

# Vplyv oxidu siričitého na biologickú čistotu prevádzkovej kultúry kvasiniek

663.13:546.224

Ing. EMÍLIA BREIEROVÁ a RNDr. ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, DrSc.

Centrum chemického výskumu SAV, Chemický ústav, Bratislava

Zachovanie biologickej čistoty počas fermentácie v prevádzkach na výrobu kŕmneho droždia je závažným problémom. Vplyvom vyskytujúcich sa kontaminácií sa nielen predčasne ukončuje kontinuálna fermentácia pre vložkovanie spôsobené morfogenetickými vlastnosťami kontaminantov, ale dochádza tu aj k prerastaniu niekedy zdravotne nevyhovujúcich kmeňov *Candida tropicalis*. Krmovinárski odborníci uvažovali o použití niektorých látok, ktoré by pomohli riešiť tento problém. Jednou z navrhovaných látok je oxid siričitý,  $\text{SO}_2$ .

Vplyv oxidu siričitého na rast kvasiniek sa už mnoho rokov využíva vo vinárskom priemysle na zabezpečenie plynulého priebehu kvasného procesu, založeného na rozdielnej rezistencii divých a produkčných kvasiniek voči účinkom  $\text{SO}_2$ .

Odolnosť kvasiniek voči  $\text{SO}_2$  možno doceliť v podstate pri každom kmeni dočasnou adaptáciou na prostredie obsahujúce určité množstvo  $\text{SO}_2$ , spravidla 200 až 250 mg na liter celkového  $\text{SO}_2$ , pokiaľ ostatné fyziologické vlastnosti, požadované pri kvasení, vyhovujú. Pasážovaním v prostredí bez  $\text{SO}_2$  kvasinky strácajú svoj nadobudnutý sulfitový charakter.

Oxid siričitý v kultivačných pôdach sa nachádza vo forme kyseliny siričitej, ktorá môže byť prítomná v médiu ako viazaná kyselina siričitá, disociovaná a nedisociovaná kyselina siričitá. Najväčšia časť kyseliny siričitej je vo forme viazanej, ako kyselina aldehydsiričitá. Voľná kyselina siričitá je v kvasnom médiu prítomná v prevažnej časti vo forme disociovej (ako  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ), kým zanedbateľný zlomok voľnej kyseliny siričitej je prítomný vo forme nedisociovej molekuly  $\text{H}_2\text{SO}_3$ . Skutočným inhibítorom reprodukčnej a fermentačnej schopnosti kvasiniek nie je viazaná, ani voľná kyselina siričitá, ale nedisociovaná molekulová forma.

Koncentrácia  $\text{H}_2\text{SO}_3$  je závislá od pH prostredia, pričom znižujúcim sa pH stúpa obsah nedisociovej  $\text{H}_2\text{SO}_3$  [1]. Odolnosť voči nedisociovej  $\text{H}_2\text{SO}_3$  je pri rôznych kmeňoch rôzna a pohybuje sa od 0 do 8 mg na liter nedisociovej  $\text{H}_2\text{SO}_3$ . Sú známe sulfitové kmene kvasiniek, ktoré znášajú vyššie koncentrácie  $\text{H}_2\text{SO}_3$  [2]. Niektoré selektované kmene kvasiniek používané vo vinárskom priemysle dobre znášajú aj 8,4 mg na liter nedisociovej  $\text{H}_2\text{SO}_3$  pri pH 2,9 [3].

Antimikróbny účinok  $\text{SO}_2$  spočíva hlavne v schopnosti acetaldehydu, kyseliny pyrohroznovej a 2-oxoglutarovej viazať  $\text{SO}_2$  [4]. Pyruvát je jeden z najhlavnejších intermediátov viažucich  $\text{SO}_2$ . Jeho dekarboxyláciou vzniká

dôležitý intermediát viažuci  $\text{SO}_2$  a to acetaldehyd. Ďalším intermediátom s obdobnou schopnosťou je 2-oxoglutarát, vznikajúci v Krebsovom cykle.

So zvyšovaním koncentrácie  $\text{SO}_2$  sa zvyšuje aj tvorba spomínaných intermediátov. Typy kvasiniek, ktoré sú citlivé na  $\text{SO}_2$  ich produkujú vo zvýšených množstvách [5]. Oxid siričitý pridaný do kultivačného média signifikantne koreluje s obsahom pyruvátu a 2-oxoglutarátu, nie však s koncentráciou acetaldehydu [6]. Oxid siričitý sa viaže aj na glukózu [7].

## Materiál a metódy

Na zisťovanie rezistencie voči účinkom  $\text{SO}_2$  sme testovali rôzne druhy kvasiniek (tab. 1), ktoré boli izolované z prevádzky výroby kŕmneho droždia zo syntetického ethanolu za spolupráce Ing. J. Rybárovej a určené boli RNDr. A. Kockovou-Kratochvílovou.

Kultúry sme testovali na troch pôdach: 2% glukózovej, 2% fruktózovej a 1% etanolovej, do pôd sme pridávali práškový kvasničný extrakt Difco v koncentrácii 0,4 %. Na zasírenie pôd sme použili pyrosiričitan draselný,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , o koncentráciách 0,5 až 4,0 g na liter. Pre účinok aktívneho inhibítora nedisociovej  $\text{H}_2\text{SO}_3$  sme pH pôd upravovali na hodnotu 3,7. Všetky kultivácie prebiehali za aeróbnych podmienok v bankách na trepačke temperovanej na 28 °C.

Prírastok biomasy sme merali spektrofotometricky na Spekle (Carl Zeiss, Jena) pri vlnovej dĺžke 500 nm o riedení kultivačného média 1 : 10.

Nedisociovanú  $\text{H}_2\text{SO}_3$  sme stanovili výpočtom (zohľadniac príslušné pH kultivačného média) podľa Kisa a Vasa [1] z výsledkov jodometrického stanovenia voľného  $\text{SO}_2$  [8].

## Výsledky a diskusia

V tejto práci sme sa zamerali na využitie mikrobicídneho účinku  $\text{SO}_2$  pri výrobe kŕmneho droždia zo syntetického ethanolu. Jedná sa tu v podstate o iný proces, ako pri výrobe vína. Namiesto anaeróbného procesu pri výrobe vína (teda redukčnej technológie) a produkcie ethanolu, ide v našom prípade o aeróbný proces a produkciu biomasy. Spoločné je to, že sa využíva  $\text{SO}_2$  pre zachovanie biologickej čistoty produkčnej kultúry.

Z prevádzky sme izolovali niekoľko druhov kvasiniek, v ktorých sa testoval účinok  $\text{SO}_2$  tak na glukózovej, ako aj na etanolovej pôde. Z výsledkov je zrejmé, že kmene *Candida tropicalis*, *Torulopsis ethanolitolerans*, *T. azyma*

Tab. 1. Kmene testované na rezistenciu voči  $\text{SO}_2$ 

Druhy kvasiniek	Kmeň CCY
<i>Candida tropicalis</i>	29-7-41, -42, -44, -45, -46
<i>Candida utilis</i>	29-38-72, -73, -75, -76, -77, -78, -79, -80, -81
<i>Torulopsis ethanolitolerans</i>	26-58-3, -4, -5, -6
<i>Torulopsis candida</i>	26-9-12
<i>Candida mogii</i>	29-66-2
<i>Torulopsis azyma</i>	26-59-1, -2, -3
<i>Geotrichum candidum</i>	16-1-3

Poznámka: CCY = Czechoslovak Collection of Yeasts, Čs. zbierka kvasiniek, Chemický ústav SAV, Bratislava

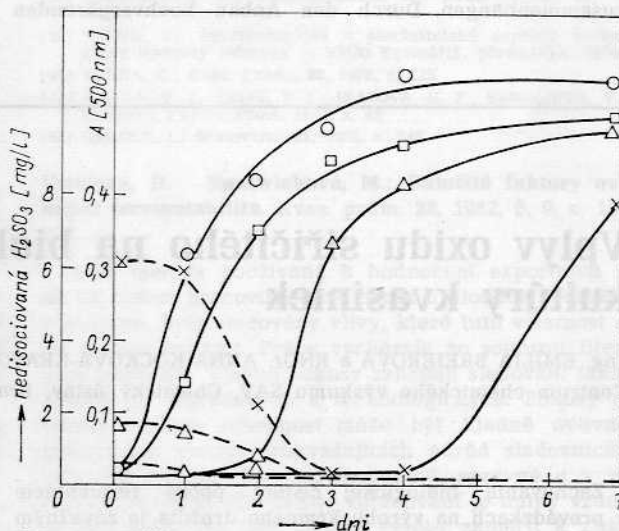
sú rezistentnejšie v glukózovej pôde ako v ethanolovej a kmene *Candida utilis*, *T. candida*, *C. mogii* a *Geotrichum candidum* v ethanolovej pôde sú práve naopak rezistentnejšie voči  $\text{SO}_2$  (tab. 2).

Na lepšie dokreslenie daného problému (teda účinku  $\text{SO}_2$  na kvasinky) bol sledovaný úbytok  $\text{SO}_2$  v kultivačnom médiu a prírastok biomasy v závislosti od času u vybraného kmeňa *C. tropicalis* CCY 29-7-41. Hodnotili sme tri druhy pôd. Rozdiel vplyvu  $\text{SO}_2$  na testovaný kmeň medzi glukózovou a fruktózovou pôdou sa neprejavil. Na glukózovej pôde dochádza k nárastu biomasy až po výraznejšom poklese nedisociovaného  $\text{H}_2\text{SO}_3$  v médiu. Vplyvom  $\text{SO}_2$  sa významne predlžuje lag fáza (obr. 1). Na ethanolovej pôde je vplyv  $\text{SO}_2$  obdobný, ale pri koncentrácii 6,7 mg na liter nedisociovaného  $\text{H}_2\text{SO}_3$  nedorieďa k výraznejšiemu nárastu biomasy ani po siedmich dňoch kultivácie (obr. 2).

Z uvedených výsledkov vyplýva, že  $\text{SO}_2$  ovplyvňuje počiatočnú fázu rastu kvasiniek. V kultivačnom médiu dochádza k prirodzenej selekcii rezistentnejších buniek a málo rezistentné odumierajú, v kultivačnom médiu vras-

tá pH z pôvodných 3,7 na 5,0 a tým koncentrácia aktívneho inhibítora, t. j.  $\text{H}_2\text{SO}_3$  v nedisociovannej forme klesá.

Keďže produkčným kmeňom pre výrobu kŕmneho drożdžia je najčastejšie *C. utilis*, využili sme adaptačnú schop-



Obr. 1. Rastové krivky kmeňa *C. tropicalis* CCY 29-7-41 pri rôznych koncentráciách nedisociovaného  $\text{H}_2\text{SO}_3$  a úbytok  $\text{H}_2\text{SO}_3$  počas rastu na 2% glukózovej pôde.

rastové krivky —, úbytok  $\text{H}_2\text{SO}_3$  ---, bez  $\text{H}_2\text{SO}_3$  ○—○, prvá koncentrácia □—□, druhá koncentrácia △—△, tretia koncentrácia ×—×.

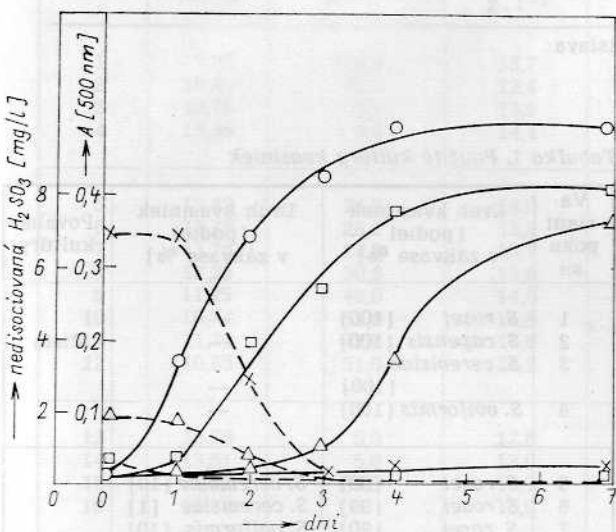
nost kmeňov kvasiniek na prostredie obsahujúce  $\text{SO}_2$ . Výsledky ukázali, že vo vybranom kmeni *C. utilis* CCY

Tab. 2. Vplyv koncentrácie  $\text{SO}_2$  na kvasinky pri dvoch rôznych koncentráciách nedisociovaného  $\text{H}_2\text{SO}_3$  na 2% glukózovej a 1% ethanolovej pôde

kmeň CCY	2% glukóza					1% ethanol				
	bez H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0,49 mg/l H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>		1,42 mg/l H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>		bez H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0,49 mg/l H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>		1,42 mg/l H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	
	A (500 nm)	A (500 nm)	%	A (500 nm)	%	A (500 nm)	A (500 nm)	%	A (500 nm)	%
29-7-41	0,64	0,40	62,5	0,35	54,7	0,47	0,28	59,7	0,02	4,3
29-7-42	0,66	0,48	72,7	0,35	53,0	0,54	0,34	85,0	0,05	9,3
29-7-44	0,47	0,23	48,9	0,00	0,0	0,38	0,20	52,6	0,00	0,0
29-7-45	0,43	0,43	100,0	0,25	58,1	0,36	0,29	80,6	0,02	5,5
29-7-46	0,52	0,45	86,5	0,02	3,8	0,44	0,20	45,5	0,00	0,0
29-38-72	0,55	0,47	85,5	0,02	3,6	0,55	0,31	56,4	0,03	5,4
29-38-73	0,49	0,38	77,6	0,00	0,0	0,45	0,05	11,1	0,00	0,0
29-38-75	0,43	0,20	46,5	0,00	0,0	0,45	0,04	8,9	0,00	0,0
29-38-76	0,83	0,45	54,2	0,00	0,0	0,52	0,34	65,4	0,02	3,8
29-38-77	0,80	0,43	53,7	0,00	0,0	0,52	0,26	50,0	0,03	5,7
29-38-78	0,47	0,40	85,1	0,02	4,2	0,41	0,05	12,2	0,00	0,0
29-38-79	0,32	0,02	6,2	0,00	0,0	0,46	0,06	13,0	0,00	0,0
29-38-80	0,47	0,40	85,1	0,02	4,2	0,45	0,42	93,3	0,06	13,3
29-38-81	0,69	0,51	73,9	0,02	2,9	0,46	0,43	93,5	0,07	15,2
26-58-3	0,39	0,35	90,9	0,06	15,6	0,38	0,03	7,9	0,00	0,0
26-58-4	0,38	0,36	94,7	0,04	10,5	0,30	0,39	96,6	0,00	0,0
26-58-5	0,36	0,35	97,2	0,06	16,7	0,33	0,28	84,8	0,00	0,0
26-58-6	0,38	0,35	92,1	0,30	78,9	0,36	0,32	88,8	0,28	77,7
26-9-12	0,75	0,60	80,8	0,03	4,0	0,56	0,43	67,7	0,03	5,3
29-66-2	0,45	0,02	4,4	0,00	0,0	0,39	0,35	89,7	0,02	5,1
26-59-1	0,66	0,53	80,3	0,38	57,5	0,52	0,42	80,7	0,25	48,1
26-59-2	0,56	0,44	78,6	0,32	57,1	0,59	0,41	69,5	0,02	3,4
26-59-3	0,69	0,64	92,7	0,02	2,8	0,61	0,48	78,7	0,02	3,3
16-1-3	0,50	0,48	96,0	0,02	4,0	0,37	0,30	81,1	0,02	5,4



29-38-81 sa zvýšila rezistencia voči  $\text{SO}_2$  za rovnakých kultivačných podmienok v 1% etanole. V tom istom kmeni pasážovaním v prostredí obsahujúcom  $\text{SO}_2$  sa zmenila absorbancia kultivačného média pri 500 nm z 0,07 na



Obr. 2. Rastové krivky kmeňa *C. tropicalis* CCY 29-7-41 pri rôznych koncentráciach nedisociovej  $\text{H}_2\text{SO}_3$  a úbytok  $\text{H}_2\text{SO}_3$  počas rastu na 1% etanolevej pôde.

rastové krivky —, úbytok  $\text{H}_2\text{SO}_3$  ---, bez  $\text{H}_2\text{SO}_3$  ○—○, prvá koncentrácia □—□, druhá koncentrácia △—△, tretia koncentrácia ×—×.

0,45 pri koncentracii nedisociovej  $\text{H}_2\text{SO}_3$  1,42 mg na liter, čo je zvýšenie o 84 %. Dokonca kmeň rástol pri koncentracii nedisociovej  $\text{H}_2\text{SO}_3$  3,21 mg na liter.

Oxid siričitý vplyva aj na morfológiu kvasiniek. Zistili sme, že počas kultivácie kvasiniek v médiu obsahujúcom  $\text{SO}_2$  kvasinky tvoria tvarovo nehomogénne populácie, zväčšené alebo zmenšené bunky. Tak napr. bunky kmeňa *T. ethanolitolerans* sa signifikantne zväčšujú viac do dĺžky ako do šírky, bunky *C. utilis* sa zužujú, teda vytvárajú sa samostatné úzke bunky a bunky *C. tropicalis* sa zväčšili viac do šírky ako do dĺžky.

Z týchto výsledkov sa nám naskytuje možnosť ovplyvniť biologickú čistotu priemyselnej kultúry pasážovaním v médiu obsahujúcom  $\text{SO}_2$  a teda udržať v činnosti potrebný čas na využitie substrátu a naprodukovať patričného množstva biomasy.

## Literatura

- [1] MINÁRIK, E.: Kvas. prům. 2, 1956, s. 183—186
- [2] YANG, H. Y.: Americ. J. Enol. Viticult. 26, 1975, s. 1—4
- [3] MINÁRIK, E.: Kvas. prům. 5, 1959, s. 174
- [4] WECKS, C.: Americ. J. Enol. Viticult. 20, 1969, s. 32—39
- [5] CARVALHO, P. A.: Office Int. Vigue Vin. D. T. 87, 1980, s. 883
- [6] RANKINE, B. C., POCKOCK, K. F.: J. Science Food Agricult. 20, 1969, s. 164—169

- [7] KIELHÖFER, E.: Deutsche Weinzeit. 96 1960, s. 14
- [8] LAHO, J., MINÁRIK, E.: Vinárstvo II. 1959

Breierová, E. - Kocková-Kratochvílová, A.: Vplyv oxidu siričitého na biologickú čistotu prevádzkovej kultúry kvasiniek. Kvas. prům., 28, 1982, č. 9, s. 203—205.

Vplyv účinku oxidu siričitého na niektoré druhy kvasiniek izolovaných z prevádzky výroby krmného droždia zo syntetického etanolu bol sledovaný za účelom ovplyvnenia biologickej čistoty priemyselnej kultúry. Zistilo sa, že pasážovaním produkčného kmeňa pre výrobu krmného droždia v prostredí obsahujúcom  $\text{SO}_2$  možno ovplyvniť biologickú čistotu priemyselnej kultúry a tým udržať fermentor v činnosti potrebný čas na využitie substrátu a na produkovanie patričného množstva biomasy.

Брейерова, Е., Кощкова-Кратохвилова, А.: Влияние двуокиси серы на биологическую чистоту эксплуатационной культуры дрожжей. Квас. прум. 28, 1982, Но 9, стр. 203—205.

Влияние действия двуокиси серы на некоторые типы дрожжей, изолированных из производства кормовых дрожжей из синтетического этанола исследовалось с целью оказать влияние на биологическую чистоту промышленной культуры. Было установлено, что повторным культивированием продукционного штамма для производства кормовых дрожжей в среде, содержащей двуокиси серы, можно повлиять на биологическую чистоту промышленной культуры и тем выдержать ферментер в действии в течение времени необходимого для использования субстрата и для продукции требующегося количества биомассы.

Breierová, E. - Kocková-Kratochvílová, A.: Effect of Sulphur Dioxide on Biological Purity of Production Yeast Culture. Kvas. prům. 28, 1982, No. 9, p. 203—205.

The effect of sulphur dioxide on some yeast species isolated from a production of fodder yeast grown on synthetic ethanol was tested. It was found that the transfer of the production strain through the medium with  $\text{SO}_2$  permits to affect biological purity of the culture. The biological purity of the yeast population permits to keep the cultivation process satisfactory long and to achieve a sufficient utilization of a substrate with an adequate biomass accumulation in the fermentor.

Breierová, E. - Kocková-Kratochvílová, A.: Einfluß des Schwefeldioxyds auf die biologische Reinheit von Betriebs-Hefekulturen. Kvas. prům. 28, 1982, Nr. 9, S. 203—205.

Der Einfluß der Wirkung des Schwefeldioxyds auf einige Arten von Hefen, die aus dem Betrieb der Futterhefeherzeugung aus synthetischem Äthanol isoliert wurden, wurde zu dem Zweck der Beeinflussung der Reinheit der Betriebskultur verfolgt. Es wurde festgestellt, daß durch das Passagieren des Produktionsstammes für die Futterhefeherzeugung in  $\text{SO}_2$ -haltigem Milieu die biologische Reinheit der Betriebskultur beeinflußt werden kann. Außerdem wird dadurch der Fermentor so lange in Tätigkeit erhalten, wie es zur Ausnützung des Substrats und zur Produktion der entsprechenden Biomassemenge erforderlich ist.

## Určování aromatických látek piva plynovou chromatografií

V jednotlivých částech obsírné práce je popsáno určování aromatických látek piva po extrakci methylenchloridem, určení volných mastných kyselin  $\text{C}_2$ — $\text{C}_{12}$  a identifikace řady doprovodných složek kombinací plynové

chromatografie a hmotové spektrometrie. Současně se podařilo identifikovat a kvantitativně určit kyseliny 4-decenovou a 9-decenovou.

NARZIŠ, L., MIEDANER, H., SCHÖNDORFEL, H.: Gaschromatographische Bestimmung von Bieraromastoffen. Brauwiss., 35, 1982, č. 5, s. 109—113.

Lhotský