

*В.В. Гудима, м.н.с.
К.В. Копилова, д.с.-г.н., заст. директора
з наукової та інноваційної роботи
О.В. Науменко, к.т.н.
Інститут продовольчих ресурсів НААН*

МІКРОБНИЙ ПРОФІЛЬ ГРИБКОВИХ КЕФІРНИХ ЗАКВАСОК

Проведено дослідження мікробного складу заквасок, отриманих з використанням кефірних грибків з різних областей України. Встановлено, що кефірні грибки характеризувались унікальною структурою мікробіоти, яка була представлена мікроорганізмами різних таксономічних груп. Показано, що у кефірних грибах присутні найпоширеніші роди лактобактерій, такі як: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* та вид *Streptococcus thermophilus*. Домінуючою мікрофлорою були кокові мезофільні та термофільні молочнокислі бактерії. Встановлено присутність таких обов'язкових компонентів кефірних грибків, як оцтовокислі бактерії, дріжджі тощо. Специфічною рисою всіх грибкових кефірних заквасок була наявність пропіоновокислих бактерій. Встановлено відсутність коліформних бактерій та плісені, що свідчить про епідеміологічну чистоту кефірних грибків. Показано, що грибкові кефірні закваски з різноманітнішим мікробним профілем характеризувались кращими органолептичними показниками.

Ключові слова: кефірні грибки, мікробіота, молочнокислі бактерії, оцтовокислі бактерії, пропіоновокислі бактерії, дріжджі.

*V.V. Gudyma, junior research fellow
K.V. Kopylova, D-r of Science, agriculture
Deputy Director on the Scientific and Innovation Work
O.V. Naumenko, Ph. D. Technics,
Food Resources Institute of NAAS*

MICROBAL PROFILE OF FUNGAL KEFIR STARTER

*A study of the microbial composition of starter cultures produced using kefir grains from different regions of Ukraine. It was found that the kefir grains were characterized by the specific structure of the microbiota, which was presented by microorganisms of different taxonomic groups. It has been shown that kefir fungi present the most common genera of lactic acid bacteria, such as: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and type *Streptococcus thermophilus*. The dominant microflora were coccoid mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria. The presence of such obligatory components of kefir fungi, as acetic bacteria, yeasts, is set. A specific feature of all fungal kefir starter cultures was the presence of propionic acid bacteria. The absence of coliform bacteria and mold, which indicates the purity of the epidemiological kefir grains. It is shown that fungal kefir starter with a more diverse microbial profile characterized by the best organoleptic characteristics.*

Keywords: kefir fungi microbiota, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, propionic acid bacteria, yeast.

В.В. Гудыма, м.н.с.

*К.В. Копылова, д.с.-х.н., зам. директора
по научной и инновационной работе*

О.В. Науменко, к.т.н.

Институт продовольственных ресурсов НААН

МИКРОБНЫЙ ПРОФИЛЬ ГРИБКОВЫХ КЕФИРНЫХ ЗАКВАСОК

*Проведено исследование микробного состава заквасок, полученных с использованием кефирных грибков из разных областей Украины. Установлено, что кефирные грибки характеризовались уникальной структурой микробиоты, которая была представлена микроорганизмами разных таксономических групп. Показано, что в кефирных грибках присутствовали самые распространенные роды лактобактерий, такие как: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* и вид *Streptococcus thermophilus*. Доминирующей микрофлорой были кокковые мезофильные и термофильные молочнокислые бактерии. Установлено присутствие таких обязательных компонентов кефирных грибков, как уксуснокислые бактерии и дрожжи. Специфической чертой всех грибковых кефирных заквасок было наличие пропионовокислых бактерий. Установлено отсутствие колиформных бактерий и плесени, что свидетельствует о эпидемиологической чистоте кефирных грибков. Показано, что грибковые кефирные закваски с более разнообразным микробным профилем характеризовались лучшими органолептическими показателями.*

Ключевые слова: *кефирные грибки, микробиота, молочнокислые бактерии, уксуснокислые бактерии, пропионовокислые бактерии, дрожжи.*

Кефір є продуктом змішаного – молочнокислого та спиртового бродіння із кисло-молочним смаком та слабоалкогольним присмаком. Цей продукт є результатом життєдіяльності природної, складної по своєму мікробіологічному складу симбіотичної закваски, так званих кефірних грибків. Останні являють собою конгломерат мікроорганізмів, об'єднаних полісахаридною матрицею. Кефірні грибки є прикладом симбіозу між дріжджами і бактеріями, роль яких надзвичайно важлива, оскільки саме вони забезпечують фізіологічну цінність та смакові принади цього продукту. Не зважаючи на досить глибокі дослідження мікрофлори кефірних грибків досі немає точних даних про їх первинне походження. Вони є окремими біологічними об'єктами, що мають певну форму, складний микробний склад і специфічні властивості. Кефірні грибки поведуться як живий біологічний мікроорганізм - ростуть, розмножуються діленням, передають свою структуру і властивості новим поколінням.

Стосовно походження кефіру, як кисло-молочного продукту, існують різні версії. Згідно з одною, його батьківщиною вважається Тибет, за іншою – Північна Осетія [1-2]. Спроби вчених різних країн світу штучно відтворити кефірні грибки у чистому вигляді не дали позитивних результатів. Тому навіть у промисловому виробництві кефіру використовують закваску, виготовлену на кефірних грибках. Саме цією особливістю кефір відрізняється від інших традиційних кисло-молочних продуктів (наприклад, йогурту) [3-4].

Порівняння даних, опублікованих різними авторами, показало, що кефір, який виробляється на кефірних грибках, має переваги над виготовленим з використанням лише заквашувальних культур. Останній має істотні відмінності у органолептиці, він здебільшого прісний, в ньому слабо відокремлюється сироватка і часто присутній вершковий присмак [5].

Унікальність кефірних грибків полягає не тільки в тому, що мікроорганізми, які їх утворюють, здатні пригнічувати патогенні бактерії за рахунок продукування молочної кислоти, антибіотиків і бактерицидних речовин [6], а й у тому, що завдяки різноманітності біохімічних властивостей усіх компонентів мікрофлори, кефірні грибки містять також

вітаміни, мінеральні речовини, амінокислоти, необхідні для здоров'я людей [7]. Саме через ці особливості кефір називають «йогуртом 21^{го} століття [8].

Згідно літературних даних, постійними представниками мікрофлори кефірних грибків є дріжджі, молочнокислі та оцтовокислі бактерії. З бактерій виділені мезофільні лактококи і лактобацили, термофільні лактобацили і оцтовокислі бактерії. Домінуючим бактеріальним компонентом кефірних грибків є мезофільні молочнокислі стрептококи. Їх кількість досягає близько 60 % усієї мікрофлори кефіру. Вони представлені як гомоферментативними (*Lactococcus lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris*), так і гетероферментативними видами (*Leuconostoc mesentericum spp. citrovorum* і *Leuc. mesentericus ssp. dextranicum*). При цьому перші розглядаються як кислотоутворювальний блок, тоді як другим характерне утворення ароматичних компонентів і, в деякій мірі, газу. Мезофільні лактобактерії грають провідну роль у процесі сквашування молока, особливо на початкових етапах цього процесу. Кількість мезофільних лактобацил у кефірних грибках дуже незначна і досить варіабельна за видовим складом. Незначна також у мікрофлорі кефірних грибків і доля термофільних молочнокислих паличок. Їх присутність спочатку взагалі відкидалася багатьма дослідниками. Проте на сьогодні доведено, що вони є обов'язковим компонентом кефірних грибків. Переважно термолактобацилли представлені видом *Lactobacillus helveticum*. Враховуючи те, що виробництво кефіру здійснюється при мезофільних температурах (не більше 25°C), вклад цих мікроорганізмів досить обмежений. Проте підвищення температури може призводити до зайвої кислотності або навіть гіркоти.

Обов'язковим компонентом кефірних грибків є дріжджі. Вони представлені двома типами - лактозоброджуючі та ті, що не зброджують лактозу. Їх кількість складає 5% від загального числа мікроорганізмів. Основні види дріжджів - *Saccharomyces cartilaginosus*, *Candida kefir*, *Candida mycoderma* і ін. При цьому лактозоброджуючі дріжджі розташовані на поверхні стіни грибка кефіру, тоді як незброджуючі лактозу - в глибинних шарах. Їх роль полягає в активізації молочнокислих бактерій утворюваними ними біологічно активними компонентами, передусім - вітамінами, більш високою біохімічною активністю в порівнянні з молочнокислими бактеріями.

Оцтовокислі бактерії також є невід'ємним компонентом мікрофлори кефірних грибків. Вони відіграють важливу роль у підтримці компонентного складу грибків і формуванні аромату та консистенції кефіру. Крім того, відзначається їх істотний вклад в антибіотичну активність кефіру.

Потрапляючи в молоко, мікрофлора грибків частково вивільняється з них і бере участь у ферментації молока. Сквашене таким чином молоко називається грибковою закваскою кефіру і надалі використовується для отримання кефіру. Її стабільність і ефективність визначається рядом чинників: регулярністю зміни молока, умовами витримки молока з грибами: тривалістю та температурою культивування, співвідношенням між грибами і молоком, швидкістю перемішування і способу промивання грибків тощо.

Метою роботи було дослідження мікробіоти грибкових кефірних заквасок з різних областей України.

Об'єкти досліджень: характерні для кефірних грибків групи мікроорганізмів: молочнокислі бактерії, оцтовокислі бактерії, дріжджі. Водночас аналізували сторонню мікрофлору – БГКП та наявність плісені.

Методи досліджень. Загальну чисельність молочнокислих бактерій визначали на традиційних для цих досліджень середовищах: гідролізований агар та МРС з 2% глюкози, кількість мезофільних лактококів, термофільних стрептококів – на середовищі гідролізований агар, лактобацил – МРС з 2% глюкози, лейконостоків – на селективному для цього роду середовищі з сахарозою згідно з ГОСТ 10444.11-89. Кількість пропіоновокислих бактерій – на лактатному середовищі за ДСТУ 7354:2013. Чисельність дріжджів визначали на твердому середовищі Сабуро з неоміцином (для пригнічення росту МКБ) за ГОСТ

10444.12-88. Коліформні бактерії (БГКП) та оцтовокислі бактерії (ОКБ) визначали за характером росту у рідких середовищах. БГКП - за наявністю газу у поплавку за ДСТУ 7357:2013. ОКБ – за утворенням каламуті та целюлозної плівки на поверхні селективного середовища [7].

Результати дослідження

Були проведені дослідження мікробного складу заквасок, отриманих із використанням кефірних грибків з 3 різних областей України. Кефірні грибки підтримували у пастеризованому молоці за температури (4±2) °С, промивали 2 рази на тиждень пастеризованим знежиреним молоком. Відновлене знежирене молоко пастеризували за температури (95±2)°С упродовж 0,5 годин. Культивування кефірних грибків здійснювали у пастеризованому молоці за співвідношення «грибок-молоко» 1:20 за температури 20-22 °С упродовж 24 годин. Після відокремлення кефірних грибків одержували грибкову кефірну закваску.

Показано, що у грибкових кефірних заквасках присутні найпоширеніші роди лактобактерій, такі як *Lactococcus*, *Lactobacillus* та вид *Streptococcus thermophilus*. Домінуючою мікрофлорою були кокові мезофільні та термофільні молочнокислі бактерії.

Як свідчать результати порівняльних мікробіологічних тестів (табл. 1) у заквасках на кефірному грибку (зразок №2) та кефірному грибку (зразок №3) визначили значно більшу кількість ароматоутворювальних бактерій, їх чисельність у 1000-10000 разів була більшою ніж у грибковій заквасці з заводу Тернопільської обл. (зразок №1).

Кількість оцтовокислих бактерій, дріжджів та лактобацил у сотні-десятки тисяч разів була більшою також у зразках № 2 та № 3.

Таблиця 1

Основна мікрофлора кефірної закваски, виробленої на різних кефірних грибках

№ п/п	Показник	Температура росту, °С	Кількість бактерій, КУО/см ³		
			Грибок №1 (Тернопільська обл.)	Грибок №2 (Львівська обл.)	Грибок №3 (Київська обл.)
1	МКБ мезофільні	30	1,6x10 ⁸	6,5x10 ⁸	1,2x10 ⁹
2	МКБ термофільні	42	1,5x10 ⁸	3,5x10 ⁸	5,5x10 ⁸
3	Ароматоутворювальні м/о	30	2,0x10 ⁴	1,3x10 ⁸	7,6x10 ⁷
4	Лейконостоки	25	відсутні	5,0x10 ³	5,6x10 ⁵
5	Лактобацили	37	1,2x10 ⁵	1,4x10 ⁷	1,1x10 ⁸
6	Оцтовокислі бактерії	30	1,0x10 ³	1,0x10 ⁵	1,0x10 ⁷
7	Пропіоновокислі бактерії	30	2,0x10 ⁴	5,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴
8	Дріжджі	25	2,2x10 ⁴	1,0x10 ⁶	1,0x10 ⁷
9	Плісені	25	відсутні	відсутні	відсутні
10	БГКП (коліформи)	37	відсутні	відсутні	відсутні

Встановлено відсутність у грибковій заквасці з заводу Тернопільської обл. (зразок №1) бактерій роду *Leuconostoc* ssp. Натомість закваски №2 (з Львівської обл.) та №3 (з Київської обл.) містили лейконостоки, причому найбільше їх було у кефірній заквасці №3.

Специфічною рисою всіх грибкових кефірних заквасок була присутність пропіоновокислих бактерій у кількості - (1,0-5,0) x10⁴ КУО/см³.

Встановлено відсутність коліформних бактерій та плісені, що свідчить про біологічну цінність та епідеміологічну чистоту кефірних грибків.

Необхідно зауважити, що лише збалансований розвиток усіх груп мікроорганізмів гарантує одержання кефіру з характерними органолептичними властивостями. Так, мікроорганізми роду *Lactobacillus* продукують молочну кислоту, специфічні

екзополісариди та мають високу антагоністичну активність щодо сторонньої мікрофлори; *Leuconostoc* та *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* утворюють ряд смакоароматичних сполук (діацетил, леткі кислоти, ефіри) та вуглекислий газ; *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* та *Streptococcus thermophilus* надають продукту сметаноподібної консистенції; лактозоброджувальні дріжджі – ініціатори спиртового бродіння з утворенням етанолу та CO₂, а оцтовокислі бактерії – продуценти оцтової кислоти, що надає кефіру різкувато-освіжаючого смаку.

Встановлено, що кефірні грибки, отримані з різних регіонів, характеризуються деякими смаковими відмінностями, які визначаються видовою різноманітністю мікрофлори, а також штамовими особливостями мікроорганізмів, що входять до них.

Так показано, що закваски № 2 та №3 характеризувались більшою мікробною різноманітністю, що вплинуло на їх органолептичні властивості. Їм був притаманний гострий тонізуючий смак, пінка консистенція, зі слабким газоутворенням.

Висновки

Встановлено, що зразки кефірних грибів характеризувались унікальною структурою мікробіоти, яка була представлена мікроорганізмами різних таксономічних груп. Показано, що у кефірних грибах присутні найпоширеніші роди лактобактерій, такі як *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* та вид *Streptococcus thermophilus*. Домінуючою мікрофлорою були кокові мезофільні та термофільні молочнокислі бактерії. Специфічною рисою кефірних грибків була присутність пропіоновокислих бактерій у кількості - (1,0-5,0)×10⁴ КУО/см³. Встановлено відсутність коліформних бактерій та плісені, що свідчить про біологічну цінність та епідеміологічну чистоту кефірного грибка.

Порівняльні дослідження мікробного профілю грибкових кефірних заквасок з різних областей України виявило збіднений видовий склад закваски №3: чисельність ароматоутворювальних бактерій була у 1000-10000 разів меншою (порівняно з іншими кефірними грибами), також спостерігали відсутність лейконостоків.

Встановлено, що біорізноманітність компонентів мікробіоти кефірних грибків обумовлювала специфічність органолептичних показників заквасок.

Література

1. Chena H.C. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods / H.C. Chena, S.Y. Wanga, M.Y. Chena // Food Microbiol. – 2008. – Vol. 25. – P. 492-501.
2. Garrote G.L., Preservation of kefir grains, a comparative study / G.L.Garrote, A.G.Abraham, G.L. De Antoni // Lebensm-Wiss Technol. - 1997. – Vol. 30. – P. 77-844.
3. Marguina D. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel / D.Marguina, A. Santos, S. Corpas et al // Lett.Appl.Microbiol. – 2002.- Vol. 35. – P. 136-140.
4. Marshall V.M. Methods for making kefir and fermented milks based on kefir / V.M. Marshall, W.M. Cole // J.Dairy Res. – 1985. – Vol. 52. – P. 451-456.
5. Muir D.D. Comparison of the sensory profiles of kefir, buttermilk and yogurt / D.D. Muir, A.Y.Tamime, M. Wszolek // Int.J. Dairy Technol. – 1999. – Vol. 52. – P. 129-134.
6. Liu J.R. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose or sucrose / J.R.Liu, C.W. Lin // J. Food Sci. – 2000. – Vol. 65. – P. 716-719.
7. Otlés S. Kefir a probiotic dairy composition, nutritional and therapeutic aspects / S. Otlés, O. Cagindi // P. J. Nutr. – 2003. – Vol. 2. – P. 49-54.
8. Gorski D. Kefir 21st century yogurt? / D. Gorski // Dairy Foods. – 1994. – Vol. 95. – P. 49.