



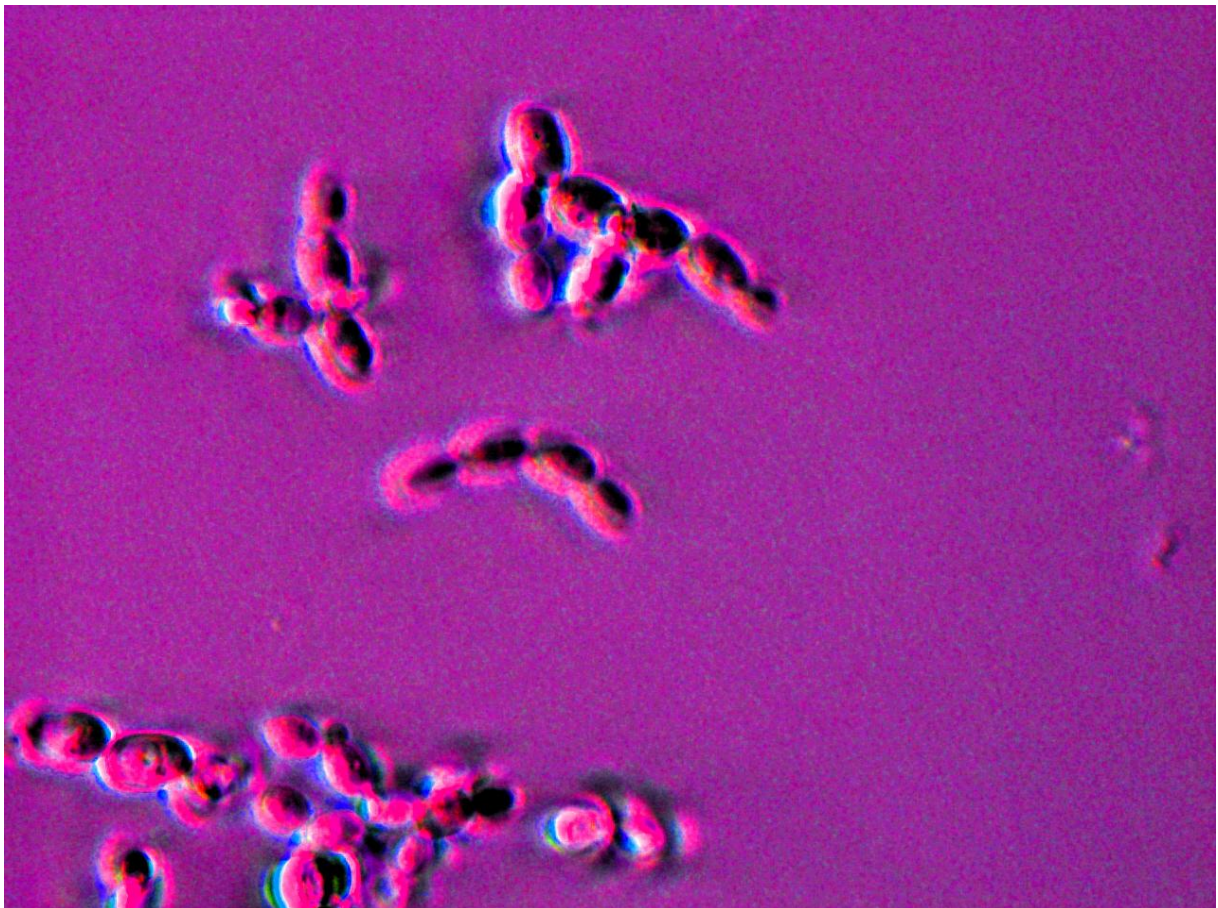
Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds-  
och växtproduktionsvetenskap

# Äppeldoft från äppeljäst?

Apple fragrance from apple yeast?

*Axel Carl-Wilhelm Ögell Benediktsson*



Kandidatarbete i biologi • 15 hp  
Hortonomprogrammet  
Alnarp 2014

## **Äppeldoft från äppeljäst?**

Apple fragrance from apple yeast?

*Axel Carl-Wilhelm Ögell Benediktsson*

**Handledare:** Malin Hultberg, SLU, Institutionen för biosystem och teknologi

**Examinator:** Lotta Nordmark, SLU, Institutionen för biosystem och teknologi

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** G2E

**Kurstitel:** Kandidatarbete i biologi

**Kurskod:** EX0493

**Program/utbildning:** Hortonom

**Examen:** Kandidatexamen i biologi

**Ämne:** Biologi

**Utgivningsort:** Alnarp

**Utgivningsmånad och -år:** maj 2014

**Omslagsbild:** Axel Carl-Wilhelm Ögell Benediktsson

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** *Jäst, Doft, Äpple, Isolera, Jäsning, Sekundära Metaboliter, Estrar, Aromatisk*

## **Förord**

Jag vill tacka Malin Hultberg, min handledare, som har varit intresserad, trevlig, tålmodig och hjälpt mig att hitta min frågeställning. Jag vill tacka Lotta Nordmark, min examinator, för att hon inspirerat mig. Jag vill även tack Suzanne Benediktsson för att hon hjälpt mig korrekturläsa mitt arbete.

- Axel Benediktsson, 2014-05-16.

## Sammanfattning

Samma typ av jäst, *Saccharomyces cerevisiae*, har använts för att jäsa produkter under en lång tid. Jäst har en potential att förändra en produkt genom olika sekundära metaboliter. De sekundära metaboliterna kan ändra sättet vi uppfattar produktens smak och doft. Metaboliterna kan skapa smaker och dofter som normalt sätt inte är associerat med exempelvis bröd. För att testa potentialen att producera doft hos jäst, isolerades jäst från utvalda äpplen och odlades. Jäst från äpplet Rubin Star kunde producera en söt och äppellik doft. Arbetet visar att vildjäst har potentialen att producera aromatiska dofter.

The same type of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, has been used to ferment products for a long time. Yeast has a latent potential to change a product using different secondary metabolites. The secondary metabolite is able to change the way we perceive a products' flavor and scent. They can create flavors and scents that usually would not be associated with for example bread. To test its scent-producing potential, yeast was isolated from selected apples' and grown. Yeast from the apple Rubin Star was able to produce a sweet and apple-like scent. They study shows that wild yeast has the potential to produce aromatic scents.

## Innehållsförteckning

Introduktion .....	1
Vad är jäst.....	1
Jästhistoria .....	2
Jästs applikationer .....	3
Jäsning .....	4
Sekundära metaboliter .....	6
Doft.....	7
Syfte .....	9
Avgränsningar .....	9
Material och metod.....	9
Resultat.....	11
Diskussion .....	18
Slutsats .....	21
Referenser.....	21

## Introduktion

Jäst används för att förbättra många olika produkter och en god doft kan ge produkten ett bra intryck. Jäst kan producera många olika typer av ämnen som både kan försämra och förbättra produktens doft, vilket kan göra det svårt att hitta en bra jäststam (Fleet 2003; Virginia et al. 2003). Speciellt hos alkoholhaltiga drycker har jästens påverkan på smak och doft forskats mycket på och visat att det finns hundratals olika ämnen som produceras av jäst vilket påverkar vinet (Fleet 1990, 2003; Lambrecht och Pretorius 2000; Nykänen 1986). Genom att använda en jäst som producerar en god och aromatisk smakprofil, kan produkten förbättras och skapa ett mervärde. Idag använder man till stor del enbart *Saccharomyces cerevisiae* (Explore yeast 2014a; Fleet 2003; Zambonelli 1989). För att få en bättre förståelse om jäst, dess användning, jästens metaboliska processer och hur detta har utvecklats kommer det genomföras en faktainsamling.

I studien kommer vi att isolera jäst från äpplen så att vi kan testa om dem producerar en äppeldoft som skulle kunna användas för att förbättra upplevelsen hos produkter för konsumenter.

## Vad är jäst

Jäst är en encellig, eukaryot svamp som har 16 linjära kromosomer och består till stor del av vatten, protein, kolhydrater, fett, mineralämnen och B-vitaminer (Explore yeast 2014a; Jästbolaget 2014). Trots att jäst är encellig, är den cellulära organisationen lik den hos högre organismer (Tuller et al. 2009). Proteinerna i jästsvamparna består till stor del av enzymer som är avgörande för jäsning (Jästbolaget 2014).

Jäst tillhör 2 olika fylum, Sporsäcksvampar, *Ascomycota*, och Basidiesvampar, *Basidiomycota* (Dujon 2010; Hogg 2005; Kurtzman 2005; SGD 2014; Suh et al.

2006). Tillsammans bildar dem underriket Dikarya och de sanna jästsvamparna tillhör stammen Sporsäcksvampar, *Ascomycota*, och ordningen *Saccharomycetales*. De sanna jästsvamparna skiljer sig genom att de knoppar av sig i nya celler. Flera olika karaktärsdrag som urskiljer den sanna jästsvamparna kan även hittas i askosporer, kolonier och den cellulära fysiologin.

Jäst hittas nästan överallt, men isoleras främst från sockerrika källor så som blommor, frukt, bär och exsudat från växter (Ho et al. 1998; Jästbolaget 2014). Jäst behöver kolhydrater för att överleva och har därför mer diversitet på sockerrika källor.

*Saccharomyces cerevisiae* är en vanligt förekommande jästsvamp och kallas inom respektive bransch för bagerijäst och bryggerijäst (Explore yeast 2014a). Det finns olika stammar av *S. cerevisiae* för olika användningsområde. Öl, vin, sprit, industriell alkohol och bröd är exempel på produkter som har förändrat jästens användning och jäsningens egenskaper (Explore yeast 2014b). Trots att det till stor del används bara en jästart är möjligt att jästen används till olika produkter för att olika stammar är specifikt anpassat för olika förhållanden och kan producera olika ämnen.

## Jästhistoria

1876 gjordes det första vetenskapliga försöket av *S. cerevisiae* av Louis Pasteur (Explore yeast 2014b). Försöket gav möjligheter till urval och lagring av de bäst anpassade jäststammarna för jäsning. Idag använder man sig av kontrollerad jäsning genom temperaturkontroller (Jästbolaget 2014). När man först upptäckte jäst förlitade man sig på spontan jäsning och gjorde så under en lång tid (Explore yeast 2014b).

Vid selektering tittar man på olika aspekter så som hur bra jästen använder sig av substratet, vilka smaker och dofter som bildas, optimala temperaturer samt resistens mot höga respektive låga temperaturer (Explore yeast 2014b). Vid industriell användning tittar man mer på specifika fysiologiska egenskaper (Ekunsanmi och Odunfa 1990). Etanoltolerans, sockertolerans och invertas aktiviteter är tre viktiga egenskaper som utvärderas för uppskatta jäststammens potential. (Tikka et al. 2013)

Det finns olika typer av användning idag för jäst. Hos vin finns det flera olika jästsläkter och arter som hittas på druvorna (Fleet 2003; Zambonelli 1989). Trots

detta är *S. cerevisiae* den primära jästarten som används. Beroende jästart producerar de olika mängder av specifika sekundära metaboliter vilket påverkar både smak och doft. Ofta kallas dessa jästsvampar för icke-*Saccharomyces* jäst och risken vid användning denna typ av jäst vid jäsning är att de kan producera för höga mängder av sekundära metaboliter så som ättiksyra och acetaldehyd som kan förstöra karaktären hos vin (Benda 1982; Schütz och Gafner 1993). Ho et al. (1998) skriver även att *Saccharomyces* är den säkraste och mest effektivaste jästen vid jäsning av socker till etanol. Inom industrin anses även *Saccharomyces* som den bästa jästen för att jäsa glukos baserade agrikulturella produkter till alkohol (Ho et al. 1998).

## Jästs applikationer

Jäst används och finns i flera olika produkter där de påverkar produkten genom alkoholjäsning, biokatalysering av smakneutrala druvkomponenter till smakaktiva komponenter och autolys, nedbrytning av döda jästceller, lipolys och proteolys (Fleet 1990, 2003; Jakobsen och Narvhus 1996). Lipolys är nedbrytningen av lipider genom hydrolys av triglycerider till glycerol och fria fettsyror. Proteolys är nedbrytningen av proteiner till mindre polypeptider eller aminosyror.

Välkända produkter så som vin, cider och mejeriprodukter påverkas av jäsning. Jäst står till exempel för en stor del av karaktären och smak hos vin och mejeriprodukter så som mjölk, yoghurt, ost och kefir (Fleet 1990, 2003; Jakobsen och Narvhus 1996). Jästen påverkar även kvalitén hos vindruvorna innan skörd genom att agera som en biokontroll av mögel. Jäst kan även påverka produkterna negativt. Mejeriprodukter kan förstöras genom gasproduktion, fel typer av aromer och missfärgning. Vin kan även påverkas negativt, som nämns under jästs historia, genom en för hög produktion av fel sekundära metaboliter (Benda 1982; Schütz och Gafner 1993).

Den mikrobiella ekologin och kemiska kompositionen hos jästa produkter påverkas av interaktioner mellan jäst, bakterier och hyf-bildande svamp. (Fleet 1993a; Fugelsang 2007; Liu et al. 2004a). Interaktioner så som mutualism, synergism,



antagonism och parasitism påverkar jäsningsen (Boddy och Wimpenny 1992). Dessa olika interaktioner kan bland annat förhindra tillväxt hos andra mikroorganismer och verka i synergi för att förbättra produktens smak. Exempelvis är laktobakterier, *Lactobacillus*, ett viktigt släkte för mejeriprodukter då de kan jäsa olika sockerarter till mjölksyra. Efter flera olika experiment kunde man observera att *S. cerevisiae* och laktobakterier hjälps åt för att förbättra produkten (Martin et al. 1999; 2001; 2002). Exakt vad som händer är att jästen bidrar med alkoholerna som används av laktobakterierna för estersyntes.

Estrar är de övervägande smakämnen hos äpple och äppleprodukter som skapar den karaktäristiska fruktiga äpplesmaken (Cunningham et al. 1986, Durr och Rothlin 1981). Äppleciderns smak beror på syntesen av smakämnen under mognaden av äpplet som fortsätter även under tillverkningen av äpplecider (Cunningham et al. 1986; Poll 1988).

## Jäsning

Jästsvampar har en mer intensiv tillväxt än vanliga organismer vilket beror på att de är encelliga organismer (Jästbolaget 2014). Jäst kan tillväxa från 10 mg till 150 ton på en vecka och styrs till stor del av temperatur, syre och tillgänglig mängd näring. Genom att kontrollera temperaturen kontrollerar man även aktiviteten hos jästen. Vid låga temperaturer kan man söva jäst, diverse sänka metabolismen och därmed tillväxten, och vid 50 °C dör jästen. Temperaturen kan göra stor skillnad när man jäser (Molina et al. 2007). Vid 15 °C kommer etanolkoncentrationen, flyktiga ämnen och biomassan vara högre än vid 28 °C och beror mycket på vad jäststammen är anpassad efter (Explore yeast 2014b; Molina et al. 2007).

Beroende på om jästen befinner sig i en syrerik eller syrefri miljö ändras dess metabolism (Explore yeast 2014a). I en syrerik miljö omvandlar jästen socker och syre till koldioxid, vatten och energi. Energin ger jästen en möjlighet att tillväxa och denna metaboliska process kallas för respiration. Jästcellerna förökar sig genom primärt genom asexuell avknoppning av nya celler (Jästbolaget 2014). I en syrefri miljö sker istället jäsning. Denna metaboliska process omvandlar socker till koldioxid

och alkohol (Explore yeast 2014a; Jästbolaget 2014). Energin som frigörs under jäsningen är lägre än för respirationen och ger inte samma tillfälle för jästen att föröka sig.

Olika typer av jästsvampar kommer att dominera beroende på vilket steg man är i vildjäsningen, och detta styrs av alkoholhalten (Fleet 1993a, b). I de tidigare stegen kommer jästsvampar från släkten *Kloeckera*, *Hanseniaspora* och *Candida* att dominera. När alkoholhalten ökar och når 3-4% etanol blir arter inom släktena *Metschnikowia* och *Pichia* dominerande. Senare steg tas istället över av alkoholtoleranta stammar hos *S. cerevisiae*. Flera olika jästsvampar kan även hittas under jäsningen från släktena *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea* och *Cygosaccharomyces*.

I flera experiment har man observerat att det finns en stamdiversitet hos *S. cerevisiae* isolerad från en given jäsning (Frezier och Dubourdieu 1992; Polsinelli et al. 1996; Querol et al. 1992; Schütz och Gafner 1993). De olika stammar av *S. cerevisiae* vilket ger en variation hos produkten då de producerar olika mängder av specifika sekundära metaboliter.

Jäsningen är den positiva huvudaktiviteten som jäst tillför vinsmaken (Henschke, 1997). Detta sker genom att omvandla ämnen hos druvjuice till etanol och andra ämnen som estrar, aldehyder, syror och monoterpener (Fleet 2003; Lambrechts och Pretorius 2000). Dessa produkter hjälper till att extrahera smakämnen från druvjuicen genom att producera enzymer som transformerar det neutrala druvmediet till hundratals olika smakaktiva sekundära metaboliter. Clemente-Jimenez et al. (2005) påstår att jäst påverkar smaken hos vin på tre olika sätt: genom att ändra på ekologin, genom metaboliska och enzymatiska aktiviteter och det organoleptiska intrycket. Hos vin använder man olika underarter för att ta fram distinkta smaker och höja smak hos specifika druvvarieteter (Explore yeast 2014b). Jästen hjälper till att skapa en rundare och mindre sträv smak hos viner med mycket tanniner. Hos bröd lyfts degen av den bildade koldioxiden och de sekundära metaboliterna verkar som smakämnen (Jästbolaget 2014).

## Sekundära metaboliter

Sekundära metaboliter är ämnen som bildas av levande organismer så som växter och jäst och inte är viktiga för funktioner som tillväxt, utveckling och reproduktion (Boundless 2014; Rodney et al. 2000). Man har sett en trend av att de har ekologiska funktioner så som att agera som en försvarsmekanism som till exempel antibiotika och förbättra symbiosen mellan organismer (Demain och Fang 2000; Rodney et al. 2000).

Hos jäst bildas det många olika sekundära metaboliter (Nykänen 1986). När jästen jäser bildas etanol och koldioxid, som nämnts innan men det bildas även flera hundratals olika sekundära metaboliter (Lambrechts och Pretorius 2000; Nykänen 1986). Över 400 flyktiga sekundära metaboliter från jäst har identifierats och används idag indirekt av människor för att förbättra produkters smak och doft. Det finns en stor variation av olika typer av sekundära metaboliter som bildas (Fleet 2003; Lambrechts och Pretorius 2000). Syror, alkoholer, estrar, polyoler, aldehyder, ketoner, fenoler, monoterpener, karbonylgrupp och flyktiga svavelföreningar är alla olika typer av sekundära metaboliter som kan bildas vid jäsning.

I arbetet kommer vi att fokusera på estrar för att de producerar fruktiga och aromatiska dofter och det finns flera som påminner om äpple (Janssens et al., 1991; Sumby et al. 2010; Sweigers et al. 2005)

## Doft

Sweigers et al. 2005 har sammanfattat hur jäst påverkar vins smak och doft. Bland de olika stora grupperna påverkar estrar den jästa produkten genom fruktiga och aromatiska dofter och smaker. Estrar representerar även en av de största grupperna av smakkomponenter hos jästa produkter (Mason och Dufour 2000; Rapp och Mandery 1986).

Estrar behöver en alkohol och en karboxylsyra för att syntetiseras (Mason och Dufour 2000). Estrar kan formas genom en kemisk reaktion av syror och alkoholer vid lågt pH (Margalit 1997). Reaktionshastigheten hos denna typ av syntes är däremot för långsam för att kunna motsvara de mängder som man hittar i alkoholhaltiga drycker. Estrar kan även katalyseras av acyltransferas eller "ester syntas" (Lilly et al. 2000; Liu et al. 2004b; Mason och Dufour 2000; Nordström 1962). Reaktionen får sin energi genom en tiolester bindning av acyl-coenzym A. Estrar kan produceras via enzymatisk estersyntes genom katalysering av esteraser samt lipaser som produceras av flera olika mikroorganismer som hittas bland annat i mat.

Vilken jäststam som används är en av ester produktionens viktigaste faktorer (Verstrepen et al. 2003). Beroende på stam kan den totala esterproduktionen öka eller påverka de relativa proportionerna av individuella estrar som blir producerade. Cunningham et al. 1986 visar i studien att doften hos äpple är orsakad av olika ämnen beroende på sort, som tyder på olika typer av jäststammar. Rankine (1967) fann även att esterproduktion under alkoholjäsning beror på specifika jästarter.

En komplex smak byggs oftast upp av flera olika estrar där etylacetat, isoamylacetat, fenetylacetat, hexylacetat och etylkaprylat är ett par välkända estrar (Ebeler 2001; Mason och Dufour 2000). Vanligt förekommande estrar har 6 till 10 korta fettsyror med en etanolgrupp, etylestrar. Bland etylestrarna står de med 4 till 10 korta fettsyror för en stor del, om inte helt exklusivt, för den fruktiga aromen hos jästa produkter (Ebeler 2001). Sumbly et al. (2010) har sammanställt fakta och möjligheter om aromatiska estrar i vin. Hos vin är de normala mängder flyktiga ämnen är 0,5 % och av detta är 35,73% estrar.

Virginia et al. (2003) odlade olika arter av jästsvampar i mixade och rena kulturer för att se om jäsningsen skiljer sig åt. När hade en renkultur av *S. cerevisiae* noterades en högre etanolhalt och större mängd totalt med alkoholer. Mixade kulturer av *S. cerevisiae* och *Pichia anomala*, *S. cerevisiae* och *Hanseniaspora guilliermondii* producerade en högre mängd ättiksyra och lägre totalmängd av alkoholer. Eglinton et al. (2000) jämförde *S. cerevisiae* med *Saccharomyces bayanus* och visade att *S. bayanus* producerade mer aldehyder som resulterar i en mer nötig och jästig smak. *S. cerevisiae* producerar mer estrar och skapar istället fruktiga smaker så som ananas, persika och citrus.

Mixade kulturer noterades ha liknande jäsningspotential som rena kulturer av *S. cerevisiae* och en högre mängd av syntetiserade acetaldehyder. Man kan notera att de olika jästarterna är olika bra på att producera olika typer av sekundära metaboliter. I rena kulturer kan man konstatera att *S. cerevisiae* var den bästa producenten av alla etylestrar, förutom etyl 3-hydroxibutytrat.

Jackson (1994) hävdar att mängden etylacetat som produceras vid mixade kulturer är ett problem då de anses påverka nedbrytning. Värden mellan 150 - 200 mg/L anses kunna påbörja nedbrytning hos karaktären i vin. *Saccharomyces cerevisiae* ligger under gränsen med 60 mg/L och mixade och rena kulturer av icke-*Saccharomyces* jästsvamparna var alla ovanför 150 mg/L. Vid dessa mängder påverkas smaken av produkten negativt och kan upplevas som aceton.

Estrar vi är ute efter är etylhexanoat, acetaldehyd, etylkaproat, etyl 2-metylbutanoat och isobutylacetat för att de producerar en äppeldoft (Sumbly et al. 2010; Swiegers et al. 2005).

## Syfte

Studiens syfte är: 1) att testa den doftproducerande potentialen hos vildjäst isolerat från äpple, 2) se om vildjästen kan producera en söt och äppellik doft och 3) att undersöka hur svårt det är att isolera jäst från ett äpple.

## Avgränsningar

Faktainsamlingen kommer att fokusera på hur jäsningen påverkar produkter idag, hur metoder och jästen har ändrats. Den jäst som isoleras kommer att jämföras morfologiskt med identifierade jästarter och kommer inte att identifieras med polymeraskedjereaktion, PCR. Potentiella ämnen som doftar kommer att tolkas genom ett dofttest och inte identifieras av vanligt använda metoder så som tränad doftpanel eller kemiskt analys med gaskromatograf, GC.

Jäst kan ändra en produkt på olika sätt och arbetet kommer att fokusera på estrar som bildas som sekundära metaboliter och produceras under jäsningen.

## Material och metod

Jäst från olika äpplesorter isolerades. De utvalda äpplesorterna var Granny Smith från Frankrike, Royal Gala eko från Österrike och Rubin Star från Sverige. Näringslösningen bestod av Yeast Extract-Peptone-Dextrose, YPD, broth med 200 µg/mL tetracyklin. Kurtzman et al. (2011) har sammanfattat om hur man isolerar jäst och visar att tetracyklin hämmar tillväxten hos prokaryota mikroorganismer så som bakterier. Tre gram skal skars bort från äpplena och placerades i varsin flaska med

näringslösning inklusive tetracyclin. Flaskorna sattes på skak i rumstemperatur under 3 dagar för att skapa en mer syrerik miljö i mediet (Explore yeast 2014a).

En spädningsserie på  $10^7$  gjordes på de tre flaskorna och serierna 2-7 odlades upp på petriskålar, med samma näringslösning och agar, med 2 replikat. Stamlösningen och spädningsserien observerades i mikroskop för att observera vad som växt. Petriskålarna förslöts i plast och inkuberades i 25°C i 3 dagar. Tillväxten i petriskålarna noterades och enstaka jästkolonier valdes ut för vidare odling i provrör med 4 ml av samma näringslösning. Kolonier togs från petriskålarna så att alla äpplena representerades och majoriteten togs från spädning 3-5. Provrören märktes efter vilket äpple de kommit ifrån och totalt valdes 78 stycken kolonier ut.

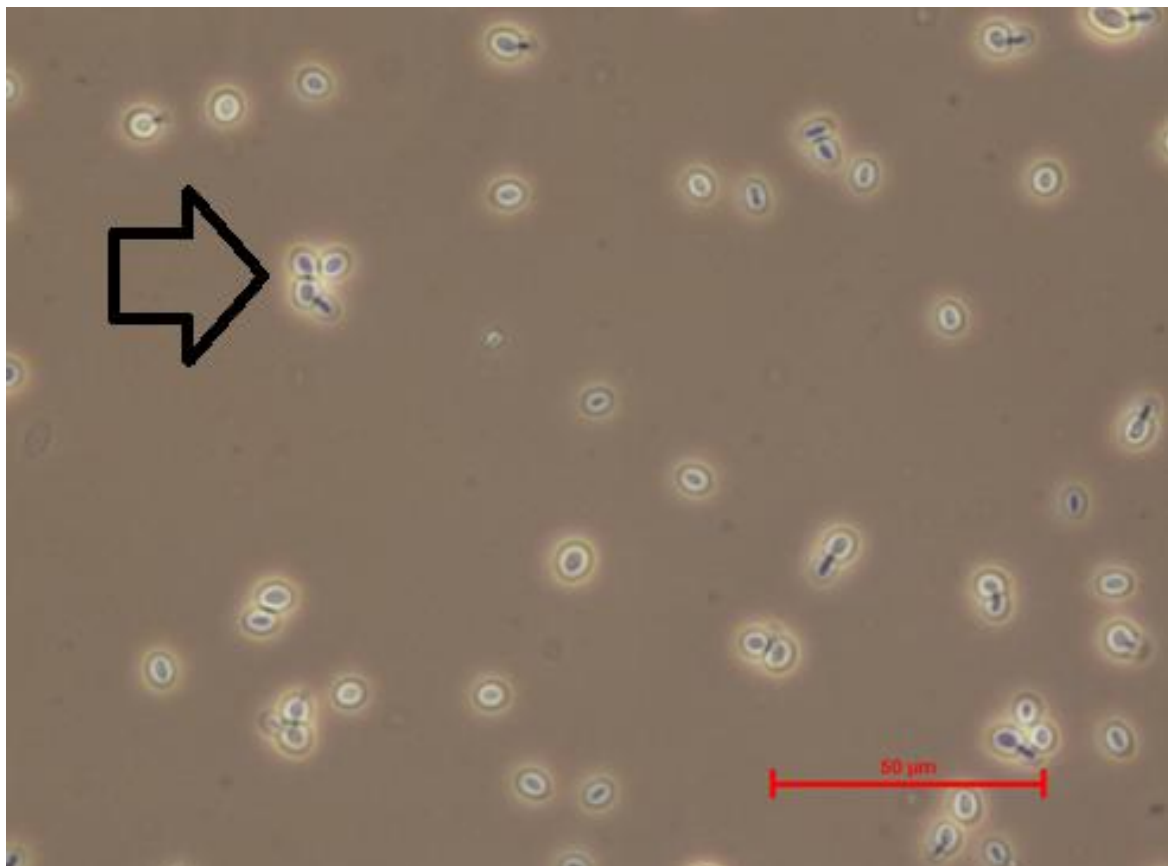
Efter 3 dagar på skak påbörjades dofttestet av Axel Benediktsson på alla provrören. Först utfördes en grovsortering mellan de bra och sämre provrören baserat på styrkan hos doften. 2 dagar senare utfördes dofttestet, finsortering. Vid dofttestet användes ett rent medium som neutral, för att inte missta dess doft för den potentiella doften jästen producerat. Dofttestet delades in i 3 delar och varje del representerade varje äppelsort. Doftefter 3 olika egenskaper: om de doftade, styrkan på doften och vad de doftade. Detta lämnade 2 provrör med jästkolonier som ströks ut på petriskålar i sterilbänk och stamlösningen från provrören överfördes till 2 nya provrör. 5 dagar efteråt utfördes examination på provrören och petriskålarna. Efter detta överfördes kolonier från de två petriskålar till nya plattor.

Antal provrör med doft inom varje äppelsort och unik jästkoloni har jämförts med Anova med Tukeys eftertest med Minitab, version 16 ( $p=0.05$ ).

Även en faktainsamling gjordes för att få en fördjupad kunskap om jäst och dofter samt som stöd för att bygga upp det experiment som beskrivs ovan.

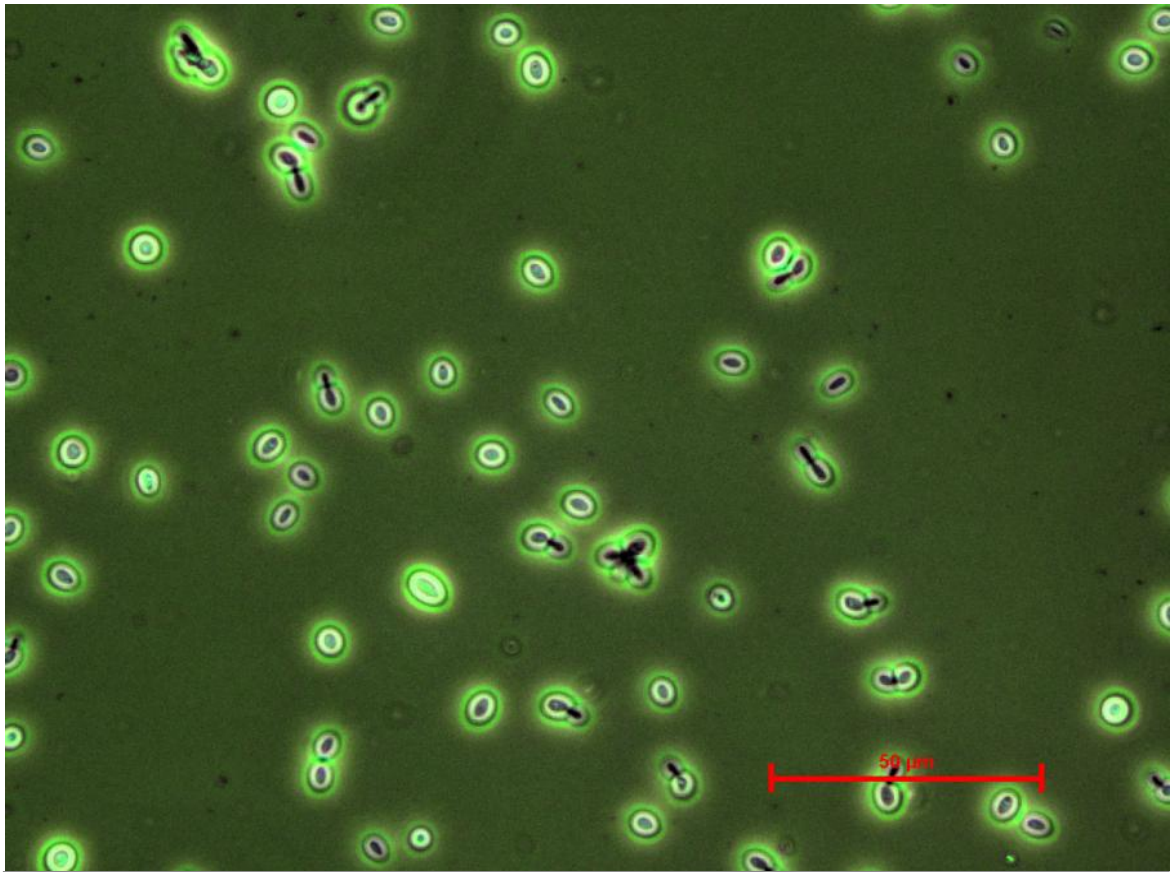
## Resultat av jästisolering

Efter en observation kunde det noteras en söt doft från kulturen med Granny Smith och även en oidentifierad doft från kulturen med Rubin Star hos de 3 initiala kulturerna som odlades från äppleskal. Oidentifierad jäst odlades upp hos de 3 initiala kulturerna och efter tillväxt gjordes en spädningsserie som undersöktes i mikroskop. Kurtzman et al. (2011) har sammanfattat fenotypisk igenkänning som kommer användas för att lättare identifiera vad figurerna visar. Figur 1 visar jästceller från Granny Smith och man kan tydligt se flera stycken som håller på att dela sig. Några delar på sig en åt gången och om man granskar där pilen visar kan man se en som har fyra celler som håller på att dela sig samtidigt. Denna typ av förökning kallas för avknoppning (Jästbolaget 2014).

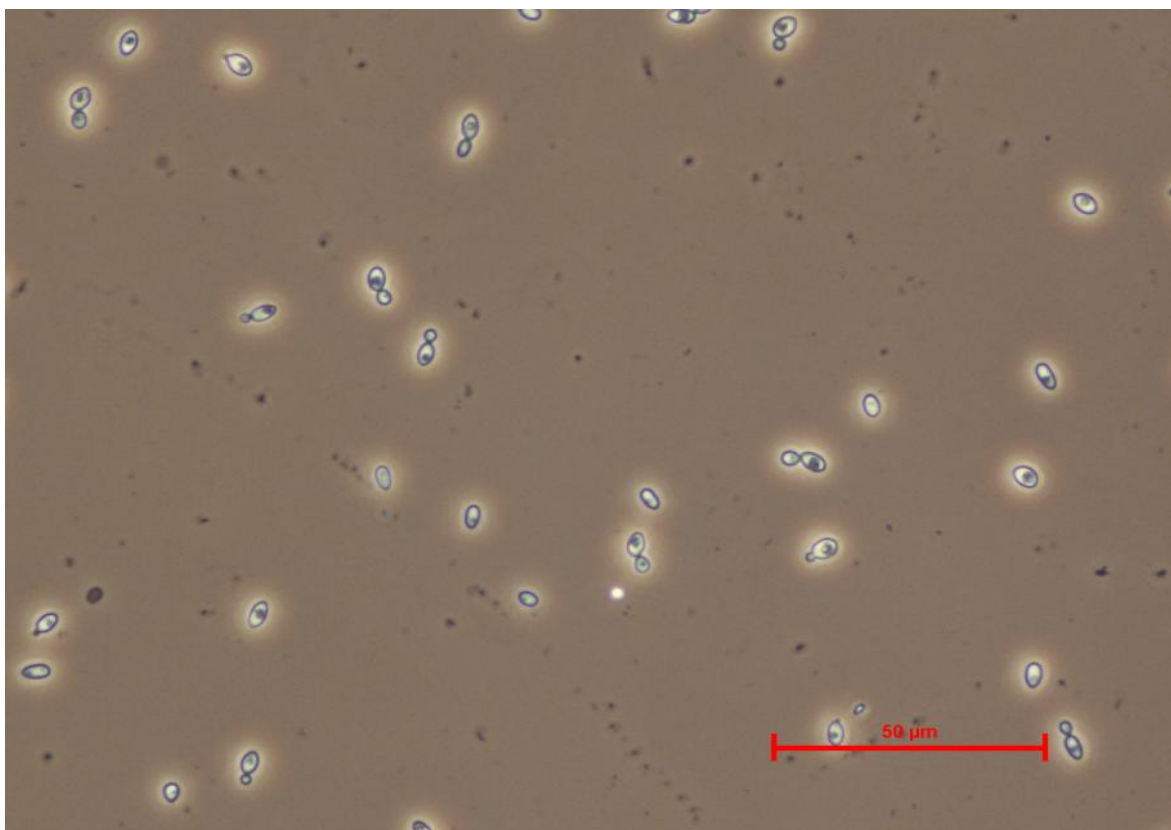


Figur 1. Mikroskopbild på Granny Smith. Jäst som delar på sig genom avknoppning.





Figur 2. Mikroskopsbild från Royal Gala. Tydlig på bild på jästceller som knoppar av sig.



Figur 3. Mikroskopsbild från Rubin Star. Bild på jästceller som knoppar av sig.

I figur 2 kan vi se jäst från Royal Gala som är runda till avlånga och som även dem knoppar av sig. På båda figurerna kan man se som en svart stav som kopplar ihop cellerna och är väldigt tydligt på figur 2. Även i figur 2 kan man se flera celler som håller på att knoppa av samtidigt.

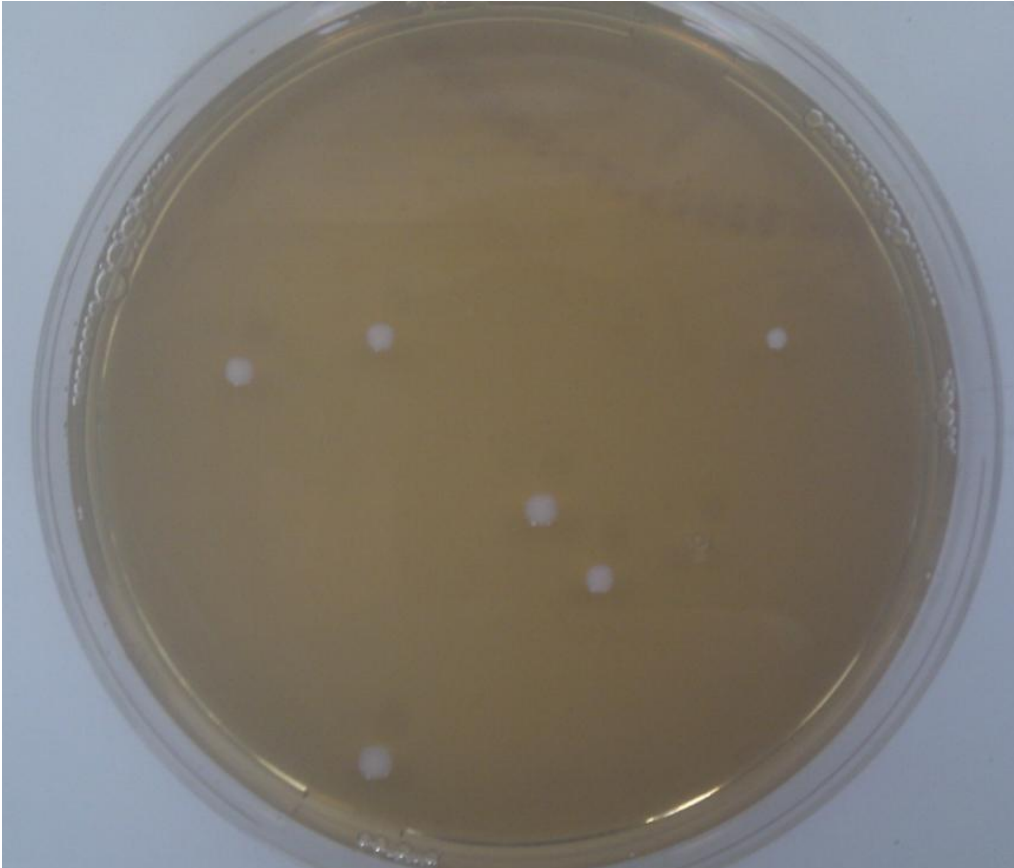
I figur 3 kan vi se jästceller hos Rubin Star. De skiljer sig tydligt från Granny Smith och Royal Gala då de är mindre och mer avlånga. Avknoppning sker även här.

Jästen hos alla äpplesorter har likheter och skillnader, speciellt lika är jästen från Granny Smith och Royal Gala. Alla verkar dela på sig genom avknoppning samt har en rund till avlång cell. Rubin Star är tydligaste utstickaren då den är betydligt mer avlång och mindre än de andra.

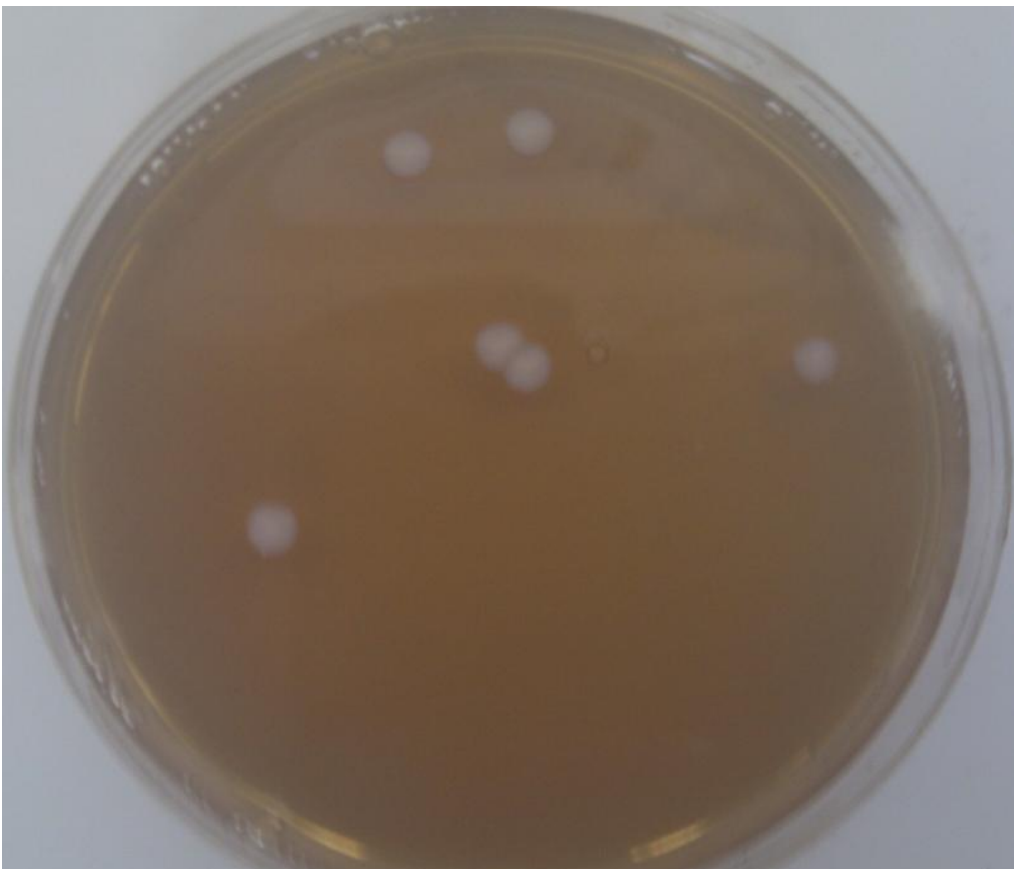
Spädningsserie två till sju med två replikat för varje äpple ströks ut på agarplattor för att se hur kolonierna hos jästen ser ut. Efter att ha undersökt alla plattor kunde vi notera att någon typ av svampinfektion hade skett på mediet som hade påverkat resultatet. Figur 4 visar tydligt svampinfektionen som har skett. Detta är från äpplet Granny Smith och vi kan även notera röda jästkolonier och även några vita kolonier som antas vara jästkolonier. Båda isolerades till provrör för ett dofttest.



Figur 4. Agarplatta med jäst från Granny Smith, spädningsserie 2, replikat 1 med tydlig svampinfektion.



Figur 6. Agarplatta med jäst från Royal Gala, spädningsserie 3, replikat 2.



Figur 5. Agarplatta med jäst från Rubin Star, spädningsserie 3, replikat 2 med svampinfektion.

Figur 5 visar tydliga, runda vita jästkolonier från Rubin Star. De är betydligt större än dem hos Granny Smith och likheten är att alla jästkolonier är runda, flera isolerades till dofttest.

Vi kan se på figur 6 hur kolonierna ser ut hos Royal Gala. De liknar kolonier hos Rubin Star men är betydligt mindre i storlek, detta tyder på att alla äpplen har olika typer av jästarter och stammar.

Provrören märktes efter äpple och olika jästkolonier. Dofttestet utfördes av Axel Benediktsson. En flaska med medium användes som utgångspunkt för att kunna urskilja en eventuell doft från mediumet. Vi hade fyra olika typer av jäst från tre äpplesorter, som alla presterade olikt.

De vita jästkolonierna från Granny Smith, hade en majoritet med en enbart mild till medel söt doft utan någon karaktär. De röda jästkolonier från Granny Smith, hade få med doft och de få som doftade hade en ruten lukt. De vita jästkolonier hade den största potentialen från Granny

Smith men dem producerade inte en aromatisk och söt doft som påminde om äpple. Majoriteten av Rubin Stars jästkolonier hade en medel till stark, söt och äppellik doft. Fyra av dessa kolonier hade en speciellt tydlig karaktär. Hos Royal Gala hade majoriteten en stark lukt. Få hade ingen till medel lukt, och det var en stickande sur och ruten lukt som identifierades.

*Tabell 1. Dofttest efter unika jästkolonier som hittas. Signifikansen är gjord med Tukeys metod 95 %.*

Jästkoloni	Antal med doft	Totalt	Signifikans
Granny Smith, vita	7	9	AB
Granny Smith, röda	3	10	B
Rubin Star	23	26	A
Royal Gala	26	33	A

*Tabell 2. Dofttest efter äpplesort. Signifikansen är gjord med Tukeys metod 95 %.*

Jästkoloni	Antal med doft	Totalt	Signifikans
Granny Smith	10	19	B
Rubin Star	23	26	A
Royal Gala	26	33	AB



Figur 7. Provrör med isolerade jästkolonier från agarplattor med alla äpplen representerade.

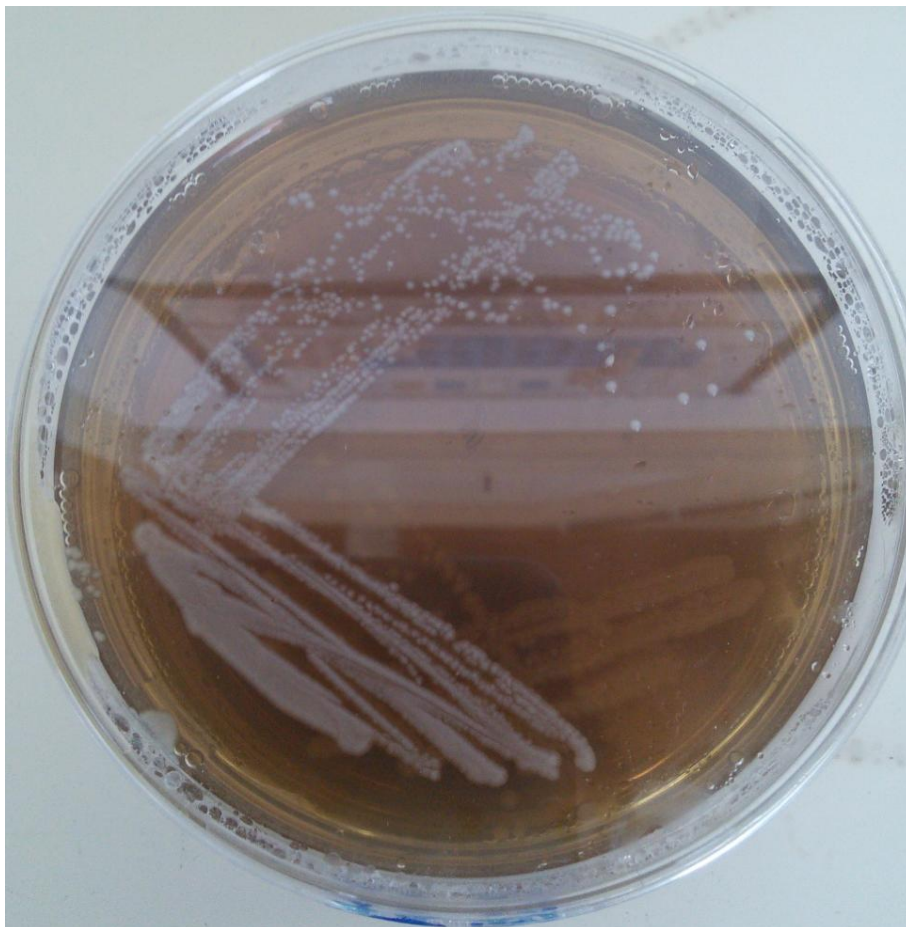


Bild 8. Skillnad i grumlighet mellan provrör som doftade och inte doftade. Höger är en starkt doftande 4j, Rubin Star, och den vänstra är en med svag doft.

Troligen hade både Royal Gala och Granny Smiths producerat någon form av svavelförening som kunde förklarat denna lukt. I figur 8 ser man en påtaglig skillnad mellan provrör som inte doftade och doftade starkt, lösningen i provrören var mer grumligt i de som doftade starkt och genomskinligt hos de som inte doftade vilket troligen beror på skillnader i tillväxt. Efter en grov- och finsortering valdes två stycken provrör ut från Rubin Star för att de producerade den sötaste och mest äppellika doften. Den mest söta och aromatiska av de två, namngavs 4s, och den andra hade en lite mer sur ton i doften och namngavs, 4b.

Figur 9 visar tydligt hur jästkolornierna från isolat 4s, Rubin Star.

Vi kan se i tabell 1 att den enda signifikanta skillnaden mellan jästkolonier som producerar en doft eller inte, är de röda jästkolornierna från Granny Smith. Den producerar alltså mindre dofter än de andra unika jästkolornierna som isolerats. I tabell 2 jämför vi istället dofttestet mellan äpplesorterna och ser att Granny Smith är skiljt från Rubin Star. Då Royal Gala delar samma siffror som Rubin Star är båda statistiskt sett lika bra. Vi kan se att Granny Smiths jäst är sämre än Rubin Stars på att producera dofter.



Figur 9. Isolat från 4s, Rubin Star.

## Diskussion

Experimentet gick ut på att försöka isolera en jäststam från äpple som kunde producera en äppeldoft. Jästen från Royal Gala producerade en stickande sur och ruttan lukt som kan ha berott på svavelföreningar (Fleet 2003). Ett oväntat resultat i jämförelse med Granny Smiths söta och okaraktäristiska doft och Rubin Stars söta och äppellika doft. Skillnaden i doft beror till största del på jäststammarnas olika egenskaper (Explore yeast 2014b). Äpplena är av olika sorter från olika gårdar och från olika länder vilket gör att mycket skiljer dem åt och stärker att jästens familj, art eller stam skiljer sig åt. Även hur äpplena har lagrats kan spela roll. Hade det varit samma jästart kan fortfarande den specifika stammen producera olika mängder och typer av sekundära metaboliter. Med denna information kan vi konstatera att eftersom jästen från Rubin Star kunde producera en söt och äppellik doft, beror skillnaden på att jästens familj, art eller stam skiljer sig åt. Skillnaden har inte uppkommit genom att mediumet skulle ha fattats några specifika kolkällor, då Rubin Star kunde producera en söt och äppellik doft.

Jämför man bilderna tagna på jästen i mikroskop och på agarplattorna, kan vi se att de skiljer sig åt och är troligen av olika arter. Alla är jästarterna är troligen samma jästsvampar. Vi kan se att de verkar dela sig genom avknoppning vilket betyder att alla jästarter kommer från ordningen *Saccharomycetales* (Dujon 2010; Hogg 2005; Kurtzman 2005; Suh et al. 2006). Detta betyder dock inte att de behöver vara familjen *Saccharomyces*, då det finns flera olika familjer inom ordningen.

Granny Smith har röda jästkolonier och vita, mer genomskinliga jästkolonier. Jästkolonierna från Rubin Star ser ut att ha mindre jästceller under mikroskopet och större och vita kolonier på agarplattorna, än hos de andra äpplena. Royal Galas jästkolonier har mindre vita kolonier på agarplattorna än hos Rubin Stars och skiljer sig i färgen från Granny Smiths vita jästkolonier. Inga jästkolonier på agarplattorna liknar varandra helt, vilket troligen betyder att de är av olika arter eller familjer.

Att det kommer fram en stickande sur och ruttan lukt från Royal Gala, skulle kunna bero på att det produceras för höga mängder av specifika sekundära metaboliter.

Detta skulle kunna vara svavelföreningar vilket överskuggar andra flyktiga ämnen som kan dofta. Den okaraktäristiska söta doften från Granny Smith beror troligen på att ämnet som doftar är svåridentifierat. Även möjligt är att mängden doftämne producerat, är för låg för att vara tillräckligt tydlig.

Dofttestet utfördes av en otränad person vilket gör det svårt att kalla resultatet definitivt. En tränad doftpanel hade precis och objektivt kunna säga vad för doft eller lukt jästen påminde om. Att tänka på är dock, att ett dofttest för varje person skulle behövas förberedas, då doften från jästen börjar avta efter bara ett test. Dofttestet utfördes troligen även av en partisk person som kan ha omedvetet anpassat doften till vad som personen i fråga "letade efter".

En potentiell indikator för att det producerats en stark doft är grumligheten hos mediumet. Det kunde noteras allmänt att, i alla provrör som var genomskinliga antingen inte doftade alls, eller hade en mycket svag doft. De starkt doftande var även tydligt grumliga. Det kan vara ett tecken på att jästen har jäst längre och att lösningen blir grumlig beror troligen på jäsningsens restprodukter så som döda jästceller. Jästen som isolerats har varierat i egenskaper och kan ha påverkat hastigheten på jäsningsprocessen (Explore yeast 2014b). Om en jäststam kunde få en större tillväxt, resulterar det i att provröret med den jäststammen kommer att jäsa snabbare.

Troligen var plattorna som användes för att isolera jästen infekterade med någon typ av svamp som hade lyckats komma in på en eller flera plattor och sedan spridits. Man hade kunnat undvika detta genom att försegla plattorna enskilt i plast, samt ett bättre sterilt arbete. Trots detta kunde enstaka jästkolonier isoleras till provrör och dofttestet kunde genomföras. Möjligheten att svampsporer följde med existerar och gör det svårare att isolera fram. Ingen störning på resultaten kunde noteras som styrks av att enbart jäst hittades växa i provrören.

Jäst används idag för att förändra flera olika typer av produkter så som mejeriprodukter och alkoholhaltiga drycker (Fleet 1990, 2003; Jakobsen och Narvhus 1996). Jästen kan tillföra en organoleptisk förbättring av en existerande produkt. Att ha en eller flera olika jäststammar som producerar fruktiga dofter kan användas till olika produkter exempelvis bröd. Dessa dofter skulle även kunna användas i butiker för att skapa en helhets känsla samt att ge konsumenter en ingivelse att till exempel inhandla ett äpple eller banan. Aromatiska dofter skulle kunna placeras ut i



exempelvis boxar och användas som dofttest av en produkt. Alternativt skulle doften kunna släppas ut i luften runt om den produkten doften ska locka konsumenter till.

Jästen skulle också kunna användas för sina dofter för att motverka illaluktande ämnen i hem eller i offentliga miljöer utan att använda kemiska ämnen, samt att ge en mer naturlig doft. Kan man ta fram en jäststam som producerar en god doft skulle man kunna gå vidare och testa om den kan producera tillräckliga mängder. För att kunna välja ut en jäst med en god doft kan det vara viktigt att veta vad det betyder. Enligt Oxford Dictionaries (2014) definieras en god doft:

"A distinctive smell, especially one that is pleasant".

Alltså är en god doft en distinkt doft som är trevlig och är alltså inte enbart en söt doft. Dessa idéers bärkraft beror mycket på om jästen kan producera en tillräckligt stark doft, i mindre och större utrymme och i en praktisk behållare med medium under en godtagbar tid. Alternativt skulle man kunna koncentrera doften på industriell skala och sälja den på flaska, istället för att sälja en behållare med jäst, som producerar lite doftämne i taget.

För att fortsätta, behöver man välja ut en riktigt god doft, ta fram en metod för att öka produktionen av aromatiska ämnen och identifiera jästen. Sedan kan man testa doften med en tränad doftpanel och till slut analysera den kemiskt i en GC-MS. Att leta efter jäst på andra källor efter bättre doftproducerande jästart och stam skulle kunna ge andra specifika dofter så som en pärondoft. Det finns inte mycket gjort på jästs doftproducerande egenskap som en förbättrare av produkter som inte är alkoholhaltiga. Det finns mycket att forska på om man vill använda sig av naturliga dofter från jäst som en helhetsupplevelse i exempelvis butiker, offentliga miljöer och hem.

## Slutsats

Jäst kan isoleras med relativt enkla medel från äpple och vid jäsning lyckas producera en söt äppellik doft. Olika äppelsorter skiljer sig åt i produktion av mängd och typ av dofter, vilket kan bero på olika jästarter och stammar. Doften kan även variera beroende på vilket äpple man isolerar ifrån, allt från en söt och äppellik doft till en stickande rutt och sur lukt. För att gå vidare skulle man välja ut en attraktiv doft som testas av en tränad doftpanel och sedan analysera dem i en GC-MS för att kunna säga om hur bra doften fungerar och vad doften består av.

## Referenser

Benda, I., 1982. Wine and brandy. I: Reed, G., Prescott and Dunn's Industrial Microbiology. AVI Publishers, Westport, CT, s.293-402.

Boddy, L., Wimpenny, J.W.T., 1992. Ecological concepts in food microbiology. Journal of Applied Bacteriology, 73, s.23s – 38s.

Boundless (2014-05-13). Primary and Secondary Metabolites.  
<https://www.boundless.com/microbiology/industrial-microbiology/industrial-microbiology/primary-and-secondary-metabolites/> [2014-05-13]

Clemente-jimenez, J.M.; Mingorance-cazorla, L.; Martinez-rodriguez, S.; Heras-vazquez, F.J. L.; Rodriguez-vico, F., 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. International journal of food microbiology, 98(3), s.301-308.

Cunningham, D.G.; Acree, T.E.; Barnard, J.; Butts, R.M.; Braell, P.A., 1986. Charm analysis of apple volatiles. Food Chemistry, 19(2), s.137-147.

Demain, A. L.; Fang, A., 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 69, s.1-39.

Dujon, B., 2010. Yeast evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 11(7), s.512-524.

Durr, P.; Rothlin, M., 1981. Development of a synthetic apple juice odour. *Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie = Food science + technology*, 14(6), s.313-314.

Ebeler, S. E., 2001. Analytical chemistry, unlocking the secrets of wine flavor. *Food Review International*, 17(1), s.45-64.

Eglinton, J. M.; McWilliam, S. J.; Fogarty, M. W.; Francis, I. L.; Kwiatkowski, M. J.; Høj, P. B.; Henschke, P. A., 2000. The effect of *Saccharomyces bayanus*-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(3), s.190-196.

Ekunsanmi, T. J.; Odunfa, S. A., 1990. Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeast strains isolated from steep water of fermenting cassava tubers. *Journal of applied bacteriology*, 69(5), s.672-675.

Explore yeast. (2014-01-05a). *What is yeast?*.  
<http://www.exploreyeast.com/article/what-yeast> [ 2014-05-01]

Explore yeast (2014-01-05b). *Yeast, wine and beer*.  
<http://www.exploreyeast.com/article/yeast-wine-and-beer> [2014-05-01]

Fleet, G. H., 1990. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(3), s.199-211.

Fleet, G.H., 1993a. The microorganisms of winemaking — isolation

enumeration and identification. I: Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers , Chur, Philadelphia, s.1-26.

Fleet, G.H., 1993b. Yeasts-growth during fermentation. I: Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers , Chur, Philadelphia, s.27-54.

Fleet, G.H., 2003. Yeast interaction and wine flavor. International journal of food as microbiology, 86, s.11-22.

Frezier, V.; Dubourdieu, D., 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. American Journal of Enology and Viticulture, 43(4), s.375-380.

Fugelsang, K.C., 2007. Wine Microbiology : practical applications and procedures. Springer, New York.

Henschke, P., 1997. Wine yeast. Zimmerman, F.K., Entian, K.D., Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications. Technomic Publishing, Lancaster, UK, s.527 – 560.

Ho, Nancy W. Y.; Chen, Zhengdao; Brainard, Adam P., 1998. Genetically Engineered *Saccharomyces* Yeast Capable of Effective Cofermentation of Glucose and Xylose. Applied and Environmental Microbiology, 64(5), s.1852-1859.

Hogg, S., 2005. The Fungi. I: Hogg, S. Essential Microbiology. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex.

Jackson, R., 1994. Chemical constituents of grapes and wine. I: Taylor, S.L. (Ed.), Wine Science: Principles and Applications. Academic Press, San Diego, s. 178-219.

Jakobsen, M.; Narvhus, J., 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. International Dairy Journal, 6(8), s.755-768.

Janssens, L.; De Pooter, H. L.; Schamp, N. M.; Vandamme, E. J., 1991. Production of Flavors by Microorganisms. *Process Biochemistry*, 27(4), s.195-215.

Jästbolaget. (2014-04-28). *Jästinfo*. <http://jastbolaget.se/sv/jastinfo> [2014-04-28]

Kurtzman, C. P., 2005. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, 10(13), s.1724-1740.

Kurtzman, C.; Fell, J. W.; Boekhout, T.; Robert, V., 2011. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. I: Kurtzman, C.; Fell, J. W.; Boekhout, T.. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, London, UK.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma - a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, s.97 – 129.

Lilly, M.; Lambrechts, M. G.; & Pretorius, I. S., 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), s.744-753.

Liu, S.-Q.; Baker, K.; Bennett, M.; Holland, R.; Norris, G.; Crow, V. L., 2004b. Characterisation of esterases of *Streptococcus thermophiles* ST1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B1079 as alcohol acyltransferases. *International Dairy Journal*, 14(10), s.865-870.

Liu, S.-Q.; Holland, R.; Crow, V. L., 2004a. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 14, s.923-945.

Margalit, Y., 1997. Concepts in wine chemistry. The Wine Appreciation Guild, San Francisco.

Martin, N.; Berger, C.; Le Du, C.; Spinnler, H. E., 2001. Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(10), s.2125-2135

Martin, N.; Berger, C.; Spinnler, H. E., 2002. Sensory and instrumental flavor analyses of cheese curd cocultured with selected yeast and bacteria. *Journal of Sensory Studies*, 17(1), s.1-17.

Martin, N.; Savonitto, S.; Molimard, P.; Berger, C.; Brousse, M.; Spinnler, H. E., 1999. Flavor generation in cheese curd by coculturing with selected yeast, mold, and bacteria. *Journal of Dairy Science*, 82(6), s.1072-1080.

Mason, A. B.; Dufour, J-P., 2000. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16(14), s.1287-1298.

Molina, A. M.; Swiegers, J. H.; Varela, C.; Pretorius, I. S.; Agosin, E., 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), s.675-687.

Nordström, K., 1962. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast III. Participation of coenzyme A. *Journal of the Institute of Brewing*, 68(5), s.398-407.

Nykänen, L., 1986. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American journal of enology and viticulture*, 37, s.84 – 96

Oxford University Press (2014-05-30). *Definition of scent in English*.  
<http://www.oxforddictionaries.com/definition/english/scent> [2014-05-30]

Poll L., 1988. Effect of pulp holding time on the volatile components in apple juice (with and without pectolytic enzyme treatment). *Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie = Food science + technology*, 21(2), s.87-91.

Polsinelli, M., Romano, P., Suzzi, G., Mortimer, M., 1996. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape wine. *Letters in Applied Microbiology*, 23(2), s.110-114.

Querol, A.; Barrio, E.; Ramoń, D., 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterisation. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), s.439-446.

Rankine, B. C., 1967. Formation of higher alcohols by wine yeast and relationships to taste thresholds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 18(12), s.583-589.

Rapp, A., Mandery, H., 1986. Wine aroma. *Experientia*, 42, s.873-884.

Rodney, C.; Toni., K. M.; Norman, L. G., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). I: Buchanan, B. B.; Grisse, W; Jones, R. L.. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.

Schütz, M., Gafner, J., 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* 75(6), s.551-558.

SGD. (2014-03-28). *What are yeast?*.  
[http://wiki.yeastgenome.org/index.php/What\\_are\\_yeast%3F](http://wiki.yeastgenome.org/index.php/What_are_yeast%3F) [2014-04-28]

Suh, S.; Blackwell, M.; Kurtzman, C. P; Lachance, M. A., 2006. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98(6), s.1006-1017.

Sumby , K. M.; Grbin , P. R.; Jiranek , V., 2010. Microbial modulation of aromatic esters in wine Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), S.1-16.

Swiegers, J. H.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A.; Pretorius, I. S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, s.139-173.

Tikka, C.; Osuru, H. P.; Atluri, N.; Raghavulu, P. C. V.; Yellapu, N. K.; Mannur, I. S.; Prasad, U. V.; Aluru, S.; K, N. V.; Bhaskar, M, 2013. Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. *Bioinformation*, 9(8), s.421-425.

Tuller, T.; Rubinstein, U.; Bar, D.; Gurevitch, M.; Ruppin, E; Kupiec, M., 2005. Higher-order genomic organization of ceullular functions in yeast.

Verstrepen, K.; Derdelinckx, G.; Dufour, J.P.; Winderickx, J.; Thevelein, J.M.; Pretorius, I.S.; Delvaux, F.R., 2003. Flavor active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), s.110-118.

Virginia, R.; José, G. V.; Franciso, P.; Paloma, M., 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 86, s.181-188.

Zambonelli, et al. 1989. *Microorganisms of wine. I: Cantarelli, C., Lanzarini, G., Biotechnology Applications in Beverage Productions. Elsevier, London, s.17-30.*