

# OPTIMALIZACE POUŽITÍ PROBIOTICKÉ KVASINKY *SACCHAROMYCES BOULARDII* DO KEFÍRŮ

Markéta Markvartová, Miloslava Kavková,  
Irena Němečková, Dominika Batíková,  
Zdeněk Švandrlík, Jan Forejt  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

## Optimization and application of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in kefir

### Abstrakt

Výživové a zdravotní benefity kefiru jsou výsledkem symbiózy a působení bakterií mléčného kvašení a kvasinek. Obohacení kefiru o probiotickou kvasinku *Saccharomyces boulardii* navyšuje probiotický potenciál nápoje. Aplikace probiotické kvasinky *Saccharomyces boulardii* do kefirů byla testována v pěti variantách a testovány byly tři kmeny CCDM 2019, CCDM 2020 a CCDM 2021. Rovněž byl testován přídatek kvasinky s ověřenými probiotickými vlastnostmi *Pichia fermentans* samostatně a v kombinaci s kmeny *S. boulardii*. K výrobě kefirů byla použita komerční kefirová kultura. Kvasinky byly přidávány v dávce 0,1 % obj. Mikrobiologické hodnoty byly sledovány před fermentací, po fermentaci a po dobu osmi týdnů skladování kefirů. Přídatek kvasinek neovlivnil chemické vlastnosti kefirů. Mikrobiologická analýza prokázala, že koncentrace kvasinek a bakterií mléčného kvašení během skladovacích testů byla mezi  $10^6$ - $10^7$  KTJ.ml<sup>-1</sup> a odpovídají tak vyhlášce č. 397/2016 Sb.. Jako technologicky a senzory nejvhodnější byl vyhodnocen kefir s přídatkem *S. boulardii* CCDM 2019 a CCDM 2020. Oba kmeny dosahovaly během skladování  $>10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>, což odpovídá požadavkům na probiotické kultury.

**Klíčová slova:** Kefír, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia fermentans*, probiotika

### Summary

Kefir is a fermented milk beverage with nutritional and health benefits. This benefits resulted from the symbiotic action of lactic acid bacteria and the yeasts. The application of technologically suitable strain of *Saccharomyces boulardii* can increase the probiotic potential of kefir. The application of three strains *S. boulardii* (CCDM 2019, CCDM 2020, CCDM 2021) into kefir technology was tested experimentally. The other yeast (*Pichia fermentans*) with declared probiotic properties was tested independently and as combined with *S. boulardii*. The commercial kefir culture was used for kefir production and the strains of experimental yeasts were added in 0,1% v/v. The microbial

counts were evaluated before and after fermentation and also during eight week of the storage. The chemical properties of kefir were not influenced by yeast adjunct significantly. The microbial analysis showed that the concentration of bacteria and yeast during storage ranged  $10^6$ - $10^7$  CFU. ml<sup>-1</sup> in accordance with the regulation No 397/2016 Sb.. The strains CCDM 2019 and 2020 showed to be the most effective with respect to the technological and sensory properties. Both the strains performed an excellent vitality  $>10^6$  CFU.ml<sup>-1</sup> during storage in accordance with the requirements on probiotics.

**Keywords:** kefir, yeast, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia fermentans*, probiotics

### Úvod

Kefír je specifický mlékárenský produkt ze skupiny fermentovaných mléčných výrobků, který vzniká působením kvasinek a bakterií mléčného kvašení (BMK), jež hydrolyzují laktózu během fermentačního procesu. Hlavními metabolity pak jsou: kyselina mléčná, malé procento alkoholu, CO<sub>2</sub> a další produkty mikrobiální aktivity jako bioaktivní peptidy, exopolysacharidy, bakteriociny a další. Příznivý vliv včetně probiotického efektu na lidské zdraví je prokázán mnoha autory u různých typů kefirů (Pogacic et al, 2013; Prado et al., 2015). Z historického hlediska je kefir tradiční fermentovaný mléčný nápoj známý již před tisíci lety z Východní Evropy, Mongolska a Turecka. V současné době je kefir pro svou oblíbenost a zdravotní benefity vyráběn v různých obměnách po celém světě.

Mikroorganismy v kefirech tvoří komunity v tzv. kefirových zrnech. Zastoupení druhů BMK a kvasinek se liší podle typu kefiru a podle původu, není tedy standardní nebo jednotné pro všechny kefiry. Mikrobiální analýzy kefirů, jak kultivační, tak pomocí sofistikovaných molekulárních metod potvrdily, že na tvorbě kefirů se může podílet více než 50 druhů mikroorganismů (Leite et al, 2012, Prado et al, 2015). Pro výrobu se obvykle používají kefirová zrna, nebo ušlechtilé kultury. S ohledem na technologii výroby a typy kultur podle Codex Alimentarius Standardu (Codex Stan 243-2003) typické kefirové kultury na bázi kefirového zrna musí obsahovat tyto BMK: *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc* sp., *Lactococcus* sp., *Acetobacter* sp. a kvasinky schopné fermentovat laktózu (*Kluyveromyces marxianus* a nefermentující laktózu (*Saccharomyces cerevisiae* a *S. exigous*). Kvasinky se v kefirech nevyskytují jednodruhově, ale tvoří konsorcia zahrnující řadu druhů, jak potvrzují studie Diosma et al, 2013. K základním kulturám se často přidávají probiotické mikroorganismy, jako bifidobakterie, laktobacily nebo kvasinka *Saccharomyces boulardii*, která se přirozeně v kefirech nevyskytuje, ale má statut probiotické kvasinky (Diosma et al, 2013; Prado et al., 2015). V případě přídatku dalšího mikroorganismu do kefiru je třeba zajistit, aby nebyla narušena symbióza tvořící komplexní mikroflóru kefirových zrn (Bourrie et al., 2016). Typický kefir musí obsahovat 2,8 % proteinů, méně než 10 % tuku a minimál-

ně 0,6 % kyseliny mléčné (Pogačić et al, 2013). Celkový počet BMK musí být minimálně  $10^7$  KTJ.ml<sup>-1</sup> a kvasinek  $10^4$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Na konci fermentace by měl kefir mít pH 4,2-4,7. Kromě uvedeného složení, kefir obsahuje různé množství aromatických látek a aromatických kyselin, které rozhodují o sensorických kvalitách. Uvádějí se tři základní metody při výrobě kefirů (Leite et al, 2013) z nichž jsme si zvolili výrobu kefiru z kefirové komerční kultury. Cílem naší studie bylo otestovat přidavek vybraných kmenů kvasinek s ověřenými probiotickými vlastnostmi ke kefirové kultuře a vyhodnotit jejich vliv na kvalitu produktu. Pro tuto studii byla použita kefirová kultura S (Milcom a.s., ČR) a dále izoláty CCDM 2012 *Pichia fermentans* a *Saccharomyces boulardii* CCDM 2019, CCDM 2020 a CCDM 2021. Porovnávány byly počty mikroorganismů během zrání a skladování kefirů, změna pH, titrační kyselosti, koncentrace kyselin a sacharidů.

## Materiál a metody

Výroby kefirů zahrnovaly sedm variant včetně kontrolní komerční kefirové kultury (S) a přidávaných kvasinek s probiotickým potenciálem a jejich kombinace uvedené v tabulce 1. Kvasinky pochází ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů CCDM® Laktoflora (Tábor, Česká Republika). Kefiry byly vyrobeny z plnotučného čerstvého mléka (3,5% tuku) (BOHEMILK a.s., ČR), které bylo vytemperováno na 23 °C. Každý vzorek byl připraven zaočkováním kulturou S a příslušnými kvasinkami (tabulka 1) do 750 ml mléka. Připravené vzorky byly rozděleny po 100 ml do sterilních sklenic. Poté probíhala fermentace při 23 °C po dobu 20 h. Po vyjmutí z termostatu se kefir nechal zrát 24 h v lednici při 6 °C.

### Příprava a zaočkování kultur

Mléko bylo zaočkováno základní kulturou S (Kefirová kultura, Milcom a.s.) podle doporučeného dávkování 70 g kultury/ 5000 l mléka a dávka byla upravena dle experimentální dávky mléka. Doplňkové kvasinkové kultury byly nejprve nakultivovány v bujónu YPD (Duchefa, Holandsko) a kultivovány po dobu 24 h při 23°C.

Pro použití do kefiru byly kultury centrifugovány, 1x promyty fyziologickým roztokem. Do mléka bylo přidáno 0,1 % nebo 0,05 % (dle receptury-tabulka1) příslušné kvasinkové kultury.

Tab. 1 Složení kefirů

Název kefiru	Složení
S	kefirová kultura S
S+CCDM 2019	kultura S + 0,1 % <i>Saccharomyces boulardii</i> CCDM 2019
S+CCDM 2020	kultura S + 0,1 % <i>Saccharomyces boulardii</i> CCDM 2020
S+CCDM2021	kultura S + 0,1 % <i>Saccharomyces boulardii</i> CCDM 2021
S+CCDM 2012	kultura S + 0,1 % <i>Pichia fermentans</i> CCDM 2012
S+CCDM2019+CCDM 2012	kultura S + 0,05 % <i>S. boulardii</i> CCDM 2019 + 0,05 % <i>P. fermentans</i> CCDM 2012
S+CCDM 2020+CCDM 2012	kultura S + 0,05 % <i>S. boulardii</i> CCDM 2020 + 0,05 % <i>P. fermentans</i> CCDM 2012

Pro rozборы byly vzorky odebrány při zaočkování (-1 den), po ukončení kultivace (0. den), po ukončení zrání (1. den). Pro skladovací test byly kefir ponechány v lednici při 6 °C. Vzorky se odebraly po 1, 2, 4 a 8 týdnech skladování. Vyhodnocení testu probíhalo mikrobiologickou, sensorickou a chemickou analýzou.

**Mikrobiologická analýza** byla provedena klasickou plotnovou metodou, kde byl 1 ml vzorku zalit příslušným agarem. Kvasinky byly detekovány na GKCH agaru (Milcom a.s., ČR); kultivovány při 25 °C po dobu 72 h. BMK byly stanoveny pomocí selektivních médií. Laktokoky byly stanoveny na M17 agar (Oxoid, UK) s přidávkem 5 g/l laktózy; kultivovány při 25 °C, 72 h, aerobně. Laktobacily byly kultivovány na MRS agaru (Merck, Německo); při 30 °C, po dobu 72 h, anaerobně.

**Senzorická analýza** byla provedena úzkou skupinou posuzovatelů. Není tedy uváděna žádná analýza dat, ale pouze subjektivní hodnocení. V rámci chemických analýz byly měřeny tyto uvedené parametry kefirů: pH (pH metr inoLab pH 720, WTW, Německo); titrační kyselost (SH°), koncentrace organických kyselin na izolachoretickém analyzátoru EA 02 (VILLA Labeco, SK) dle zavedené metody SOP č. 23 MILCOM a. s.

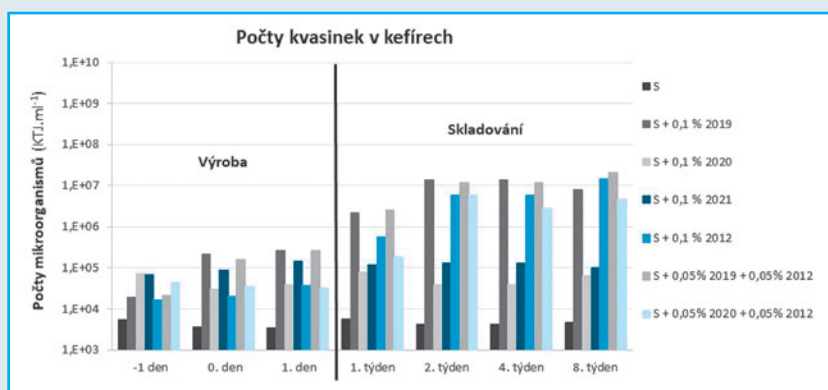
## Výsledky a diskuze

### Mikrobiologická analýza

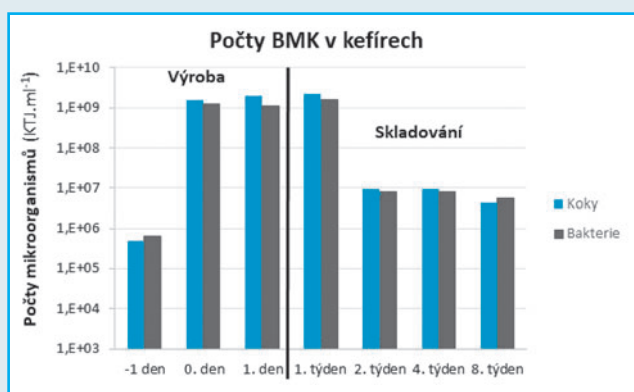
Mikrobiologické analýzy na živných půdách prokázaly změny v počtech sledovaných mikroorganismů během výroby a doby skladování. Změna koncentrace kvasinek během výroby kefirů a jejich skladování je zaznamenána v obrázku 1.

Z obrázku 1 je patrné, že koncentrace kvasinek se v kontrolním kefiru S, který obsahoval pouze kefirovou kulturu, se během výroby i skladování pohybovala mezi  $10^3$ - $10^4$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Ostatní kefir, které byly obohaceny příslušnými kmeny kvasinek, vykazovaly počty kvasinek od počátku výroby vyšší  $10^4$ - $10^5$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Nejmenších změn v růstu kvasinek dosahovala kombinace S + 0,1 % CCDM 2020 a S + 0,1 % CCDM 21. Ostatní kombinace kefirů vykazovaly především během skladování nárůst počtů kvasinek až o 3 řády. Jednotlivé druhy kvasinek není možné plotnovou metodou oddělit, ale předpoklad byl takový, že u kefiru S by počty kvasinek měly být stabilní. Nárůsty v ostatních případech jsou proto připisovány přidávaným kmenům kvasinek. Vysoká koncentrace kvasinek může mít

nežádoucí účinek na sensorickou hodnotu výrobku. Experiment, při kterém byly obohacovány kefir *S. boulardii* jen s tím rozdílem, že jako základ pro výrobu kefiru bylo použito kefirové zrno, potvrdil nárůst populace kvasinek po 16 h fermentace o řád, tedy z  $10^5$  na  $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. U kontrolní varianty zůstala koncentrace kvasinek stejná (Ivanova et al, 2012). Počet BMK se ve stejné studii po ukončení fermentace dosahoval  $10^8$  KTJ.ml<sup>-1</sup>.



**Obr. 1** Výsledky mikrobiologické analýzy obsahu kvasinek v kefirech. Graf je rozdělen na část výroby a skladovacích pokusů (skladování). - 1 den... zaočkování mléka, 0. den... kefir, 1 den... kefir po zrání, 1.-8. týden... skladovací pokus



**Obr. 2** Výsledek mikrobiologické analýzy laktokoků a laktobacilů v kefiru se základní kefirovou kulturou. Graf je rozdělen na část výroby a skladovacích pokusů (skladování). - 1 den... zaočkování mléka, 0. den... kefir, 1 den... kefir po zrání, 1.-8. týden... skladovací pokus

Kromě změn v počtech kvasinek, byla během zrání a skladových zkoušek zároveň sledována změna v počtech BMK, které jsou v kefirové kultuře obsaženy. Výsledek je uveden pro kefir S (obrázek 2). Na rozdíl od kvasinek (obrázek 1) se navýšila koncentrace bakterií během výroby o 4 řády. Mezi 1. a 2. týdnem skladování ale došlo k výraznému poklesu bakterií i koky o 2 řády. Nadále však zůstávala koncentrace stabilní mezi  $10^6$ – $10^7$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Podle vyhlášky č. 397/2016 Sb. by měly být počty bakterií v kefiru  $10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup>. V tomto ohledu tedy kefir vyhláše vyhovovaly.

### Senzorická analýza

Během skladování docházelo ke vzniku nežádoucích chutí u některých kombinací kefirů. Hořkou chuť po 1 týdnu skladování vykazovala kombinace S s kvasinkou CCDM 2012. Později, po 4 týdnech skladování byl hořký také kefir s přísadkou CCDM 2021. Kefir s přísadkou CCDM 2019 i přes vysoké koncentrace kvasinky, nevykazoval kažení chuti

nežádoucími hořkými peptidy ani silnou kvasinkovou chutí. Stejně tak nedocházelo ani k pění kefiru. Jako nejchutnější kefir byly vyhodnoceny ty s přísadkou *Saccharomyces boulardii* CCDM 2019 a CCDM 2020, poté kontrolní kefir *S. studie*, ve které byly kefir obohacovány *S. boulardii* uvádí, že žádoucích sensorických změn bylo dosaženo v kombinaci s aromatickou kulturou *Streptococcus thermophilus* (Ivanova et al, 2011). V této studii byl testován však pouze jeden izolát *S. boulardii*. Naše studie potvrzuje, že tři různé kmeny *S. boulardii* se chovají v rámci kefiru různě, co do růstu, ale také rozdílně ovlivňují sensorické vlastnosti.

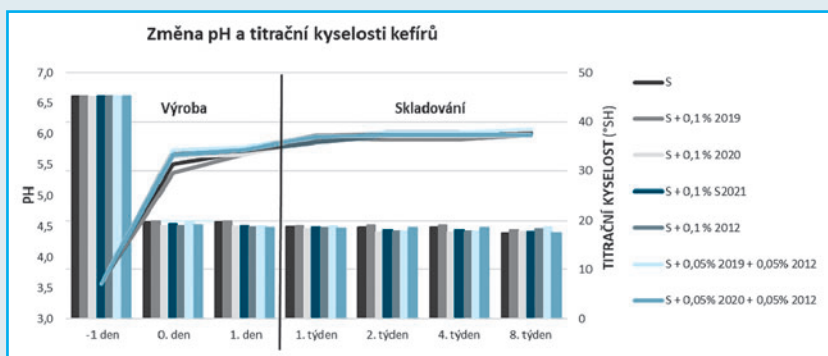
Implementace *S. boulardii* do kefiru je tedy otázkou výběru vhodného izolátu s ověřenými probiotickými a technologickými vlastnostmi.

### Chemická analýza

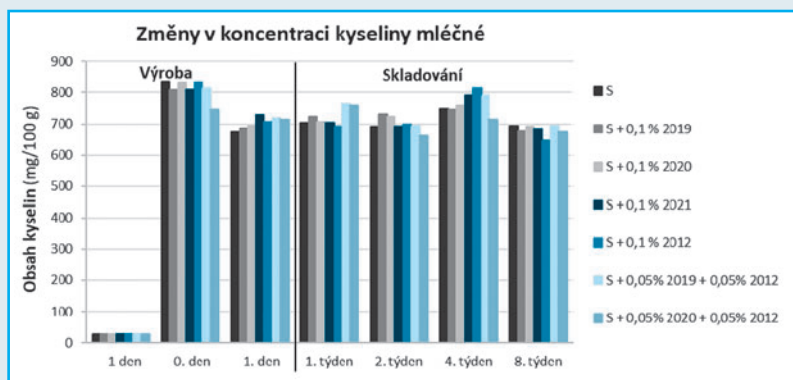
Chemická analýza se zabývala porovnáním změn pH a titrační kyselosti během výroby a skladování kefirů. Současně byl také proveden rozbor koncentrací organických kyselin a sacharidů. Trend změny kyselosti byl pro všechny kefir podobný (obrázek 3).

Počáteční pH (tedy pH mléka) kleslo během kultivace kefirů a zůstalo po dobu skladování téměř neměnné. Naproti tomu titrační kyselost se při kultivaci zvýšila a mírně postupovala v tomto trendu i během skladování. Je tedy znatelné, že ke zrání kefiru dochází i během skladování. Společně s nárůstem titrační kyselosti docházelo také k nárůstu obsahu kyseliny mléčné (obrázek 4). Ostatní organické kyseliny, např. kyselina octová, nevykazovaly ve svých hodnotách větší změny.

*S. boulardii* byla testována a je součástí některých dalších fermentovaných nápojů například také ve spojení s kombuchou a v nápojích z ova a rýže. S ohledem na zdravotní benefity a probiotické vlastnosti BMK a kvasinek jako je *S. boulardii* je třeba zmínit, že i mrtvé buňky BMK a kvasinek hrají ve fermentovaných nápojích svou speci-



**Obr. 3** Výsledky chemické analýzy změn pH a titrační kyselosti. Sloupcový graf značí pH, spojnicový graf titrační kyselost. Graf je rozdělen na část výroby a skladovacích pokusů (skladování). - 1 den... zaočkování mléka, 0. den... kefir, 1 den... kefir po zrání, 1.-8. týden... skladovací pokus.



**Obř. 4** Obsah kyseliny mléčné v keřirech. Graf je rozdělen na část výroby a skladovacích pokusů (skladování). - 1 den... zaočkování mléka, 0. den... keřír, 1 den... keřír po zřání, 1.-8. týden... skladovací pokus.

fickou roli například při laktóзовé intoleranci (Ouwehand a Salminen, 1998). Keřiry představují tradiční mléčné nápoje, jejichž základem a místem mikrobiální symbiózy je keřírové zřno. Probiotické vlastnosti keřírů se často přisuzovaly zejména BMK. Studie zaměřené na složení keřírových zřrn včetně kvasinek však potvrzují, že i izoláty *Saccharomyces cerevisiae*, původem z keřírových zřrn, vykazují výrazné probiotické vlastnosti, včetně antibiózy vůči nežádoucím mikroorganismům, antioxidační aktivity, adheze k epiteliálním buňkám apod. (Lima et al, 2017). V tomto kontextu je třeba také zmínit, že *S. cerevisiae* a *S. boulardii* jsou taxonomicky úzce příbuzné druhy, jejichž taxonomická identita byla potvrzena na základě genomových a proteomických studií (Mitterdorfer et al, 2002; Fietto et al, 2004; Khatri et al, 2017).

## Závěr

Po stránce chemické analýzy keřiry dosahovaly téměř stejného pH, titrační kyselosti i koncentrace kyseliny mléčné. Přídavek kvasinek tedy chemické vlastnosti významně neovlivnil. Mikrobiologická analýza prokázala, že koncentrace BM během skladovacích testů byla mezi  $10^6$ - $10^7$  KTJ.ml<sup>-1</sup>, což je hodnota vyhovující vyhlášce č. 397/2016 Sb.. Naopak koncentrace kvasinkových buněk se v případě jednotlivých druhů, případně jejich kombinace lišily. Pojmeme-li však přídavek *S. boulardii* jako přídavek probiotika, pak všechny varianty splnily podmínku pro počty živých buněk v probiotickém přípravku (FAO, 2002). Jejich počty přesahovaly  $>10^6$  po dobu skladování 56 dní. Sensoricky nejlépe byl hodnocen kmen CCDM 2019. Během skladovacích testů nedošlo u žádného výrobku k viditelným změnám - tedy změně konzistence, vzhledu případně růstu nežádoucí mikroflóry na povrchu výrobku. Během skladovacích testů nedošlo u žádného výrobku k viditelným změnám - tedy ke změně konzistence, vzhledu a případně k růstu nežádoucí mikroflóry na povrchu výrobku.

## Poděkování:

Tato práce vznikla za finanční podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství České republiky při řešení projektu QJ1515338 a institucionální podpory MZE-RO1418.

## Literatura:

- BOURRIE B.C.T., WILLING B.P., COTTER P.D. (2016): The Microbiota nad Health Probing Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Frontiers in Microbiology*, str. 1-17, vol. 7, article 647.
- PRADO M.R., BLANDÓN L.M., VANDENBERGHE L.P.S., RODRIGUES C., CASTRO G.R. (2015): Thomaz-Soccol V., Soccol C.R.: Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, str. 1-10, vol. 6, article 1177.
- Vyhláška č. 397/2016 Sb.: Vyhláška o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
- MITTERDORFER G., MAYER H.K., KNEIFEL W., AND VIERNSTEIN H. (2002): Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *Saccharomyces cerevisiae* using molecular typing techniques. *J. Appl. Microbiol.* 93: 521-530.
- FIETTO J.L., ARAÚJO R.S., VALADÃO F.N., FIETTO L.G., BRAND/O R.L., NEVES M.J., GOMES F.C., NICOLI J.R., CASTRO I.M. (2004): Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can. J. Microbiol.* 2004; 50: 615-621.
- KHATRI I. TOMAR R., GANESA K., PRASAD G.S. & SUBRAMANIAN S. (2017): Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), p. 371. doi: 10.1038/s41598-017-00414-2.
- PARVEZ S., MALIK K. A., KANG A., & KIM H. Y. (2006): Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171-1185.
- DIOSMA G., ROMANIN D., REY-BURUSCO M., LONDERO A., GARROTE G. (2014) Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World J Microbiol Biotechnol.* 30: 43-53.
- LEITE A, LEMOS M, SILVA R, SOARES A, TRAJANO J, FLOSI V. (2013): Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Braz. J. Microbiol.* 44: 341-349.
- POGACIC T, ŠINKO S, ZAMBERLIN Š, SAMARŽIJA D. (2013): Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo* 63(1), 3-14.
- Codex alimentarius (2003) Codex Standard for Fermented Milks (Codex stan 243-2003) CCNEA document (CA/NEA/13/7/6)
- IVANOVA G., MOMCHILOVA M., RUMYAN N., ATANASOVA A., GEORGIEVA N. (2012): Effect of *Saccharomyces boulardii* yeast addition on the taste and aromatic properties of kefir. *Journal of the University of Chemical technology and Metallurgy*, 47(1) 59-62.
- LIMA M. (2017): *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties, *Microbial Pathogenesis*, 110, pp. 670-677. doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.010.
- Ouwehand A. C. AND SALMINEN S. J. (1998): The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-Viable Bacteria *International Dairy Journal*, Vol. 8, No. 9, pp. 749-758. doi:10.1016/S0958-6946(98)00114-9

## Korespondující autor:

Ing. Miloslava Kavková Ph. D.  
vedoucí Sběrky mikroorganismů  
Výzkumný ústav mlékárenský  
Ke dvoru 12 a, 160 00 Praha 6  
m.kavková@vum-tabor.cz

Přijato do tisku: 5. 11. 2018

Lektorováno: 21. 11. 2018