

Zjišťování mikroflory v melase

BOŽENA BUREŠOVÁ a PAVEL ŘACH,
Výzkumný ústav kvasného průmyslu v Praze

664.151.2:576.8

Melasa je hlavní surovinou k výrobě droždí a lihu, a proto je důležité znát její chemické složení i biologickou čistotu. Studium vhodných metodik mikrobiologického rozboru zabývali se mnozí autoři i v novější době [1 až 5].

Řepná melasa obsahuje větší množství mikroorganismů, které je závislé na jakosti řepy cukrové a způsobu jejího skladování, na technologickém postupu při jejím zpracování v cukrovaru a konečně i na způsobu a době uložení melasy; na příklad každé zředění melasy vodou působí příznivě na rozmnožení a životnost dosud latentních mikrobů. Kvašení škodí ty druhy mikroorganismů, které využívají stejných živných látek ke svému růstu jako kvasinky a tím ochuzují substrát, po př. tvoří sloučeniny, jež působí nepříznivě na rozmnožování kvasinek a na aktivitu jejich enzymového systému.

Při mikrobiologickém rozboru melas jsme zjišťovali počet mikroorganismů v melasách pro droždárny a lihovary, kdežto hlavní fyziologické skupiny mikrobů infikující melasu pouze u melas určených pro výrobu droždí.

Počet mikroorganismů v melase

Podle našich dosavadních zkušeností není správné, posuzuje-li se vhodnost melasy pro výrobu droždí jen podle celkového množství mikroorganismů, nýbrž je nutno posuzovat ji i podle počtu převládajících druhů mikrobů, jež mají přímý nebo nepřímý vliv na růst a činnost kvasinek.

Živé pudy, na nichž vyrostou největší počet kolonií mikrobů, jsou podle novějších údajů [1 až 5] kvasničný agar se 4 % sacharosy nebo masopeptonový agar s event. přídavkem 0,5 % sacharosy. Plevako a Givartovskij [1] zjišťovali celkový počet

mikroorganismů v melase tak, že počítali kolonie vyrostlé z 1 ml melasy zředěné 1:100 a 1:1000 na kvasničním agaru ze 4 % sacharosy za 48 hod při 30 °C. Autoři rozlišují melasy 1. jakosti do 90 000, 2. jakosti do 900 000 a 3. jakosti přes 900 000 mikroorganismů v 1 g melasy.

Melasa 1. jakosti se dobře v droždárně zpracovává, melasa 2. jakosti potřebuje zvláštní úpravy a melasa 3. jakosti nedává normální výtěžky droždí.

Kolker [2] nacházel v melasách z SSSR (Ukrajina a Moldavsko) 30 000 až 1 500 000 mikrobů v 1 g melasy na masopeptonovém agaru s 0,5 % sacharosy při kultivaci 48 hod za teploty 30 °C.

Karczewska [3] zachycovala mikroby na stejné půdě jako Plevako-Givartovskij a rozlišuje podle počtu mikroorganismů v 1 g melasy 1. jakost do 100 000, 2. jakost do 1 000 000 a 3. jakost do 5 000 000. První druh označuje jako normální, druhý potřebuje úpravu a třetí je nevhodný k výrobě droždí.

Jonáš [4] zjišťoval celkový počet zárodků v 1 g melasy na sladidinové želatině při teplotě 20 až 22 °C. Množství zárodků v 1 g melasy se pohybovalo od 3000 do 15 000.

Metodika pro stanovení celkového množství mikroorganismů v melase

Odběr vzorků melasy a její zředění

Vzorky byly odebrány na závodech z melas podle směrnice JAM — Cukrovarské suroviny, výrobky a pomocné látky — MPP — Praha, 1953. Před navážením k rozboru v laboratoři se vzorky dobře promíchaly a melasa byla zředěna takto: 20 g melasy se smísí se 180 ml sterilní vody teplé 30 až 35 °C, promíchá a pipetuje 1 ml sterilní pipe-

tu do 9 ml sterilované vody ve zkumavce (zředění 1 : 100), obdobným způsobem se připraví zředění 1 : 1000 v další zkumavce.

Příprava živných půd

Kvasničný agar se sacharosou se připraví z 1 l kvasničné vody, 40 g sacharosy a 30 g agaru.

Kvasničná voda připravená z 200 g kvasnic, rozptýlených v 1 l vodovodní vody, se zahřívá 1 hod při 1 atp, nechá volně sedimentovat, dekantuje a zbaví ssedliny odstředěním na sedimentační centrifuze. Získaná čirá kvasničná voda se steriluje dvakrát po 30 min při 1 atp, pH půdy 6,7 až 6,9.

Masopeptonový agar běžného složení — MPA. Steriluje se při 1 atp dvakrát po 30 min, pH půdy 6,9 až 7,0.

Provedení zkoušky

Do sterilních Petriho misek se pipetuje 1 ml melasy zředěné 1 : 100 a 1 : 1000, přelije 15 až 20 ml půdy rozehřáté a zchlazené na 50 °C a dobře promíchá; po utužení se kultivuje 48 hod při 30 °C. Potom se počítají vyrostlé kolonie, počet se přepočítává na 1 g melasy.

Výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů v 1 g melasy

Zjišťovalo se osmnáct vzorků čs. melas kampaně 1955/56, jež pocházely z droždíren Krásné Březno a Michalovce (dávaly špatné výtěžky), Olomouc-Hejčín, Olomouc-Pavlovice, Plzeň, Teplice, Kolín (normální výtěžky) a Trenčín (výtěžky lepší než normální) a z lihovarů: Kralupy, Kolín, Libeň, Pardubice, Hodolany, Svinov, Smiřice, Mladá Boleslav, Kojetín a Chrudim. Výsledky jsou v tab. 1.

Celkový počet mikroorganismů v 1 g melasy

Vzorek melasy	MPA	Kvas. agar se 4 % sacharosy
Krásné Březno	54 000	38 000
Teplice	12 700	16 000
Trenčín	13 000	16 500
Kolín	9 200	7 500
Olomouc-Hejčín	12 300	8 900
Olomouc-Pavlovice	13 200	12 400
Michalovce	14 300	12 200
Plzeň	11 500	12 300
Kralupy	11 200	11 200
Kolín	10 200	5 800
Libeň	10 600	8 000
Pardubice	14 600	8 600
Hodolany	12 800	12 100
Svinov	6 900	7 500
Smiřice	6 100	2 500
Mladá Boleslav	7 800	4 200
Kojetín	9 900	7 300
Chrudim	14 000	12 000

Tabulka 1

Podle hodnocení jakosti melas podle Plevakové patřily by všechny uvedené vzorky melas do první skupiny jakosti.

Složení mikroflory v melase

Mikroflora v melase je nejružnějšího druhu, při čemž převládají kyselinotvorné bakterie.

a) Bakterie kyselinotvorné

jsou zastoupeny hlavně bakteriemi mléčného kvašení heterofermentativního typu, jež tvoří z cukrů vedle kyseliny mléčné i kyselinu octovou.

Ke stanovení počtu těchto kyselinotvorných bakterií se dosud doporučoval na př. sladivový agar s přísadkou 0,3 % křídly, při čemž kolonie těch bakterií, jež tvořily kyselinu, měly kolem sebe vyjasněnou zónu vzniklou rozpuštěním suspendovaného uhličitanu vápenatého. Tato zóna byla často neztetelná, zejména u bakterií, jež rostly pomalu; také záleželo na homogenním rozptýlení křídly, jež měla být co nejjemnější. Vhodnější jsou žitné půdy s barevnými indikátory, na př. MPA nebo kvasničný agar s 0,5 až 1 % sacharosy po př. glukosy s pří-

Počet kyselinotvorných bakterií v 1 g melasy

Vzorek melasy	Slad. agar s CaCO ₃	Agar s bromkresolovým purpurem
Krásné Březno	1 600	21 500
Teplice	1 100	2 700
Trenčín	800	—
Kolín	—	1 700
Olomouc-Hejčín	1 200	—
Olomouc-Pavlovice	900	—
Michalovce	7 800	1 300
Plzeň	1 100	900

Tabulka 2

pravkem brom-kresolového purpuru, jenž je vhodný pro oblast pH 5,2 až 6,8. Obvykle se užívá 1,6 % alkohol-vodného roztoku podle Salle-a [6]. Barva půdy při pH 7 je modrofialová, při změně pH na 5,4 žlutá; tuto barvu mají i kolonie kyselinotvorných bakterií na Petriho misce, především jejich nejbližší okolí. Kultivují se 48 hod při 30 °C. V tab. 2 jsou výsledky stanovení počtu kyselinotvorných bakterií ve zkoušených melasách z kampaně 1955 až 1956.

b) Bakterie redukující nitráty

Bakterie redukující nitráty na nitrity se mohou stát za mimořádných podmínek nebezpečné pro rozmnožování kvasinek. Plevako a Givartovskij [1] udávají, že dusitany již v množství 0,0005 % působí nepříznivě na normální růst kvasinek, při množství 0,004 % dusitanů v melasové zápare klesne počet kvasinek na 55 až 60 % množství získaného v témže prostředí bez dusitanů; koncentrace 0,02 % nitritů již téměř potlačuje schopnost kvasinek k rozmnožování. Plevako a Bakušinskaja [5] nověji zjišťují, že počátek inhibice růstu kvasinek je při koncentraci 0,001 % dusitanů. Z bakterií denitrifikačních se mohou škodlivě projevit především sporo-otvorné druhy, jež přežívají teploty, při nichž se melasová zápara ve varné čerí a jež během nenormálně dlouhé prodlevy při sedimentaci zápara nebo v přítokové kádi se mohou při teplotě 30 až 40 °C

rozmnožovat a z přítomných dusičnanů tvořit dusitany.

Metodika pro stanovení denitrifikačních bakterií

1. Důkaz dusitanů v melase

Nejdříve se provede kvalitativní důkaz dusitanů ve zkoušeném vzorku melasy. Melasa se zředí 1 : 10 (20 g melasy na 180 ml sterilní vody) a 0,5 ml roztoku se odpipetuje do zkumavky, zahřívá se 3 min. na vodní lázni při 70 až 80 °C a přidá se 0,5 ml Griessova činidla [7], jež se připraví takto: 1 g metafenylendiaminu se rozpustí ve 200 ml destilované vody, přidá se 3 ml kyseliny sírové koncentrované, roztok se odbarví aktivním uhlím, filtruje a uchovává se ve tmě a chladu.

Po přidavku Griessova činidla se znovu zahřívá 2 až 3 min. na lázni a potom se určí intensita zabarvení. V přítomnosti nitritů vznikne červené až karmínově červené zabarvení. Vyloučení barvy melasy se kontroluje na stejném objemu zředěné melasy a místo Griessova činidla se přidá 0,5 ml sterilní vody.*)

2. Důkaz denitrifikačních bakterií v melase

Plevako a Bakušinskaja [5] provádějí důkaz takto: melasa zředěná 1 : 100, po př. 1 : 1000 se zahřívá ve zkumavce 10 min při 35 °C na vodní lázni, načež se vloží na 50 vt do vroucí vodní lázně, takže lze předpokládat, že většina vegetačních buněk bakterií je potlačena, kdežto spory přežívají. Po rozsevu zředěné melasy na kvasničný agar se 4 % sacharosy se odpichují kolonie do spec. půdy pro důkaz denitrifikačních bakterií, složené z 1000 ml kvasničné vody, 40 g sacharosy a 1 g dusičnanu draselného. Kultivuje se 24 hod při 30 až 32 °C, načež se zkouší známým způsobem na přítomnost dusitanů Griessovým činidlem. Při této metodě se ovšem nezachytí nesporetné bakterie, jež také mohou redukovat nitráty na nitrity, na př. *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Agrobacterium tumefaciens*, také sporetné anaerobní, na př. *Clostridium perfringens*, se při uvedené kultivaci neprokáží.

Podle údajů z rumunské dokumentace [7] se provádí důkaz denitrifikačních bakterií přesněji takto: melasa, v níž se současně provede důkaz dusitanů, se zředí ve zkumavce 1 : 10 sterilní vodou, kultivuje 48 hod při 30 °C a znovu se zkouší na dusitany. Intensita na zabarvení při nepatrných koncentracích dusitanů může být při této metodě kryta barvou melasy, dále pomnožení denitrifikačních bakterií (sporetných i nesporetných) se provádí v prostředí pouze aerobním a bez přidavku KNO_3 , takže může chybět materiál pro tvorbu dusitanů.

Po přezkoušení těchto metod navrhuje tento způsob důkazu denitrifikačních bakterií v melase: melasa se zředí 1 : 10. 1 ml se pipetuje do 9 ml spec. půdy pro denitrifikační bakterie podle Plevako a Bakušinské [5], kultivuje se 24 až 48 hod při 30 °C aerobně i anaerobně (v evakuovaném exikátoru s alkalickým roztokem pyrogallolu), načež se zkouší 0,5 ml tekutiny na přítomnost dusitanů Griessovým činidlem jako ad 1.

*) Poznámka: Citlivost diazotační reakce je vysoká: 1 až 0,1 mikrogramu.

Pro případnou další identifikaci jednotlivých druhů bakterií pipetuje se 1 ml tekutiny z pozitivní pomnožovací zkoušky do zkumavky s 9 ml sterilizované vody, obsah se zahřeje 10 min při 35 °C a vloží na 50 vt do vroucí vodní lázně a provede se izolace výsevem nebo čárkovací metodou na spec. půdách s dusičnanem. Je to na př. půda Plevako a Bakušinské s 3 % agaru nebo agar podle Hofmanna [8]. Kultivuje se 48 hod při 30 °C aerobně i anaerobně a jednotlivé kolonie se odpichují, přečistí a identifikují.

Výsledky kvalitativního stanovení bakterií redukujících dusičnany na dusitany v melase

Zkoušelo se osm drožďařských melas kampaně 1955/56; výsledky jsou v tab. 3.

Kvalitativní důkaz denitrifikačních bakterií v melasách kampaně 1955/56

Vzorek melasy	Barevná reakce s Griessovým činidlem	
	původní vzorek	pomnožná zkouška
Krásné Březno	—	**
Teplice S	* —	**
Trenčín	—	—
Plzeň	—	—
Kolín	—	—
Olomouc-Hejčín	—	* —
Olomouc-Pavlovice	—	* —
Michalovce	* —	*

Vysvětlivky:

** silně pozitivní reakce, intenzivní karmínově červená barva,
* pozitivní reakce, červeně rumělková barva,

* — slabě pozitivní reakce, oranžová barva,
— negativní reakce, žlutá barva.

Tabulka 3

Z tab. 3 je zřejmé, že pouze dva vzorky melas daly silně pozitivní reakci při pomnožovací zkoušce melasy. Při úpravě melasové záparty je možné odstranit dusitany oxydaci chlorovým vápnem za studena.

Poznámka: Výsledky stanovení biologické čistoty melas z kampaně 1956/57 budou uveřejněny v dalším sdělení, při čemž bude navrženo i hodnocení jakosti melas. Dále bude popsána metodika pro zachycení kvasinkovitých mikroorganismů, zejména asporogenních.

Souhrn

1. Při stanovení počtu mikroorganismů v osmnácti vzorcích melas kampaně 1955/56 bylo na maso-peptonovém agaru zjištěno 6100 až 54 000 mikroorganismů v 1 g melasy a na kvasničném agaru se 4 % sacharosy 2500 až 38 000 mikrohub v 1 g melasy.

2. Při mikrobiologickém rozboru osmi vzorků drožďařských melas kampaně 1955/56 byla použita elektivní půda pro zachycení kyselinotvorných bakterií.

3. Důkaz denitrifikačních bakterií ve zkoušených melasách byl proveden pomnožovací zkouškou a barevnou reakcí s Griessovým činidlem. Pouze dvě melasy daly při pomnožovací zkoušce silně pozitivní reakci na dusitany.

Literatura

- [1] PLEVAKO-GIVARTOVSKIJ: *Technologia drožževogo proizvodstva*, Pisčepromizdat, Moskva (1949) 59.
- [2] KOLKER: *Mikrobiologičeskoje issledovanie melass*, *Mikrobiologija* VII (1938) 229
- [3] KARCZEWSKA: *Melas, jeho mikroflora i sposoby oczyszczanie* *Przem. spożywczy*, 4 (1950) 18
- [4] JONÁŠ: *Technologie drožďařství*, II. díl, *Védecko-technické nakladatelství*, Praha (1951) 92.
- [5] PLEVAKO, BAKUŠINSKÁ: *Mikrobiologičeskij i chimikotechnologičeskij kontrol drožževogo proizvodstva*, Moskva (1952) 32
- [6] SALLE: *Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology*, New York (1954) 168.
- [7] Rumunská dokumentace v rámci VTS: *Grundbegriffe bei der Erzeugung von Presshefe aus Melasse*, Bukurešť, 1954.
- [8] HAMPL: *Mikrobiologická příručka*, Ministerstvo zemědělství, Praha (1946) 68
- [9] KUTSCHER: *Die Infektionen der Zuckerlösungen und Fruchtsyrup*, *Branntweinwirtschaft* 77 (1955) 479
- [10] OLBRICH: *Die Bedeutung und Verwertung der Melasse unter besonderer Berücksichtigung ihrer Vergärung und Verhefung*, *Branntweinwirtschaft* 78 (1956) 43.
- [11] LILLIENSKIOLD, BECKER: *Über die Tätigkeit von Mikroorganismen bei der Rohsaftgewinnung*, *Zucker* 18 (1956) 411.