

KEFYRO GRYBELIO BIOMASĖS SUDĖTIS IR AUGINIMO TERPĖS MIKROBIOLOGINĖS CHARAKTERISTIKOS

A. Liutkevičius, A. Šarkinas

KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; aliutkev@takas.lt

Nustatyta, kad išrūgos yra tinkama terpė kefyro grybelio biomasei auginti. Auginimo sąlygos buvo vertinamos pagal kefyro grybelio biomasės prieaugį. Pienarūgščių bakterijų skaičius vertinamas ribinių skiedinių metodu, mielių skaičius – sėjimo į lėkšteles metodu.

Pagrindinę bakterijų dalį išrūgose, kuriose buvo kultivuotas kefyro grybelis, sudaro mezofilinės pienarūgštės bakterijos. Taikant komercinę identifikavimo sistemą API 50 CH („BioMerieux“) iš išrūgų buvo išskirtos 3 grynios kultūros, kurių biocheminės savybės neatitiko nei vienos iš identifikavimo sistemos sąrašė išvardintų pienarūgščių bakterijų.

Kefyro grybelio biomasės augimas natūraliose, sutirštintose išrūgose ir jų mišiniuose yra trumpalaikis procesas (1–4 paros). Jį galima prailginti atnaujinant kefyro grybelio mitybos terpę, t. y. periodiškai, kas 1–4 paros užpilant kefyro grybelį šviežiomis išrūgomis ar jų mišiniais.

Pažymėtina, jog natūraliose ir sutirštintose išrūgose kultivuotas kefyro grybelis kokybiškai išlaiko savo pagrindinius mikroorganizmus – pienarūgštės bakterijas ir mieles.

Didžiausias kefyro grybelio biomasės prieaugis (iki 21,47–23,13 %) po 3–4 parų kultivavimo pasiektas natūraliose varškės išrūgose. Kefyro grybelio masės prieaugis natūraliose išrūgose pastoviai didėjo, taikant ilgalaikį masės persodinimų laikotarpį (35 paras). Kultivuojant kefyro grybelį natūraliose išrūgose, jose taip pat nustatytas pakankamai didelis (10^7) pienarūgščių bakterijų skaičius. Varškės išrūgose aptikta daugiau pienarūgščių bakterijų ir mielių, nei fermentinių sūrių išrūgose, taigi varškės išrūgos yra palankesnė terpė ne tik biomasei auginti, bet ir kefyro grybelio mikroorganizmų dauginimuisi.

Raktažodžiai: išrūgos, kefyro grybelis, kultivavimas, augimo sąlygos, mikrobiologiniai rodikliai.

Išvadas

Gaminant varškę, fermentinius sūrius, kazeiną ir baltymų koncentratą, susidaro dideli išrūgų kiekiai. Lietuvoje naudingai perdirbama tik apie 21 % išrūgų. Mokslininkai pastoviai tiria aktualias problemas, susijusias su maisto ir pašarų resursų didinimu ir racionalių antrinių maisto gamybos atliekų panaudojimu.

Ieškant potencialių išrūgų naudojimo būdų, susidomėjimą kelia kefyro grybelio (KG) savybė augti ne tik pieno terpėje, bet ir išrūgose. Auginimo išrūgose metu KG biomasa didėja, į terpę išskiriami vandenyje tirpūs polisacharidai, kurių koncentracija po 5 parų kultivavimo gali pasiekti 103,4 mg/l. Taigi KG kultivavimas parūgština išrūgas, sumažina laktozės koncentraciją jose, pagausina polisacharidais ir sudaro sąlygas biomasei prieaugiui [1].

KG yra gana jautri simbiotinė sistema, ir jo mikroflora gali iš dalies keistis veikiant aplinkai. Savo kilmės vietoje KG sudėtis buvo gana stabili, jam paplitus po visą pasaulį kultivavimo sąlygos gali

šiek tiek skirtis, tuo pačiu svyruoja ir KG mikroorganizmų sudėtis. Dabar kefyras gaminamas daugelyje šalių. Tiriant iš trijų šaltinių gautus kefyro grybelio pavyzdžius visais atvejais buvo rasti *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter* ir *Saccharomyces*. *Leuconostoc mesenteroides* aptiktas tik viename iš jų. Tik viename buvo rasta ir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus parakefir* ir *Kluyveromyces marxianus*. Visais atvejais pagaminto kefyro pH siekė 3,5–4,0 [2].

KG esančios bakterijos ir mielės polisacharidu kefiranu sujungtos į grūdelių pavidalo struktūrą. Kefiranas sudarytas iš lygių dalių gliukozės ir galaktozės, jį produkuoja *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*. Bakterijų ir mielių santykis skirtinguose KG skiriasi. Išoriniame KG sluoksnyje vyrauja lazdelinės pieno rūgšties bakterijos, o KG šerdyje – mielės [3].

KG ir paties kefyro mikroorganizmų sudėtis skiriasi. KG randama 10^8 – 10^9 KSV/g laktokokų ir

leukonostokų, 10^7 – 10^8 KSV/g laktobacilų, 10^7 – 10^8 KSV/g mielių, 10^3 – 10^6 KSV/g acto rūgšties bakterijų (KSV – kolonijas sudarantys vienetai) [4]. Paties kefyro populiaciją sudaro 10^8 – 10^9 KSV/ml homofermentinių laktokokų (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*), 10^2 – 10^3 KSV/ml mezofilinių laktobacilų, 10^5 KSV/ml termofilinių laktobacilų, 10^7 – 10^8 KSV/ml heterofermentinių mezofilinių laktokokų (*Leuconostoc* spp.), 10^5 – 10^6 KSV/ml mielių, 10^5 – 10^6 KSV/ml acto rūgšties bakterijų, nukrypimai nuo šio santykio sukelia produkto ydas [5].

Darbo tikslas. Moksliniu ir praktiniu atžvilgiu yra aktualu nustatyti kultivuojamo išrūgose KG mikrobiologinę ir cheminę sudėtį, masės augimo ypatumus įvertinant įvairius technologinius faktorius ir mikrobiologinius rodiklius bei optimizuoti grybelio kaip vertingos biomasės auginimo sąlygas.

Tyrimų metodai ir sąlygos

Darbo technologinė dalis (KG auginimo procedūra veikiant įvairiems technologiniams faktoriams, fizikinių cheminių rodiklių nustatymas) atlikta KTU Maisto instituto Technologijos laboratorijoje ir eksperimentiniame stende. Darbo mikrobiologinė dalis atlikta KTU Maisto instituto Mikrobiologijos laboratorijoje. Įvertinant kefyro raugo mikrofloros dauginimąsi išrūgose po kultivavimo ir išlaikymo, jose nustatytas mielių ir pienarūgščių bakterijų skaičius. Pieno rūgšties bakterijų skaičius nustatytas ribinių skiedinių metodu, mielių skaičius – sėjimo į lėkšteles metodu, išreiškiant KSV ml(g). Higieninėms sąlygoms įvertinti parinkti rodikliai – koliforminių bakterijų skaičius, nustatytas sėjant į laktozės, tulžies, brilliantinės žalumos sultinį [6], ir salmonelės, tirtos pagal standartinę metodiką (LST 1432 Veterinarinė mikrobiologija. Bendrieji salmonelių (*Salmonella*) išskyrimo metodai). KG masės cheminė sudėtis nustatyta Lietuvos žemės ūkio universiteto Agronominių ir zootechninių analizų laboratorijoje „TEMPUS“, mikro- ir makroelementai KG masėje ir išrūgose – Lietuvos žemdirbystės instituto Agrocheminių tyrimų centre.

Identifikuojant pienarūgštes lazdeles, kultūros izoliuotos, pasėjus kultivuotų išrūgų skiedinius į MRS agarą. Lėkštelės termostatuotos anaerobinėmis sąlygomis (anaerostate). Atrinktos kolonijos persėtos keletą kartų, kontroliuojant izoliuotų kultūrų grynumą. Vėliau kultūros nuplautos į specialią terpę ir identifikuotos API 50 CH sistema („BioMerieux“) pagal gamintojo aprašymą. Joms identifikuoti panaudota API 50 CHL sistema, pritaikyta atpažinti Europoje žinomas ar naudojamas produktams gaminti *Lactobacillus* ir *Lactococcus* genties

pienarūgštes lazdeles ir kokus: *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. cellobiosus*, *L. collinoides*, *L. caprophilus*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii delbrueckii*, *L. delbrueckii lactis*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. helveticus*, *L. jensenii*, *L. lindneri*, *L. paracasei paracasei*, *L. casei casei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, tarp jų ir *Lactobacillus acidophilus* bei *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, naudojamas įvairiems fermentuojamiems produktams gaminti. Šia sistema galima apibūdinti ir rutulines bakterijas – *Lactococcus garvieae*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *hordniae*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. raffinolactis*, *Leuconostoc citreum*, *L. lactis*, *L. mesenteroides* ssp. *cremoris*, *L. mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*, *Leuconostoc* spp.

KG masės priaugio įvairiomis sąlygomis tyrimai kartoti 3–5 kartus (lentelėse pateikiamos vidutinės reikšmės), masės cheminės sudėties, aminorūgščių, mikro- ir makroelementų sudėties analizė atlikta iš bendro mėginio, paruošto sumaišius 3 gamybų KG biomasę.

Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Tiriant KG simbiotinius mikroorganizmus vertintas pienarūgščių bakterijų ir mielių skaičius. Pabandyta nustatyti pienarūgščių bakterijų, išskirtų iš išrūgų, kuriose buvo kultivuotas KG, grupes. Pirmiausiai nustatytas mezofilinių ir termofilinių pienarūgščių bakterijų santykis. Termofilinių bakterijų rasta mažai ar iš viso nerasta (1 lentelė), nes daugelis kefyro mikroorganizmų atstovų auga tik specialios sudėties terpėse [5]. Mes savo darbe neturėjome tikslo gilintis į kefyro mikroorganizmų tyrimus, siekėme tik parinkti palankias KG auginimo sąlygas, tarp jų ir pagal pagrindinius mikrobiologinius rodiklius, todėl specialių terpių nenaudojome. Termofilinių bakterijų rasta mažai. Pasėjus ant standžios terpės, buvo izoliuotos trys pienarūgščių bakterijų kultūros, besiskiriančios kolonijų morfologija, kurias bandyta identifikuoti taikant komercines mikroorganizmų identifikavimo sistemas.

Atlikus identifikavimo procedūras su minėta identifikavimo sistema, jos negalėjo būti priskirtos nei vienai iš sąrašė išvardintų, tarp jų ir naudojamų kitų produktų gamyboje pienarūgščių bakterijų rūšių (2 lentelė). Taigi atliktas tiriamasis darbas parodė, kad išrūgose kultivuojamo KG pienarūgščių bakterijų savybės ar rūšinė sudėtis kinta, tačiau pienarūgšties bakterijos aptinkamos dideliais kiekiais.

KG masės cheminė sudėtis bei masės energijos kiekis pateikti 3 lentelėje, mikrobiologiniai rodikliai – 4 lentelėje.

1 lentelė. Mezofilinių ir termofilinių pienarūgščių bakterijų sudėties tyrimai kefyro grybelyje bei terpėse, kuriose jis buvo kultivuotas

Tyrimo objektas	Mezofilinių pienarūgščių bakterijų skaičius 1 ml(g)	Termofilinių pienarūgščių bakterijų skaičius 1 ml(g)
Kefyras	$1,0 \times 10^8$	<1
Kefyro grybelis	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10$
Neplautas kefyro grybelis	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10$
Išrūgos, kuriose kultivuotas kefyro grybelis	$1,0 \times 10^7$	<1

2 lentelė Izoliuotų kultūrų biocheminės savybės pagal API 50 CHL testo rezultatus

Tiriama medžiaga	1 kultūra	2 kultūra	3 kultūra
Kontrolė	–*	–	–
Glicerolis	–	–	–
Eritritolis	–	–	–
D–Arabinozė	–	±**	–
L–Arabinozė	+***	+	–
Ribozė	+	+	–
D–Ksilozė	–	–	–
L–Ksilozė	–	–	–
Adonitolis	–	–	–
B Metil–ksilozidas	–	–	–
Galaktozė	+	+	+
D–gliukozė	–	+	+
D–Fruktozė	+	–	–
D–manozė	–	–	–
L–Sorbozė	–	–	–
Ramnozė	–	–	–
Dulcitolis	–	–	–
Inozitolis	–	–	–
Manitolis	–	–	–
Sorbitolis	–	–	–
A Metil–D–manozė	–	–	–
A Metil–D–gliukozė	–	–	–
N Acetyl gliukozaminas	–	–	–
Amigdalinas	–	–	–
Arbutinas	–	–	+
Eskulinas	–	–	–
Salicinas	–	+	–
Celobiozė	+	+	+
Maltozė	+	+	+
Laktozė	–	+	–
Melibiozė	–	+	+
Sacharozė	–	–	–
Trehalozė	–	–	–
Inulinas	–	–	–
Melazitozė	–	–	–
D–Rafinozė	–	–	–
Amidon	–	–	–
Glikogenas	–	–	–
Ksilitas	–	–	–
Gentabiozė	–	–	–
D–Turanozė	–	–	–
D–Lyksozė	+	+	–
D–Tagatozė	–	–	–

2 lentelės tęsinys

Tiriama medžiaga	1 kultūra	2 kultūra	3 kultūra
D–Fukozė	–	–	–
L–Fukozė	–	–	–
D–Arabitolis	–	–	–
L–Arabitolis	–	–	–
Glukonatas	+	+	–
2–ceto–Glukonatas	+	+	–
5–ceto–Glukonatas	–	–	–

* (–) – neskaido, ** (±) – silpnai skaido, *** (+) – skaido.

3 lentelė. Kefyro grybelio biomasės cheminė sudėtis ir energijos kiekis

Rodikliai	Natūralaus drėgnio kefyro grybelio masė, proc.	Sausa kefyro grybelio masė, proc.
Žali proteinai	4,5±0,4	32,7±1,9
Žali pelenai	1,2±0,12	8,7±0,64
Žalia ląstelienu	0,2±0,069	1,8±0,17
Žali riebalai	0,03±0,004	0,2±0,037
Sausųjų medžiagų kiekis natūralaus drėgnio kefyro grybelio biomasėje – 13,7 %		
Apykaitos energija – 13,40 MJ/kg		

4 lentelė. Kefyro grybelio masės mikrobiologiniai rodikliai

Rodikliai	Mikroorganizmų skaičius 1 g
Pienarūgštės bakterijos	10 ⁸
Koliforminės bakterijos	<1
Mielės	1,6×10 ⁵
Salmonelės, 25 g	nerastos

KG biomasėje nustatyta 86,3 % natūralaus drėgnio ir 13,7 % sausųjų medžiagų, iš kurių apie 4,5 % baltymų, 1,2 % pelenų, 0,2 % ląstelių ir 0,03 % riebalų. Natūralaus drėgnio KG biomasės apykaitos energija – 13,4 MJ/kg.

Iš mikrobiologinių KG analizės duomenų matyti (4 lentelė), jog jame vyrauja pienarūgštės bakterijos bei aptinkamas nedidelis kiekis mielių.

Biomasės maistingumo pagrindas yra baltymai, kurie sausojoje medžiagoje sudaro apie 33,0 % (pelenai – apie 9 %; ląstelienu – apie 1,8 %; riebalai – apie 0,2 %).

Kefyro grybelio masę sudaro stangroki 1–3 mm dydžio grūdėliai, kuriuose yra pakankamai daug natūralios drėgmės (iki 86,34 %). Ši masė greitai genda, todėl atskyrus nuo išrūgų reikia laikyti žemoje temperatūroje. Dėl šios priežasties natūralaus drėgnio KG kaip pašaro rekomenduojama vartojimo trukmė 1–2 paros.

Išrūgų transportavimo, o tuo pačiu ir jų panaudojimo problemas padeda spręsti jų

sutirštinimas. Todėl parenkant KG biomasės auginimo terpę bandytas skirtingas sausųjų medžiagų kiekis, gautas maišant įvairiu santykiu natūralias ir sutirštintas išrūgas. Sutirštintų išrūgų ir jų mišinio su natūraliomis panaudojimas neturėjo žymesnės įtakos nei pradiniam KG biomasės prieaugiui, nei jos prieaugiui po dviejų parų. Tais atvejais, kai sutirštintų ir natūralių išrūgų mišinių sausųjų mišinių (SM) buvo 14 % ir 16 %, nustatytas kiek didesnis pradinis KG masės prieaugis. Galima manyti, jog didėjant mišinio SM kiekiui didėja KG biomasė. Tokiu būdu, sutirštintų išrūgų panaudojimas KG auginimo ekonominiu ir technologiniu požiūriu būtų priimtinas, nors ir ne ypatingai efektyvus. KG masės augimo tendencija aiškintina KG augimui reikalingų maitinamųjų medžiagų kiekio padidėjimu auginimo terpėje. Iš kitos pusės, padidintas išrūgų terpės osmosinis slėgis galėjo veikti priešingai, t. y. stabdyti biomasės prieaugį.

Atlikus mikrobiologinius tyrimus, nustatyta, jog atskirų sutirštintų išrūgų variantų mielių skaičius svyruoja nuo 2,7×10⁵ KSV/ml iki 6,2×10⁵ KSV/ml, o pienarūgščių bakterijų skaičius pasiekia 1,0×10²/ml. Taigi yra galimybės auginimo KG ir sutirštintose išrūgose, nes jose po kultivavimo aptinkamos mielės ir pienarūgštės bakterijos, tačiau pastarųjų skaičius pastebimai mažesnis.

KG masė labiau didėjo mažėjant sutirštintų išrūgų santykiui. Svarbus veiksnys yra nupiltų išrūgų rūgštingumas. Tais atvejais, kai išrūgų pH viršijo 4,0, KG masės prieaugis nenustatytas. KG biomasės

prieaugis buvo didžiausias esant sutirštintų išrūgų pH 3,66–3,95. Šių bandymų rezultatai leidžia teigti, jog natūraliose varškės išrūgose KG toliau auga, o jo masė didėja, tik būtina kas 3–4 paras ant KG užpilti šviežių natūralių varškės išrūgų. Charakteringa, jog per visą ilgo kultivavimo ciklo laikotarpį (35 ir 21 paras) KG biomasė nuolat didėjo, tik masės prieaugis šiek tiek kito. Gauti tyrimų duomenys leidžia manyti, jog natūralios varškės išrūgos technologiniu požiūriu yra priimtinos KG biomasei auginti.

Kultivuojant KG varškės išrūgose lyginta šių išrūgų mikroorganizmų sudėtis (5 lentelė) auginimo pradžioje ir pabaigoje. Gauti duomenys rodo, kad varškės išrūgose yra daug pienarūgščių bakterijų ir šiek tiek mielių. KG biomasėje yra beveik po lygiai mielių ir pienarūgščių bakterijų. Po KG kultivavimo pasteurizuotose išrūgose 1, 2, 3 paras, jose išsilaiko pakankamai didelis pienarūgščių bakterijų skaičius (10^7) bei nemažai mielių. Taigi varškės išrūgos

užtikrina KG biomasės ir jo mikroorganizmų augimą.

Įvertinant KG laikymo ir apdorojimo sąlygas buvo nustatytas mielių ir pienarūgščių bakterijų skaičius šaldytame ir įvairiose augimo stadijose esančiame KG (6 lentelė). Nustatyta, kad jame yra gana nedaug pienarūgščių bakterijų, šaldytame mažiau, o aktyviame daugiau mielių, tačiau nei vienas iš tirtų variantų neužkrėstas koliforminėmis bakterijomis ir salmonelėmis.

Kadangi pradiniai rezultatai nerodė naudingų mikroorganizmų gausumo nei išrūgose, nei pačiame grybelyje, bandyta palyginti jo augimą varškės, fermentinių sūrių išrūgose ir piene (7, 8, 9 lentelės). Varškės išrūgose pienarūgščių bakterijų ir mielių užauga daugiau nei fermentinių sūrių išrūgose, tačiau suprantama, kad pienas yra palankiausia ir įprasta terpė – jame susidarė 10–100 kartų daugiau pienarūgščių bakterijų, bet mažiau mielių, nors ir pastebimas jų skaičiaus augimas kultivuojant.

5 lentelė. Varškės išrūgų mikrobiologiniai rodikliai po kefyro grybelio kultivavimo

Tyrimo objektas	Pienarūgščių bakterijų skaičius 1 ml(g)	Mielių skaičius, KSV/ml(g)	Koliforminių bakterijų skaičius 1 ml(g)	Salmonelės, 25 ml(g)
Varškės išrūgos prieš įterpiant kefyro grybelį	$1,0 \times 10^7$	$4,8 \times 10^3$	<1	nerastos
Kefyro grybelio masė	$7,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	<1	nerastos
Varškės išrūgos po kultivavimo:				
1 parą	$1,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^5$	<1	nerastos
2 paras	$1,0 \times 10^7$	$1,8 \times 10^5$	<1	nerastos
3 paras	$1,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^5$	<1	nerastos

6 lentelė. Kefyro grybelio mikrobiologinė charakteristika, priklausomai nuo laikymo sąlygų ir grybelio amžiaus

Tyrimo objektas	Pienarūgščių bakterijų skaičius 1 g	Mielių skaičius, KSV/g	Koliforminių bakterijų skaičius 1 g	Salmonelės, 25 g
Kefyro grybelis, šaldytas minus 10 °C temperatūroje	$1,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	<1	nerastos
Šviežias kefyro grybelis, kultivuotas varškės išrūgose 1 parą	$1,0 \times 10^3$	$4,6 \times 10^5$	<1	nerastos
Kefyro grybelis, kultivuotas varškės išrūgose 10 parų	$1,0 \times 10^3$	$7,3 \times 10^5$	<1	nerastos

7 lentelė. Varškės išrūgų mikrobiologiniai pokyčiai kefyro grybelio kultivavimo metu

Tyrimo objektas	Pienarūgščių bakterijų skaičius 1 ml	Mielių skaičius, KSV/ml	Koliforminių bakterijų skaičius 1 ml	Salmonelės, 25 ml
Varškės išrūgos po 1 paros kultivavimo	$1,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	<1	nerastos
Varškės išrūgos po 2 parų kultivavimo	$1,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^5$	<1	nerastos
Varškės išrūgos po 3 parų kultivavimo	$1,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	<1	nerastos

8 lentelė. Fermentinių sūrių išrūgų mikrobiologiniai pokyčiai kefyro grybelio kultivavimo metu

Tyrimo objektas	Pienarūgščių bakterijų skaičius 1 ml	Mielių skaičius, KSV/ml	Koliforminių bakterijų skaičius 1 ml	Salmonelės, 25 ml
Fermentinių sūrių išrūgos po 1 paros kultivavimo	$1,0 \times 10^6$	$4,5 \times 10^4$	<1	nerastos
Fermentinių sūrių išrūgos po 2 parų kultivavimo	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	<1	nerastos
Fermentinių sūrių išrūgos po 3 parų kultivavimo	$1,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	<1	nerastos

Sanitarinės sąlygos bandymo metu buvo tinkamos, koliforminės bakterijos ir salmonelės nebuvo išskirtos.

Laboratorinėmis sąlygomis gautų produktų rodikliai buvo palyginti su prekybos tinkle įsigyto kefyro rodikliais. Analizuotas kefyras, gamintas su tradiciniu raugu, o kito gamintojo – su koncentruotu raugu (10 lentelė). Matome, kad tradicinio kefyro rodikliai panašūs į mūsų tyrimo metu gautus varškės ir fermentinio sūrio išrūgų rodiklius, – iš jo išskirtos ir mielės ir pienarūgštės bakterijos. Kefyre, pagamintame su koncentruotais raugais, imituojančiais KG mikroorganizmus, bet neturinčiais mielių, kaip ir buvo tikėtasi, mielių neaptikta, o pienarūgščių bakterijų rasta apie 100 kartų daugiau –

taigi šį kefyru vadinamą produktą galima laikyti rūgpieniu, nes mikroskopiniame preparate matomi tik kokai. Koliforminės bakterijos nei viename produkte nerastos.

Vertinant galimybes panaudoti sutirštintas ar prisotintas anglies dvideginio išrūgas, įvertinta anglies dvideginio įtaka kefyro grybelio mikroflorai daugintis (11 lentelė). Tyrimo duomenys patvirtino, kad terpės prisotinimas anglies dvideginio nekenkia nei mielių, nei pienarūgščių bakterijų gyvybingumui. Tokių išrūgų mikroskopiniame preparate, taip pat kaip ir prieš apdorojant anglies dvideginio, matomos daugiausiai lazdelių formos bakterijos, pasitaiko mielių ir koku.

9 lentelė. Pieno mikrobiologinių rodiklių pokyčiai kefyro grybelio kultivavimo metu

Tyrimo objektas	Pienarūgščių bakterijų skaičius 1 ml	Mielių skaičius, KSV/ml	Koliforminių bakterijų skaičius 1 ml	Salmonelės, 25 ml
Pienas, kuriame kefyro grybelis buvo kultivuotas 1 parą	$1,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^2$	<1	nerastos
Pienas, kuriame kefyro grybelis buvo kultivuotas 2 paras	$1,0 \times 10^9$	$9,0 \times 10^4$	<1	nerastos

10 lentelė. Prekybos tinkle įsigyto kefyro mikrobiologiniai rodikliai

Tyrimo objektas	Pienarūgščių bakterijų skaičius 1 ml	Mielių skaičius, KSV/ml	Koliforminių bakterijų skaičius 1 ml	Salmonelės, 25 ml
Kefyras, pagamintas naudojant natūralų kefyro grybelio raugą (A gamintojas)	$1,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^4$	<1	nerastos
Kefyras, pagamintas naudojant koncentruotus raugus (B gamintojas)	$1,0 \times 10^9$	<1	<1	nerastos

11 lentelė. Apdorojimo anglies dvideginiu įtaka išrūgų, kuriose kultivuotas kefyro grybelis, mikrobiologiniams rodikliams

Tyrimo objektas	Pienarūgščių bakterijų skaičius 1 ml	Mielių skaičius, KSV/ml	Koliforminių bakterijų skaičius 1 ml	Salmonelės, 25 ml
Kultivuotos išrūgos prieš gazavimą	$1,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	<1	nerastos
Kultivuotos išrūgos po gazavimo	$1,0 \times 10^4$	$3,4 \times 10^6$	<1	nerastos

Apibendrinant gautus rezultatus, galima konstatuoti, jog išrūgose kultivuotame KG išlieka pagrindiniai mikroorganizmai – pienarūgštės bakterijos ir mielės, o KG kultivavimas varškės ar fermentinių sūrių išrūgose praturtina jas naudingomis pienarūgštėmis bakterijomis ir mielėmis. Šie mikroorganizmai gali išgyventi ir sutirštintose ar apdorotose anglies dvideginiu išrūgose.

Iš gautų duomenų galima daryti išvadą, jog kultivuojant KG masę natūraliose varškės išrūgose ir periodiškai, kas 3–4 paras jas keičiant šviežiomis, pasiekiamas gana didelis KG biomasės prieaugis (iki 28,02–28,27 % kiekvieno 3–4 parų ciklo metu).

Tyrimų rezultatų apibendrinimas

Lietuvoje, kaip ir visame pasaulyje, labai aktuali yra racionalaus išrūgų perdirbimo problema, kadangi kasmet šalies pieno pramonė gauna didelį kiekį išrūgų, iš kurių į produktus perdirba tik apie 21 %. Visa kita dalis gautų išrūgų išleidžiama į kanalizaciją ar išvežama į sąvartynus, taip darant didžiulę žalą gamtai. Todėl ieškoma efektyvių technologinių sprendimų, kaip racionaliau perdirbti ir panaudoti varškės ir fermentinių sūrių gamyboje susidarančias išrūgas.

Šiame darbe, siekiant nustatyti kefyro grybelio kaip maistinio ir pašarinio priedo sudėtį ir optimalias kultivavimo išrūgose sąlygas, ištirta KG baltyminės masės mikroorganizmų sudėtis, biomasės auginimo

sąlygos, kultivuojant jį varškės išrūgose, fermentinėse išrūgose ir sutirštintose išrūgose.

Nustatyta, jog išrūgose, kuriose buvo kultivuotas KG, rasta labai mažai termofilinių bakterijų. Pagrindinę mikroorganizmų dalį išrūgose sudaro mezofilinės pienarūgštės bakterijos. Panaudojant identifikavimo sistemą API 50 CHL išskirtos 3 grynos kultūros, kurių nepavyko identifikuoti, nes pagal nustatytas biochemines savybes jos nebuvo priskirtos nei vienai iš identifikavimo sistemos sąrašė išvardintų pienarūgščių bakterijų.

Pažymėtina, jog natūraliose ir sutirštintose išrūgose kultivuotas KG kokybiškai išlaiko savo pagrindinės mikrofloros sudėtį – pienarūgštės bakterijas (pastarosios kiekybiškai yra vyraujančios) ir kefyro mieles.

Didžiausias KG biomasės prieaugis (iki 21,47–23,13 %) po 3–4 parų kultivavimo pasiektas KG kultivuojant natūraliose varškės išrūgose, kurios periodiškai, kas 3–4 paras buvo keičiamos šviežiomis. KG masės prieaugis natūraliose išrūgose nuolat didėjo, taikant ilgalaikį masės persėjimų laikotarpį (35 paras). Pusiau pramoniniai KG masės auginimo bandymai patvirtino laboratorijoje gautus rezultatus.

Kultivuojant KG natūraliose išrūgose 1–3 paras, jose taip pat nustatytas pakankamai didelis (10^7 /ml) pienarūgščių bakterijų kiekis.

Neapdorota KG biomasė yra tinkama kiaulėms ir paukščiams šerti, tačiau dėl savo struktūrinių savybių

(stangroki 1–3 mm dydžio grūdėliai) mažiau tinkama žmogaus mitybai.

Išvados

1. Nustatyta, jog vienu iš perspektyvių išrūgų perdirbimo būdų galėtų būti jų kaip mitybos terpės panaudojimas kefyro grybelio biomasei auginti.
2. Pagrindinę išrūgų, kuriose buvo kultivuotas kefyro grybelis, bakterijų dalį sudaro mezofilinės pienarūgštės bakterijos. Izoliuotos kultūros pagal nustatytas biochemines savybes nebuvo priskirtos nei vienai identifikavimo sistemos API 50 CHL sąrašo išvardintai pienarūgščių bakterijų rūšiai.
3. Kefyro grybelio biomasę sudaro 86,3 % natūralaus drėgnio ir 13,7 % sausųjų medžiagų, iš kurių apie 4,5 % baltymų, 1,2 % pelenų, 0,2 % ląstelienos ir 0,03 % riebalų. Biomasės maistingumo pagrindas yra baltymai, kurie sausojoje medžiagoje sudaro apie 33,0 % (pelenai – apie 9 %, ląsteliena – 1,8 %, riebalai – 0,2 %).
4. Kefyro grybelio biomasės augimas natūraliose išrūgose ir jų mišiniuose su sutirštintomis išrūgomis yra trumpalaikis procesas (1–4 paros). Jį galima prailginti atnaujinant kefyro grybelio mitybos terpę, t. y. periodiškai, kas 1–4 paros užpilant kefyro grybelį šviežiomis išrūgomis ar jų mišiniais.
5. Kultivuojant kefyro grybelį natūraliose išrūgose 1–3 paros, jose nustatytas pakankamai didelis (10^7 /ml) pienarūgščių bakterijų kiekis.
6. Kefyro grybelio biomasė kaip vertingas priedas tinka kiaulėms ir paukščiams šerti, tačiau dėl savo struktūrinių savybių mažiau tinka žmogaus mitybai. Išrūgos, kuriose buvo auginamas kefyro grybelis, vartotinos gyvuliams girdyti ar kazeinui gaminti.

Literatūra

1. **Sebastian Rimada S., Graciela Abraham A.** Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation // *Journal of Dairy Research*. 2001. Vol. 68, No. 4. P. 653–661.
2. **Garrotte G. L., Abraham A. G., Antoni G. L.** Chemical and microbiological characterisation of kefir grains // *Journal of Dairy Research*. 2001. Vol. 68, No. 4. P. 639–652.
3. **Королева Н. С.** Техническая микробиология кисломолочных продуктов. Москва: Пищевая промышленность, 1966. 248 с.
4. **Bottazzi V., Zacconi C., Sarra P. G., Dallavalle P., Parisi M. G.** Kefir microbiology, chemistry and technology // *Ind. Latte*. 1994. Vol. 30. P. 41–62.
5. **Seiler H.** A review: Yeasts in kefir and kumiss // *Milchwissenschaft*. 2003. Vol. 58, No. 7/8. P. 392–396.

6. **Šalomskienė J.** Mikrobiologinės kontrolės instrukcija pieno perdirbimo įmonėms. Vilnius, 1996. 124 p.

Pateikta spaudai 2004-09

A. Liutkevičius, A. Šarkinas

COMPOSITION OF KEFIR GRAIN BIOMASS AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CURD WHEY AFTER CULTIVATION

Summary

The study found that milk whey is a suitable growing medium for the kefir grain (KG) biomass. Growth conditions were evaluated according to the increase in the kefir grain biomass. The content of lactic acid bacteria was determined by the limited dilution method. To determine yeast content the plate method was used.

The mesophilic lactic acid bacteria accounted for the major of the curd whey microflora after cultivation of KG. By applying an API 50 CH commercial system of identification, 3 pure cultures were separated from the curd whey. However, none of the cultures could be attributed to any known lactic acid bacteria listed in the identification system.

The growth of the kefir grain biomass in natural curd whey, partly evaporated whey and their mixtures is a process of short duration (1–4 days). It is possible to prolong this process by renewing KG nutrition medium, i. e. by regularly (every 1–4 days) adding fresh whey or its mixtures to the cultivation medium.

It should be noted that kefir grain when cultivated in the natural or partly evaporated curd whey retains the quality of its main of microflora, i.e. lactic acid bacteria and kefir yeasts.

The highest increase in the kefir grain biomass (21.47–23.13 %) was observed in the natural curd whey after 3 days cultivation. The biomass of KG increased after a long cultivation period (35 days) using a multiple transplantation method. The cultivation of KG in natural curd whey resulted in a sufficiently high content of lactic acid bacteria (10^7 /ml).

Compared to cheese whey, curd whey has been found to contain a higher content of lactic acid bacteria and yeasts (after cultivation of KG) therefore it is considered a better medium for the growth of the kefir grain biomass as well as for the production of the microorganisms.

Keywords: whey, kefir grain, cultivation, growing conditions, microbiological characteristics.

А. Люткавичюс, А. Шаркинас

СОСТАВ БИОМАССЫ КЕФИРНОГО ГРИБКА И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СРЕДЫ ВЫРАЩИВАНИЯ

Резюме

Установлено, что творожная сыворотка является подходящей средой для выращивания биомассы кефирного грибка. Условия роста оценивали по

приросту биомассы грибка. Количество молочнокислых бактерий определяли методом предельных разведений, количество дрожжей – чашечным методом.

Основную микрофлору сыворотки после культивирования кефирного грибка составляют мезофильные молочнокислые бактерии. Идентификация 3 выделенных культур молочнокислых бактерий с помощью системы идентификации API 50 CHL показала, что обнаруженные в сыворотке молочнокислые бактерии являются нетипичными для кефира.

Выращивание биомассы кефирного грибка в творожной сыворотке или ее смеси – кратковременный процесс, не превышающий 1–4 суток. Его можно продлить регулярным обновлением питатель-

ной среды, т. е. заменой отработавшей сыворотки свежей через каждые 1–4 суток.

Биомасса кефирного грибка после культивирования в сыворотке сохраняет в своем составе молочнокислые бактерии и дрожжи.

Наибольший прирост биомассы кефирного грибка (до 21,47–23,13 %) получен после 3 суток культивирования в натуральной творожной сыворотке. В сыворотке после выращивания кефирного грибка определено достаточно большое количество молочнокислых бактерий – 10^7 в 1 мл.

Творожная сыворотка по сравнению с подсырной сывороткой является более подходящей средой как для роста биомассы, так и для микрофлоры кефирного грибка.