



Doctoral Thesis

## **Osmotolerant yeasts their detection, isolation and properties related to food processing**

**Author(s):**

Jermini, Marco F.G.

**Publication Date:**

1986

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000363271> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 8029

**OSMOTOLERANT YEASTS -  
THEIR DETECTION, ISOLATION AND  
PROPERTIES RELATED TO FOOD PROCESSING**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Technical Sciences

presented by  
MARCO F.G. JERMINI  
dipl. LM.-Ing. ETH  
born on 4 October 1957  
citizen of Torricella-Taverne TI

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. W. Schmidt-Lorenz, examiner  
Prof. Dr. E. Müller, co-examiner  
PD Dr. F. Escher, co-examiner

Zürich 1986

### SUMMARY

The  $a_w$  of 29 different solutions of glucose, fructose, sucrose, glycerol and sodium chloride were measured at 10°C, 20°C and 30°C. The water retaining capacity of the tested 5 substances decreased in the order indicated: NaCl>glycerol>fructose>glucose>sucrose. The  $a_w$  is temperature dependent; Any increase in the measurement temperature resulted in a small, but significant decrease of the water activity value.

A simple presence-absence test for the detection of small numbers of osmotolerant yeasts in foods was developed. Yeast-extract-glucose 50% w/w broth was used as enrichment broth. The detection was performed i) by microscope and ii) by streaking 0,030ml enrichment culture on selective yeast-extract-glucose 50% w/w agar.

In accordance with the method proposed, 28 strains of osmotolerant yeasts were isolated from 27 spoiled high sugar products. Twenty-four strains were identified as Zygosaccharomyces rouxii, 2 as Zygosaccharomyces bailii and 1 each as Torulasporea delbrueckii and as Debaryomyces hansenii.

Turbidity measurements were adopted to investigate the minimum  $a_w$  for the growth of 29 osmotolerant yeast strains, which were arranged in 3 homogeneous groups in accordance to their growth behaviour at low  $a_w$ ; With 7 strains, representing all the groups formed, the influence of  $a_w$  on lag phase, mean generation time and cell yield was then determined by culturing the yeasts in broths at 10 different  $a_w$  in the range 0,998-0,626 and by counting the colony forming units (CFU) per ml. None of the tested strains could grow at 0,701 $a_w$  and 30°C. During 60 days incubation at this  $a_w$ , slight reductions of the initial CFU.ml<sup>-1</sup> counts were stated. By incubation at  $a_w$ <0,701 these reductions were larger. 6 strains of Z.rouxii grew however at 0,760 $a_w$ , whilst a strain of Z.bailii could not grow at  $a_w$ <0,858. For 6 strains the optimum  $a_w$  for growth was in the range 0,958-0,998. A single strain of Z.rouxii showed optimum  $a_w$  for growth in the range 0,913-0,958. Therefore it was opportune to redefine it as "osmophilic".

Because of high dehydration, cells actively grown at 0,837 $a_w$  were by approx. 30% smaller than cells actively grown at 0,998 $a_w$ .

All 3 cardinal temperatures for the growth of 6 osmotolerant yeast strains and  $t_{min}$  and  $t_{max}$  for the growth of 23 additional strains were investigated at 4 different  $a_w$ . The  $t_{opt}$  for the growth of Z.rouxii and Z.bisporus were 24-28,5°C at  $a_w$  higher than 0,990 and 31-33°C at  $a_w$  in the range 0,922 to 0,868. Z.bailii showed  $t_{opt}$  of 29-31°C and 33-35°C at  $a_w$ >0,990 and  $a_w$ <0,922 respectively. The  $t_{opt}$  for the growth of T.delbrückii was 27-28,5°C at  $a_w$ >0,990 and 31-33,5°C at  $a_w$  in the range 0,922-0,868. D.hansenii showed  $t_{opt}$  of 24°C and 27-29,5°C at  $a_w$ >0,990 and  $a_w$ <0,922 respectively. The  $t_{min}$

and  $t_{max}$  for growth were also shifted towards higher values if the  $a_w$  decreased; At  $a_w < 0,922$  none of the tested strains grew at  $4^\circ C$  within 30 days. Several strains could grow at  $42^\circ C$ , however only in the presence of high sugar concentrations.

A method for the rapid production of asci based on the incubation of the sporulation media in the presence of 14% v/v  $O_2$  and 4% v/v  $CO_2$  was developed.

The heat resistance of Z.rouxii and Z.bailii was investigated in 2 different broths of 0,963 $a_w$  and 0,858 $a_w$  respectively. The highest heat resistance was observed with asci of Z.bailii strain LMZ 108 showing a decimal reduction time at  $60^\circ C$  and 0,858 $a_w$  of 14,9 min. Asci of Z.rouxii strain LMZ 100 were less heat resistant ( $D_{60}$ -value at 0,858 $a_w$  = 3,5 min). Moreover it was observed that the heat resistance (D-values) of asci at 0,963 $a_w$  proved to be 20 to 50-fold and 5 to 8-fold higher than the D-values of the corresponding vegetative cells of Z.rouxii and Z.bailii respectively.

The effectiveness of sodium benzoate and ethyl-paraben against osmotolerant yeasts has been investigated. The  $a_w$  of the substrate did not affect the tolerance limits for growth, provided the preservative concentration reflects only the amount of water and not the whole volume of the substrate. At  $a_w < 0,900$  and  $pH < 4,0$  1'500ppm Na-benzoate were necessary to inhibit the growth of osmotolerant yeasts for 30 day. At  $a_w < 0,900$  and  $pH = 4,8$  a 30 days-free shelf life was guaranteed by the addition of 900ppm ethyl-paraben. At  $a_w < 0,900$  an  $pH = 3,0$  the same shelf life was guaranteed by 400ppm ethyl-paraben. If the substrates were acidulated with citric acid the antimycotic effectiveness could be enhanced. Chemical preservatives were usually less effective when the initial levels of osmotolerant yeasts were high. Z.bailii was found to be the most preservative resistant osmotolerant yeast.

In order to record the effects of a long culture storage on the sugar tolerance of Z.rouxii and Z.bailii, the fermentation behaviour of 3 new isolated strains and the same strains after 2 years storage i) on high-sugar agar slants and ii) in Biomalt (liquid malt extract) was investigated in glucose broths at 4 different  $a_w$  (0,963 - 0,936 - 0,909 and 0,858). The trials with stock strains resulted in sensible reductions of both maximum ethanol yield and production rate. The storage of strains in liquid malt extract supplied slight faster and stronger fermentation than the maintenance on agar slants. Therefore, for the storage of osmotolerant culture collections the use of liquid natural products such as Biomalt, without subculturing, is suggested.

Additionally, the influence of frozen storage on osmotolerant yeast cells viability was investigated in a 20% V/V glycerol solution; osmotolerant yeasts were found to be particularly sensitive to frozen storage and to thaw-freeze stress.

### ZUSAMMENFASSUNG

Der  $a_w$ -Wert von 29 verschiedenen Glucose-, Fructose-, Saccharose-, Glycerin- und NaCl-Lösungen wurde bei 10°C, 20°C und 30°C gemessen. Die Hydratation der 5 untersuchten Stoffe nahm in der Reihenfolge NaCl>Glycerin>Fructose>Glucose>Saccharose ab. Der  $a_w$ -Wert ist temperaturabhängig: je höher die Messtemperatur, desto niedriger ist der  $a_w$ -Wert.

Es wurde ein einfacher und wirtschaftlich günstiger Präsenz-Absenz Test zum Schnell-Nachweis von kleinen Zahlen osmotoleranter Hefen entwickelt. Die Methode besteht darin, die Hefen in Hefe-Extrakt-Bouillon mit 50% w/w Glucose anzureichern, und die Anwesenheit von Hefen in der Anreicherungskultur mikroskopisch und durch Selektiv-Ausstrich auf Hefe-Extrakt-Agar mit 50% w/w Glucose nachzuweisen.

Mit dieser Methode wurden 28 osmotolerante Hefestämme aus 27 verschiedenen, zuckerreichen Lebensmitteln isoliert. Davon wurden 24 als Zygosaccharomyces rouxii, 2 als Zygosaccharomyces bailii und je 1 Stamm als Torulasporea delbrueckii und Debaryomyces hansenii identifiziert.

Die  $a_w$ -Wert-Abhängigkeit für das Wachstum wurde bei 29 Stämmen (26 eigenen Isolaten und 3 Referenzstämmen) durch Trübungsmessung ermittelt, und nach ihrem Verhalten bei tiefen  $a_w$ -Werten konnten die Stämme in 3 homogene Gruppen eingeteilt werden. Es wurden 7 repräsentativen Stämme ausgewählt und damit bei 10 verschiedenen  $a_w$ -Werten der Einfluss auf die lag-Phase, die Generationszeit und die Zell-Ausbeute durch kulturelle Wachstumsversuche untersucht. Keiner dieser Stämme konnte bei 0,701 $a_w$  und 30°C wachsen, vielmehr wurde bei diesem  $a_w$ -Wert nach einer Bebrütungszeit von 60 Tagen eine leichte Abnahmen der Lebendkeimzahl festgestellt. Bei noch tieferen  $a_w$ -Werten waren diese Abnahmen ausgeprägter. Sechs Stämme von Z.rouxii konnten bei 0,760 $a_w$  wachsen, während sich 1 Stamm von Z.bailii bei  $a_w < 0,858$  nicht vermehren konnte. Der optimale  $a_w$ -Wert für das Wachstum lag für 6 Stämmen im Bereich 0,958-0,998 $a_w$ . Ein Stamm von Z.rouxii zeigte jedoch ein optimales Wachstum bei  $a_w$  zwischen 0,913 und 0,958, sodass er als "osmophil" bezeichnet wurde. Zellen, die bei 0,837 $a_w$  gewachsen sind, waren der hohen Zell-Dehydratation wegen um ca. 30% kleiner als Zellen, die bei 0,998 $a_w$  gewachsen sind.

Die Kardinal-Temperaturen für das Wachstum von 6 Stämmen sowie  $T_{min}$  und  $T_{max}$  für weitere 23 Stämme wurden bei 4 verschiedenen  $a_w$ -Werten untersucht.  $T_{opt}$  für das Wachstum von Z.rouxii und Z.bisporus war 24-28,5°C bei  $a_w$  0,990 und 31-33°C im Bereich 0,922-0,868 $a_w$ . Z.bailii zeigte eine  $T_{opt}$  von 29-31°C bei  $a_w > 0,990$  und 33-35°C bei  $a_w < 0,922$ . Bei tieferen  $a_w$ -Werten wurden stets höhere Kardinaltemperaturen gefunden. Lag der  $a_w$ -Wert unter 0,922, konnte keiner der 29 Stämme innerhalb von 30 Tagen bei 4°C wachsen. Einige Stämme konn-

ten bei 42°C nur bei hohen Zucker-Konzentrationen wachsen.

Die Hitze-Resistenz der vegetativen Zellen und Asci von Z.rouxii und Z.bailii wurde bei 2 verschiedenen  $a_w$ -Werten untersucht. Dabei zeigten die Asci von Z.bailii die höchste Hitze-Resistenz ( $D_{60^\circ C}$  bei 0,858 $a_w$  = 14,9 Min). Asci von Z.rouxii waren weniger hitzeresistent ( $D_{60^\circ C}$  bei 0,858 $a_w$  = 3,5 Min). Die Hitzeresistenz der Asci von Z.rouxii bzw. Z.bailii war bei 0,963 $a_w$  um die Faktoren 20 bis 50 bzw. 5 bis 8 höher als die der vegetativen Zellen.

Die antimikrobielle Wirksamkeit von Na-Benzoesäure und Ethylparaben gegen osmotolerante Hefen wurde bei 4 verschiedenen  $a_w$ -Werten untersucht. Der  $a_w$ -Wert spielt bei der Feststellung der Toleranzgrenzen keine entscheidende Rolle, wobei zu beachten ist, dass die Konzentration der Konservierungsmittel auf die vorhandene Wassermenge und nicht auf das totale Volumen bezogen werden muss. Um das Wachstum der osmotoleranten Hefen bei einem  $a_w$ -Wert <0,990 während 30 Tagen zu hemmen, waren bei einem pH=4,0 1'500ppm Na-Benzoesäure nötig und bei pH=4,8 900ppm Ethylparaben sowie bei pH=3,0 lediglich 400ppm Ethylparaben.

Die antimikrobielle Wirksamkeit kann durch Ansäuerung des Substrates mit Zitronensäure erhöht werden.

Bei einem hohen Anfangskeimgehalt wird die Wirksamkeit deutlich herabgesetzt. Z.bailii erwies sich als die resistenteste Art gegen Konservierungsmittel.

Die Einflüsse einer langen Aufbewahrung der Stämme auf die osmotoleranten Eigenschaften wurde mit Z.rouxii und Z.bailii untersucht, wobei die Fermentation von Glucose durch frisch isolierte Stämme und durch Stämme, die 2-Jahre lang i) auf Schrägagar und ii) in Biomalt aufbewahrt wurden, bei 4 verschiedenen  $a_w$ -Werten verglichen wurde. Die 2-jährigen Stämme produzierten bedeutend weniger Ethanol als frische Isolate, wobei bei einer Aufbewahrung auf Schrägagar ein Verlust der Gährfähigkeit noch ausgeprägter war.

Osmotolerante Hefen erwiesen sich als besonders empfindlich sowohl gegen lange Gefrierlagerungen als auch gegen mehrmalige Auftau-Gefriervorgänge.