

Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowywania AR w Lublinie
Instytut Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie

Helena GÓRECKA, Stanisław BUJAK,
Zdzisław TARGOŃSKI

**Aktywność fermentacyjna drożdży w sokach jabłkowych
o różnym stężeniu ekstraktu**

Бродильная активность дрожжей в яблочных соках
с различной концентрацией экстракта

Fermentative Activity in Apple Juices of Different Concentration
of the Extract

Proces zagęszczania soków owocowych ma na celu, m.in. zwiększenie ich trwałości bez użycia środków konserwujących. Jednakże wielu badaczy, badając różne produkty spożywcze bogate w cukier, stwierdziło możliwość rozwoju drożdży w tych produktach (3, 4, 5, 7, 9, 11).

Drożdże rozmnażające się w zagęszczonych sokach i innych produktach o wysokiej koncentracji cukru wykorzystują ten składnik do syntezy substancji komórkowych i jako źródło energii. W wyniku przemiany węglowodanów prowadzonej w warunkach beztlenowych lub utrudnionego dostępu tlenu tworzy się alkohol etylowy lub polialkohole oraz CO_2 (3, 6, 10).

Drugim ważnym składnikiem soków owocowych dla dalszego ich przetwarzania są zawarte w nich kwasy. Z badań Jarczyka (8) wynika, że kwas jabłkowy stanowi 85—98% sumy wszystkich kwasów występujących w jabłkach i ich przetworach. Kwas jabłkowy łatwo ulega rozkładowi pod wpływem działalności drożdży z rodzaju *Schizosaccharomyces* (1, 2) oraz przez niektóre gatunki bakterii fermentacji mlekowej. Ubytek kwasu jabłkowego w sokach, zachodzących podczas jego przechowywania może być znaczny, w takich przypadkach sok nie nadaje się do produkcji win i innych przetworów.

Celem tej pracy jest zbadanie aktywności drożdży wyosobnionych z zagęszczonego soku jabłkowego do wytwarzania alkoholu etylowego podczas składowania soku.

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Badania uzdolnień drożdży do wytwarzania alkoholu etylowego w sokach zawierających 12, 20, 40, 60, 65 i 67,5% ekstraktu prowadzono przy pomocy szczepów wyosobnionych z zagęszczonego soku jabłkowego. Szczepy te należały do następujących gatunków: *Saccharomyces florentinus* — 16 szczepów, *S. steinerii* — 3 szczepy, *S. italicus* — 1 szczep, *Kluyveromyces lactis* — 8 szczepów i *Candida tropicalis* — 4 szczepy.

Soki jabłkowe zawierające od 12 do 67,5% ekstraktu szczepiono 1 cm³ 24-godzinnej hodowli wymienionych drożdży. Objętość każdej hodowli wynosiła 100 cm³. Hodowle prowadzone przez 2 miesiące w temperaturze 28°C.

Zawartość alkoholu w hodowlach oznaczano po jego oddestylowaniu i oznaczeniu ciężaru właściwego destylatu przy pomocy piknometru. Hodowle kontrolne stanowiły soki o takiej samej zawartości ekstraktu jak hodowle doświadczalne, lecz nie szczepione drożdżami, zawierające tylko rodzimą mikroflorę drożdżową.

Zawartość ekstraktu w sokach przygotowanych do fermentacji oznaczano przy pomocy refraktometru.

PRZEBIEG I WYNIKI BADAŃ

Wyniki dwumiesięcznej hodowli 32 szczepów drożdży należących do 5 rodzajów i 5 gatunków prowadzonej w sokach jabłkowych zawierających od 12 do 67,5% ekstraktu, przedstawiono w tab. 1 i 2. Okazało się, że wszystkie badane szczepy drożdży w czasie dwumiesięcznej hodowli najwięcej wytwarzały alkoholu w podłożach zawierających 20% ekstraktu. Można było spodziewać się, że 12% stężenie ekstraktu będzie bardziej sprzyjające fermentacji alkoholowej niż następne 20% stężenie.

Wśród drożdży *S. florentinus* najwięcej alkoholu wytwarzał w soku zawierającym 20% ekstraktu, bo aż 6,38%. Zbliżone do tej aktywności wykazywał szczep *S. steinerii* — 2 (6,21%), *Kluyveromyces lactis*, szczep — 48, bo nawet 6,79%. Dla wszystkich badanych szczepów najlepszym podłożem fermentacyjnym okazał się sok zawierający 20% ekstraktu. Nawet niektóre szczepy *Candidia tropicalis* w tym podłożu wytwarzały do 5,6% alkoholu.

W miarę podwyższania zawartości ekstraktu w soku malała aktywność fermentacyjna badanych szczepów drożdży. W soku zawierającym 40% ekstraktu aktywność fermentacyjna drożdży była mniejsza niż w soku zawierającym 20% ekstraktu, ale w większości przypadków wyższa od aktywności wykazywanej w podłożu zawierającym 12% ekstraktu. Przyjmując zawartość alkoholu wytworzonego po 2 miesiącach fermentacji

Tab. 1. Średnie zawartości alkoholu etylowego wytworzonego przez drożdże w czasie dwumiesięcznej hodowli w sokach jabłkowych o różnym stężeniu ekstraktu
Average content of ethyl alcohol produced by yeasts during 2 months' cultivation in apple juices of various concentration of extract

Nr szcze- pu	Gatunek drożdży	alkoholu w g/kg soku o ekstrakcie					
		12 %	20 %	40 %	60 %	65 %	67,5 %
1	<i>S. florentinus</i>	27,6	35,7	32,2	0,403	0,350	0,320
1a		29,3	47,2	31,1	0,423	0,230	0,230
4		27,6	59,3	32,2	0,230	0,110	0,350
5		31,0	45,2	36,8	0,230	0,110	0,750
6		24,5	49,5	36,8	0,230	0,110	0,460
9		32,8	49,5	27,6	0,230	0,110	0,380
10		25,9	63,8	29,8	0,300	0,110	0,490
11		28,5	43,7	41,4	0,230	0,260	0,490
14		21,6	56,7	23,0	0,230	0,230	0,460
15		10,6	41,4	25,3	4,030	0,440	0,490
16		29,4	57,5	30,5	0,250	0,110	0,460
22		33,0	41,8	28,8	0,230	0,260	0,230
27		30,7	42,6	28,8	0,287	0,110	0,490
30		17,7	36,2	24,2	0,230	0,260	0,490
38		17,9	37,9	41,4	0,230	0,380	0,230
46		18,4	53,5	21,3	0,230	0,380	0,580
2	<i>S. steinerii</i>	29,0	62,1	40,3	0,230	0,110	0,230
21		41,2	44,8	33,4	0,230	0,110	0,230
34		12,4	48,3	32,8	0,230	0,230	0,380
12	<i>S. italicus</i>	25,3	45,4	34,5	0,287	0,110	0,460

Tab. 2. Średnie zawartości alkoholu etylowego wytworzonego przez drożdże *Kluyveromyces* i *Candida* w sokach o różnym stężeniu ekstraktu
Average content of ethyl alcohol produced by *Kluyveromyces* and *Candida* yeasts of various concentration of extract

Nr szcze- pu	Gatunek drożdży	alkoholu w g/kg soku o ekstrakcie					
		12 %	20 %	40 %	60 %	65 %	67,5 %
31	<i>Kluyveromyces</i> <i>lactis</i>	4,8	35,7	16,1	0,230	-	-
37		8,1	48,3	32,2	0,230	-	-
39		21,2	55,2	29,3	0,249	0,350	0,350
41		21,6	37,2	42,0	0,230	0,260	0,230
43		13,3	62,1	29,9	0,230	0,230	0,380
45		19,3	36,8	32,2	9,090	0,490	-
47		15,5	52,9	28,8	0,230	0,320	0,490
48		13,3	67,9	36,2	0,230	0,230	0,460
35	<i>Candida</i> <i>tropicalis</i>	21,9	53,5	41,4	0,230	0,230	0,230
36		11,5	36,8	38,3	0,230	-	0,460
42		17,0	56,4	27,0	0,315	0,230	-
49		18,8	49,5	26,5	0,230	0,110	0,380
	Sok nieszczepiony	0,5	2,3	1,5	0,230	0,110	0,230

w podłożu z 20% ekstraktu za 100%, to w soku zawierającym 40% ekstraktu znaleziono po zakończeniu hodowli średnio 62% tego produktu u *K. lactis*, 76% u *S. italicus*, 68% u *S. steinerii* i *C. tropicalis* oraz 88% w hodowlach *S. florentinus*.

Stężenie ekstraktu w wysokości 60% wyraźnie hamowało wytwarzanie alkoholu. Średnio przy tym stężeniu ekstraktu drożdże *K. lactis* wytworzyły 1,34%, a szczepy pozostałych gatunków tylko 0,5% lub nawet mniej.

Interesujące zjawisko zaobserwowano w przypadku fermentowania soku zawierającego 67,5% ekstraktu, bowiem średnio wszystkie szczepy badanych gatunków wytworzyły więcej alkoholu niż w podłożu zawierającym 65% ekstraktu (tab. 3).

Tab. 3. Średnie zawartości alkoholu etylowego w dwumiesięcznych hodowlach drożdży w podłożach o różnym stężeniu ekstraktu
Average content of ethyl alcohol in 2 months' yeasts cultivations in medium of various concentration of extract

Gatunek drożdży	alkoholu g/kg soku o ekstrakcie					
	12 %	20 %	40 %	60 %	65 %	67,5 %
<i>Saccharomyces florentinus</i>	25,40	41,59	36,67	0,50	0,53	0,43
% w stosunku do najwyższej zawart.	61,05	100,0	88,15	1,20	0,53	1,03
<i>S. italicus</i>	25,30	45,40	34,50	0,287	0,110	0,460
% w stosunku do najwyższej zawart.	55,70	100,0	76,00	0,63	0,24	1,01
<i>S. steinerii</i>	27,50	51,73	35,50	0,690	0,450	0,840
% w stosunku do najwyższej zawart.	53,20	100,0	68,60	0,44	0,29	0,54
<i>Kluyveromyces lactis</i>	14,64	49,51	30,84	1,34	0,310	0,380
% w stosunku do najwyższej zawart.	29,50	100,0	62,30	2,10	0,62	1,83
<i>Candida tropicalis</i>	17,30	49,05	33,30	0,25	0,190	0,357
% w stosunku do najwyższej zawart.	35,30	100,0	68,0	0,51	0,38	0,72

W sokach nieszczepionych najwięcej alkoholu znaleziono w kombinacji z 20% zawartością ekstraktu, ale tylko 2,3 g/kg soku, a przy 40% zawartości ekstraktu tylko 1,5 g alkoholu w kg soku. Nieznaczne ilości alkoholu stwierdzano i w sokach zawierających 60 i 67,5% ekstraktu, ale prawie o 50% mniej niż w odpowiednich kombinacjach szczepionych.

W drugiej serii doświadczenia fermentowano soki jabłkowe zawierające 45% ekstraktu i kwas jabłkowy w stężeniach 2,88%, 3,68, 4,17 oraz 6,1%. Wyniki hodowli przedstawiono w tab. 4. O aktywności fermentacyjnej w takich podłożach wnioskowano na podstawie ilości wydzielonych $\text{cm}^3 \text{CO}_2$ po 6 i 18 dniach hodowli drożdży.

Tab. 4. Średnie zawartości CO₂ wydzielonego przez drożdże w czasie hodowli w sokach o różnej zawartości ekstraktu i kwasu jabłkowego
Average amount of CO₂ secreted by yeasts during cultivation in juices of various concentration of extract and malic acid

Szczepy z gatunku	Ekstrakt 45 %							
	kw. jabłko- wego 2,28 %		kw. jabłko- wego 3,68 %		kw. jabłko- wego 4,17 %		kw. jabłko- wego 6,1 %	
	Wydzielonego CO ₂ w cm ³ po dniach							
	6	18	6	18	6	18	18	
S. florentinus	3,5	6,1	0,7	1,0	0,7	0,8	0,0	
	3,5	5,7	1,4	2,1	0,7	0,8	0,0	
	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3,1	5,2	1,9	3,2	0,4	0,5	0,0	
	0,7	0,8	2,3	3,5	0,8	1,2	0,0	
	0,0	1,5	4,5	6,2	0,4	1,2	0,0	
	1,6	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	1,0	2,2	0,0	2,4	0,0	0,7	0,0	
S. italicus	1,9	6,2	3,8	5,3	0,7	1,0	0,0	
	0,3	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	0,6	2,0	2,5	3,2	0,0	0,0	0,0	
Kluyveromyces lactis	1,8	4,8	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	
	1,6	2,9	1,7	4,8	1,0	1,6	0,0	
	0,0	0,9	0,5	0,7	0,0	0,5	0,0	
	0,8	3,8	0,6	1,8	0,4	0,6	0,0	
	0,0	3,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	
Candida tropicalis	0,0	1,5	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	
	0,7	3,5	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	
Kontrola bez szczepienia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

W okresie 18-dniowej hodowli najwięcej wydzielaly CO₂ drożdże w podłożu zawierającym 45% ekstraktu i 2,88% kwasu jabłkowego, bo 6,1 cm³, średnio zaś od 2,5 do 3,5 cm³. Zwiększenie w podłożu zawartości kwasu jabłkowego powodowało osłabienie aktywności fermentacyjnej drożdży. Przy 4% stężeniu tego kwasu oznaki fermentacyjne były znikome, a przy 6,1% stężeniu nie stwierdzono oznak fermentacji (tab. 4).

DYSKUSJA

Badane szczepy drożdży nie należą do typowych gatunków drożdży osmofilnych, do których zalicza się takie gatunki, jak *Saccharomyces rouxii*, *S. bisporus* i *S. bailii* (9). Jednakże i użyte w doświadczeniach tej pracy, wyosobnione z soku jabłkowego, fermentowały w podłożach zawierających nawet 67% ekstraktu, aczkolwiek ze znacznie zmniejszoną

intensywnością w porównaniu do drożdży osmofilnych, które dopiero w podłożu o aktywności wodnej równej 0,64 nie wykazują działalności fermentacyjnej (9). Wg Dłużewskiego drożdże osmofilne wytwarzają w czasie 12 dni hodowli nawet 1,0% alkoholu w środowisku zawierającym 65% cukru. Badane szczepy *S. florentinus* wytwarzały w takim podłożu tylko od 0,11 do 0,44% alkoholu w kg soku, czyli od 0,011 do 0,044% wprawdzie w podłożu zawierającym 67,5% ekstraktu wytwarzały nieco więcej tego produktu fermentacji (od 0,023 do 0,058%). Zatem znacznie ustępują drożdżom osmofilnym.

Wyraźne ograniczenie fermentacji obserwowano przy zawartości w podłożu 45% ekstraktu i 4,17% kwasu jabłkowego. W takim podłożu stężenie jonów wodorowych wynosiło 2,9. Można zatem sądzić, że soki jabłkowe już 5-krotnie zagęszczone będą dość trwale w przechowywaniu, a 7-krotnie zagęszczone uznać można za trwałe.

WNIOSKI

1. Drożdże wyosobnione z soków jabłkowych, nie należące do typowych gatunków osmofilnych, mogą rozwijać się w sokach zagęszczonych nawet do zawartości 60% ekstraktu.
2. Podwyższenie zawartości kwasu jabłkowego w soku zagęszczonym do 6,1% całkowicie hamuje działalność drożdży wyosobnionych z soków jabłkowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Bujak S., Dąbkowski W.: Rozkład kwasu jabłkowego przez drożdże *Schizosaccharomyces acidivoratus* w różnych warunkach fermentacji. *Acta Microb. Polon.*, 10, 409, 1961.
2. Bujak S., Dąbkowski W.: Zapotrzebowanie na substancje odżywcze drożdży *Schizosaccharomyces acidivoratus* rozkładających kwas 1-jabłkowy. *Acta Microb. Polon.* 11, 373, 1962.
3. Dąbkowski W.: Drożdże osmofilne miodów pszczelich i ich uzdolnienia do wytwarzania polialkoholi. Praca doktorska, maszynopis, WSR w Lublinie, 1966.
4. Dłużewski M.: Studia nad drożdżami osmofilnymi. *Rolnictwo, Technologia Roln.-Spoż.*, SGGW, 1, 25, 1961.
5. Górecka H., Bujak S.: Osmofilne drożdże zagęszczonych soków jabłkowych. Cz. I. Botaniczny skład drożdży występujących w zagęszczonych sokach jabłkowych oraz wpływ składu podłoża na zarodnikowanie tych drożdży. *Prace Instyt. Lab. Przem. Spoż.* XXIII, 2, 245, 1973.
6. Ingram M.: *Yeasts in Food Spoilage. The Chemistry and Biology of Yeasts.* Acad. Press INC, New York 1958.
7. Ingram M.: *Physiological properties of Osmophilic Yeasts.* *Rev. Ferm. Ind. Alim. Bruxells*, 14, 23, 1959.

8. Jarczyk A.: Studia nad identyfikacją i oznaczaniem nietlotnych kwasów w jabłkach i przetworach jabłkowych. Praca doktorska, maszynopis, SGGW, 1963.
9. Leveau J. V., Bouix M.: Etude des conditions extrêmes de croissance des levures osmophiles. Ind. Aliment. Agric., 1147, 1979.
10. Peterson W. H., Hendershot W. F., Hajny G. J.: Factors Affecting Production of Glycerol and D-Arabitol by Representative Yeasts of the Genus *Zygosaccharomyces*. Appl. Microbiol. 6, 349, 1958.
11. Schelhorn M.: Untersuchungen über den Verderb wasserrarmer Lebensmittel durch osmophile Mikroorganismen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 91, 117, 1950.

РЕЗЮМЕ

Яблочным сокам, содержащим 12, 20, 40, 60, 65 и 67,5% экстракта, прививалась суспензия дрожжей, выращиваемых в течение 1 суток. Дрожжи принадлежали к *Saccharomyces florentinus*, *S. italicus*, *S. steinerii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida tropicalis* и были выделены из яблочных соков. Культивирование велось в течение 2 месяцев при температуре 28°C. Содержание этанола обозначалось в полученном дистилляте по пикнометрическому методу.

Во второй серии опытов культивирование проводилось в соке, содержащем 45% экстракта, но обогащенном добавлением яблочной кислоты до 2,88, 3,68, 4,17 и 6,10%. В этой серии опытов бродильная активность дрожжей определялась на основании числа см³ CO₂, выделенного после 6 и 18 дней культивирования.

Было определено, что самой высокой бродильной активностью отличались все исследуемые штаммы и виды в питательной среде, содержащей 20% экстракта. В среде, содержащей 40% экстракта, дрожжи производили от 62% до 88% количества алкоголя, получаемого в питательной среде, содержащей 20% экстракта.

Добавление яблочной кислоты к соку с содержанием 45% экстракта тормозило бродильную активность дрожжей. При 4,17% концентрации яблочной кислоты в присутствии 45% экстракта наблюдалась незначительная бродильная активность, а концентрация 6,1% кислоты полностью прекращала брожение.

SUMMARY

Apple juices containing 12, 20, 40, 60, 65 and 67,5% of the extract were inoculated with the suspension of 24 hours' cultures of yeast belonging to *Saccharomyces florentinus*, *S. italicus*, *S. steinerii*, *Kluyveromyces lactis* and *Candida tropicalis* isolated from concentrated apple juice from malic acids. The cultures were kept in the temperature of 28°C for two months. The content of ethyl alcohol was determined by pycnometric method in the distillate obtained.

In the second series of experiments, the cultures were kept in the juice containing 45% of the extract, but enriched with the addition of malic acid to 2.88, 3.68, 4.17 and 6.10%. In the series of experiments, fermentative activity of yeast was investigated on the basis of the amount of cm³ CO₂ liberated after six and eighteen days of the culture.

It was found out that the highest fermentative activity was shown by all investigated species in the medium containing 20% of the extract. On the medium containing 40% of the extract, yeast produced from 62 to 88% of that amount of alcohol which was the case in the medium containing 20% of the extract.

The investigated yeast produced a little more alcohol in the medium containing 67.5% of the extract than in that with 65% of the extract, and at times more than in the medium containing 60% of the extract.

Addition of malic acid to the juice containing 45% of the extract impeded the fermentative activity of yeast. With 4.17% concentration of malic acid in the presence of 45% of the extract, a slight fermentative activity was observed, whereas the concentration of 6.1% of this acid stopped the fermentative activity completely.