

Afslutningsrapport

Identifikation og karakterisering af gær og
gærlignende organismer i mejeriprodukter

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1998-18

August 1998



mejeriforeningen

danish dairy board

Identifikation og karakterisering af gær og gærlignende organismer i mejeri produkter

Medarbejdere:

Lektor Ole Filtenborg, Institut for Bioteknologi, Bygning 221, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby (Projektleder). Tlf. 4525 2620. FAX 4588 4922

Ph.D. Signe Westall, Institut for Bioteknologi, Bygning 221, Danmarks Tekniske Universitet, 2800 Lyngby. Tlf. 4525 2729. FAX 45884922

Førord:

Projektets medarbejdere vil gerne takke Mejeriforeningen og Statens Teknisk Videnskabelige Forskningsråd for økonomisk støtte til projektet. Vi vil endvidere takke ansatte på de involverede mejerier for velvilje, interesse og opbakning af projektet.

Resumé (dansk):

Projektet har resulteret i ny viden vedrørende den associerede gær flora i Feta ost og dekorerede flødeoste. Den associerede flora var produkt specifik men der blev også registreret store forskelle i gær floraen fra mejeri til mejeri. Kun ganske få gær arter havde en beviselig kvalitets forringende indflydelse på Feta ost, mens et bredere udsnit af arter var i stand til at ødelægge de undersøgte flødeoste. Det blev under projektet vist, at indpakning af flødeostene i modificeret atmosfære ikke kunne hindre vækst af fermenterende gær arter. En simpel metode baseret på modifikationer af osten blev derfor udviklet til detektion af fermenterende gær arter. Denne metode kan også med fordel benyttes til kvalitetskontrol af dekorations materialer. En metode til differentiering og identifikation af gær baseret på dannelsen af flygtige metabolitter blev udviklet og viste sig at være velegnet til differentiering mellem forskellige gær arter associeret med de undersøgte oste typer, men metoden kan også med fordel bruges ved undersøgelse af andre typer levnedsmidler. Metoden kan bruges til løbende kvalitetskontrol og vil lette fremtidigt identifikations arbejde betydeligt.

English summary:

The project has provided new knowledge about the associated yeast flora of Feta cheese and decorated soft cheese. The associated flora proved to be product specific however major differences were observed in the yeast flora associated with different dairies. Only very few yeast species caused spoilage of Feta cheese, while a broader range of species was able to cause deterioration of the soft cheese. It was shown that packaging in modified atmosphere can not be relied on as a method of preventing growth of fermenting yeast species. A method based on simple modifications of the cheese was therefore developed for the detection of fermenting species. This method is also a useful tool in routine quality control of the decoration materials. A method based on the profile of volatile metabolites was developed for differentiation and identification of yeast species. This method proved useful for the differentiation between different yeast species associated with the examined cheese products as well as differentiation between yeast species associated with other food products. The developed method can be incorporated as part of routine quality control procedures and will reduce the amount of work involved in future identifications considerably.

Formål:

At identificere og karakterisere de gær arter, der forårsager kvalitets forringelse af oste, samt at udvikle simple og hurtige metoder til tidlig registrering og identifikation af produkt ødelæggende gærarter.

Baggrund:

Gær vækst udgør en væsentlig holdbarhedsbegrænsende faktor for mange oste produkter. Gær vækst viser sig oftest ved pustning af emballagen (bompage) forårsaget af kraftig CO₂ dannelse fra fermenterende gær arter. Alternativt kan gær forringelse vise sig ved synlig vækst på overfladen af produktet samt ved ændringer af ostens smag, lugt og konsistens.

En væsentlig hindring for effektiv gær bekæmpelse er, at der traditionelt har været fokuseret på bakterie og skimmelsvampe vækst pga. disse organismers mulige patogene virkninger. Derfor findes der i litteraturen kun ganske få referencer, der omhandler kvalitetsforringelse af oste som følge af gær vækst. En forudsætning for at kunne bekæmpe kvalitetsforringende gær er et indgående kendskab til gær floraen i produkterne og produktions miljøet, samt viden om disse gær arters fysiologiske egenskaber.

En anden væsentlig hindring er vanskelighederne med at skelne mellem forskellige gær arter - herunder differentiering mellem harmløse og produkt ødelæggende arter idet traditionel gær identifikation er en meget langsommelig procedure, der forudsætter en stor del erfaring.

Endelig forudsætter effektiv gær bekæmpelse udvikling af forbedrede metoder til tidlig registrering af gær forekomst, idet start koncentrationen af gær i oste ofte er så lav, at gæren ikke kan detekteres ved de almindelig anvendte kim tællings metoder. Først efter længere tids modning og opbevaring af osten kan gær vækst registreres.

Resultater:

1. Gær forekomst i oste.

Den associerede gær flora i 3 forskellige oste typer blev bestemt. Feta ost og dekoreret flødeost pakket i modificeret atmosfære blev undersøgt, idet det var kendt, at gær udgjorde den væsentligste holdbarhedsbegrænsende faktor for disse produkter. Gær forekomsten i kitmodnede Danbo oste blev undersøgt for at afgøre om pasteurisering af den anvendte saltlage havde afgørende indflydelse på gær forekomsten i den modnende og færdige ost.

Overraskende viste undersøgelserne, at den associerede gær flora varierede kraftigt fra mejeri til mejeri samt mellem de forskellige oste typer. Endvidere var det overraskende, at undersøgelserne viste, at de laktose fermenterende gær arter *Kluyveromyces lactis* og *Kluyveromyces marxianus* ikke var årsag til kvalitets forringelse i nogen af de undersøgte oste.

1.1 Gær forekomst i traditionel feta ost.

Gær forekomsten i feta ost fra 3 mejerier blev undersøgt, heraf blev ost fra 2 mejerier løbende undersøgt gennem et år. Forekomsten af fundne gær arter er vist i Tabel 1. Som forventet var gær forekomsten i frisk ost lav/ikke målelig, mens samtlige undersøgte oste på ca. 8 uger indeholdt mellem 10^5 og 10^8 gær/g.

Tabel 1. Forekomst og koncentration af gær i Feta ost.

	Koncentration cfu/g	Mejeri		
		A	B	C
<i>Candida boidinii</i>	10 ⁴ -10 ⁶	8 ^{*)}	-	-
<i>Candida butyri</i>	10 ³ -10 ⁵	-	-	50
<i>Candida intermedia</i>	10 ⁴	15	-	-
<i>Candida sake</i>	10 ⁵ -10 ⁶	-	63	-
<i>Candida zeylanoides</i>	10 ³ -10 ⁵	2	3	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	10 ³ -10 ⁶	8	88	27
<i>Geotrichum candidum</i>	10 ² -10 ⁴	32	18	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	10 ⁴ -10 ⁵	9	12	9
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	10 ⁴ -10 ⁶	12	40	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	10 ³ -10 ⁵	3	6	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	10 ³ -10 ⁵	5	-	-
<i>Saccharomyces dairensis</i>	10 ³ -10 ⁵	6	-	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	10 ⁵ -10 ⁶	83	1	9
<i>Yarrowia lipolytica</i>	10 ² -10 ⁵	25	75	55
Skimmel svampe	10 ² -10 ³	10	6	9

^{*)} procentdel afprøver fra pågældende mejeri der indeholder denne gær art

Den associerede flora i ost fra Mejeri A viste ingen årstids variation men var konstant gennem hele undersøgelsesperioden. *Torulaspota delbrueckii* var, som det fremgår af Tabel 1, klart dominerende. Koncentrationen af gær i osten var til gengæld højest i sommer halvåret. Gær koncentrationen i ost fra Mejeri B varierede ikke med årstiden. Til gengæld blev der observeret et skift i den associerede flora, idet *Candida sake* kun blev fundet i første halvdel af undersøgelses perioden, mens *Kluyveromyces-arteme* overvejende blev fundet i anden halvdel af perioden. *Debaryomyces hansenii* var dog den dominerende gær art i feta ost fra Mejeri B gennem hele perioden.

1.2 Kvalitets forringelse af feta ost.

Kvalitetsforringelse af feta ost fra Mejeri B som følge af gær vækst, manifesterede sig i form af meget kraftig gærlugt. Gær lugten kunne henføres til den høje koncentration af *Debaryomyces hansenii* i osten. *Debaryomyces hansenii* fandtes i stor mængde i produktions miljøet og forringelsen skyldtes efterkontaminering af osten under forarbejdning og pakning.

Kvalitetsforringelse af ost fra Mejeri A viste sig ved bombage. Bombagen var i alle tilfælde forårsaget af en forekomst $>10^6$ cfu/g af *Torulaspota delbrueclidi*. Generelt var der tale om en meget høj forekomst af forskellige gær arter i det omgivende produktionsmiljø, hvorfor forekomsten af *Torulaspota delbrueckii* formodentlig kan tilskrives efterkontaminering af osten. *Torulaspota delbrueclidi* blev dog aldrig isoleret fra produktions miljøet.

1.3 Gær forekomst i dekoreret flødeost pakket i modificeret atmosfære.

Flødeost der viste tegn på gær vækst, enten som følge af synlig vækst på overfladen eller som følge af bombage af pakningen, blev undersøgt. I Tabel 2 (side 6) er vist, hvilke gær arter der blev fundet i ostene.

Kvalitetsforringelse af ost fra Mejeri A viste sig udelukkende som bombage. Høje koncentrationer $> 10^6$ cfu/g af *Torulaspota delbrueckii* forårsagede bombage i oste i første halvdel af undersøgelsesperioden, mens *Pichia fermentans* forringede osten i sidste halvdel af perioden. Gær forekomsten skyldtes sandsynligvis efterkontaminering, selvom kontaminationskilden ikke kunne bestemmes. Gærforekomsten i produktionsmiljøet var lav og ingen af de pågældende arter blev isoleret herfra.

Ligeledes kunne der ikke findes en sammenhæng mellem den lave gær forekomst i de anvendte dekorations materialer og de gær arter, der forårsagede kvalitetsforringelse af osten.

Tabel 2. Gærforekomst i flødeoste pakket i modificeret atmosfære.

	Mejeri A	Mejeri B
Antal isolater	161	24
<i>Torulaspota delbrueclidi</i>	23.6 ^{*)}	4.2
<i>Candida parapsilosis</i>	16.8	4.2
<i>Pichia fermentans</i>	14.3	4.2
<i>Debaryomyces hansenii</i>	8.7	12.5
<i>Pichia membranaefaciens</i>	8.7	
<i>Pichia norvegensis</i>	8.7	
<i>Pichia guilliermondii</i>	3.1	8.3
<i>Pichia jahdinii</i>	2.5	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1.9	4.2
<i>Pichia anomala</i>	1.2	
<i>Saccharomyces dairensis</i>	1.2	4.2
<i>Candida norvegica</i>	0.6	
<i>Candida rugosa</i>	0.6	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.6	
<i>Rhodotorula minuta</i>		8.3
<i>Saccharomyces unisporus</i>		8.3
<i>Cryptococcus</i> sp.		16.7
<i>Yarrowia lipolytica</i>		20.8
Uidentificerede	7.5	4.2

^{*)} Procentdel af undersøgte isolater fra pågældende mejeri.

Kvalitetsforringelse af oste fra Mejeri B viste sig kun i få tilfælde ved bombage - også her skyldtes gasudviklingen vækst af *Torulaspota delbrueclidi* og *Pichiafermentans*.

Kvalitetsforringelse af hovedparten af ostene fra Mejeri B viste sig ved synlig gærvækst af ikke-fermenterende arter på overfladen af ostene. I disse oste var der en entydig sammenhæng mellem gær fundet i de anvendte dekorationsmaterialer og gær isoleret fra overfladen af ødelagte oste.

1.4 Gærforekomst i kitmodnede Danbo oste.

Undersøgelsen af gær forekomsten i saltlage og på overfladen af kitmodnede Danbo oste produceret med hhv. pasteuriseret og ikke-pasteuriseret saltlage viste, at pasteuriseringen ikke havde nogen indflydelse på gær udviklingen under modningen og på de færdige oste. Ikke-pasteuriseret saltlage indeholdt foruden *Debaryomyces hansenii* kun en meget lille forekomst af andre gær arter. Den anvendte kit samt modnende og færdige oste indeholdt udelukkende *Debaryomyces hansenii*, uanset hvilken saltlage der havde været benyttet ved fremstillingen. Den fuldstændige dominans af *Debaryomyces hansenii* skyldtes, at *Debaryomyces hansenii* var den af de fundne gær arter, der havde absolut størst resistens overfor høje saltkoncentrationer.

2. Gærs tolerance overfor pakning i modificeret atmosfære.

Da pakning i modificeret atmosfære (MAP) i stigende grad anvendes som metode til reduktion og kontrol af mikrobiel vækst, blev MAP's indflydelse på specielt fermenterende gær arter undersøgt. Dette skete bl.a. for at undersøge om en ændring i sammensætningen af atmosfæren, der benyttes til pakning af flødeost, ville resultere i en større grad af hæmning af de kvalitetsforringende arter.

Væksten af de kraftigt fermenterende gær arter *Torulaspora delbrueckii* og *Kluyveromyces lactis* blev som forventet reduceret ved pakning i iltfattig atmosfære. Pakning i atmosfære med et højt CO₂ indhold varierende mellem 20 og 50 v/v% resulterede ikke i en yderligere hæmning. Bombage af ostene viste sig, når gær koncentrationen oversteg 10⁶ cfu/g. Ingen af de anvendte atmosfære sammensætninger var i stand til at hindre, at gæren voksede til denne koncentration. Den ikke-fermenterende art *Debaryomyces hansenii* hæmmedes som forventet af iltfattig atmosfære og ved pakning i MA oversteg koncentrationen af denne art ikke 10⁶ cfu/g. Pakning i modificeret atmosfære kan derfor ikke benyttes til bekæmpelse af fermenterende gær arter. Tværtimod vil MAP pga. hæmningen af den aerobe mikro flora favorisere vækst af fermenterende arter.

Undersøgelsen viste endvidere, at vækst af *T. delbrueckii* resulterede i en meget kraftigere CO₂ udvikling end vækst af *K. lactis* - hvilket forklarede, hvorfor vækst af *K. lactis* ikke forårsagede bombage af feta ost i modsætning til *T. delbrueckii*.

3. Metode til detektion af fermenterende gær arter.

Ved hjælp af simple modifikationer af ostene kunne forekomsten af fermenterende gær arter registreres langt tidligere.

Metode til detektion af fermenterende gær arter.

1. Osten fortyndes 50% med sterilt vand.
2. Ostemassen homogeniseres og overføres til 2 sterile glas flasker, koniske kolber, plastic emballage eller lignende.
3. Evt. anbringes et durham rør i prøverne.
4. Den ene flaske tilsættes 50 ppm chloramphenicol og 50 ppm chlortetracyclin.
5. Prøverne inkuberes ved 25°C og undersøges dagligt for gasdannelse enten i durhamrøret eller direkte i ostemassen jvf. Skema 1.

Skema 1. Skema til aflæsning af prøveresultat.

		50% ostemasse tilsat antibiotika	
		+	-
50% ostemasse	+	Tilstedeværelse af fermenterende gær og evt. også fermenterende bakterier. Forekomst af fermenterende bakterier kan registreres ved mikroskopering af ostemassen uden antibiotika	Tilstedeværelse af fermenterende bakterier. Ingen forekomst af fermenterende gær.
	-	Tilstedeværelse af fermenterende gær samt en stor del aerobe bakterier eller gær. Tilstedeværelse af aerob flora checkes ved mikroskopering af ostemassen uden antibiotika	Ingen fermenterende mikroorganismer tilstede

Vha. den udviklede metode kunne tilstedeværelse af mindre en 10 fermenterende gær celler i osteprøven detekteres indenfor 3-5 dage afhængig af gær art. Ved en foregående sterilisering af ostemassen (vha. opvarmning) kan metoden med fordel benyttes til kvalitetskontrol af anvendte dekorations materialer, idet kun gær eller bakterier, der er i stand til at vokse i osteproduktet, detekteres. Mikroorganismer, der er tilstede i dekorations materialerne, men som ikke er i stand til at forårsage kvalitets forringelse af osteproduktet, registreres ikke.

4. Differentiering og karakterisering af gær ved hjælp af flygtige metabolitter.

Da de fysiologiske og morfologiske test, der udføres ved traditionel gær identifikation, er meget tidskrævende, dyre og vanskelige at udføre og ofte resulterer i identifikationer behæftet med fejl eller stor usikkerhed, blev en metode udviklet til bestemmelse af gærens dannelse af flygtige metabolitter.

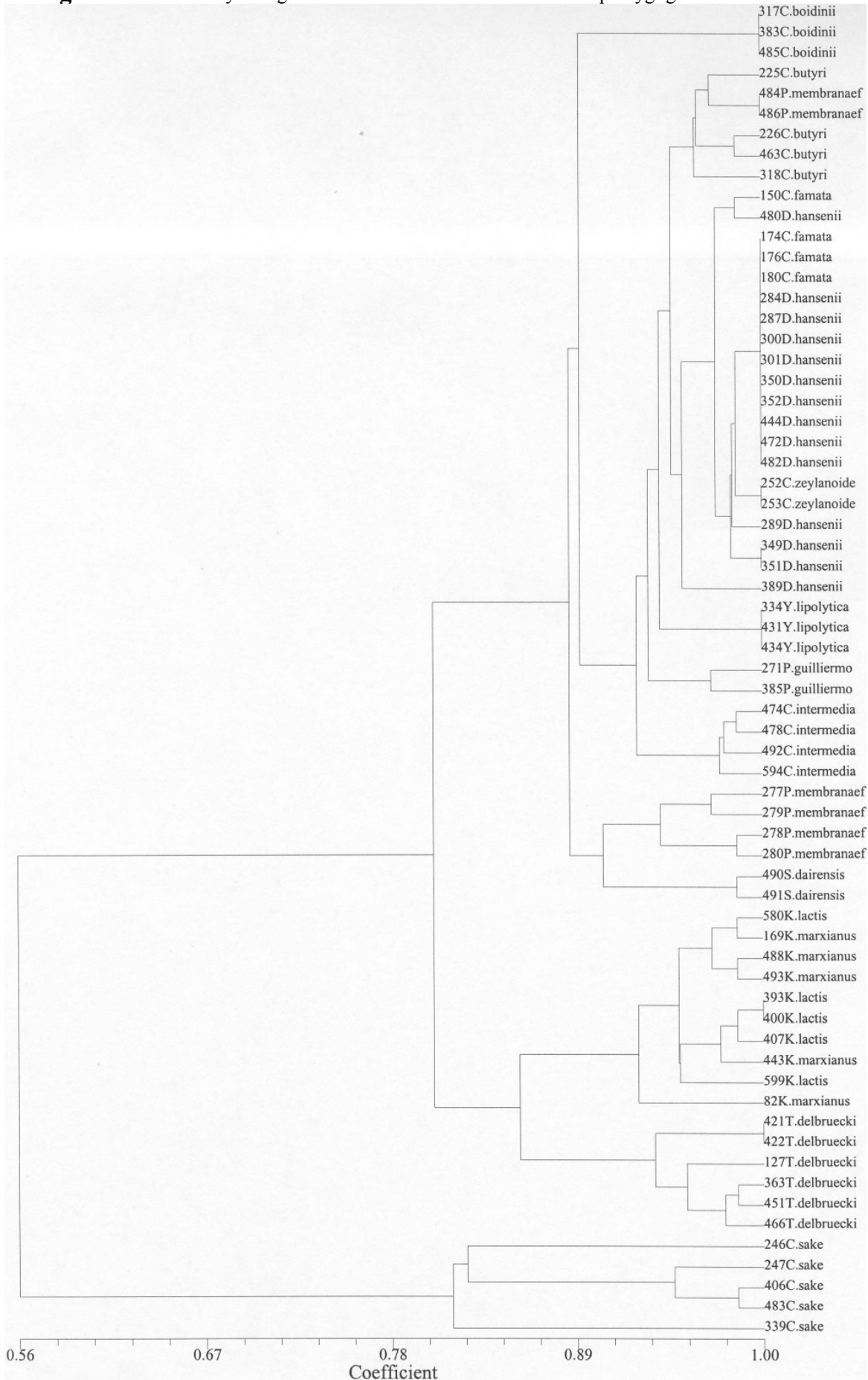
Metode til bestemmelse af flygtige metabolitter:

1. Isolatet udstreges på YM agar i en glas petriskål og inkuberes 1 døgn ved 25°C.
2. Herefter erstattes petriskålens låg med et låg, hvor igennem der er anbragt et stålrør indeholdende Tenax. De flygtige metabolitter adsorberer til Tenaxen.
3. Prøverne inkuberes yderligere 4 døgn.
4. Herefter aftages Tenax røret og anbringes i en termisk desorber (Perkin Elmer ATD 400) tilsluttet en gas chromatograf.
5. Metabolitterne overføres til kapillar kolonnen ved hjælp af opvarmning og analyseres vha. en MS detektor (Hewlett Packard 5972). Analysen foregår automatisk og tager ca. 45min pr. prøve.

Profilerne af flygtige metabolitter fra 189 isolater tilhørende 75 arter blev bestemt. Enkelte arter havde helt specifikke profiler, f.eks. *Candida sake*, *Candida boidinii* m.fl. Da de fermenterende arter producerede flest forskellige flygtige forbindelser, blev disse arter bedst adskilt ved hjælp af metoden. I Figur 1 er vist en opdeling af gær associeret med feta ost baseret på deres profiler af flygtige stoffer. Som det fremgår af figuren, kan den kvalitetsforringende art *Tondaspora delbrueckii* nemt adskilles fra de øvrige arter udelukkende ved hjælp af metabolit profilen. Tilsvarende adskillelse baseret på profiler af flygtige metabolitter sås for gær arter associeret med flødeoste, rugbrød, samt arter associeret med kirsebær og kirsebær saft. Metoden er velegnet tilløbende kvalitets kontrol, idet den ikke forudsætter kendskab til traditionel gær identifikation. Ved undersøgelser, der involverer mange isolater, kan metoden benyttes til en indledende screening, da bestemmelse af profilen af flygtige metabolitter kun kræver en minimal arbejdsindsats.

Det var håbet, at kendskabet til de enkelte arters profiler af flygtige metabolitter ville kunne bruges til en tidlig detektion af gær metabolitter - og dermed gær vækst - direkte i ostene. Desværre viste undersøgelserne, at de dannede metabolitter alle var primære metabolitter, der for en stor dels vedkommende allerede var til stede i osten, idet de også dannes af starterkulturene. Forsøg på at detektere gær metabolitter direkte i osten blev derfor opgivet.

Figur 1. Cluster analyse af gær arter associeret med feta ost baseret på flygtige metabolitter



Dokumentation:

Westall, S. (1997). Identification and characterization of yeasts in cheese. *Department of Biotechnology, Technical University of Denmark*. Ph.D. Thesis.

Følgende artikler er foreløbig publiceret i internationale tidsskrifter:

Westall, S. and Filtenborg, O. 1998. Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiology* 15: 215-222.

Westall, S. and Filtenborg, O. 1998. Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiology* 15: 243-249.

Westall, S. & Filtenborg, O. 1997. Identifikation og karakterisering af gær og gærlignende organismer i mejeriprodukter. *Mælkeritidende*.

