

Angewandte Wissenschaft » Originalarbeiten exklusiv für Sie vorgestellt**Kultivierung osmotoleranter Hefen – Vergleich unterschiedlicher Kulturmedien im Parallelfementer****Jens Pfannebecker[#], Claudia Schiffer-Hetz und Barbara Becker**Hochschule Ostwestfalen-Lippe, Institut für Lebensmitteltechnologie.
NRW (ILT.NRW), Mikrobiologie, Liebigstr. 87, 32657 Lemgo**Zusammenfassung**

In der vorliegenden Studie wurden fünf für osmotolerante Hefen beschriebene Kultivierungsmedien (GB 50, MYG 50, DG 18, FSGY und SY) im RAMOS[®]-Parallelfementer untersucht. Es wurden die Keimzahlentwicklung und das Gasbildungsvermögen ausgewählter Kultur- und Wildhefestämme verglichen. Berücksichtigung fanden niedrige (10 KbE/mL) und hohe (100–1000 KbE/mL) Keimzahlen. Die Kulturmedien SY und FSGY waren wegen ihrer hohen osmotischen Werte für einen schnellen Nachweis ungeeignet. Die Messungen der Gasbildung im Parallelfementer zeigten deutliche Unterschiede beim Vergleich der Gäraktivität von Hefen aus Kulturensammlungen und Wildhefeisolaten. Die Wildhefestämme zeigten schnelleres Wachstum und eine höhere Gäraktivität, was insgesamt in einer höheren CO₂-Transferrate resultierte. Das schnellste Wachstum konnte in DG-18-Bouillon beobachtet werden. Allerdings war die CO₂-Entwicklung in diesem Medium im Vergleich zu den Medien GB 50 und MYG 50 am geringsten. Auf Basis dieser Ergebnisse wird ein optimiertes Kultivierungsmedium in Bezug auf schnelles Wachstum und hohes Gasbildungsvermögen entwickelt.

Summary

Five culture media (GB 50, MYG 50, DG 18, FSGY and SY) published for osmotolerant yeasts were examined in a RAMOS[®] device, a parallel-fermenter-system. The microbial counts and the production of excess gas of strains from culture collections and wild yeast isolates were compared. Low (10 cfu/mL) and higher (100–1000 cfu/mL) microbial counts were analysed. Due to their high osmotic values, the culture media SY and FSGY were not useful for fast detection of yeasts. The measurement of carbon dioxide transfer rate (CTR) in the parallel-fermenter-system showed significant differences in the fermentation activity of yeasts from culture collections and wild yeast strains. The wild yeast strains were characterised by faster growth and higher fermentation activity resulting in a higher CTR. Although the fastest growth was shown in DG 18 culture medium, the CO₂ transfer rate was lowest in this medium compared to GB 50 and MYG 50. The results of the present study are basis for the development of an optimised culture medium regarding fast growth and high fermentation activity of yeasts.

Einleitung

Kontaminationen durch osmotolerante Hefen können in Rohstoffen und Produkten der Süßwaren-, Feinkost- und Fruchtverarbeitungsindustrie zu bedeutender CO₂-Bildung führen. Verderberscheinungen wie das Aufbrechen von Marzipan oder Bombagenbildung in geschlossenen Verpackungen sind zu beobachten [1,2]. Häufig führen Temperaturwechsel während der Lagerung zu einer Kondensierung von Wasserdampf auf der Oberfläche von Produkten, die das Wachstum osmotoleranter Hefen fördert [3]. Trübungen können entstehen. Zudem kommt es häufig zu sensorischen Veränderungen durch die Bildung von Stoffwechselprodukten wie Essigsäure, Acetaldehyd und Lactat. Gasbildung und sensorische Veränderungen der Rohstoffe und Produkte haben Reklamationen und Rückrufaktionen zur Folge, die einen beträchtlichen finanziellen und Image-Verlust für die betroffenen Unternehmen nach sich ziehen. Osmotolerante Hefen können bei Zuckerkonzentrationen von 40–70 % wachsen [4] und werden oft aus Lebensmitteln mit niedrigen a_w-Werten, wie Marmelade, Zuckersirup, Fruchtsaftkonzentrate, Trockenfrüchte, Melasse, Marzipan und Honig, isoliert [5]. Auch Produkte wie Dressings, Ketchup, Mayonnaise, Soja-Sauce und Kondensmilch gelten als anfällig für eine Kontamination mit diesen Hefen. Die Stabilität hoch zuckerhaltiger Produkte hängt vor allem von a_w-Wert, pH-Wert, dem Vorhandensein von Konservierungsmitteln und der Temperatur ab [6]. Durch die Weiterverarbeitung kontaminierter Roh-

[#] Dr. Jens Pfannebecker, Tel.: 05261-702-296

stoffe können auch Lebensmittel betroffen sein, in denen das Wachstum osmotoleranter Hefen nicht durch hohen osmotischen Druck eingeschränkt wird.

Hefen der Gattung *Zygosaccharomyces* (Familie *Saccharomycetaceae*) gehören zu den am häufigsten isolierten Schadorganismen aus stark zuckerhaltigen Produkten und werden oftmals mit Lebensmittelverderb assoziiert [7]. Arten der Gattung *Zygosaccharomyces*, wie *Z. rouxii*, *Z. bailii* und *Z. mellis*, können in hoch zuckerhaltigen Umgebungen wachsen, z. B. in einer 60 % Glucose-Lösung [8]. Einige extrem osmotolerante *Z. rouxii*-Stämme wachsen noch bei Glucose-Konzentrationen von 80 % [5]. Für Hefen der Gattung *Zygosaccharomyces* wurden a_w -Werte zwischen 0,62 und 0,66 ermittelt, bei denen gerade noch Wachstum möglich ist [9–11]. Zahlreiche weitere Spezies sind in hoch zuckerhaltigen Rohstoffen und Produkten nachweisbar. Sie gehören überwiegend den Gattungen *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Candida*, *Pichia* und *Debaryomyces* an [12]. Osmotolerante Hefen wachsen optimal bei Temperaturen um 30 °C und sind in der Regel gegenüber Ethanol, SO₂, Essigsäure und Konservierungsmitteln wie Benzoesäure oder Sorbinsäure widerstandsfähig [12–14]. Zudem können Hefe-Ascosporen die Pasteurisation überstehen [15].

Um die Qualität der betreffenden Rohstoffe und Produkte zu sichern, ist ein selektiver und zuverlässiger Nachweis osmotoleranter Hefen Voraussetzung. Ein Standard-Nachweisverfahren für Hefen und Schimmelpilze in Produkten mit a_w -Werten $\leq 0,95$ ist in der ISO/FDIS 21527-2 [16] beschrieben. Aktuell werden zum Nachweis osmotoleranter Hefen in Betriebs- und Dienstleistungslaboren jedoch auch individuelle „Hausmethoden“ angewendet. Zur Kultivierung osmotoleranter Hefen finden Nährmedien wie YGC-, YPD- oder TGYC-Medium [17] Verwendung, die aus Bestandteilen wie Glucose, Hefeextrakt und Pepton zusammengesetzt sind. Das Wachstum von Bakterien wird häufig durch Zugabe von Chloramphenicol unterdrückt. All diesen Nährmedien ist gemein, dass der a_w -Wert nicht deutlich abgesenkt ist und somit bei einem Einsatz in der Qualitätskontrolle nicht spezifisch osmotolerante Hefen nachgewiesen werden. Das in der ISO/FDIS 21527-2 [16] beschriebene Medium, DG18 [18], besitzt einen a_w -Wert von 0,95, der durch das enthaltene Glycerin erreicht wird. Selektivität gegenüber schnell wachsenden Pilzen und Bakterienwachstum wird durch Zugabe von Dichloran und Chloramphenicol erreicht. Hinsichtlich des Gasbildungsvermögens der Hefen wird nicht geprüft. Dahingegen verwenden Deak [19], Jermini et al. [20], Combina et al. [21] und von Drachenfels [22] Kulturmedien mit unterschiedlichen Zuckern und niedrigeren a_w -Werten (Tab. 1). Ein direkter Nachweis der Gasbildung wird nur von wenigen Autoren durchgeführt. Baumgart und Becker [23] beschreiben die Messung der Gasbildung mittels MPN-Verfahren, während bei Martorell et al. [14] und von Drachenfels [22] ein semi-quantitativer Nachweis in Kulturkolben mit Septum und Einwegspritzen durchgeführt wurde. Häufige Verwendung findet der Verschluss

der Kulturgefäße mit Paraffin. Dieser Nachweis ist zusätzlich zum unkomfortablen Handling fehleranfällig durch Undichtigkeit des Paraffins. Nachweise der Gasbildung mittels „Sternchentest“ im Plattengussverfahren [24] oder die Bestimmung der Gewichtsabnahme in einem Gärkolben sind langwierig und unzuverlässig. Die verwendeten Kulturmedien sind nicht optimiert, Detektionszeiten schwanken zwischen 10 und 21 Tagen. Es entsteht eine Befundlage, die nicht vergleichbare Ergebnisse liefert. Ein Nachweis osmotoleranter Hefen muss niedrige Keimzahlen zuverlässig erfassen, vorzugsweise das Gasbildungsvermögen direkt anzeigen sowie schnell (< 10 Tage) und standardisiert für möglichst viele osmotolerante Hefen anwendbar sein. Ziel dieser Studie war der Vergleich ausgewählter Kultivierungsmedien mit niedrigen a_w -Werten zur Anzucht osmotoleranter Hefen unter Berücksichtigung der Gasbildung im Parallelfementer.

Material und Methode

Wachstum und Gasbildungsvermögen osmotoleranter Hefen wurde in fünf ausgewählten Nährmedien (Tab. 1) im Parallelfementer überprüft. Alle Nährmedien wurden wie in Tabelle 1 beschrieben, eingewogen und autoklaviert. Bei den hoch zuckerhaltigen Medien erfolgte die Zuckerzugabe unter ständigem Rühren, damit ein vollständiges Lösen der Bestandteile möglich war. Grundsätzlich wurden nach jeder Medienherstellung jeweils die a_w -Werte überprüft und ggf. die pH-Werte eingestellt. Die Messung der a_w -Werte erfolgte mit dem AquaLab 4TE DUO (*Decagon Devices Inc.*, Pullman, USA). Begleitend zu den Wachstumsversuchen im Parallelfementer wurden Keimzahlbestimmungen auf entsprechenden Kulturmedien, verfestigt mit 1,5 % Agar, durchgeführt.

Organismen

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die in Tabelle 2 angegebenen Kultur- und Wildstämme eingesetzt. Es wurden gezielt Hefestämme von Kulturensammlungen bezogen, die ursprünglich aus hoch zuckerhaltigen Rohstoffen und Produkten stammen. Zusätzlich wurden Wildstämme aus ausgewählten Matrizes isoliert. Die Identifizierung der Wildstämme erfolgte durch Sequenzierung ihrer Internal Transcribed Spacer (ITS)-Regionen [26]. Alle Identifizierungsergebnisse wurden darüber hinaus durch Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS bestätigt.

Vor jedem Wachstumsversuch wurde eine Impföse des gewünschten Hefestammes auf Schrägagar in 5 mL des zu untersuchenden Nährmediums gegeben und für 3–5 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Vorkulturen, die eine Keimzahl von 10^7 bis 10^8 KBE/mL enthielten, wurden in dekadischen Reihen in Reagenzgläsern mit 9 mL des zu untersuchenden Mediums verdünnt und zur Inokulation der Versuchsansätze verwendet.

Tab. 1 Kultur Nährmedien zum Nachweis osmotoleranter Hefen

Medium	Zusammensetzung	Konzentration	a _w -Wert	pH-Wert	Referenz
MYG 50	Glucosemonohydrat	500 g	0,89	5,6	[21]
	Malzextrakt	10 g			
	Hefeextrakt	2,5 g			
	dest. Wasser	500 mL			
GB 50	Glucosemonohydrat	500 g	0,91	4,5	[1]
	Hefeextrakt	5 g			
	dest. Wasser	495 g			
SY	Saccharose	680 g	0,78	6,6	[22]
	Hefeextrakt	4 g			
	dest. Wasser	320 g			
FSGY	Fructosesirup (70 %)	410 g	0,72	6,0	[25]
	Saccharose	320 g			
	Glucosemonohydrat	190 g			
	Hefeextrakt	2,8 g			
	dest. Wasser	135,9 g			
DG 18	Glucosemonohydrat	10 g	0,95	5,6	[16,18]
	Casein-Pepton	5 g			
	Dichloran	0,002 g			
	Chloramphenicol	0,1 g			
	KH ₂ PO ₄	1 g			
	MgSO ₄ × H ₂ O	0,5 g			
	Glycerin	220 g			
	dest. Wasser	1000 mL			

Untersuchung der Gasbildung im Parallelfementer

Zur Ermittlung der Stoffwechselaktivität in den beschriebenen Kulturmedien wurden Vergleichsuntersuchungen unter standardisierten Kultivierungsbedingungen im RAMOS®-System (HiTec Zang GmbH, Herzogenrath) durchgeführt. Das Gerät erlaubt die parallele Untersuchung von acht Fermentationsansätzen unter quantitativer Messung der CO₂-Bildung. Temperatur und Rotation des Schüttlers sind regulierbar. Die CO₂-Messung erfolgt im RAMOS®-System in speziellen Messkolben indirekt über Sauerstoff- und Drucksensoren [27]. Die RAMOS®-

Software zeigt unter anderem Messgrößen wie die Kohlendioxidtransferrate (CTR), Kohlendioxidtransfer (CT), Sauerstoffpartialdruck und Differenzdruck. Die Messdaten können sowohl für jeden Fermentationskolben einzeln als auch im direkten Vergleich aller acht Fermentationskolben ermittelt werden. Die ausgewählten Hefestämme (Tab. 2) wurden in den fünf Kulturmedien GB 50, MYG 50, DG 18, FSGY und SY (Tab. 1) im Parallelfementer untersucht. Die Messungen im Parallelfementer erfolgten in speziellen 250-mL-Kulturkolben, die mit je 25 mL Nährmedium befüllt waren. Die Versuche im Parallelfementer wurden bei einer Bebrütungstemperatur von 30 °C unter

Tab. 2 Untersuchte osmotolerante Hefen (Kultur- und Wildstämme)

Stamm	Gattung, Art	Isoliert aus
DSMZ 70492	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Apfelsaft
DSMZ 70526	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Marzipan
DSMZ 70576	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Traubenmost
CBS 1091	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	Honig
CBS 4512	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Marzipan
CBS 9696	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Honig
WH 1001	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Fructosesirup
WH 1002	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Marzipan
WH 1003	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Zuckerrübensirup
WH 1004	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Zucker
WH 1005	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Dattel
WH 1010	<i>Candida parapsilosis</i>	Schokoladentrüffel
WH 1013	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Schokoladentrüffel

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holland; WH: Wildhefe

Schütteln (60 UpM) durchgeführt. Inokuliert wurden 10 bzw. 100–1000 Kbe/mL der jeweiligen Hefereinkultur. Die Untersuchung von Wachstum und Gasbildung erfolgte über einen Zeitraum von max. 10 Tagen. Die Messzeit des Systems wurde nach Vorgaben des Herstellers auf 10 min eingestellt, die Spülzeit der Kolben betrug 20 min, sodass sich Messzyklen von 30 min ergaben. Da die Hefen ohne Sauerstoffzufuhr inkubiert werden sollten, wurde die Durchflussspülphase des Systems (Aktivität der Pumpe) auf einen Fluss von 0 mL/min eingestellt. Unter diesen Bedingungen war der vorhandene Luftsauerstoff in den Fermentationskolben durch das Wachstum der Hefen nach einiger Zeit vollständig verbraucht. Vor Beginn jeder Messung im RAMOS®-System wurden jeweils eine Sauerstoffkalibrierung und ein Dichtigkeitsstest durchgeführt. Um die Messkurven vergleichen zu können, wurden für die Auswertung der Gäraktivität charakteristische Zeitpunkte definiert. Es wurden die Zeitpunkte der CO₂-Transferrate > 0,004 mol/L × h herangezogen, die den Beginn der Fer-

mentation zeigen. Außerdem wurden Zeitpunkte und Höhe der maximalen Gäraktivität (CTR_{Max.}) untereinander verglichen.

Begleitend zu den Versuchen im Parallelfementer erfolgte die Keimzahlbestimmung auf den zu untersuchenden Nährmedien, verfestigt mit 1,5 % Agar. So wurden zu Beginn und am Ende jedes Versuches Proben für die Keimzahlbestimmungen aus den Fermentationskolben entnommen.

Ergebnisse und Diskussion

Das Wachstum und die Gasbildung von Kultur- und Wildhefestämmen wurde in den Medien GB 50, MYG 50, DG 18, FSGY und SY (Tab. 1) im Parallelfementer untersucht. Als Negativkontrolle diente nicht inokuliertes Nährmedium. Der Parallelfementer eignete sich, die Unterschiede der Hefen in Bezug auf die Gasbildung (CO₂-Transferrate) in den verschiedenen Nährmedien aufzuzeigen. Die ausge-

wählten Nährmedien, die sich in ihrer Zusammensetzung und ihren a_w-Werten unterscheiden, hatten einen großen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Gasbildung der untersuchten Hefen.

In den Nährmedien SY und FSGY konnte keine signifikante CO₂-Bildung durch die untersuchten Hefen während des gesamten Bebrütungszeitraums von bis zu 10 Tagen beobachtet werden. Auch das Wachstum auf den entsprechenden Nährböden war sehr eingeschränkt. Kolonien waren nach der Bebrütungszeit von 10 Tagen kaum wahrnehmbar. Die Nährmedien SY und FSGY besitzen mit a_w-Werten von 0,78 bzw. 0,72 die niedrigsten Wasseraktivitäten der untersuchten Medien. Ähnliche Ergebnisse wurden von *Beuchat* [28] erzielt, in denen in Nährmedien aus Fructose und Saccharose mit a_w-Werten < 0,78 bei einzelnen Stämmen gerade noch Wachstum stattfand. Die Versuche haben gezeigt, dass die Medien SY und FSGY für eine schnelle Kultivierung osmotoleranter Hefen ungeeignet sind. Der hohe Anteil an Saccharose bzw. einer Mischung aus Fructose und Saccharose wirkte außerdem hemmend auf das Wachstum der Hefen. Dies zeigten auch Versuche in denen Nährmedien hergestellt wurden, die ausschließlich Hefeextrakt und Fructose bzw. Saccharose enthielten mit a_w-Werten

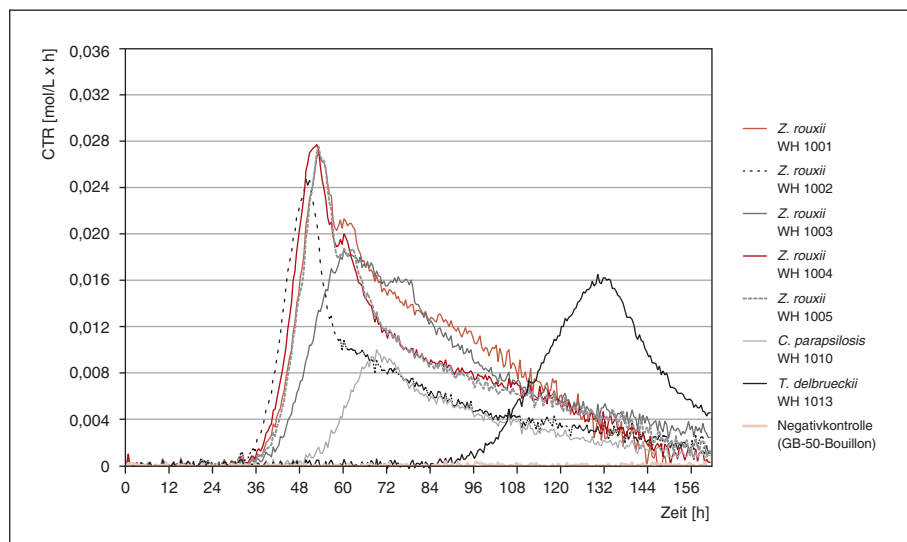


Abb. 1 Vergleich der CO₂-Transferrate (CTR) beim Wachstum osmotoleranter Hefen (Wildstämme) in GB-50-Bouillon; Inokulation: 10² Kbe/mL

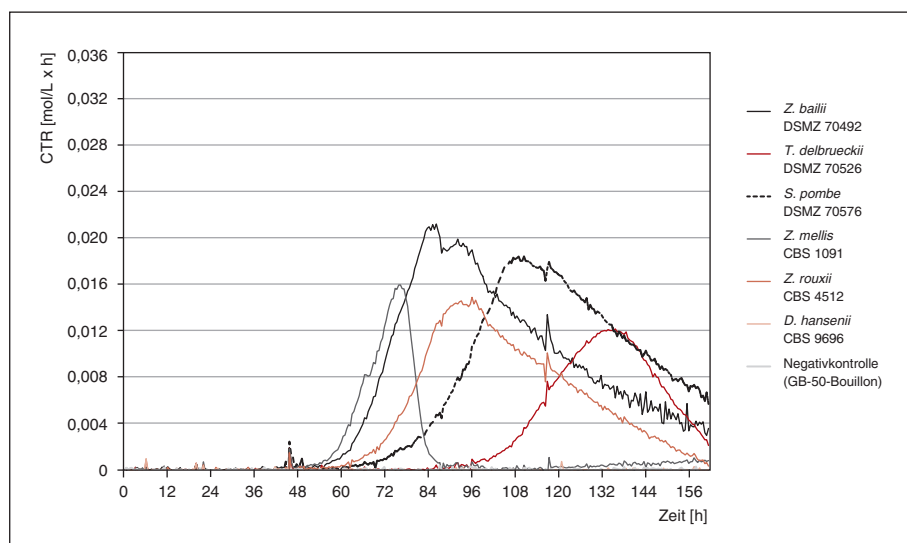


Abb. 2 Vergleich der CO₂-Transferrate (CTR) beim Wachstum osmotoleranter Hefen (Kulturstämme) in GB-50-Bouillon; Inokulation: 10² Kbe/mL

von 0,89–0,90. Im Vergleich zum Wachstum in GB 50 bzw. MYG-50-Bouillon, die als einzigen Zucker Glucose enthalten, aber dieselben a_w -Werte, war das Wachstum stark eingeschränkt. Obwohl Arten wie *Z. bailii* und *Z. rouxii* bei einigen Autoren als fructophil beschrieben wurden [29–30], war das Wachstum der untersuchten Hefestämme in dieser Studie auf Glucose-Medien deutlich schneller.

Beim Vergleich osmotoleranter Hefen aus Kultursammlungen und den Wildstammisolaten wurden Unterschiede im Gasbildungsvermögen festgestellt. Beide Versuchsreihen wurden mit jeweils 10^2 KbE/mL inokuliert und unter gleichen Bedingungen im Parallelfementer untersucht. Die Wildhefen zeichneten sich durch schnelleres Wachstum und höhere Gäraktivität aus, was insgesamt in einer gesteigerten CO_2 -Transferrate (CTR) resultierte. In Abbildungen 1 und 2 sind die Ergebnisse der Vergleiche zwischen Kultur- und Wildhefestämmen in GB-50-Bouillon dargestellt. Die Ergebnisse in MYG-50-Bouillon entsprachen weitestgehend diesen Ergebnissen. In GB-50-Bouillon setzte der Beginn der Gäraktivität ($\text{CTR} > 0,004 \text{ mol/L} \times \text{h}$) bei den Wildhefestämmen von *Z. rouxii* nach 38–45 h ein, während beim Kulturstamm (CBS 4512) erst nach 65 h Gäraktivität messbar war. Die höchste Gäraktivität von $0,028 \text{ mol/L} \times \text{h}$

wurde von *Z. rouxii* (WH 1004) nach 52,5 h erreicht. Bei den Wildstämmen von *C. parapsilosis* (WH 1010) und *T. delbrueckii* (WH 1013) dauerte das Einsetzen der Gärung 59 h bzw. 105,5 h und es wurden niedrigere Gäraktivitäten ($\text{CTR}_{\text{Max.}}$) von $0,010$ bzw. $0,017 \text{ mol/L} \times \text{h}$ im Vergleich zu *Z. rouxii* erreicht (Abb. 1). Die Keimzahlen lagen am Ende des Bebrütungszeitraumes nach 160 h in allen Fermentationskolben in Bereichen zwischen 10^6 – 10^7 KbE/mL. Die Kulturstämme zeigten erste Gäraktivitäten ($\text{CTR} > 0,004 \text{ mol/L} \times \text{h}$) nach 57 h (*Z. mellis* CBS 1091) bis 113 h (*T. delbrueckii* DSM 70526). Die höchste Gäraktivität wurde bei *Z. bailii* (DSM 70492) mit $0,022 \text{ mol/L} \times \text{h}$ nach 85,5 h gemessen. *T. delbrueckii* (DSM 70526) zeichnete sich mit einer $\text{CTR}_{\text{Max.}}$ nach 137,5 h als am langsamsten wachsender Stamm aus. Bei *D. hansenii* (CBS 9696) konnte während des Bebrütungszeitraumes von 160 h kein Wachstum festgestellt werden (Abb. 2).

Die Vergleiche zwischen Kultur- und Wildhefestämmen veranschaulichen, dass die Wildhefeisolate deutlich besser an die hohen osmotischen Bedingungen der ausgewählten Kulturmedien angepasst waren. Die nach dem Erreichen von $\text{CTR}_{\text{Max.}}$ lang auslaufenden Messkurven (Abb. 1 und 2) weisen auf eine Substratlimitierung in den Medien hin [31].



„Kaffee dehydriert den Körper nicht.
Ich wäre sonst schon Staub.“ Franz Kafka

Kaffee ist ein ganz besonderes Getränk – wegen seiner belebenden Wirkung wird es seit Jahrhunderten geschätzt. Doch das ist nicht alles: Studien haben gezeigt, dass Kaffee vielerlei Krankheiten und Beschwerden lindern kann. Das Spektrum reicht von Kopfschmerzen über Asthma und Diabetes bis zur parkinsonschen Krankheit. Welche Inhaltsstoffe für diese Heilwirkungen zuständig sind und wie sie unsere Gesundheit fördern können, erfahren Sie in diesem Buch. Es widerlegt alte Vorurteile und zeigt, dass Kaffee zu Recht ein wichtiger Teil unserer Kultur ist.



Karen Nieber
Schwarz und stark
Wie Kaffee die Gesundheit fördert
2013. 144 Seiten, 46 Abbildungen, 8 Tabellen.
Kartonierte.
€ 19,80 [D]
ISBN 978-3-7776-2161-6
E-Book: PDF. € 19,80 [D]
ISBN 978-3-7776-2339-9

www.hirzel.de

HIRZEL

S. Hirzel Verlag · Birkenwaldstraße 44 · 70191 Stuttgart · Telefon 0711 2582 350 · Fax 0711 2582 390 · Mail service@hirzel.de

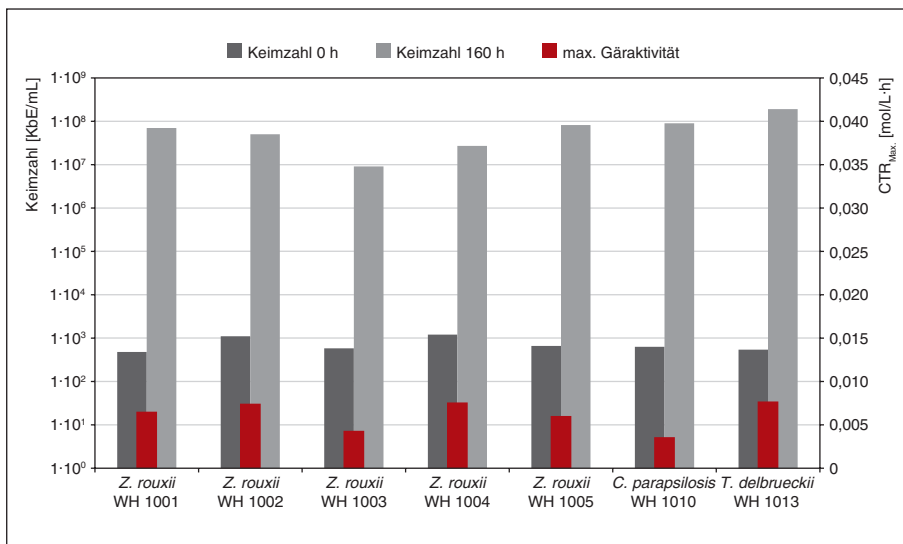


Abb. 3 Wachstum und maximale CO₂-Transferrate (CTR_{Max}) osmotoleranter Hefen in DG-18-Bouillon

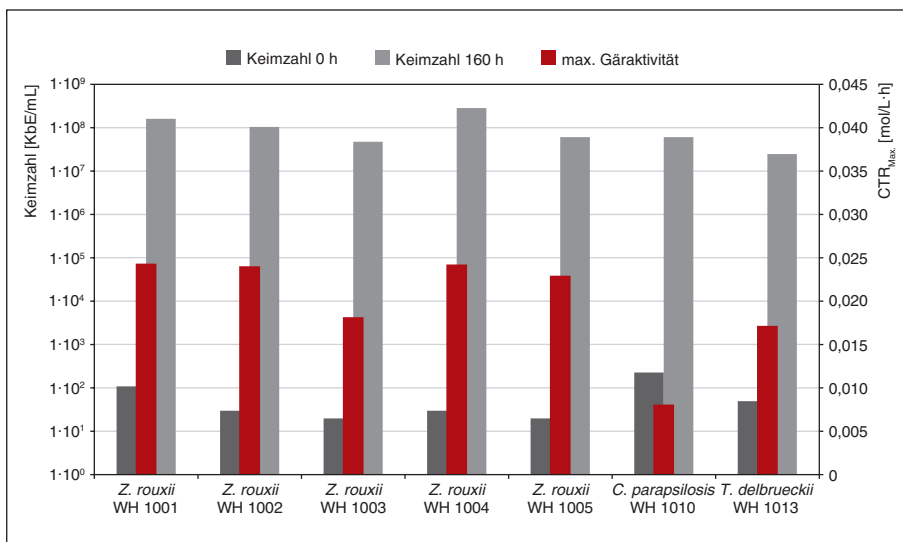


Abb. 4 Wachstum und maximale CO₂-Transferrate (CTR_{Max}) osmotoleranter Hefen in MYG-50-Bouillon

In DG-18-Bouillon wurde, ausgehend von einer Keimzahl von 10²–10³ KbE/mL, ein sehr schnelles Wachstum auf bis zu 10⁸ KbE/mL und ein schnelles Einsetzen der Gärung (CTR > 0,004 mol/L × h) nach 32–46 h im Parallelfemter gemessen. Die maximalen CO₂-Transferraten waren mit 0,004–0,008 mol/L × h im Vergleich zu Nährmedien mit höheren Glucose-Konzentrationen sehr gering (Abb. 3). Dies liegt zum einen an der insgesamt niedrigeren Konzentration an vergärbarem Zucker in DG-18-Bouillon. Es ist aber auch bekannt, dass sich die Zugabe von Dichloran in den verwendeten Konzentrationen negativ auf das Gärverhalten von Hefen auswirkt [32]. Diese Tatsache konnte durch Versuche mit und ohne Dichloran im Parallelfemter für osmotolerante Hefen bestätigt werden. In MYG-50-Bouillon zeigten die Hefen schnelles Wachstum und eine deutlich höhere CTR_{Max} von bis zu 0,024 mol/L × h. Die Keimzahlen stiegen im Verlauf der Fermentation auf vergleichbare Keimzahlen wie in DG-18-Bouillon. Im Vergleich zu GB-50-Bouillon konnte insge-

samt ein höheres Gasbildungsvermögen detektiert werden (Abb. 4). Die Ergebnisse dienen als Grundlage zur Entwicklung eines optimierten Mediums zum Nachweis osmotoleranter Hefen. Dabei soll durch eine Steigerung der Gasbildung – dem primären Verderbspotenzial der Hefen – ein schneller und sensibler Nachweis entwickelt werden. Ausgehend von einem Grundmedium aus Glucose wird mithilfe der CO₂-Messung im Parallelfemter ein Medium entwickelt, das für ausgewählte Hefespezies maximale Gäraktivität zeigt. Die Optimierungsstrategie zielt darauf ab, niedrige Keimzahlen von 10–100 KbE/g in Produkten in Nachweiszeiten von 3–7 Tagen zu detektieren.

Fazit

Der Vergleich verschiedener Kulturmedien, die sich in ihrer Zusammensetzung und in ihren a_w-Werten unterscheiden, zeigte deutliche Unterschiede in Wachstum und Gäraktivität osmotoleranter Hefen. Bei den Kulturmedien GB 50 und MYG 50, mit einer Konzentration von 50 % Glucose, wurden die besten Ergebnisse in Bezug auf schnelles Wachstum und hohe Gäraktivität erzielt. In DG-18-Bouillon wurde das schnellste Wachstum von allen untersuchten Nährmedien beobachtet. Allerdings war die maximale Gäraktivität (CTR_{Max}) der Hefen in diesem Medium am geringsten. Die untersuchten Wildhefeisolate waren an die Kulturmedien mit hohen osmotischen Werten besser angepasst als die Hefen aus Kultursammlungen. Für ein optimiertes Kulturmedium sollten die a_w-Werte nicht unter 0,89 liegen, da das Wachstum osmotoleranter Hefen bei niedrigeren a_w-Werten stark eingeschränkt wird.

Dank

Das Forschungsvorhaben (AiF 16650 N) wurde im Programm zur Förderung der „Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI) gefördert. Wir danken der HiTec Zang GmbH für die freundliche Unterstützung.

Literatur

- [1] *Jermi MFG, Geiges O, Schmidt-Lorenz W*: Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products. *J Food Prot* **50**, 468–472 (1987).
- [2] *Tokuoka K et al.*: Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. *J Gen Appl Microbiol* **31**, 411–427 (1985).
- [3] *Tokuoka K*: Sugar- and salt-tolerant yeasts. *J Appl Biotechnol* **74**, 101–110 (1993).
- [4] *Lodder J*: The Yeasts: A Taxonomic Study, 2. Aufl., S. 91, North Holland Publ. Co., Amsterdam (1970).
- [5] *Ok T, Hashinaga F*: Identification of sugar-tolerant yeasts isolated from high-sugar fermented vegetable extracts. *J Gen Appl Microbiol* **43**, 39–47 (1997).
- [6] *Deák T*: Handbook of food spoilage yeasts. 2. Edition, CRC Press, Boca Raton, USA (2008).
- [7] *Boekhout T, Robert V*: Yeasts in Food – Beneficial and Detrimental Aspects. Seiten 20, 46, 172–173, 237, Behr's Verlag, Hamburg (2003).
- [8] *Thomas DS*: Yeasts as spoilage organisms in beverages. In: Rose AH, Harrison JS (Eds.): The Yeasts. 2. Aufl., Vol. 5, S. 517–561, Academic Press, New York (1993).
- [9] *Schelhorn M*: Untersuchungen über den Verderb wasserarmer Lebensmittel durch osmophile Mikroorganismen. *Z Lebensm-Untersuch Forsch* **91**, 117–124 (1950).
- [10] *Tilbury RH*: Studies on the microbial deterioration of raw cane sugar. Masterarbeit, Universität Bristol, UK (1967).
- [11] *Leveau JY, Bouix M*: Etude des conditions extremes de croissance des levures osmophiles. *Industrie Alimentaire et Agricole* **79**, 1147–1151 (1979).
- [12] *Fleet G*: Spoilage Yeasts. *Crit Rev Biotechnol* **12**, 1–44 (1992).
- [13] *Dittrich HH, Großmann M*: Mikrobiologie des Weines. 3. Auflage, Ulmer, Stuttgart (2005).
- [14] *Martorell P et al.*: Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int J Food Microbiol* **114**, 234–242 (2007).
- [15] *Put HMC et al.*: Heat resistance studies on yeasts causing spoilage of soft drinks. *J Appl Bacteriol* **40**, 135–152 (1976).
- [16] ISO/FDIS 21527-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95 (2008).
- [17] *Beuchat LR et al.*: Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: an interlaboratory study. *Int J Food Microbiol* **70**, 89–96 (2001).
- [18] *Hocking AD, Pitt JI*: Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl Environ Microbiol* **39**, 488–492 (1980).
- [19] *Deak T*: Detection, enumeration and isolation of yeasts. In: *Boekhout T, Robert V* (Hrsg.): Yeasts in food – Beneficial and detrimental aspects, S. 39–68, Behr's Verlag, Hamburg (2003).
- [20] *Jermi MFG, Geiges O, Schmidt-Lorenz W*: Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products. *J Food Prot* **50**, 468–472 (1987).
- [21] *Combina M et al.*: Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina. *Lett Appl Microbiol* **46**, 192–197 (2007).
- [22] *von Drachenfels*: Ein schneller und empfindlicher Nachweis von osmophilen Hefen in Süßwaren. *Süsswaren Technik Wirtschaft* **54**, 22–23 (2009).
- [23] *Baumgart J, Becker B*: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 5. Aufl., S. 152–155, Behr's Verlag, Hamburg (2004).
- [24] *Klinkert J*: Einfluss unterschiedlicher Rezepturen auf die Auslösung von Bombagen in Feinkostsalaten durch Hefen und Milchsäurebakterien. Diplomarbeit. Landwirtschaftliche Fakultät, Universität Bonn (1998).
- [25] *Häcker M*: Regulierung des GF-Wertes von mehrschichtigen Artikeln durch verschiedene Zuckerarten und durch Gemische mit verschiedenen Zuckerarten mit Sorbit, ZDS-Fachtagung Inter-Praline 88, Solingen, (1988).
- [26] *White TJ et al.*: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. S. 315–322, Academic Press Inc. (1990).
- [27] *Anderlei T et al.*: Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem Eng J* **17**, 187–194 (2004).
- [28] *Beuchat LR*: Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts. *Int J Food Microbiol* **19**, 1–14 (1993).
- [29] *Pina C et al.*: Ffz1, a new transporter specific for fructose from *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology* **150**, 2429–2433 (2004).
- [30] *Leandro MJ et al.*: The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasmamembrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. *Microbiology* **157**, 601–608 (2011).
- [31] *Anderlei T, Büchs J*: Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem Eng J* **7**, 157–162 (2001).
- [32] *Michaels GE, Wolfe NL, Lewis DL*: Fermentation Inhibition by 2,6-Dichloro-4-nitroaniline (DCNA). *J Agric Food Chem* **25**, 419–420 (1977).

Die kompletten Beiträge aus „Angewandte Wissenschaft Originalarbeiten exklusiv für Sie vorgestellt“ und mehr finden Sie unter www.dlr-online.de

Passwort: Donuts