AL. (5) ukázali silnú koreláciu ($R^2 = 0,85$) medzi manitolom a dextransom v šťavách z rôznej cukrovej trstiny poškodenej mrazom. Trochu nižšia korelácia v prevádzkovom výskume je najpravdepodobnejšie spôsobená väčšou rôznorodosťou biologických vzoriek. Preto je manitol minimálne rovnako dobrý, ak nie lepší, ako dextrans na

predpovedanie problémov so zhoršovaním kvality spôsobenom baktériou *Leuconostoc*.

Enzymatická metóda merania manitolu v cukrovaroch

Až do roku 2005 sa manitol meral v cukorných produktoch z cukrovej trstiny aj repy použitím chromatografických metód, najmä IC-PAD (tiež známa ako HPAEC-PAD). Avšak chromatografické techniky sú príliš sofistikované pre použitie v cukrovare, veľmi drahé a vyžadujú vysokú odbornosť obsluhy. Preto EGGLESTONOVÁ A HARPER (6) vyvinuli enzymatickú metódu (Príloha) na meranie obsahu manitolu v trstinových šťavách priamo v cukrovare, ktorú je tiež možné aplikovať na repné šťavy. Metóda používa manitol dehydrogenázu (= MDH) na konvertovanie manitolu na fruktózu za prítomnosti koenzýmu NAD⁺. Vytvorený NADH je možné ľahko zmerať spektrofotometricky pri 340 nm:



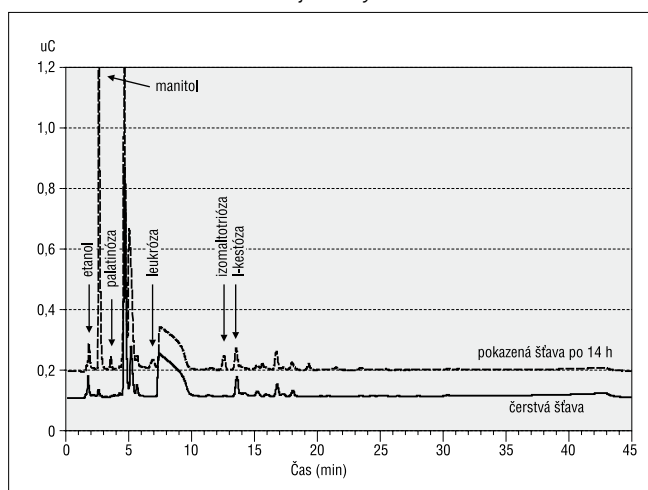
Na začiatku vývoja metódy sa objavili problémy týkajúce sa stability enzýmu MDH. Zistilo sa, že prídavok 30% glycerolu do tlmivého roztoku v zásobnom roztoku a zriedených roztokoch MDH je optimálny na stabilizáciu enzýmu. Lyofilizovaný MDH je stabilný v bežnej mrazničke pri -20 °C po dobu 6 mesiacov. Ešte vhodnejšie pre skladovanie zriedených roztokov sú teploty -40 °C.

Trstinová šťava obsahuje množstvo veľkých častíc, vrátane vlákien bagasila, zeminu a granule škrobu. Častice v nezriedenej a nefiltrovanej trstinovej šťave môžu silno interferovať enzymatické stanovenie manitolu. Preto sa musí trstinová šťava riediť minimálne v pomere 1:1 v glycinovom tlmivom roztoku. Ak je šťava veľmi pokazená, vyžaduje si ďalšie riedenie. Filtrácia zriedenej šťavy cez filtre s veľkosťou pórov 0,45 μm a následne 0,22 μm je nevyhnutná na odstránenie interferujúcich častíc. Takéto filtre sú relatívne drahé, je možné namiesto nich použiť filtráciu cez sklenený filter s prídavkom kremelinového filtračného prostriedku (pozri Prílohu).

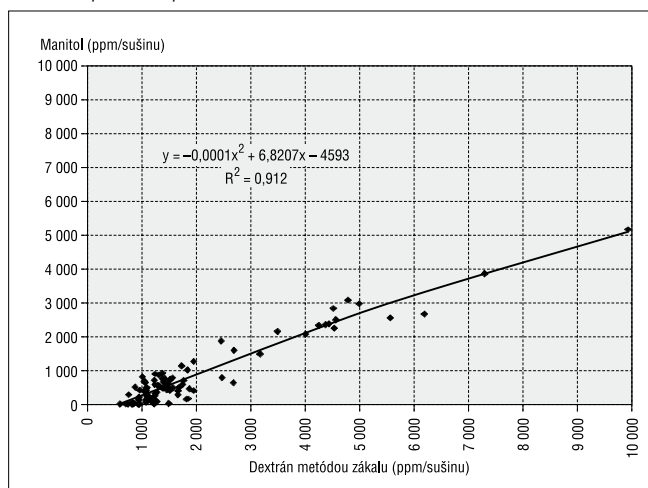
Závislosť medzi koncentráciou manitolu a absorpciou pri 340 nm po 5 min je približne lineárna až do 1 000 ppm, kvadratická závislosť je niekedy lepšia. Metóda je rýchla (približne 7 min pri izbovej teplote a do 4 min, ak sa použije na inkubáciu šťavy vodný kúpeľ s teplotou 40 °C), presná, vysoko špecifická pre manitol, a neovplyvňuje ju prítomnosť sacharózy, glukózy, fruktózy alebo dextransu. Presnosť bola prijateľná, aj keď je horšia pri nižších koncentráciách manitolu (6). Metóda sa dá ľahko vykonať s existujúcim vybavením v cukrovare. Súčasný náklady na jednu analýzu manitolu pre cukrovú trstinu v cukrovare sú len 0,60 USD pričom najvyššiu položku tvorí NAD v hodnote 0,45 USD na analýzu. Supravy na stanovenie manitolu v šťavách, napr. od fy BiosentecTM a MegazymeTM, sú teraz tiež dostupné, ale náklady presahujú 4 USD na analýzu. Inou možnosťou je použiť technológiu imobilizovaného enzýmu, napr. od BiosentecTM, ale po vstupných nákladoch na obstaranie zariadenia, cena na jednu analýzu presahuje 1 USD.

Enzymatická manitolová metóda od EGGLESTONOVEJ A HARPERA (6) bola overená ako vhodná prevádzková metóda pri stanovení koncentrácie manitolu v 188 vzorkách štiav z laboratorného (prejímkového) lisovania aj ze štiav provozných z 1. stupňa válcových mlynov v trstinovom cukrovare v Louisiane, USA (8). Keďže mnoho cukrovarov meria obsah dextransu v šťave rýchlou

Obr. 2. Zmena v IC-IPAD chromatograme po pokazení sa šťavy z cukrovej trstiny: palatinóza, leukróza a izomaltotrióza sú indikátormi závažnej tvorby dextransu



Obr. 3. Vzťah medzi obsahom manitolu a dextransu (meraný metódou zákalu) v šťavách z laboratorného lisovania a z 1. válcových lisů, v cukrovare v Louisiane, USA: viac ako 250–500 ppm/sušinu manitolu predpovedá problémy počas spracovania



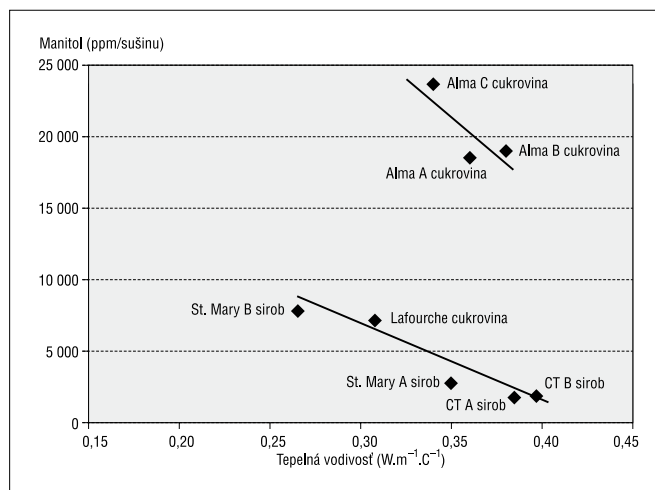
metódou zákalu (tzv. zákalový dextrans – metóda nie je špecifická pre dextrans). Vykonávala sa tiež aj táto analýza a výsledky boli porovnané s obsahom manitolu (obr. 3.).

Z obr. 3. je vidieť, že tu bola veľmi dobrá polynomická závislosť s koeficientom determinácie $R^2 = 0,912$ (i keď aj lineárna závislosť bola dobrá) medzi obsahom manitolu a dextransu metódou zákalu a že sa v šťavách môže nachádzať vysoké množstvo manitolu. Aj keď koncentrácie manitolu boli nižšie ako zákalový dextrans, obsah manitolu je všeobecne vyšší ako obsah dextransu, keď sa meria špecifickou metódou, tj. ASI-II enzymatická metóda a metóda dextransovej protilátky.

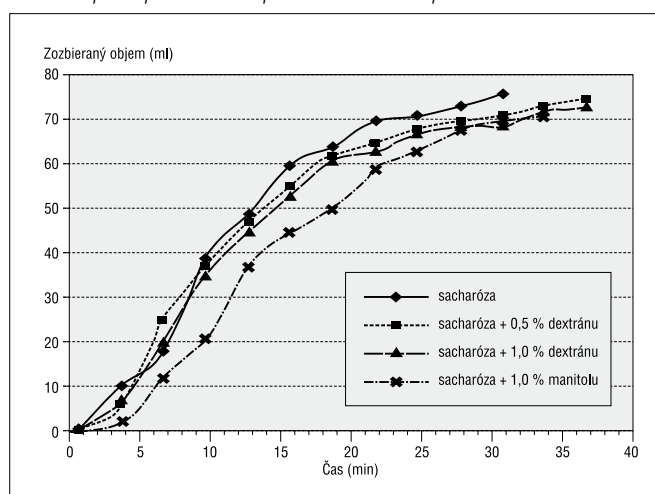
Toto zdôrazňuje vhodnosť a citlivosť manitolu na predpovedanie kazení sa cukrovej trstiny vplyvom baktérie *Leuconostoc* a iných baktérií.

Pracovníci cukrovárnickeho priemyslu podceňujú relatívne vysoké množstvá manitolu prítomné v alterovanej cukrovej trstine, ktoré môžu ovplyvniť spracovanie.

Obr. 4. Závislost medzi tepelnou vodivosťou a obsahom manitolu pre normálne a HTB vzorky – HTB vzorky sa vyskytujú po spracovaní silne alterovanej cukrovej trstiny; v CT boli A a B siroby normálne, Alma A a B cukroviny boli normálne/HTB a ostatné vzorky boli HTB: pre meranie manitolu z veľmi alterovanej cukrovej trstiny je potrebné vysoké riedenie, aby sa nepresiahol rozsah kalibračnej krivky



Obr. 5. Vplyv rôznych množstiev dextransu (T2000™) a manitolu na rýchlosť odparovania roztokov sacharózy (S = 50 %) pri teplote 95 °C pri konštantnom podtlaku



Stanovenie zákalového dextransu, keď nebol detegovaný žiaden manitol (obr. 3.), je možné vysvetliť podstatou metódy stanovenia dextransu zákalom. Táto metóda meria všetok materiál tvoriaci zákal pri zrážaní absolútnym etanolom (t.j. škrob strednej molekulovej hmotnosti [= SMMW], pokiaľ je amyláza súčasťou metódy, vlastné polysacharidy trstiny a iné zlúčeniny, ktoré tvoria „zákal“, ako napr. mikročastice bagasy), a preto sa vždy odmeria aj zákalové pozadie. Napr. v čerstvej šťave z cukrovej trstiny je približne 500–700 ppm na sušinu zákalového dextransu. V Louisiane sa technologické problémy predpokladajú, keď je obsah zákalového dextransu v šťave z drvenia okolo 1 000 ppm na sušinu (Adrian Monge, Cora Texas Inc., USA, osobná komunikácia), aj keď tieto výstražné „prahové“ limity závisia od pracovníkov cukrovare. Toto zodpovedá približne 250–500 ppm manitolu [obr. 4., upravený, od EGGLESTONOVEJ ET AL. (8)], pričom

vyššie hodnoty z tohto rozsahu sú presnejšie. Avšak tieto hodnoty manitolu možno považovať len za približný odhad dextransu, pretože manitol tvoria rôzne kmene baktérií *Lactobacillus*, aj keď *Leuconostoc mesenteroides* je najväčší laktobacilový pôvodca manitolu (7). Následne možno manitol považovať za citlivú mieru kazenja sa cukrovej trstiny vplyvom baktérie *Leuconostoc* a iných baktérií *Lactobacillus* a za vhodnú približnú mieru dextransu v šťave (nízkej, strednej a vysokej molekulovej hmotnosti).

Repné cukrovary

Na začiatku výskumu, bola použitá pokazená repná šťava z USA. Vytvorilo sa purpurové zafarbenie, ktoré spôsobilo obavy z možnej interferencie spektrofotometrického merania pri 340 nm. Vzorka však bola abnormálna, pretože následné aplikácie metódy na repnú šťavu z amerických a francúzskych cukrovárov boli úspešné, bez tvorby purpurového zafarbenia (tab. I.).

HUET (10) tiež testoval, adaptoval a vylepšil enzymatickú metódu na stanovenie manitolu v produktoch spracovania cukrovej repy, najmä pre rezky a surové šťavy. Citlivosť metódy sa odhaduje medzi 10–15 ppm manitolu. Absorbancia surovej šťavy v kvete so vzorkou sa niekedy zvýšila ešte pred pridaním enzýmu, ale doplnenie kroku s trojminútovou stabilizáciou alebo čerením Carrezovými roztokmi (alebo inými čeriacimi činidlami) pred pridaním enzýmu, odstránilo tento problém. Správnosť a presnosť metódy (presnosť bola nižšia pri nižších hodnotách manitolu) boli prijateľné a metóda sa v súčasnosti schvaľuje ako oficiálna ICUMSA metóda.

V repných cukrovarech sa najvyššie hodnoty manitolu našli vždy v extraktoroch a v časti sparovákov šťava/rezky. Vo francúzskych repných cukrovarech sa v surovej šťave nachádza viac ako (1,0–1,2).105 buniek.ml⁻¹ baktérie *Leuconostoc*, keď sa objavia problémy v spracovaní, čo zodpovedá 900–1 500 ppm manitolu, prepočítané na sušinu (10). Podobne ako pri cukrovej trstine, výstražné limity manitolu v surovej šťave sa rôznia od cukrovare k cukrovare a od regiónu k regiónu.

Ako manitol ovplyvňuje priemyselné spracovanie

Ako rastie v cukrovarníctve povedomie o manitole, tak isto rastie aj znalosť, ako ovplyvňuje spracovanie. Už v roku 1975 BUSS (1) pozoroval, že manitol vplyva na spracovanie znížením výťažnosti cukru. V roku 2004 EGGLESTONOVÁ ET AL. dokázali, že manitol sa, na rozdiel od sacharózy a redukujúcich cukrov, nerozkladá za priemyselných podmienok v cukrovare (5) a je teda stabilný. To znamená, že keď sa manitol dovezie do cukrovare v alterovanej trstine alebo repe, môže prejsť cez celú výrobu. Takto sa našli veľmi veľké množstvá manitolu v sirupoch, cukrovinách a melase (9) po spracovaní alterovaných surovín (obr. 4.).

Navše sa teraz manitol spája s fenoménom ťažko variteľných cukrovín (z angl. hard-to-boil = HTB) v Louisiane, USA, keď sa po spracovaní silne alterovanej cukrovej trstiny výrazne znížili tepelno-prestupné vlastnosti cukrovín. Vzťah medzi obsahom manitolu a tepelnou vodivosťou v normálnych a HTB vzorkách je ilustrovaný na obr. 4. Viac ako 24 000 ppm na sušinu manitolu sa našlo v jednej HTB cukrovine (Alma C). Celkovo bolo zvyšovanie koncentrácie manitolu sprevádzané znížením prestupu tepla. Toto nasvedčuje, že hygroskopický manitol bol minimálne jedným z faktorov znižovania prestupu tepla v HTB vzorkách.

Avšak, aj keď sa v tejto štúdií objavili dve zreteľné závislosti (obr. 4.) – jedna pre tri cukroviny z cukrovaru Alma a jedna pre ostatné vzorky (z CT, ze St. Mary a z cukrovaru Lafourche), HTB fenomén môže mať iné príčiny. Intermolekulová sieť (gél) (najpravdepodobnejšie z polysacharidov) bola hlavným faktorom podieľajúcim sa na vyššej viskozite v HTB cukrovinách (9). Teda, aj keď je manitol jedným z faktorov, nie je tým hlavným.

Bolo ukázané, že manitol predpovedá cukorné straty a problémy spôsobené dextransom, ako sú viskozita a v menšej miere problémy s filtrovateľnosťou pri cukrovej trstine (5). V roku 1998 Steinmetz a spolupracovníci (14) referovali, že manitol najlepšie koreluje s filtrovateľnosťou prvej saturovanej šťavy po spracovaní alterovanej cukrovej repy (poškodenej mrazom). Manitol môže tiež znižovať rýchlosť odparovania sirupov (obr. 5.), ale na potvrdenie je potrebný ďalší výskum.

Manitol ($C_6H_{14}O_6$; mol hm. 182,2) má nízku kladnú optickú otáčavosť, $[\alpha]_D$ pri 20 °C je +23° a môže prispievať k nesprávnym hodnotám polarizácie v šťavách z alterovanej cukrovej trstiny a cukrovej repy, avšak nie tak veľmi, ako vysoko kladný dextrans, $[\alpha]_D \sim +195^\circ$. Manitol je omnoho menej rozpustný ako sacharóza pri všetkých teplotách (11) a vytvára ihlicovité kryštály. Napr. rozpustnosť sacharózy pri 60 °C je 283 g.100 cm⁻³ a manitolu len 56 g.100 cm⁻³. Preto manitol kryštalizuje pri omnoho nižších koncentráciách ako sacharóza. Autorka momentálne skúma vplyv manitolu na kryštalizáciu sacharózy v priemyselných podmienkach.

Zhrnutie

O manitole, cukornom alkohole, sa teraz vie, že je hlavným degradačným produktom a citlivým indikátorom kazenía sa cukrovej trstiny a repy baktériou *Leuconostoc*. Koncentrácia degradačných produktov má všeobecne nasledovné klesajúce poradie: manitol > dextrans > kyselina D-mliečna (9, 10).

Koncentrácia manitolu v šťavách z trstinových a repných cukrovarov, ktoré spracovávajú rôzne množstvá alterovanej cukrovej trstiny resp. repy, sa dá jednoducho merať pomocou práve vyvinutej, presnej, správnej, rýchlej a nenákladnej enzymatickej metódy. Aj keď je presnosť nižšia pri nízkych koncentráciách manitolu, tieto koncentrácie sú pod výstražnými limitnými hodnotami, ktoré spôsobujú technologické problémy.

Existuje veľmi dobrá polynomická závislosť medzi obsahom manitolu a dextransu (metódou zákalu) v trstinových šťavách z laboratorného lisovania i z válcových stolic, zozbieraných počas kampane. V Louisiane, USA predpovedajú technologické problémy pri spracovávaní cukrovej trstiny, keď sa v šťave z 1. válcovej stolice objaví cca 1 000 ppm na sušinu zákalového dextransu, čo zodpovedá ~250–500 ppm na sušinu manitolu. Manitol možno považovať za citlivú mieru kazenía sa cukrovej trstiny vplyvom baktérie *Leuconostoc* a iných baktérií rodu *Lactobacillus*, za indikátor technologických problémov a môže sa tiež využiť na približný odhad dextransu v šťave.

Enzymatická metóda stanovenia manitolu je kvantitatívna a výsledky oprávňujú na ďalší výskum na jej využitie pri výpočtoch platieb za cukrovú trstinu, ktoré zahŕňajú výsledky analýz rôznych parametrov šťavy z lisovania. Zhrnutie manitolu, ako faktora zhoršovania kvality, do výpočtového vzorca by mohlo slúžiť ako odstrašujúci prostriedok pre pestovateľov v dodávkach extrémne alterovanej cukrovej trstiny, ako aj zlepšiť praktiky hospodárenia s cukrovou trstinou. Cena jednej analýzy enzymatickej

Tab. 1. Presnosť enzymatickej metódy od EGGLESTONOVEJ A HARPERA (6) na meranie obsahu manitolu v šťavách z cukrovej repy vyjadrená ako koeficient variácie (CV)

Vzorka	Pôvod	Počet merania (N)	Stredná koncentrácia manitolu (ppm/sušinu)	Variácia manitolu CV (%)
Repná šťava A	USA	11	1 539,7	3,7
Repná šťava B	USA	10	137,6	9,9
Surová šťava	Francúzsko	10	200,8	6,7

metódy pre manitol (USD 0,60) je omnoho nižšia ako cena rýchlej dextransovej analýzy založenej na monoklonálnej protilátkovej technológii (12). Manitol má ďalšiu výhodu oproti dextransu, ako indikátor kazenía sa cukrovej trstiny, pretože môže tiež indikovať dextrans, levan a iné polysacharidy tvorené baktériou *Leuconostoc* (5) a ďalšie bakteriálne a mikrobiálne kontaminanty.

Manitol je za podmienok priemyselného spracovania stabilný (4), ovplyvňuje výťažnosť cukru a podieľa sa fenoméne ťažko variteľných cukrovín. Pokračuje sa vo výskume v oblasti implementácie enzymatickej metódy v trstinových cukrovaroch ako aj možného škodlivého vplyvu manitolu na priemyselné spracovanie.

Podakovanie: Rada by som sa poďakovala kolegom, ktorí sa zapojili do tejto práce: Uvedenie obchodných názvov alebo komerčných produktov v tomto článku slúži výhradne na poskytnutie špecifickej informácie a neznamená odporúčanie alebo súhlas Ministerstva pôdobospeľárstva USA.

Súhrn

Manitol, produkovaný najmä baktériou *Leuconostoc mesenteroides*, je citlivým ukazovateľom zhoršovania kvality cukrovej trstiny a cukrovej repy, čo môže predikovať množstvo technologických problémov. Dodávky alterovanej cukrovej trstiny alebo cukrovej repy do cukrovarov môžu škodlivo ovplyvniť technologické operácie a dokonca viesť k odstávke cukrovaru. Teraz je dostupná rýchla, jednoduchá a nie drahá enzymatická prevádzková metóda na meranie obsahu manitolu. Toto umožní pracovníkom cukrovaru vedieť, ktorá dávka cukrovej trstiny alebo repy ovplyvní proces negatívne alebo umožní odmietnuť dodávku, ktorá by spôsobila neakceptovateľné technologické problémy. Manitol sa meria priamo na spektrofotometri, za použitia manitol dehydrogenázy ako enzýmu. Je popísaná stabilita činidiel, krátka príprava šťavy a linearita. Metóda je presná v porovnaní s iónovou chromatografiou, aj keď presnosť klesá pre cukrovú trstinu aj repu s nízkou koncentráciou manitolu. Existuje veľmi dobrá polynomická korelácia ($R^2 = 0,91$) medzi obsahom manitolu a dextransu (α -(1→6)- α -D-glukán) v šťavách získaných počas trojmesačnej kampane v trstinovom cukrovaru. Koncentrácie manitolu sú zvyčajne vyššie ako monoklonálna protilátka dextransu a iné špecifické miery dextransu, čo indikuje (I) vhodnosť a citlivosť manitolu na predpovedanie kazenía sa cukrovej trstiny *Leuconostoc* a inými baktériami a (II) podceňovanie relatívne vysokého obsahu manitolu v alterovanej cukrovej trstine pracovníkmi cukrovarníckeho priemyslu. Viac ako 250–500 ppm na sušinu manitolu v trstinovej šťave napovedá problémy v celom procese, ale táto hraničná hodnota sa môže meniť od regiónu k regiónu. Tiež je diskutované zvyšujúce sa povedomie o tom, ako manitol škodlivo vplyva na spracovanie, ako napr. fenomén ťažko variteľnej cukroviny.

Klíčové slová: cukrová repa, cukrová trstina, manitol, dextrans, enzym, *Leuconostoc mesenteroides*, spektrofotometer, dehydrogenáza.

preložila Alžbeta Korčeková

Literatúra

1. BLISS L. Q.: *Los sistemas de cosecha y su influencia en la cristalización de los azúcares*. Miscellaneous publication, No. 53 EEAT, 1975, Hoy EEAOC, Tucuman, Argentina.
2. CLARKE M. A., BERGERON J., COLE F.: A rapid dextran screening test. *Sugar y Azucar*, 82, 1987 (3), s. 23–24.
3. EGGLESTON G.: Deterioration of cane juice – sources and indicators. *Food Chemistry*, 78, 2002, s. 99–107.
4. EGGLESTON G., LEGENDRE B. L.: Mannitol and oligosaccharides: Potential new criteria for determining cold tolerance in sugarcane varieties. *Food Chemistry*, 80, 2003, s. 451–461.
5. EGGLESTON G., LEGENDRE B. L., TEW T.: Indicators of freeze damaged sugarcane varieties which can predict processing problems. *Food Chemistry*, 87, 2004 (1), s. 119–133.
6. EGGLESTON G., HARPER W.: Determination of sugarcane deterioration at the factory: Development of a rapid, easy and inexpensive enzymatic method to determine mannitol. *Food Chemistry*, 98, 2006 (2), s. 366–370.
7. EGGLESTON G. ET AL.: Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. *Zuckerind.*, 132, 2007 (1), s. 33–39.
8. EGGLESTON G. ET AL.: Viability of an enzymatic mannitol method to predict sugarcane deterioration at the factory. *Food Chemistry*, 111, 2008, s. 476–482.
9. EGGLESTON G., CÔTÉ G.: Elucidation of the hard-to-boil massecuites phenomenon and the introduction of oscillatory deformation rheology to the sugar industry. In *Proc. 2006 Sugar Processing Res. Conf.*, 2009, Delray Beach, FL, USA, 2009.
10. HUET J. M.: General Subject 8. Beet Sugar Processing. In *ICUMSA Proc. 2008, 26th Session Delray Beach, USA*, Bartens, Germany, 2009.
11. LE BOT Y.: Stable sugarless coating. Stable sugarless coating. In *Food Technology International Europe*. Sterling Public. Internat., London, 1993, s. 67–70.
12. RAUH J. S., CUDDIHY J. A., FALGOUT R. N.: Analyzing dextran in the sugar industry: A review of dextran in the factory and a new analytical technique. In *Proc. XXVII Conference West Indies Sugar Technologists*. Trinidad, 2001, s. 1–11.
13. SARKAR D., DAY D. F.: Dextran analysis: a modified method. *J. ASSCT*, 6, 1986, s. 102–107.
14. STEINMETZ K., BUCZYS R., BUCHOLZ K.: The quality of frost-damaged sugar beet. *Zuckerind.*, 123, 1998 (12), s. 933–942.
15. THIELECKE K.: Oligosaccharides and polysaccharides. Referees Report Subject 2. *ICUMSA Reports*, 2002, s.107–122.

Eggleston G.: Analysis of mannitol, as tracer of bacterial infections in cane and beet sugar factories

Mannitol, formed mainly by *Leuconostoc mesenteroides* bacteria, is a sensitive marker of sugarcane and sugar beet deterioration that can predict multiple processing problems. The delivery of consignments of deteriorated sugarcane or sugar beets to factories can detrimentally affect multiple process units, and even lead to a factory shut-down. An enzymatic factory method that is rapid, simple, and inexpensive is now available to measure mannitol in consignment juices at both sugarcane and sugar beet factories. This will allow factory staff to know which consignments of sugarcane or sugar beet will affect processing negatively or reject consignments that will cause unacceptable processing problems. Mannitol is directly measured on a spectrophotometer using mannitol dehydrogenase as the enzyme. The stability of the reagents, limited juice preparation, and linearity are described. The method is accurate compared to ion chromatography and precise, although precision decreases for both sugarcane and sugarbeet juices with low mannitol concentrations. A strong polynomial relationship ($R^2 = 0.912$) existed between mannitol and haze dextran (α -(1→6)- α -D-glucan) in juices obtained across a 3-month processing season at a sugarcane factory. Mannitol concentrations are usually higher than concentrations of monoclonal antibody dextran and other specific measures of dextran, which indicates (I) the usefulness and sensitivity of mannitol to predict sugarcane deterioration from *Leuconostoc* and other bacteria, and (II) the underestimation by sugar industry personnel of the relatively large amounts of mannitol present in deteriorated sugarcane. Greater than ~250–500 ppm/Brix of mannitol in sugarcane juice predicts downstream processing problems, but this threshold value may vary from region to region. The increasing awareness of how mannitol detrimentally effects processing, e.g., its contribution to the Louisiana hard-to-boil massecuite phenomenon, is also fully discussed.

Key words: sugar beet, sugar cane, manitol, dextran, enzyme, *Leuconostoc mesenteroides*, spectrophotometer, dehydrogenase.

Kontaktná adresa – Contact address:

Gillian Eggleston(ová), USDA-ARS-Southern Regional Research Center, 1100 Robert E. Lee Boulevard, New Orleans, LA 70124, USA, e-mail: gillian.eggleston@ars.usda.gov

PRÍLOHA

Prevádzková enzymatická metóda na stanovenie manitolu

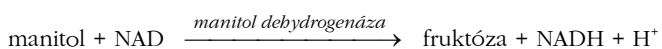
Gillian Eggleston, William Harper – USDA-ARS-Southern Regional Research Center, New Orleans, USA

Predmet

Táto enzymatická metóda meria množstvo manitolu v trstinových šťavách. Metóda je určená na ohodnotenie miery zhoršenia kvality trstiny v cukrovare (6). Pre adaptáciu pre cukrovú repu pozri Hueta (10).

Princíp

Manitol dehydrogenáza (MDH) premieňa manitol na fruktózu v prítomnosti koenzýmu nikotínamid adenín dinukleotidu (NAD):



Redukovaná forma koenzýmu, NADH, sa dá ľahko zmerať spektrofotometricky, keďže absorbuje svetlo v ultrafialovej oblasti o vlnovej dĺžke 340 nm.

Podmienky reakcie

- teplota izbová teplota (~25 °C)
- vlnová dĺžka 340 nm
- pH 10,5
- reakčný čas 7 min

Potrebné vybavenie

Skúmavky, odmerné banky, pipety, spektrofotometer, jednorázové kyvety (hrúbka 1 cm), stopky

Potrebné chemikálie a enzýmy

Pokiaľ nie je uvedené inak, používajú sa chemikálie stupňa analytickej čistoty. Manitol dehydrogenáza (EC 1.1.1.67) sa nakupuje ako lyofilizovaný prášok (8,45 U.mg⁻¹ sušiny) od Biocatalyst Ltd, Wales (len doporučené).

Príprava činidiel

Hydroxid sodný (1M NaOH)

Odvážte 40,01 g NaOH do 1000ml odmernej banky, potom doplňte na objem 1000 ml deionizovanou alebo destilovanou vodou. Roztok sa môže uchovávať pri izbovej teplote po dobu 3 mesiacov.

Glycínový tlmivý roztok (100mM; pH 10,5)

Odvážte 7,51 g glycínu do vážiacej lodičky a spláchnite do 1000ml odmernej banky pomocou 800ml deionizovanej vody a rozpustite. Upravte pH na hodnotu 10,5 pomocou NaOH (1M), potom doplňte na objem 1000 ml deionizovanou alebo destilovanou vodou. Roztok sa môže uchovávať pri izbovej teplote alebo v chladničke po dobu 2 mesiacov.

Fosforečnanový tlmivý roztok (25mM; pH 6,0) + 30% glycerol

Odvážte 0,34 g dihydrogénfosforečnanu draselného a 30 g glycerolu do 100ml odmernej banky, potom rozpustite v 50 ml deionizovanej vody. Upravte pH na hodnotu 6,0 pomocou NaOH (1M). Odvážte 0,0154 g dithiotreitolu do vážiacej lodičky a pridajte do odmernej banky, potom doplňte objem deionizovanou vodou na 100 ml. Uchovávajte v chladničke pri teplote 4 °C po dobu 2 mesiacov.

Roztok NAD (0,22 g · 10 ml⁻¹)

Odvážte 0,22 g NAD a rozpustite v 10 ml deionizovanej vody. Roztok NAD sa musí pripravovať denne.

Štandardný zásobný roztok manitolu (500ppm)

Odvážte 0,5 g manitolu do 1000ml odmernej banky, potom doplňte na objem 1000 ml deionizovanou vodou.

Príprava enzýmu manitol dehydrogenázy

1. Najprv sa pripraví zásobný roztok enzýmu rozpustením presne 0,01 g lyofilizovaného MDH v ľadovo studenom fosforečnanovom tlmivom roztoku (s obsahom 30 % glycerolu). Roztok sa musí skladovať pri teplote -20 °C v mrazničke, po dobu najviac 1 mesiaca.
2. Na skúšanie sa pripraví ďalšie riedenie, odpipetovaním 100 µl zásobného roztoku do 10ml odmernej banky a doplnením na konečný objem pomocou roztoku: fosforečnanový tlmivý roztok + 30% glycerol (riedenie 10 000×). Tento zriedený roztok enzýmu sa musí uchovávať v mrazničke pri -20 °C po dobu najviac 2 týždňov.
3. Lyofilizovaný enzým je stabilný po dobu 6 mesiacov v mrazničke pri teplote -20 °C.

POZNÁMKA: Keď používate zriedený roztok enzýmu, držte ho po celú dobu na ľade alebo v chladničke (4 °C).

Postup

A. Príprava štandardov a štandardnej krivky (kalibračný graf)

- a) Do štyroch 10ml odmerných baniek pripravte štandardné roztoky podľa rozpisu:

Štandard	500ppm štandardný zásobný roztok manitolu (ml)	Deionizovaná voda (ml)	Koncentrácia manitolu (ppm)
1	10	-	500
2	5	5	250
3	2	8	100
4	0,2	9,8	10

- b) Stanovte korekciu komory pri 340 nm dvoch kyviet, ktoré sa použijú na meranie.

- c) Do dvoch skúmaviek (jedna označená ako slepý pokus, jedna ako vzorka) pridajte 1,4 ml glycinového tlmivého roztoku, 0,2 ml štandardu manitolu a 0,2 ml roztoku NAD:

Činidlo	Slepý pokus	Vzorka
Glycinový tlmivý roztok	1,4 ml	1,4 ml
Štandard	0,2 ml	0,2 ml
NAD	0,2 ml	0,2 ml
Voda	0,2 ml	–
MDH zriedený enzým	–	0,2 ml

Do skúmavky so slepým pokusom pridajte 0,2 ml deionizovanej vody, dôkladne premiešajte a ihneď prelejte obsah skúmavky do 1cm kyvety a vložte do spektrofotometra. Do skúmavky so vzorkou pridajte namiesto vody 0,2 ml z 10 000× zriedeného MDH, dôkladne premiešajte a ihneď zapnite stopky. Rýchlo prelejte obsah skúmavky do kyvety pre vzorku a vložte do spektrofotometra. Absorbancia v každej kyvete sa meria pri 340 nm po 0 a po 5 min. Použite korekciu komory pre absorbanciu vzorky a slepého pokusu po 0 a 5 min. Korigovaná absorbancia vzorky je absorbancia vzorky – absorbancia slepého pokusu. Vypočítajte konečnú absorbanciu ako: $absorbancia\ vzorky_{korigovaná\ po\ 5\ min} - absorbancia\ vzorky_{korigovaná\ po\ 0\ min}$ (delta absorbancie).

- d) Zopakujte postup (c) ešte dvakrát, aby ste získali tri opakovania pre každý štandard.
- e) Vyneste do grafu delta absorbancie (os x) pre každý štandard $\times 10$ (riediaci faktor v skúmavkách) oproti koncentrácii manitolu (os y) a vytvorte lineárnu alebo kvadratickú závislosť, aby ste získali rovnicu krivky (kvadratické závislosti sú zvyčajne mierne presnejšie ako lineárne).

Dôležitá poznámka: Pre každú novú fľašu enzýmu manitol dehydrogenázy sa musí urobiť nová kalibračná krivka. Takisto sa nová kalibračná krivka musí urobiť každý mesiac.

B. Stanovenie manitolu v trstinových šťavách

- a) Najprv zriedte šťavu 1:1 (t.j. 2-násobné riedenie) v glycinovom tlmivom roztoku (na filtráciu potrebujete minimálne 10 ml zriedenej šťavy) a potom prefiltrujte cez 0,45 μ m polyvinylidénfluoridový (= PVDF) filter, potom cez 0,22 μ m PVDF filter. Pre ťažko filtrovateľné vzorky je možné pred filtráciou cez PVDF filtre pridať kremelinu alebo vzorku najprv prefiltrovať cez filtračný papier Whatman™ 91 (185 mm; 10 m).
Poznámka: Ak 0,45 μ m a 0,22 μ m PVDF filtre nie sú dostupné, potom je možné vzorku šťavy pripraviť nasledovne:
- b) Umiestnite sklenený filter (priemer 25 mm) do striekačkového držiaka filtrov a pripojte na koniec 20ml alebo 25ml plastovej striekačky. Napipetujte 10 ml trstinovej šťavy dovnútra striekačky. Odvážte 0,5 g kremelinového filtračného prípravku a pridajte do striekačky obsahujúcej šťavu. Uzavrte striekačku piestom a prevráťte aspoň 5×, aby sa obsah striekačky dobre premiešal. Prefiltrujte zmes cez sklenený filter do malej kadičky, pričom prvé 2 ml vylejte. Zoberte 5 ml filtrátu a zriedte s 5 ml glycinového tlmivého roztoku, aby ste získali zriedenie 1 : 1 (t.j. 2-násobné riedenie).
- c) Stanovte korekciu komory pri 340 nm dvoch kyviet, ktoré sa použijú na meranie.
- d) Do dvoch skúmaviek (jedna označená ako slepý pokus, jedna ako vzorka) pridajte 1,4 ml glycinového tlmivého roztoku,

0,2 ml zriedenej a prefiltrovanej šťavy a 0,2 ml roztoku NAD (pozri tabuľku nižšie). Do skúmavky so slepým pokusom pridajte 0,2 ml deionizovanej vody, dôkladne premiešajte a ihneď prelejte obsah skúmavky do 1cm kyvety a vložte do spektrofotometra. Do skúmavky so vzorkou pridajte namiesto vody 0,2 ml z 10 000× zriedeného MDH, dôkladne premiešajte a ihneď zapnite stopky. Rýchlo prelejte obsah skúmavky do kyvety pre vzorku a vložte do spektrofotometra. Odcítajte absorbanciu v každej kyvete pri 340 nm po 0 a 5 min. Použite korekciu komory pre absorbanciu vzorky a slepého pokusu po 0 a 5 min. Korigovaná absorbancia vzorky je absorbancia vzorky – absorbancia slepého pokusu. Vypočítajte konečnú absorbanciu ako: $absorbancia\ vzorky_{korigovaná\ po\ 5\ min} - absorbancia\ vzorky_{korigovaná\ po\ 0\ min}$ (delta absorbancie).

Činidlo	Slepý pokus	Vzorka
Glycinový tlmivý roztok	1,4 ml	1,4 ml
Zriedená a filtrovaná šťava	0,2 ml	0,2 ml
NAD	0,2 ml	0,2 ml
Voda	0,2 ml	–
MDH zriedený enzým	–	0,2 ml

- e) Ak je absorbancia manitolu v šťave vyššia ako limit kalibračnej krivky, zopakujte stanovenie so 4násobným riedením (1 diel šťavy a 3 diely glycinového tlmivého roztoku) alebo s 8násobným riedením (1 diel šťavy a 7 dielov glycinového tlmivého roztoku).

Výpočet

Koncentráciu manitolu v šťave je možné získať priamo z kalibračnej krivky, a to:

- odčítaním oproti zodpovedajúcej absorbancii roztoku,
- použitím rovnice kalibračnej krivky (toto je presnejšie).

Príklad použitia lineárnej krivky

Delta absorbancie šťavy = 0,040 a sušina šťavy = 14,00 %.

Rovnica lineárnej kalibračnej krivky je: $y = 1932,8x - 27,983$.

Potom: $(1\ 932,8 \times 0,040) - 27,983 = 49,3\ \text{ppm}$.

Vynásobte výsledok získaný z krivky zriedovacím faktorom. Pre horeuvedený príklad:

$49,3 \times 2$ (predriedenie šťavy) $\times 10$ (riedenie v skúmavke) = $98,6\ \text{ppm}$.

Potom uvádzajte prepočítané na sušinu.

Príklad použitia kvadratickej krivky

Všeobecná rovnica kvadratickej krivky je: $y = ax^2 + bx + c$.

Na použitie pre absorbanciu šťavy je možné pripraviť jednoduchú rovnicu v programe Excel alebo podobnom softvéri. Napríklad, ak delta absorbancie šťavy = 0,040 a sušina šťavy = 14,00 % a rovnica kalibračnej krivky je: $y = 3535,8x^2 + 974,85x + 4,6172$, potom: $(3\ 535,8 \times 0,040^2) + (974,85 \times 0,040) + 4,6172 = 49,27\ \text{ppm}$.

Vynásobte získaný výsledok zriedovacím faktorom. Pre horeuvedený príklad:

$49,27 \times 2$ (predriedenie šťavy) $\times 10$ (zriedenie v skúmavke) = $98,54\ \text{ppm}$.

Potom uvádzajte prepočítané na sušinu.

$98,54 / (14,0 \times 0,01) = 703,14\ \text{ppm/sušinu}$.