

Helena GÓRECKA, Stanisław B UJAK,
Eugenia PODGÓRSKA

Ciepłooporność osmofilnych drożdży zagęszczonych soków jabłkowych

Heat-Resistance of Osmophilic Yeasts in the Concentrated Juices

Cecha osmofilności niektórych gatunków drożdży występujących w sokach owocowych budziła żywe zainteresowanie uczonych i technologów ze względów poznawczych i praktyki przemysłowej. Z tych powodów prowadzono badania dla poznania przynależności gatunkowej tych drożdży (1, 2, 6), ich rozwoju w środowiskach o różnym stężeniu rozpuszczalnej suchej masy (3) oraz aktywności fermentacyjnej (4) i uzdolnień do biosyntezy polialkoholi.

Równie interesującą i ważną dla praktyki przemysłowej w zakresie produkcji soków owocowych jest cecha ciepłooporności osmofilnych drożdży, bytujących na owocach, a zatem i w sokach owocowych, przede wszystkim dla doboru parametrów termicznej obróbki soków jak i ich przechowywania i dystrybucji po obróbce. Ta właściwość osmofilnych drożdży była głównym celem podjęcia niniejszych badań obok określenia wielkości zmian w zawartości ekstraktu, kwasów organicznych i liczby komórek drożdży w zagęszczonych sokach jabłkowych, zachodzących w 6 miesięcznym okresie przechowywania.

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Obiektem badań były soki jabłkowe zawierające 12% i 40% ekstraktu oraz ponad 4% kwasów. Z poprzednich badań (1, 3, 4) wybrano 3 szczepy drożdży: *Saccharomyces florentinus* i *Kluyveromyces lactis* zachowujące się jak drożdże osmofilne oraz szczep *Candida sake*, niewykazujący wyraźnych cech osmofilności. Dwa pierwsze gatunki należą do klasy workowców trzeci zaś do *Fungi imperfecti* (8).

W badaniach ciepłooporności określono wpływ stężenia ekstraktu soku i temperatur w granicach od 50° do 90°C oraz czasu ich oddziaływania na przeżywalność komórek drożdży, którą określono poprzez posiewy uprzednio ogrzewanych zawiesin drożdży w sokach i liczenie wyrosłych kolonii. Podłożem, na które dokonywano posiewów była brzeczka słodowa zawierająca 10% ekstraktu i 2% agaru.

Zmiany w stężeniu ekstraktu przechowywanego soku określano przy pomocy refraktometru, zmiany kwasów zaś potencjometrycznym miareczkowaniem. Zawartość kwasów lotnych w przeliczeniu na kwas octowy określano przez miareczkowanie destylatu z soku otrzymanego przez ogrzanie parą wodną. Badania zmian zawartości wymienionych składników zagęszczonych soków prowadzono przez okres 6 miesięcznego ich przechowywania.

PRZEBIEG I WYNIKI BADAŃ

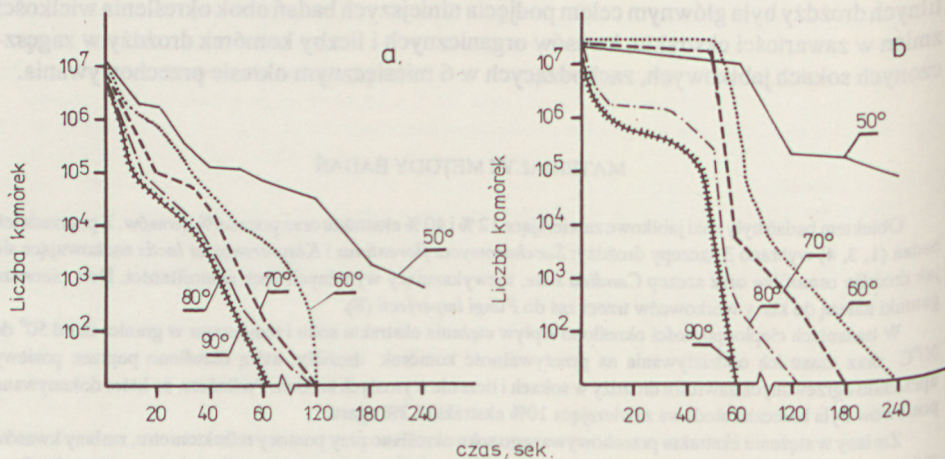
Określenie czasu zamierania komórek drożdży w różnych temperaturach miało na celu dostarczenie odpowiednich danych dla przeprowadzenia skutecznej pasteryzacji soków owocowych przed ich składowaniem w magazynach. Soki przechowywano w tankach o pojemności 15 tys. dm³, w magazynach niechłodzonych i chłodzonych do temperatury 6°C. Badania przechowywanych soków przeprowadzono w 2 zakładach produkcyjnych oznaczonych w pracy jako zakład A i zakład B.

Tab. 1. Czas całkowitego zniszczenia komórek drożdży w zależności od temperatury i zawartości ekstraktu w soku jabłkowym, w sek.

The time of complete damage of yeast cells depending on the temperature and the content of the extract in apple juice

Gatunek drożdży	Czas całkowitego zniszczenia komórek w sek. w temperaturach			
	60°	70°	80°	90°
<i>S. florentinus</i> przy 12 % ekstraktu	120	120	120	60
<i>S. florentinus</i> przy 40% ekstraktu	240	180	120	60
<i>K. lactis</i> przy 12 % ekstraktu	120	40	30	20
<i>K. lactis</i> przy 40% ekstraktu	120	120	60	60
<i>C. sake</i> przy 12% ekstraktu	120	60	60	60
<i>C. sake</i> przy 40% ekstraktu	180	120	60	20

Wychodząc z założenia, że w sokach owocowych znajdują się zarówno drożdże osmofilne, jak i nieosmofilne, spośród tych ostatnich poddano badaniom szczep *Candida sake*, wyosobniony z soków w poprzednim okresie. Wyniki badań nad wpływem czasu powodującego całkowite zabicie komórek drożdży w sokach zawierających 12%



Ryc. 1 Czas obumierania komórek *S. florentinus* w soku zawierającym 12% ekstraktu - a 40% ekstraktu - b

The time of the decay of the cells of *S. florentinus* in the juice containing 12% of the extract - a 40% of the extract - b

i 40% ekstraktu, przedstawiono w tab. 1. Zawarte w niej dane świadczą o tym, że komórki drożdży należące do gatunków *S. florentinus* i *K. lactis*, szybciej ulegały zamieraniu w soku zawierającym 12% ekstraktu pod wpływem działania podwyższonych temperatur niż w soku zawierającym 40% ekstraktu w takich samych temperaturach. Szczególnie duże różnice w czasie zabójczego oddziaływania temperatur obserwowano w przypadku drożdży *K. lactis*, które w temperaturze 80°C w soku o stężeniu 12% ekstraktu traciły żywotność już po 30 sek. ogrzewania, podczas gdy w soku o gęstości 40% ekstraktu dopiero po 60 sek.

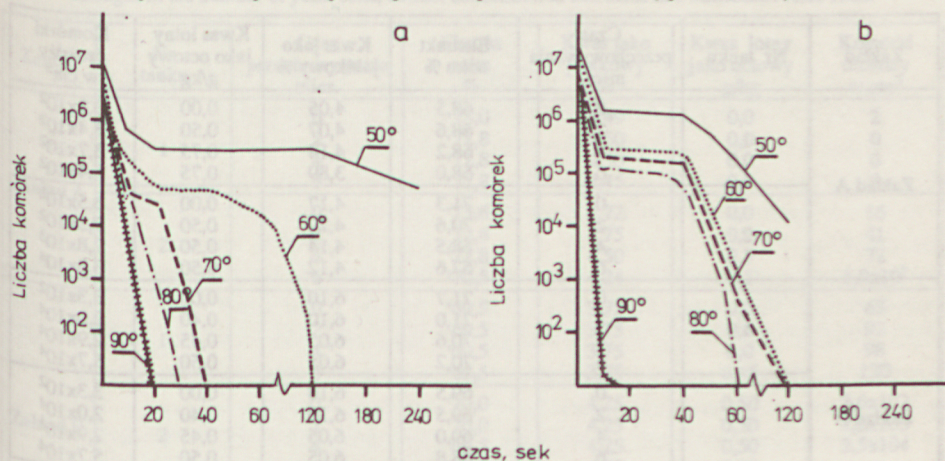
Podobnie zachowywały się te drożdże w temperaturze 90°C, choć czas ich zamierania był w tym przypadku znacznie krótszy niż komórek drożdży *S. florentinus*.

Inaczej reagowały na czynnik termiczny i zawartość ekstraktu w środowisku komórki drożdży *C. sake*, których czas, zamierania był dłuższy w soku zawierającym 12% ekstraktu w temperaturze 90°C w porównaniu do czasu zamierania w soku zawierającym 40% ekstraktu, choć w temperaturze 60°C zachowywały się inaczej. W przypadku tego gatunku drożdży podwyższone stężenie ekstraktu w podłożu potęgowało oddziaływanie niekorzystnej temperatury na żywotność komórek, skracając czas ich zamierania.

W zawiesinach komórek drożdży *S. florentinus* i *K. lactis* podwyższone stężenie ekstraktu w podłożu oddziaływało ochronnie na ich żywotność.

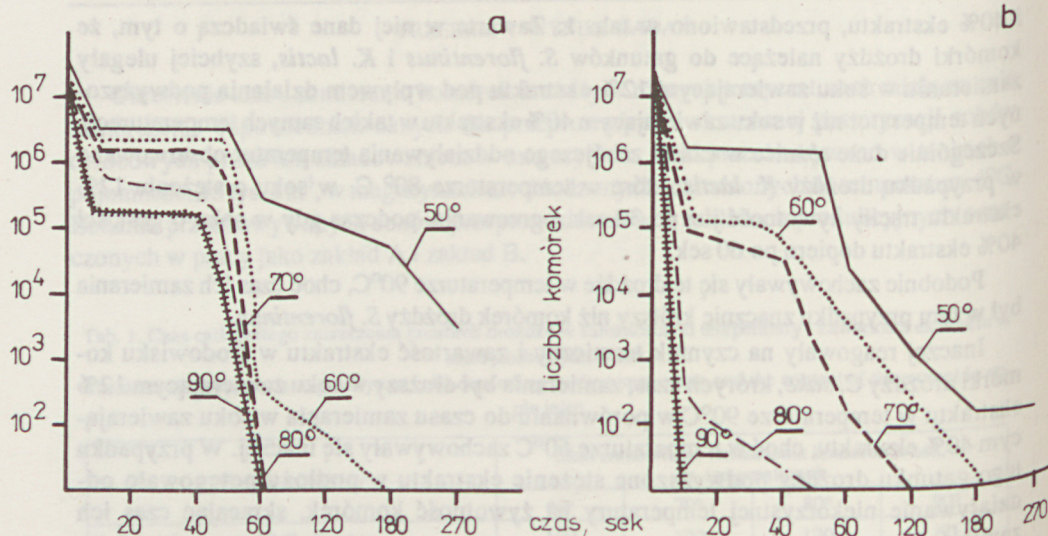
Na ryc. od 1 do 3 przedstawiono dynamikę oddziaływania podwyższonych temperatur na przeżywalność komórek badanych drożdży w sokach zagęszczonych i niezagęszczonych.

Liczba żywych komórek drożdży *S. florentinus* w soku niezagęszczonym zmniejszała się w miarę równomiernie, choć w różnym tempie, w zależności od poziomu oddziałującej temperatury. W soku zagęszczonym, w temperaturze od 50° do 90°C po 50 sek. ich oddziaływanie następowało szybkie zamieranie komórek tego gatunku drożdży, oczywiście najintensywniej w temperaturze 90°C (ryc. 1a i 1b).



Ryc. 2. Czas obumierania komórek *K. lactis* w soku zawierającym 12% ekstraktu - a 40% ekstraktu-b

The time of the cells of *K. lactis* in the juice containing 12% of the extract - a 40% of the extract - b



Ryc. 3. Czas obumierania komórek *C. sake* w soku zawierającym 12% ekstraktu - a 40% ekstraktu - b
The time of the decay of the cells of *C. sake* in the juice containing 12% of the extract - a 40% of the extract - b

Drożdże *K. lactis* w soku niezagęszczonym w temperaturze 60°C reagowały podobnie jak drożdże *S. florentinus*, wykazując w temperaturach 80°C i 90°C gwałtowny spadek żywotności komórek. W soku zagęszczonym do 40% ekstraktu dynamika zamierania

Tab. 2. Zmiany liczby komórek drożdży, stężenia ekstraktu i kwasów w soku zagęszczonym podczas przechowywania w magazynie chłodzonym
Changes in the number of yeast cells, extract concentration and acids in the juice concentrated during its storage in a cooled store-room

Zakład	Nr tanku	Czas przechowywania mies.	Ekstrakt soku %	Kwas jako jabłkowy %	Kwas lotny jako octowy g/kg	Komórki drożdży w cm^3
Zakład A	1	0	68,5	4,05	0,00	$3,2 \times 10^2$
		2	68,6	4,07	0,50	$3,4 \times 10^2$
		4	68,2	4,14	0,75	$3,7 \times 10^2$
		6	68,0	3,89	0,75	$5,4 \times 10^2$
	2	0	71,3	4,17	0,00	$6,5 \times 10^2$
		2	70,6	4,20	0,50	$7,3 \times 10^2$
		4	68,5	4,14	0,50	$2,8 \times 10^3$
		6	67,6	4,12	0,50	$3,3 \times 10^4$
Zakład B	1	0	71,7	6,10	0,00	$3,3 \times 10^2$
		2	71,0	6,10	0,40	$2,0 \times 10^4$
		4	70,6	6,05	0,45	$2,9 \times 10^4$
		6	70,2	6,05	0,50	$5,7 \times 10^4$
	2	0	69,5	6,10	0,00	$3,3 \times 10^2$
		2	69,5	6,10	0,40	$2,0 \times 10^4$
		4	69,0	6,05	0,45	$2,9 \times 10^4$
		6	68,8	6,05	0,50	$5,7 \times 10^4$
	3	0	71,1	6,50	0,00	$2,4 \times 10^2$
		2	70,0	6,50	0,45	$2,0 \times 10^4$
		4	69,7	6,45	0,50	$2,7 \times 10^4$
		6	69,5	6,40	0,50	$4,1 \times 10^4$

komórek była także podobna w obu przypadkach za wyjątkiem temperatury 90°C, w której po 10 sek. jej oddziaływania prawie wszystkie komórki drożdży *K. lactis* traciły żywotność, przy czym ich wrażliwość na podwyższone temperatury okazała się około trzykrotnie większa niż *S. florentinus* (ryc. 2a i 2b).

Komórki drożdży *C. sake* w soku zagęszczonym miały dwa krytyczne okresy przy wszystkich poziomach stosowanych temperatur. Już po 10 sek. w temperaturze 90°C następowało całkowite zamieranie komórek, a w 80°C znaczne zmniejszenie liczby żywych komórek aż do utraty żywotności po 40-50 sek. W temperaturze 70°C komórki traciły żywotność dopiero po 120 sek. (ryc. 3b).

W soku niezagęszczonym, w temperaturach 70- 90°C dopiero po 60 sek. wszystkie komórki drożdży *C. sake* były martwe (ryc. 3a i 3b). Natomiast w temperaturze 50°C, niezależnie od stężenia ekstraktu, zachowywały swoją żywotność przez ponad 240 sek., choć w miarę upływu czasu ich liczba malała. Prawdopodobnie, zależało to i od wieku komórek i od osobniczych właściwości.

Zmiany zawartości kwasów zachodzące w sokach w okresie przechowywania przedstawiono w tab. 2 i 3. Soki przechowywane były w zbiornikach o pojemności 15 tys. dm³ w magazynach niechłodzonych i chłodzonych do 6 °C. Skład chemiczny soków i zawartość komórek drożdży badano bezpośrednio po zagęszczeniu i umieszczeniu w tankach, znajdujących się w dwóch różnych zakładach produkcyjnych.

Koncentracja ekstraktu w zagęszczonych sokach przechowywanych w magazynach niechłodzonych, w okresie 6 miesięcy zmniejszyła się o 0,5 do 3,7% w zakładzie A i od 0,7 do 1,6% w zakładzie B.

Wielkość ubytku kwasu jabłkowego również postępowała z upływem czasu przechowywania soku w granicach od 0,05 do 0,49%, przy czym były one zbliżone w obu zakładach (tab. 2).

Tab. 3. Zmiany liczby komórek drożdży, stężenia ekstraktu i kwasów w soku zagęszczonym przechowywanym w magazynie niechłodzonym

Changes in the number of yeast cells, extract concentration and acids in a noncooled store-room

Zakład	Nr tanku	Czas przechowywania mics.	Ekstrkt soku %	Kwas jako jabłkowy %	Kwas lotny jako octowy g/kg	Komórki drożdży w cm ³
Zakład A	1	0	73,0	4,49	0,0	2
		2	72,8	4,50	0,0	0
		4	72,8	4,50	0,0	0
		6	72,8	4,45	0,0	0
	2	0	73,6	4,72	0,0	16
		2	72,8	4,75	0,0	41
		4	72,8	4,50	0,5	72
		6	70,5	4,24	0,5	5,9x10 ²
Zakład B	1	0	69,5	3,75	0,0	63
		2	69,5	3,75	0,0	92
		4	69,5	3,75	0,0	98
		6	69,5	3,75	0,45	120
	2	0	70,0	4,25	0,50	3,6x10 ²
		2	70,0	4,25	0,50	2,8x10 ³
		4	69,5	4,25	0,50	2,5x10 ⁴
		6	69,5	4,20	0,50	-
	3	0	73,0	3,40	0,45	4,9x10 ³
		2	73,0	3,40	0,45	-
		4	72,8	3,40	0,45	2,1x10 ⁴
		6	72,8	3,40	0,45	7,8x10 ⁴

W przypadku przechowywania soku zagęszczonego w magazynie chłodzonym do temperatury 6°C koncentracja ekstraktu soku zmniejszyła się średnio o 0,8%, przy czym w Zakładzie A średnio o 1,7%, a w Zakładzie B tylko o 0,25%.

Zawartość kwasu jabłkowego w przechowywanym, chłodzonym soku praktycznie nie uległa zmianie, za wyjątkiem jednego tanku w Zakładzie A, w którym ubyło o 0,48% tego kwasu.

Nie można znaleźć jednak zależności pomiędzy ubytkiem kwasu jabłkowego i wzrostem liczby komórek drożdży w cm³ soków, bowiem w innych tankach, przy podobnym wzroście liczby komórek drożdży, zawartość kwasu jabłkowego pozostała bez zmian (tab. 3). Być może, przyczyną ubytku kwasu jabłkowego w jednym z tanków były drożdże należące do gatunku szczególnie uzdolnionego do rozkładu tego kwasu lub bakterie, których obecności nie badano. Liczba komórek drożdży wzrastała w miarę wydłużania się czasu przechowywania soków w obu typach magazynów. Sądząc po różnej zawartości kwasów w sokach, pochodziły one z różnych partii owoców i zapewne o różnej zdrowotności.

DYSKUSJA

Problem ciepłoporności drożdży w produkcji zagęszczonych soków owocowych ma istotne znaczenie dla ich trwałości. Proces zagęszczania soków zastępuje stosowanie chemicznych konserwantów, likwiduje potrzebę wprowadzania obcych substancji. Technologia tego procesu przewiduje stosowanie obniżonego ciśnienia i temperatury, co chroni sok przed głębszymi zmianami chemicznymi jego składników. Jednakże poziom stosowanych termicznych parametrów zagęszczania kształtuje się powyżej optymalnych dla działalności drożdży, co może być przyczyną zarodnikowania komórek drożdży należących do klasy workowców. Zarodniki drożdży przeżywają proces zagęszczania i pasteryzacji.

H o r u b a ł a (5) w swoich badaniach stwierdził, że zarodniki drożdży zachowywały żywotność nawet po 28 minutach ogrzewania w temperaturze 100°C. Zatem obecność drożdży w zagęszczonych sokach pomimo ich obróbki cieplnej jest możliwa i pozostaje w zgodzie z wynikami naszych badań. Uzasadniają to też wyniki wielu innych badań (1, 5, 7 i 9) dotyczących drożdży osmofilnych. W przypadku drożdży nieosmofilnych, jakimi są *C. sake*, wysokie stężenie ekstraktu obniżyło ich ciepłoporność, co zauważyli i inni (6, 9).

Podczas 6 miesięcznego przechowywania soków występowały przeważnie niewielkie ubytki ekstraktu i w niektórych przypadkach kwasu jabłkowego. Badaniom zmian soków w okresie ich przechowywania poddano pokaźne ich objętości. Zatem soki składowane w poszczególnych tankach pochodziły nie z jednej partii owoców, lecz zapewne z wielu, różniących się pomiędzy sobą jakością, stąd przyrost liczby komórek drożdży był w nich zróżnicowany. Należy jednak podkreślić, że nie badano zmian liczebności komórek bakterii, wśród których mogą występować gatunki uzdolnione do prowadzenia fermentacji mannitowo-mlekowej, w której źródłem węgla i energii jest kwas jabłkowy. Wydaje się że byłoby celowe przeprowadzenie badań również w tym kierunku.

Ogólnie można stwierdzić, że wysokie stężenia ekstraktu i kwasów chroniły przechowywane zagęszczone soki jabłkowe przed istotnymi zmianami przez dość długi okres, choć pewne zmiany w zawartości ekstraktu i kwasów zachodziły w nich w tym czasie.

WNIOSKI

1. Wysokie stężenie ekstraktu soków jabłkowych podwyższało ciepłoodporność drożdży zaliczanych do osmofilnych.
2. Drożdże nieosmofilne pod wpływem działania podwyższonych temperatur, szybciej ginęły w soku o wysokiej koncentracji ekstraktu niż w sokach o niskim jego stężeniu.
3. Wysokie stężenie ekstraktu soków zagęszczonych chroniło je przed istotnymi zmianami podczas 6 miesięcznego przechowywania nawet w magazynach niechłodzonych.
4. Proces zagęszczania soku jabłkowego pozwala skutecznie zastąpić stosowanie konserwantów chemicznych dla utrwalenia tego produktu.
5. W soku jabłkowym do 40% zawartości ekstraktu następuje rozwój drożdży w okresie 6 miesięcznego przechowywania.

Praca złożona 4 IX 1990

PIŚMIENNICTWO

1. Dłużewski M.: Studia nad drożdżami osmofilnymi. Rolnictwo. Technologia Rolno-Spożywcza. 1, 25, 1961.
2. Górecka H., Bujak S.: Osmofilne drożdże zagęszczonych soków jabłkowych. Prace Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż. 23, 1 133, 1973.
3. Górecka H., Bujak A., Kisielewska E.: Wzrost drożdży w podłożach o różnej zawartości ekstraktu, wyosobnionych z zagęszczonego soku jabłkowego. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. E, vol. 38/39, 35, 397, 1983/1984.
4. Górecka K., Bujak S., Targoński Z.: Aktywność fermentacyjna drożdży w sokach jabłkowych o różnym stężeniu ekstraktu. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. E, vol. XL, 40, 29, 297, 1985.
5. Horubała A.: Zagadnienia drobnoustrojów ciepłoodpornych w konserwach owocowych i warzywnych. Warszawa, Zesz. Probl. PAN, 1955.
6. Ingram M.: Comparisons of Different Media for Counting Super Tolerant Yeasts in Concentrated Orange Juice. J. Appl. Bact. 22, 234, 1959.
7. Leveau J.V., Bouix M.: Etude des conditions extremes de croissance des levures osmophiles. Ind. Aliment. Agric. 1147, 1979.
8. Lodder J.: The Yeasts. A Taxonomic Study. North-Holland Publ. Comp. Amsterdam 1970.
9. Schelhorn M.: Untersuchung über das Absterben von Hefen und anderen Mikroorganismen in Substraten von NaCl Cuckergehalt. arch Microb. 25, 39, 1956.

SUMMARY

The yeasts *Saccharomyces florentinus*, *Kluyveromyces lactis* and *Candida sake*, selected from the concentrated apple juice were the objects of research on their heat-resistance in the environment of different concentrations of the extract and the acids. The time of the decay of these yeasts was examined in the temperatures between 50°C and 90°C.

The studies showed that an increase of the concentration of the extract up to 40%, increased heat-resistance of the cells of *S. florentinus* and *K. lactis*, as opposed to *C. sake*, whose resistance to the thermic stimulus grew. After 50 seconds of heating the yeasts in the bed containing 40% of the extract, rapid decay of the yeast cells was observed in the temperatures between 60°C and 90°C.

In the period of 6-months' storage in the tanks of concentrated juices, the extract in the store-rooms dropped by 1,6% /ranging between 0,5 and 3,7%/, and in the store-rooms cooled down to the temperature of 6°C, the drop was by 6°C /ranging between 0 and 3,1%. A loss of the apple acid and a growth of the number of the yeast cells were also observed.