

Fermentacija i antimikrobna aktivnost vodenih kefirnih zrnaca

Grünfeld, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:577685>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Petra Grünfeld

7384/BT

**FERMENTACIJA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST VODENIH KEFIRNIH
ZRNACA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

FERMENTACIJA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST VODENIH KEFIRNIH ZRNACA

Petra Grünfeld, 7384/BT

Sažetak: Vodeni kefir je blago kiselo, alkoholno i voćno fermentirano piće, čija fermentacija započinje s vodenim kefirnim zrcima. Vodena kefirna zrnca sastoje se od polisaharida i sadrže mikroorganizme potrebne za fermentaciju vodenog kefira. U ovom radu, proces fermentacije vodenog kefira proveden je tijekom 12 dana kako bi se otkrila dinamika združene kulture bakterija mliječne kiseline (rod *Lactobacillus*), octene kiseline (rod *Acetobacter*) i kvasaca (vrste *Saccharomyces cerevisiae* i *Dekkera bruxellensis*), kao i kinetika potrošnje supstrata i proizvodnje metabolita. Glavni supstrat, saharoza, je u potpunosti metaboliziran nakon 4 dana fermentacije, što se podudara s proizvodnjom većeg dijela polisaharida vodenih kefirnih zrnaca. Glavni metaboliti fermentacije bili su mliječna i glukonska kiselina. Octena kiselina i etanol proizvedeni su u niskim koncentracijama. Najveći dio ovih metabolita nastao je tijekom prvih 96 sati fermentacije, pri čemu se pH smanjio s 3,86 na 3,45. Antimikrobna aktivnost je testirana na bakterijama vrste *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* te kvascu vrste *Candida albicans*. Uočena je izvrsna antimikrobna aktivnost na bakterije i kvasac, no ne i na bakteriju vrste *E. coli*.

Ključne riječi: vodeni kefir, organske kiseline, antimikrobna aktivnost

Rad sadrži: 32 stranice, 11 slika, 3 tablice, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Datum obrane: lipanj 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

FERMENTATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WATER KEFIR GRAINS

Petra Grünfeld, 7384/BT

Abstract: Water kefir is mild sour, alcoholic, and fruity fermented beverage, of which the fermentation is started with water kefir grains. The water kefir grains consists of polysaccharides and microorganisms responsible for the water kefir fermentation. In this work, a water kefir fermentation process was followed during 12 days to unravel the symbiotic community dynamics of lactic acid bacteria (genus *Lactobacillus*), acetic acid bacteria (genus *Acetobacter*), and yeasts (species *Saccharomyces cerevisiae* and *Dekkera bruxellensts*), as well as the kinetics of substrate consumption and metabolite production. The major substrate, sucrose, was completely converted after 4 days of fermentation, which coincided with the production of the major part of the water kefir grain polysaccharide. The main metabolites of the fermentation were lactic and gluconic acid. Acetic acid and ethanol were produced at minor concentrations. The major part of these metabolites was produced during the 96 h of the fermentation, during which the pH decreased from 3.86 to 3.45. The antimicrobial activity was tested against bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, as well as yeast *Candida albicans*. Antimicrobial activities were observed in the fermented samples against the investigated bacteria strains and *C. albicans* but *E. coli* was not inhibited.

Keywords: Water kefir, Organic acids, Antimicrobial activity

Thesis contains: 32 pages, 11 figures, 3 tables, 49 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Defence date: Juny, 2019

Contents

1. UVOD.....	6
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Vodeni kefir.....	3
2.2. Metabolizam šećera vodenih kefirnih mikroorganizama.....	5
2.2.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK).....	5
2.2.2. Bakterije octene kiseline.....	7
2.2.3. Bifidobakterije	8
2.2.4. Kvasci.....	10
3. MATERIJALI I METODE	3
3.1. Cjelokupni tijek istraživanja	11
3.2.1. Priprava vodenih kefirnih zrnaca	12
3.2.2. Priprava uzoraka za fermentaciju	12
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti	12
3.2.4. Određivanje koncentracije mliječne kiseline.....	12
3.2.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline	13
3.2.6. Određivanje koncentracije octene kiseline.....	13
3.2.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom	13
3.2.8. Izračunavanje prinosa vodenih kefirnih zrnaca	14
3.2.9. Određivanje antimikrobne aktivnosti.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. Promjena pH vrijednosti	17
4.2. Promjena koncentracija organskih kiselina i etanola	18
4.5. Antimikrobna aktivnost.....	23
5. ZAKLJUČCI	25
6. LITERATURA.....	29

1. UVOD

Vodeni kefir je fermentirani napitak koji se dobiva dodatkom vodenih kefirnih zrnaca (polisaharidna zrnca koja služe kao inokulum) mješavini vode, šećera (saharoze), suhogvoća i eventualno drugih sastojaka kao što je limun, ovisno o receptu. Nakon 2 do 4 dana aerobne inkubacije na sobnoj temperaturi, dobiva se pjenušavo, žućkasto fermentirano piće koje ima voćni, kiseli, blago slatki i blago alkoholni okus i aromu. Vodeni kefir je dostupan diljem svijeta, ali još uvijek nije poznato koje je stvarno podrijetlo vodenih kefirnih zrnaca. Pretpostavlja se da polisaharidna zrnca potječu iz listova biljke smokve *Opuntia cactus*. Osim upotrebe naziva vodena kefirna zrnca u zapadnoj Europi, druga imena se također koriste za ovaj inokulum fermentiranog pića, ovisno o zemljopisnom položaju, kao što su „ginger beer plants“, „Tibicos“, „Tibi grains“, „California bees“, „African bees“, „ale nuts“, „balm of Gilead“, „Bèbéés“, „Japanese beer seeds“, and „sugary kefir grains“. Trenutno su istraživanja o vodenom kefiru vrlo ograničena i većina dostupnih znanstvenih informacija bavi se raznolikošću vrsta.

Također, istražen je kemijski i strukturni sastav polisaharida vodenih kefirnih zrnaca. Do danas je poznato da se raznolikost mikrobnih vrsta vodenog kefira sastoji od stabilnog konzorcija, uglavnom bakterija mliječne kiseline, kvasaca i bakterija octene kiseline, što se može pokazati pomoću kulturno-ovisnih i kulturno-neovisnih metoda. Nedavno je pronađena i *Bifidobacterium psychraerophilum/crudilactis* u vodenom kefiru putem kulturno-ovisnih i kulturno-neovisnih metoda. Međutim, postalo je jasno da različiti vodeni kefiri pokazuju različitu raznolikost vrsta. Stoga je potreban sustavni pristup zaproučavanje mikrobiologije vodenog kefira. Nadalje, poznato je da se polisaharid vodenog kefirnog zrnca sastoji od dekstrana, α -1,6 povezanog glukoznog polimera, kojeg proizvode određene vrste bakterija iz roda *Lactobacillus* i/ili *Leuconostoc*. Međutim, do sada nije provedena temeljita analiza metabolita tijekom procesa fermentacije vodenog kefira. Cilj ovog istraživanja bio je steći dublje razumijevanje procesa fermentacije vodenog kefira, te dinamiku zajednice i tijekom potrošnje supstrata i proizvodnje metabolita.

U ovom radu su tijekom 12 dana fermentacije vodenog kefira s kefirnim zrcima mineralnoj vodu praćeni slijedeći parametri:

- utjecaj tijeka fermentacije na prinos biomase vodenih kefirnih zrnaca
- promjena pH vrijednosti kefira tijekom fermentacije
- promjena koncentracija ukupnih kiselina, glukonske, mliječne i octene kiseline tijekom fermentacije

- antimikrobna aktivnost napitka dobivenog fermentacijom mineralne vode s dodatkom suhe marelice i različitih koncentracija dodane saharoze

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Vodeni kefir

Vodeni kefir je stabilna mikrobna zajednica različitih mikroorganizama koji se koristi za izradu domaćeg fermentiranog pića. Za pripremu pića zrnca su uronjena u otopinu saharoze (8% tež/vol), s dodatkom svježeg ili suhog voća (Reiß, 1990) i fermentirana na sobnoj temperaturi dva ili tri dana. Mogu se dodati i kriške limuna za svježiji okus, ali one nisu potrebne za rast mikrobne simbioze. Nakon fermentacije, zrnca se mogu ukloniti procjeđivanjem, a dobiveni napitak je ugodnog voćnog okusa. Nakon toga, zrnca se isperu vodom iz slavine i ponovno se upotrijebe za sljedeći korak fermentacije. Nastalo piće je pjenušavo i mutno, gazirano, slabo kiselo, pomalo slatko i blago alkoholno, ovisno o tome koliko dugo je trajala fermentacija.

Podrijetlo kefira nije poznato. Prvi opis sličnih zrnaca zvanih "Ginger-beer Plant" opisao je Ward 1892. godine (Ward, 1892). Izvijestio je da su britanski vojnici donijeli zrnca iz Krimskog rata 1855. Ostali opisi povezuju zrnca (zvana Tibi) s meksičkim kaktusima sorte *Opuntia* gdje su skinuti lišća (Lutz, 1899). Do danas su poznati različiti sinonimi, tako da ova simbioza ima različite nazive kao što su "California bees", "African bees", "Ale nuts", "Balm of Gilead", "Japanese Beer Seeds" ili "Sugary kefir grains" (Kebler, 1921; Pidoux i sur., 1988). Nekoliko istraživanja je potvrdilo mikrobne vrste koje se nalaze unutar zrnaca kao stabilnu simbiozu nekoliko rodova laktobacila, bakterija octene kiseline i kvasaca (Franzetti i sur., 1998; Horisberger, 1969; Lutz, 1899; Moinas i sur., 1980; Neve i Heller, 2002; Pidoux, 1989; Stadelmann, 1957; Ward, 1892). Gulitz i sur. (2011) su pokazali da se simbioza vodenog kefira sastoji od 10^8 laktobacila, 10^6 - 10^8 bakterija octene kiseline i 10^6 - 10^7 kvasaca po gramu zrnaca. Osim toga, još nekultivirane bifidobakterije mogu se otkriti u nekoliko vodenih kefirnih zrnaca različitog podrijetla (Gulitz i sur., 2013). Ovi nekultivirani organizmi pokazuju obvezujući sinergizam između mikrobiota u simbiozi vodenog kefira. Mikroorganizmi su ugrađeni u prozirna zrnca u obliku smrvljenog leda koja se uglavnom sastoje od netopljivog dekstrana s α -1,6-vezanom glukozom i grananjem na α -1,3 mjestu (Horisberger, 1969; Pidoux i sur., 1988). Pidoux i sur. (1988) i Waldherr i sur. (2010) svojim su istraživanjima pokazali da je *Lactobacillus hilgardii* važna vrsta za sintezu EPS (egzopolisaharid) te stoga i za formiranje zrnca tijekom fermentacije vodenog kefira.



Slika 1. Vodena kefirna zrnca (Stadie, 2013)



Slika 2. Sastojci potrebni za fermentaciju vodenog kefira; mineralna voda, suho voće, vodena kefirna zrnca, šećer. U čaši je prikazan gotovi napitak (Stadie, 2013)

Leroi i Pidoux (Leroi i Pidoux, 1993a) su prvo odredili sinergizam izolata vodenog kefira, odnosno interakciju *L. hilgardii* i *Saccharomyces florentinus* (reklasificirano kao *Zygorulasporea (Z.) florentina* (Kurtzman, 2003)). U mješovitoj kulturi *L. hilgardii* bolje preživljava i proizvodi mliječnu kiselinu, dok je rast *S. florentinus* drastično smanjen pa su zaključili da postoji parazitska interakcija između ovih mikroorganizama vodenog kefira. Dokazali su da su CO₂, piruvat, propionat, acetat i sukcinat, metaboliti kvasca odgovorni za prednosti kod *L. hilgardii*. S druge strane, pokazali su da kombinacija *L. hilgardii* i *Candida*

lambica nije stimulirala simbiozu, već suprotno, imobilizirani u kalcijevom alginatu, rast bakterija i proizvodnja mliječne kiseline su inhibirani (Leroi i Pidoux, 1993a, 1993b).

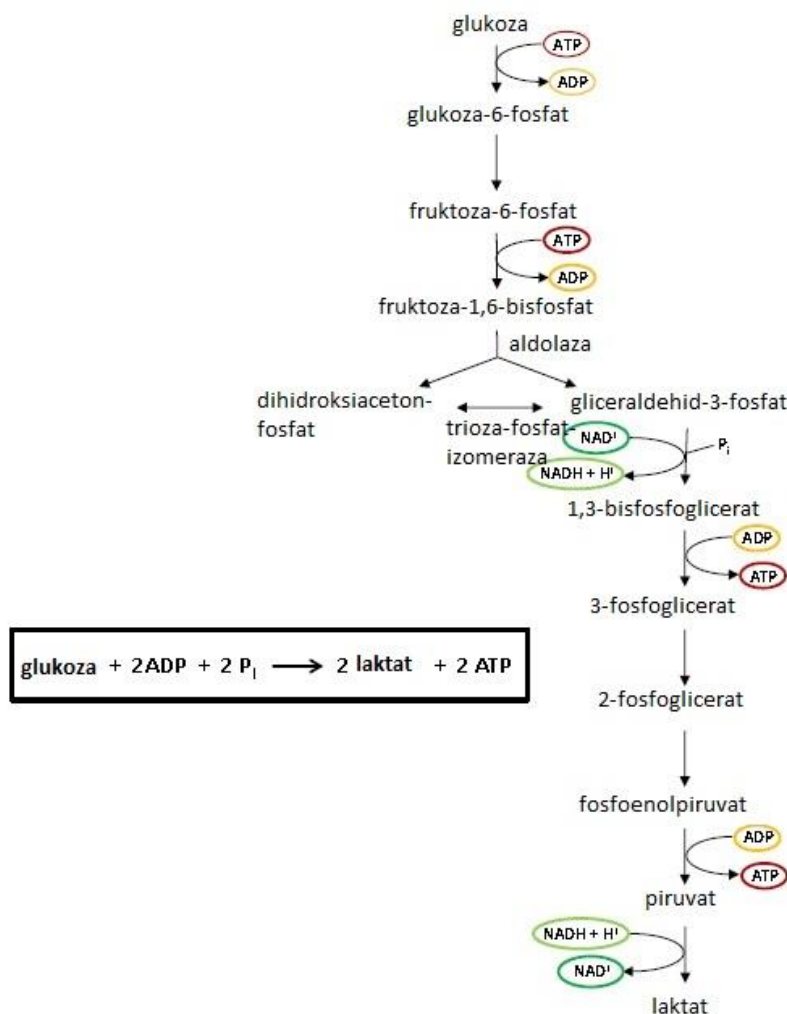
2.2. Metabolizam šećera vodenih kefirnih mikroorganizama

2.2.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK)

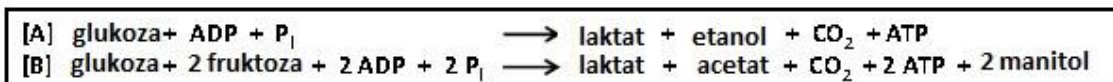
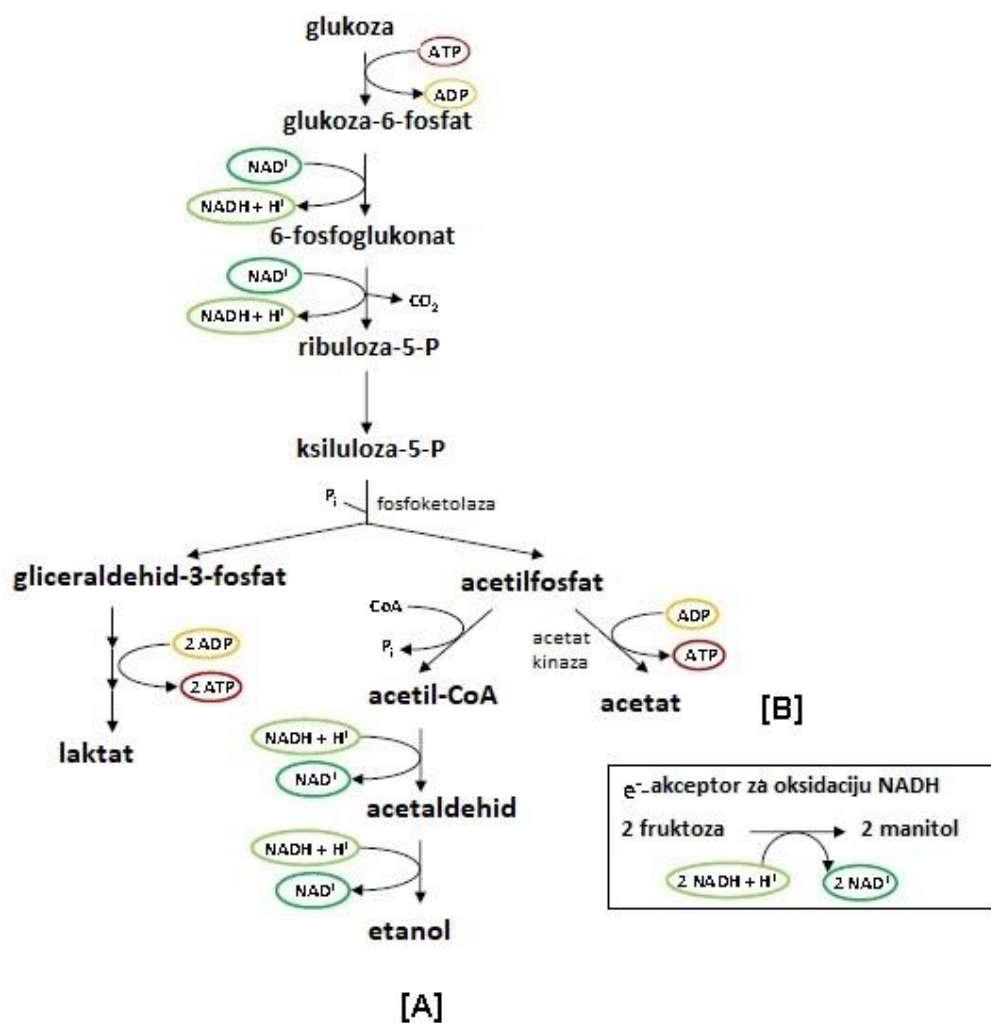
Bakterije mliječne kiseline su gram pozitivne bakterije, koje koriste ugljikohidrate kao izvor energije za proizvodnju mliječne kiseline. Rodovi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Vagococcus* pripadaju skupini bakterija mliječne kiseline (Jay, 1992a). U vodenom kefiru može se naći nekoliko vrsta prvih dvaju rodova (Gulitz i sur., 2013). Metabolizam šećera podijeljen je u dvije skupine, homofermentativne i heterofermentativne BMK. Homofermentativne BMK kataboliziraju glukozu putem Emden-Meyerhof puta s laktatom kao svojim glavnim krajnjim produktom (najmanje 80% laktata od glukoze). Zbog nedostatka aldolaze i trioza fosfat izomeraze, homofermentativne BMK metaboliziraju glukozu proizvodnjom ekvimolarnih količina laktata, etanola i ugljičnog dioksida putem pentozna fosfatnog puta. Tijekom tih reakcija samo jedan mol ATP-a rezultira iz jednog mola glukoze, dok se kod homolaktične fermentacije proizvode 2 mola ATP-a. U prisutnosti elektron-akceptor molekula kao što su fruktoza, citrat, malat, fumarat, kisik ili nezasićene masne kiseline (Stolz i sur., 1995) pomoću acetat kinaze, acetat i ATP mogu nastati umjesto etanola. U tim uvjetima heterolaktička fermentacija glukoze također rezultira s 2 mola ATP-a. Fakultativni heterofermentativni laktobacili fermentiraju heksoze do laktata kao homofermentativne bakterije, ali dodatno mogu proizvesti etanol i laktat bez stvaranja plina iz pentozna. Ovu vrstu fermentacije nemamo kod vodenih kefirnih organizama. Tablica 1 prikazuje homo i heterofermentativne vrste BMK koje su uključene u simbiozi vodenog kefira. Prijenos saharoze u stanice može se provesti uglavnom pomoću sustava za fosfotransferazu (PTS) uz istovremenu fosforilaciju saharoze do saharoza-6-fosfata fosfoenolpiruvatom ili alternativno putem kationskog sustava (Kaditzky, 2008).

Tablica 1. Homo- i heterofermentativne vrste u vodenim kefirnim zrnima (Gulitz i sur., 2011, 2013)

homofermentativne vrste BMK	heterofermentativne vrste BMK
<i>Lactobacillus hordei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus nagelu</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus hilgardu</i>
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	



Slika 3. Homofermentativna fermentacija bakterija mliječne kiseline (BMK)



Slika 4. Heterofermentativna fermentacija bakterija mliječne kiseline (BMK)

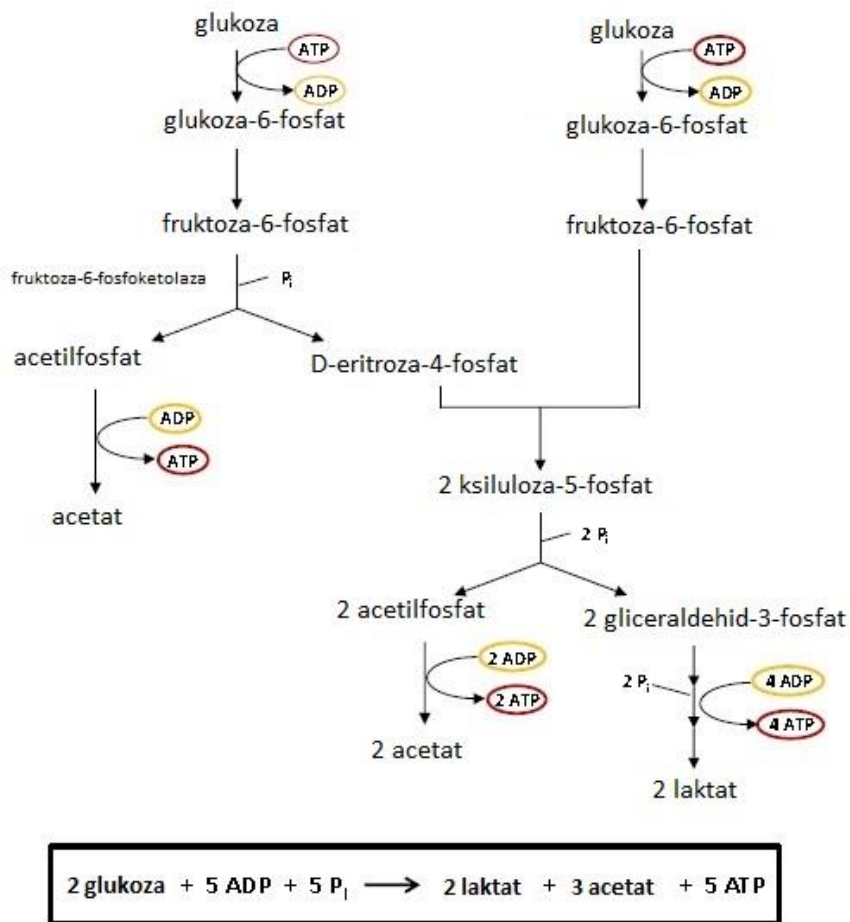
2.2.2. Bakterije octene kiseline

Bakterije octene kiseline su gram negativne, otporne na kiselinu (do pH 2.6) i obligatni aerobi, uključujući rod *Acetobacter* i *Gluconobacter*. *Gluconobacter* stvaraju svoju energiju putem nepotpune oksidacije ugljikohidrata ili alkohola, što rezultira odgovarajućim kiselinским oblicima (npr. glukonska kiselina iz glukoze i acetidna kiselina iz etanola) (Jakob i sur., 2012; Krämer, 2007). *Acetobacter sp.* nadalje su sposobni oksidirati octenu kiselinu u vodu i CO₂. Bakterije octene kiseline prirodno se mogu naći u biljnim staništima bogatim ugljikohidratima ili etanolom. Danas su bakterije octene kiseline vrlo važne za komercijalnu

proizvodnju octene kiseline (Gullo i Giudici, 2008; Krämer, 2007), a upravo zbog toga nisu poželjne tijekom fermentacije vina. Mnogi sojevi bakterija octene kiseline mogu se identificirati kao proizvođači fruktana, njihovi egzopolisaharidi se sastoje samo od monomera fruktoze (Jakob i sur., 2012, 2013). Tijekom tog rada, bakterije octene kiseline su igrale malu ulogu, budući da ih je jako malo nađeno u vodenim kefirnim zrnima, vjerojatno zato što je kisik ograničen u ovom okruženju, osim u postupku pranja i ponovne procedure (Gulitz i sur., 2013).

2.2.3. Bifidobakterije

Bifidobakterije su gram pozitivni mikroorganizmi, a mliječna kiselina jedan je od njihovih glavnih metabolita, stoga su dugo vremena bile klasificirane kao bakterije mliječne kiseline. Zbog njihovih filogenetskih i metaboličkih razlika u odnosu na bakterije mliječne kiseline, izdvojene su kao posebna vrsta bakterija 1974. godine (Ballongue, 1993). Monosaharidi se metaboliziraju u tzv. "bifidus shunt" koji je različit od homo- i heterofermentativnog puta bakterija mliječne kiseline. Umjesto aldolaze i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, bifidobakterije proizvode fruktoza-6-fosfat fosfoketolazu, ključni enzim u njihovom metaboličkom putu i taksonomski marker za bifidobakterije. Slično homofermentativnom putu, „bifidus shunt“ počinje s konverzijom glukoza-6-fosfata u fruktoza-6-fosfat pomoću glukoza-6-fosfat izomeraze. Zatim se fruktoza-6-fosfat podijeli na acetilfosfat i eritrozu-4-fosfat. Na kraju, „bifidus shunt“ rezultira s 1.5 mola acetata, 1 mola laktata i 2.5 mola ATP-a iz 1 mola glukoze (Kaditzky, 2008; Pokusaeva i sur., 2011; de Vries i Stouthamer, 1967). Na temelju sposobnosti korištenja različitih vrsta oligosaharida, bifidobakterije su prilagođene specifičnim nišama i stoga su sposobne preživjeti u zahtjevnim staništima. Bifidobakterije su dio bakterijske flore ljudskog i životinjskog gastrointestinalnog trakta. Posebno velike količine bifidobakterija mogu se naći u izmetu dojenčadi hranjene majčinim mlijekom zbog njihovog metabolizma neprobavljivih oligosaharida ljudskog mlijeka (Pokusaeva i sur., 2011). Osim njihove upotrebe oligosaharida, bifidobakterije su sposobne inhibirati patogene bakterije, proizvodeći kiselinu što rezultira smanjenim pH vrijednostima, proizvodnjom bakteriocina i dodatno blokiranjem receptora za adheziju patogena i toksina. Tako da se bifidobakterije zbog svojih blagotvornih učinaka na zdravlje često koriste kao probiotici u hrani (Collado i sur., 2005; Macfarlane i Englyst, 1986; Rastall i sur., 2005; de Vries i Stouthamer, 1968).



Slika 5. Bifidobakterijski metabolizam glukoze nazvan „bifidus shunt“ ()

Većina vrsta bifidobakterija može se izolirati iz ljudskog i životinjskog crijeva i obično rastu striktno anaerobno na 37°C, što je i uobičajeno za ovo stanište. S metodama neovisnim o kulturi neke vrste bifidobakterija mogu se otkriti u mliječnom kefiru, isto kao i u vodenom kefiru (Dobson i sur., 2011; Gulitz i sur., 2013). *Bifidobacterium psychraerophilum*, jedna vrsta koja se još može kultivirati iz vodenih kefirnih zrnaca (Gulitz i sur., 2013) je neuobičajena vrsta bifidobakterija. Kako je ova vrsta sposobna rasti pri nižim temperaturama (do 4°C) i u aerobnim uvjetima, naziva se psihroaerofil (vole hladnoću i zrak). Ipak, optimalni rast postižu anaerobno na 37°C (Simpson i sur., 2004).

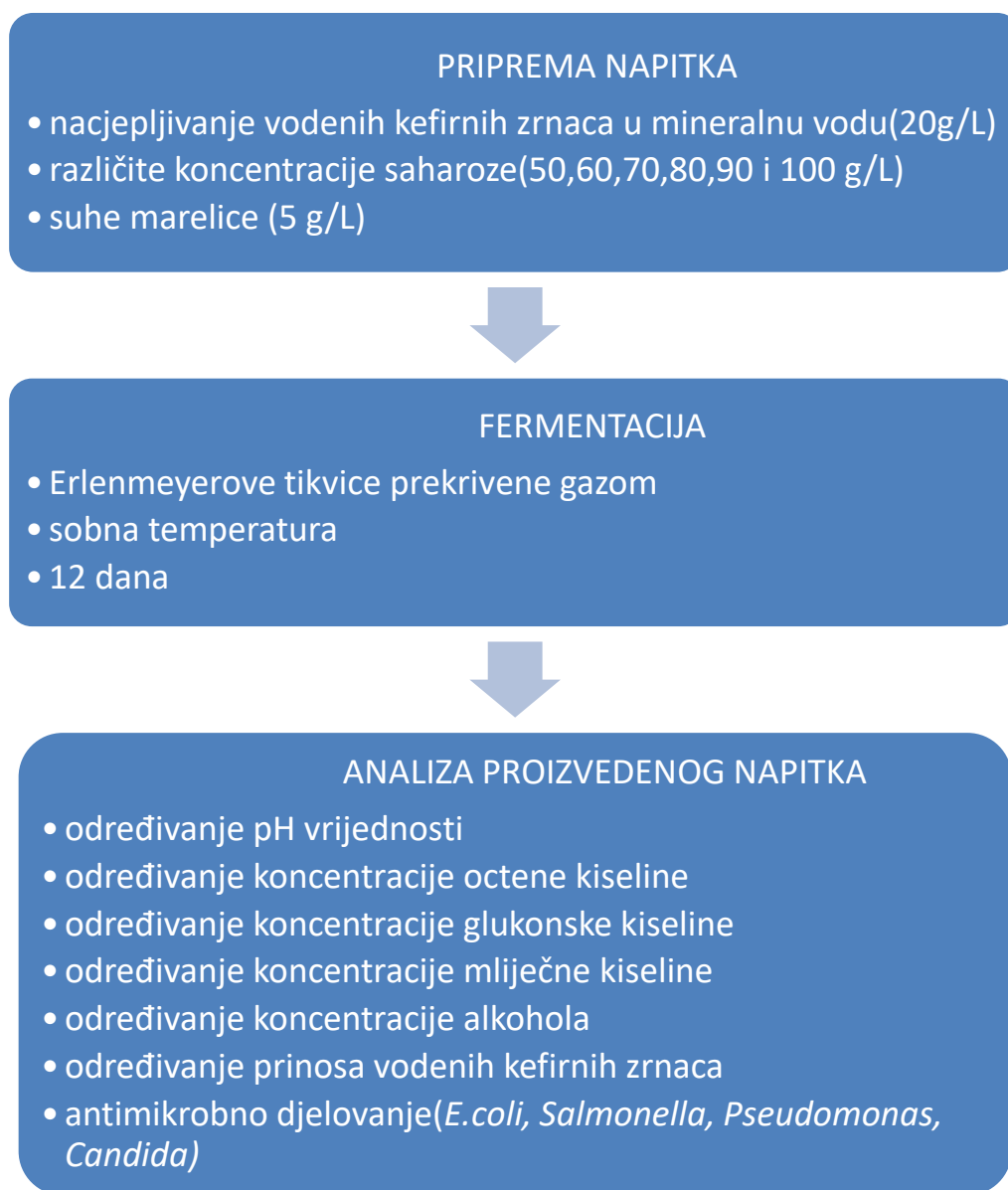
2.2.4. Kvasci

Kao glavni izvor energije, kvasci kataboliziraju glukozu do piruvata putem glikolize. U odsutnosti kisika, NADH se mora ponovno oksidirati tijekom etanolne fermentacije. Tijekom fermentacije, piruvat se pretvara u acetaldehid i CO₂ te se acetaldehid reducira u etanol pomoću alkoholne dehidrogenaze (Dickinson i Kruckeberg, 2006). U prisutnosti kisika i odsutnosti represije, piruvat se može respirirati do CO₂ i energije u obliku ATP-a. Dakle, piruvat se transportira u mitohondrij, pretvara se u acetil-CoA i oksidira putem citratnog ciklusa. Reducirani NADH i FADH₂ koji su nastali tijekom glikolize i citratnog ciklusa, reoksidiraju se u dišnom lancu u cilju proizvodnje energije u obliku ATP-a (Dickinson i Kruckeberg, 2006; Feldmann, 2005). Citratni ciklus nije samo katabolički put za proizvodnju energije, nego i anabolički put proizvodnje intermedijara za formiranje aminokiselina i nukleotida (Feldmann, 2005). *Saccharomyces cerevisiae*, sastojak vodenih kefirnih zrnaca je fakultativni anerobni kvasac. To su kvasci koji mogu katabolizirati glukozu aerobno i anaerobno. Anaerobno fermentiraju glukozu u etanol kao što je već opisano. Respiracija u mediju koji sadrži glukozu (više od 0.1%) iz *S. cerevisiae* je ograničena (manje od 10% katabolizma glukoze) zbog Crabtree efekta ili represije glukoze. U prisutnosti glukoze, više se ne sintetiziraju respiratorni i glukoneogenezni enzimi pa se piruvat usmjerava u etanol čak i u prisutnosti kisika (Barnett i Entian, 2005; Gancedo i Serrano, 1989). Nastajanje sukcinata pomoću kvasaca može biti izvedeno na različite načine. S jedne strane, oksidativni put citratnog ciklusa se prekida na razini sukcinata u fermentirajućim kvascima tijekom aerobnih uvjeta (de Klerk, 2010; Gancedo i Serrano, 1989). Reducirani ekvivalenti mogu se reciklirati npr. proizvodnjom manitola, dok je elektron upućen na fruktozu (Lee i sur., 2003). S druge strane, u odsutnosti kisika, citratni ciklus može funkcionirati u reduktivnom putu od oksaloacetata preko malata i fumarata do sukcinata (De Klerk, 2010). Unos heksoze u stanice reguliran je permeazom induciranim transportnim sustavima (Dickinson i Kruckeberg, 2006; Gancedo i Serrano, 1989). Hranjiva podloga za vodeni kefir sadrži glukozu i fruktozu, ali glavni šećer koji se koristi je saharoza. Disaharid saharoza hidrolizira se izvanstanično pomoću invertaze kvasca na fruktozu i glukozu (Dickinson i Kruckeberg, 2006; Feldmann, 2005). Nakon toga, heksoze se transportiraju do stanice na način koji je već opisan. *Zygosaccharomyces* su rod osmotolerantnih kvasaca i stoga mogu rasti na supstratima s visokom koncentracijom šećera (Dickinson i Kruckeberg, 2006). Hranjiva podloga vodenog kefira s visokim udjelom šećera (ukupno oko 90 g/L) i niskom koncentracijom aminokiselina zahtjevno je stanište za mikroorganizme. *Zygorulaspora florentina*, glavni predstavnik kvasaca u vodenim kefirnim zrnacima (Gulitz i sur., 2011) nazvan je *Zygosaccharomyces*

florentinus prije reklasifikacije 2003. (Kurtzman, 2003), poznat je kao osmotolerantni kvasac. Ove vrste kvasaca mogu uzrokovati kvarenje hrane, ali tijekom fermentacije vodenog kefira su poželjne.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Cjelokupni tijek istraživanja



Slika 6. Shematski prikaz cjelokupnog istraživanja

3.2.1. Priprava vodenih kefirnih zrnaca

Starter kultura vodenih kefirnih zrnaca je pripravljena zajedno s „majčinskom hranjivom podlogom“ u mineralnoj vodi s dodatkom 60 g/L konzumnog šećera. 20 g kefirnih zrnaca je uzgajano u 100 mL mineralne vode na 28 °C u termostatu. Nakon 24 sata uzgoja, zrnca su isprana sterilnom destiliranom vodom i ponovno inokulirana u 100 mL mineralne vode, te je ovaj postupak proveden dva puta.

3.2.2. Priprava uzoraka za fermentaciju

Za proizvodnju napitaka su u mineralnu vodu (Radenska d. o. o. Radenci, Slovenija) dodane različite koncentracije šećera (50, 60, 70, 80, 90 i 100 g/L) i 5 g/L vodenih kefirnih zrnaca. Fermentacija je trajala 12 dana.

3.2.3. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki dan tijekom 12 dana fermentacije. Mjerenja su provedena pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

3.2.4. Određivanje koncentracije mliječne kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 10 mL uzorka fermentiranog napitka i dodano je nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak titriran je otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Svaki mL 0,1 M NaOH ekvivalentan je 90,08 mg mliječne kiseline. Masena koncentracija mliječne kiseline (mg/mL) izračunata je prema jednadžbi:

$$\gamma(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 90,08) / V(\text{uzorka}) \quad (3)$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

$M(\text{NaOH})$ = molaritet NaOH (0,1 M)

$V(\text{uzorka})$ = volumen uzorka (mL)

3.2.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 mL uzorka i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija glukonske kiseline (g/L) izračunata je prema jednadžbi:

$$\chi(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 1,97) / V(\text{uzorka}) \quad (2)$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

$M(\text{NaOH})$ = molaritet NaOH (0,1 M)

$V(\text{uzorka})$ = volumen uzorka (mL)

3.2.6. Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentiranognapitka i 20 mL vode te je dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak titriran je otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija octene kiseline (g/L) izračunata je prema izrazu:

$$\chi(\text{CH}_3\text{COOH}) = V(\text{NaOH}) \cdot f(\text{NaOH}) \cdot V(\text{uzorka}) \cdot 6 \quad (1)$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

$f(\text{NaOH})$ = faktor 0,1 M NaOH (1,000)

$V(\text{uzorka})$ = volumen uzorka (1 mL)

3.2.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Udjel alkohola u fermentiranim uzorcima, tijekom previranja šećera do etanola i biooksidacije etanola do octene kiseline, određivan je kemijskom metodom koja se zasniva na oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) u kiselom okolišu.

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL stavljeno je 5 mL uzorka kokosove vode koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos kokosove vode i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0,1 M NaOH. U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, u koju će se hvatati destilat, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 ml koncentrirane H₂SO₄. Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija je morala biti polagana i postupna, a trajala je dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Po završetku destilacije lula je isprana s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmeyer tikvicu u koju je uzorak predestilirao. Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Tijekom oksidacije, utrošen je jedan dio bikromata, dok je drugi ostao u suvišku. Nakon toga je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje, dodano mu je oko 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20 %-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavljeno začepljeno 5 minuta. Tijekom tog perioda dolazi do oksido-redukcijske reakcije između preostalog kalijevog bikromata i KI, gdje se krom se iz šesterovalentnog reducira u trovalentni, a jod iz KI oksidira se u elementarni jod, zbog čega otopina dobije tamnu boju; elementarni jod se oslobađa u količini ekvivalentnoj kalijevom bikromatu. Nakon 5 minuta, uzorci su titrirani s 0,1 M otopinom natrijevog tiosulfata (Na₂S₂O₃), pri čemu dolazi do oksido-redukcijske reakcije između joda i natrijevog tiosulfata u kojoj se jod reducira, a tiosulfat oksidira. Kad je boja postala svjetlija, dodano je 5 mL 1 %-tne otopine škroba i titrirano do pojave tirkizno-zelene boje. Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{alkohol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6,9}\right) \cdot 2 \quad (4)$$

a = utrošak 0,1 M otopine Na₂S₂O₃ (mL)

3.2.8. Izračunavanje prinosa vodenih kefirnih zrnaca

Nakon 12 dana fermentacije, vodena kefirna zrnca su pažljivo izvađena iz staklenih posuda i oprana u plastičnom cjedilu demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu vrijednost vode (Toda i sur., 1991).

Prinos biomase vodenih kefirnih zrnaca (Y_{vkz}) izračunat je prema formuli:

$$Y_{vkz} (\%) = \frac{(\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma})}{(\gamma \text{ izvora C na početku fermentacije})} \cdot 100 \quad (5)$$

3.2.9. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost inhibicija rasta odabranih test mikroorganizama, bakterija vrsta *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Salmonella typhimurium* i kvasca *Candida albicans*, određivana je metodom radijalne difuzije. Kao testni mikroorganizmi korišteni su sojevi bakterijskih i kvašćevih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Suspenzije stanica bakterija i kvasaca ($10^8/\text{mL}$) nacijepljene su na hranjive podloge te im je u izbušene rupe u podlozi (visina 3 mm, promjer 4 mm) pipetom dodano 100 μL uzoraka fermentirane kokosove vode. Podloge su stavljene na inkubaciju 24 h pri 28 °C (kvasci) i 48 h pri 37 °C (bakterije). Tijekom inkubacije, istraživani uzorci difundirali su radijalno u agar tvoreći gradijent koncentracije i, ovisno o njihovim antimikrobnim djelovanjima, inhibirali rast mikroorganizama u okolini izbušenih rupa. Prozirna zona, u kojoj nema vidljivog rasta, naziva se zona inhibicije (ZI) i indikacija je osjetljivosti testnog mikroorganizma.

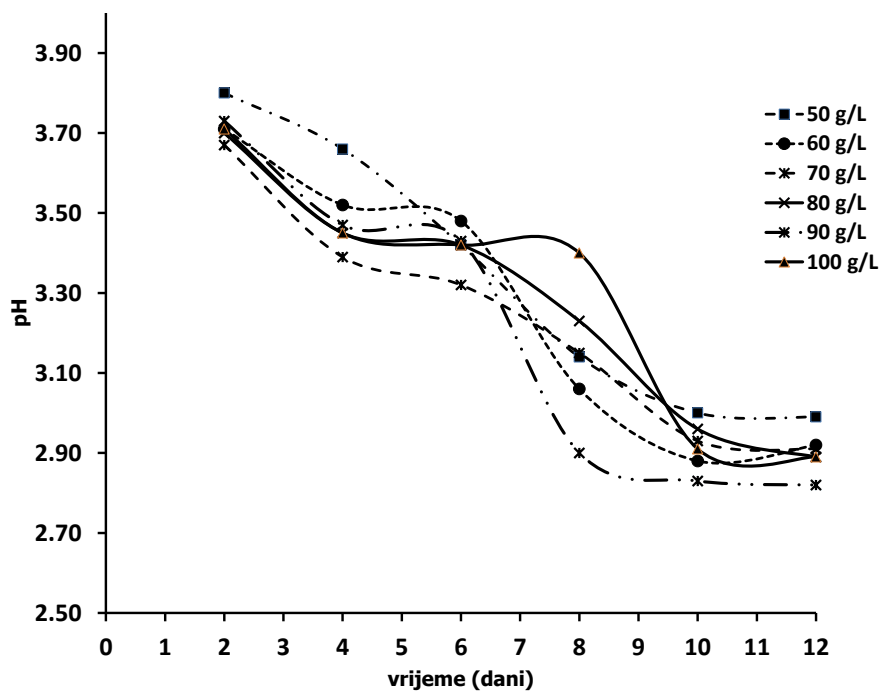
Nakon toga su očitani rezultati pokusa, pri čemu je zamjećivano postoji li zona inhibicije, je li područje zamućeno ili čisto, te su mjereni promjeri nastalih zona. Svi pokusi provedeni su u trima paralelama te je izračunata srednja vrijednost dobivenih rezultata.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Posljednjeg je desetljeća povećan interes za proizvodnju fermentiranih napitaka koji imaju probiotička svojstva i time poboljšavaju zdravstveni status konzumenata (Ozer i Kirmaci, 2010). Vodeni kefir je pjenušav osvježavajući proizvod, blago kiselog okusa. Dobiva se fermentacijom pomoću združene kulture bakterija i kvasaca. U ovom je radu proučavana fermentacija mineralne vode s dodatkom suhih marelica pomoću vodenih kefirnih zrnaca. Tijekom 12 dana aerobne fermentacije na sobnoj temperaturi, praćeni su različiti parametri: promjena pH vrijednosti fermentiranog napitka, kinetika nastajanja octene, glukonske i mliječne kiseline, te smanjenje koncentracije etanola, prinos biomase kefirnih zrnaca, kao i antimikrobno djelovanje fermentiranog napitka (Slike 7-13, Tablica 2).

4.1. Promjena pH vrijednosti

Optimalna pH vrijednost za rast kvasaca iz roda *Saccharomyces* je od 4,3 do 4,8, a bakterija iz roda *Acetobacter* između 5,4 i 6,3. Rast se odvija i pri nižim pH vrijednostima, od 4,0 do 4,5 povoljnim za bakterije iz roda *Lactobacillus* (Bergey i Holt, 1994). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju da su bakterije octene kiseline kao dio mikroflore vodenih kefirnih zrnaca sposobne rasti, proizvoditi organske kiseline i pri pH vrijednostima nižim od 4,0 (Slika 7).



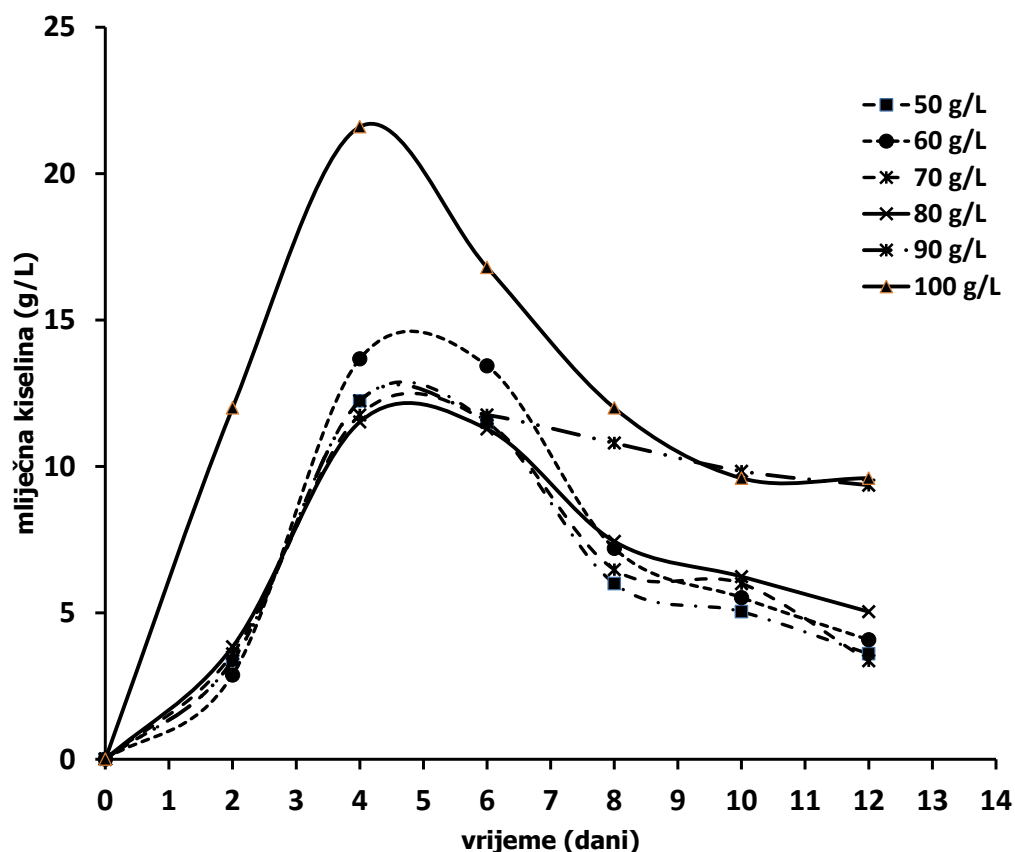
Slika 7. Promjena pH vrijednosti tijekom 12 dana uzgoj vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s različitim koncentracijama dodane saharoze

Važno je napomenuti da se pH vrijednost tijekom uzgoja može sniziti zbog nakupljanja sekundarnih metabolita, uglavnom organskih kiselina (octena, glukonska, mliječna), koje nastaju kao rezultat potrošnje izvora ugljika ili dušika. Pad pH vrijednosti započinje fermentacijom i sintezom organskih kiselina (Mikkelsen i sur., 2009). No, nastajanje organskih kiselina nije jedini razlog smanjenja pH vrijednosti napitka. Postoji pH gradijent između inokuliranih vodenih kefirnih zrnaca i tekućine u kojoj se fermentacija odvija. Napitak dobiven fermentacijom je prirodno vrlo blago kiseli jer se tijekom inokulacije dodaje i dio „majčinskog“ napitka u kojem je kultura uzgojena, te se njenom inokulacijom odmah smanjuje pH vrijednost hranjive podloge, najčešće s početne vrijednosti od pH 4 na pH 2.5 tijekom fermentacije (Chen i Liu, 2000; Sreeramulu i sur., 2000).

4.2. Promjena koncentracija organskih kiselina i etanola

Mliječna kiselina jedna je od glavnih metabolita tijekom fermentacije napitaka dobivenih previranjem šećera s dodatkom voća i dodatkom vodenih kefirnih zrnaca. Kinetika nastajanja mliječne kiseline tijekom fermentacije prikazana je na Slici 7. Vidljivo je gotovo linearno povećanje koncentracije u prvih 4 dana fermentacije dana pri svim dodanim koncentracijama saharoze. Najveća koncentracija na kraju procesa određena je u uzorku sa 100 g/L šećera (21,6 g/L), a najniža kod 70 i 80 g/l (11,76 i 11,52 g/L), dok su u ostalim koncentracijama određene relativno podjednake koncentracije octene kiseline (od 12,24 do 13,28 g/L).

Dobiveni rezultati ne razlikuju se od bitno rezultata koje je objavio Blanc (1996), koji je u podlozi sa 70 g/L saharoze izmjerio nisku koncentraciju mliječne kiseline, u podlozi sa 100 g/L visoku koncentraciju, a najvišu koncentraciju u podlozi s 50 g/L dodane saharoze. No, općenito gledano, iako i u rezultatima dobivenim u ovom radu i u istraživanju koje je proveo Blanc (1996) nema izričite regularnosti, apsolutne vrijednosti nastale mliječne kiseline u obadva istraživanja su bile podjednake, između 11 i 22 g/L.

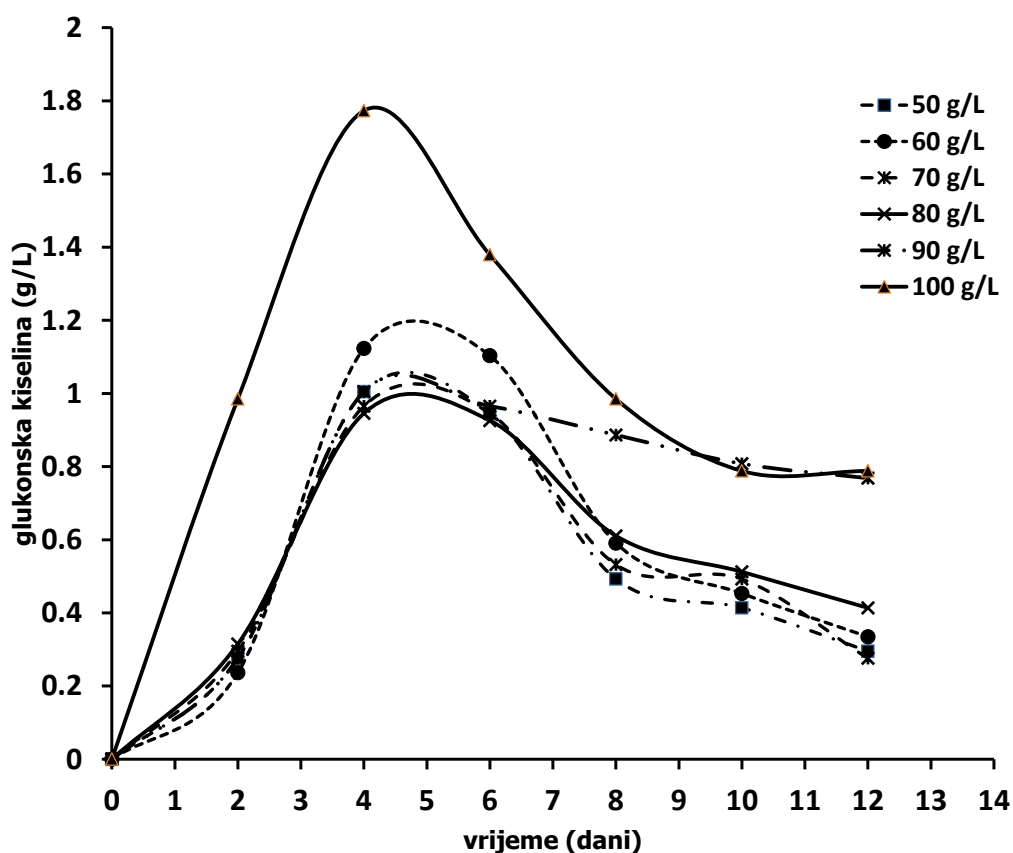


Slika 8. Promjena koncentracije mliječne kiseline tijekom 12 dana uzgojavodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s različitim koncentracijama dodane saharoze

Ovisno o tome želi li se proizvoditi fermentirani napitak različitim voćem, učinak početne koncentracije izvora ugljika u podlozi je izrazito važan jer nastajanje glukonske kiseline kao sporednog proizvoda rezultira snižavanjem pH hranjive podloge (Masaoka i sur., 1993). Prema istraživanju koje je proveo Roussin (1996), uz mliječnu kiselinu koja je dominantna u ovakvim napitcima, u relativno visokim koncentracijama je određena i glukonska kiselina. Autor je upozorio da često navođena prisutnost glukuronske kiseline u različitim uzorcima može zavarati jer obje kiseline imaju isto retencijsko vrijeme ako se određuju mjerenjem na HPLC-u. Zaključio je da glukuronska kiselina nije tipična za napitke s vodenim kefirnim zrcima, već je to glukonska kiselina.

Rezultati prikazani na Slici 9 ukazuju da je koncentracija glukonske kiseline bila 10 puta niža od koncentracije mliječne kiseline, no može se uočiti karakteristični linearni rast i kod jedne i druge kiseline tijekom prvih 4 dana fermentacije. Ponovno je najveća koncentracija određena kod uzorka s dodanih 100 g/L saharoze (1,77g/L), nešto niža pri 60 g/L (1,12 g/L), a u

uzorcima sa 50, 70, 80 i 90 g/L izmjerene su vrlo slične koncentracije glukonske kiseline (od 0,94 do 1 g/L).

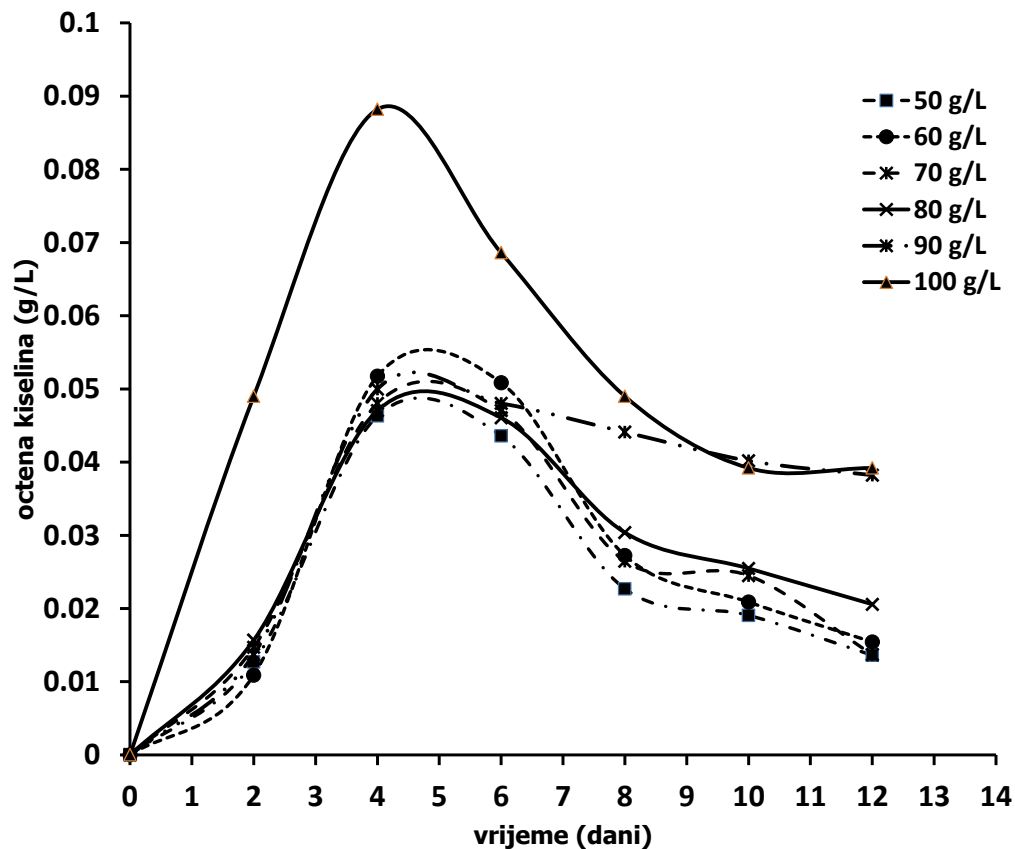


Slika 9. Promjena koncentracije glukonske kiseline tijekom 12 dana uzgojavodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s različitim koncentracijama dodane saharoze

Uzorci nacijepjeni vodenim kefirnim zrcima uzgojeni su u statičkoj kulturi na sobnoj temperaturi, pri čemu nije bio određivan mikrobiološki sastav uzoraka. Upravo zbog ovog razloga određeno odstupanje između dobivenih rezultata u ovom radu i objavljenih u literaturi može biti posljedica različitosti mikroflore koja je dio ekološkog izvorišta inokuliranih vodenih zrnaca.

Nastajanje octene kiseline rezultat je metabolizma bakterija octene kiseline i vrlo je značajna zbog svog inhibicijskog djelovanja na patogene mikroorganizme i vrste koje izazivaju kvarenje namirnica (Magalhaes i sur., 2010). Povećanje koncentracije octene kiseline tijekom 12 dana fermentacije prikazano je na Slici 10. Kao što se može primijetiti na grafičkom prikazu, ponovno je najveća koncentracija određena u uzorku sa 100 g/L dodane saharoze (0,08 g/L), a pri svim ostalim koncentracijama izmjerene su podjednake vrijednosti

koncentracije octene kiseline (0,046 do 0,51 g/L). Ovako niske koncentracije octene kiseline mogu se objasniti time što mineralna vodane sadrži biotin kao faktor rasta i amino dušik koji su nužni za intenzivniji metabolizam vodenih kefirnih zrnaca koji bi rezultirao većim udjelom octene kiseline u napitku.



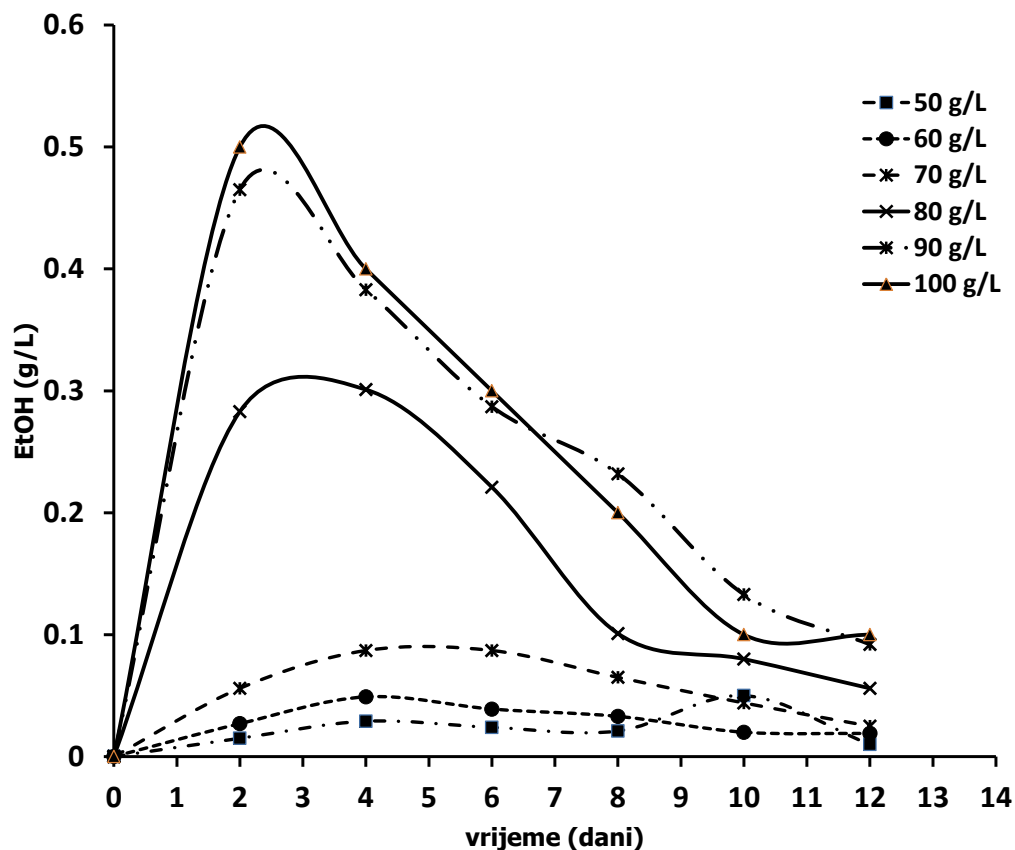
Slika 10. Promjena koncentracije octene kiseline tijekom 12 dana uzgojavodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s različitim koncentracijama dodane saharoze

Napitak dobiven fermentacijom pomoću vodenih kefirnih zrnaca je kompleksni napitak koji je istovremeno i zdrav i osvježavajući, a na tržištu se može naći kao bezalkoholno piće, čija koncentracija etanola mora biti niža od 0,5 % vol/vol.

Prema istraživanjima koje su proveli Chen i Liu (2000), koncentracija etanola se povećava u prvom dijelu fermentacije i postiže svoju maksimalnu vrijednost, te se nakon toga smanjuje. Do istog zaključka došao je i Reiss (1994), koji je zaključio da se nastajanje etanola povećava do maksimuma u šestom danu fermentacije, a nakon toga se smanjuje.

U ovom je radu izmjereno linearno povećanje koncentracije etanola do drugog dana fermentacije i to kod svih koncentracija šećera (Slika 11). Najveće koncentracije su izmjerene

kod 90 i 100 g/L (0,46 i 0,5 g/L), dok su pri drugim koncentracijama šećera izmjerene puno manje koncentracije etanola (od 0,015 do 0,016 g/L). Rezultati smanjenja koncentracije etanola ukazuju na biooksidaciju do octene kiseline jer je u četvrtom danu njena koncentracija naglo počela rasti (Slika 10).



Slika 11. Promjena koncentracije etanola tijekom 12 dana uzgojavodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s različitim koncentracijama dodane saharoze

Tijekom 12 dana fermentacije, masa vodenih kefirnih zrnaca se mijenjala ovisno o koncentraciji dodane saharoze (Tablica 2).

Tablica 2. Prinos vodenih kefirnih zrnaca nakon 12 dana fermentacije u mineralnoj vodi s dodatkom različitih koncentracija saharoze

Koncentracija saharoze (g/L)	γ inokuluma (g/L)	γ suhih marelica (g/L)	Prinos (%)
50	20,14	33.93	10,21
60	24,28	33.39	19,11
70	26,07	33.52	23,12
80	28,47	32.50	28,45
90	31.11	33.50	30,33
100	34,02	35.18	38,42

4.5. Antimikrobna aktivnost

Mnoga dosadašnja istraživanja antimikrobne aktivnosti napitaka dobivenih pomoću fermentacije vodenim kefirnim zrcima pokazala su djelovanje na široki spektar patogenih bakterija, no djelovanje na kvasce i plijesni je vrlo rijetko istraživano (Greenwalt i sur., 1998; Sreeramulu i sur., 2000). Rezultati tih istraživanja pokazali su da takvi napitci vrlo djelotvorno inhibira rast bakterijskih vrsta, dok prema kvascima i plijesnima uglavnom nije imala inhibicijsko djelovanje, vjerojatno zato što su kvasci i plijesni acidofilni mikroorganizmi, a time i otporniji na organske kiseline koje nastaju tijekom fermentacije, posebice na mliječnu kiselinu koja nastaje u najvećoj koncentraciji (Battikh i sur., 2012).

U ovom su radu, zbog određivanja antimikrobne aktivnosti vodenog kefira uzgajanog u mineralnoj vodi s različitim koncentracijama dodane saharoze, uzorci testirani na hranjivim podlogama nacijepljenim s bakterijama *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, tekvascem *C. albicans*. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 3. Može se uočiti da je dvostruko veća antimikrobna aktivnost postignuta prema bakterijama *P. aeruginosa* i *S. typhimurium*, pri svim koncentracijama saharoze dodane u mineralnu vodu, nego prema *C. albicans*., no prema bakteriji *E. coli* napitak nije pokazao antimikrobnu aktivnost. Najveće zone inhibicije prema bakterijama *P. aeruginosa* i *S. typhimurium* postignute su pri koncentracijama šećera od 50 i 60 g/L, malo manje pri 90 i 100 g/L, a pri svim koncentracijama dodane saharoze su postignute jednake zone inhibicije prema kvascu *C. albicans*.

Tablica 3. Antimikrobna aktivnost napitka fermentiranog pomoću vodenih kefirnih zrnaca uz dodatak različitih koncentracija saharoze

Koncentracija saharoze (g/L)	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
50	-	26	25	15
60	-	27	27	15
70	-	22	27	15
80	-	16	18	15
90	-	22	23	15
100	-	22	22	14

5. ZAKLJUČCI

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti:

1. Vodeni kefir je probiotički napitak dobiven fermentacijom mineralne vode pomoću vodenih kefirnih zrnaca, odnosno združene kulture kvasaca i bakterija mliječne i octene kiseline.
2. Fermentacija je provedena tijekom 12 dana s „domaćom“ kulturom vodenih kefirnih zrnaca, uz dodatak suhih marelica (5 g/L) pri sobnoj temperaturi (25 °C).
3. U svim je uzorcima tijekom fermentacije pad pH vrijednosti vodenog kefira bio u korelaciji s povećanjem koncentracija mliječne, glukonske i octene kiseline.
4. Istraživanjem antimikrobnog djelovanja fermentiranog napitka je dokazano izrazito dobro djelovanje na bakterije vrste *P. aureginosa* i *S. typhimurium*, kao i na kvasac vrste *C. albicans*, dok na bakteriju *E. coli* nije antimikrobno djelovao.

6. LITERATURA

- Ballongue, J. (1993). Bifidobacteria and probiotic action. U: *Lactic acid bacteria*, S. Salminen, A. Wright (urednici), New York: Dekker, Marc., str. 357–428.
- Barnett, J. a, Entian, K.-D. (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast (Chichester, England)*, 22(11): 835–894.
- Bergey, D.H. and Holt, J.G. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Blanc, P. J. (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol. Lett.* **18**, 139–142.
- Chen, C., Liu, B. Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metanolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 834–839.
- Collado, M. C., Hernandez, M., Sanz, Y. (2005). Production of Bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium strains. *Journal of Food Protection*, 68(5): 1034–1040.
- De Klerk, J. L. (2010). Succinic acid production by wine yeasts. Stellenbosch University.
- De Vries, W., Stouthamer, A. H. (1967). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of Bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 93(2): 574–576.
- De Vries, W., Stouthamer, A. H. (1968). Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by *Bifidobacteria*. *Journal of Bacteriology*, 96(2): 472–478.
- Dickinson, J. R., Kruckeberg, A. L. (2006). Carbohydrate Metabolism. In A Querol & G. H. Fleet (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages* (str. 215–242). Berlin.
- Dobson, A., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Ross, P., Hill, C. (2011). High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS microbiology letters*, 320(1): 56–62.
- Feldmann, H. (2005). Yeast metabolism. *Yeast molecular biology*. München: Adolf-Butenandt-Institut.
- Franzetti, L., Galli, A., Pagani, M. A., De Noni, L. (1998). Microbiological and chemical investigations on "Sugar Kefir" drink. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 48: 67–80.
- Gancedo, C., Serrano, R. (1989). Energy-Yielding Metablism. In A. Rose J. Harrison (Eds.), *The yeasts volume 3* (2.izd, str. 205–259). London.
- Gulitz, A., Stadie, J., Ehrmann, M. A., Ludwig, W., Vogel, R. F. (2013). Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 1–10.
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3): 284–8.

- Gullo, M., Giudici, P. (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1): 46–53.
- Horisberger, M. (1969). Structure of the dextran of the tibi grain. *Carbohydrate Research*, 10: 379–385.
- Jakob, F., Pfaff, A., Novoa-Carballal, R., Rüksam, H., Becker, T., Vogel, R. F. (2013). Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydrate Polymers*, 92(2): 1234–1242.
- Jakob, F., Steger, S., Vogel, R. F. (2012). Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads. *European Food Research and Technology*, 234(3): 493–499. doi:10.1007/s00217-011-1658-7
- Jay, J. M. (1992a). Fermented Foods and Related Products of Fermentation. *Modern Food Microbiology* (Vol. 45, str. 371–409). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Jay, J. M. (1992b). History of Microorganisms in Food. *Modern Food Microbiology* (4.izd, str. 3–10). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Kaditzky, S. B. (2008). *Sucrose metabolism in lactobacilli and bifidobacteria*. Technische Universität München.
- Kebler, L. (1921). California bees. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 10: 939–943.
- Krämer, J. (2007). *Lebensmittel Mikrobiologie. Lebensmittelmikrobiologie* (5.izd). Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Kurtzman, C. (2003). Phylogenetic circumscription of, and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma and Zygorulaspora. *FEMS Yeast Research*, 4(3): 233–245.
- Lee, J.-K., Song, J.-Y., Kim, S.-Y. (2003). Controlling substrate concentration in fed-batch candida magnoliae culture increases mannitol production. *Biotechnology Progress*, 19(3): 768–775.
- Leroi, F., Pidoux, M. (1993a). Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Microbiology*, 74(1): 48–53.
- Leroi, F., Pidoux, M. (1993b). Characterization of interactions between Lactobacillus hilgardii and Saccharomyces florentinus isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Microbiology*, 74(1): 54–60.
- Lutz, M. L. (1899). Recherches biologiques sur la constitution du Tibi. *Bulletin de la Societe Mycologique de France*, 15: 68–72.

Macfarlane, G. T., Englyst, H. N. (1986). Starch utilization by the human large intestinal microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 60(3): 195–201. doi:10.1111/j.1365-2672.1986.tb01073.x

Masaoka S., Ohe T., Sakota K. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Ferment. Bioeng.* **75**: 18-22.

Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., Gidley, M. J. (2009) Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J. Appl. Microbiol.* 107, 576-583.

Moinas, M., Horisberger, M., Bauer, H. (1980). The structural organization of the Tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Archives of Microbiology*, 128: 157–161.

Neve, H., Heller, K. J. (2002). The microflora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 54: 1337–349.

Ozer, B. H., Kimaci, H. A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *Int. J. Dairy Technol.*, **63**, 1-15.

Pidoux, M. (1989). The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN Journal*, 5: 223–238.

Pidoux, M., Brillouet, J., Quemener, B. (1988). Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnology letters*, 10(6): 415–420.

Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes & nutrition*, 6(3): 285–306.

Rastall, R. a, Gibson, G. R., Gill, H. S., Guarner, F., Klaenhammer, T. R., Pot, B., Reid, G., et al. (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS microbiology ecology*, 52(2): 145–152.

Reiß, J. (1990). Metabolic activity of Tibi grains. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 191(6): 462–465.

Roussin, M. R. (1996). Analyses of Kombucha ferments: report on growers. Information Resources, LC, Salt Lake City, Utah.

Simpson, P. J., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2004). *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2): 401–406.

Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knool, W. (2000) Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2589-2594.

Stadelmann, E. (1957). Die Symbiose Tibi. *Bull Soc Fibourgeoise Sci Nat*, 47: 16–19.

Stolz, P, Böcker, G., Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995). Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. I. *Lactobacillus sanfransiscensis*. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 201: 91–96.

Waldherr, Florian W, Doll, V. M., Meißner, D., Vogel, R. F. (2010). Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology*, 27(5): 672–678.

Ward, M. (1892). The ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution to the study of fermentation yeasts and bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 183: 125–197.

Začnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Grünfeld

ime i prezime studenta