

Identification and characterisation of the yeast flora in kefir and smear ripened cheese

contribution of selected yeasts to cheese ripening

Doctoral Thesis

Author(s):

Wyder, Marie-Therese

Publication date:

1998

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001988263>

Rights / license:

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

Diss. ETH No. 12842

IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION
OF THE YEAST FLORA IN
KEFYR AND SMEAR RIPENED CHEESE –
CONTRIBUTION
OF SELECTED YEASTS TO
CHEESE RIPENING

A THESIS
submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY (ETH), ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF TECHNICAL SCIENCES

presented by

MARIE-THERESE WYDER

Dipl. Lm.-Ing. ETH
born September 10th, 1969
citizen of Riggisberg (BE)

accepted on the recommendation of
PROF. DR. Z. PUHAN, EXAMINER
DR. H. SPILLMANN, CO-EXAMINER
DR. H. SEILER, CO-EXAMINER

Zürich 1998

SUMMARY

Identification and Characterisation of the Yeast Flora in Kefyr and Smear ripened Cheese – Contribution of selected Yeasts to Cheese Ripening

Yeasts are widely dispersed in the environment and, thus, are encountered also in several dairy products as part of the typical microflora, or else as contaminants. They are known for their high tolerance towards low pH and temperature as well as for their ability to ferment carbon sources to mainly ethanol and carbon dioxide. In kefyr which undergoes both a lactic acid and an alcoholic fermentation, yeasts are responsible for the development of a distinctive prickling taste. A large number of cheese varieties are characterised by a specific surface microflora composed of moulds, yeasts, micrococci and coryneform bacteria. Yeasts contribute to the metabolism of lactic acid with the consequence of increased pH. As contaminants in fermented milk products, they may cause blowing of the packages. The importance of yeasts in the production and spoilage of dairy products is indisputable. There is, thus, a need for a rapid and accurate identification technique. Furthermore, not much is known about the direct contribution by yeasts to e.g. cheese ripening.

In the present study, the yeast flora of five kefyr grains and three smear ripened cheese varieties was investigated using non-traditional methods. Electrophoretic karyotyping in the contour-clamped homogeneous electric field and amplification of the ITS region with subsequent restriction analysis were used to characterise and group isolates from kefyr, whereas for the characterisation and grouping of isolates from cheese only the ITS method was applied. The use of PCR and subsequent restriction analysis proved to be a simple, rapid and reliable technique to differentiate yeasts at the species level. Isolates from cheese were then tested in cheese curd slurries in order to select four species for the production of foil ripened Raclette cheeses. The objective was to gain more knowledge on their direct contribution to ripening and flavour development.

The composition of the kefyr yeast flora with totally five different species was strongly

dependent on the production procedure. In grains with at least two different species *Yeast U* always dominated and when absent, *Saccharomyces unisporus* was predominant. But during fermentation, the lactose fermenting yeasts *Kluyveromyces marxianus* and *Candida kefir* could catch up with *Yeast U*. When kefir was taken as inoculum, *K. marxianus* or *C. kefir* outnumbered all other mostly lactose negative species, if absent, however, *S. unisporus* dominated. Repeated subculturing (22 °C for 24 h) always led to a decrease of the yeast count.

It was not possible to identify *Yeast U* with certainty. This yeast was found, according to its biochemical characteristics, to be close to either *S. bayanus* or *S. pastorianus* which, however, could not be confirmed by analysing the ITS region. Since the species occurs fairly often in grains, its identity would be of high interest.

A total of 12 species were isolated from the surface and the inside of Limburger, Münster and Tête de Moine cheeses. In spite of applying cultures of *Debaryomyces hansenii* and *Galactomyces geotrichum* on the surface of Limburger and Münster, most of the yeasts found originated from spontaneous contamination. The predominant species in all investigated cheese varieties was *D. hansenii* regardless of whether it had been added as a starter to the smear or of whether it originated, in case of Tête de Moine, from spontaneous contamination. The second most frequent species was *Gal. geotrichum* followed by *Yarrowia lipolytica*. The soft cheeses Limburger and Münster made with pasteurised milk revealed a homogeneous yeast flora with a maximum of 3 – 5 species. The composition inside and on the surface of the cheeses was very much alike. The yeast flora in the inner part of Tête de Moine which is made with raw milk, was quite heterogeneous with a spectrum of seven species. However, the surface flora composed of mainly *D. hansenii* was not affected by the inside flora. The counts of 100 – 1'000 CFU/g inside the cheeses were always much lower than on the surface.

According to the results obtained with cheese curd slurries, most yeasts isolated from the smear ripened cheeses could be divided into two groups. One group was characterised by the ability to ferment glucose, to utilise lactate, to increase pH and not showing proteolytic activity. The resulting odour of the slurries was mainly acidic, fruity or fermented. The second group was composed of non fermenting species which utilised lactate but did not affect pH. They were proteolytic yielding a cheesy aroma. For the

production of Raclette model cheeses, *Pichia jadinii* was chosen from the first group, and *Gal. geotrichum* and *Y. lipolytica* from the second group. The fourth species was *D. hansenii* B, isolate from Tête de Moine, which combined properties of both groups.

In the mature Raclette model cheeses ripened in foil, hardly any yeasts could be detected as a consequence of primarily anaerobic conditions in and around the cheeses. Thus, no lactic acid degradation occurred. In contrary, yeasts led to a moderate increase of lactic acid concentration. This might be attributed to a stimulation of the lactic starter as a result of released metabolism products by yeasts. Furthermore, yeasts may have affected syneresis and consequently the final lactic acid content. Lipid metabolism seemed to be characterised either by esterase (*Gal. geotrichum* and *D. hansenii* B) and/or lipase activity (*P. jadinii* and *Y. lipolytica*). As far as proteolysis is concerned, all but *Y. lipolytica* revealed peptidase activity resulting in smaller breakdown products and free amino acids. Except for *Gal. geotrichum*, they also enhanced formation of biogenic amines. Finally, yeasts influenced the sensory quality of cheese significantly. *Y. lipolytica* was capable to improve overall sensory characteristics. All other species, however, influenced the flavour rather negatively.

Gal. geotrichum, *P. jadinii* and *D. hansenii* are species often applied in cheese production. From the results obtained with the Raclette model cheeses, it can be concluded that yeasts should always be applied in combination. In order to improve flavour, *Y. lipolytica* should never be missing. If biogenic amine formation needs to be suppressed, *Gal. geotrichum* might be of benefit. However, since hardly any yeasts were detectable in the mature cheeses, the action of yeasts can most probably be attributed to enzymes released after cell lysis.

ZUSAMMENFASSUNG

Identifizierung und Charakterisierung der Hefeflora in Kefir und in schmieregereiften Käse – Beitrag ausgewählter Hefen zur Käsereifung

Hefen sind in der Natur weit verbreitet und daher auch in Milchprodukten als Teil der spezifischen Mikroflora oder aber als Kontaminanten häufig anzutreffen. Sie sind beständig gegen tiefe pH-Werte sowie Temperaturen und können Kohlehydratquellen unter Freisetzung der Haupt-Stoffwechselprodukte Alkohol und Kohlendioxid vergären. Im Sauer Milchprodukt Kefir, das sowohl einer Milchsäure- als auch einer alkoholischen Gärung unterzogen wird, sind die Hefen daher für den charakteristisch prickelnden Geschmack verantwortlich. In einer Vielzahl von Käsesorten sind sie Teil der spezifischen Oberflächenflora bestehend aus Schimmelpilzen, Hefen, Mikrokokken und Koryneforme Bakterien. Die Hefen tragen zur Anhebung des pH-Wertes bei, hauptsächlich als Folge der Verwertung von Laktat. Als Kontaminanten z.B. in Sauer Milchprodukten können sie jedoch zu einer Bombage der Packungen führen. Die Bedeutung der Hefen in der Produktion, aber auch im Verderb von Milchprodukten ist unbestreitbar. Es besteht somit ein Bedarf für eine schnelle und sichere Identifikationsmethode. Ausserdem ist nur wenig bekannt über den direkten Beitrag von Hefen zur Käsereifung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hefeflora von fünf verschiedenen Kefirkörnern und drei geschmierten Käsesorten mittels nicht-traditioneller Identifikationsmethoden untersucht. Zur Charakterisierung und Gruppierung der Isolate aus Kefir kamen die Pulsfeldgelelektrophorese und die Amplifizierung der ITS-Region mit anschliessender Restriktionsanalyse zur Anwendung. Für die Untersuchung der Hefeflora aus Käse wurde jedoch nur noch die letztgenannte Methode eingesetzt. Die Analyse der ITS-Region erwies sich als ein einfaches, schnelles und zuverlässiges Verfahren, um Hefen auf Stufe der Spezies zu differenzieren. Isolate aus Käse wurden daraufhin in sogenannten ‚Slurries‘, einer Käsebruchmasse, mit der Absicht untersucht, vier Hefen unterschiedlicher Spezies für die Produktion von foliengereiften Raclette-Modellkäsen auszuwählen. Ein weiteres Ziel war, deren direkten Beitrag zur Reifung und

Geschmacksentwicklung im Käse zu ergründen.

Die fünf Kefirkörner wiesen total fünf verschiedene Hefearten auf, wobei die Florazusammensetzung sehr vom Produktionsverfahren abhängig war. In Körner mit mindestens zwei verschiedenen Hefearten dominierte stets *Hefe U*, fehlte diese jedoch, überwog *Saccharomyces unisporus*. Während der Fermentation nahmen die lactose-positiven Hefen *Kluyveromyces marxianus* und *Candida kefyr* überhand. Wurde nun der daraus hergestellte Körnerkefir als Inokulum für weitere Fermentationen verwendet, nahm der Anteil dieser lactose-positiven Hefen auf Kosten der anderen meist lactose-negativen Spezies weiter zu. Nur in Abwesenheit der lactose-positiven dominierte eine lactose-negative Hefe, *S. unisporus*. Wiederholte Überimpfung von Körnerkefir (22 °C, 24 h) hatte immer eine Abnahme der Hefezahl zur Folge.

Die Identität von *Hefe U* konnte nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Gemäss der biochemischen Eigenschaften ist diese Hefe *S. bayanus* oder *S. pastorianus* sehr nahe. Dies konnte jedoch mit der Analyse der ITS-Region nicht bestätigt werden. Da die *Hefe U* in Kefirkörner häufig anzutreffen war, wäre ihre Identität von grossem Interesse.

Im ganzen wurden 12 verschiedene Spezies aus der Oberfläche und dem Inneren von Limburger, Münster und Tête de Moine isoliert. Obwohl für Limburger und Münster Oberflächenkulturen aus *Debaryomyces hansenii* und *Galactomyces geotrichum* verwendet wurden, waren die meisten Hefen auf eine spontane Kontamination zurückzuführen. Die vorherrschende Spezies in allen untersuchten Käsesorten war *D. hansenii* unabhängig davon, ob sie als Oberflächenkultur zugesetzt wurde oder nicht. Die zweithäufigst vorkommende Spezies war *Gal. geotrichum*, gefolgt von *Yarrowia lipolytica*. Die beiden aus pasteurisierter Milch hergestellten Weichkäse Limburger und Münster hatten im Innern und auf der Oberfläche eine vergleichbare und homogene Zusammensetzung der Hefeflora bestehend aus 3 – 5 Spezies. Tête de Moine, ein aus Rohmilch hergestellter Halbhartkäse, wies im Innern eine ziemlich heterogene Hefeflora auf, welche sieben Spezies umfasste. Die Oberflächenflora jedoch bestand hauptsächlich aus *D. hansenii*. Die Hefezahlen von 100 – 1'000 KBE/g im Innern der Käse waren immer um einiges tiefer als auf der Oberfläche.

Der überwiegende Teil der aus den drei Käsesorten isolierten Hefen konnten mittels Slurry-Versuchen in zwei Gruppen eingeteilt werden. Eine Gruppe war charakterisiert

durch die Fähigkeit, Glukose zu fermentieren, Laktat zu verwerten und das pH in den Slurries zu erhöhen, war jedoch nicht proteolytisch. Das Aroma der Slurries wurde vor allem als sauer, fruchtig und fermentiert empfunden. Die zweite Gruppe war aus nicht fermentierenden Hefen zusammengesetzt, welche Laktat verwerteten aber das pH der Slurries nicht beeinflussten. Diese Spezies waren proteolytisch aktiv und ergaben ein käsiges Aroma. Für die Produktion der foliengereiften Raclette-Modellkäse wurden aus der ersten Gruppe *Pichia jadinii* und aus der zweiten Gruppe *Gal. geotrichum* und *Y. lipolytica* gewählt. Die vierte Spezies war *D. hansenii* B, ein Isolat aus Tête de Moine, welche sich von den Isolaten aus Limburger und Münster unterschied und Eigenschaften aus beiden oben genannten Gruppen besass.

In den ausgereiften Raclette-Modellkäsen konnten praktisch keine Hefen mehr nachgewiesen werden, höchstwahrscheinlich als Folge von anaeroben Bedingungen im Innern und Äussern der Käse. Somit ist kaum ein Abbau des Laktats zu erwarten. Im Gegenteil, der Zusatz von Hefen hatte sogar eine Erhöhung des Laktatgehaltes zur Folge. Dies könnte auf der Stimulation der Milchsäurebakterien durch Stoffwechselprodukte der Hefen beruhen. Ausserdem könnten die Hefen auch die Synärese des Bruches beeinträchtigt haben mit der Konsequenz eines erhöhten Laktatgehaltes im Käse. Der Lipidstoffwechsel kann mit grosser Wahrscheinlichkeit auf Esteraseaktivität (*Gal. geotrichum* und *D. hansenii* B) und/oder auf Lipaseaktivität (*P. jadinii* und *Y. lipolytica*) zurückgeführt werden. Alle ausser *Y. lipolytica* wiesen eine peptidolytische Aktivität unter Freisetzung kleinerer Bruchstücke und Aminosäuren auf. Zusätzlich förderten alle Spezies ausser *Gal. geotrichum* die Bildung von biogenen Aminen. Schliesslich beeinflussten die Hefen die sensorische Qualität der Käse signifikant. *Y. lipolytica* konnte das Flavour der Käse i.a. verbessern, alle andern jedoch eher verschlechtern.

Gal. geotrichum, *P. jadinii* und *D. hansenii* sind Spezies, die in der Käseherstellung häufig eingesetzt werden. Aus den Ergebnissen mit den foliengereiften Raclette-Modellkäsen kann gefolgert werden, dass Hefen immer in Kombination eingesetzt werden sollten. Zur Verbesserung der sensorischen Eigenschaften darf *Y. lipolytica* nie fehlen. Zur Unterdrückung der Bildung von biogenen Aminen könnte *Gal. geotrichum* von Nutzen sein. Da jedoch kaum mehr Hefen im reifen Käse nachgewiesen wurden,

kann die Wirkung der Hefen auf die Aktivität ihrer Enzyme nach Freisetzung durch Zellyse zurückgeführt werden.