

# KVANTITATÍVNA CHARAKTERIZÁCIA TOLERANCIE *CANDIDA MALTOSA* YP1 VOČI BENZOANU SODNÉMU

## QUANTITATIVE CHARACTERIZATION OF THE TOLERANCE OF *CANDIDA MALTOSA* YP1 AGAINST SODIUM BENZOATE

*D. Liptáková, E. Valík, B. Bajúsová*

**Abstract:** The aim of our study was to characterize the effect of sodium benzoate on *Candida maltosa* YP1 growth in glucose solution with yeast extract. The concentration of sodium benzoate were ranged from 0.0; 0.015; 0.03; 0.05; 0.068; 0.08 to 0.1 % (w/v) at the temperatures of 8, 12, 16 a 25 ± 0.5 °C. The strong inhibitory effect of sodium benzoate on the yeast contaminant growth was determined at low temperatures as 12 and 8 °C. The significant decline of number microbial cells followed by direct transition to exponential growth phase was observed during lag-phase at higher temperatures of 12, 16 and 25 °C and concentration of benzoate 0.015 to 0.05 % (w/v). The combined effect of temperature and sodium benzoate concentrations on growth rate of *Candida maltosa* was described by surface response methodology and represented with following equation:  $\mu = -0.082 + 0.014 \times T - 4.10^{-5} \times c_{\text{benz}} - 3.10^{-6} \times T \times c_{\text{benz}}$  ( $R^2 = 0.916$ ).

**Key words:** *Candida maltosa* YP1, acidotolerancia, prediktívna mikrobiológia

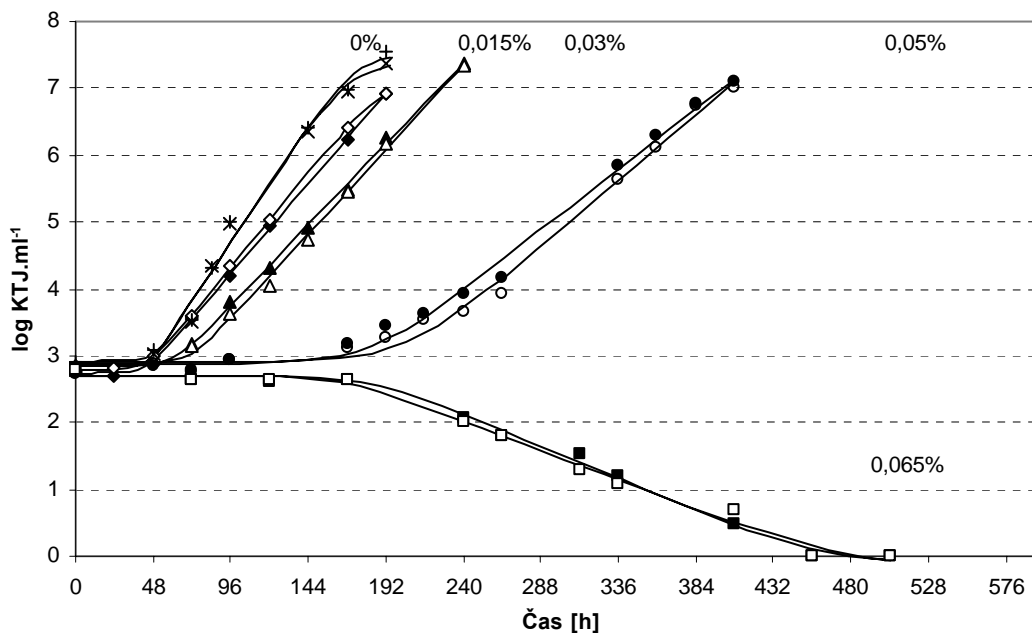
Kvasinka *Candida maltosa* patrí do taxonomickej skupiny anamorfných foriem askogénnych kvasiniek (Kasúske a kol., 1992). *C. maltosa* je schopná využívať n-alkány ako zdroj uhlíka a energie, predovšetkým s počtom uhlíkov 10 a 14 (Schmitz a kol., 2000). Dobre známa je jej chemorezistencia (Kurtz a Crow, 1997), rezistencia voči antibiotikám, napr. cykloheximidu (Delneri a kol., 2000), organickým kyselinám a zvýšeným teplotám (Lauková a kol., 2002a,b). Významnou vlastnosťou *C. maltosa* z pohľadu potravinárskej praxe je jej schopnosť aktívne sa podieľať na tvorbe biofilmov na plochách technologických zariadení (Jirků, Masák a Čejková, 2001).

Cieľom našej štúdie bolo sledovať dynamiku rastu nami izolovanej, psychrotrofnej a termorezistentnej kvasinky *C. maltosa* v glukózových roztokoch s kvasničným extraktom v závislosti od prídavku benzoanu sodného (0,0; 0,015; 0,03; 0,05; 0,068; 0,08 až 0,1 % (w/v)) pri teplote uchovávania 8, 12, 16 a 25 ± 0,5 °C.

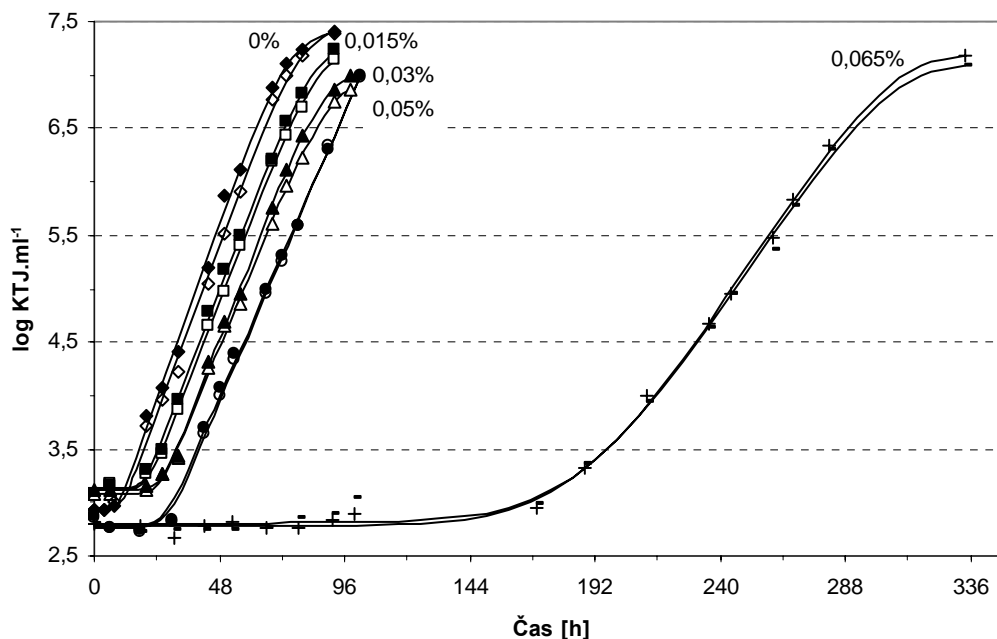
Z grafických znázornení dynamiky rastu *C. maltosa* YP1 v modelových kultivačných médiách (obr. 1 až 4) je vidieť, že vplyv benzoanu sodného sa na raste kvasinky významnejšie prejavil najmä pri nižších teplotách 12 a 8 °C. Napríklad už najnižšia koncentrácia benzoanu sodného, 0,015 % w/v, spôsobila zníženie rastovej rýchlosti *C. maltosa* YP1 o 22 % pri teplote 8 °C v porovnaní s kontrolnou vzorkou bez benzoanu sodného. Ďalšie zvýšenie obsahu benzoanu sodného v modelovom prostredí zapríčinilo pokles rastovej rýchlosti kvasinky o 31 % (0,03 %) a o 47 % (0,05 %). V prostredí s maximálne aplikovanou koncentráciou chemickej konzervačnej látky (0,065 %) sme rast *C. maltosa* pri spolupôsobení teploty 8 °C nepozorovali. Po 7 d uchovávaní glukózových roztokov v termostate došlo k postupnému odumieraniu živých buniek *C. maltosa* YP1 z počiatočnej priemernej koncentrácie 500 KTJ.ml<sup>-1</sup> na konečnú hodnotu 10 KTJ.ml<sup>-1</sup> rýchlosťou -0,010 h<sup>-1</sup>.

Obr. 1: Dynamika rastu *C. maltosa* YP1 v modelovom kultivačnom médiu v závislosti od koncentrácie benzoanu sodného pri teplote 8 °C.

Pri teplote 12 °C sme v modelovom živnom prostredí obsahujúcom 0,05 % benzoanu sodného po 6 hodinách kultivácie zaznamenali aj známy jav, že z počiatku v lag-fáze



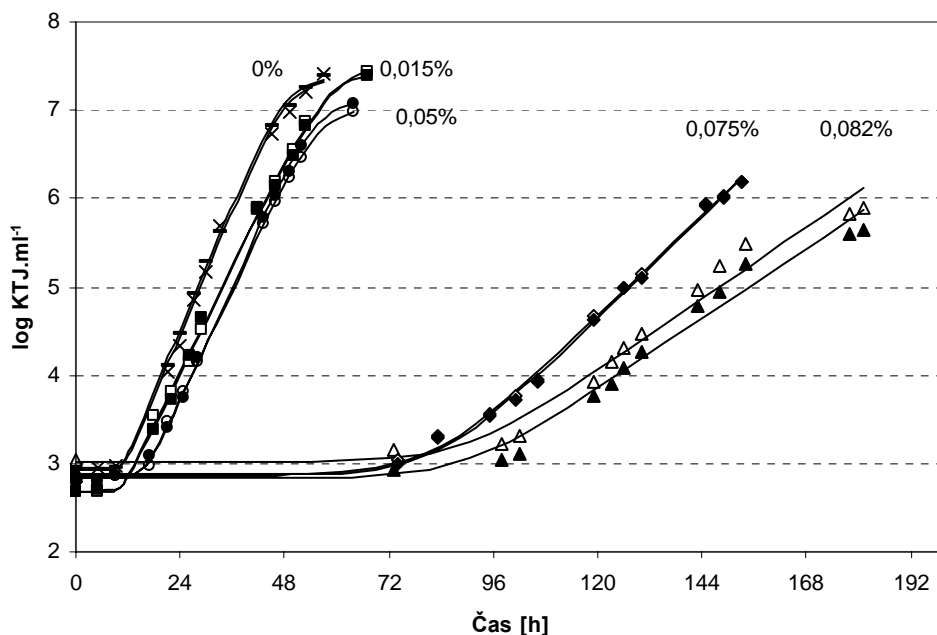
dochádzalo k úbytku stanoviteľných buniek, čo sme pozorovali aj v inej práci (Lauková a kol., 2003). Po 30 hodinách sa však počet *C. maltosa* YP1 stanovený ako KTJ.ml<sup>-1</sup> takmer vyrovnal počiatočnej denzite a kvasinka začala exponenciálne rásť.



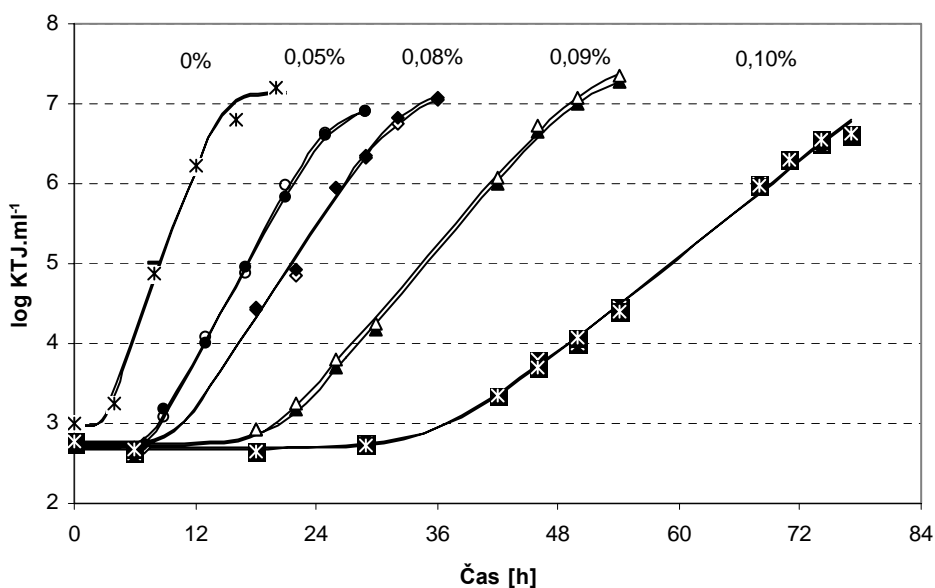
Obr. 2: Dynamika rastu *C. maltosa* YP1 v modelovom kultivačnom médiu v závislosti od koncentrácie benzoanu sodného pri teplote 12 °C.

Podobný mikrobicídny efekt benzoanu sodného sme pozorovali aj pri teplotách 16 a 25 °C, pričom koncentrácia aplikovanej konzervačnej látky spôsobujúca prvočné odumieranie buniek kvasinky v lag-fáze sa pohybovala už v koncentracii od 0,015 do 0,03 % (w/v). Pri teplotách 16 a 25 °C bola významnejšia inhibícia dynamiky rastu *C. maltosa* YP1 zaznamenaná až pri vyšších koncentráciách benzoanu sodného (0,08 až 0,1 %).

Kolísanie počtu životaschopných buniek počas lag-fázy rastu je možné vysvetliť acidoregulačným mechanizmom mikroorganizmov, ktorým sa bunky prispôbujú vonkajšiemu prostrediu, v tomto prípade prítomnosti slabej kyseliny s výrazným konzervačným účinkom. Pri tomto procese časť buniek z populácie odumiera a časť sa prispôbi. Bunky, ktoré sa dokážu prispôbiť takémuto prostrediu, udržia si intracelulárne pH v neutrálnej až mierne kyslej oblasti. Acidoregulačný proces sa uskutočňuje prostredníctvom enzýmu H<sup>+</sup>-ATPáza lokalizovanom na plazmatickej membráne (Henriques a kol., 1997; Portillo, 2000; Loureiro, 2000). Tento enzým slúži ako protónová pumpa, ktorá vytláča protóny z cytosolu buniek do vonkajšieho prostredia, a tým sa udržuje homeostáza v kyslom prostredí. Anióny slabých organických kyselín sú následne transportované prostredníctvom plazmatickej pumpy PDR12 do extracelulárneho prostredia, čím sa zamedzí ich intracelulárnej akumulácii a cytotoxickému pôsobeniu (Piper a kol., 2001; Hazan a kol., 2004; Jungwirth a Kuchler, 2006).



Obr. 3: Dynamika rastu *C. maltosa* YP1 v modelových živných médiách v závislosti od koncentrácie benzoanu sodného pri teplote 16 °C.



Obr. 4: Dynamika rastu *C. maltosa* YP1 v modelových živných médiách v závislosti od koncentrácie benzoanu sodného pri teplote 25 °C.

Rastové parametre kvasinky *C. maltosa* YP1 získané analýzou rastových čiar použitím primárneho Baranyiho modelu boli matematicky transformované vo vzťahu k prídavkom benzoanu sodného a teploty kultivácie. Matematické závislosti uvedené v tabuľke 1 poukazujú na skutočnosť, že so zvyšujúcou sa koncentráciou benzoanu sodného a znižujúcou sa teplotou uchovávanania sa dĺžka fázy prispôsobovania sa kvasinky zmeneným podmienkam v prostredí predlžovala a hodnota rastovej rýchlosti

sa znižovala. Obe závislosti boli zákonité a vysoko významné, čo je zreteľné z vysokých korelačných koeficientov ( $R_{\mu}^2 = 0,916$  and  $R_{\lambda}^2 = 0,842$ ).

Tabuľka 1: Matematické závislosti rastovej rýchlosti a lag-fázy od koncentrácie benzoanu sodného a teploty.

Rastový parameter	Rovnica	R <sup>2</sup>
Rastová rýchlosť [h <sup>-1</sup> ]	$\mu = -0,082 + 0,014 \times T - 4,10^{-5} \times c_{\text{Benz}} - 3,10^{-6} \times T \times c_{\text{Benz}}$	0,916
Lag-fáza [h]	$\lambda^{-1} = -0,04778 + 0,00956 \times T - 2,6,10^{-5} \times c_{\text{Benz}} - 4,4,10^{-6} \times T \times c_{\text{Benz}}$	0,842

## ZÁVER

Testovaný kmeň *Candida maltosa* YP1 pôvodne izolovaný zo znehodnotených jogurtových krémov (Lauková a kol., 2002a) sa vyznačuje zvýšenou termorezistenciou a acidotoleranciou nielen voči kyseline mliečnej ale i benzoanu sodnému. V modelových bujónoch obsahujúcich 0,05 % benzoanu sodného pri hodnote pH= 4,2 by kvasinka potrebovala na zvýšenie svojej koncentrácie z počiatočnej denzity  $N_0 = 1$  KTJ.ml<sup>-1</sup> na koncentráciu 1.10<sup>6</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup> 22 dní pri teplote 8 °C, pri 12 °C by to už bolo len 6 dní, pri 25 °C 31 hodín. Avšak ak berieme do úvahy, že doba trvanlivosti majonézových krémov deklarovaná väčšinou výrobcov je 4 až 6 mesiacov pri teplote 8 až 15 °C a podľa Potravinového kódexu SR je maximálne prípustná koncentrácia benzoanu 0,05 %, na dosiahnutie koncentrácie kvasiniek 1.10<sup>3</sup> KTJ.g<sup>-1</sup> pri počiatočnej denzite  $N_0 = 1$  KTJ.g<sup>-1</sup> a teplote 8 °C by bolo potrebných len 15 dní. Dôležitým faktorom je aj absorpcia určitého podielu konzervačnej látky v tukovej fáze emulzií, čím sa zníži jej koncentrácia vo vodnej fáze, takže možno predpokladať, že čas potrebný na dosiahnutie hygienického limitu by sa v emulznom systéme ešte skrátil.

## LITERATÚRA

1. Delneri, D.- Tomlin, G.C.- Wixon, J.L.- Hutter, A.- Sefton, M.- Louis, E.J.- Oliver, S.G. 2000. Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-loxP system. *Gene*, 252, 2000, s. 127-135.
2. Hazan, H. – Levine, A. – Abeliovich, H. 2004. Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, roč. 70, 2004, č. 8, s. 4449-4457.
3. Henriques, M. – Quintas, C. – Loureiro-Dias, M.C. 1997. Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism. *Microbiology*, roč. 143, 1997, č. 6, s. 1877-1883.
4. Jirků, V.- Masák, J.- Čejková, A. 2001. Significance of physical attachment of fungi for bio-treatment of water. *Microbiol. Res.*, 156, 2001, s. 383-386.
5. Jungwirth, H. – Kuchler, K. 2006. Yeast ABC transporters- a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Letters*, roč. 580, 2006, s. 1131-1138.
6. Kasúske, A.-Wedler, H.-Schulze, S.- Becher, D. 1992. Efficient electropulse transformation of intact *Candida maltosa* cells by different homologous vector plasmids. *Yeast*, 8, 1992, s. 691-697.
7. Kurtz, A.M.- Crow, S.A. 1997. Transformation of chlororesorcinol by the hydrocarbonoclastic yeasts *Candida maltosa*, *Candida tropicalis*, and *Trichosporon oivide*. *Curr. Microbiol.*, 35, 1997, s. 165-168.
8. Lauková, D.- Valík, E.- Görner, F.- Schmidt Š. 2002a. Kvantitatívna analýza vplyvu kyseliny mliečnej na rast kvasinky *Candida maltosa*. *Bull. Food Res.*, 41, 2002a, s. 131-143.
9. Lauková, D.- Valík, E.- Görner, F.- Schmidt Š. 2002b. Termorezistencia vegetatívnych buniek kvasinky *Candida maltosa*. *Bull. Food Res.*, 41, 2002b, s. 169-178.
10. Lauková, D.- Valík, E.- Görner, F. 2003. Effect of lactic acid on the growth dynamics of *Candida maltosa* YP1. *Czech Journal of Food Sciences*, 21, 2003, č. 2, s. 43-49.
11. Loureiro, V. 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*, roč. 33, 2000, č. 3-4, s. 247-256.

12. Piper, P. – Alderson, C.O. – Hatzixanthis, K. – Mollapour, M. 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, roč. 147, 2001, č. 10, s. 2635-2642.
13. Portillo, F. 2000. Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, roč. 1469, 2000, s. 31-42.
14. Schmitz, C.-Goebel, I.-Wagner, S.-Vomberg, A.-Klinner, U. 2000. Competition between  $\alpha$ -alkane-assimilating yeasts and bacteria during colonization of sandy soil microcosms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 2000, s. 126-132.

*Kontaktná adresa:*

Ing. Denisa Liptáková PhD., Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.