

Istraživanje mikroflore radne kulture proizvedene od kefirnih zrnaca različitog podrijetla

Marija Jukić, Ljerka Gregurek, Ljubica Tratnik

Izvorni znanstveni rad – Original scientific paper

UDK: 637.146.21

Sažetak

Fermentirani mliječni napici u koje se ubraja i kefir, namirnice su visoke prehrambene i biološke vrijednosti. Kulture za proizvodnju kefirna dobivaju se fermentacijom mlijeka pomoću kefirnih zrnaca. Mikroflora kefirnih zrnaca je vrlo složena i promjenjivog sastava, a sadržava više vrsta bakterija i kvasaca.

Cilj ovog rada bio je odrediti broj živih stanica laktokoka, laktobacila i kvasaca u kefirnoj kulturi, o čemu ovisi kvaliteta proizvoda-kefirna.

Mikrobiološki sastav određen je u kefirnoj kulturi pripremljenoj od dvije vrste kefirnih zrnaca (K i N) fermentacijom na dvije temperature (20 i 22°C). Ispitana je i higijenska ispravnost kefirne kulture (prisutnost bakterije Escherichia coli i različitih vrsta plijesni). Za određivanje broja živih stanica laktobacila upotrijebljen je MRS-agar, a za određivanje broja živih stanica laktokoka upotrijebljen je M17-agar.

Broj živih stanica kvasaca i plijesni određen je pomoću podloge "YM Petrifilm", a moguća prisutnost živih stanica Escherichia coli i drugih koliformnih bakterija ispitana je pomoću podloge "EC Petrifilm". Za pripremu kefirne kulture korišteno je obrano mlijeko (1,0 % mliječne masti) pasterizirano na 90°C/15 minuta u koje su paralelno nacijepljena kefirna zrnca oznake K i N. Po završenoj fermentaciji (18 sati) i nakon hlađenja, kefirna su zrnca odvojena filtracijom, a ispitana je kiselost i mikroflora filtrata - kefirne kulture korištene za proizvodnju kefirna (na 20°C) od pasteriziranog mlijeka s 3,2% mliječne masti.

Broj živih stanica laktobacila u kefirnoj kulturi N inkubiranoj na 20°C bio je $3,3 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹, a na 22°C $9,0 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹, dok je u kulturi K, inkubiranoj na 20°C bio $2,7 \cdot 10^6$ cfu mL⁻¹ a na 22°C $6,9 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹. Broj živih stanica laktokoka u kefirnoj kulturi N, inkubiranoj pri 20°C bio je $6,2 \cdot 10^8$ cfu mL⁻¹ a

pri 22°C $9,7 \cdot 10^8$ cfu mL⁻¹, dok je u kulturi K inkubiranoj na 20°C bio $8,3 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹, a na 22°C $8,0 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹.

Rezultati ispitivanja broja kvasaca pokazala su da kultura K sadržava manji broj kvasaca na obje odabrane temperature fermentacije (K_{20} je $7,1 \cdot 10^4$ cfu mL⁻¹ i K_{22} je $6,9 \cdot 10^4$ cfu mL⁻¹) od kulture N (N_{20} je $1,2 \cdot 10^5$ cfu mL⁻¹ i N_{22} je $1,6 \cdot 10^5$ cfu mL⁻¹).

Kefirna kultura proizvedena pomoću kefirnih zrnaca oznake K_{22} utjecala je na bolje senzorske osobine kefira tijekom ukupnog perioda čuvanja (9 dana) u hladnjaku (6-8 °C).

Ključne riječi: kefir, kefirna zrnca, petrifilm, mikroflora.

Uvod

Fermentirana mlijeka su proizvodi koji se međusobno razlikuju, ovisno o vrsti upotrijebljene kulture i o primijenjenoj tehnologiji. Fermentirani proizvodi ranije su pripremani u seoskim domaćinstvima, a karakteristike su ovisile o kraju u kome su proizvedeni. Krajem pedesetih godina fermentirani proizvodi postaju najznačajniji proizvodi u mljekarskoj industriji zapadne Europe. Značenje dobivaju isticanjem njihove zdravstvene uloge, pa tako fermentirana mlijeka postaju esencijalne namirnice.

Najčešće zastupljena mikroflora u fermentiranim mliječnim proizvodima su bakterije mliječne kiseline, koje daju svježi kiselkast okus, formiraju i teksturu gruš. Posljednjih godina potrošači sve više uzimaju fermentirane mliječne proizvode jer imaju i terapijska svojstva, tj. povoljno djeluju na zdravlje potrošača. U takve proizvode ubraja se i kefir, mliječno kiselinski-alkoholni napitak proizveden upotrebom prirodne kefirne kulture (tj. kefirnih zrnaca) koja uz bakterije mliječne kiseline sadržava i kvasce. Prema legendi, kefirna su zrnca dobili stanovnici Kavkaza od Muhameda koji je strogo zabranio odavanje tajne proizvodnje kefira. Tako su kefirna zrnca bila poznata i kao "Muhamedova zrnca" (K o r o l e v a, 1991.), a mnogi ih nazivaju i "Božji dar" (K o s i k o w s k i, 1982.). Kefir - proizveden pomoću kefirnih zrnaca, navodi veliki broj autora (L i b u d z i s z i P i a t k i e w i c z, 1990.; A n g u l o i sur., 1993.; B o t t a z z i i sur., 1994.) - ima visoku nutritivnu, biološku i dijetalnu vrijednost. Znanstvenici širom svijeta bave se sastavom kefira, svojstvima i uvjetima uzgoja kefirnih zrnaca, problemom proizvodnje

te utjecajem postupka i korištene kulture na njegovu kvalitetu i trajnost (K o r o l e v a, 1982.; R e a i sur.,1996.).

Svrha ovoga rada je istražiti mikrofloru kefirne kulture pripravljene od dvije vrste kefirnih zrnaca inkubiranih na 20 i 22°C, te ispitati utjecaj tih kultura na senzorska svojstva kefira tijekom 9 dana čuvanja u hladnjaku.

Materijali i metode

Materijal

Za pripravu radne kulture od kefirnih zrnaca korišteno je obrano, homogenizirano mlijeko (1% mliječne masti), a za proizvodnju kefira upotrijebljeno je je djelomično obrano, homogenizirano mlijeko (3,2 % mliječne masti).

Za pripravu radne kulture u ovom istraživanju uzete su dvije vrste kefirnih zrnaca oznake K i N, privatni izvor tvrtke «Probiotik» Zagreb.

Za određivanje broja živih stanica laktobacila upotrijebljen je MRS-Agar (pH=5,7 na 21°C) tvrtke «Biolife», a za određivanje broja živih stanica laktokoka upotrijebljen je M17-Agar (pH=6,8 na 21°C) tvrtke «Biolife». Podloge su pripravljene prema navedenoj uputi proizvođača.

Za određivanje broja živih stanica kvasaca i plijesni korištene su podloge «YM Petrifilm» (Petrifilm Yeast and Mould Count Plates), a za određivanje moguće prisutnih živih stanica *Escherichia coli* i drugih koliformnih bakterija korištene su podloge «EC Petrifilm» (Petrifilm *Escherichia coli* and Coliform Count Plates).

Podloge su upotrijebljene prema uputi proizvođača (3M Petrifilm™).

Priprava radne kulture za proizvodnju kefira

Mlijeko za pripravu radne kefirne kulture pasterizirano je u šaržnom pasterizatoru (tvrtke Pecon) na 90°C tijekom 15 minuta. Za dvije serije pokusa mlijeko je ohlađeno na: 20°C i 22°C.

Uzorci pasteriziranog obranog mlijeka ohlađeni na zadane temperature (20°C i 22°C) nacijepljeni su kefirnim zrcima različitih oznaka : zrnca oznake K i zrnca oznake N. Nacijepljeno mlijeko inkubirano je na zadanim

temperaturama fermentacije : 20 i 22°C tijekom 18 sati. Nakon 18 sati i pojave čvrstog koaguluma pripremljeni uzorci su ostavljeni u hladnjak (temperature oko 6-8°C) tijekom 10 –12 sati. Ohlađeni koagulum s kefirnim zrnima procijeđen je u prostoriji prethodno osvijetljenoj UV zrakama preko steriliziranih cjedila u sterilizirane posude: kefirna zrnca odvojena su od gruš. Odvojena kefirna zrnca oznake K i N ponovno se naciepljuju u pasteurizirano mlijeko za sljedeću proizvodnju kefirne kulture, tj. u svrhu razmnožavanja kefirnih zrnaca. Od zrnaca odvojeni koagulum koristio je kao radna kultura za proizvodnju kefira.

Uzorcima kefirne kulture određena je pH-vrijednost, titracijska kiselost (izražena u °SH i % mliječne kiseline) te broj:

- ♦ živih stanica laktobacila (na 37°C)
- ♦ živih stanica laktokoka (na 30°C)
- ♦ živih stanica kvasaca (na 25°C)

Zbog utvrđivanja higijenske ispravnosti pripravljene kulture, kontrolirana je i prisutnost koliformnih bakterija i *Escherichia coli* (na 37°C).

Proizvodnja kefira

Za proizvodnju kefira korišteno je homogenizirano mlijeko s 3,2 % mliječne masti pasteurizirano na 90°C tijekom 15 minuta. Mlijeko je ohlađeno na 20°C i naciepljeno s 2% inokuluma pripremljenih kefirnih kultura:

- ♦ K₂₀ (kultura pripravljena fermentacijom zrnaca oznake K na temperaturi 20°C).
- ♦ K₂₂ (kultura pripravljena fermentacijom zrnaca oznake K na temperaturi 22°C).
- ♦ N₂₀ (kultura pripravljena fermentacijom zrnaca oznake N na temperaturi 20°C).
- ♦ N₂₂ (kultura pripravljena fermentacijom zrnaca oznake N na temperaturi 22°C).

Naciepljeni uzorci mlijeka za kefir inkubirani su na 20°C. Nakon 18 sati inkubacije uzorci kefira su spremljeni u hladnjak i čuvani tijekom devet dana na temperaturi 6-8°C. Prvi, treći, šesti i deveti dan čuvanja uzorcima kefira određena je pH-vrijednost, te su im ocijenjena senzorska svojstva.

Mjerenje pH-vrijednosti vršeno je na pH-metru "Knich" tip 646, uz očitavanje 5 minuta nakon uranjanja elektrode u uzorak.

Određivanje broja živih stanica laktobacila

Količinu od 1 mL uzorka odabranog decimalnog razrjeđenja odpipetirati u Petrijevu zdjelicu i preliterati s otopljenom hranjivom podlogom temperature oko 45°C uz miješanje. Kada podloga očvrstne, preliterati još jednim slojem iste podloge kako bi se stvorili anaerobni uvjeti potrebni za rast laktobacila. Nakon 72 sata inkubacije na 37°C izbrojiti izrasle kolonije. Broj izraslih kolonija pomnožiti s recipročnom vrijednošću odabranog decimalnog razrjeđenja. Dobivena vrijednost je broj kolonija živih stanica laktobacila u 1 mL uzorka (CFU, Colony Forming Units). Rađena je serija od šestog i sedmog decimalnog razrjeđenja.

Određivanje broja živih stanica laktokoka

Količinu od 1 mL uzorka odabranog decimalnog razrjeđenja otpipetirati u Petrijevu zdjelicu i preliterati otopljenom hranjivom podlogom temperature oko 45°C. Očvrstnutu podlogu staviti na inkubaciju 72 sata na temperaturi od 30°C. Nakon inkubacije prebrojiti izrasle kolonije, broj pomnožiti s recipročnom vrijednošću odabranog decimalnog razrjeđenja. Dobivena vrijednost je broj kolonija živih stanica laktokoka u 1 mL uzorka (CFU, Colony Forming Units). Rađena je serija od šestog i sedmog decimalnog razrjeđenja.

Priprava uzoraka za Petrifilm podloge

Pripravi se otopina uzorka 1:10. Odpipetira se uzorak u staklenu posudu. Dodati odgovarajuću količinu otapala. Kao otapalo koristi se standardna Ringerova otopina. Proizvođač zabranjuje primjenu otopina koje sadrže Na - citrat i tiosulfat. Nakon toga promiješati, odnosno homogenizirati uzorak za daljnji postupak (B e t t s i sur., 1994.).

Nacjepljivanje

Prilikom nacjepljivanja mora se svaki Petrifilm staviti na ravnu podlogu. Nakon toga podignuti pokrovni dio sastavljen od polipropilena i premazan gelom indikatorske boje. Nakon što se pipetom uzme 1 mL homogeniziranog uzorka, vrh pipete prenijeti okomito na površinu Petrifilma, te točno u središte filma ispustiti 1 mL uzorka. Nakon toga pažljivo spustiti pokrovni dio da bi se izbjeglo nepoželjno zadržavanje mjehurića zraka. Daljnji postupak nacjepljivanja razlikuje se kod YM Petrifilma i EC Petrifilma.

Određivanje broja živih stanica kvasaca (YM Petrifilm)

Udubljenu stranu plastičnog kalupa prisloniti na gornju plohu Petrifilma neposredno iznad nacijepljenog uzorka. Nakon toga prstima lagano pritisnuti plastični kalup kako bi se nacijepljeni materijal kružno proširio i poprimio kružni oblik udubljenja kalupa. Plastični kalup ne smije klizati po podlozi odnosno po gornjoj površini Petrifilma. Sa plastičnim kalupom ne smiju se činiti kružni pokreti.

Zatim plastični kalup podignuti da se gel ukruti. Nakon obavljenog nacijepljivanja, prikupiti podloge Petrifilma, naslagati jednu na drugu do 20 komada; prozirnú stranu okrenuti prema gore. Tako naslagane podloge Petrifilma staviti u termostat i to YM Petrifilme na temperaturi inkubacije 25°C 3 do 5 dana. Po završetku inkubacije podloge Petrifilma izvaditi iz termostata, te prebrojiti vidljivo izrasli broj kolonija živih stanica kvasaca i plijesni u 1 mL uzorka (CFU/mL) (B e a u c h a t i sur., 1990.).

Određivanje broja živih stanica *Escherichia coli* i drugih koliformnih bakterija (EC Petrifilm)

Donja podloga Petrifilma ima kružno udubljenje u koje stane točno 1 mL uzorka. Zbog toga se, nakon nacijepljivanja uzorka i spuštanja pokrovnog djela, poravnavanje obavi ravnom stranom plastičnog kalupa. Nakon toga prstima se lagano pritisne plastični kalup kako bi se nacijepljeni materijal kružno proširio i poprimio kružni oblik udubljenja na Petrifilmu. Pri tome je važno, da se plastični kalup ne kliže po podlozi, odnosno po gornjoj površini Petrifilma. S plastičnim kalupom ne smiju se činiti kružni pokreti. Nakon toga se plastični kalup podigne da se gel ukruti. Nakon obavljenog nacijepljivanja, prikupiti podloge Petrifilma, naslagati jedna na drugu do 20 komada sa prozirnóm stranom okrenutom prema gore. Tako naslagane podloge Petrifilma staviti u termostat i to: EC Petrifilme na temperaturu inkubacije od 37°C 24 do 48 sati. Po završetku inkubacije podloge Petrifilma izvaditi iz termostata, te prebrojiti vidljivo izrasli broj kolonija živih stanica (CFU) u 1 mL uzorka (Suhren, 1990.).

Tablica 1: Srednja vrijednost broja živih stanica laktobacila, laktokoka i kvasaca, (N), u 1mL uzorka radnih kefirnih kultura (N₂₀, N₂₂, K₂₀ i K₂₂).

Table 1: The average value of viable number of lactobacilli, lactococci and yeasts, (N), in 1mL of kefir culture samples (N₂₀, N₂₂, K₂₀ i K₂₂).

Broj živih stanica Viable cell number	N (CFU / mL)			
	N ₂₀	N ₂₂	K ₂₀	K ₂₂
Laktobacili Lactobacilli	$3,3 \cdot 10^7$	$9,0 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^7$
Laktokoki Lactococci	$6,2 \cdot 10^8$	$9,7 \cdot 10^8$	$8,3 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$
Kvasci Yeasts	$1,2 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$7,1 \cdot 10^4$	$6,9 \cdot 10^4$

Tablica 2: Prosječna kiselost uzoraka radne kulture za proizvodnju kefira

Table 2: The average acidity of culture samples for kefir production

Kiselost Acidity	Uzorci kefirnih kultura /Kefir culture samples			
	N ₂₀	N ₂₂	K ₂₀	K ₂₂
pH	4,45	4,41	4,43	4,47
°SH	38,84	39,97	38,75	40,60
% mliječne kiseline* % lactic acid	0,874	0,899	0,872	0,914

*°SH °0,0225

Senzorska procjena kefira

Senzorska svojstva pripremljenih uzoraka kefira (K_{K22} , K_{K20} , K_{N22} , K_{N20}) ocijenjena su metodom ponderiranih bodova. Svako svojstvo je ocijenjeno ocjenom od 1 do 5. Zatim je ocjena pomnožena s faktorom značajnosti i tako su dobiveni ponderirani bodovi (ISO, 1985.). Panel skupina senzorskih ocjenjivača sastojala se od 5 članova.

Rezultati i rasprava

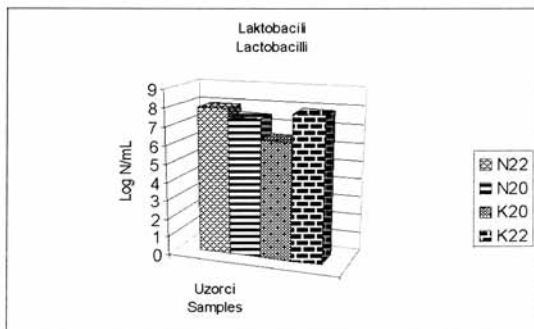
Nakon 18 sati fermentacije mlijeka za pripremu kefirne kulture, bez obzira na vrstu kefirnih zrnaca (K i N) i temperaturu inkubacije (20 i 22 °C), dobiven je čvrsti koagulum. Kefirna zrnca nalazila su se na površini koaguluma što je znak aktivnosti kefirnih zrnaca (Sabadoš, 1958.). Nakon hlađenja koagulum sa kefirnim zrcima čuvan je u hladnjaku (6-8 °C oko 10 sati) što pogoduje nastanku intenzivnije arome (K o r o l e v a, 1991.). Radna kultura za pripremu kefira dobivena je tada nakon odvajanja kefirnih zrnaca filtracijom.

Tablica 1 i slike 1, 2, 3 prikazuju rezultate određivanja broja živih stanica laktobacila, laktokoka i kvasaca u uzorcima radnih kultura korištenih za proizvodnju kefira. Kiselost pripremljenih kultura (pH i °SH) prikazana je u tablici 2.

Prikazani rezultati su srednje vrijednosti od 3 ponovljena pokusa.

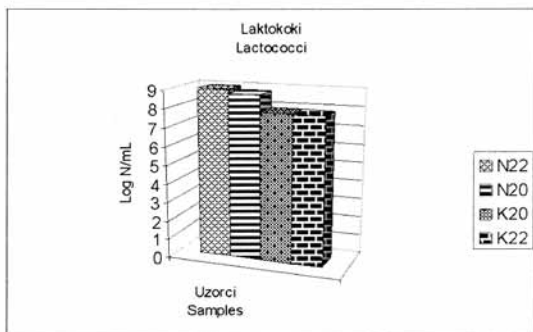
U uzorcima kefirnih kultura pripremljenih pomoću kefirnih zrnaca oznake N, rezultati pokazuju (tablica 1) da se broj živih stanica laktokoka, osobito laktobacila, povećao na višoj temperaturi inkubacije (22 °C).

Kada je za inkubaciju zrnaca oznake K korištena viša temperatura (22 °C) broj živih stanica laktobacila u kefirnoj kulturi K_{22} je značajno porastao, a broj laktokoka je bio gotovo isti kao i na nižoj temperaturi inkubacije (20 °C). Stoga se smatra da je za laktobacile prisutne u kefirnim zrcima oznake K bila puno povoljnija povišena temperatura inkubacije (tablica 1). Međutim, broj živih stanica laktobacila u kefirnoj kulturi pripremljenoj pomoću kefirnih zrnaca oznake K općenito je manji u odnosu na kulturu pripremljenu kefirnim zrcima oznake N (slika 1) i to značajno manji kod K_{20} nego kod N_{20} kulture (tablica 1).



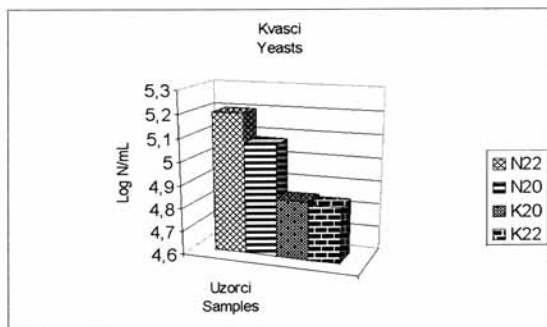
Slika 1: Broj živih stanica laktobacila ($\log N$) u 1mL uzorka pripremljenih kultura (N_{20} , N_{22} , K_{20} i K_{22}) za proizvodnju kefira.

Figure 1: The viable number of lactobacilli ($\log N$) in 1mL kefir culture samples (N_{20} , N_{22} , K_{20} i K_{22}) for kefir production



Slika 2: Broj živih stanica laktokoka ($\log N$) u 1mL uzorka pripremljenih kultura (N_{20} , N_{22} , K_{20} i K_{22}) za proizvodnju kefira.

Figure 2: The viable number ($\log N$) of lactococci in 1mL kefir culture samples (N_{20} , N_{22} , K_{20} i K_{22}) for kefir production



Slika 3: Broj živih stanica kvasaca ($\log N$) u 1 mL uzorka pripremljenih kultura (N_{20} , N_{22} , K_{20} i K_{22}) za proizvodnju kefira.

Figure 3: The viable number of yeasts ($\log N$) in 1 mL kefir culture samples (N_{20} , N_{22} , K_{20} i K_{22}) for kefir production.

Prema podacima iz literature (K o r o l e v a, 1991.) navodi se da je u kefirnoj kulturi broj živih stanica laktokoka najveći (10^8 - 10^9 cfu mL^{-1}), potom leukonostoka (10^7 - 10^8 cfu mL^{-1}), termofilnih laktobacila (10^5 cfu mL^{-1}) i bakterija octene kiseline (10^5 - 10^6 cfu mL^{-1}). U pokusima ovog rada također je u kefirnoj kulturi najveći broj laktokoka (tablica 1) i to značajno veći u kefirnoj kulturi oznake N u odnosu na kulturu oznake K (slika 2). U svakom slučaju, najveći broj laktobacila i laktokoka (tablica 1) posjedovala je kefirna kultura N_{22} koja je imala i najmanju pH-vrijednost (tablica 2).

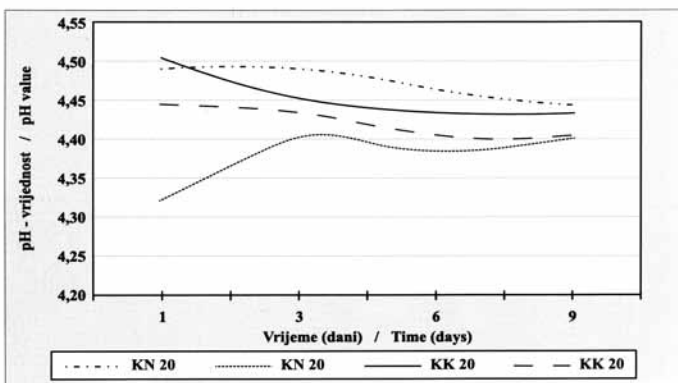
U tablici 1 i na slici 3 nalaze se rezultati istraživanja broja živih stanica kvasaca u uzorcima kefirnih kultura.

Iz tablice 1 se vidi da je u uzorcima kultura pripremljenim pomoću kefirnih zrnaca N veći broj kvasaca ($1,23 \cdot 10^5$ i $1,63 \cdot 10^5$ cfu mL^{-1}) nego u uzorcima kefirne kulture pripremljene pomoću kefirnih zrnaca K ($7,10 \cdot 10^4$ i $6,87 \cdot 10^4$ cfu mL^{-1}) te da temperatura inkubacije (20 i 22 °C) nije značajno utjecala na njihov broj.

Broj živih stanica kvasaca, u obje vrste pripremljene kulture, u granicama je broja koji se spominje u literaturi K o r o l e v e (1991.), a navodi se kao povoljan broj (10^5 - 10^6 cfu mL^{-1}) za proizvodnju kvalitetnog kefira. Važno je

da kefirna kultura, a potom i kefir, sadržavaju povoljnu količinu kvasca, koja će pozitivno djelovati na okus i aromu proizvoda i stvarati umjerenu količinu CO₂. Nije nađena ni jedna stanica bakterije *Escherichia coli* ni plijesan u ispitivanim kulturama.

Prvi, treći, šesti i deveti dan tijekom čuvanja kefira proizvedenog uz pripravljene kulture; mjerene su pH-vrijednosti, a uzorci kefira tada su i senzorski ocijenjeni.



Slika 4: Promjena srednje pH-vrijednosti uzoraka kefira (K_{N20} , K_{N22} , K_{K20} , K_{K22}) tijekom 9 dana čuvanja.

Figure 4: pH values of kefir samples (K_{N20} , K_{N22} , K_{K20} , K_{K22}) during 9 days of storage.

U svim uzorcima kefira proizvedenog od kefirnih kultura pripremljenih pomoću kefirnih zrnaca oznake K, pH-vrijednost neznatno pada od prvog do devetog dana čuvanja (slika 4). Nije zapažena značajna razlika u kiselosti između uzoraka kefira proizvedenih kefirnom kulturom oznake K i N dobivenom inkubacijom kefirnih zrnaca na 20°C. Rezultati praćenja prosječnih pH-vrijednosti za uzorke kefira proizvedenih kefirnom kulturom dobivenom od kefirnih zrnaca N₂₂ pokazali su tendenciju pada kiselosti tijekom čuvanja (slika 4). Međutim, pH-vrijednost tih uzoraka kefira (KN₂₂) bila je najmanja tijekom svih 9 dana čuvanja u hladnjaku.

Tablica 3: *Senzorska ocjena uzoraka kefira (K_{N20} , K_{N22} , K_{K20} , K_{K22}) tijekom devet dana čuvanja.*

Table 3: *Sensory evaluation of kefir samples (K_{N20} , K_{N22} , K_{K20} , K_{K22}) during nine days of storage.*

Senzorska svojstva Sensory properties	Dani Days	Senzorska ocjena uzoraka kefira Sensory scores of kefir samples			
		K_{K20}	K_{N20}	K_{K22}	K_{N22}
Opći izgled General appearance (1)	1	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	1,0	1,0	1,0
	6	1,0	1,0	1,0	1,0
	9	1,0	1,0	1,0	1,0
Boja Colour (1)	1	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	1,0	1,0	1,0
	6	1,0	1,0	1,0	1,0
	9	1,0	1,0	1,0	1,0
Miris Odour (2)	1	1,93	1,92	2,0	2,0
	3	1,96	1,96	2,0	2,0
	6	1,96	2,00	2,0	1,94
	9	1,96	2,00	2,0	2,0
Konzistencija Consistency (4)	1	3,92	3,65	3,88	3,80
	3	4,00	3,79	3,88	3,84
	6	3,92	3,57	4,00	3,76
	9	3,73	3,60	4,00	4,00
Okus Flavour (12)	1	11,20	10,96	12,0	11,76
	3	11,20	11,76	12,0	11,76
	6	10,96	11,68	12,0	11,40
	9	11,96	11,36	12,0	12,00
Σ (20)	1	19,05	18,53	19,88	19,65
	3	19,16	19,51	19,88	19,60
	6	18,84	19,85	20,00	19,10
	9	19,05	18,96	20,00	20,00

Ipak, iz slike 4 se vidi da su pH-vrijednosti uzoraka kefira pripremljenih od kultura K_{22} i N_{22} bile manje nego istih uzoraka kefira pripremljenih od kultura K_{20} i N_{20} .

Uzorci kefira stari jedan dan ocijenjeni su od 18,53 (K_{N20}) do 19,88 (K_{K20}) bodova. Trećeg dana čuvanja u uzorcima kefira nije bilo značajnih promjena senzorskih svojstava (osim poboljšanog okusa) jer su se ukupne ocjene uzoraka kretale u granicama od 19,16 do 19,88 bodova. I šesti i deveti dan čuvanja nisu uočene bitne promjene senzorske kvalitete proizvedenih uzoraka kefira, ali su uzorci kefira pripremljeni kefirnom kulturom oznake K_{22} već šesti dan postigli maksimalan broj bodova (20).

Zaključci

Radna kefirna kultura pripremljena od kefirnih zrnaca oznake K inkubirana na temperaturi 22°C, koja je imala manji broj živih stanica laktobacila i laktokoka te manji broj kvasaca od kulture oznake N, najpovoljnije je utjecala na senzorska svojstva kefira, osobito na okus.

Radna kultura pripremljena od kefirnih zrnaca oznake K utjecala je neznatno na promjene pH-vrijednosti u kefiru tijekom devet dana čuvanja u hladnjaku na 6-8°C.

Senzorska svojstva kefira proizvedenog od radne kulture kefirnih zrnaca oznake K, pripremljene na 22°C, ocijenjena su najvećim brojem bodova tijekom svih devet dana čuvanja.

INVESTIGATION OF THE KEFIR CULTURE MICROFLORA PRODUCED FROM DIFFERENT KEFIR GRAINS

Summary

Fermented products including kefir are food products with high nutritional and biological value. Kefir culture samples is produced by fermentation of milk with kefir grains. Kefir grains starters consist of various bacteria and yeast species.

The aim of this study was to determine the viable numbers of lactococci, lactobacilli and yeasts in kefir culture important for the final product-kefir quality. Different kefir grains (K and N) used for the preparation of kefir cultures at two different temperature (20 and 22°C) were examined microbiologically.

Lactobacilli were enumerated on MRS Agar plates (pH=5.7 at 21°C). Lactococci were enumerated on M17 Agar plates (pH=6.8 at 21°C). Yeasts and moulds were enumerated on YM Petrifilm and the potential presence of *Escherichia coli* bacteria EC Petrifilm was used. For the kefir culture production pasteurised (90°C for 15 min) skimmed milk (1 % of milk fat) inoculated with kefir grains and incubated about 18 hours was used. The kefir grains were subsequently separated from the fermented milk by filtration through a metal sieve and the samples of kefir culture for bacteriological and acidity analysis were obtained and used for kefir production (at 20°C) from pasteurized milk with 3.2% milk fat.

In kefir culture prepared with N kefir grain at 20°C the number of lactobacilli were $3.3 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹ and at 22°C were $9.0 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹. In kefir culture prepared with K kefir grain at 20°C the number of lactobacilli were $2.7 \cdot 10^6$ cfu mL⁻¹ and at 22°C were $6.9 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹. The counts of lactococci in kefir culture N at 20°C were $6.2 \cdot 10^8$ cfu mL⁻¹ and at 22°C were $9.7 \cdot 10^8$ cfu mL⁻¹. In kefir culture K prepared at 20°C the counts of lactococci were $8.3 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹ and at 22°C were $8.0 \cdot 10^7$ cfu mL⁻¹. The yeasts number in the kefir culture K was lower at both chosen temperatures (K_{20} was $7.1 \cdot 10^4$ cfu mL⁻¹ and K_{22} was $6.9 \cdot 10^4$ cfu mL⁻¹) than in the kefir culture N (N_{20} was $1.2 \cdot 10^5$ cfu mL⁻¹ and N_{22} was $1.6 \cdot 10^5$ cfu mL⁻¹).

Kefir culture prepared from kefir grain K_{22} is better for kefir production as according to acidity and sensory properties during all time of storage (9 days) in refrigerator (6-8 °C,) the best quality of the kefir samples is obtained.

Key words: kefir, kefir grains, petrifilm, microflora.

Literatura

ANGULO, A., LOPEZ, E., LEMA, C. (1993.): Microflora present in kefir grain of the galician region (northwest of Spain). *Journal of Dairy Research*, 60, 263-267.

BEAUCHAT, L.R., NAIL, B.V., BRACKETT, R.E., FOX, T.L. (1990.): Evaluation of a Culture film (Petrifilm YM) Method for Enumerating Yeasts and Moulds in Selected Dairy and High Acid Foods. *Journal of Food Protection*, 53 (10), 869-874.

BETTS, G.D., BETTS, R.P., TAYLOR R. (1994.) Evolution of 3M Petrifilm for aerobic plate count, yeast and mould count and E.coli count.

BOTTAZZI, V., ZACCONI, C., EARRA, P.G., DALAVALLE, P., PARISI, M.G. (1994.): Kefir: microbiology, chemistry and technology. *Industrial de Latte*, 30, 41-62.

ISO (TC 34) SC 12 (Secretariat-139) E "Sensory analysis" DC, 1985-02-05

KOROLEVA, N.S. (1982.): Special products (kefir, koumyss, etc.). Proceedings of the International Dairy Congress, Moscow. Vol 2, pp. 146-152.

KOROLEVA, N.S. (1991.): Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. U: Therapeutic Properties of Fermented Milks. R.K. Robinson, ed. Elsevier Sci. Publ., New York. pp.159.

KOSIKOWSKI, F.V. (1982.): Cheese and Fermented Milk Foods, 2nd ed., F.V. Kosikowski&Associates, Brooktondale, New York, pp. 40

LIBUDZISZ, Z., PIATKIEWICZ, A. (1990.): Kefir production in Poland. *Dairy Industry International*, 55, pp.31.

REA, M.C., LENNARTSSON, T., DILLON, P., DRINAN, F.D., REVILLE, W.J., MEAPS, M., COGAN, T.M. (1996.): Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 83-94.

SABADOŠ, D. (1958.): Kefir. *Mljekarstvo*, 8 (2), 1-10.

SUHREN, G. (1990.): Enumeration of total and coliform bacteria in pure cultures, raw and pasteurized milk by rehydratable film and standard methods. *Milchwissenschaft*, 45 (3), p. 139-144.

Adrese autora-Author's addresses:

Dipl. ing. Marija Jukić
SAPPIT Mljekara d.o.o., Posušje
Dr. sc. Ljerka Gregurek
Probiotik d.o.o. Zagreb
Prof. dr. sc. Ljubica Tratnik
Prehrambeno-biotehnoški fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

Prispjelo – Received:

20. 05. 2001.

Prihvaćeno – Accepted:

27. 06. 2001.

IDF World Dairy Summit

Auckland, New Zealand

28. listopada – 1. studeni, 2001.

za daljnje informacije: www.idf-wds2001.org
online registracija

IDF Symposium on New Developments in Technology of Fermented Milks,

Kolding, Denmark

3–5 June, 2002

za daljnje informacije: www.fmp2002.dk

Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria, Genetics, Metabolism and Applications,

Egmond aan Zee, The Netherlands

1–5 September, 2002

za daljnje informacije: For scientific matters:

Dr. J.W. Sanders

Unilever Research

PO Box 114

3130 AC Vlaardingen

The Netherlands

tel: 31/10-4606256, fax: 31/10-4605383

e-mail: jan-willem.sanders@unilever.com

For organisation matters:

Mrs. J. Coolen / Mrs. J. van Dulmen

Congress & Meeting Services

Holland

PO Box 18

5298 ZG Liempde

The Netherlands

tel: 31/411-611199, fax: 31/411-633805

e-mail: lab7@comngresservice.nl

IDF World Dairy Congress & Summit,

Paris, France

23–28 September, 2002

za daljnje informacije: www.fil-idf.org