

ВИДІЛЕННЯ, ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ІЗ КЕФІРНИХ ГРИБКІВ ТА КЕФІРУ

Досліджено мікрофлору кефірних грибків, кефірної грибкової закваски та кефіру від різних виробників. Вилучено 171 штам лактококів та лактобактерій, представлених видами та підвидами *S. thermophilus*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *diacetylactis*, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. casei* ssp. *casei*, *L. plantarum*, *L. kefir*, *L. brevis*.

Ключові слова: кефірні грибки, кефірна грибкова закваска, кефір, молочнокислі бактерії, ідентифікація.

Исследована микрофлора кефирных грибков, кефирной грибковой закваски и кефира от разных производителей. Выделен 171 штам лактококков и лактобактерий, представленных видами и подвидами *S. thermophilus*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *diacetylactis*, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. casei* ssp. *casei*, *L. plantarum*, *L. kefir*, *L. brevis*.

Ключевые слова: кефирные грибки, кефирная грибковая закваска, кефир, молочнокислые бактерии, идентификация.

Investigated the microflora of kefir fungi, fungal kefiric starters and kefir from different manufacturers. Removed 171 strain laktokokiv and lactobacilli species and subspecies represented *S. thermophilus*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *diacetylactis*, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. casei* ssp. *casei*, *L. plantarum*, *L. kefir*, *L. brevis*.

Keywords: kefir fungi, yeast fungal kefir, kefir, lactic acid bacteria identification.

Кефір – продукт змішаного молочнокислого та спиртового бродіння, який виробляють сквашуванням молока симбіотичною кефірною закваскою на кефірних грибках або концентратом грибкової кефірної закваски. До нормальної мікрофлори кефірної закваски відносять такі основні групи бактерій: дріжджі (що ферментують лактозу *Kluuveromyces marxianus* та ті, що не ферментують лактозу – *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* і *Saccharomyces exiguus*); гомо- і гетероферментативні молочнокислі мікроорганізми родів *Leuconostoc*, *Lactococcus*, молочнокислі палички видів *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, оцтовокислі бактерії *Acetobacter aceti*. Роль цих мікроорганізмів є важливою, оскільки саме вони, розвиваючись у тісному симбіозі під час ферментування молока, забезпечують специфічні органолептичні показники та функціональну активність готового продукту [1].

Кефірні грибки є унікальною сквашувальною культурою, яка має певну здатну до самовідтворення біологічну структуру.

Деякі науковці дослідили просторове розташування мікроорганізмів у кефірних грибках, проаналізувавши за допомогою скануючого електронного мікроскопу їх зовнішню та внутрішню частини. Було встановлено, що мікрофлора поверхні грибків представлена переважно бактеріями, тоді як у центральній зоні домінували дріжджі. У частині між периферією грибка та його серцевиною співвідношення між бактеріями і дріжджами змінюється пропорційно відстані до центру [3, 4]. Слід зазначити, що структура кефірних

грибків настільки складна, що її дотепер не вдалося відтворити із окремих складників ще нікому.

Дослідженню мікробіологічного складу кефірних грибків приділялося багато уваги провідними мікробіологами світу упродовж останніх десятиліть. Достеменно відомо, що вони містять молочнокислі бактерії, а саме лактококи та лактобацили, дріжджі й оцтовокислі бактерії. Співвідношення між основними групами мікроорганізмами кефірних грибків є динамічним і істотно залежить від багатьох факторів, як-то походження кефірних грибків, складу молока та способу його оброблення, умов культивування та зберігання [2]. З іншого боку коригуючи співвідношення між окремими групами кефірної мікрофлори можна певною мірою впливати на органолептику кінцевого продукту – кефіру.

Отже, склад мікрофлори кефіру, виділення, окремих культур з бажаними характеристиками, встановлення таксономічного положення штамів та дослідження їх властивостей є актуальною проблемою біотехнології.

Мета роботи дослідження складу мікрофлори кефірних грибків, грибкової кефірної закваски та кефіру, виділення та ідентифікація молочнокислих бактерій.

Об'єкти досліджень кефірні грибки, грибкова кефірна закваска, кефір, чисті культури молочнокислих бактерій.

Матеріали та методи досліджень. У роботі для виділення мезофільних лактококів використовували спеціальні селективні середовища: для виділення ароматоутворювальних лактококів *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Leuconostoc* – середовище на основі гідролізованого молока з додаванням лимоннокислого кальцію та поживний агар з сахарозою; для виявлення *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* – середовище Редді та *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* – гідролізований агар (ГА), для виділення термофільних стрептококів середовище Lee, для виділення лактобацил використовували середовища МРС і Рогози. Остаточну таксономічну приналежність встановлювали за класичними фізіолого-біохімічними та культуральними властивостями: спектр ферментування вуглеводів за оптимальної температури росту термофільних та мезофільних штамів 37 °С та 30 °С відповідно, здатністю розвиватися у молоці у широкому діапазоні температури, концентрації солі та рівня рН.

Результати досліджень та їх обговорення. Для визначення показників якості та складу мікрофлори було проаналізовано склад мікрофлори 22 зразків кефірів, вироблених у різних регіонах України та імпортного виробництва (Росія, Польща, Туреччина) і 2 зразків кефірних грибків різного джерела походження.

У результаті з кефірів та кефірних грибків було вилучено і отримано в чистій культурі 171 штам молочнокислих мікроорганізмів. Частка мезофільних лактококів склала 43%, у тому числі 24% штамів належало до ароматутворювальних культур виду *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* та *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, 8 та 11% – відповідно до *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* і *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Значну частку склали термофільні стрептококи – близько 39%. Решта молочнокислої мікрофлори (18%) була представлена мезофільними та термофільними лактобацилами.

Відібрані штами термофільних стрептококів та мезофільних молочнокислих лактококів аналізували за термо- та солестійкістю, ростом у молоці за різних температур, рН, утворенням CO₂ з глюкози та аміаку з аргініну, які допомагають диференціювати їх вид (табл. 1).

Показано, що ключовими ознаками для диференціації термофільних стрептококів від мезофільних молочнокислих лактококів є низька резистентність до хлористого натрію, відсутність утворювати аміак із аргініну, висока терморезистентність та оптимальна температура росту.

Відомо, що штамам *L. lactis* у порівнянні з *L. cremoris* притаманна більша стійкість до хлористого натрію та лужної реакції середовища, а також утворення аміаку з аргініну [5].

Таблиця 1

**Фізіологічна та морфологічна характеристика ізолюваних штамів мезофільних
молочнокислих лактококів та термофільного стрептококу**

Показники	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	<i>L.</i> <i>mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	<i>S. thermophilus</i>
Ріст у молоці за температури, °С					
40	+	–	+	–	+
45	–	–	–	–	+
Ріст у м'ясопептонному бульйоні при рН 9,2	+	–	+	–	–
Ріст у гідролізованому молоці з вмістом NaCl, 4 %	+	–	+	–	–
6,5 %	–	–	–	–	–
Терmostійкість за температури 60 °С впродовж 30 хв	+	+	+	–	+
Утворення CO ₂ з глюкози	–	–	–	+	–
Утворення аміаку з аргеніну	+	–	+	–	–
Оптимальна температура росту, °С	30	30	30	30	37
Зовнішній вигляд колонії на твердому середовищі	човнико-подібна чи кругла	жовта матова з рівним краями	човнико-подібна з світлою зоною навколо неї	біла блискучо-слизиста кругла	зерниста
Форма клітини	диплококи, короткі та середні ланцюжки коків	ланцюжки коків середніх та великих розмірів	диплококи, короткі ланцюжки коків	дипло-коки, короткі ланцюжки коків	крупні ланцюжки коків середніх та великих розмірів
Селективне середовище	ГА	середовище Редді	ГА+лимонно-кислий кальцій	середовище з сахарозою	середовище Lee

Ізолювані штами лактобактерій було досліджено за сукупністю важливих для біотехнології показників: тривалість утворення згустку, титрова кислотність на момент сквашування молока даними культурами, гранична кислотність та рівень газоутворення.

Встановлено, що серед проаналізованих молочнокислих мікроорганізмів зустрічались штами мезофільних та термофільних культур як з високою (5,10–8,2 год), так і низькою молокозсідальною активністю (МЗА) (до 24 год). Водночас для всіх досліджених штамів помічено значні розбіжності за цим показником. Найвищий рівень МЗА спостерігали у штамів з термофільними стрептококами *S. thermophilus* і *L. lactis*, що є характерною ознакою для цих видів.

Слід зазначити, що позитивним біотехнологічним фактором, є незначне наростання титрової кислотності у мезофільних лактококів *L. cremoris* і *L. lactis* впродовж 7 діб. Про це свідчить мала різниця між граничною кислотністю та кислотністю за розвитку у молоці на момент утворення згустку. Застосування штамів з такою властивістю дозволить запобігти переокисанню продукту під час виготовлення та зберігання. Стосовно термофільних стрептококів, як і слід було очікувати їх гранична кислотність не перевищувала 121 °С. У

штамів *L. diacetilactis* та *Leuconostoc* ssp. цей показник був на рівні відповідно 100 та 106 °C (табл. 2).

Таблиця 2

Технологічні властивості штамів молочнокислих мікроорганізмів

Вид лактобактерій	К-ть штамів	Діапазон МЗА, год	Кислотність утвореного згустку, °Т	Гранична кислотність, °Т	Діапазон утворення CO ₂ , см
<i>L. lactis</i>	8	6,0-24,0	90,0±8,0	94,0±9,0	0
<i>L. cremoris</i>	5	7,3-24,0	82,0±8,0	83,0±4,0	0
<i>L. diacetilactis</i>	12	8,2-24,0	75,0±11,0	89,0±11,2	0,2-3,2
<i>Leuconostoc</i>	15	8,2-24,0	80,0±10,0	95,0±10,9	0,5-4,5
<i>S. thermophilus</i>	60	5,10-24,0	75,0±10,0	107±14,0	0

Відомо, що ароматоутворювальні бактерії продукують вуглекислий газ, доповнюючи дріжджі за цією ознакою та формуючи характерну для кефіру пінку консистенцію. Вилучені штами істотно розрізнялися за рівнем утвореного вуглекислого газу, що коливався від 0,2 до 3,2 см для *L. lactis* ssp. *diacetilactis* та від 0,5 до 4,5 см *Leuconostoc* ssp. Коливання у такому широкому діапазоні, очевидно, є штамовою специфічністю. У біоценозі кефірних грибків та кефірів було виявлено 31 штам лактобацил різних видів, з яких 5 штамів *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 4 штами *L. acidophilus*, 2 штами *L. lactis*, 3 штами *L. helveticus*, 3 штами *L. casei* ssp. *casei*, 7 штамів *L. plantarum*, 4 штами *L. kefir*, 3 штами *L. brevis* (табл. 3).

Таблиця 3

Фізіолого-культуральні характеристики ізольованих штамів молочнокислих паличок

Показники	<i>L. bulgaricus</i> (5 штамів)	<i>L. acidophilus</i> (4 штамів)	<i>L. lactis</i> (2 штамів)	<i>L. helveticus</i> (3 штамів)	<i>L. casei</i> (3 штамів)	<i>L. plantarum</i> (7 штамів)	<i>L. kefir</i> (4 штамів)	<i>L. brevis</i> (4 штамів)
Ріст у молоці за температури:								
15 °C	-	-	-	-	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	-	-	-	-
48 °C	+	-	+	+	-	-	-	-
Ріст у гідролізованому молоці з вмістом NaCl:								
4 %	-	-	+	+	+	+	-	-
6 %	-	-	-	-	+	+	-	-
Термостійкість за температури, °C								
60 впродовж 30 хв	+	-	+	+	-	-	-	-
65 впродовж 30 хв	-	-	+	+	-	-	-	-
Зброджування вуглеводів:								
галактоза	-	+	+	+	+	+	-	+
сахароза	-	+	+	-	+	+	-	-
рафіноза	-	-	-	-	-	+	-	-
мальтоза	-	+	+	+	+	+	+	+
маніт	-	-	-	-	+	+	-	-
сорбіт	-	-	-	-	+	+	-	-
Утворення аміаку з аргініну	-	-	±	-	-	-	+	+

Варто зауважити, що характерними ознаками для мезофільних паличок *L. kefir* та *L. brevis*, як типової мікрофлори кефірних грибків та кефірів, вироблених з їх використанням, є відсутність росту у гідролізованому молоці з вмістом солі 4 та 6%. Ці лактобацили також відрізняються від інших видів молочнокислих паличок за спектром зброджуваних вуглеводів: вони не ферментують сахарозу, маніт, сорбіт та утворюють аміак з аргініну.

Термофільні молочнокислі палички, на відміну від інших видів, не ростуть за температури 15 °С і добре розвиваються за 45 °С.

Морфологію клітин вилучених штамів молочнокислих паличок представлено у табл. 4.

Таблиця 4

Морфологічна характеристика ізольованих штамів молочнокислих паличок

Вид лактобацил	К-ть штамів	Форма клітин
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	5	палички середньої довжини
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4	зернисті великі палички поодинокі і в ланцюжках
<i>Lactobacillus lactis</i>	2	тонкі палички в ланцюжках
<i>Lactobacillus helveticus</i>	3	тонкі, дуже довгі палички
<i>Lactobacillus casei</i>	3	тонкі дрібні палички або закручені в легку спіраль
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7	тонкі дрібні палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
<i>Lactobacillus kefir</i>	4	товсті палички, всередині прозорі, поодинокі, попарні чи в коротких ланцюжках
<i>Lactobacillus brevis</i>	3	палички із заокругленими кінцями поодинокі чи в коротких ланцюжках

У нововиділених штамів було досліджено основні біотехнологічні характеристики: молокозсідальну активність і граничну кислотність. Результати аналізу представлено на рис. 1 та 2.

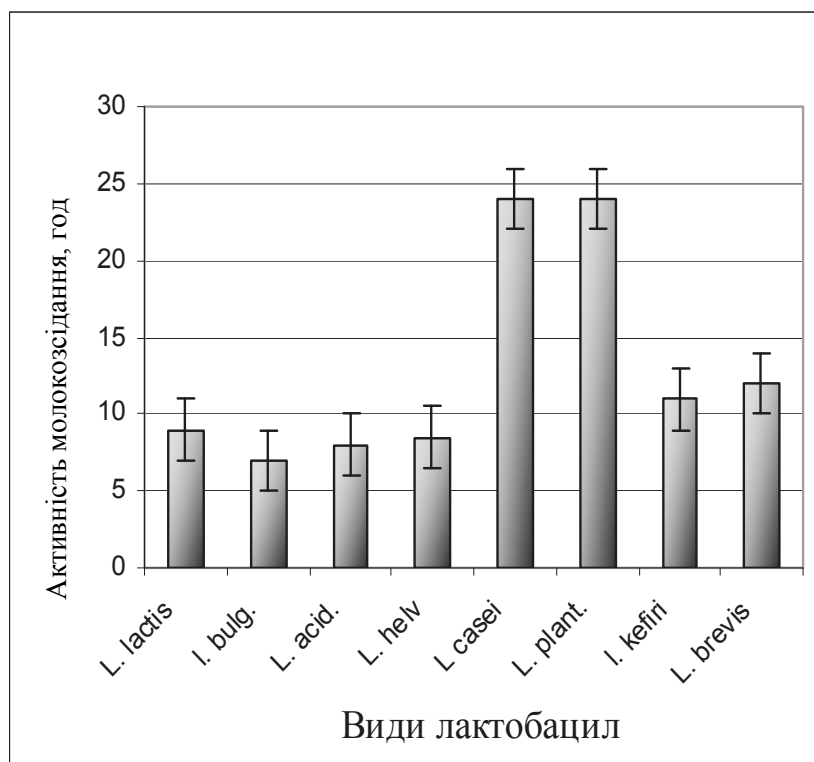


Рис. 1. Молокозсідальна активність селекціонованих лактобацил

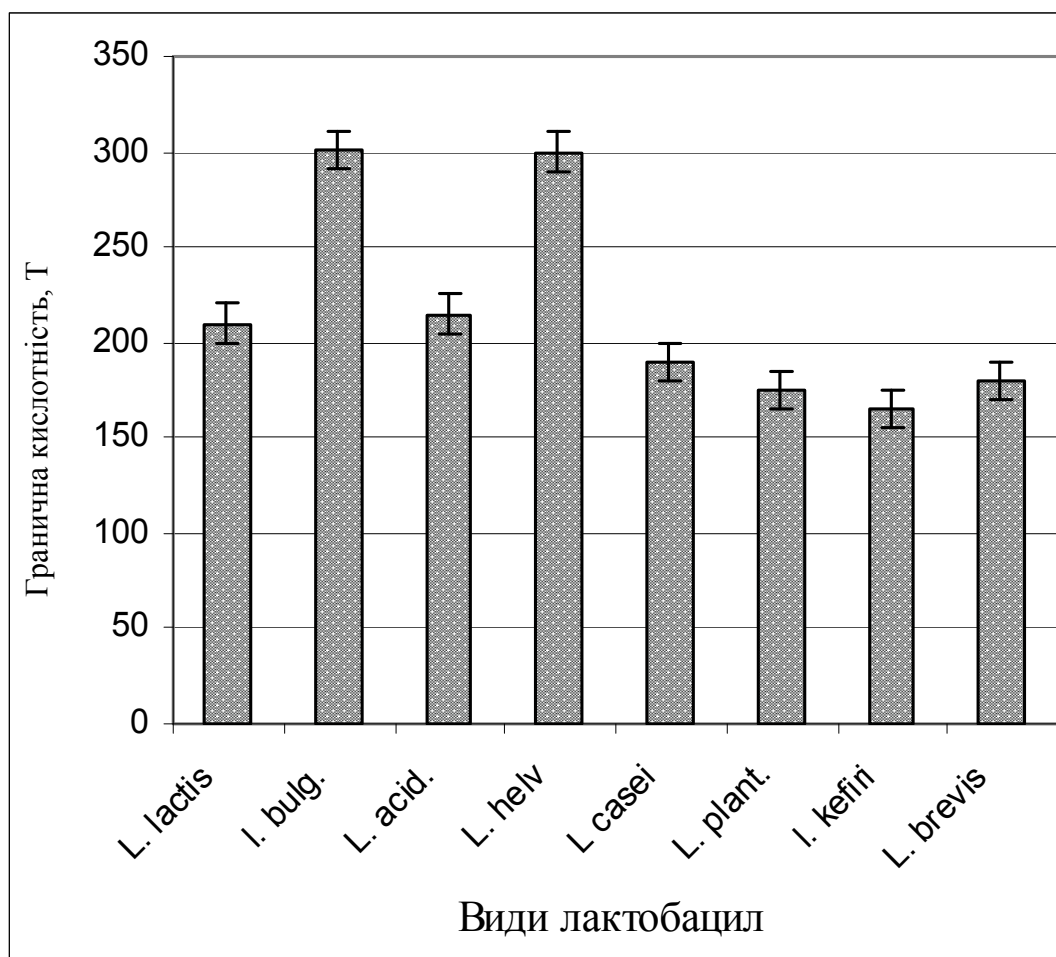


Рис. 2. Гранична кислотність селекціонованих лактобацил

Із наведених матеріалів видно, що на відміну від мезофільних молочнокислих паличок виду *L. casei*, *L. plantarum* з низькою МЗА (біля 24 год), штами термофільних лактобацил швидко сквашують молоко – впродовж 7–9 год. Дещо повільніше сквашували молоко лактобацили видів *L. kefir* і *L. brevis* – за 11–12 год. Рівень граничної кислотності у термофільних молочнокислих паличок був вищим у порівнянні з мезофільними культурами і складав 215 °Т для видів *L. lactis* та *L. acidophilus* та 300 °Т для видів *L. helveticus* і *L. bulgaricus*. Для мезофільних молочнокислих паличок цей показник коливався в межах 165–190 °Т.

Висновки. У результаті аналізу мікробіологічного складу кефіру встановлено загальні закономірності в морфології мікрофлори кефіру:

- основними морфологічними видами мікрофлори є палички, стрептококи, диплококи, ланцюжки коків різної довжини, дріжджі;
- кокові мікроорганізми істотно переважають над паличкоподібною мікрофлорою, яка в окремих зразках взагалі відсутня;
- більшість зразків кефірів містили диплококи, короткі ланцюжки коків, зернисті, великі та дрібні палички, овальні дріжджі.

Комплекс морфологічних і біохімічних властивостей виділених із кефірних грибків, кефірної закваски та кефіру штамів дозволив ідентифікувати наступні види та підвиди молочнокислих бактерій: *S. thermophilus*, *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. diacetylactis*, *L. mesenteroides ssp. mesenteroides*, *L. lactis ssp. cremoris*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. casei ssp. casei*, *L. plantarum*, *L. kefir*, *L. brevis*.

Список літератури

- 1 Фильчакова С.А. Микробиологический состав кефирных грибков и кефирной закваски / С.А. Фильчакова // Переработка молока. – № 7 (69). – 2005. – С. 28–29.
- 2 Фильчакова С.А. Влияние режимов культивирования кефирной закваски на видовой состав микрофлоры / С.А. Фильчакова // Сборник научных трудов ВНИИМС. – 2004. – С. 72–75.
- 3 Хамнаева Н.И. Биосинтез биологически активных веществ кефирными грибами / Н.И. Хамнаева, В.Ж. Цыренов, В.С. Гонгорова, А.М. Шалыгина // Молочная промышленность. – 2000. – № 4. – С. 49–50.
- 4 Garrote G.L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains / G.L. Garrote, A.G. Abraham, G.L. De Antoni // Journal of dairy research. – 2001. – Vol. 68.– № 4. – P. 639–652.
- 5 Cais-Sokolinska D. Physicochemical and sensory characteristics of sheep kefir during storage / D. Cais-Sokolinska, R. Danków, J. Pikul // Acta Science Polonium, Technol. Aliment. – 2008. – Vol. 7. – № 2. – P. 63–73.