

Antimikrobna aktivnost, antioksidacijski kapacitet i nastajanje organskih kiselina nastalih tijekom fermentacije voćnog napitka fermentiranog pomoću kefirnih zrnaca

Besednik, Ana

Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:140838>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2019.

Ana Besednik
1151/BPI

**ANTIMIKROBNA AKTIVNOST,
ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET
I NASTAJANJE ORGANSKIH
KISELINA VOĆNOG NAPITKA
FERMENTIRANOG POMOĆU
KEFIRNIH ZRNACA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sunčici Beluhan na ukazanom povjerenju, stručnim savjetima, znanju, iskustvu i pomoći pri izradi ovog rada. Najveće hvala mojim roditeljima i sestri na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom cijelog studija. Također hvala mojim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST, ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET I NASTAJANJE ORGANSKIH KISELINA NASTALIH TIJEKOM FERMENTACIJE VOĆNOG NAPITKA FERMENTIRANOG POMOĆU KEFIRNIH ZRNACA

Ana Besednik, 1151/BPI

Sažetak: Vodeni kefir je blago kiseli, nisko alkoholni fermentirani napitak, čija fermentacija započinje dodatkom vodenih kefirnih zrnaca. S visokim koncentracijama šećera i malim udjelom aminokiselina, vodeni kefir predstavlja kompleksnu hranjivu podlogu. U ovom radu, proces fermentacije vodenog kefira proveden je tijekom 14 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 6 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 3,80 na 3,52. Antimikrobna aktivnost je testirana na bakterijama vrste *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, te kvascu vrste *Candida albicans*. Uočena je izvrsna antimikrobna aktivnost na bakterije i kvasac, no ne i na bakteriju vrste *S. aureus*. Za dokazivanje antioksidacijskog kapaciteta fermentiranog napitka provedena su tri određivanja: redukcijska snaga, sposobnost vezanja radikala i uspješnost keliranja iona željeza. Svi uzorci pokazali su izvrstan antioksidacijski kapacitet. Rezultatima ovog istraživanja je potvrđeno da je dobiven voćni napitak izvrstan izvor antioksidacijskih sastojaka.

Ključne riječi: vodeni kefir, organske kiseline, antimikrobna aktivnost, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 52 stranice, 22 slike, 4 tablice, 92 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan
3. Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek
4. Prof. dr. sc. Ksenija Markov (zamjena)

Datum obrane: 27. studenog, 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ANTIMICROBIAL ACTIVITY, ANTIOXIDANT CAPACITY AND ORGANIC ACID SYNTHESIS OF FRIUT DRINK FERMENTED BY KEFIR GRAINS

Ana Besednik, 1151/BPI

Abstract: Water kefir is a mildly sour, low alcoholic fermented beverage, of which the fermentation is started with water kefir grains. With its high sugar content and low amino acid concentration, water kefir as medium represents a demanding habitat. In this work, a water kefir fermentation process was followed during 14 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 of substrate consumption and metabolite production. The major substrate, sucrose, was completely converted after 6 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 3.80 to 3.52. The antimicrobial activity was tested against bacteria *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, as well as yeast *Candida albicans*. Antimicrobial activities were observed in the fermented samples against the investigated bacteria strains and *C. albicans* but *S. aureus* was not inhibited. To determine the antioxidant capacity of the fermented beverage, three determinations were made: reducing power, the radical scavenging ability, and the chelation efficiency of iron ions. All the samples showed excellent antioxidant capacity. The results of this study confirmed that the fruit drink obtained is an excellent source of antioxidant ingredients.

Keywords: *Water kefir, Organic acids, Antimicrobial activity, Antioxidant capacity*

Thesis contains: 52 pages, 22 figures, 4 tables, 92 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD *Sunčica Beluhan*, Associate professor

Reviewers:

1. PhD *Blaženka Kos*, Full professor
2. PhD *Sunčica Beluhan*, Associate professor
3. PhD *Mirela Ivančić Šantek*, Full professor
4. PhD *Ksenija Markov*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 27th November, 2019

1.UVOD.....	1
2.TEORIJSKI DIO	3
2.1. Kefirna zrnca	3
2.2. Mikrobiološki aspekt	4
2.3. Raspodjela mikroorganizama u zrcima kefiru	5
2.3.1. Bakterijske kulture kefiru	7
2.3.2. Kefirni kvasci	9
2.4. Interakcije između mikroorganizama u kefiru	9
2.4.1. Tehnološki aspekti	10
2.5. Proizvodnja kefiru	10
2.6. Terapijski aspekti	12
2.6.1. Antimikrobna aktivnost	13
2.6.2. Utjecaj na gastrointestinalni trakt (GIT)	13
2.6.3. Antikarcinogeni učinci.....	14
2.6.4. Stimulacija imunološkog sustava.....	14
2.6.5. Hipokolesterolemijski učinak	15
2.6.6. Netolerancija na kefir i laktozu	15
2.7. Egzopolisaharidi (EPS)	16
3.EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. Tijek istraživanja	18
3.2. Materijali i metode rada.....	19
3.2.1. Priprava kulture vodenih kefirnih zrnaca	19
3.2.2. Hranjiva podloga za uzgoj kulture	19
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti.....	20
3.2.4. Određivanje koncentracije octene kiseline.....	20
3.2.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline.....	20
3.2.6. Određivanje koncentracije mliječne kiseline	21
3.2.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom	21
3.2.8. Izračunavanje mase i prinosa vodenih kefirnih zrnaca.....	22
3.2.9. FT-IR spektroskopija.....	23
3.2.10. Pretražna elektronska mikroskopija (eng. Scanning Electron Microscopy; SEM).....	23
3.2.11. Određivanje antimikrobne aktivnosti.....	23
3.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	24
3.3.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	24
3.3.2. Određivanje reducirajuće snage	24
3.3.3. Sposobnost keliranja iona željeza	25
4.REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. Promjena pH vrijednosti.....	26
4.2. Promjena koncentracija organskih kiselina i etanola	27
4.3. Određivanje prinosa vodenih kefirnih zrnaca	32
4.4. Antimikrobna aktivnost	33
4.5. FT-IR.....	37
4.6. Morfologija površine vodenih kefirnih zrnaca	38
4.6.1. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)	38
4.7. Antioksidacijski kapacitet fermentiranog napitka.....	39
4.7.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	39
4.7.2. Reducirajuća snaga	40
4.7.3. Sposobnost keliranja iona željeza	41
5.ZAKLJUČCI.....	43
6. LITERATURA.....	44

1.UVOD

Vodeni kefir je napitak pripremljen djelovanjem simbiotske mikrobiološke zajednice bakterija (bakterije mliječne i octene kiseline) i kvasaca (Franzetti i sur., 1998; Neve i Heller, 2002; Pidoux i sur., 1988), ugrađene u vodena kefirna zrnca. Proizvodi se iz vodene otopine saharoze u koju je dodano suho ili svježe voće, voćni sok ili kokosova voda nacijepljene zrnima, a fermentacija traje 10-33 dana pri sobnoj temperaturi (Stadie, 2013). Tako dobiven napitak je gorko-kiseo, ovisno o dodanom voću i pjenušav s blagim udjelom alkohola. Općenito, kefirna zrna sadrže relativno stabilnu i specifičnu mikrobiotu zatvorenu u matrici od polisaharida i proteina. Specifične populacije pojedinih zrna doprinose određenim osjetilnim karakteristikama prisutnim u fermentiranim pićima.

Kefir je tradicionalni primjer suživota bakterija i kvasaca, a važnost ove simbiotske veze čini se jasnom jer je potrebno proizvesti spojeve korisne za zdravlje. Iako dokazi nisu konačni i trebalo bi provesti daljnje studije, postojeće znanstvene studije pokazuju zdravstvene koristi koje su empirijski dokazane povijesnom konzumacijom kefira. Trenutno se primjena probiotika u prehrambenoj industriji širi, a i razumijevanje simbiotskih odnosa različitih mikroorganizama prisutnih u hrani, kao i njihovih interakcija, koja bi mogla pomoći poboljšanju tehnoloških procesa. Na kvalitetu tradicionalnog kefira uglavnom utječu mikroorganizmi prisutni u zrnima kefira i uvjeti prerade kefira. Iako su znanstvenici i prehrambene tvrtke u iskušenju da razviju komercijalni napitak tipa "kefir" proizveden od različitih kultura mezofilnih i termofilnih bakterija mliječne kiseline (BMK), ili čak čistih kultura izoliranih iz kefirnih zrna, njihov uspjeh u usporedbi s tradicionalnim kefirom je ograničen. Ograničenje zbog mikrobne raznolikosti prisutne u kefirnim zrnima i njihove interakcije, mogu odrediti probiotička i terapijska svojstva konačnog proizvoda. S industrijskog stajališta, ta su kretanja dobrodošla, s obzirom na nedostatak standardizacije u proizvodnji i stavljanju na tržište tradicionalnog kefira. U posljednje vrijeme se intenzivno istražuju kemijski i strukturni sastav polisaharida vodenih kemijskih zrnaca.

U ovom radu istraživana je biotransformacija združene kulture bakterija octene i mliječne kiseline te kvasaca tijekom 14 dana uzgoja u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica kao kompleksnoj podlozi. Glavni izvor ugljika bila je saharoza dodana u različitim koncentracijama (30, 50, 70, 90 i 110 g/L). Tijekom fermentacije, provedene pomoću vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica, praćeni su i određivani sljedeći parametri:

- utjecaj tijeka fermentacije na prinos biomase vodenih kefirnih zrnaca
- promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije
- promjena koncentracije octene, glukonske i mliječne kiseline te etanola u aerobnim uvjetima uzgoja tijekom 14 dana
- kinetika sinteze vodenih kefirnih zrnaca
- antimikrobna aktivnost fermentiranog napitka
- antioksidacijski kapacitet fermentiranog napitka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kefirna zrnca

Kefirna zrnca igraju ulogu prirodne starter kulture tijekom proizvodnje kefira i obnavljaju se nakon procesa fermentacije procjeđivanjem mlijeka (Ratray i O'Connell, 2011). Ta zrnca se sastoje od mikroorganizama koji su imobilizirani na polisaharidnom i proteinskom nosaču, gdje nekoliko vrsta bakterija i kvasca čine simbiotsku zajednicu (Farnworth i Mainville, 2008; Garrote i sur., 2010). U ovom ekosustavu postoji relativno stabilna populacija mikroorganizama, koja utječe i na ostale članove te zajednice. Takva populacija omogućava sintezu bioaktivnih metabolita, koji su nužni za rast zrnca i inhibiciju mikroorganizama, koji su patogeni i kontaminiraju hranu (Garrote i sur., 2010). Kefirna zrnca razlikuju se u veličini, promjera su od 0,3 do 3,0 cm (slika 1), karakterizira ih nepravilna površina, objedinjena s jednim središnjim dijelom, a njihova boja varira od bijele do žućkasto bijele. Zrnca su elastična i imaju viskoznu i čvrstu teksturu (Farnworth i Mainville, 2008; Magalhães i sur., 2011; Rea i sur., 1996). Iako se kefirni napitak može pronaći u mnogim zemljama, u Hrvatskoj kefirna zrnca nisu službeno dostupna na tržištu, i daruju se od osobe do osobe.



Slika 1. Fotografija vodenih kefirnih zrnaca (Stadie, 2013).

2.2. Mikrobiološki aspekt

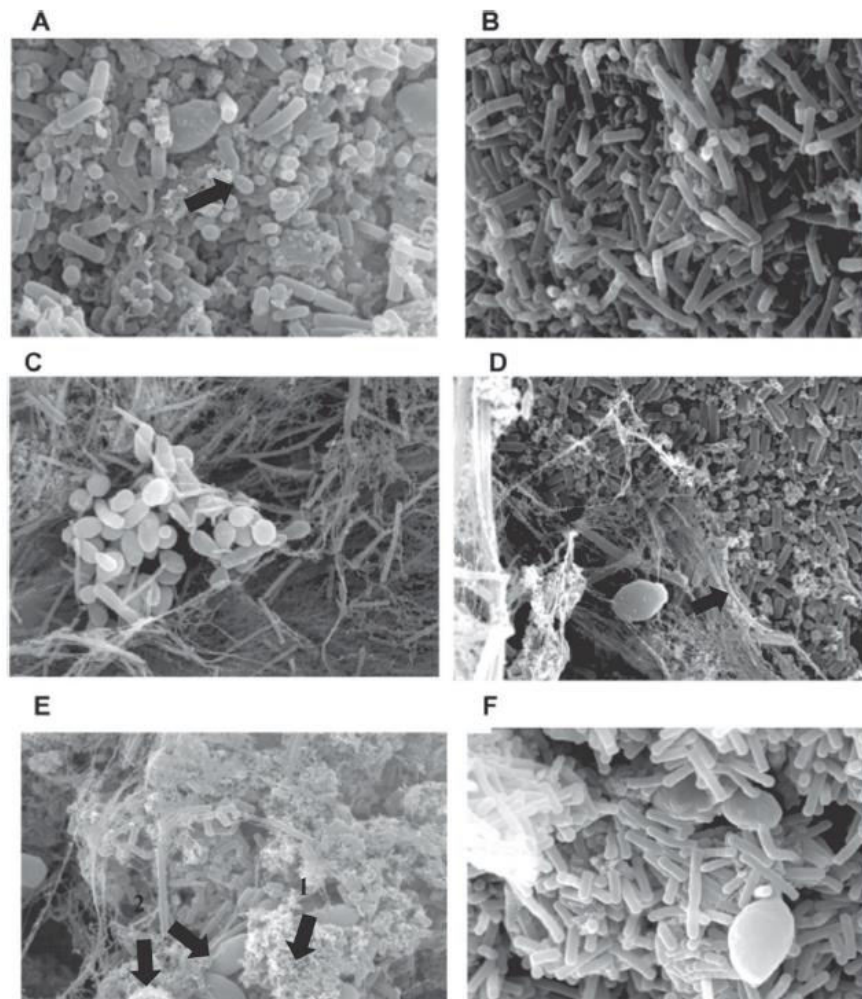
U kefiru su prisutne bakterije mliječne kiseline (BMK) koje su prvenstveno odgovorne za pretvorbu laktoze prisutne u mlijeku u mliječnu kiselinu, što rezultira smanjenjem pH i očuvanju mlijeka. Ostali mikrobnii sastojci kefira su kvasci koji fermentiraju laktozu i stvaraju etanol i CO₂. Također u procesu sudjeluju i kvasci koji ne fermentiraju laktozu te bakterije octene kiseline (Magalhães i sur., 2011; Rattray i O'Connel, 2011). Nakon fermentacije zrnca se poveća za oko 5-7% biomase. Za vrijeme rasta u mlijeku, udjeli mikroorganizama u zrnima razlikuju se od onih prisutnih u konačnom proizvodu (Rattray i O'Connel, 2011; Tamime, 2006). Ova razlika povezana je s uvjetima fermentacije kao što su trajanje fermentacije, temperatura, stupanj miješanja, vrsta mlijeka, omjer inokuluma/mlijeka i raspodjela mikroorganizama (Rattray i O'Connel, 2011; Simova i sur., 2002; Tamime, 2006). Klasične mikrobiološke metode koriste se za proučavanje mikrobiote kefira (Rea i sur., 1996; Simova i sur., 2002). Iako su ove metode korisne, u nekim slučajevima nisu dovoljno točne za prepoznavanje usko povezanih ili novih vrsta. Zbog mikrobioloških simbiotskih udruženja prisutnih u zrnima, rast i opstanak pojedinačnih vrsta mikroorganizama ovise o prisutnosti jednih o drugima. Često, kada su pojedinačno mikroorganizmi izolirani iz zrnca, ne rastu dobro u mlijeku i/ili pokazuju smanjenu biokemijsku aktivnost (Farnworth i Mainville, 2008). Stoga se koriste neovisne metode uzgoja kao dodatak konvencionalnim metodama u studiji mikrobiote zrnca kefira. Tehnika lančane reakcije polimeraze, povezana s elektroforezom u denaturirajućem gradijntnom gelu (PCR-DGGE), pokazala se prikladnom za analizu složenih mikrobniih udruženja (Jianzhong i sur., 2009; Leite i sur., 2012; Magalhães i sur., 2010a, 2010b), dok se za identifikaciju vrsta koristi parcijalno sekvenciranje gena za koji kodira 16S rRNA (Mainville i sur., 2006; Rattray i O'Connel, 2011). Međutim, neke studije pokazuju kako tehnika elektroforezom u denaturirajućem gradijntnom gelu (PCR-DGGE) ne dopušta otkrivanje značajnih promjena tijekom fermentacije kefira (Magalhães i sur., 2010a), vjerojatno zbog relativne nestabilnosti dominantne vrste mikroorganizama u ovoj zajednici. Složenost ove zajednice može se bolje razumjeti uvođenjem tehnika masovnog sekvenciranja, poput pirosekvenciranja. U dvije nedavne studije (Dobson i sur., 2011; Leite i sur., 2012) korištena je ova tehnika za procjenu mikrobne raznolikosti kefira i otkrivena prisutnost mikroorganizama koji pripadaju manjim skupinama, o kojima prethodno nije izviješteno. Nadalje, Leite i sur. (2012), uspoređujući tri vrste kefirna zrnca za koja se navodi da su sve vrste zrnaca različitog podrijetla, bakterije iz roda *Lactobacillus* su bile uvijek prisutne u svim zrnima. Autori su zaključili da manje i specifične populacije pojedinih zrnca mogu doprinijeti određenim

organoleptičkim karakteristikama prisutnim u fermentiranim pićima (Leite i sur., 2012). Neke vrste izolirane od kefirnih zrnca i napitaka od kefira nisu ključne vrste i obično se smatraju kontaminantima. Nedavno su gljive iz rodova *Dipodascus capitus* i *Trichosporon coremiiforme*, koje se smatraju patogenima, identificirane sekvenciranjem gena u kefirnim zrcima (Rattray i O'Connel, 2011). Opisana su i neka bakterijska onečišćenja, poput kontaminacija bakterijama roda *Pseudomonas* spp. (Dobson i sur., 2011; Jianzhong i sur., 2009; Leite i sur., 2012) te iz roda *Enterobacteriaceae* (Dobson i sur., 2011) i *Clostridiaceae* (Dobson i sur., 2011). Prisutnost ovih mikroorganizama može biti povezana s onečišćenjem tijekom rukovanja kefirnim zrcima ili nepravilnim postupcima tijekom pripreme kefirnog napitka.

2.3. Raspodjela mikroorganizama u zrcima kefira

Istraživanjem raspodjele mikroorganizama unutar kefirnih zrnca, dobiveni rezultati su bili kontroverzni. Skupina istraživača podupire hipotezu da se kvasci uglavnom nalaze u zoni unutarnjeg i srednjeg zrnca, zajedno sa štapićastim bakterijama iz roda *Lactobacillus* i rijetkim laktokokima na površini (Bottazzi i Bianchi, 1980; Lin i sur., 1999). Suprotno tome, drugi istraživači (Guzel-Seydim i sur., 2005; Jianzhong i sur., 2009; Magalhães i sur., 2011; Rea i sur., 1996) opisuju da se kvasci nalaze i u vanjskom i u unutarnjem području zrna, s tim da su razlike između dva područja povezane sa bakterijama štapićastog oblika. Suprotno prethodno objavljenim rezultatima (Bottazzi i Bianchi, 1980; Rea i sur., 1996), Guzel-Seydim i sur. (2005) uočili su da prevladavaju bakterije štapićastog oblika, bez ikakvih dokaza o postojanju kvasca u unutarnjem zrnju. Nadalje, neki autori (Jianzhong i sur., 2009; Magalhães i sur., 2011) izvijestili su o manjem broju stanica opaženih u unutarnjem dijelu zrna u usporedbi s vanjskim. Neki su autori pretpostavili da vlaknasti materijal opažen u zrnju može u stvari biti polisaharidni kefir prisutan u cijelom zrnju (Guzel-Seydim i sur., 2005; Magalhães i sur., 2010a, 2010b, 2011). Također postoji procjena raspodjele mikroorganizama u tri vrste kefirnih zrnaca (Slika 2) pri čemu je uočena relativna razlika u njihovoj distribuciji prema podrijetlu zrnca. Općenito, štapićaste bakterije primijećene su i u unutarnjem (Slika 2 b, d, f) i vanjskom dijelu zrnca (Slika 2 a, c, e), dok su kvasci najčešće u vanjskom dijelu (Slika 2 a, c, e), kao i koki. U vanjskom dijelu jednog zrna uočeni su koki. Iako je *L. lactis* jedan od dominantnih mikroorganizama izoliranih iz kefirnog napitka, nekoliko istraživača (Guzel-Seydim i sur., 2005; Jianzhong i sur., 2009; Magalhães i sur., 2011) nisu primijetili koke u mikrografima,

vjerojatno zbog slabe laktokokne adhezije na zrnce tijekom rasta, što bi olakšalo oslobađanje laktokoka u procesu pranja (Guzel-Seydim i sur., 2005; Jianzhong i sur., 2009; Magalhães i sur., 2011; Rea i sur., 1996). Nadalje, vjerojatno je da bi niski pH u unutrašnjosti zrnca ometao rast ovog mikroorganizma u tom posebnom mikrokruženju (Rea i sur., 1996). Smatra se da su površinski mikroorganizmi imali veći utjecaj na proces fermentacije kefira (Farnworth i Mainville, 2008). Kako god, studije su pokazale da se velike razlike u populaciji mikroorganizama pojavljuju između različitih zrna i unutar istog zrna. Lin i sur. (1999) zaključili su da samo mjesto nastanka zrnca može objasniti razlike koje su zabilježene u nekoliko studija elektronskom mikroskopijom.



Slika 2. SEM fotografije mikrobnog sastava kefirnih zrnaca. A, C, E prikazuju vanjski sloj, a B, D, F unutrašnji dio zrnaca. Sa strelicama su na A označeni koki, na D vlaknasti dio – polisaharid kefiran, na E 1) granularna struktura – koagulirani proteini; 2) različite vrste mikroorganizama (Leite i sur., 2012).

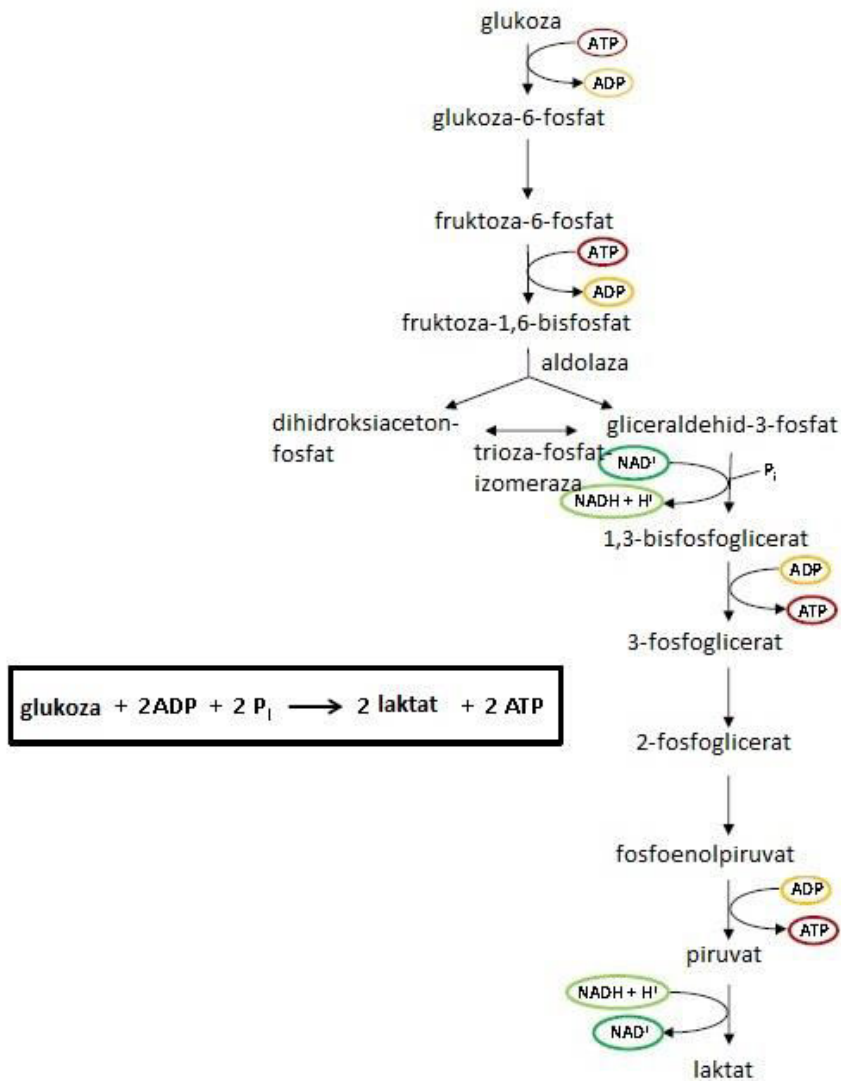
2.3.1. Bakterijske kulture kefira

Homofermentativne bakterije mliječne kiseline, uključujući vrste *Lactobacillus*, kao što su *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* i *L. acidophilus*; zatim vrste *Lactococcus* kao što su *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* i *Streptococcus thermophiles* identificirane su u kefirnim zrnima i fermentiranom napitku, kao i heterofermentativne bakterije mliječne kiseline, uključujući *L. kefiri*, *L. parakefiri*, *L. fermentum* i *L. brevis* (Leite i sur., 2012; Rattray and O'Connel, 2011), kao i citrat pozitivni sojevi *L. lactis* (*L. lactis* subsp. *lactis biovar diacetyllactis*), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroidi* (Leite i sur., 2012; Lopitz-Otsoa i sur., 2006; Rattray i O'Connel, 2011). Upotreba citrata rezultira proizvodnjom ključnih spojeva koji pridonose tipičnom okusu kefira (Rattray i O'Connel, 2011). Kefir proizveden od *L. kefiranofaciens* je razgranati, u vodi topljivi polisaharid, koji sadrži jednake količine D-glukoze i D-galaktoze. Proizvodnja ovog polisaharida stimulirana je rastom *L. kefiranofaciens* u kokulturi s kvascem *S. cerevisiae* (Cheirsilp i sur., 2003). Bakterije octene kiseline izolirane su i identificirane kako u zrcu kefira, tako i u kefirnom napitku (Tablica 1). Međutim, u nekim se zemljama prisustvo ovih vrsta smatra nepoželjnim (Farnworth i Mainville, 2008; Rattray i O'Connel, 2011; Tamime, 2006).

Tablica 1. Rodovi i vrste bakterija izoliranih iz kefirnih zrnaca i kefira

<i>Lactobacilli</i>	
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus fructivativorans</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus viridescens</i>
<i>Lactococci</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>Streptococci</i>	
<i>Streptococcus thermophiles</i>	
<i>Enterococci</i>	
<i>Enterococcus durans</i>	
<i>Leuconostocs</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Acetic acid bacteria</i>	
<i>Acetobacter</i> sp.	

Acetobacter pastorianus
Acetobacter acti
Bacillus sp.
Bacillus subtilis
Micrococcus sp.
Escherichia coli



Slika 3. Homofermentativna fermentacija bakterija mliječne kiseline (BMK) (Doenecke i sur., 2005; Goyal, 1999).

2.3.2. Kefirni kvasci

Iako proizvodi metabolite koji doprinose poželjnim i tipičnim senzornim svojstvima kefira (Rattray i O'Connel, 2011; Simova i sur., 2002), kefirni kvasac je manje proučavan od kefirnih bakterija. Glavne vrste kvasaca koji mogu fermentirati laktozu koja se nalazi u kefiru i zrnju kefira su *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Debaryomyces hansenii* i *Dekkera anomala*, dok su kvasci koji ne fermentiraju laktozu *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* i *Debaryomyces occidentalis*.

2.4. Interakcije između mikroorganizama u kefiru

Kompleksne interakcije između kvasaca i bakterija i njihova međuovisnost u kefirnim zrnima nisu do sada u potpunosti znanstveno razjašnjene. Međutim, kada se bakterije izdvoje od zrnca, kvasac neće rasti jednako učinkovito (Cheirsilp i sur., 2003; Farnworth i Mainville, 2008; Rattray i O'Connel, 2011). Zbog velikog kapaciteta metabolizma laktoze (Rea i sur., 1996), rod *Lactococcus* ima tendenciju bržeg rasta od kvasca u mlijeku (Rea i sur., 1996; Tamime, 2006). Ovaj rod hidrolizira laktozu, stvarajući mliječnu kiselinu i pogodno okruženje za rast kvasaca (Tamime, 2006). Nadalje, kvasci sintetiziraju složene vitamine B skupine i hidroliziraju mliječne proteine, koristeći kisik za proizvodnju CO₂ i etanola (Lopitz-Otsoa i sur., 2006; Tamime, 2006). Interakcija između kvasaca i bakterija mliječne kiseline može biti potaknuta ili inhibirana zbog kokulturnog suživota. Ti se mikroorganizmi mogu natjecati za hranjive tvari potrebne za rast i razmnožavanje, ili mogu proizvoditi metabolite koji inhibiraju ili stimuliraju jedni druge (Lopitz-Otsoa i sur., 2006). Neke vrste kvasaca su proteolitičke ili lipolitičke vrste, čijim se metabolizmom sintetiziraju aminokiseline i masne kiseline (Rattray i O'Connel, 2011). Vrste kao što su *Debaryomyces hansenii* i *Yarrowia lipolytica* asimiliraju mliječnu kiselinu nastalu od bakterija mliječne kiseline, povećavajući pH i stimuliraju rast bakterija. Proizvodnja B vitamina pomoću *Acetobacter* spp. također pogoduje rastu drugih mikroorganizama koji su prisutni u kefirnim zrnima (Lopitz-Otsoa i sur., 2006; Rea i sur., 1996).

2.4.1. Tehnološki aspekti

Tijekom fermentacije, zrnca povećavaju svoju veličinu i broj te se redovito obnavljaju iz mlijeka i ponovno koriste (Garrote i sur., 2010). Ako su pažljivo sačuvana, mogu zadržati svoju aktivnost godinama (Lopitz-Otsoa i sur., 2006; Rattray i O'Connel, 2011). Glavni pokazatelj procjene simbiotskog odnosa između različitih mikroorganizama je povećanje biomase tijekom fermentacije (Garrote i sur., 2010).

Kefirna zrna mogu se čuvati liofilizirana, suha ili mokra (Garrote i sur., 2010), a često ispiranje smanjuje njihovu održivost (Farnworth i Mainville, 2008). Međutim, Pintado i sur. (1996) opazili da čuvana zrna u tim različitim uvjetima sadrže drukčiji mikrobiološki sastav nego svježije zrnca. Sušena zrnca održavaju svoju aktivnost u roku trajanja od 12 do 18 mjeseci, dok vlažna zrnca zadržavaju svoju aktivnost 8 do 10 dana (Garrote i sur., 2010). Ispitane su različite metode čuvanja, a Garrote i sur. (1997), smatraju zamrzavanje najboljom metodom. Ispitana je i liofilizacija zrna, ali rezultirala je smanjenim metabolizmom laktoze, kao i modifikacijama bakterijskog profila, koji su bili različiti u odnosu na izvorni profil zrna (Farnworth i Mainville, 2008).

2.5. Proizvodnja kefir

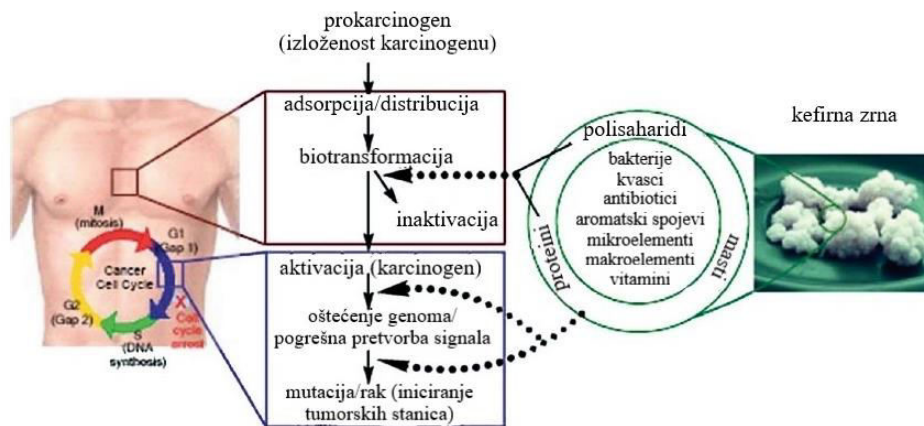
Postoje tri glavna načina proizvodnje kefir: (I) kućni postupak, (II) komercijalni postupak ruskom metodom i (III) komercijalni postupak korištenjem čistih kultura (Farnworth, 2005; Otles i Cagindi, 2003; Rattray i O'Connel, 2011). Mogu se koristiti i drugi supstrati, poput mlijeka drugih životinjskih vrsta, kokosovog mlijeka, sojinog mlijeka, voćnih sokova i/ili otopina šećera i melase (Magalhães i sur., 2010a; Öner i sur., 2010; Rattray i O'Connel, 2011). Tradicionalna kućna proizvodnja uključuje inokulaciju mlijeka ili voćnog napitka s promjenjivom količinom zrnaca i fermentaciju u trajanju od 18 do 24 sati pri temperaturi od 20 do 25 °C. Na kraju procesa fermentacije zrnca se separiraju cijeđenjem i mogu se koristiti za novu fermentaciju ili se mogu čuvati (1-7 dana) u svježem mlijeku ili kod vodenih kefirnih zrnaca u zašećerenoj vodi, dok se kefirni napitak čuva na 4 °C, spreman za konzumaciju (Beshkova i sur., 2002; Farnworth i Mainville, 2008; Otles i Cagindi, 2003). Početna koncentracija inokuluma (omjer zrnca/napitka) utječe na pH vrijednost, viskoznost, konačnu koncentraciju laktoze i mikrobiološki profil konačnog proizvoda (Garrote i sur., 1998; Simova i sur., 2002). Miješanje tijekom fermentacije također utječe na mikrobiološki sastav kefir, što pogoduje razvoju homofermentativnih laktokoka i kvasca (Farnworth i Mainville, 2008;

Ratray i O'Connel, 2011; Tamime, 2006). Inkubacija na temperaturama iznad 30 °C potiče rast termofilnih bakterija mliječnih kiselina, a nepovoljna je za rast kvasaca i mezofilnih bakterija mliječnih kiselina (Ratray i O'Connel, 2011). Druga metoda, poznata kao "ruska metoda", omogućuje proizvodnju kefira u velikim omjerima i koristi postupak fermentacije u serijama, od procjeđivanja koje je rezultat prve fermentacije zrna (Farnworth i Mainville, 2008; Ratray i O'Connel, 2011). U industrijskom procesu proizvodnje kefira mogu se koristiti različite metode, ali se sve temelje na istom principu. Mlijeko ili voćni sok je inokuliran čistim kulturama izoliranim iz kefirnih zrnca i komercijalnim kulturama (Beshkova i sur., 2002; Ratray i O'Connel, 2011; Tamime, 2006). Faza sazrijevanja može se provesti ili ne mora, a sastoji se od održavanja kefira na temperaturi od 8 do 10 °C u trajanju do 24 h (Beshkova i sur., 2002; Ratray i O'Connel, 2011), kako bi se omogućio rast mikroorganizama, prije svega kvasaca koji doprinosi specifičnom okusu proizvoda (Beshkova i sur., 2002). Izostanak ovog koraka povezano je s razvojem atipičnog okusa kefira (Beshkova i sur., 2002; Ratray i O'Connel, 2011). Tijekom skladištenja, proizvodnja CO₂ kvascem ili heterofermentativnim bakterijama mliječne kiseline može uzrokovati napuhavanje proizvoda, što bi trebalo uzeti u obzir pri odabiru ambalaže (Farnworth i Mainville, 2008; Sarkar, 2008). Iako je komercijalni napitak dostupan u mnogim zemljama, nisu sva svojstva tradicionalnog kefira uvijek prisutna (Farnworth i Mainville, 2008; Lopitz-Otsoa i sur., 2006). Assadi i sur. (2000) testirali su nekoliko omjera starter kultura izoliranih iz zrna (bakterije mliječne kiseline, kvasac, bakterije octene kiseline) i utvrdili su da je tradicionalni kefir proizveden sa zncima kefira bolje prihvaćen od kefira dobivenog korištenjem starter kulture. Rossi i Gobbetti (1991) proizveli su napitak "kefir", s nižom viskoznošću i odsutnosti nekih sastojaka koji se često nalaze u tradicionalnom kefiru. S druge strane, Carneiro (2010) razvijao je starter kulturu iz mikroorganizama izoliranih iz kefirnih zrnaca i proizvod je bio prihvaćen bolje nego tradicionalni kefir. Beshkova i sur. (2002) predložili su dvije metode fermentacije kefira: jedna od njih je istodobna fermentacija, a druga je uzastopna fermentacija. Stoga su koristili starter kulturu koja se sastojala od bakterija i kvasaca izoliranih iz kefirnih zrnaca, u kombinaciji s dva soja koji se često koriste u proizvodnji jogurta. Kvasci su dodani u početnu kulturu sa saharozom, oba na početku (istodobna fermentacija), tako i nakon fermentacije mliječne kiseline (uzastopna fermentacija). Dva postupka fermentacije proizvela su kefir s velikim brojem održivih laktokoka i laktobacila, osjetnih svojstava sličnih tradicionalnom kefiru. Upotreba komercijalnih kultura može standardizirati komercijalnu proizvodnju kefira, ako se odabir vrsta i sojeva kvasaca i bakterija provodi precizno i pažljivo, te na taj način omogućava proizvodnju „kefirskog“ napitka prihvatljivog okusa i dobrih zaštitnih svojstava (Beshkova i

sur., 2002; Carneiro, 2010). Komercijalni napitak može imati komercijalni vijek trajanja do 28 dana, dok se konzumiranje kefira sa zrnima preporučuje u roku 3 do 12 dana. Kako god, napitak "kefir" nema ista terapijska i probiotička svojstva kao u tradicionalnom kefiru (Ratray i O'Connel, 2011). Razvoj napitka "kefir" nije jedina industrijska primjena koja se proučavala. Kefirna zrnca su također proučavana u vezi s proizvodnjom jednostaničnih proteina (SCP) u biokonverziji sirutke i njihovoj primjeni u prehrambenoj industriji radi poboljšanja senzornih karakteristika određenih proizvoda (Paraskevopoulou i sur., 2003). Glavni nedostaci u proizvodnji kefira mogu se pripisati neugodnom okusu i aromi tipičnoj za kvasac (Tamime, 2006). Kasniji uzrok može biti brz rast kvasca *S. cerevisiae*, popraćen tipičnom aromom octa (Tamime, 2006). Prekomjerna proizvodnja octene kiseline može imati utjecaj i na aromu kefira, a javlja se zbog intenzivnog rasta *Acetobacter* spp. ili prisutnosti *Dekkera* spp. u zrnima. Gorak okus može izazvati i prisustvo *Geotrichum candidum* i/ili aktivnost nekih atipičnih kvasaca koji mogu biti prisutni u proizvodu (Tamime, 2006).

2.6. Terapijski aspekti

U povijesti se kefir preporučio za liječenje gastrointestinalnih bolesti, hipertenzija, alergija i ishemijskih bolest srca (Farnworth i Mainville, 2008; Ratray i O'Connel, 2011). Ocijenjenom sposobnosti i produktivnosti fermentacije zrnca kefira iz različitih supstrata (Farnworth, 2005; Magalhães i sur., 2010a; Öner i sur., 2010) primijećeni su široki spektri bioaktivnih spojeva, poput organskih kiselina, CO₂, H₂O₂, etanola, bioaktivni peptida, egzopolisaharida (kefiran) i bakteriocina. Ovi spojevi mogu djelovati neovisno ili zajednički kako bi doprinijeli različitim zdravstvenim koristima pripisanim konzumiranju kefira (Garrote i sur., 2010; Ratray i O'Connel, 2011).



Slika 4. Zdravstvene koristi kefira (Ratray i O'Connel, 2011).

2.6.1. Antimikrobna aktivnost

Santos i sur. (2003) su uočili antagonističko ponašanje laktobacila izoliranih iz kefirnih zrna prema *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri* i *Y. enterocolitica*. Silva i sur. (2009) primijetili su inhibiciju *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* i *E. coli* pomoću kefira uzgojenog u smeđem šećeru. S druge strane, Chifiriuc i sur. (2011) primijetili su da je sve mlijeko fermentirano zrnima kefira imalo antimikrobno djelovanje prema bakterijama *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* i *S. enteritidis*, ali nije inhibiralo *P. aeruginosa* i *C. albicans*. Sva ova istraživanja pokazuju da je antimikrobno djelovanje kefira povezano s proizvodnjom organskih kiselina, peptida (bakteriocina), ugljičnog dioksida, vodikovog peroksida, etanola i diacetila. Ti spojevi mogu imati korisne učinke ne samo na smanjenje patogena koje se prenose u hrani i propadanje bakterija tijekom proizvodnje i skladištenja pića, već i na liječenje i sprječavanje gastroenteritisa i vaginalnih infekcija (Farnworth, 2005; Sarkar, 2007). Pored toga, antimikrobna aktivnost polisaharidnog kefirana također je dokazana prema bakterijama i *C. albicans* (Rodrigues i sur., 2005).

2.6.2. Utjecaj na gastrointestinalni trakt (GIT)

Učinak dobiven konzumiranjem kefira na sastav mikroflore crijeva može biti posljedica kombinacije različitih čimbenika, poput izravne inhibicije patogena kiselinama i stvaranja bakteriocina (Rattray i O'Connell, 2011). Prema Marquina i sur. (2002), konzumiranje kefira značajno je utjecalo na povećanje broja bakterija mliječne kiseline u crijevnoj sluznici, a smanjio je populaciju enterobakterija i klostridija. Nadalje, konzumacija kefira također je spriječila kolonizaciju *C. jejuni* (Zacconi i sur., 2003), a bila je učinkovita u postoperativnom tretmanu i u bolesnika s gastrointestinalnim poremećajima (Sarkar, 2007). U Rusiji mnogi istraživači koriste kefir u liječenju peptičkih čireva na želucu i dvanaestercu kod ljudskih pacijenata (Farnworth i Mainville, 2008), a granulomatozno tkivo i zbrinjavanje induciraju octenom kiselinom u miševa. Husseini i sur. (2012) potvrdili su ljekovitu aktivnost kod opekлина zaraženih *Pseudomonas aeruginosa* kod miševa.

2.6.3. Antikarcinogeni učinci

Antikancerogena uloga fermentiranih mliječnih proizvoda može se općenito pripisati prevenciji raka i suzbijanju tumora u ranom stadiju odgađanjem enzimskih aktivnosti koje pretvaraju kancerogene spojeve u kancerogene tvari ili aktiviranje imunološkog sustava (Sarkar, 2007). Kubo i sur. (1992) izvijestili su o inhibiciji proliferacije potkožno transplantiranog *Ehrlichova ascitesa* tumora kod miševa. Liu i sur. (2002) promatrali su inhibiciju rasta tumora, indukciju apoptotičnih tumora celulita i značajno povećanje inzulina kod miševa *Alevelsina*, sugerirajući da kefir potencijalno ima protutumorska svojstva i potiče otpornost crijevnih mukoznih infekcija. Guven i Gulmez (2003) izvijestili su da miševi tretirani kefirom imaju veći zaštitni učinak protiv oštećenja izazvanog karbon tetrakloridom, što ukazuje da kefir također može djelovati kao antioksidans.

2.6.4. Stimulacija imunološkog sustava

Stvaranje bioaktivnih peptida tijekom procesa fermentacije ili probave pokazalo je razne fiziološke aktivnosti, uključujući stimulaciju imunološkog sustava u životinjskim modelima (Farnworth, 2005). Thoreux i Schmucker (2001) su nakon hranjenja miševa s kefirom primijetili porast specifičnog imunološkog odgovora sluznice (IgA) na virus kolere. Stimulacija imunološkog sustava može biti posljedica djelovanja egzopolisaharida koji se nalaze u zrcima kefira (Farnworth, 2005; Furukawa i sur., 1992). Medrano i sur. (2011) primijetili su da je konzumiranje kefira promijenilo ravnotežu imunoloških stanica u crijevnoj mukozi. Vinderola i sur. (2006) pokazali su imunomodulacijsku sposobnost kefira u imunološkom odgovoru na sluznicu crijeva miševa. Davanje kefira također je induciralo odzivnu reakciju intestinalne mukoze, ukazujući da sastojci kefira mogu stimulirati stanice urođenog imunološkog sustava, suzbijajući imunološki odgovor Th2 fenotipa ili promičući imunološke reakcije uzrokovane stanicama protiv tumora i intracelularnih infekcija patogenima (Liu i sur., 2002). Nedavno je Hong i sur. (2010) demonstrirao, *in vitro*, imuno modulirajuću sposobnost bakterija mliječne kiseline izolirane iz kefirnih zrnaca, sugerirajući njihov utjecaj na lučenje proupalnih citokina IL-6 and TNF-by TLR-2.

2.6.5. Hipokolesterolemijski učinak

Mogući mehanizmi predloženi za hipokolesterolemičku aktivnost kod bakterija mliječne kiseline (BMK) mogu uključivati inhibiciju apsorpcije egzogenog kolesterola u tankom crijevu, vezanjem i ugradnjom kolesterola u bakterijske stanice i unos kolesterola, kao i suzbijanje reapsorpcije žučne kiseline enzimskom dekonjugacijom žuči soli, koje promiče enzimom žučne soli hidrolaze (BSH) (Wang i sur., 2009). Wang i sur. (2009) primijetili su značajno smanjenje serumskih razina ukupnog kolesterola, lipoproteina niske gustoće (LDL) i triglicerida, dok nije bilo promjene razine lipoproteina visoke gustoće (HDL-C) kod miševa hranjenih bogatom kolesterolnom dijetom nadopunjenom bakterijom *Lactobacillus plantarum* MA2. Štoviše, smanjen je i ukupni kolesterol i trigliceridi u jetri. S druge strane, kolesterol i trigliceridi u izmetu životinja značajno su porasli. Druga studija (Liu i sur., 2006) također je uočila smanjenje nivoa triglicerida u serumu i kolesterola, posebno ne-HDL-C frakcije. St-Onge i sur. (2002) izvijestili su o kontradiktornim rezultatima, gdje konzumiranje kefira nije smanjilo ukupnu razinu kolesterola, LDL-C, HDL-C i triglicerida, već je povećalo koncentracije izobutrične, propionske i izovalerične kiseline, kao i ukupnu količinu kratkolančanih masnih kiselina u fekalijama.

2.6.6. Netolerancija na kefir i laktozu

Mogućnost smanjenja koncentracije laktoze i prisutnost aktivnosti β -galaktozidaze u fermentiranim mliječnim proizvodima čine pogodnim za konzumaciju ljudi koji imaju intoleranciju na laktozu (Farnworth i Mainville, 2008; Sarkar, 2007). Pokazano je da neka zrna kefira pokazuju aktivnost enzima β -galaktozidaze, koja ostaje aktivna kada se konzumira, a taj kefir sadrži manje laktoze nego mlijeko (Farnworth, 2005; Sarkar, 2007). Komercijalni kefir (Hertzler i Clancy, 2003) pokazao se jednako učinkovit kao i jogurt u smanjenju iscrpljenog vodika i probavnim problemima odraslih osoba s intolerancijom na laktozu u usporedbi s gutanjem mlijeka. De Vrese i sur. (1992) pokazali su da svinje hranjene kefirom pokazuju značajno povećanje koncentracije galaktoze u plazmi, što sugerira poboljšanje hidrolize crijevne laktoze pomoću mikrobnog enzima β -galaktozidaze.

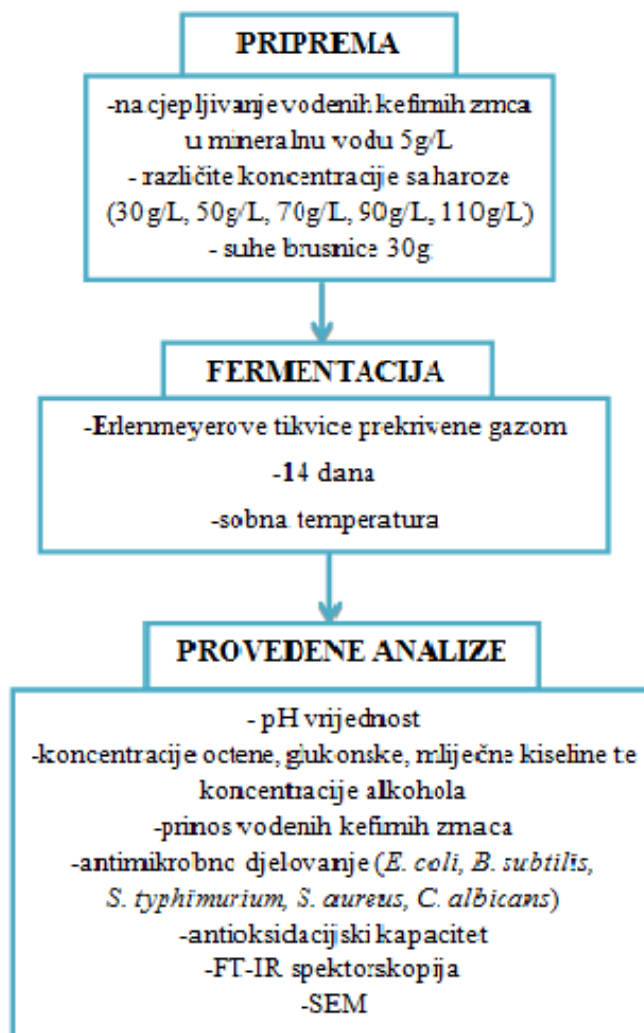
2.7. Egzopolisaharidi (EPS)

Polisaharidi su spojevi velike molekulske mase koji se sastoje od monosaharida povezanih glikozidnom vezom. U prirodi su polisaharidi široko rasprostranjeni u obliku: strukture tvari (npr. celuloza ili hitin), rezervne materije (npr. škrob ili glikogen) i kao tvari koje vežu vodu (npr. agar ili pektin). Funkcionalna svojstva ovisna su o različitim vrstama povezivanja i grananja, kao i njihovim težinama monomera i šećera (Belitz i sur., 2001). Prvi opis mikrobnih polisaharida napravljen je 1839. godine, u kojem je Kircher ispitivao organizme koji tvore sluzave strukture kada su uzgajani na mediju sa saharozom (Jay, 1992b). Mikrobnih polisaharidi koji se izlučuju izvan stanice nazvani su egzopolisaharidi (EPS). Većina bakterija nije u mogućnosti metabolizirati vlastiti EPS pa je s toga malo vjerojatna upotreba EPS za skladištenje hranjivih tvari (Cerning, 1990). EPS se vjerojatno proizvode kao zaštitna sredstva protiv dehidracije, različitih napada poput toksina, antibiotika ili faga, predacije od protozoa i osmotskog stresa. Druga funkcija je da se bakterije mogu adsorbirati na čvrste površine s EPS-om kako bi formirale biofilm (De Vuyst i Degeest, 1999). Na primjer, zubni plak je složen biofilmom različitih EPS-a. Fruktani se mogu koristiti kao skladište energije za udružene bakterije, a glukani su važni čimbenici adhezije i agregacije za kolonizaciju bakterija plakova (Russel, 2009). EPS koji su povezani sa staničnom površinom pokazuju kapsularni izgled, a slobodni difuzni EPS su tanki. U nekim slučajevima obje vrste mogu biti proizvedene od istog organizma (Cerning, 1990). EPS se može razlikovati prema sastavu monomernih šećera. Heteropolisaharidi (HePS) se sastoje od različitih šećera s monomer ponavljajućim jedinicama prekursora. Ove se jedinice sintetiziraju unutarstanično i polimeriziraju izvanstanično. To je proces koji je ovisan o energiji (De Vuyst i Degeest, 1999). HePS su važni za osjećaj u ustima i reologiju u fermentiranim mliječnim proizvodima, na primjer u kefiru (50% glukoza i 50% galaktoza), u mliječnom kefiru (La Rivière i Kooiman, 1967). Suprotno tome, homopolisaharidi (HoPS) sastoje se od jedne vrste monomera. EPS sastavljeni od glukoze nazivaju se glukani, a oni sastavljeni iz fruktoza fruktani. Nadalje, HoPS se mogu razlikovati prema njihovim dominantnim vrstama vezama. α -D-glukani s α -1,6-vezama i granama na položajima 3, 2 i 4 nazivaju se dekstrani, dok je grananje specifično za sojeve. Sojevi nekoliko vrsta *Leuconostoc* poznato je da proizvode dekstrane. Mutanti koje stvaraju streptokoki uglavnom imaju α -1,3-veze, a alternativni tip koji proizvode različiti sojevi *Leuconostoc mesenteroides* sadrži naizmjenično oba tipa veze. Predstavnici fruktana su levani, s β -2,6-vezama i β -2,1 grananjem, te inulin s β -2,1 kao glavnim tipom spona (De Vuyst i Degeest, 1999; Waldherr, 2009). Homopolisaharidi su sintetizirani glikoziltransferazama, dok

glukansukraze kataliziraju proizvodnju glukana, a fruktansukraze proizvodnju fruktana. Enzimi se mogu pojaviti na staničnoj stijenci ili izvan nje. Supstrati za polimerizaciju mogu biti saharoza ili rafinoza, dok rafinozu mogu koristiti samo fruktansukraze (Van Geel-Schutten i sur., 1999). Energija koja je potrebna za reakciju prijenosa šećera monomera oslobađa se cijepanjem glikozidne veze saharoze. Jedna jedinica šećera (fruktoza ili glukoza) tada se prenosi na molekulu akceptora, dok se druga ispušta u medij. Ako voda reagira kao molekula akceptor, glikoziltransferaze pokazuju svoju aktivnost hidrolize što rezultira slobodnom glukozom i fruktozom. Oligosaharidi nastaju ako male jedinice šećera (maltoza, saharoza) reagiraju kao akceptorske molekule, dok saharozu mogu koristiti samo fruktoziltransferaze što rezultira kestozom ili nistazom. Ova se funkcija glikoziltransferaza naziva akceptorska reakcija. Aktivnost transferaze glikoziltransferaze dovodi do EPS-a jer se monomeri šećera prenose u rastuće polisaharidne lance (Kaditzky, 2008; Waldherr, 2009).

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Tijek istraživanja



Slika 5. Shematski dijagram tijeka cjelokupnog istraživanja.

3.2. Materijali i metode rada

3.2.1. Priprava kulture vodenih kefirnih zrnaca

Komercijalna kultura vodenih kefirnih zrnaca uzgojena je u vodi zaslađenoj s 50 g/L saharoze tijekom 5 dana uzgoja na sobnoj temperaturi. 25 g vodenih kefirnih zrnaca je uzgajano u 100 mL mineralne vode, a nakon 24 sata uzgoja, zrnca su isprana sterilnom demineraliziranom vodom i ponovno inokulirana u 100 mL mineralne vode, te je ovaj postupak proveden dva puta.



Slika 6. Prikaz vodenih kefirnih zrnaca uporabljenih u istraživanju (osebna fotografija, Ana Besednik)

3.2.2. Hranjiva podloga za uzgoj kulture

Uzgojena vodena kefirna zrnca nacijepljena su u mineralnu vodu proizvođača Radenska, Slovenija. U mineralnu vodu su dodane različite mase suhih brusnica proizvođača EuroCompany, zemlja podrijetla Turska.

Tablica 2. Koncentracije saharoze dodane u uzorke

Oznaka uzorka	γ saharoze (g/L)
VK1	30
VK2	50
VK3	70
VK4	90
VK5	110

3.2.3. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost uzorka mjerena je svaki dan tijekom 14 dana fermentacije. Mjerenja su provedena nakon pažljivog izuzimanja 5 mL uzorka. Mjerenja su provedena pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

3.2.4. Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyerovu tikvicu od 200 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentiranog napitka 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:

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

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)

3.2.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

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

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

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 mliječne kiseline

U Erlenmeyerovu tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 mL fermentiranog napitka i dodano 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)

3.2.7. 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 fermentiranog napitka, koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos napitka i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0,1 M NaOH. U Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL, čija je namjena hvatanje destilata, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 ml koncentrirane H_2SO_4 . Destilat se preko hladila i lule uvodio u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL, koja se držala u rashlađenoj vodi. Destilacija je morala biti polagana i postupna, a trajala je sve 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 Erlenmeyerovu 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 Erlenmeyerovu 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 kalijeveg bikromata) te ostavljeno začepljeno 5 minuta. Tijekom tog vremena dolazi do oksido-redukcijske reakcije između preostalog kalijeveg 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 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 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 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mL)

3.2.8. Izračunavanje mase i prinosa vodenih kefirnih zrnaca

Nakon fermentacije, koja je trajala 14 dana, vodena kefirna zrnca su izdvojena iz posuda i oprana u plastičnom cjedilu demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu pH vrijednost vode (Toda i sur., 1989). Izračunata je masa biomase vodenih kefirnih zrnaca (g) prema sljedećoj formuli:

$$m_{kz} \text{ (g)} = m_{kzt} - m_i \quad (5)$$

gdje je:

m_{kz} = masa (vlažne/suhe) biomase (g)

m_{kzt} = masa (vlažne/suhe) biomase na kraju fermentacije (g)

m_i = masa inokuluma (g)

Prinos biomase (Y_{kz}) izračunat je prema formuli:

$$Y_{kz} \text{ (\%)} = \frac{(\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma})}{(\gamma \text{ izvora C na početku fermentacije})} \cdot 100 \quad (6)$$

3.2.9. FT-IR spektroskopija

Svi izdvojeni uzorci vodenih kefirnih zrnaca sušeni su u Petrijevim zdjelicama u suhom sterilizatoru pri 60 °C te usitnjeni u tarioniku do praha. IR spektri čvrstih uzoraka snimljeni su u kalijevu bromidu na IR-spektrofotometru Bruker, ALPHA-Transmittance FT-IR Spectrometre pri rezoluciji od 2 cm⁻¹ u rangu od 4000 do 400 cm⁻¹.

3.2.10. Pretražna elektronska mikroskopija (eng. Scanning Electron Microscopy; SEM)

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) napravljena je na instrumentu Tescan Vega 3 Easyprobe s volframovom žarnom niti pri ubrzavajućem naponu 5 kV. Uzorci su prethodno napareni vodljivim slojem zlata i paladija.

3.2.11. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Metodom radijalne difuzije određena je antimikrobna aktivnost inhibicije rasta odabranih test mikroorganizama, bakterija vrsta *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* te kvasca *Candida albicans*.

Sojevi bakterijskih i kvašćevih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu korišteni su kao testni mikroorganizmi.

Suspenzije stanica bakterija i kvasaca (10⁸/mL) naciepljene su na hranjive podloge te im je u izbušene rupe u podlozi (visina 3 mm, promjer 4 mm) pipetom dodano 100 µL fermentiranog uzoraka. Zatim su podloge stavljene na inkubaciju 24 h na 28 °C (kvasci) i 48 h na 37 °C (bakterije). Tijekom inkubacije, uzorci su difundirali radijalno u agar tvoreći gradijent koncentracije i ovisno o njihovim antimikrobnim djelovanjima, inhibirali rast mikroorganizama u okolini izbušenih rupa. Prozirna zona, 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 gledano postoji li zona inhibicije, je li područje zamućeno ili čisto, te su ravnalom izmjereni promjeri nastalih zona. Svi pokusi provedeni su u trima paralelama te je izračunata srednja vrijednost dobivenih rezultata.

3.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidansi su, po definiciji, sve one tvari koje u maloj količini u kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidanata. Slobodni radikal je svaki atom ili molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnim i veoma reaktivnim (sposobni oksidirati biološke molekule) (Tseng i Mau, 2007).

3.3.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je mjerenjem sposobnosti inhibicije slobodnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Antioksidacijska sposobnost se mjeri u vidu otpuštanja vodika od strane antioksidansa odnosno sposobnosti vezivanja radikala pri čemu se koristi stabilan DPPH radikal (Cheung i sur., 2003).

U kivetu širine 1 cm otpipetirano je 2 mL DPPH otopine i izmjerena početna apsorbancija otopine radikala (A_0). U kivetu je potom dodana etanolna otopina (50 μ L) uzorka, reakcijska smjesa je dobro promiješana i praćena je promjena apsorbancije tijekom jednog sata pri valnoj duljini od 517 nm. Antioksidacijska aktivnost uzorka mjerena je pri različitim razrjeđenjima (1:1; 1:10; 1:50; 1:100) pripremljenim s etilnim alkoholom. Za baždarenje spektrofotometra i određivanje nule u referentnoj kiveti korišten je čisti etanol.

Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računat je prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = [1 - (A_{\text{uzorka}} - A_0)] \times 100 \quad (2)$$

A_{uzorka} – apsorbancija istraživanog uzorka na 517 nm

A_0 – apsorbancija slijepe probe na 517 nm

3.3.2. Određivanje reducirajuće snage

Reducirajuća snaga određivana je prema metodi Oyaizu (1986). Svaki od ekstrakata (0,1 – 30 mg/mL) je pomiješan s 2,5 mL 200 mM fosfatnog pufera (pH 6,6) i 2,5 mL kalijevog ferocijanida (10 mg/mL), te inkubiran pri 50 °C tijekom 20 minuta. Nakon toga je u uzorke dodano 2,5 mL trikloroctene kiseline (100 mg/mL) te su centrifugirani pri 200 o/10 minuta. Gornji sloj (5 mL) je pomiješan s 5 mL deionizirane vode i 1 mL željeznog klorida (1 mg/mL)

te je izmjerena apsorbancija na 700 nm. Veća vrijednost apsorbancije ukazala je na veću reducirajuću snagu. EC₅₀ vrijednosti (mg ekstrakta/mL) su koncentracije ekstrakta pri kojima je apsorbancija iznosila ½ vrijednosti apsorbancije izmjerene za reducirajuću snagu i dobivene su interpolacijom. Askorbinska kiselina i α-tokoferol korišteni su kao standardi.

3.3.3. Sposobnost keliranja iona željeza

Kelirajuća sposobnost određena je prema metodi Dinisa i sur. (1994). Ekstrakti (0,1 – 30 mg/mL) su pomiješani s 3,7 mL metanola i 0,1 mL 2 mM željeznog klorida. Reakcija je pokrenuta dodatkom 0,2 mL 5 mM ferozina. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (10 minuta), izmjerena je apsorbancija na 562 nm. Askorbinska kiselina i α-tokoferol korišteni su kao standardi.

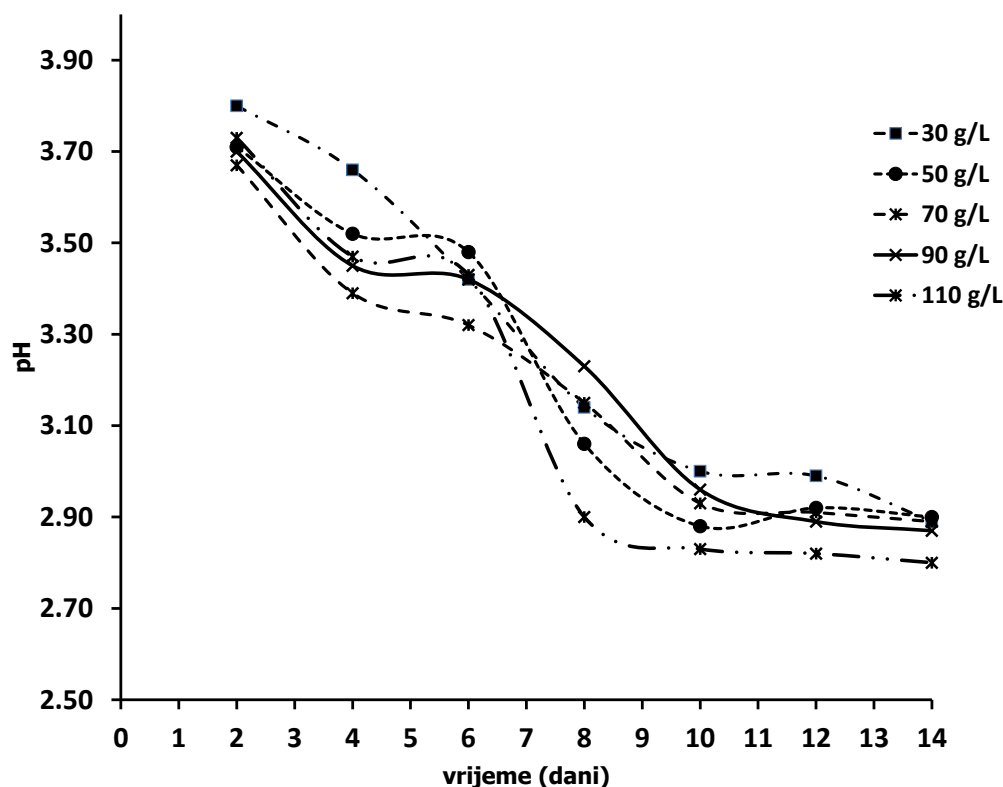
4.REZULTATI I RASPRAVA

Posljednjih deset godina sve je veći 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 koji se dobiva fermentacijom pomoću združene kulture bakterija i kvasaca. U ovom radu proučavana je fermentacija mineralne vode s dodatkom suhih brusnica i vodenih kefirnih zrnaca. Tijekom 14 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 7-12, Tablice 3 i 4).

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).

Tijekom uzgoja pH vrijednost se 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). 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 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, s početne vrijednosti od pH 4 na pH 2,5 tijekom fermentacije (Chen i Liu, 2000; Sreeramulu i sur., 2000).



Slika 7. Promjena pH vrijednosti tijekom 14 dana uzgoja vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica i različitim koncentracijama dodane saharoze.

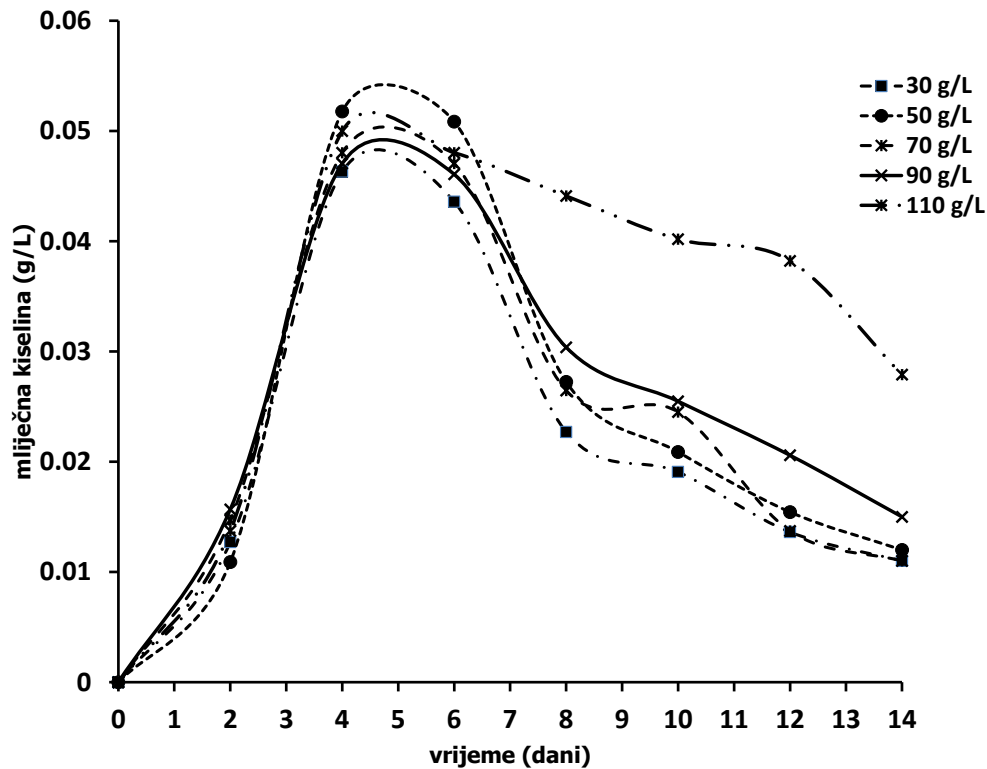
Na Slici 7 vidljivo je da tijekom 14 dana fermentacije pH vrijednost s početnih 3,7 naglo opadala sve do 10 dana fermentacije, nakon čega se pH ustalio. Najviša pH vrijednost u 14. danu izmjerena je pri koncentraciji šećera od 30 g/L, a najniža pri koncentraciji od 70 g/L.

4.2. Promjena koncentracija organskih kiselina i etanola

Mliječna kiselina je jedna od glavnih metabolita koja nastaje tijekom fermentacije napitaka dobivenih previranjem šećera s dodatkom voća i dodatkom vodenih kefirnih zrnaca. Kinetika nastajanja mliječne kiseline tijekom fermentacije prikazana je na Slici 8. U prvih 4 dana fermentacije vidljivo je linearno povećanje koncentracija pri svim dodanim koncentracijama saharoze. Najveća koncentracija na kraju procesa određena je u uzorku sa 110 g/L šećera, a najniža kod 70 g/L.

Dobiveni rezultati slični su rezultatima 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

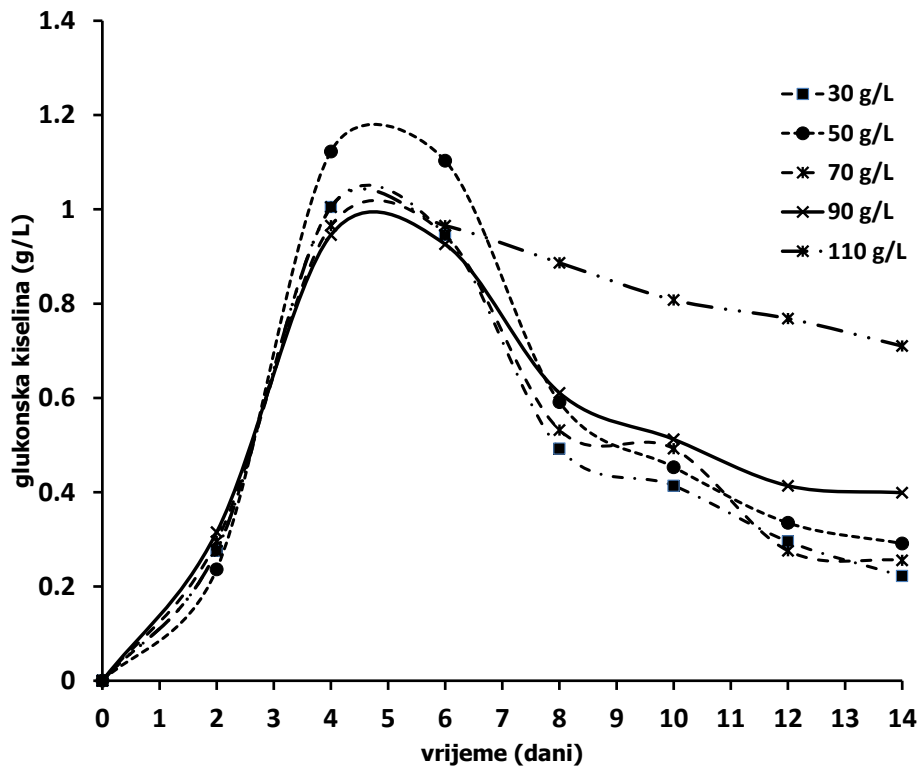
koncentraciju, a najvišu koncentraciju u podlozi s 50 g/L dodane saharoze. Općenito gledano, iako i u rezultatima dobivenim u ovom radu i u istraživanju koje je proveo Blanc (1996) nema izričite regularnosti, apsolutne vrijednosti nastale mliječne kiseline u oba dva istraživanja su bile podjednake.



Slika 8. Promjena koncentracije mliječne kiseline tijekom 14 dana uzgoja vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica i različitim koncentracijama dodane saharoze.

Ovisno o tome želi li se proizvoditi fermentirani napitak s 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 glukuronska 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 prikazuju da je koncentracija glukonske kiseline bila 10 puta viša 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 110 g/L saharoze, nešto niža pri 90 g/L, a u uzorcima sa 30, 50 i 70 g/L izmjerene su podjednake koncentracije glukonske kiseline.

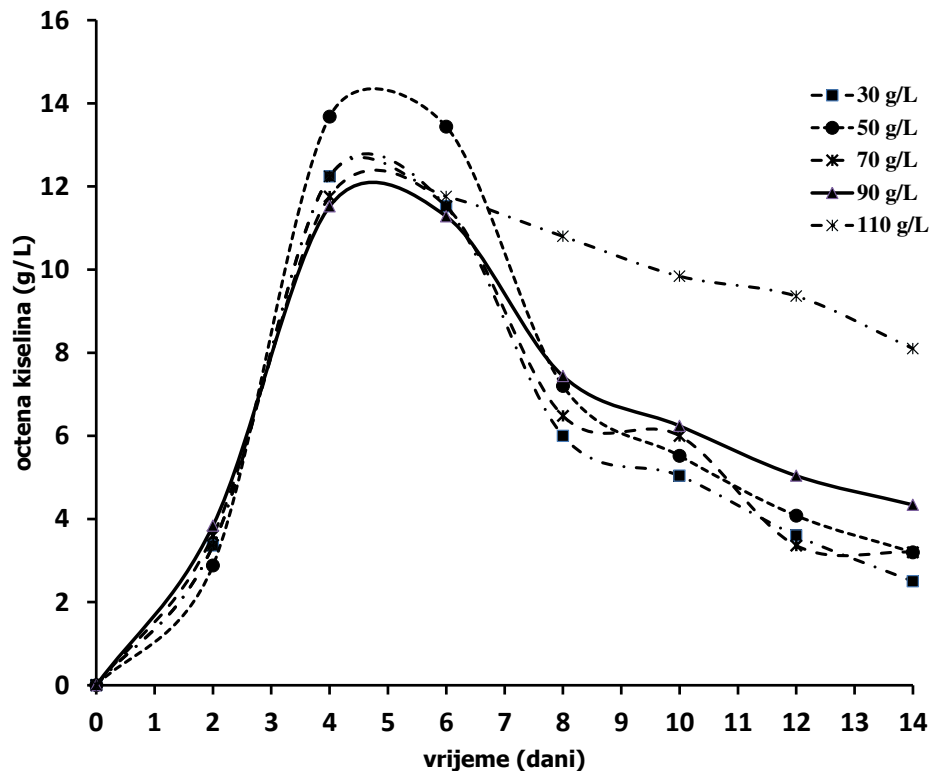


Slika 9. Promjena koncentracije glukonske kiseline tijekom 14 dana uzgoja vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica i različitim koncentracijama dodane saharoze.

Uzorci nacijeppljeni vodenim kefirnim zrcima uzgojeni su u statičkoj kulturi na sobnoj temperaturi, pri čemu nije bio određivan mikrobiološki sastav uzoraka. Zbog ovog razloga određeno odstupanje između dobivenih rezultata u ovom radu i rezultata 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

14 dana fermentacije prikazano je na Slici 10. Kao što se može primijetiti na grafičkom prikazu, ponovno je najveća koncentracija određena u uzorku s 50 g/L dodane saharoze, a pri svim ostalim koncentracijama izmjerene su podjednake vrijednosti koncentracije octene kiseline. Ovako niske koncentracije octene kiseline mogu se objasniti time što mineralna voda ne 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.

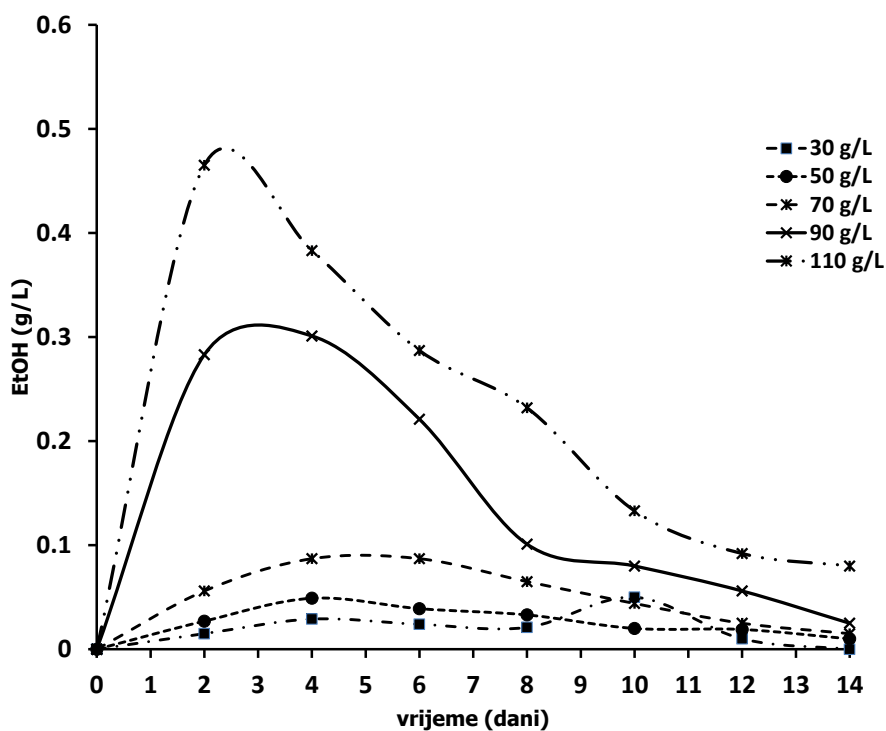


Slika 10. Promjena koncentracije octene kiseline tijekom 14 dana uzgoja vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica i različitim koncentracijama dodane saharoze.

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, a nakon toga se 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.

Prema većini autora, koncentracija EtOH u kefirnim napitcima nije veća od 1% (vol/vol) (Teoh i sur., 2004). Sievers i sur. (1995) su nakon 10 dana fermentacije izmjerili 0,36 % EtOH, uz početnih 70 g/L saharoze u hranjivoj podlozi. Reiss (1994) je ispitivao utjecaje različitih izvora ugljika (saharoza, laktoza, glukoza i fruktoza) na metabolizam kefirnih zrnaca, te uočio da koncentracija proizvedenog EtOH ovisi o vrsti i količini dodanog šećera. U ovom radu je u mineralnu vodu dodano od 30 do 110 g/L saharoze (konzumni bijeli šećer) i već nakon 2. dana fermentacije izmjerena je maksimalna koncentracija EtOH, od 0,49 g/L, koja se u 6. danu smanjila na vrijednosti od 0,29 g/L, a nakon toga je pala na manje od 0,15 g/L i nije se značajnije mijenjala do kraja fermentacije (Slika 11).



Slika 11. Promjena koncentracije etanola tijekom 14 dana uzgoja vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica i različitim koncentracijama dodane saharoze.

Uočeno je linearno povećanje koncentracije etanola do drugog dana fermentacije i to kod svih koncentracija šećera (Slika 11). Najveće koncentracije su izmjerene kod 90 i 110 g/L (0,46 i 0,3 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 njena koncentracija naglo počela rasti (Slika 11).

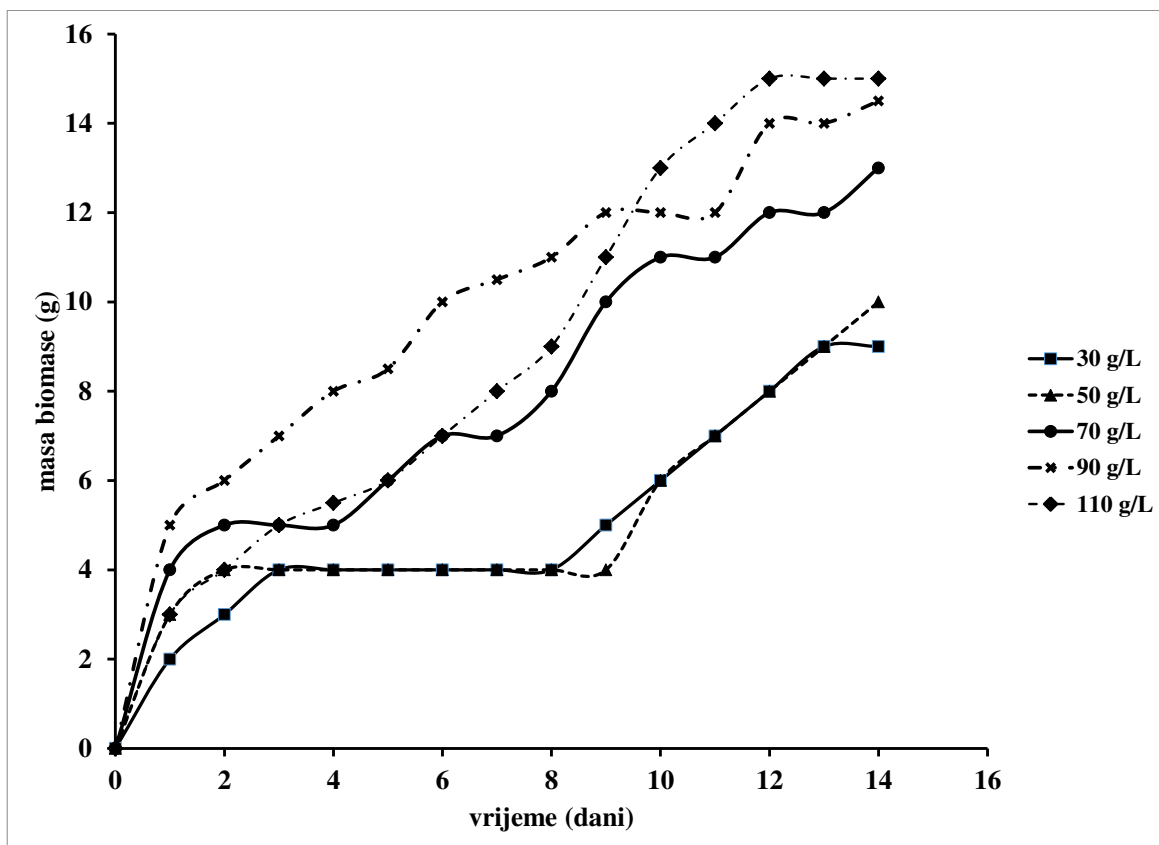
4.3. Određivanje prinosa vodenih kefirnih zrnaca

Tijekom 14 dana fermentacije, prinos vodenih kefirnih zrnaca se mijenjao ovisno o koncentraciji dodane saharoze (Tablica 3). Najveći prinos postignut je pri koncentraciji saharoze od 110 g/L (38,17 %). Iz tablice se može uočiti kako je prinos linearno rastao s povećanjem koncentracije saharoze dodane u mineralnu vodu s brusnicama.

Tablica 3. Prinos vodenih kefirnih zrnaca nakon 14 dana fermentacije u mineralnoj vodi sa suhim brusnicama i dodatkom različitih koncentracija saharoze

Koncentracija saharoze (g/L)	γ inokuluma (g/L)	γ suhих brusnica (g/L)	Prinos (%)
30	20,20	30,03	10,54
50	24,45	31,45	18,12
70	26,57	32,65	22,96
90	28,17	34,60	28,57
110	35,09	36,09	38,17

Kinetika sinteze vodenih kefirnih zrnaca, praćena tijekom 14 dana fermentacije je prikazana na Slici 12. Vidljivo je linearno povećanje mase vodenih kemijskih zrnaca u svim uzorcima s različitim koncentracijama šećera, najveće izmjerene mase vodenih kemijskih zrnaca pri 90 i 110 g/L. Za razliku od računanja prinosa (Tablica 3), na Slici 12 su vrijednosti γ inokuluma (g/L) normalizirane i na početku fermentacije počinju od nulte vrijednosti.



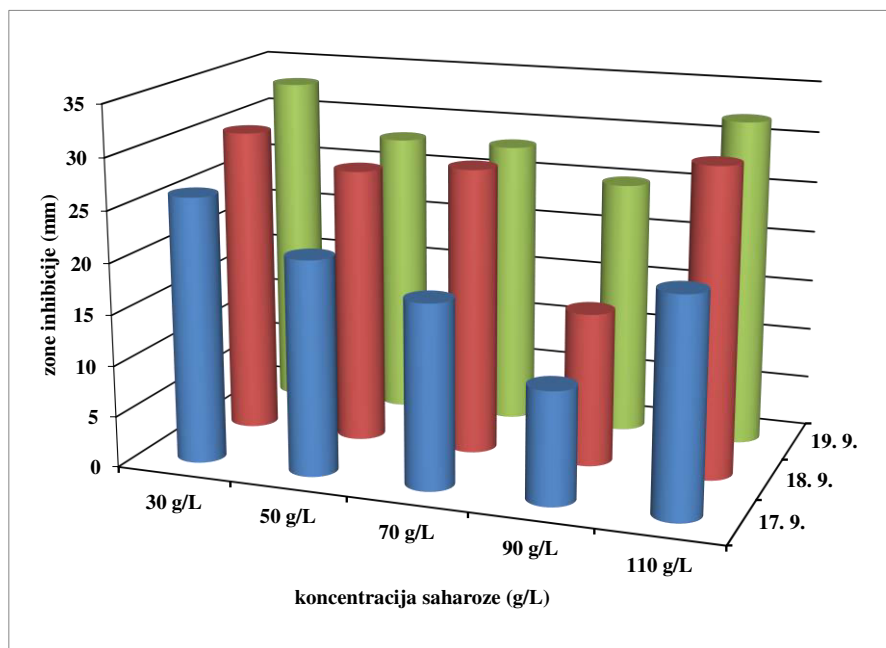
Slika 12. Kinetika sinteze vodenih kefirnih zrnca uzgojenih u mineralnoj vodi uz dodatak suhih brusnica i različitih koncentracija šećera.

4.4. Antimikrobna aktivnost

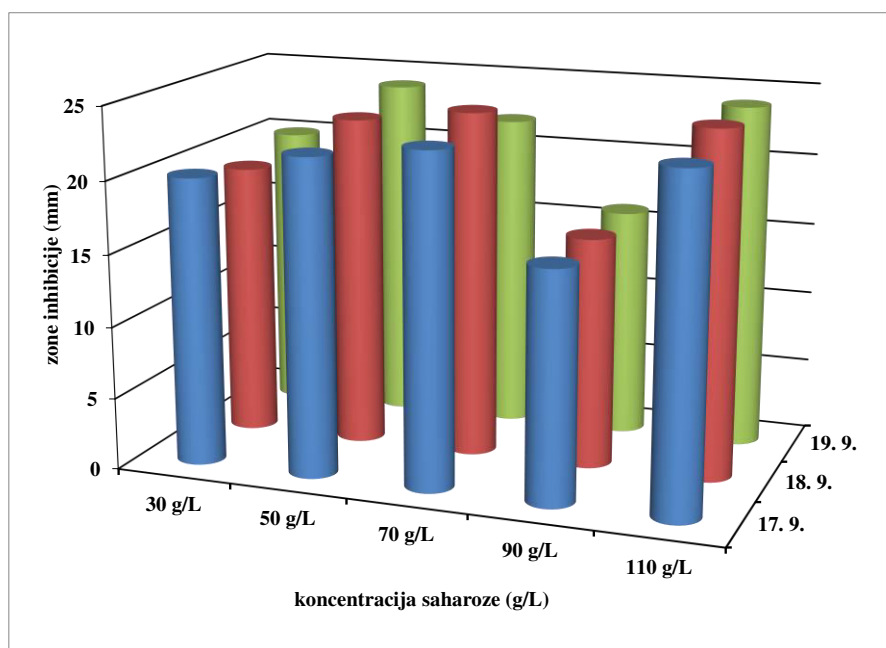
Brojna dosadašnja istraživanja antimikrobne aktivnosti napitaka uz pomoć fermentacije vodenih kefirnih zrnaca pokazala su djelovanje na široki spektar patogenih bakterija, no djelovanje na kvasce i plijesni je vrlo rijetko istraživano (Greenwalt i sur., 1998; Sreeramulu i sur., 2000). Rezultati tih istraživanja pokazali su da takvi napitci vrlo djelotvorno inhibiraju rast bakterijskih vrsta, dok prema kvascima i plijesnima uglavnom nisu imali 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 dodatkom suhih brusnica i različitim koncentracijama dodane saharoze, uzorci testirani na hranjivim podlogama nacijepljenim s bakterijama *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, te kvascem *C. albicans*. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama

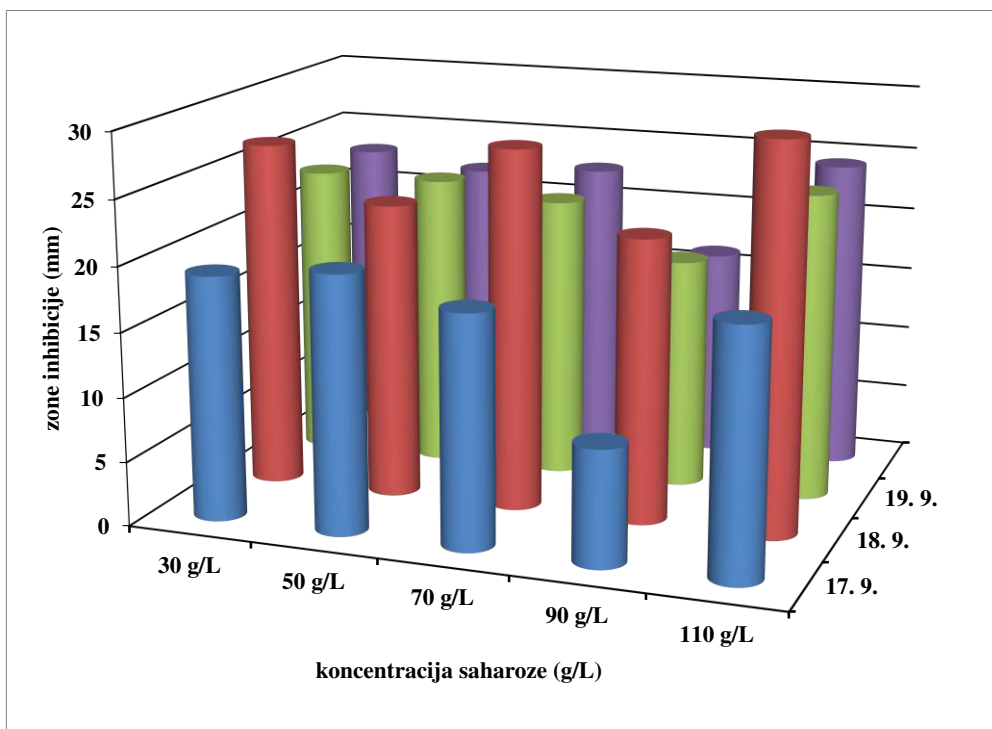
13-17 i u Tablici 4. Može se uočiti da su podjednake antimikrobne aktivnosti postignute prema bakterijama *E. coli*, *B. subtilis* i *S. typhimurium*, pri svim koncentracijama saharoze dodane u mineralnu vodu, no prema bakteriji *S. aureus* napitak nije pokazao antimikrobnu aktivnost. Prema kvascu vrste *C. albicans*, napitak je pokazao blagu antimikrobnu aktivnost. Najveće zone inhibicije prema bakterijama *E. coli* i *S. typhimurium* postignute su pri koncentracijama šećera od 30 i 110 g/L, malo manje pri 50 i 70 g/L.



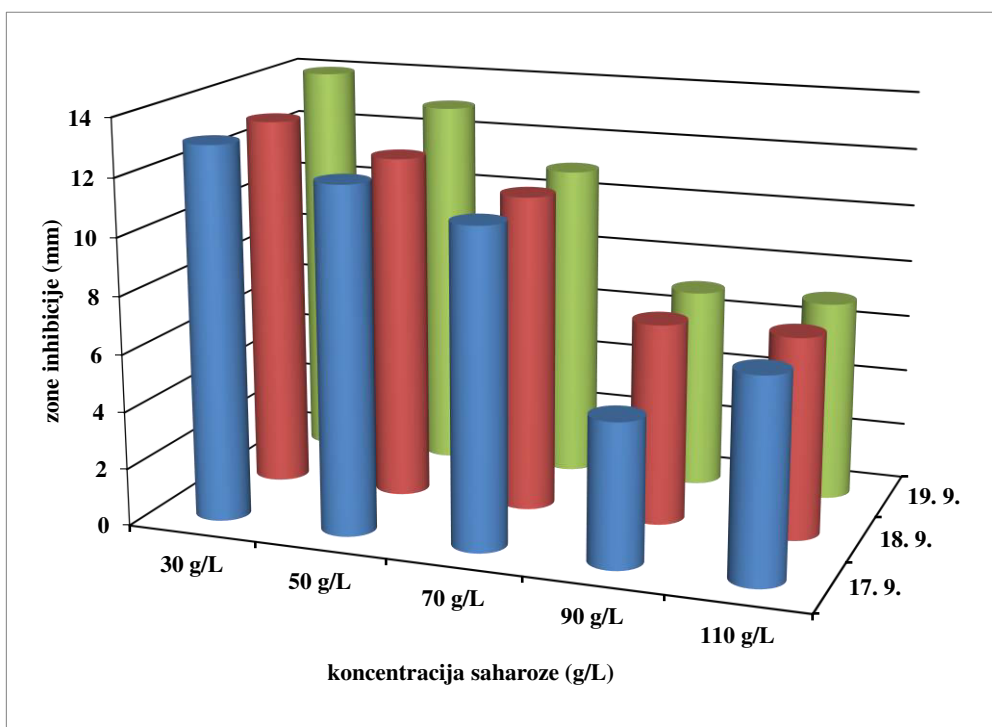
Slika 13. Promjeri zona inhibicije prema danima inkubacije uzoraka (*E. coli*)



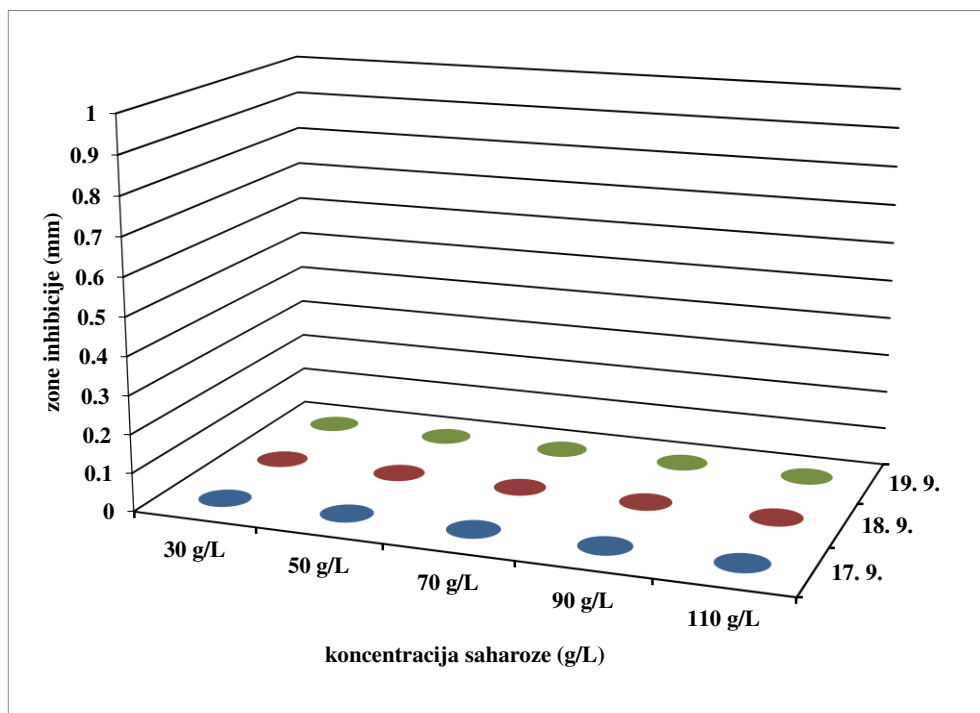
Slika 14. Promjeri zona inhibicije prema danima inkubacije uzoraka (*B. subtilis*)



Slika 15. Promjeri zona inhibicije prema danima inkubacije uzoraka (*S. typhimurium*)



Slika 16. Promjeri zona inhibicije prema danima inkubacije uzoraka (*C. albicans*)



Slika 17. Promjeri zona inhibicije prema danima inkubacije uzoraka (*S. aureus*)

Tablica 4. Antimikrobna aktivnost napitka fermentiranog pomoću vodenih kefirnih zrnaca uz dodatak suhih brusnica i različitih koncentracija saharoze

Koncentracija saharoze (g/L)	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
30	30	20	23	13	-
50	25	23	22	12	-
70	25	23	23	11	-
90	17	16	16	6	-
110	28	24	24	7	-

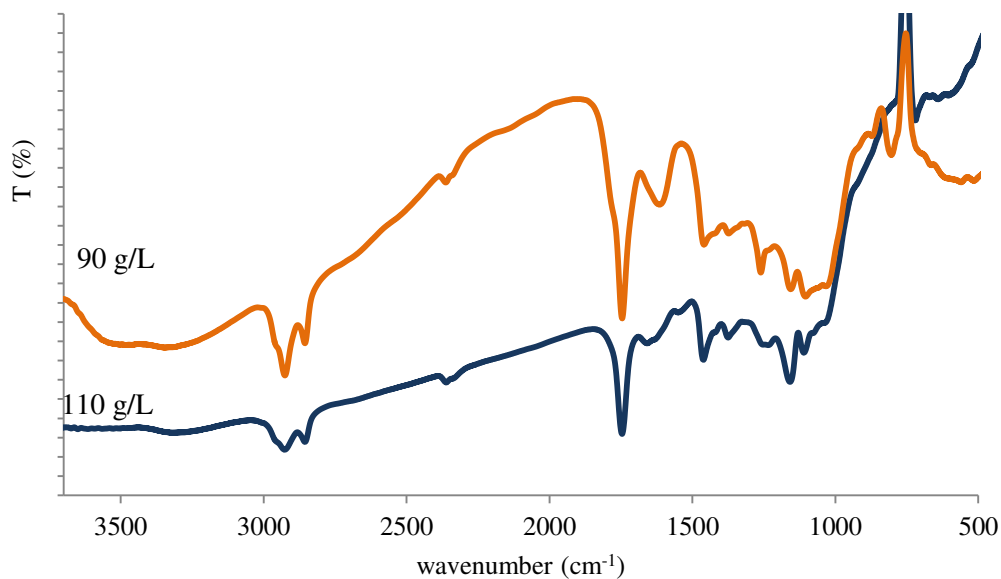
Važno je napomenuti da su uzorci nacijepljenih kefirnih zrnaca uzgojeni tradicionalnim načinom, pri čemu nije bio određivan mikrobiološki sastav uzoraka. Nekoliko istraživanja je potvrdilo mikrobne vrste koje se nalaze unutar zrnaca kao stabilnu simbiozu nekoliko rodova laktobacila, bakterija octene kiseline i kvasaca (Neve i Heller, 2002; Pidoux, 1989). 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 (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.

4.5. FT-IR

S ciljem analize egzaktnih vrijednosti masenih udjela vodenih kefirnih zrnaca, napravljene su analize putem FT-IR spektroskopije. FT-IR spektroskopska analiza je tehnika koja omogućava dobivanje informacija o kemijskim vezama u strukturama različitih materijala, bili oni organskog ili anorganskog podrijetla. S obzirom na kompleksnost ispitivane strukture (biljne ili bakterijske), FT-IR analiza omogućava dobivanje dragocjenih informacija o udjelu amorfne strukture molekula (Movasaghi i sur., 2008).

Rastezne vibracije hidroksilnih skupina alkohola pojavljuju se kao široke apsorpcijske vrpce u području 3200 do 3600 cm^{-1} . Slobodna hidroksilna skupina registrira se kao uska vrpca kod približno 3600 cm^{-1} , a obično se zamjećuje širok signal koji odražava vodikovu vezu između hidroksilnih skupina molekula alkohola. U IR-spektrima dva uzorka (Slika 18), vidljiva je apsorpcijska vrpca pri 3350 cm^{-1} koja se pripisuje hidroksilnoj skupini. Intenzitet tih apsorpcijskih vrpce je i širok, što može ukazivati na prisutnost slobodnih hidroksilnih skupina u spojevima koji se nalaze u ispitivanim uzorcima. Alkani (zasićeni spojevi) imaju apsorpcijske vrpce između 2800 i 3000 cm^{-1} jer je to područje svojstveno za rastezne frekvencije veze C–H. U frakcijama su vidljive vrpce slabog intenziteta oko 2936 cm^{-1} , što se pripisuje rasteznoj frekvenciji veze C–H. Apsorpcijske vrpce u dijelu spektra od 1030 do 1100 cm^{-1} odgovaraju rasteznoj frekvenciji jednostruke veze C–O. U frakcijama je vidljiva srednje jaka apsorpcijska vrpca oko 1042 cm^{-1} , a može se pripisati esterskoj vezi prisutnoj u ugljikohidratima. Asignirana apsorpcijska vrpca puno slabijeg intenziteta, pri 669 cm^{-1} u spektrima svih ekstrakta potvrđuje prisutnost glikozidne veze.

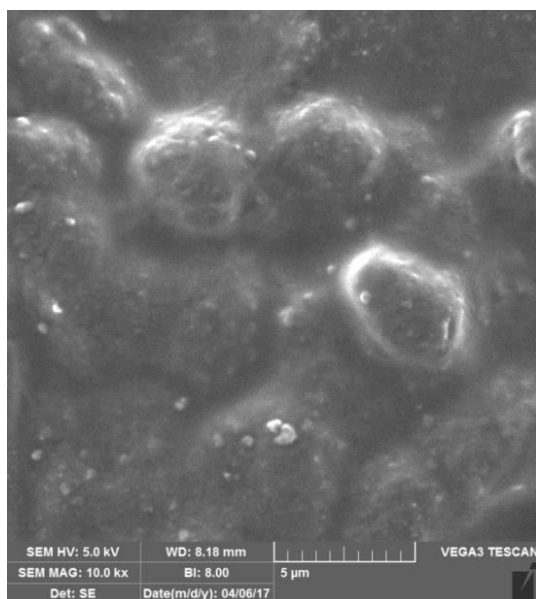


Slika 18. FT-IR spektri vodenih kefirnih zrnaca sintetiziranih fermentacijom mineralne vode s dodanim suhim brusnicama (90 i 110 g/L saharoze).

4.6. Morfologija površine vodenih kefirnih zrnaca

4.6.1. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Površina vodenih kefirnih zrnaca snimana je pretražnim elektronskim mikroskopom. Na Slici 19 jasno su vidljive stanice bakterija i kvasaca na površini vodenih kefirnih zrnaca.



Slika 19. SEM snimka površine vodenih kefirnih zrnaca nakon 14 dana fermentacije vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica i s koncentracijom šećera 70 g/L.

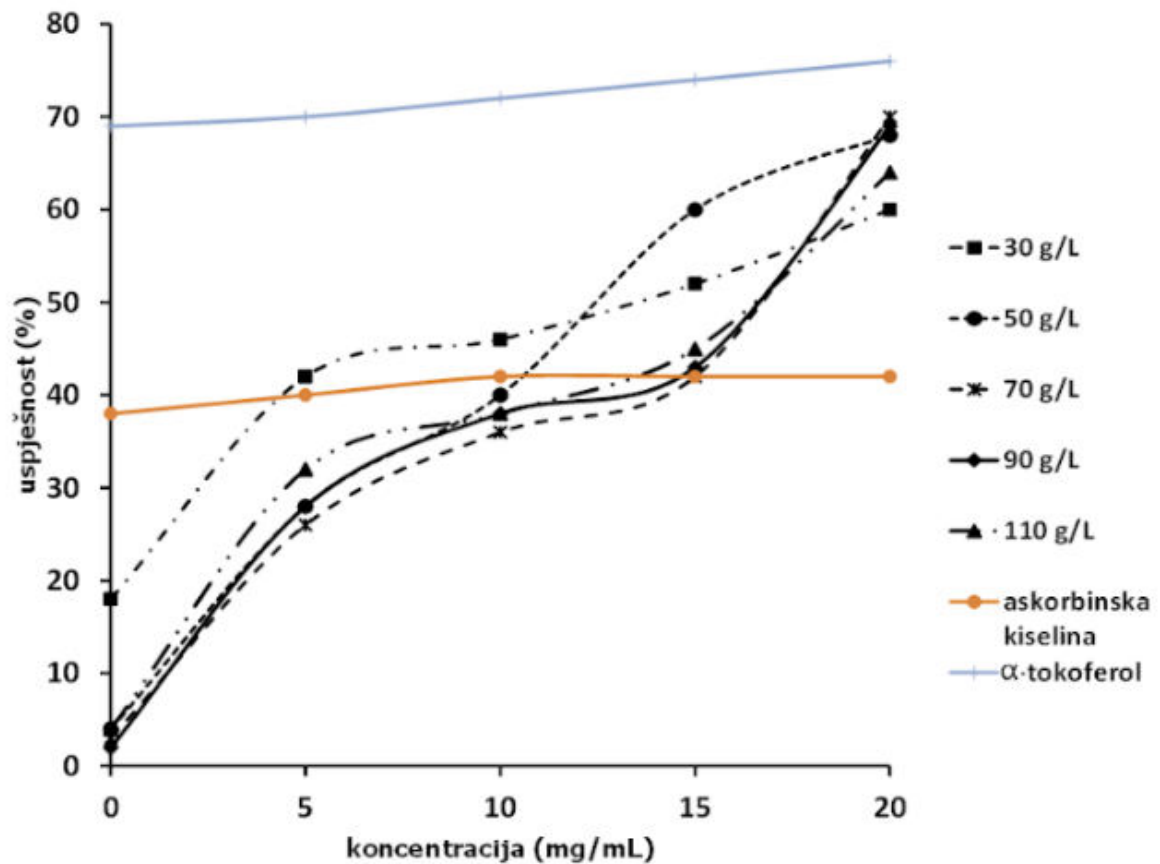
4.7. Antioksidacijski kapacitet fermentiranog napitka

Antioksidacijska aktivnost prirodnih sastojaka se u posljednje vrijeme pojačano proučava zahvaljujući potražnji farmaceutskih i prehrambenih industrija, koje pokazuju sve veći interes za prirodne bioaktivne sastojke kojima se poboljšava ljudsko zdravlje (Smith i sur., 2015).

Fenolni spojevi su glavni antioksidacijski sastojci kojima biljke obiluju, kao s drugim jakim antioksidansima (askorbinska kiselina, β -karoten, likopen i α -tokoferol) (Barros i sur., 2008).

4.7.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

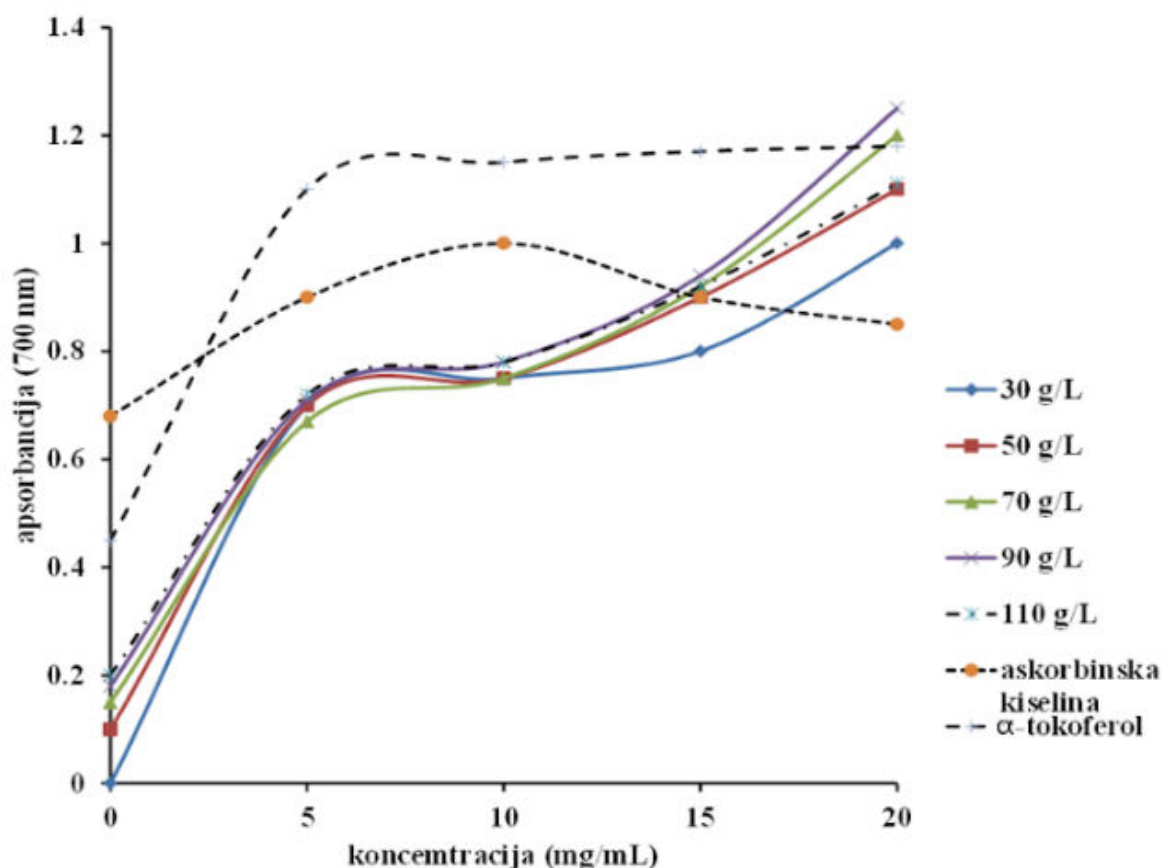
Vežanje proton-radikala smatra se važnim mehanizmom za postizanje antioksidacije. Određivanje sposobnosti vežanja proton-radikala s DPPH je relativno jednostavno i izrazito ponovljivo, budući da se ovaj spoj stehiometrijski obezboji. Smanjenje koncentracije DPPH omogućava praćenje smanjenja apsorbancije (A_{700} nm), pri čemu se može odrediti sposobnost vežanja proton-radikala (Yamaguchi i sur., 1998). Slika 20 prikazuje aktivnost DPPH radikala pri različitim koncentracijama šećera u fermentiranim napitcima. Svi uzorci su pokazali vrlo zadovoljavajuću sposobnost vežanja slobodni radikala.



Slika 20. Sposobnost vezanja slobodnih radikala napitka dobivenog fermentacijom vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica i različitim koncentracijama saharoze.

4.7.2. Reducirajuća snaga

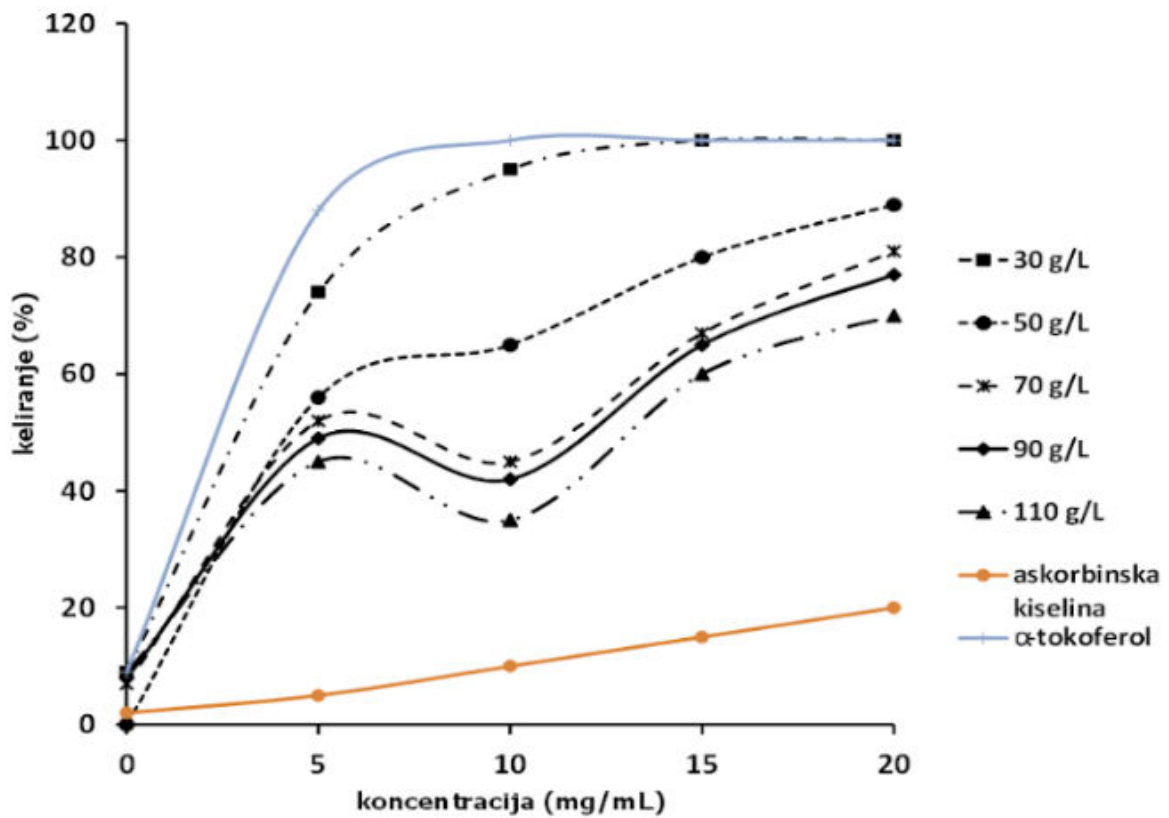
Prema literaturi, neka istraživanja su pokazala da reducirajući kapacitet različitih sastojaka može poslužiti kao značajni indikator njihove potencijalne antioksidacijske aktivnosti (Meir i sur., 1995). Zbog toga je bilo važno izmjeriti reducirajuću snagu fermentiranog napitak da bi odredili odnos između antioksidacijskog kapaciteta i reducirajuće snage uzoraka.



Slika 21. Reducirajuća snaga napitka dobivenog fermentacijom vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica i različitim koncentracijama saharoze.

4.7.3. Sposobnost keliranja iona željeza

Željezo, najzastupljeniji tranzicijski metalni ion u našem tijelu, može djelovati kao katalizator za stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva u patološkim uvjetima. Reducirani oblik željeza pojačava toksičnost kisika, konvertirajući preko Fentonove reakcije manje reaktivni vodikov peroksid do reaktivnijih kisikovih spojeva, hidroksid radikala i željeznih iona. Zbog toga nije začuđujuće da se povećanjem koncentracije željeza smatra povezanim s karcinogenim i krvožilnim bolestima (Toyokuni, 2002). Kelirajuća aktivnost željeznih iona je prikazana na Slici 22. Vidljivo je da je veća sposobnost keliranja postignuta pri nižim koncentracijama šećera (30 i 50 g/L), dok su više koncentracije (70, 90 i 110 g/L) imale podjednaku sposobnost keliranja prema ionima željeza.



Slika 22. Sposobnost keliranja željeza dobivenog fermentacijom vodenih kefirnih zrnaca u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica i različitim koncentracijama saharoze.

5.ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

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 14 dana s „domaćom“ kulturom vodenih kefirnih zrnaca, uz dodatak 30 g suhih brusnica 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 *E. coli*, *B. subtilis* i *S. typhimurium*, kao i na kvasac vrste *C. albicans*, dok na bakteriju *S. aureus* nije antimikrobno djelovao.
5. FT-IR spektroskopskom analizom je dokazana blaga kristalinična struktura vodenih kefirnih zrnaca uzgojenih u mineralnoj vodi s dodatkom suhih brusnica pri svim koncentracijama dodane saharoze.
6. Istraživanjem antioksidacijskog kapaciteta fermentiranog napitka dokazano je da je vrlo bogat izvor fitokemikalija, kao što su askorbinska kiselina i α -tokoferol, koji posjeduju važna antioksidacijska svojstva i čine ga visokovrijednom namirnicom.

6. LITERATURA

- Assadi, M. M., Pourahmad, R., Moazami, N. (2000) Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 541-543.
- Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira., I. C. F. R. (2008) Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 3856-3862.
- Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2012). Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *J. Food. Biochem.* **37**, 231–236.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2001) Kohlenhydrate. U: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. izd., Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, str. 236-329.
- Bergey, H., Holt, J. (1994) Group I the Spirochetes. U: Bergey's manual of determinative bacteriology, 9. izd. (Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A. i sur., ured.) Williams & Wilkins, Baltimore, str. 27-38.
- Beshkova, D., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I., Spasov, Z. N. (2002) Pure cultures for making kefir. *Food Microbiol.* **19**, 537-544.
- Blanc, P. J. (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol. Lett.* **18**, 139-142.
- Bottazzi, V., Bianchi, F. (1980) A Note on Scanning Electron Microscopy of Microorganisms associated with the Kefir Granule. *J. Appl. Microbiol.* **48**, 265-268.
- Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **87**, 113–130.
- Chen, C., Liu, B. Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 834-839.
- Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C. (2003) Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.* **81**, 249-255.

Carneiro, R. P. (2010) Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir. Belo Horizonte, Brasil, p.142. (M.Sc. Dissertation. Faculdade de Farmácia. UFMG).

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

Chifiriuc, M.C., Cioaca, A. B., Lazar, V. (2011) In vitro assay of the antimicrobial activity of kefir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe* **17**, 433-435.

De Vrese, M., Keller, B., Barth, C. A. (1992) Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial beta-galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. *Br. J. Nutr.* **67**, 67-75.

De Vuyst, L., Degeest, B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 153-177.

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., Almeda, M. L. M. (1994) Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 161-169.

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 Microbiol. Lett.* **320**, 56-62.

Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W. (2005) *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. izd., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Farnworth, E. (2005) Kefir – a complex probiotic. *Food Sci. Technol.* **2**, 1-17.

Farnworth, E. R., Mainville, I. (2008) Kefir – A Fermented Milk Product. In: Farnworth, E. R. 2. izd., Handbook of Fermented Functional Foods. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, str. 89-127.

Franzetti, L., Galli, A., Pagani, M. A., De Noni, L. (1998) Microbiological and chemical investigations on “Sugar Kefir” drink. *Ann. Microbiol. Enzimol.* **48**, 67-80.

Furukawa, N., Liyama, R., Takahashi, T., Yamanka, Y. (1992) The effect of oral administration of water soluble fraction from kefir grain on antibody production in mice. *Anim. Sci. Technol.* **63**, 428-436.

Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. (1997) Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. *Leben. Wiss. Technol.* **30**, 77-84.

Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. (1998) Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. *J. Dairy Res.* **65**, 149-154.

Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. (2010) Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In F. Mozzi, R. R. Raya & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications*, str. 327-340. Iowa: Blackwell Publishing.

Goyal, R. K. (1999) *Biochemistry of fermentation*. U: *Biotechnology: Food fermentation Volume 1*, Educational Publishers & Distributors, New Delhi.

Greenwalt, C. J., Ledford, R. A. L., Steinkraus, K. H. (1998) Determination and characterization of the anti-microbial activity of the fermented tea Kombucha. *Lebensm. Wiss. Technol.* **31**, 291-296.

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. *J.Appl. Microbiol.* **4**, 1–10.

Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *Int. J. Food Microbiol.* **151**, 284–288.

Güven, A., Gülmez, M. (2003) The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *J. Vet. Med.* **50**, 412-416.

Guzel-Seydim, Z., Wyffels, J. T., Seydim, A. C., Greene, A. K. (2005) Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *Int. J. Dairy Technol.* **58**, 25-29.

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, V. P., Chen, V. J. (2010) The antiallergic effect of kefir lactobacilli. *J. Food Sci.* **75**, 244-253.

Huseini, H. F., Rahimzadeh, G., Fazeli, M. R., Mehrazma, M., Salehi, M. (2012) Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns* **38**, 719-723.

Jay, J. M. (1992b) History of Microorganisms in Food. *Modern Food Microbiology*, 4. izd., New York.

Jianzhong, Z., Liu, X., Jiang, H., Dong, M. (2009) Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.* **26**, 770-775.

Kaditzky, S. B. (2008) Sucrose metabolism in lactobacilli and bifidobacteria. Technische Universität München, München.

Kubo, M., Odani, T., Nakamura, S., Tokumaru, S., Matsuda, H. (1992) Pharmacological study on kefir a fermented milk product in Caucasus. I. On antitumor activity. *Yakugaku Zasshi* **112**, 489-495.

La Rivière, J. W. M., Kooiman, P. (1967) Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Microbiol.* **59**, 269-278.

Leite, A. M. O., Mayo, B., Rachid, C. T. C. C., Peixoto, R.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F, Delgado, S. (2012) Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol.* **31**, 215-221.

Lin, C. W., Chen, H. L., Liu, J. R. (1999) Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Aust. Journal of Dairy Tech.* **54**, 14-18.

Liu, J. R., Wang, S. Y., Lin, Y. Y., Lin, C. W. (2002) Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutr. Cancer* **44**, 183-187.

- 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 soyamilkkefir in cholesterol-fed hamsters. *Br. J. Nutr.* **95**, 939-946.
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., Garaizar, J. (2006) Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev. Iberoam Micol.* **23**, 67-74.
- Magalhães, K. T., Pereira, G. V. M., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2010a) Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1241-1250.
- Magalhães, K. T., Pereira, M. A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J. A., Silva, J. B. A., Schwan, R. F. (2010b) Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresour. Technol.* **101**, 8843-8850.
- Magalhães, K. T., Pereira, G. V. M., Campos, C. R., Dragone, G., Schwan, R. F. (2011) Brazilian Kefir: Structure, Microbial Communities and Chemical Composition. *Braz. J. Microbiol.* **42**, 693-702.
- Mainville, I., Robert, N., Lee, B., Farnworth, E. R. (2006) Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 59-68.
- Marquina, D., Santos, A., Corpas, I., Munoz, J., Zazo, J., Peinado, J. M. (2002) Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 136-140.
- Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, K. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Ferment. Bioeng.* **75**, 18-22.
- Medrano, M., Racedo, S. M., Rolny, I. S., Abraham, A. G., Perez, P. F. (2011) Oral Administration of Kefiran Induces Changes in the Balance of Immune Cells in a Murine Model. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5299-5304.
- Meir, S., Kanner, L., Akiri, B., Philosoph-Hadas, S. (1995) Determination and involvement of aqueous reducing components in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1813-1819.

- 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 ATTC 53524. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 576-583.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I. (2008) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* **43**, 134-179.
- Neve, H., Heller, K. J. (2002). The microflora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* **54**, 337-349.
- Otles, S., Cagindi, O. (2003) Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan J. Nutr.* **2**, 54-59.
- Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutrition.* **44**, 307-315.
- Ozer, B. H., Kirmaci, H. A. (2010) Functional milks and dairy beverages. *Int. J. Dairy Technol.* **63**, 1-15.
- Öner, Z., Karahan, A. G., Çakmakçi, M. L. E. (2010) Effects of different milk types and starter cultures on kefir. *Gida* **35**, 177-182.
- Paraskevopoulou, A., Athanasiadis, I., Kanellaki, M., Bekatorou, A., Blekas, G., Kiosseoglou, V. (2003) Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Res. Int.* **36**, 431-438.
- Pidoux, M., Brillouet, J., Quemener, B. (1988) Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnol. Lett.* **10**, 415-420.
- Pintado, M. E., Da Silva, J. A. L., Fernandes, P. B., Malcata, F. X., Hogg, T. A. (1996) Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *Int. J. Food Sci. Technol.* **31**, 15-26.
- Rattray, F. P., O'Connell, M. J. (2011) Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W., Encyclopedia of Dairy Sciences, 2. izd., Academic Press, San Diego, USA, str. 518-524.

- Rea, M. C., Lennartsson, T., Dillon, P., Drina, F. D., Reville, W. J., Heapes, M., Cogan, T. M. (1996) Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *J. Appl. Microbiol.* **8**, 83-94.
- Reiss, J. (1994) Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z. Lebensm. Unters. For.* **198**, 258-261.
- Rodrigues, K. L., Caputo, L. R., Carvalho, J. C., Evangelista, J., Schneedorf, J. M. (2005) Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**, 404-408.
- Rossi, J., Gobetti, M. (1991) Impiego di un multistarter per la produzione in continuo di kefir (Vol. 41). Milano, ITALIE: Dipartimento di scienze e tecnologie alimentari e microbiologiche dell' Università degli studi di Milano.
- Roussin, M. R. (1996). Analyses of Kombucha ferments: report on growers. Information Resources, LC, Salt Lake City, Utah.
- Russel, R. R. B. (2009) Bacterial polysaccharides in dental plaque. U: Bacterial Polysaccharides (Ullrich, M., ured.), Caister Academic Press, Norfolk, str. 143-153.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. M., Marquina, D. (2003) The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 434-437.
- Sarkar, S. (2007) Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *Br. Food J.* **109**, 280-290.
- Sarkar, S, (2008) Biotechnological innovations in kefir production: a review. *Br. Food J.* **110**, 283-295.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1995). Microbiology and fermentation balance in kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 590-594.
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., Lima, A. S. (2009) Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **152**, 316-325.

- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. (2002) Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1-6.
- Smith, H., Doyle, S., Murphy, R. (2015) Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. *Food Chem.* **185**, 225-234.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knool, W. (2000) Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2589-2594.
- Stadie, J. (2013) Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir. Doctoral dissertation, Technische Universität München, München.
- St-Onge, M. P., Farnworth, E., Savard, T., Chabot, D., Mafu, A., Jones, P. (2002) Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complement. Altern. Med.* **2**, 1.
- Tamime, A.Y. (2006) Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime, A.Y., *Fermented Milk* Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, str. 174-216.
- Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. (2004). Yeast ecology of kombucha fermentation. *Int. J. Food. Microbiol.* **95**, 119–126.
- Thoreux, K., Schmucker, D. L. (2001) Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *J. Nutr.* **131**, 807-812.
- Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., Tadakatsu, S. (1989) The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**, 123-125.
- Toyokuni, S. (2002) Iron and carcinogenesis: From Fenton reaction to target genes. *Redox Rep.* **7**, 189-197.
- Tseng, Y. M. T., Mau, L. R. C. (2007) Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT-Food Sci. Technol.* **40**, 255-261.

- Van Geel-Schutten, G. H., Faber, E. J., Smit, E., Bonting, K., Smith, R., Brink, B. Ten, Kamerling, J. P., et al. (1999) Biochemical and Structural Characterization of the Glucan and Fructan Exopolysaccharides Synthesized by the *Lactobacillus reuteri* Wild-Type Strain and by Mutant Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (7), 3008–3014.
- Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Thangavel, D., Farnworth, E., Matar, C. (2006) Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology* **211**, 149-156.
- Waldherr, Florian, Wolfgang (2009) Comparative analysis of fructosyltransferases of lactobacilli. TU München.
- Wang, Y., Xu, N., Xi, A., Ahmed, Z., Zhang, B., Bai, X. (2009) Effects of *Lactobacillus plantarum* M, A2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 341-347.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoda, T., Terao, S. (1998) HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1201-1204.
- Zacconi, C., Scolari, G., Vescovo, M., Sarra, P. G. (2003) Competitive exclusion of *Campyloacter jejuni* by kefir fermented milk. *Ann. Microbiol.* **53**, 179-187.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ana Besednik

Ime i prezime studenta