

Kyselina benzoová ako substrát pre rast kvasiniek

JOZEF AUGUSTÍN - DRAHOMÍRA MUNCNEROVÁ
- ELENA SLÁVIKOVÁ - EVA GIBLÁKOVÁ

Súhrn. Prezentujú sa poznatky o vplyve kyseliny benzoovej na metabolizmus 10 kmeňov kvasiniek rodov *Rhodospiridium*, *Rhodotomula* a *Saitoella*. Koncentrácie kyseliny benzoovej 5,0 g.l⁻¹ (40 mmol.l⁻¹) pri pH 5,5 inhibujú respiráciu a rast študovaných kvasiniek. Pri koncentráciách 1,0 g.l⁻¹ (8 mmol.l⁻¹) a pH 5,5 v prítomnosti zdroja dusíka v aeróbných podmienkach kvasinky využívajú kyselinu benzoovú ako zdroj uhlíka a energie, pričom krivka spotreby kyseliny benzoovej sleduje tvar rastovej krivky. Výsledky poukazujú na možnosť výskytu kvasiniek rezistentých voči pôsobeniu tejto konzervačnej látky a ich rozmnožovaniu v aeróbných podmienkach.

Používanie kyseliny benzoovej ako konzervačného prostriedku v potravinárstve má dlhodobú tradíciu. Vďaka svojim antibakteriálnym a antifungálnym účinkom našla široké uplatnenie pri konzervovaní nápojov, džemov a ďalších potravinárskych výrobkov kyslého charakteru [1]. Všeobecne je akceptovaný názor, že mechanizmus antimikrobiálneho účinku spočíva v prenikaní kyseliny benzoovej v nedisociovej forme cez cytoplazmovú membránu a znižovaní intracelulárneho pH, čo má za následok inhibíciu metabolických procesov a rozmnožovania buniek [2]. Citlivosť rôznych mikroorganizmov na inhibičný účinok kyseliny benzoovej je rôzna a súvisí so zložením a morfológiou cytoplazmovej membrány ako i schopnosťou vyrovnávať nepriaznivé zmeny vnútrobunkového pH [3,4].

Prof. Ing. Jozef Augustín, DrSc., Ing. Drahomíra Muncnerová, Ing. Eva Gibláková, Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava., Ing. Elena Sláviková, CSc., Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava.

Warth [5] zistil, že *Zygosaccharomyces bailii* vykazuje výraznú metabolickú aktivitu aj pri koncentráciách kyseliny benzoovej 4 mmol.l⁻¹ (0,5 g.l⁻¹) v médiu pH=3,5. Kvasinka *Z. bailii* rástla v prítomnosti kyseliny benzoovej a akumulovala ju v intracelulárnom priestore vo väčších koncentráciách ako by sa predpokladalo na základe rovnováh protonizovanej a neprotonizovanej formy v prostredí a v intracelulárnom pH. Z toho sa usudzuje, že okrem transportu kyseliny benzoovej v neprotonizovanej forme je potrebné brať do úvahy aj možnosť účasti aniónovej permeability v transportnom mechanizme. Podľa novších poznatkov [5] boli zistené prípady, že sa kyselina benzoová akumulovala v bunkách a spôsobovala výrazný pokles hladiny ATP, pričom nedošlo k výraznejšiemu poklesu hladiny intracelulárneho pH. Z toho vyplýva, že inhibičný účinok bol spôsobený vyčerpaním zdrojov energie, teda ATP a nie zmenou intracelulárneho pH. Iní autori pripisujú inhibičný účinok kyseliny benzoovej inhibícii fosfofruktokinázy ako kľúčového enzýmu metabolizmu spôsobený znížením intracelulárneho pH [6].

Pri uvedených štúdiách sa nebrala do úvahy skutočnosť, že kyselina benzoová rovnako ako ďalšie látky zo skupiny arómatov sú degradované a asimilované pomerne širokým spektrom baktérií, vlákňitých húb a kvasiniek [7]. Takáto metabolická premena kyseliny benzoovej, pri ktorej vznikajú medziprodukty so zníženým alebo žiadnym inhibičným účinkom sa bude podieľať na zvyšovaní rezistencie kvasiniek proti inhibičnému pôsobeniu kyseliny benzoovej a za optimálnych podmienok koncentrácie a pH. Kyselina benzoová môže byť jedným zo substrátov pre rozmnožovanie buniek. V našej práci sme sledovali účinok kyseliny benzoovej na 10 vybraných kvasiniek z rodov *Rhodotorula*, *Rhodosporidium* a *Saitoella*. Ide o kvasinky syntetizujúce karotenoidy, ktorých rodová vlastnosť je dobrá schopnosť využívať uhľovodíky ako jediný zdroj uhlíka a vyznačujúce sa schopnosťou syntézy lipidov. Ako kritérium sme zvolili vplyv na intenzitu respirácie vo zvolenej oblasti pH a koncentrácie kyseliny benzoovej v prítomnosti a v neprítomnosti ďalšieho zdroja uhlíka a energie. Môžu nastať v princípe tri prípady. Ak látka neovplyvňuje intenzitu endogénnej respirácie, neuplatňuje sa inhibičný ani stimulačný efekt. Ak sa pozoruje inhibícia je nutné ju pripísať študovanej látke. Stimulácia respirácie poukazuje na využívanie kyseliny benzoovej ako využiteľného substrátu.

Materiál a metódy

Študované kvasinky *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* a *Saitoella* sú uvedené v tab. 1. Kmene boli uchovávané na sladinovom agare resp. na Czapek-Doxovom agare s prídavkom 0,5 % kvasničného autolyzátu pri 4 °C pod parafínom a preočkovávané v 3-mesačných intervaloch.

K pokusom sa používali kultúry kvasiniek vyrastené do logaritmickkej fázy rastu za aerácie v bankách na trepačke pri 28 °C v polosyntetickom médiu zloženia (g.l⁻¹): (NH₄)₂SO₄ 6,0, KH₂PO₄ 1,0, KCl 0,5, FeSO₄ 0,01, MgSO₄ 0,5, kvasničný autolyzát 5,0, glukóza 30, pH = 5,5. Po 24 hodinách kultivácie sa bunky oddelili odstredením, premyli sa fyziologickým roztokom a rozsuspendovali v minerálnom médiu pH 5,5 na hustotu sušiny bunkovej hmoty 1-1,5 g.l⁻¹. Pri štandardizácii sa vychádzalo z kalibračných závislostí sušina vs. absorbancia pri 620 nm.

Intenzita respirácie sa zisťovala meraním spotreby kyslíka suspenziou kvasiniek Warburgovou manometrickou technikou [8], s použitím štandardných 20 ml nádobiek s plnením: absorbér KOH 4 mol.l⁻¹, hlavný priestor 3,0 ml suspenzie kvasiniek obsahujúci kyselinu benzoovú 8,0 - 40 mmol.l⁻¹. Hodnota pH sa upravovala prídavkom vypočítaného množstva roztoku NaOH.

Rast kultúry bol sledovaný turbidimetricky pri 620 nm a prepočítaný podľa kalibračných závislostí sušina vs. absorbancia.

Spotreba kyseliny benzoovej bola meraná na základe poklesu absorbancie absorbčného maxima 268 nm n-hexánových extraktov kultivačného média zbaveného bunkovej hmoty odstredením a okyselených s kys. fosforečnou na pH 1,0 [9].

Výsledky a diskusia

V predchádzajúcom štúdiu venovanom inhibičnému účinku kys. benzoovej sme zistili, že medzi kvasinkami patriacimi do rodov: *Candida* (5), *Hansenula* (2), *Hypopichia* (2), *Trichosporon* (3), *Saitoella* (1), *Rhodotorula* (6) a *Rhodosporidium* (3) (čísla v zátvorkách - počet študovaných kmeňov) najvyššiu rezistenciu alebo schopnosť rásť v prítomnosti kyseliny benzoovej vykazovali kvasinky patrice do rodov *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* a *Saitoella* [10]. Z tejto skupiny sme pre ďalšie štúdium vybrali 9 zbierkových kmeňov a izolát získaný zo zeminy zne-

Tabuľka 1. Vplyv koncentrácie kyseliny benzoovej na respiráciu kvasiniek.

Minerálne médium pH 5,5 bez ďalšieho zdroja uhlíka.^a

Table 1. Effect of benzoic acid concentration on yeast respiration.

Mineral medium pH 5,5 without other source of carbon.^a

KULTÚRA ¹	KONTROLA ² Q(O ₂)	RESPIRAČNÁ AKTIVITA ³ [% kontroly] kyselina benzoová		
	[μl.h ⁻¹ ml ⁻¹]	8 mmol.l ⁻¹	12 mmol.l ⁻¹	40 mmol.l ⁻¹
<i>R.gracilis</i> CCY 20-8-9	384	118	60	0
<i>Rh.toruloides</i> CCY 62-2-4	293	105	35	0
<i>R.nubra</i> CCY 20-7-2	226	100	23	0
<i>Rh.diobovatum</i> CCY 62-5-2	334	112	60	0
<i>S.complicata</i> CCY 8-1-1	280	114	43	0
<i>Rh.sphaerocarpum</i> CCY 62-3-8	323	113	41	0
<i>R.glutinis</i> CCY 20-2-12	334	113	43	0
<i>R.glutinis</i> RIVE 14-1-1	300	118	50	0
<i>R.glutinis</i> ^b	385	150	92	0
<i>R.aurantiaca</i> CCY 20-9-1	296	118	33	0

a - Zloženia média [g.l⁻¹]: (NH₄)₂SO₄ 6,0, KH₂PO₄ 13,8, KCl 0,5, MgSO₄ 0,5, FeSO₄ 0,01.,

b - Izolát získaný v tejto práci nahromaďovacou kultiváciou zo zeminy znečistenej ropnými uhľovodíkmi.

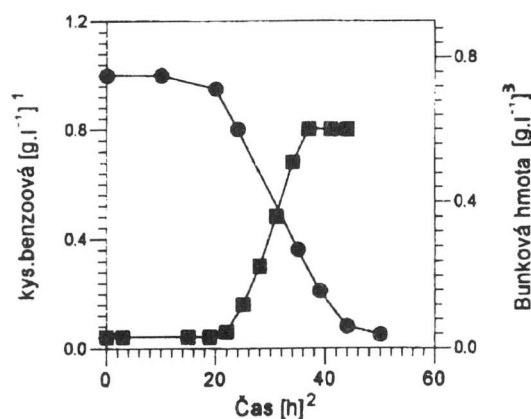
1 - Culture, 2 - Control, 3 - Respiratory activity [% of control], Benzoic acid, a - medium composition [g.l⁻¹]: (NH₄)₂SO₄ 6,0, KH₂PO₄ 13,8, KCl 0,5, MgSO₄ 0,5, FeSO₄ 0,01., b - isolation yeald obtained in this work by accumulating cultivation from soil polluted by crude oil hydrocarbons.

čistenej ropnými produktami nahromaďovacou kultiváciou na pôde s benzoátom ako zdrojom uhlíka. Pri systematickom určení sa ukázalo, že opäť ide o druh *Rhodotorula glutinis*. Zistili sme, že kyselina benzoová 40 mmol.l⁻¹ (5,0 g.l⁻¹) pri pH 5,5 spôsobuje úplnú inhibíciu endogénnej respirácie a respirácie na glukóze všetkých študovaných kmeňov kvasiniek (tab.1.). Koncentrácia 12 mmol.l⁻¹ (1,5 g.l⁻¹) pri pH 5,5 spôsobovala čiastočnú inhibíciu respirácie, pričom pri tejto koncentrácii je možné pozorovať rozdiely v citlivosti rôznych kvasiniek. Pri koncentrácii 8 mmol.l⁻¹ (1 g.l⁻¹) kyselina benzoová vyvolávala stimuláciu endogénnej

respirácie (s výnimkou *R. rubra*), čo by bolo možné vysvetliť buď stimulačným účinkom inhibítora pri nízkej koncentrácii alebo využitím látky ako zdroja uhlíka a energie. Paralelné pokusy so sledovaním rastu na médiu rovnakého zloženia ukázali, že študované kvasinky sú schopné rásť na benzoátových pôdach, pričom spotreba benzoátu je proporcionálna ku nárastu bunkovej hmoty (obr.1.). Z uvedeného pokusu vyplýva, že kvasinky syntetizujúce karotenoidné pigmenty majú enzýmy, ktoré štiepia aromatické jadro a tým znižujú inhibičný účinok kyseliny benzoovej.

Z výsledkov v tab.1. je zrejmé, že zvyšovanie rýchlosti respirácie kvasiniek vplyvom kyseliny benzoovej za daných podmienok (8 mmol.l^{-1} , $\text{pH} = 5,5$) stúpa v poradí: *Rhodotorula rubra* CCY 20-7-2, *Rhodosporidium toruloides* CCY 62-2-4, *Rhodosporidium diobovatum* CCY 62-5-2, *Rhodosporidium sphaerocarpum* CCY 62-3-8, *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-12, *Rhodotorula gracilis* CCY 20-8-9, *Saitoella complicata* CCY 8-1-1, *Rhodotorula glutinis* RIV 14-1-1, *Rhodotorula aurantiaca* CCY 20-9-1 a *Rhodotorula glutinis* (Izolát).

Sú známe kvasinky, ktoré sú proti pôsobeniu kyseliny benzoovej značne rezistenté. Warth [5] opisuje *Zygosaccharomyces bailli*, ktorá vykazovala výraznú metabolickú aktivitu pri koncentrácii 4 mmol.l^{-1} ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$) kyseliny benzoovej pri $\text{pH}=3,5$, pri koncentrácii 10 mmol.l^{-1}



Obr.1. Rast *Rhodotorula glutinis* a spotreba kyseliny benzoovej pri kultivácii v kvapalnom médiu $\text{pH} 5,5$ za aerácie pri 28°C . Syntetické minerálne médium $[\text{g.l}^{-1}]$: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6,0, KH_2PO_4 1, KCl 0,5, MgSO_4 0,5, FeSO_4 0,01.

Fig.1. *Rhodotorula glutinis* growth and benzoic acid consumption during cultivation in liquid medium $\text{pH} 5,5$, and aeration at 28°C . Synthetic mineral medium $[\text{g.l}^{-1}]$: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6,0, KH_2PO_4 1, KCl 0,5, MgSO_4 0,5, FeSO_4 0,01.

1 - Benzoic acid, 2 - Time, 3 - Cell mass.

(1,25 g.l⁻¹) pri tom istom pH sa pozoroval už výrazný inhibičný účinok. Do akej miery je možné znížiť citlivosť kvasinky na kyselinu benzoovú napr. pasážovaním vo vhodných médiách alebo prídavkom ďalších substrátov nie je známe. Je však veľmi pravdepodobné, že sa takýto efekt dá dosiahnuť buď na princípe zvýšenia metabolickej rýchlosti odbúravania kyseliny benzoovej v bunke (využívanie kyseliny benzoovej ako substrátu) alebo ovplyvnením zloženia a vlastností cytoplazmatickej membrány. K takémuto predpokladu ovprávaňuje analógia zo zvyšovania rezistencie kvasiniek na zvýšenú koncentráciu etanolu, ktorá sa dá dosiahnuť napr. zmenou v lipidovom zložení membrán alebo prídavkom ochranných látok do kultivačného média [11].

Z našich výsledkov vyplýva, že kvasinky syntetizujúce karotenoidy majú zvýšenú rezistenciu voči kyseline benzoovej a sú schopné degradovať kyselinu benzoovú, čo sa prejavuje rastom kultúry a úbytkom kyseliny benzoovej z kultivačných médií. Uvedené kvasinky sú ubikvotné a mohli by sa pomnožovať v potravinách konzervovaných kyselinou benzoovou v prípade, že by nastali podmienky pre utilizáciu kyseliny benzoovej (teplota, pH). Keďže v praxi sa kyselina benzoová používa v koncentráciách (1-2 g.kg⁻¹), je dôležité sledovať hodnoty extracelulárneho pH. Prvé výsledky našich pokusov naznačujú, že posun pH do mierne alkalických oblastí podstatne znižuje inhibičný účinok kyseliny benzoovej, ktorá sa ako jediný zdroj uhlíka stáva vhodným substrátom pre kvasinky patriace do viacerých rodov (nepublikované dáta).

Z hľadiska využívania kyseliny benzoovej ako konzervačného činidla i z hľadiska teoretického štúdia je pozoruhodné zistenie, že koncentračné rozmedzie, kedy sa kyselina benzoová mení z látky inhibičného charakteru na látku uplatňujúcu sa ako substrát pre rast niektorých kvasiniek, je pomerne úzke, približne v rozsahu jedného dekadického poriadku. V oblasti hodnôt ID₅₀ sa kyselina benzoová správa ako substrát s inhibičnými vlastnosťami umožňujúci rast kvasiniek, čím sa súčasne znižuje aj konzervačný efekt.

Literatúra

1. BALATSOURAS, G.D. - POLYMENACOS, N.G.: J. Food Sci., 28, 1963, s. 267.
2. AUGUSTÍN, J. - MUNCNEROVÁ, D.: Konferencia "Aditívne látky v potravinách", Nitra, Zborník abstraktov, 1993, s. 50.
3. WARTH, A.D.: J. Appl. Bacteriol., 43, 1987, s. 215.

4. WARTH, A.D.: J. Food Microbiol., 3, s. 263.
5. WARTH, A.D.: Appl. Environ. Microbiol., 54, 1988, s. 2091.
6. KREBS, H.A.D. - WIGGINS, D. - STABBS, M. - SOLS, A. - REDOYA, F.: Biochem. J., 214, 1983, s. 657.
7. WRIGHT, J.D.: World J. Microbiol. Biotechnol., 9, 1993, s. 9.
8. KLEIZELLER, A. - MÁLEK, J. - VRBA, R.: Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii, SNTL, Praha 1954
9. SUTHERLAND, J.B. - CRAWFORD, D.L. - POMETTO, A.L.: Appl. Environ. Microbiol. 41, 1981, s. 442.
10. MUNCNEROVÁ, D. - AUGUSTÍN, J.: Konferencia "Aditivné látky v potravínach", Nitra, Zborník abstraktov, 1993, s. 152.
11. JONES, R.P. - GREENFIELD, P.P.: Microbiol. Technol., 9, 1987, s. 334.

Do redakcie došlo 27.1.1994.

Benzoic acid as a substrate for a growth of yeast

Summary

Knowledge about an influence benzoic acid has on metabolism of 10 strains of yeasts of *Rhodospiridium*, *Rhodotomula* and *Saitoella* genes are presented. Concentration of benzoic acid of 5.0 g.l⁻¹ (40 mmol.l⁻¹) at pH 5.5 inhibit a respiration and growth of studied yeasts. At the concentrations of 1.0 g.l⁻¹ (8 mmol.l⁻¹) and pH 5.5 in the presence of N₂ resource and under aerobic conditions, yeasts use benzoic acid as a source of carbon and energy. As a result of it a curve for the consumption of benzoic acid has an ascending trend. The results achieved point out the possibilities for existence of yeasts resistant again the effects of such preservative and prove their propagation under aerobic conditions.