

# Fermentacija kozjeg, pirovog i sojinog mlijeka s dodatkom vanilije nacijepljenih kefirnim zrcima

---

**Kovačina, Antonela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*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:159:234885>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

**Antonela Kovačina**

6674/BT

**FERMENTACIJA KOZJEG, PIROVOG I SOJINOG MLIJEKA  
S DODATKOM VANILIJE NACIJEPLJENIH KEFIRNIM  
ZRNCIMA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 2

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

Zagreb, 2016.

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.

## 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

### FERMENTACIJA KOZJEG, PIROVOG I SOJINOG MLIJEKA S DODATKOM VANILIJE NACIJEPLJENIH KEFIRNIM ZRNCIMA

Antonela Kovačina, 6674/BT

**Sažetak:** Kefir je jedinstveni mliječni proizvod dobiven fermentacijom laktoze do mliječne kiseline i alkohola. Proizvodi se zahvaljujući mikrobnj aktivnosti kefirnih zrnaca, koja imaju relativno stabilan i na specifičan način ujednačen udjel bakterija i kvasaca. Kefir predstavlja kompleksnu i snažnu simbiozu više od 30 mikroorganizama, koji tvore nakupinu sličnu cvatu cvjetače i povezani su u polisaharidni matriks naziva kefiran. Sastav kefira različit je ovisno o čimbenicima kao što su tip mlijeka i mikrobiološki sastav radne kulture (kefirna zrnca ili komercijalno dostupna starter kultura). Cilj ovog rada bio je odrediti učinkovitost kefirnih zrnaca kao inokuluma za pripremu kefira od različitih tipova mlijeka (kozjeg, pirovog i sojinog s dodatkom vanilije). Uzorci mlijeka su inokulirani s 5 % kefirnih zrnaca i prirodno fermentirani na sobnoj temperaturi tijekom 14 dana uzgoja. Promjene pH vrijednosti bile su u korelaciji s metaboličkim aktivnostima bakterija i kvasaca. Uočen je linearni odnos prinosa biomase kefirnih zrnaca i povećanja koncentracije mliječne, glukonske i octene kiseline tijekom fermentacije. Pirovo i sojino mlijeko s dodatkom vanilije mogu poslužiti kao hranjiva podloga za proizvodnju napitaka sličnih kefiru proizvedenom na kozjem mlijeku.

**Ključne riječi:** kefir, kefirna zrnca, fermentacija, mliječni napitak, nastajanje organskih kiselina

**Rad sadrži:** 29 stranica, 13 slika, 4 tablice, 42 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

**Rad predan:** lipanj 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Undergraduate studies Biotechnology  
Department of Biochemical engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing  
Technology

### FERMENTATION OF GOAT, SPELT AND SOY MILK WITH VANILLA INOCULATED WITH KEFIR GRAINS

Antonela Kovačina, 6674/BT

**Abstract:** Kefir is a unique cultured dairy product due to combined lactic acid and alcoholic fermentation of lactose in milk. Kefir is produced by microbial activity of kefir grains, which have a relatively stable and specific balance of lactic acid bacteria and yeast. It is a complex and powerful symbiosis of more than 30 microorganisms that form a cluster or cauliflower-like structure held together in a polysaccharide matrix named kefiran. The composition of kefir varies according to factors such as milk type and the microbiological composition of culture types (kefir grain or commercial starter culture). The aim of the present study was to evaluate the use of kefir grains as inoculum for the preparation of different milk types (goat, spelt and soy milk with vanilla) kefir. Milk samples were inoculated with 5 % kefir grains and fermented naturally at room temperature over a period up to 14 days. Changes in pH were correlated to the symbiotic metabolic activities of bacteria and yeasts. The yield of kefir grain biomass increased with fermentation time resulting in linear increment of lactic, gluconic and acetic acid formation. Spelt milk and soy milk with vanilla may serve as culture medium for the production of kefir-like beverages similar to goat kefir.

**Keywords:** Kefir, Kefir grains, Fermentation, Milk beverage, Organic acids formation

**Thesis contains:** 29 pages, 13 figures, 4 tables, 42 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

**Final work delivered:** June 2016

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. Porijeklo kefira .....	2
2.2. Sastav kefirnih zrnaca i mikrobne populacije.....	2
2.3. Proizvodnja kefira.....	8
2.4. Kemijski i nutritivni sastav kefira .....	11
<b>3. MATERIJALI I METODE RADA .....</b>	<b>13</b>
3.1. Priprava kulture kefirnih zrnaca .....	13
3.2. Uporabljene vrste napitaka .....	13
3.2.1. Kemijski sastav uporabljenih vrsta napitaka.....	13
3.2.1.1. Kozje mlijeko.....	13
3.2.1.2. Pir.....	14
3.2.1.3. Soja s okusom vanilije .....	14
3.2.2. Nutritivni sastav uporabljenih vrsta napitaka.....	14
3.3. Priprava uzoraka .....	14
3.4. Određivanje prinosa biomase kefirnih zrnaca i mase kefira.....	15
3.4.1. Određivanje prinosa biomase kefirnih zrnaca.....	15
3.4.2. Određivanje prinosa mase kefira.....	15
3.5. Određivanje pH vrijednosti kefira .....	16
3.6. Određivanje koncentracije mliječne kiseline u kefiru .....	16
3.7. Određivanje koncentracije glukonske kiseline u kefiru .....	16
3.8. Određivanje koncentracije octene kiseline u kefiru .....	17
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>18</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>23</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>25</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>26</b>

## **1. UVOD**

Kefir je fermentirani mliječni proizvod koji svoje izvorište ima na području Kavkaza, Tibeta i Mongolije, gdje se pripravlja već stoljećima. Stanovnici Kavkaza su, čuvajući svježe mlijeko u kožnim vrećama, otkrili da je ono nakon nekog vremena postalo pjenušavo (Irigoyen i sur., 2003). U tim zemljama kefir se i dalje tradicionalno proizvodi od ovčjeg, dok se u Europi komercijalna proizvodnja kefira temelji na kravljem mlijeku (Wójtowski i sur., 2003).

Brojne su koristi od konzumiranja kefira, a istraživanja su pokazala da ima antibakterijsko (Zacconi i sur., 1995), imunološko (Furukawa i sur., 1990), antitumorno (Furukawa i sur., 1991) i hipokolesterolno djelovanje (Tamai i sur., 1996).

Tradicionalno se kefir proizvodi fermentacijom dodanih kefirnih zrnaca u mlijeko sisavaca, a najčešća su kravlje, kozje i ovčje, pri čemu se dobiva kefir s različitim organoleptičkim i nutritivnim svojstvima. Kefirna zrnca su združena kultura bakterija mliječne kiseline i kvasaca, sitne strukture (promjera 0,3 do 3,5 cm), nejednolikog oblika i bijelo-žute boje, a izgledom podsjećaju na cvat cvjetače. Kefirna zrnca mogu previrati i mlijeka, odnosno napitke biljnog podrijetla kao što su sojino, rižino i kokosovo mlijeko (Kesenkas i sur., 2013) te druge slatke tekućine, uključujući voćni sok, kokosovu vodu ili sok od đumbira (Öner i sur., 2010). Takve fermentacije mogu rezultirati smanjenim prinosom biomase kefirnih zrnaca jer je istraživanjima dokazano da je laktoza nužna za sintezu kefirana (Farnworth, 2005).

Kefir je, uz jogurt, mlijeko, različite vrste sira te druge mliječne proizvode, značajan izvor proteina za vegetarijance, a mogu ga konzumirati i ljudi koji imaju razvijenu netoleranciju na laktozu (Hertzler i sur., 2003). Također, kefir kao proizvod sadrži probiotike, posljednja dva desetljeća prepoznate kao „dobre bakterije“, koje imaju pozitivan učinak na različite bolesti probavnog sustava, primjerice sindrom iritabilnog debelog crijeva i Chronovu bolest te pomažu kod različitih gljivičnih infekcija (Marteau i sur., 2001; Zubillaga i sur., 2001). Kada se kefir pripravlja s mlijekom ili napitkom biljnoga podrijetla, a ne životinjskog, mogu ga konzumirati i vegani.

U ovom radu su tijekom 14 dana fermentacije kefira s kefirnim zrcima u kozjem, pirovom te sojinom mlijeku s dodatkom vanilije praćeni sljedeći parametri:

- utjecaj vrste mlijeka na prinos biomase kefirnih zrnaca
- utjecaj vrste mlijeka na prinos mase i teksturu kefira
- promjena pH vrijednosti kefira tijekom fermentacije
- promjena koncentracija mliječne, glukonske i octene kiseline tijekom fermentacije



## **2. TEORIJSKI DIO**

## **2.1. Porijeklo kefir**

Kefir je blago kiselo fermentirano, pjenušavo mlijeko porijeklom s Kavkaza, koje sadrži malu količinu alkohola. Ono po čemu se kefir razlikuje od klasičnog fermentiranog mlijeka, najčešće jogurta, jest to što nastaje samo pomoću kefirnih zrnaca, koja predstavljaju združenu kulturu kvasaca i bakterija (Marquina i sur., 2002). Povijesno gledano, kefirna zrnca smatrala su se Alahovim darom Muslimanima sa sjevera kavkaskih planina. Riječ kefir potječe od turske riječi „keif“, što se može prevesti kao „osjećaj užitka nakon konzumiranja napitka“. Kefirna zrnca prenošena su s generacije na generaciju među kavkaskim plemenima, smatrajući se izvorom obiteljskog bogatstva. Danas se tradicionalni, autentični kefir jednostavno priprema diljem svijeta naciepljivanjem kefirnih zrnaca u svježe ili pasterizirano mlijeko (Roberts i Yarunin, 2000).

Za kefir se od samog početka 18. stoljeća smatralo da ima iscjeljujuća svojstva. S obzirom na porijeklo i način na koji je prenošen s generacije na generaciju, znanstvena zajednica podcjenjivala je njegove blagotvorne osobine. Iako su brojna istraživanja dokazala prednosti kefir, nedostatak standardnih protokola za klinička ispitivanja otežavao je interpretaciju rezultata. Također, proizvodnja kefir koristeći kefirna zrnca u velikim količinama u industriji nije standardizirana, zbog čega je problematično proizvesti velike količine s ujednačenim karakteristikama. Usprkos tomu, na tržištu su komercijalno dostupni različiti kefirni proizvodi (Roberts i Yarunin, 2000).

## **2.2. Sastav kefirnih zrnaca i mikrobne populacije**

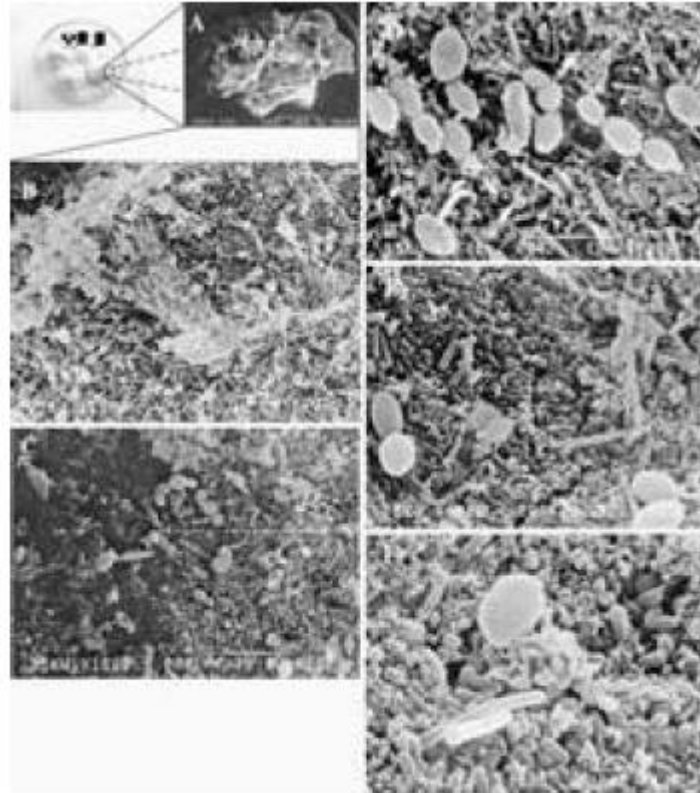
Kefir je fermentirani mliječni napitak s jedinstvenom kremastom konzistencijom i blago kiselim okusom. Mliječna fermentacija odvija se pomoću kefirnih zrnaca, malom nakupinom mikroorganizama povezanih u cjelinu pomoću polisaharidnog matriksa, nazvanog kefiran. Zrnca su meka, želatinozna, bijela biološka masa sastavljena od proteina, lipida i topljivog polisaharida – kompleksa kefirana, koji okružuje kvasac i bakterije u kefirnim zrcima (Slika 1).



**Slika 1.** Kefirna zrnca; crni pravokutnik je ekvivalentan 1 cm (Lopitz-Osoa i sur., 2006)

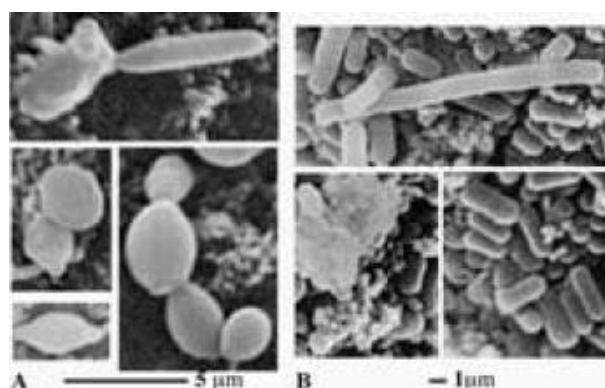
Kefiran je glukogalaktan topljiv u vodi kojeg proizvodi *Lactobacillus kefiranofaciens*. Ova bakterija ima sposobnost proizvodnje kefirana u različitim uvjetima, a uzgajana je na hranjivoj podlozi koja je sadržavala hidrolizat riže ili PYG10 kemijski definiranoj podlozi (Maeda i sur., 2004). Istraživanja su pokazala da je brzina staničnog rasta i proizvodnje kefirana veća kada *Lactobacillus kefiranofaciens* raste u mješovitoj kulturi sa *Saccharomyces cerevisiae* (Cheirsilp i sur., 2003) te u uvjetima kulture uspostavljenima oponašajući aktivnost stanica kvasca (Taniguchi i Tanaka, 2004), čime je ukazano na važnost simbioze između bakterija i kvasca u kefiru.

Kako su neki autori opisali (Neve i Heller, 2002), mikrobna populacija je čvrsto povezana na vanjskoj strani zrnaca, dok unutarnji dio nije tako kompaktan. U mikrobnoj populaciji dominiraju stanice kvasca oblika limuna ili dugih filamenata koje rastu isprepletene s kuglastim (koki) i kratkim ili dugim štapićastim bakterijama (laktobacili). Uočeno je da se koki nalaze prvenstveno na površini, dok su laktobacili većinom pronađeni između stanica kvasca (Slika 2).



**Slika 2.** SEM fotografija mikrobne populacije kefirnih zrnaca. A: 30x; B: 1100x; C: 1800x; D: 3600x; E: 4800x; F: 8600x (Lopitz-Osoa i sur., 2006)

Širok raspon različitih vrsta mikroorganizama, uključujući kvasce i bakterije, izoliran je i identificiran u kefirnim zrnacima – laktobacili, streptokoki, *Acetobacter* i kvasci. Kvasci i bakterije povezani su simbiotski, što znači da preživljavaju ili se razmnožavaju međusobnim korištenjem proizvoda vlastitih metabolizama kao izvora energije ili stimulatora rasta (Slika 3).



**Slika 3.** SEM fotografije na kojima su prikazani različiti rodovi kvasaca (A) te koka, bacila i laktobacila (B) (Lopitz-Osoa i sur., 2006)

Neki mikroorganizmi izolirani iz kefira dobili su naziv upravo po njemu, npr. *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir* i *Candida kefir*. Otkrivene su i nove vrste, kao što je *Saccharomyces turicensis* (Wyder i sur., 1999). Taksonomska nomenklatura raznih vrsta kvasca i bakterija ključnih za proizvodnju kefira, mijenjala se tijekom vremena zbog unaprjeđivanja metoda koje se primjenjuju u taksonomskoj klasifikaciji. Također, cjelovito poznavanje životnih ciklusa kvasaca (telemorfne i anamorfne faze) u nekim od ovih mikroorganizama rezultiralo je uporabom različite nomenklature za njihovu klasifikaciju. Tako su različiti autori u kefirmim zrnima identificirali brojne vrste kvasaca i bakterija, a njihova nomenklatura prikazana je u Tablicama 1 i 2.

**Tablica 1.** Mikrobna populacija kefira iz različitih načina uzgoja (Wyder, 1998)

Nova nomenklatura <sup>a</sup>	Prijašnja nomenklatura
<i>Dekkera anomala</i> (t) / <i>Brettanomyces anomalus</i> (a)	
<i>Torulaspota delbrueckii</i> (t)	<i>Saccharomyces delbrueckii</i> ; <i>Candida colliculosa</i>
<i>Candida friedrichii</i>	
<i>Candida humilis</i>	
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Torulopsis holmii</i> ; <i>Candida holmii</i>
<i>Candida inconspicua</i>	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (t) / <i>Candida kefir</i> (a)	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i>
<i>Pichia fermentans</i> (t) / <i>Candida firmetaria</i> (a)	<i>Candida lambica</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i> (t) / <i>Candida knisei</i> (a)	
<i>Candida maris</i>	
<i>Cryptococcus humicolus</i>	
<i>Debaryomyces hansenii</i> (t) / <i>Candida famata</i> (a)	
<i>Debaryomyces</i> ( <i>Schwanniomyces</i> ) <i>occidentalis</i>	
<i>Galactomyces geotrichum</i> (t) / <i>Geotrichum candidum</i> (a)	
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> ; <i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Kluyveromyces lodderae</i>	var. <i>lactis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
<i>Saccharomyces unisporus</i>	
<i>Yarrowia lipolytica</i> (t) / <i>Candida lipolytica</i> (a)	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	
<i>Saccharomyces turicensis</i> sp. nov	

**Tablica 2.** Mikrobna populacija kefira iz različitih načina uzgoja (Farnworth, 2005)

Nova nomenklatura <sup>a</sup>	Prijašnja nomenklatura
Laktobacili	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	
<i>Lactobacillus kefir</i>	
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	<i>Lactobacillus kefirgranum</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Lactobacillus parakefiri</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	
Ostale bakterije	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus cremoris</i> ; <i>Streptococcus cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ; <i>Streptococcus lactis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>Enterococcus durans</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	
<i>Acetobacter aceti</i>	

<sup>a</sup> Garrity i sur. (2004); (t): telemorf, (a): anamorf

Prema Halléu i suradnicima (1994), najčešće prisutni laktobacili u kefirnim zrnima su *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus kefiranofaciens*. Navedeni mikroorganizmi predstavljaju 20 % od ukupnih laktobacila u konačnom fermentiranom napitku, dok preostalih 80 % čine *Lactobacillus kefir*. Prevladavajući kvasci u kefirnim zrnima i napitku su vrste *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida kefir* i *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*. Prema Wyderu (1998), 23 vrste kvasaca mogu se izolirati iz kefira, no najčešće izolirane vrste bile su *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir* i *Saccharomyces cerevisiae*. U relativno nedavnom istraživanju (Kwon i sur., 2003), još

jednom je većina izoliranih mikroorganizama iz kefir identificirana kao kvasci i mliječne bakterije, pri čemu su kvasac *Candida kefyr* i bakterija *Lactococcus lactis* činili 90 % mikrobnog populacije.

Iz dostupnih podataka može se zaključiti da sastav mikrobnog populacije u kefiru varira ovisno o izvoru kefirne starter kulture, iako su pojedine vrste uvijek prisutne. Očito je da do značajnih promjena sastava rodova i vrsta mikroorganizama i njihove ukupne zastupljenosti, dolazi ovisno o porijeklu mlijeka, ali i periodu uzgoja kefirnih zrnaca. Nadalje, mikrobnog populacija iz istih uzoraka kefirnih zrnaca može varirati ovisno o sezoni ili uvjetima uzgoja.

Karakteristike bilo kojeg spontano fermentiranog mliječnog proizvoda posljedica su metabolizma široke palete mikroorganizama (Narvhus i sur., 2003). Kefir, kao fermentirani mliječni proizvod, predstavlja kompleksne reakcije između kvasaca i mliječnih bakterija, koje mogu utjecati na karakteristike i kakvoću konačnog proizvoda. Aktivnost pojedinih mikroorganizama i način na koji doprinose ravnoteži simbioze, još uvijek nije potpuno proučena. Narvhus i suradnici (2003) proveli su istraživanje o mogućim interakcijama do kojih dolazi između kvasaca i bakterija u spontano fermentiranom mlijeku. Zaključak je bio da se, s obzirom da je kefir fermentirano mlijeko, njegovi proizvodi smatraju prvenstveno proizvodima mliječne fermentacije dobivenima pomoću bakterija mliječne kiseline (BMK). BMK naglo snižavaju pH nakupljanjem laktata dokle god proces nije inhibiran i proizvode se sastojci od kojih potječe okus kefir (acetaldehid, itd.), zajedno s aromama fermentiranog mlijeka. Prisutnost kvasaca je, u proizvodima kao što je kefir, presudna radi osiguravanja potrebnih karakteristika procesa proizvodnje ugljičnog dioksida i etanola. Interakcija između kvasaca i bakterija mliječne kiseline može rezultirati stimulacijom ili inhibicijom rasta jednog ili oba roda u ovakvoj mješovitoj kulturi. Ovi organizmi mogu se nadmetati za potrebna hranjiva ili mogu svojim proizvodima metabolizma inhibirati ili stimulirati međusobni rast. Rast kvasaca u mlijeku i njihova uloga u sastojcima mlijeka još uvijek nisu u potpunosti objašnjeni. Vrlo malo izoliranih vrsta kvasaca iz kefir pozitivno je na laktozu, ali većina sojeva ima mogućnost iskorištenja galaktoze, laktata ili citrata. Kada BMK koriste laktozu, pretpostavlja se da se metaboliziraju oba dijela monosaharida, ali zabilježen je porast galaktoze u fermentiranom mlijeku. To znači da kvasci koji mogu asimilirati galaktozu, ali ne i ostale komponente mlijeka ili laktat, mogu rasti zajedno s BMK koje galaktozu proizvode. Neke vrste kvasaca također imaju proteolitičke ili lipolitičke enzime i mogu metabolizirati ključne spojeve potrebne za stanični rast. Kvasci mogu promijeniti svoj metabolizam ovisno o koncentraciji ugljikohidrata i dostupnog kisika, a najbolji primjer je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. *Kluyveromyces marxianus* metabolizira laktozu, a kao proizvodi nastaju glukoza, galaktoza i etanol. Ostale

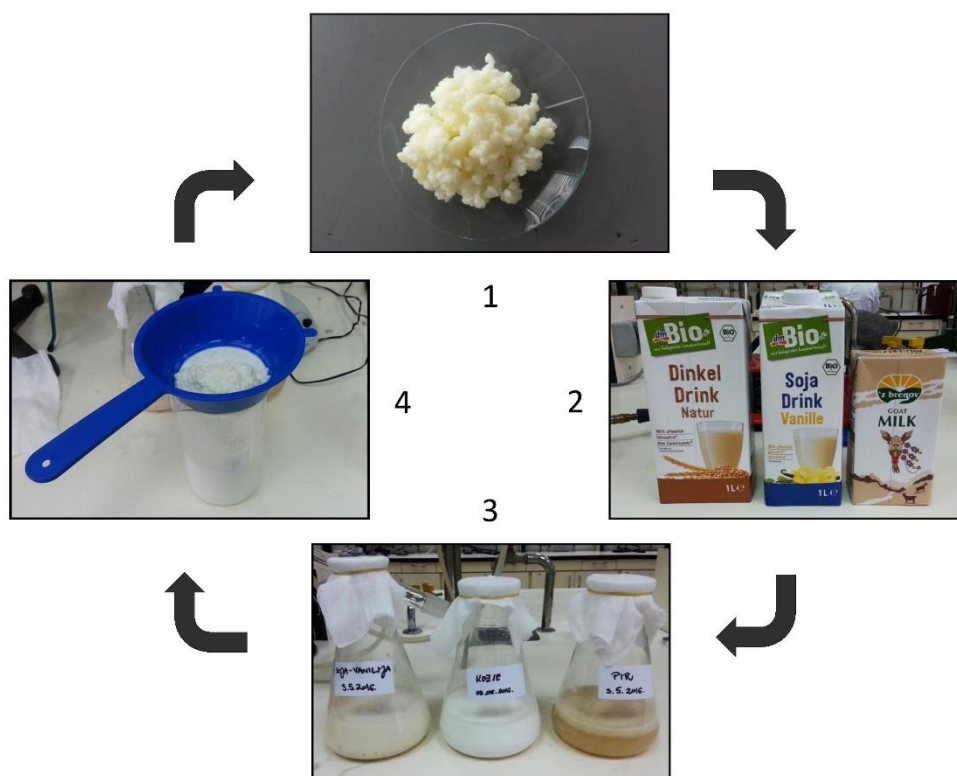
vrste imaju proteolitičku i lipolitičku aktivnost, zbog kojih se tijekom rasta povećava koncentracija slobodnih aminokiselina i masnih kiselina, a najveću takvu aktivnost je pokazala *Yarrowia lipolytica*. Kvasci mogu proizvesti vitamine koji pospješuju rast BMK. Brojni kvasci izolirani iz fermentiranih mliječnih proizvoda mogu asimilirati laktat, a kvasac koji je pozitivan na laktat i BMK u mješovitoj kulturi u mlijeku, može uzrokovati neznatan porast pH vrijednosti. To omogućuje daljnji rast i proizvodnju laktoze pomoću BMK, što dovodi do povećane proizvodnje laktata koja može inicirati metabolički ciklus. Također, kada kvasci i laktobacili rastu zajedno, primijećen je porast u proizvodnji kefirana (Cheirsilp i sur., 2003).

### **2.3. Proizvodnja kefira**

Postoji nekoliko metoda za proizvodnju kefira. Uz uobičajene tradicionalne i industrijske postupke, znanstvenici svakodnevno primjenjuju moderne tehnike kako bi proizveli kefir s istim svojstvima koje ima tradicionalni. Kefir se može proizvesti od bilo koje vrste mlijeka životinjskog ili biljnog porijekla: kravljeg, kozjeg, ovčjeg, kokosovog, rižinog ili sojinog. Nadalje, osim različitih izvora mlijeka, ona mogu biti pasterizirana, nepasterizirana, punomasna, obrana i potpuno bez masnoće.

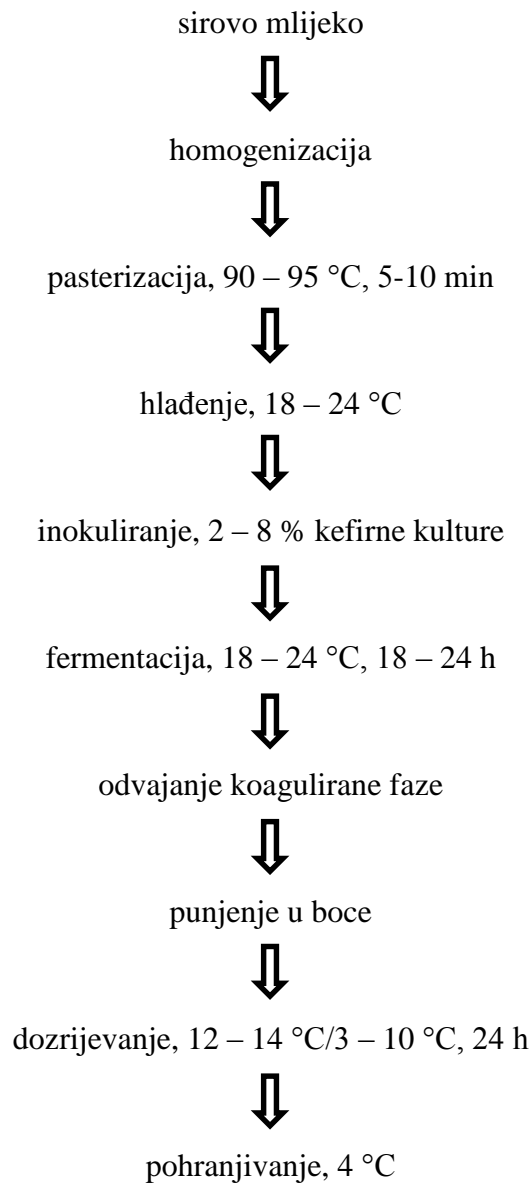
Za „tradicionalni“ način proizvodnje kefira koristi se sirovo nepasterizirano, pasterizirano ili UHT mlijeko (tretirano visokom temperaturom). Mlijeko se ulijeva u čistu, pogodnu posudu te se inokulira s 2 – 10 % kefirnih zrnaca (obično 5 %) te se takva suspenzija ostavlja stajati na sobnoj temperaturi otprilike 24 sata. Nakon toga se kefir procijedi kroz cjedilo kako bi se kefirna zrnca izdvojila iz tekućeg dijela. Ovako fermentirano mlijeko spremno je za konzumaciju i može se čuvati u hladnjaku nekoliko dana, a ocijedena zrnca ponovno se stavljaju u svježe mlijeko. Proces se jednostavno ponavlja te se može ponavljati više puta, s obzirom da su kefirna zrnca živi, složeni ekosustav koji se može čuvati i razmnožavati dokle god ima hranjivog supstrata (Altay i sur., 2013). Tijekom višekratnog naciepljivanja kefirnih zrnaca u svježe mlijeko, zrnacima se povećava volumen, odnosno uočljiv je porast biomase (Slika 4).





**Slika 4.** Proizvodnja kefira. Kefirna zrnca (1) dodana su u mlijeko (2) i ostavljena radi fermentacije na sobnoj temperaturi tijekom 18 – 24 h (3), nakon čega su filtrirana (4) i spremna za novi ciklus fermentacije. Fermentirano mlijeko koje je rezultat koraka (4) spremno je za konzumaciju

U industrijskoj se proizvodnji kefira mogu koristiti razne metode, koje se uglavnom temelje na istoj metodi kao i u proizvodnji tradicionalnog kefira. Prvi korak je homogenizacija mlijeka do 8 % suhe tvari i termička obrada pri 90 – 95 °C tijekom 5 – 10 minuta. Nakon toga se mlijeko hladi na 18 – 24 °C i inokulira s 2 – 8 % kefirne kulture (bakterijske starter kulture) u spremnicima, čemu slijedi fermentacija u trajanju od 18 do 24 sata. Koagulirani dio odvaja se pumpama i prebacuje u boce. Nakon dozrijevanja pri 12 – 14 °C, odnosno 3 – 10 °C tijekom 24 sata, kefir se skladišti na 4 °C (Koroleva, 1988). Pojedina istraživanja (Maeda i sur., 2004) pokazala su da tradicionalna kefirna zrnca ne mogu biti korištena kao starter kulture u industriji. Mikrobna populacija kefirnih zrnaca je u simbiotskoj ravnoteži, ali vrste i kvantitativna struktura različitih grupa mikroorganizama značajno se mijenjaju tijekom procesa proizvodnje. Zbog složenosti mikrobnih odnosa u kefirnoj strukturi, utjecaj mikroorganizama na međusobne metabolizme može dovesti do različitih profila organoleptički važnih sastojaka u fermentiranom mlijeku. Industrijski proces proizvodnje kefira je prikazan na Slici 5.



**Slika 5.** Industrijski postupak proizvodnje kefira (Otles i Cagindi, 2003)

U određenim uvjetima, koristeći mješavinu ograničenog broja reprezentativnih mikroorganizama (laktobacili, koki i kvasci) izoliranih iz kefirnih zrnaca, postignute su osnovne fizikalno-kemijske i senzorske karakteristike tradicionalnog kefira. U jednom istraživanju (Assadi i sur., 2000), korištenjem različitih omjera starter kultura kefirnih zrnaca (BMK, kvasci i bakterije octene kiseline) za proizvodnju kefira, postignuta je i željena kvaliteta (boja, miris, okus, kiselost, pjenušavost i viskozitet) proizvoda. Usporedbom rezultata s onima iz prethodnih istraživanja, utvrđeno je da kefir proizveden pomoću kefirnih zrnaca ima poželjnije karakteristike nego kefir za čiju proizvodnju su korištene starter kulture.

## 2.4. Kemijski i nutritivni sastav kefira

Sastav kefira je varijabilan i nije u potpunosti definiran, a ovisi o izvoru i udjelu masti u mlijeku, mikrobnom sastavu kefirnih zrnaca i tehnološkom postupku njegove proizvodnje (Zubillaga i sur., 2001). Glavni spojevi koji nastaju tijekom fermentacije su mliječna kiselina, CO<sub>2</sub> i alkohol. Aromatični sastojci diacetil i acetaldehid također su prisutni u kefiru, a pH vrijednost proizvoda je od 4,2 do 4,6 (Odet, 1995). Kemijski sastav i nutritivna vrijednost kefira prikazana je u Tablici 3.

Osim što sadrži probiotičke bakterije, kefir je izvor vitamina, minerala i esencijalnih aminokiselina koji pomažu u održavanju tijela zdravim. Bogat je vitaminima B skupine te vitaminom C, kalcijem i magnezijem, a također je i izvor biotina, folne i pantotenske kiseline. Kefir sadrži esencijalne aminokiseline koje tijelo, nakon konzumacije, vrlo lako apsorbira. Triptofan je jedna od aminokiselina iz kefira za koju je poznato da ima relaksirajući učinak na živčani sustav, zajedno s kalcijem i magnezijem, također prisutnima u kefiru. Ovaj napitak je dobar izvor fosfora, koji je drugi najvažniji mineral u našem tijelu, a pomaže pri apsorpciji ugljikohidrata, masti i proteina za stanični rast, održavanje i energiju (Saloff-Coste, 1996).

Kefir je dobra namirnica za osobe netolerantne na laktozu, odnosno one koje nemaju sposobnost probavljanja većih količina laktoze, glavnog šećera u mlijeku. Tijekom fermentacije, udjel laktoze u kefiru se smanjuje, a povećava se udjel  $\beta$ -galaktozidaze (Otlés i Cagindi, 2003).

**Tablica 3.** Kemijski sastav i nutritivna vrijednost kefira (Otles i Cagindi, 2003)

Sastojak	100 g	Sastojak	100 g
Energetska vrijednost	65 kcal	Minerali (g)	
masti (%)	3,5	kalcij	0,12
proteini (%)	3,3	fosfor	0,10
laktoza (%)	4,0	magnezij	12,0
voda (%)	87,5	kalij	0,15
		natrij	0,05
mliječna kiselina (g)	1,0	klorid	0,10
etanol (g)	0,9		
kolesterol (mg)	13,0	Elementi u tragovima	
		željezo (mg)	0,05
Esencijalne aminokiseline (g)		bakar (μg)	12,0
triptofan	0,05	molibden (μg)	5,5
fenilalanin + tirozin	0,35	mangan (μg)	5,0
leucin	0,34	cink (mg)	0,36
izoleucin	0,21		
treonin	0,17	Aromatski sastojci	
metionin + cistein	0,12	acetaldehid	
lizin	0,27	diacetil	
valin	0,22	acetoin	
Vitamini (mg)			
A	0,06		
karoten	0,02		
B <sub>1</sub>	0,04		
B <sub>2</sub>	0,17		
B <sub>6</sub>	0,05		
B <sub>12</sub>	0,5		
niacin	0,09		
C	1,0		
D	0,08		
E	0,11		

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Priprava kulture kefirnih zrnaca

Starter kultura kefirnih zrnaca pripravljena je zajedno s „majčinskom hranjivom podlogom“ u kravljem mlijeku. Aktivacija kefirnih zrnaca provedena je pri 28 °C u termostatu. 20 g kefirnih zrnaca dodano je u 100 mL steriliziranog kravljeg mlijeka, a nakon 24 sata uzgoja zrnca su isprana sterilnom destiliranom vodom i ponovno naciepljena u 100 mL sterilnog mlijeka. Ovaj je postupak proveden tri puta prije naciepljivanja u različite vrste biljnih napitaka.



**Slika 6.** Matična kultura kefirnih zrnaca nakon 5 dana uzgoja u kravljem mlijeku (2.5 % m.m.)

### 3.2. Uporabljene vrste napitaka

Uzgojena kefirna zrnca naciepljena su na 3 vrste napitaka:

- **kozje mlijeko** – 'z bregov, Vindija, Varaždin, Hrvatska
- **pir** – dmBio, dm-drogerie markt GmbH + Co. KG., Karlsruhe, Njemačka
- **soja s okusom vanilije** – dmBio, dm-drogerie markt GmbH + Co. KG., Karlsruhe, Njemačka

#### 3.2.1. Kemijski sastav uporabljenih vrsta napitaka

##### 3.2.1.1. Kozje mlijeko

Sastojci: kozje mlijeko s 2,8 % mliječne masti, stabilizator E339.

### 3.2.1.2. Pir

Sastojci: voda, pir punog zrna (11 %), ulje suncokreta, morska kuhinjska sol.

### 3.2.1.3. Soja s okusom vanilije

Sastojci: voda, soja (7 %), djelomično rafinirani šećer šećerne trske, ekstrakt burbon vanilije, morska sol.

## 3.2.2. Nutritivni sastav uporabljenih vrsta napitaka

Nutritivni sastav uporabljenih vrsta napitaka prikazan je u Tablici 4.

**Tablica 4.** Nutritivni sastav napitaka uporabljenih u istraživanju (100 mL)

Sastojak	Kozje	Pir	Soja s vanilijom
ugljikohidrati	4,5 g	6,2 g	6,8 g
od toga šećeri	4,5 g	5,7 g	5,8 g
masti	2,8 g	1,5 g	1,7 g
od toga zasićene	1,9 g	0,2 g	0,4 g
od toga mononezasićene	-	-	-
od toga polinezasićene	-	-	-
proteini	2,8 g	0,8 g	2,9 g
kalcij	120 mg	-	-
vlakna	-	0,4 g	0,2 g
sol	0,1 g	0,13 g	0,11 g

## 3.3. Priprava uzoraka

Tri vrste napitaka (500 mL) nacijepljeno je s 12,5 g svježe uzgojene kulture kefirnih zrnaca (5 % tež/vol) i inkubirano pri 28 °C u termostatu tijekom 14 dana. Svaka tri dana uzorci su procijeđeni kroz cjedilo s plastičnom mrežicom, a kefirna zrnca precijepljena u svježih 500 mL mlijeka. Kontrolni uzorci bila su mlijeka uporabljena u istraživanju.

### 3.4. Određivanje prinosa biomase kefirnih zrnaca i mase kefira

Masa kefira zajedno s biomasom kefirnih zrnaca mjerena je svaki dan vaganjem Erlenmeyer tikvice (prije i nakon dodavanja 500 mL napitka) u kojem je proveden uzgoj kefirnih zrnaca, odnosno kefira.

#### 3.4.1. Određivanje prinosa biomase kefirnih zrnaca

Prinos biomase kefirnih zrnaca ( $Y_{kz}$ ) određen je mjerenjem mase kefirnih zrnaca tijekom uzgoja (svaka 24 h). Kefirna zrnca su procijedena iz kefira, isprana sterilnom destiliranom vodom i osušena pomoću filter papira. Nakon toga je biomasa izvagana i dobiveni rezultati uvršteni su u sljedeću jednadžbu:

$$Y_{kz} (\%) = [(X_{n+1} - X_n) / X_n] \cdot 100$$

gdje je:

$Y_{kz}$  = prinos biomase kefirnih zrnaca (g)

$X_{n+1}$  = masa biomase nakon 24 h uzgoja (g)

$X_n$  = početna masa biomase (inokulum) (g)

#### 3.4.2. Određivanje prinosa mase kefira

Prinos mase ( $Y_{mk}$ ) kefira izračunat je prema jednadžbi:

$$Y_{mk} (\%) = [(m_t - m_0) / m_k] \cdot 100$$

gdje je:

$Y_{mk}$  = prinos mase kefira (g)

$m_k$  = masa kefira nakon 24 h uzgoja (g)

$m_0$  = početna masa napitaka (g)



### 3.5. Određivanje pH vrijednosti kefir

Prije, tijekom i na kraju uzgoja kefirima je određivana pH vrijednost pomoću pH-metra Hanna Industrials model HI 98103.

### 3.6. Određivanje koncentracije mliječne kiseline u kefiru

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 mL uzorka kefir i dodano je nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak titiran 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:

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

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)

### 3.7. Određivanje koncentracije glukonske kiseline u kefiru

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

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

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)

### 3.8. Određivanje koncentracije octene kiseline u kefiru

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

$$\gamma(\text{CH}_3\text{COOH}) = V(\text{NaOH}) \cdot f(\text{NaOH}) \cdot V(\text{uzorka}) \cdot 6,7$$

gdje je:

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

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

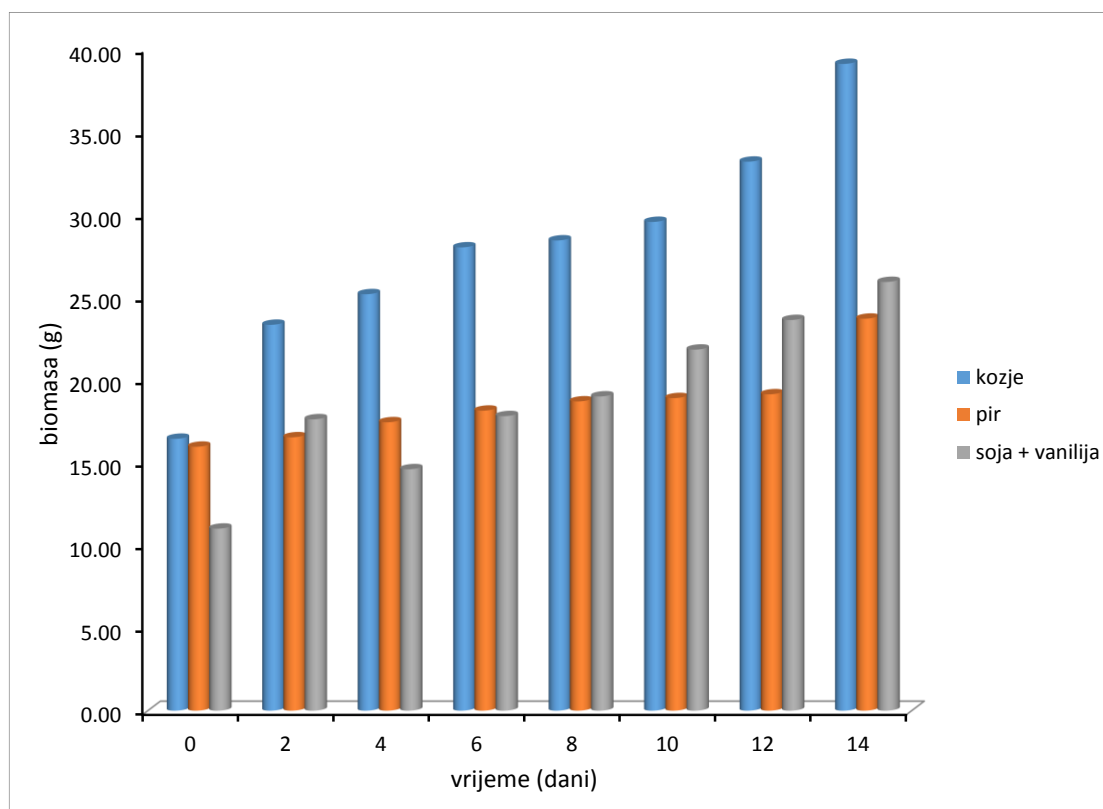
$V(\text{uzorka})$  = volumen uzorka (mL)

## **4. REZULTATI**

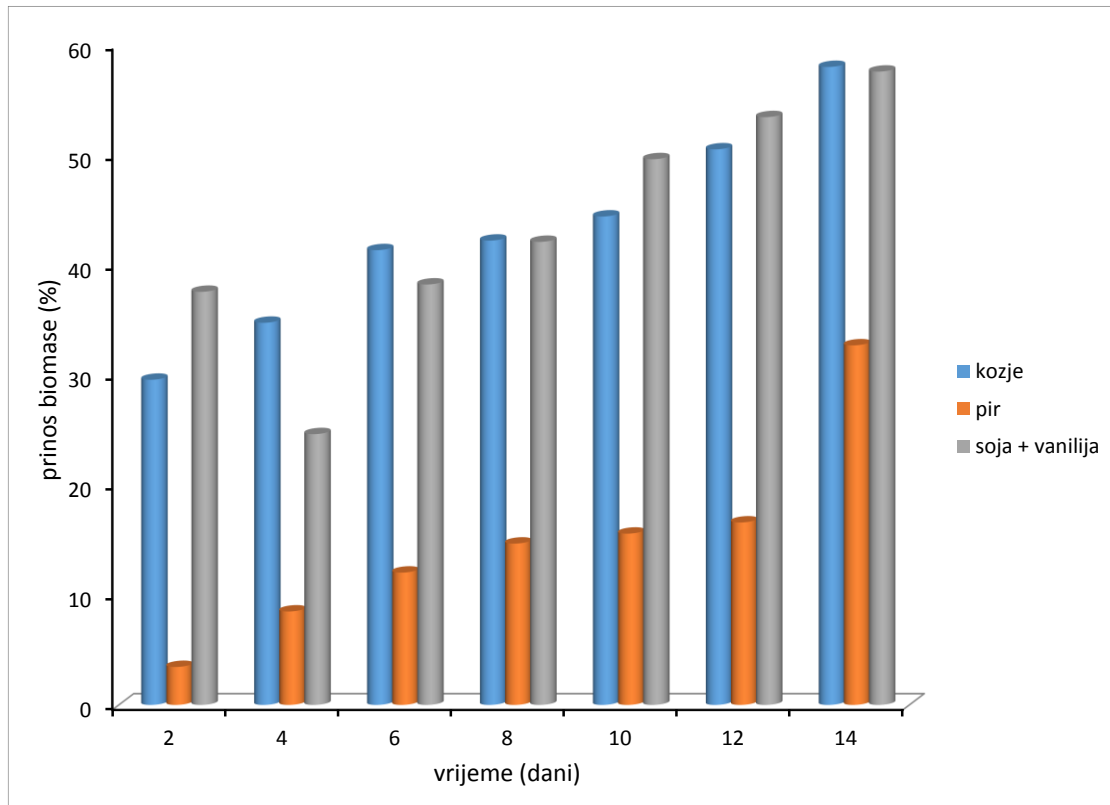
Tijekom posljednjeg desetljeća povećana je popularnost kefirā kao funkcionalnog fermentiranog mliječnog proizvoda, s obzirom na njegove pozitivne učinke na zdravlje (Guzel-Seydim i sur., 2011). Kefir je osvježavajući, prirodno pjenušavi mliječni proizvod, blago kiselog i okusa po kvascu te kremaste konzistencije (Powell i sur., 2007). Tradicionalno se dobiva fermentacijom mlijeka pomoću združene kulture bakterija i kvasaca. U ovom je radu ispitan uzgoj kefirnih zrnaca u tri različite vrste mlijeka: kozjem, životinjskog porijekla i dvije vrste biljnih mlijeka – pirovom i sojinom s dodatkom vanilije.

Tijekom 14 dana fermentacije masa biomase kefirnih zrnaca mijenjala se ovisno o vrsti mlijeka (Slika 7). Kao što je vidljivo na Slici 8, najveći je prinos biomase izmjeren uzgojem u kozjem, zatim u sojinom s dodatkom vanilije, a pirovo mlijeko bilo je najmanje pogodno za uzgoj i prinos biomase kefirnih zrnaca.

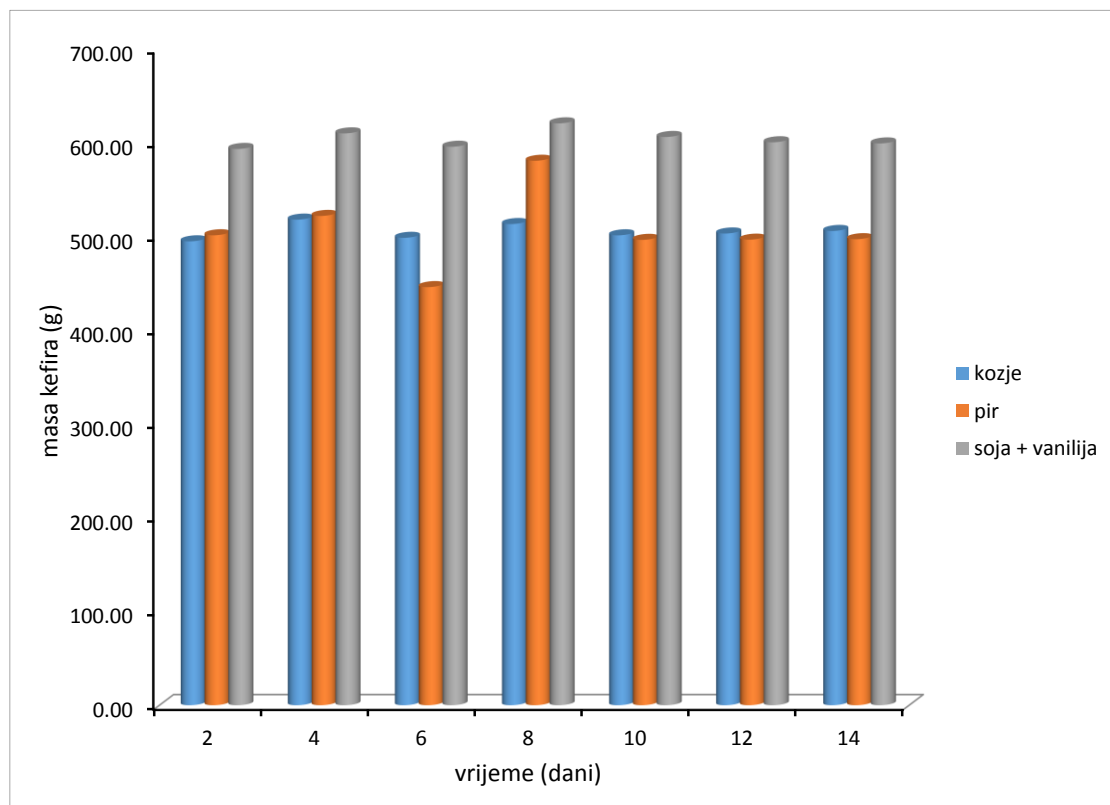
Najveći prinos mase kefirā uočen je i izmjeren u uzorcima sojinog mlijeka s vanilijom (Slika 9), dok je najujednačenija masa kefirā dobivena fermentacijom kozjeg mlijeka, uz izrazito ujednačenu teksturu kefirā.



**Slika 7.** Masa biomase kefirnih zrnaca tijekom 14 dana uzgoja u različitim vrstama mlijeka

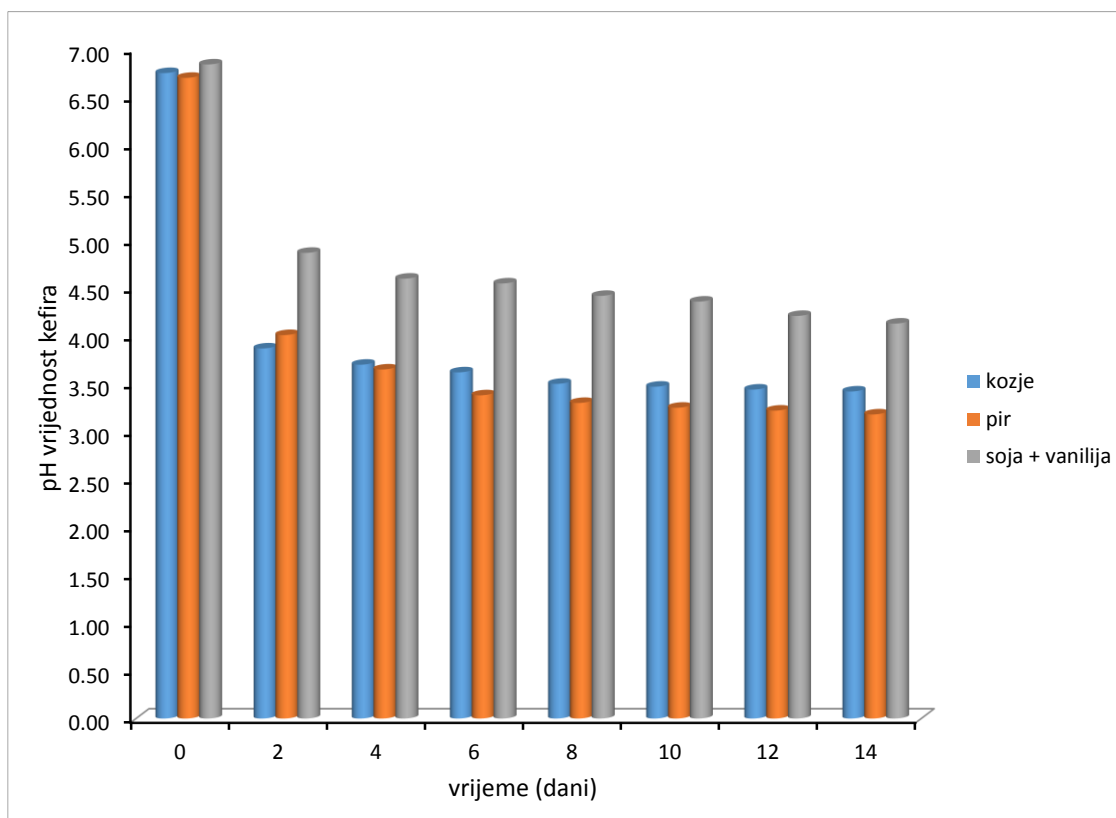


**Slika 8.** Prinos biomase kefirnih zrnaca tijekom 14 dana uzgoja u različitim vrstama mlijeka



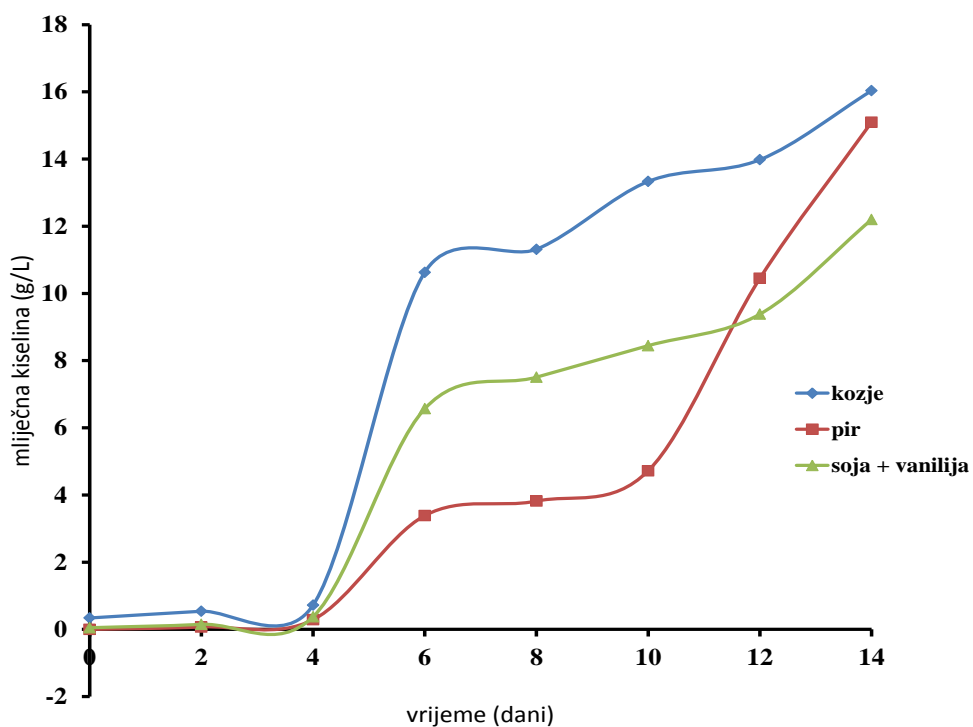
**Slika 9.** Prinos mase kefira tijekom 14 dana uzgoja u različitim vrstama mlijeka

Nakon inokuliranja kefirnih zrnaca u mlijeko ili napitak, započinje fermentacija, pri čemu dolazi do sinteze organskih kiselina, a samim time i snižavanja pH vrijednosti kefira (Slika 10). U ovom su radu određivane promjene koncentracija mliječne, glukonske i octene kiseline tijekom 14 dana proizvodnje kefira (Slike 11, 12 i 13).

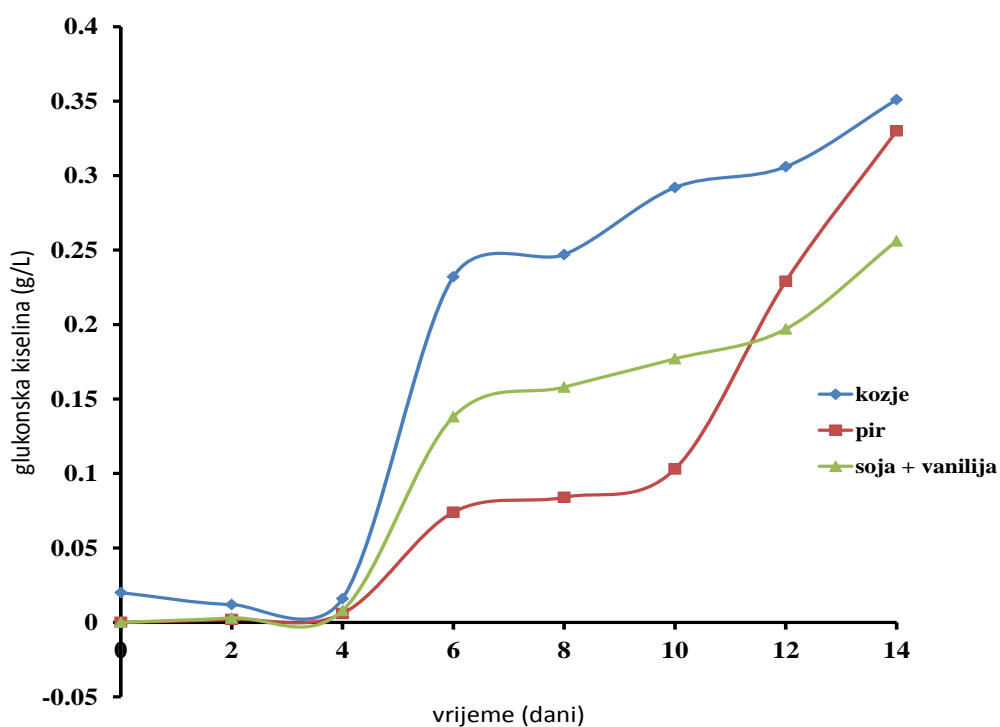


**Slika 10.** Promjena pH vrijednosti kefira tijekom 14 dana uzgoja u različitim vrstama mlijeka

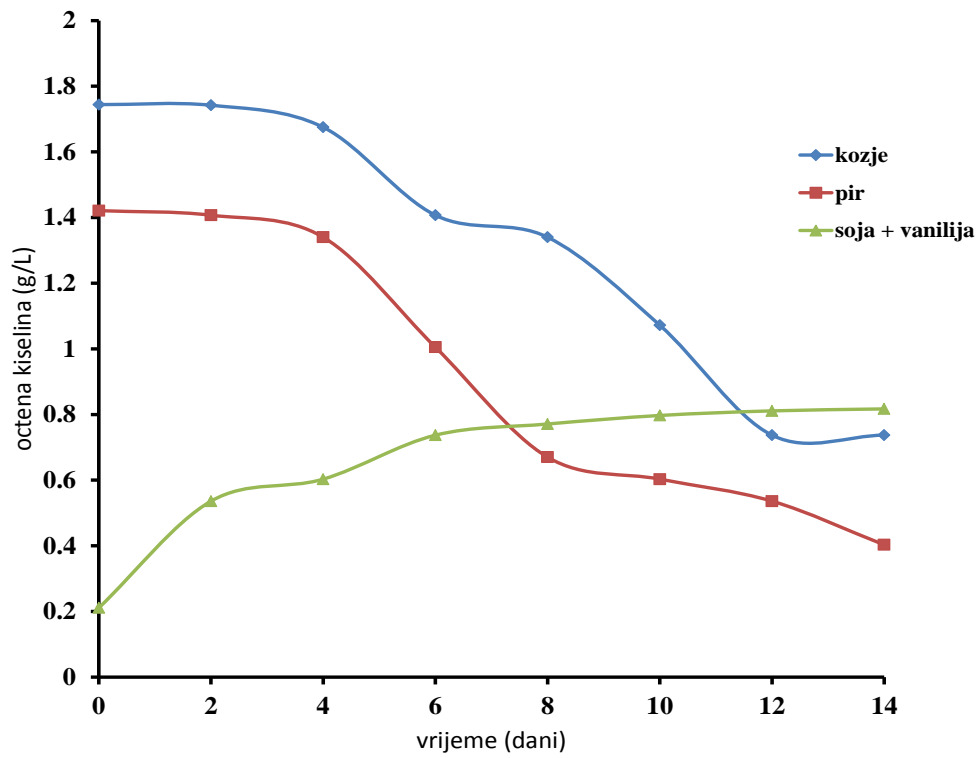
Kao što je i očekivano, kako se pH vrijednost uzoraka smanjivala, tako je rasla koncentracija mliječne, glukonske i octene kiseline (Slike 11, 12 i 13). U svim ispitivanim uzorcima uočena je najveća koncentracija mliječne kiseline (Slika 11), dok je koncentracija glukonske kiseline bile zamjetno niža, no vidljiva je linija porasta tijekom fermentacije (Slika 12). Koncentracija octene kiseline u uzorcima kozjeg mlijeka i pira tijekom fermentacije se značajno smanjivala, za razliku od sojinog mlijeka s dodatkom vanilije, gdje se, u prvih 6 dana povećavala, a nakon toga ustalila (Slika 13).



**Slika 11.** Promjena koncentracije mliječne kiseline u kefiru tijekom 14 dana uzgoja u različitim vrstama mlijeka



**Slika 12.** Promjena koncentracije glukonske kiseline u kefiru tijekom 14 dana uzgoja u različitim vrstama mlijeka



**Slika 13.** Promjena koncentracije octene kiseline u kefiru tijekom 14 dana uzgoja u različitim vrstama mlijeka



## **5. RASPRAVA**

Kefir je specifični mliječni proizvod te pripada skupini fermentiranih mlijeka u kojima je laktoza tijekom fermentacije hidrolizirana simultanim djelovanjem združene kulture bakterija i kvasaca u kefirnim zrnima. Mliječna kiselina je glavni metabolit, ali zbog kvaščeve aktivnosti kefir sadrži značajan udjel CO<sub>2</sub> te, ovisno o starter kulturi, različite udjele alkohola. Kao rezultat rasta mikroorganizama, tijekom fermentacije sintetiziraju se i druge organske kiseline, bioaktivni peptidi, egzopolisaharidi i bakteriocini koji imaju probiotički učinak na ljudsko zdravlje (Lopitz-Otsoa i sur., 2006; Hong i sur., 2010).

U ovom radu ispitivan je uzgoj kefirnih zrnaca u tri različite vrste mlijeka: kozjem, životinjskog porijekla i dvije vrste biljnih mlijeka – pirovom i sojinom s dodatkom vanilije. Do sada je, osim u mlijeku životinjskog podrijetla, zabilježeno samo jedno istraživanje u sojinom mlijeku (Öner i sur., 2003), no nikad u mlijeku od pira. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je podjednaki prinos biomase postignut uzgojem u kozjem (58 %) i sojinom (57,5 %), dok je nešto manji prinos postignut u pirovom mlijeku (32,7 %) (Slika 9).

Sastav kefira nije uvijek isti i do sada još nije u potpunosti objašnjen. Kemijska, organoleptička i teksturna svojstva kefira ovise o porijeklu i izvoru kultura kefirnih zrnaca koje se koriste u fermentaciji, sastavu i porijeklu mlijeka ili napitaka od kojih se želi proizvesti kefir te uvjetima fermentacije (Otles i Cagindi, 2003).

Pad pH vrijednosti započinje fermentacijom i sintezom organskih kiselina, no nastajanje organskih kiselina nije jedini razlog smanjenja pH vrijednosti kefira. Postoji pH gradijent između kefirnih zrnaca i fermentacijske podloge. Kefirna zrnca su prirodno kisela te se njihovom inokulacijom smanjuje pH vrijednost hranjive podloge. Sva tri mlijeka imala su prije inokulacije približno jednaku početnu pH vrijednost, oko 6,75. Nakon 14 dana fermentacije, najveći pad pH vrijednosti kefira uočen je kod pira (3,18), a najmanji kod soje s vanilijom, gdje je konačna pH vrijednost bila 4,13. U uzorcima s kozjim mlijekom izmjeren je najveći pad pH vrijednosti već nakon 24 sata uzgoja (sa 6,75 na 3,87) (Slika 10). Dobivene rezultate nije moguće usporediti s literaturnim podacima osim ako se radi o kozjem mlijeku, gdje su rezultati usporedivi s onima istraživanja Garcia Fontan i sur. (2006). Prema njima, pri toj pH vrijednosti okus gotovog proizvoda je ujednačen s obzirom na hlapive kiseline, što nije zabilježeno kod drugih pH vrijednosti.

Kao što je i očekivano, kako se pH vrijednost uzoraka smanjivala, tako je rasla koncentracija organskih kiselina, odnosno ispitivane mliječne, glukonske i octene kiseline (Slike 11, 12 i 13). Nastajanje mliječne kiseline rezultat je metabolizma bakterija mliječne kiseline i vrlo je značajna zbog svog inhibicijskog djelovanja na patogene mikroorganizme i vrste koje izazivaju kvarenje kefira (Magalhães i sur., 2011). U svim ispitivanim uzorcima

uočena je najveća koncentracija mliječne kiseline, dok su koncentracije glukonske i octene kiseline bile niže (Slike 12 i 13). Tijekom 14-dnevne fermentacije na kozjem mlijeku, koncentracija mliječne kiseline porasla je s 0,34 g/L u početnom uzorku do 16 g/L na kraju (Slika 11). Slične rezultate su postigli i Magalhães i sur. (2011) na kravljem mlijeku, u kojem je koncentracija mliječne kiseline porasla s 1,4 na 17,4 g/L. U dvije vrste biljnog mlijeka, pirovom i sojinom s okusom vanilije, izmjerene su nešto niže konačne koncentracije mliječne kiseline: u pirovom 15 g/L, a u sojinom 12,2 g/L (Slika 11). U svim vrstama mlijeka izmjerena je podjednako niska koncentracija glukonske kiseline, oko 0,3 g/L na kraju fermentacije (Slika 12). Prosječna koncentracija octene kiseline u prvih 24 h uzgoja u kozjem i pirovom mlijeku bila je 1,5 g/L, ali je do kraja fermentacije pala na 0,7, odnosno 0,4 g/L. Potpuno suprotno, koncentracija octene kiseline u sojinom mlijeku s okusom vanilije tijekom fermentacije porasla je s početnih 0,2 g/L na 0,8 g/L (Slika 13).

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazali su da se tradicionalni način proizvodnje kefira može provesti i na mlijeku biljnog porijekla, a ne samo životinjskom kako je uobičajeno.

## **6. ZAKLJUČCI**

### **Iz dobivenih rezultata proizlaze sljedeći zaključci:**

1. Kefir je probiotički napitak dobiven fermentacijom mlijeka pomoću kefirnih zrnaca, odnosno združene kulture bakterija mliječne kiseline i kvasaca.
2. Proučavana je fermentacija kozjeg, pirovog i sojinog mlijeka s dodatkom vanilije tijekom 14 dana s „domaćom“ kulturom kefirnih zrnaca pri 28 °C.
3. Prinos biomase kefirnih zrnaca nakon 14 dana fermentacije bio je podjednak u kozjem (58 %) i sojinom mlijeku s dodatkom vanilije (57,5 %), dok je prinos u pirovom mlijeku iznosio samo 32,7 %.
4. U svim je uzorcima tijekom fermentacije pad pH vrijednosti kefira bio u korelaciji s povećanjem koncentracija mliječne, glukonske i octene kiseline.

## **7. LITERATURA**

Abraham, A. G., de Antoni, G. L. (1999) Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soy milk. *J. Dairy Res.* **66**, 327 – 333.

Altay, F., Karbancıoğlu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., Heperkan, D. (2013) A review on traditional Turkish fermented nonalcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *Int. J. Food Microbiol.* **167**, 44 – 56.

Assadi, M. M., Pourahmad, R., Moazami, N. (2000) Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World J. Microbiol. Biotech.* **16**, 541 – 543.

Cheirsilp, B., Shimizu, H., Shioya, S. (2003) Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotech.* **100**, 43 – 53.

Farnworth, E. R. (2005) Kefir – a complex probiotic. *Food Sci. Techn. Bull.: Functional Foods.* **2**, 1 – 17.

Furukawa, N., Matsuoka, A., Takahashi, T., Yamanaka, Y. (1990) Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **43**, 450 – 453.

Furukawa, N., Matsuoka, A., Takahashi, T., Yamanaka, Y. (1991) Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival in mice bearing Meth-A. *J. Anim. Sci. Techn.* **62**, 579 – 585.

Furukawa, N., Matsuoka, A., Takahashi, T., Yamanaka, Y. (2000) Anti-metastatic effect of kefir grain components on Lewis lung carcinoma and highly metastatic B16 melanoma in mice. *J. Agric. Sci. Tokyo.* **45**, 62 – 70.

Garcia Fontan, M. C., Martinez, S., Franco, I., Carballo, J. (2006) Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *Int. Dairy J.* **16**, 762 – 767.

Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes release 5.0. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. izd., Springer, New York

Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. (2000) Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *J. Food Protect.* **63**, 364 – 369.

Guzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T., Greene, A. K., Seydim, A. C. (2011) Review: Functional properties of kefir. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 261 – 268.

Halle, C., Leroi, F., Dousset, X., Pidoux, M. (1994) Les kefirs: des associations bacteries lactiques- levures. U: Bacteries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques, 2. izd. (de Roissart, H., Luquet, F.M., ured.), Lorica, Uriage, str. 169 – 182.

Hertzler, S. R., Clancy, S. M. (2003) Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J. Am. Diet. Assoc.* **103**, 582 – 587.

Hong, W. S., Chen, Y. P., Chen, M. J. (2010): The antiallergic effect of kefir lactobacilli. *J. Food Sci.* **75**, 244 – 253.

Irigoyen, A., Ortigosa, M., Torre, P., Ibanez, F. C. (2003) Influence of different technological parameters in the evolution of pH during fermentation of kefir. *Milchwissenschaft.* **58**, 631 – 633.

Kesekas, H., Yerlikaya, O., Ozer, E. A. (2013) Functional milk beverage: Kefir. *Agro Food Ind. Hi Tech.* **24**, 53 – 55.

Koroleva, N. S. (1988) Technology of kefir and kumys. *IDF Bull.* **227**, 96 – 100.

Kwon, C. S., Park, M. Y., Cho, J. S., Choi, S. T., Chang, D. S. (2003) Identification of effective microorganisms from kefir fermented milk. *Food Sci. Biotech.* **12**, 476 – 479.

Liu, J. R., Wang, S. Y., Chen, M. J., Chen, H. L., Yueh, P. Y., Lin, C. W. (2006) Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *Br. J. Nutr.* **95**, 939 – 946.

Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., Garaizar, J. (2006) Kefir: A symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev. Iberoam. Micol.* **23**, 67 – 74.



- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., Kitamura, S. (2004) Effects of an exopolysaccharide (Kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors*. **22**, 197 – 200.
- Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K., Kitamura, K. (2004) Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5533 – 5538.
- Magalhães, K. T., de Melo Pereira, G. V., Campos, C. R., Dragone, G., Schwan, R. F. (2011) Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Braz. J. Microbiol.* **42**, 693 – 702.
- Marquina, D., Santos, A., Corpas, I., Muñoz, J., Zazo, J., Peinado, J. M. (2002) Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 136 – 140.
- Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J., Schreizeimer, J. (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 430S – 436S.
- Matsuo, M., Shichijo, K., Okaichi, K., Wen, C. Y., Fukuda, E., Nakashima, M., Nakayama, T., Shirahata, S., Tokumaru, S., Sekine, I. (2003) The protective effect of fermented milk kefir on radiation-induced apoptosis in colonic crypt cells of rats. *J. Radiat. Res.* **44**, 111 – 115.
- Narvhus, J. A., Gadaga, T. H. (2003) The role of interaction between yeast and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 51 – 60.
- Neve, H., Heller, K. J. (2002) The microflora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. **54**, 337 – 349.
- Odet, G. (1995) Fermented milks. *IDF Bull.* **300**, 98 – 100.
- Otles, S., Cagindi, O. (2003) Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pak. J. Nutr.* **2**, 54 – 59.
- Öner, Z., Karahan, A. G., Çakmakçı, M. L. (2010) Effects of different milk types and starter cultures on kefir. *Gıda*. **35**, 177 – 182.

Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. (2007) Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *Int. Dairy J.* **17**, 190 – 198.

Roberts, M., Yarunin, S. (2000) Danone moves into Russian kefir market. *New. Nutr. Business.* **6**, 22 – 24.

Saloff-Coste, C. J. (1996) Kefir. *Danone World Newsletter* No. 11.

Tamai, Y., Yoshimitsu, N., Watanabe, Y., Kuwabara, Y., Nagai, S. (1996) Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 181 – 182.

Taniguchi, M., Tanaka, T. (2004) Clarification of interaction among microorganisms and development of co-culture system for production of useful substances. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* **90**, 35 – 62.

Wójtowski, J., Danków, R., Skrzypek, R., Fahr, R. D. (2003) The fatty acid profile in kefir from sheep, goat and cow milk. *Milchwissenschaft.* **58**, 633 – 636.

Wyder, M. T. (1998) Identification and characterization of the yeast flora in kefir and smear ripened cheese: Contribution of selected yeast to cheese ripening. PhD Thesis, ETH, Zurich, Switzerland.

Wyder, M. T., Meile, L., Teuber, M. (1999) Description of *Saccharomyces turicensis* sp. nov., a new species from kefir. *Syst. Appl. Microbiol.* **3**, 420 – 425.

Zacconi, C., Parisi, M.G., Sarra, P.G., Dallavalle, P., Bottazzi, V. (1995) Competitive exclusion of *Salmonella Kedougou* in kefir fed chicks. *Microbiol. Aliments Nutr.* **12**, 387 – 390.

Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R., Bocci, J. (2001) Effects of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutr. Res.* **21**, 569 – 579.