

Vodeni kefir - alternativni probiotički napitak

Vidan, Valerija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:524839>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-14**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Valerija Vidan
0058217916

**VODENI KEFIR – ALTERNATIVNI PROBIOTIČKI NAPITAK
ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: Prof.dr.sc Sunčica Beluhan

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Vodeni kefir - alternativni probiotički napitak

Valerija Vidan, 0058217916

Sažetak: Vodeni je kefir osvježavajuće, kiselkasto piće dobiveno fermentacijom šećerne otopine uz dodatak voća ili drugih namirnica, pomoću zrnaca vodenog kefir. Zrnca vodenog kefir simbiotska su zajednica bakterija mliječne i octene kiseline, kvasaca i drugih mikroorganizama unutar polisaharidnog matriksa od dekstrana i levana. Vodeni kefir u Republici Hrvatskoj ne proizvodi se komercijalno zbog nestabilnosti zrnaca, ali se proizvodi u "kućnim" fermentacijama. Sastav, izgled i okus konačnog proizvoda ovisi o uporabljenom supstratu i podrijetlu zrnaca. Iako je mliječni kefir popularnija varijanta, vodeni kefir ima velik potencijal jer je prikladan i za vegane, vegetarijance i ljude koji ne podnose laktozu. Cilj ovog rada je ukazati na nutritivnu i probiotičku vrijednost vodenog kefir.

Ključne riječi: vodeni kefir, fermentacija, bakterije mliječne kiseline, bakterije octene kiseline, kvasci

Rad sadrži: 21 stranica, 3 slike, 1 tablicu, 15 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical engineering
Laboratory for Biochemical engineering, industrial microbiology, malting and brewing
technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Water kefir – alternative probiotic beverage

Valerija Vidan, 0058217916

Abstract: Water kefir is a refreshing, sour drink obtained by fermenting of water sugar solution with the addition of fruit or other foods, using water kefir grains. Water kefir grains are a symbiotic community of lactic and acetic acid bacteria, yeasts and other microorganisms within a polysaccharide matrix of dextran and levan. Water kefir in the Republic of Croatia is not produced commercially due to the instability of the grains, but it is produced in "home" fermentations. The composition, appearance and taste of the final product depends on the substrate used and the origin of the grains. Although milk kefir is the more popular variant, water kefir has great potential as it is also suitable for vegans, vegetarians and people who are lactose intolerant. The aim of this work is to point out the nutritional and probiotic value of water kefir.

Keywords: water kefir, fermentation, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, yeasts

Thesis contains: 20 pages, 3 figures, 1 table, 15 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Sunčica Beluhan, PhD, Full Professor

Thesis defended:

Sadržaj

1.UVOD.....	1
2.TEORIJA.....	2
2.1. POVIJEST.....	2
2.2.ZRNCA VODENOG KEFIRA.....	2
2.2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE.....	3
2.2.2. BAKTERIJE OCTENE KISELINE.....	4
2.2.3. OSTALE BAKTERIJE.....	4
2.2.4. KVASCI.....	5
2.3.SUPSTRATI.....	5
2.4.FERMENTACIJA.....	6
2.5.ANALIZA PROIZVODA.....	8
2.5.1. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA.....	8
2.5.2. KEMIJSKA ANALIZA.....	9
2.5.3. SENZORSKA ANALIZA.....	11
2.6.UTJECAJ NA ZDRAVLJE.....	11
2.6.1. PROBIOTIČKA SVOJSTVA.....	12
2.6.2. PREBIOTIČKA SVOJSTVA.....	13
2.6.3. VITAMINI I MINERALI.....	13
2.6.4. UKLANJANJE MIKOTOKSINA.....	14
2.7.USPOREDBA MLIJEČNOG I VODENOG KEFIRA.....	14
3.ZAKLJUČCI.....	18
4. POPIS LITERATURE.....	19

1. UVOD

Probiotici su živi organizmi koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje kada se konzumiraju u adekvatnim količinama (Hill i sur., 2014), a njihova upotreba u fermentiranim namirnicama ima dugu povijest. Proces fermentacije jedan je od najstarijih metoda čuvanja hrane, a bazira se na činjenici da se tijekom samog procesa snižava pH što inhibira rast neželjenih mikroorganizama. Fermentirana hrana i piće konzumira se tisućama godina po cijelom svijetu, a najpopularniji su pivo, vino, sirevi, *kombucha*, ocat i kefir (de Oliviera i sur., 2022). Vodeni je kefir voćno, kiselkasto, lagano gazirano tradicionalno fermentirano piće s do 2% sadržaja mliječne kiseline i uobičajeno ispod 1% etanola (Cufaoglu i Erdinc, 2023). Dobiven je iz kefirnih zrnaca, fermentiranih uz različitog voća, povrća, žitarica, orašastih plodova te mlijeka na biljnoj bazi, što ovu namirnicu čini važnim izvorom probiotika za vegetarijance, ali i ljude koji ne podnose laktozu, a ima antimikrobna, protuupalna, antioksidativna, antihiperглиkemijska i antidijabetička svojstva (Güzel-Seydim i sur., 2023). Dobiva se fermentacijom vodene šećerne otopine sa zncima vodenog kefira koja sadrže bakterije mliječne kiseline kao što su *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus nagelii*, bakterije octene kiseline kao *Acetobacter lovaniensis* te kvasci poput *Saccharomyces cerevisiae* (Güzel-Seydim i sur., 2023) unutar polisaharidnog matriksa, za razliku od npr. jogurta koji sadrži samo bakterije mliječne kiseline i koji se ne fermentira sa zncima (Dahiya i Nigam, 2023). Iako je jogurt popularniji probiotički proizvod, upravo zbog toga što sadrži samo bakterije mliječne kiseline, kefir je efikasniji izvor probiotika jer sadrži simbiotsku mješavinu probiotskih organizama (Dahiya i Nigam, 2023).

Vrijeme fermentacije, temperatura, vrsta i koncentracija izvora ugljika te mineralna svojstva korištene vode, imaju najveći utjecaj na završni proizvod, a korištenjem različitog voća i povrća dobivamo različiti udio određenih nutrijenata (Güzel-Seydim i sur., 2023). Proizvodnja vodenog kefira limitirana je na manje pogone koji svoje proizvode prodaju u lokalnim dućanima zdrave prehrane zbog nestabilnosti procesa fermentacije i varijabilnosti kvalitete proizvoda (Laureys i sur., 2017). Fermentacijom dobivamo dva konačna proizvoda, a to su fermentirano piće – vodeni kefir i kefirna zrnca koja se nakon izdvajanja mogu skladištiti te ponovno koristiti (Dahiya i Nigam, 2023). Države u kojima se vodeni kefir najviše konzumira su SAD, Meksiko i Kanada u Sjevernoj Americi, u Europi Francuska, Grčka, Turska, Rumunjska, Belgija, Ujedinjeno Kraljevstvo, Portugal, Španjolska, Nizozemska, Švedska i Norveška te Brazil, Argentina, Čile i Peru u Južnoj Americi (Moretti i sur., 2022). Konzumacija vodenog kefira porasla je tijekom pandemije COVID-a-19, a očekuje se i povećanje tržišta sa \$1.23 milijarde (2019) na \$1.84 milijardi do 2027. (Moretti i sur., 2022).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POVIJEST VODENOG KEFIRA

Zbog manjka povijesnih podataka, povijest vodenog kefira nije sasvim poznata. Riječ „kefir“ izveden je iz turske riječi „keyif“ koja se odnosi na „dobar osjećaj nakon jela“ (Dahiya i Nigam, 2023). Smatra se da se zrnca kefira koriste stoljećima, a prvobitno su korištena kao temeljna stočna hrana u mnogim zajednicama dok zbog svojstava poput bogatstva nutrijenata i regulacije probavnog sustava radi dobrih izvora probiotika, kefir nije postao popularno piće korišteno u ljudskoj prehrani. Kombinacijom istraživanja i spekulacija, smatra se da vodeni kefir potječe iz Meksika, gdje je 1899. M.L. Lutz dokumentirao njegovu prisutnost u prirodno ošerećenoj vodi jedne vrste kaktusa. Drugi izvori govore da vodeni kefir potječe iz Tibeta, a postoje i izvori koji statiraju da su britanski vojnici donijeli vodeni kefir u Europu nakon Krimskog rata. Smatra se da se u tim izvorima zapravo radi o takozvanom „ginger beer plant“ koji je sličan zrnima vodenog kefira, ali je zasebna kultura. Nalaze se i na Kavkazu, odakle potječu zrnca mliječnog kefira. Nazivi za zrnca vodenog kefira razlikuju se od države do države a neki od njih su „Tibi“, „Tibicos“, „Granillo“, „Tibi-complex“ (meksički nazivi), „Arroz de indio“, „Indiecitos“ (kolumbijski nazivi), „Californian bees“, „Japanese Beer Seeds“, „California Bees' Beer“, „American kephir“, „Bees“, „BeBées“ (američki i kanadski nazivi) i „Ginger beer plants“ (naziv na Britanskim otocima). Vodeni kefir kao piće u Meksiku nazivaju „Colonche“, „Tepache de tibicos“ i „Vinagre de tibicos“, u Francuskoj „Sugary kefir“, u Grčkoj „Ginger Beer“, u Italiji „Kefir d'uva“ te u istočnoj Africi (uglavnom Keniji i Tanzaniji), angawizi (Moretti i sur., 2022).

2.2. ZRNCA VODENOG KEFIRA

Zrnca vodenog kefira želatinaste su strukture nepravilnog oblika poput cvjetače (slika 1) promjera 5 do 20 mm (Lynch i sur., 2021). Krhka su i deformiraju se pod pritiskom, a varijaju od prozirne do bijele i žućkaste boje ovisno o tipu šećera i voća dodanog u otopinu (Cufaoglu i Erdinc., 2023). Ona su zapravo kompleksne strukture sačinjene od bakterija mliječne kiseline, bakterija octene kiseline, drugih bakterija i kvasaca (Lynch i sur., 2021) sadržanih unutar matriksa od polisaharida (uglavnom dekstrana i u manjem udjelu levana) koje proizvode bakterije, specifično *Lactobacillus hilgardii*. Rast matriksa također pridonosi povećanju mase kefirnih zrnaca (Cufaoglu i Erdinc., 2023). Dekstran i levan su biomolekule koje potencijalno mogu biti korištene kao funkcionalni

prehrambeni aditivi, a dekstrani su također prepoznati kao bioaktivne komponente s potencijalom za titulu prebiotika (Moretti i sur., 2022).

Svaki gram zrnca vodenog kefira sadrži otprilike 10^8 CFU (eng. *Colony Forming Units*) bakterija mliječne kiseline, 10^6 - 10^8 CFU bakterija octene kiseline i 10^6 - 10^7 CFU kvasaca (Cufaoglu i Erdinc, 2023). Dobar su izvor kalija, kalcija, natrija, magnezija, željeza i bakra. Ako ih je nužno skladištiti, preporuča se otopina šećera pri +4 °C. Ustanovljeno je da ako se otopina skladišti 30 dana, broj se živih laktokoka, bifidobakterija i kvasaca može značajno smanji (Gökırmaklı Ç i sur., 2024).



Slika 1. Zrnca vodenog kefira (Cufaoglu & Erdinc, 2023)

2.2.1. Bakterije mliječne kiseline

Najčešće vrste bakterija mliječne kiseline pronađene u vodenom kefiru uključuju *Lactobacillus hilgardii*, *L. nagelii*, *L. casei* i *L. paracasei*. *L. hilgardii* i *L. nagelii* smatraju se ključnim vrstama populacije vodenog kefira zbog proizvodnje egzopolisaharida. Uočena je razlika u sastavu zrnaca vodenog kefira u različitim zemljama. Naime, *L. hilgardii* pronađen je u svim istraživanjima provedenim na belgijskom vodenom kefiru, ali samo u jednom od dva njemačka istraživanja te jednom od tri brazilska istraživanja. Također, *L. nagelii* nađen je u svim belgijskim i njemačkim istraživanjima, a samo u jednom od četiri južnoamerička (Brazil i Meksiko) dok su *L. casei* i *L.*

paracasei istaknute vrste u brazilskim, odnosno meksičkim zrnima, a odsutni u njemačkim i belgijskim (s iznimkom u jednom istraživanju). Rjeđe pronađene, ali i dalje poprilično zastupljene vrste bakterija mliječne kiseline su *L. hordei*, nađen samo u europskim zrnima te *L. satsumensis* nađen u brazilskim, njemačkim i belgijskim zrnima. Vrste nađene u jednom ili dva istraživanja uključuju *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. harbinensis* (identificiran u svim belgijskim istraživanjima), *L. buchneri* i *L. kefir* (nađeni u brazilskim zrnima) (Lynch i sur., 2021).

Osim roda *Lactobacillus*, rodovi bakterija mliječne kiseline prisutni u zrnima vodenog kefir su *Leuconostoc*, *Bifidobacteria*, *Oenococcus*, *Pediococcus* i *Lactococcus*. *Leuc. mesenteroides* i *Leuc. citreum* nađeni su u francuskim i njemačkim zrnima, a *Leuc. pseudomesenteroides* u jednom belgijskom istraživanju. *Bifidobacteria*, specifično vrste *B. psychraerophilum*, *B. aquikefir* i *B. tibiigranuli*, nađeni su samo u zrnima podrijetlom iz Europe. Vrste roda *Oenococcus* su *O. Oeni*, *O. kitaharae* i *O. sicerae*. *Pediococcus* vrste identificirane su samo u jednom istraživanju, a od roda *Lactococcus* ističe se *L. lactis* (Lynch i sur., 2021).

Razlika u prisutnosti različitih bakterija mliječne kiseline u zrnima vodenog kefir u različitim geografskim regijama može indicirati na različito podrijetlo zrnaca. Također, uočena je razlika u sastavu zrnaca ovisno o korištenim supstratima što znači da zrnca vodenog kefir inicijalno sadrže velik broj različitih mikroorganizama od kojih određeni počnu dominirati tijekom fermentacije (Lynch i sur., 2021).

2.2.2. Bakterije octene kiseline

Najzastupljeniji rod bakterija octene kiseline je *Acetobacter*. *A. lovaniensis* i *A. fabarum* detektirani su u tri istraživanja, *A. orientalis* u dva te *A. tropicalis*, *A. indonesiensis* i *A. okenawensis* u jednom. Osim roda *Acetobacter*, pronađeni su i rodovi *Gluconobacter* i *Gluconoacetobacter*. *G. liquefaciens* i *G. roseus/oxydans* nađeni su u zrnima vodenog kefir iz Belgije i Brazila (Lynch i sur., 2021). Prisutnost bakterija octene kiseline najviše ovisi o količini dostupnog kisika (Zannini i sur., 2023).

2.2.3. Ostale bakterije

Najznačajnija bakterija, koja ne pripada skupinama bakterija mliječne i octene kiseline, je *Zymomonas mobilis*. To je gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija štapičastog oblika, koja proizvodi etanol, konkurirajući kvascu *Saccharomyces cerevisiae* u prinosu (Lynch i sur., 2021).

2.2.4. Kvasci

Raznolikost kvasaca u zrcima vodenog kefiru manja je nego ona u bakterija. Dominira kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, nađen u gotovo svim istraživanjima, a ostale vrste istog roda uključuju *S. florentinus*, *S. pretoriensis* i *S. bayanus*. Drugi najzastupljeniji rod je *Dekkera*, međutim on je nađen gotovo ekskluzivno u belgijskim istraživanjima što znači da je njegova zastupljenost pristrana geografskom ograničenju, a značajne vrste su *D. bruxellensis* i *D. anomala*. Za razliku od roda *Dekkera*, vrste rodova *Zygorulaspota* i *Hanseniaspora* šire su zastupljene, s tim da *Zygorulaspota* nije nađen u zrcima iz Južne Amerike, a *Hanseniaspora* u zrcima Južne Amerike i Belgije. Predstavnik roda *Zygorulaspota* je *Z. florentina*, a od roda *Hanseniaspora* identificirani su *H. valbyensis* i *H. vinae*. Rod *Lachancea*, primarno *Lac. fermentati*, također je identificirana na više lokacija, uključujući Brazil, Njemačku i Ujedinjeno Kraljevstvo, dok su vrste roda *Candida* (*C. ethanolica*, *C. valida*, *C. lambica*, *C. californica* i *C. valdiviana*) identificirane uglavom u zrcima iz Južne Amerike, ali i Francuskoj i Tajlandu (Lynch i sur., 2021).

Rjeđe pronađeni kvasci rodovi su *Torulaspota* (*T. pretoriensis*) – nađen u zrcima iz Francuske, Italije, Ujedinjenog Kraljevstva i SAD-a, *Pichia* (*P. cecembensis*, *P. membranifencis*, *P. caribbica*, *P. fermentans*), *Yarrowia* (*Y. lipolytica*) i *Kluyveromyces* (*Kl. lactis*) – nađeni primarno u brazilskim zrcima (Lynch i sur., 2021).

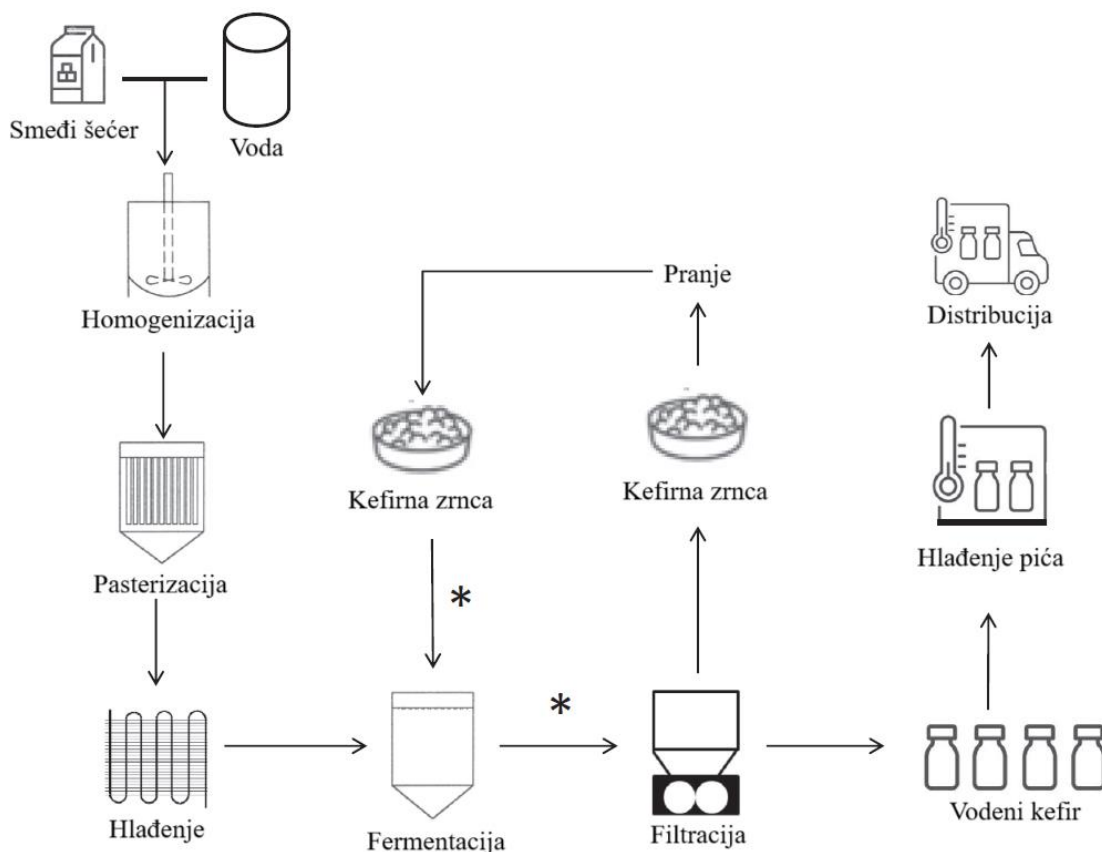
2.3. SUPSTRATI

Najčešće korišteni izvori ugljika su bijeli ili smeđi šećer dok je svježe ili sušeno voće izvor i ugljika i dušika (Lynch i sur., 2021). Rafinirani i nerafinirani šećeri različito utječu na fermentaciju, a neki od alternativnih izvora ugljika uključuju smeđi, kokosov, rafinirani i demerara šećer te melasu šećerne trske (Tavares i sur., 2023). Preferira se dodatak voćnih ekstrakata umjesto cijelog voća, a oni se mogu pripremiti standardnim postupkom i pasterizacijom. Ovisno o tom je li voće svježe ili sušeno, ima li dodane konzervanse i kako se provodi proizvodnja, moguć je doprinos potencijalno neželjenih mikroorganizama s voća u konačan proizvod, npr. *Enterobacteriacrae* i/ili *Pseudomonas*. Često se koriste sušene smokve, ponekad s dodatkom kriške limuna. Alternativni supstrati uključuju mrkvu, sjemenke soje, luk, đumbir, med, ječam, jabuke, grožđe, kivi, šipak, jagode, rajčice, kruške, dinje, dunje i ananas. Smatra se da smokve sadrže faktor koji promovira rast, a može se ekstrahirati iz hladne vode i toplinski je stabilan. Jedan od poznatih potencijalnih faktora koji promoviraju rast je kalcij, a upravo sušene smokve imaju velik udio kalcija. Također, tvrda voda (koja sadži više kalcijevih i magnezijevih iona) pogodnija je za fermentaciju od meke vode (Lynch i sur., 2021). Dakle, prilagodljivost zrnaca vodenog kefiru omogućava veliku

raznolikost korištenih supstrata, a razmatra se korištenje nusproizvoda prehrambene industrije kao supstrata za fermentaciju što pridonosi mogućnosti ostvarenja kružnog gospodarstva (Moretti i sur., 2022). Utvrđeno je da se fermentacijom u uvjetima s malom koncentracijom dušika fermentativni kapacitet zrnaca smanjuje što dokazuje smanjenje konzumacije supstrata i smanjena proizvodnja etanola i organskih kiselina, dakle dodatak voća kao izvora dušika je nužan (Zannini i sur., 2023).

Kefiri bogati proteinima su bademov kefir, kefir od indijskog oraščića, kefir od oraha, kikirikija i kefir od kombinacije jogurta i indijskog oraščića, badema ili graška. Nadalje, kefiri bogati ugljikohidratima su rižin, kokosov kefir, kefir od sjemenki lana i zobi, a kefiri bogati vitaminima, mineralima ili uljem su kefir od lješnaka, pistacija, suncokretovih sjemenki, bundevinih sjemenki, pinjola, makadamije i pekanovog oraha (Dahiya i Nigam, 2023).

2.4. FERMENTACIJA



Slika 2. Proizvodnja vodenog kefir (prema Moretti i sur., 2022)

Fermentacija predstavlja glavni dio procesa proizvodnje vodenog kefir. Proizvodnja (slika 2) uključuje dodatak zrnaca vodenog kefir u vodenu otopinu šećera (npr. smeđeg) koja se onda homogenizira i pasteurizira te inkubira na određenoj temperaturi. Nakon fermentacije zrnca se odvajaju od ostatka medija filtracijom kroz sterilno sito, peru, suše i čuvaju na 4°C u spremniku za hlađenje za iduću inokulaciju, a piće ide dalje u distribuciju. Vijek trajanja konačnog proizvoda nije jasno definiran te osim toga i drugi parametri kvalitete moraju definirani kako bi se mogao provesti „scale-up“ ovog proizvoda i regulacija (Moretti i sur., 2022).

Fermentacija se događa spontano kada se kefirna zrnca nalaze u otopini saharoze sa ili bez sušenog voća ili voćnim ekstraktom. S obzirom da je pH vodenog kefir ispod 4,5 na početku fermentacije, a dalje se snižava tijekom procesa zbog proizvodnje octene i mliječne kiseline, proces je prirodno zaštićen. Bez obzira na to, voda koja se koristi, prethodno se prokuha, a voće se guli, pere i/ili doda vodi prije nego zakuha dok se ekstrakti pasteuriziraju. Koncentracija etanola na kraju procesa (0,02-2%) također pridonosi prirodnoj zaštićenosti procesa (Lynch i sur., 2021). Fermentacija se provodi pri temperaturama od 21 do 37 °C (optimalno 20-25 °C) u mračnom okruženju, a proces traje 4 do 8 dana (Lynch i sur., 2021) i udjel zrnaca na početku iznosi 6 do 30% (tež/vol) (Moretti i sur., 2022). Na povećanje mase biomase uvelike utječu učestalost inokulacije, dostupni nutrijenti, sastav šećera, vrijeme fermentacije, temperatura i svojstva mikroorganizama (Lynch i sur., 2021). Zrnca vodenog kefir mogu se filtrirati iz otopine kroz sterilno sito na kraju procesa, osušiti i ponovno koristiti. Potvrđeno je da ukoliko se dobiveni vodeni kefir koristi za drugu fermentaciju uz dodatak voća i voćnih sokova (najčešće jabuka, ananas, limeta, limun, mango, naranča, jagoda, višnja) uz inkubaciju na 4 °C na 24 sata, dobije ukusniji konačni proizvod (Cufaoglu i Erdinc, 2023).

U kućnim fermentacijama, proces proizvodnje završava kada se dostigne željena razina kiselosti dok se u poluindustrijskoj skali mjere pH, koncentracija šećera i alkohola. U istraživačke svrhe, može se određivati koncentracija određenih organskih kiselina i šećera HPLC-om ili HPAEC-om (eng. *High Performance Anion-Exchange Chromatography*) te komponente okusa i arome plinskom ili tekućinskom kromatografijom kombiniranu s masenom spektroskopijom (Lynch i sur., 2021).

Neki od faktora koji utječu na ishode fermentacije su količina nutrijenata, puferski kapacitet, količina kisika, pH i rast zrnaca vodenog kefir. Nutrijenti utječu na rast kvasaca i bakterija mliječne kiseline tako da kada je količina nutrijenata niska, dominiraju bakterije mliječne i octene kiseline, a kada je koncentracija nutrijenata visoka, favorizira se rast kvasaca. Osim toga posljedice niske količine nutrijenata su spora fermentacija, slaba proizvodnja metabolita, visok pH, slab rast kefirnih zrnaca, dok visok udio nutrijenata rezultira brзом fermentacijom, visokom

proizvodnjom metabolita, visokim ostatkom neprevrelih ugljikohidrata, te također relativno visokim pH. Kada je puferski kapacitet nizak, vrijednosti pH su niske i rast zrnaca je slab dok pri visokim puferskim kapacitetom imamo relativno visok pH, proizvodnju metabolita i udjel zaostalog ugljika. Udjel kisika najviše utječe na bakterije octene kiseline koje su obligatni aerobi, te im je nužna visoka koncentracija kisika. Konačno, pri niskoj brzini rasta zrnaca, zrnca su na kraju fermentacije manja, a proizvodnja metabolita visoka dok su pri visokom brzini rasta zrnca veća (Lynch i sur., 2021). Otkriveno je da na rast zrnaca utječu puferski kapacitet i koncentracija kalcija jer kad oni padnu ispod određene razine usporava se rast zrnaca, a te razine se onda nazivaju kritičnima. Kalcij utječe na sintezu glukana tako da mijenja aktivnost glukansukraze koja ima mjesto za njegovo vezanje čime se regulira aktivnost tog enzima. Sukladno tome, bolji rezultati dobiveni su korištenjem tvrde vode jer ona ima veću koncentraciju kalcijevih i magnezijevih iona od meke vode. Također, mikroorganizmi poput *L. casei*, *L. nagelii*, *L. satsumensis*, *L. hordei* i *Leuc. mesenteroides* proizvode dekstran iz saharoze što pridonosi rastu zrnaca (Cufaoglu i Erdinc, 2023).

2.5. ANALIZA PROIZVODA

Supstrat korišten za fermentaciju utječe na tip i udjel proizvedenih kiselina, a one su u direktnoj ovisnosti o mikrobiološkom sastavu zrnaca vodenog kefira. Nadalje, mikrobiološki sastav ovisi o uvjetima fermentacije te je uočeno da se fermentativni kapacitet kultura smanjuje kada nastupi limitacija dušikom. Dakle kinetika i karakteristike vodenog kefira ovise o korištenom supstratu, prisutnim mikroorganizmima i uvjetima u kojima je fermentacija bila provedena (Zaninni i sur., 2023).

2.5.1. Mikrobiološka analiza

Prema istraživanju Gökırmaklı i sur. (2023), broj bakterija roda *Lactobacillus* smanjio se neznatno u čistoj vodenoj šećernoj otopini kao supstratu dok se dodatkom suhih smokvi značajno povećao. Dakle vodena otopina šećera nije sadržavala esencijalne nutrijente potrebne za njihov rast te je otopina s dodatkom smokve općenito imala raznolikiji sadržaj mikroorganizama. Broj većine laktobacila mijenjao se značajno unutar prvih 24 sata fermentacije no nakon toga nije bilo velikih promjena. Količina bakterija roda *Lactococcus* također se značajno povećala nakon prvih 24 sata i to u obje otopine, dok se između 24 i 48 sati njihov sadržaj nije puno mijenjao. Broj bakterija roda *Bifidobacterium* smanjio se tijekom prva 24 sata u otopini šećera dok se u otopini sa smokvama gotovo poduplao, a između 24 i 48 sati nije bilo znatne promjene ni u jednoj otopini.

Razlog različitoj promjeni broja bakterija mliječne kiseline u navedene dvije otopine je u tome što otopna smokve, za razliku od otopine šećera, sadrži fruktozu koja je dobar izvor ugljika za bifidobakterije i laktobacile. S druge strane, vrsta supstrata nije imala veliku ulogu u rastu kvasaca. Naime, u obje otopine u prvih 24 sata došlo je do porasta broja kvasaca, a nakon toga se njihov broj počeo smanjivati.

Što se alternativnih izvora ugljika tiče, najveći broj mikroorganizama izmjeren je u fermentacijama s melasom šećerne trske i smeđim šećerom. Najlošiji potencijal za rast bakterija imali su demerara šećer i rafinirani šećer dok je na rast kvasaca negativno utjecao kokosov šećer (Tavares i sur., 2023).

Uočena je simbiotska veza među bakterija mliječne kiseline i kvasaca. Metabolička aktivnosti bakterija rezultirala je kiselim okolišem što odgovara kvascima za rast. Također, kao rezultat kvačevih metaboličkih aktivnosti proizvedeni su esencijalni spojevi za prehranu bakterija, poput vitamina i dušičnih spojeva (Gökırmaklı i sur., 2023). Osim toga, otkriveno je da *Liquorilactobacillus hordei* može konzumirati glukonat koji je proizvod metabolizma bakterija octene kiseline roda *Gluconobacter* (Zannini i sur., 2023).

2.5.2. Kemijska analiza

U pokusu kojeg su proveli Gökırmaklı i sur. (2023) sadržaj glukoze znatno se smanjio u prva 24 sata i u vodenim otopinama s dodatkom smokve i šećernoj otopini, a zatim do kraja fermentacije nije bilo znatne promjene. Doduše, u početku se fermentacije koncentracija glukoze i fruktoze povećala jer su mikroorganizmi metabolizirali saharozu do glukoze i fruktoze, ali su ih onda dalje razgradile bakterije mliječne kiseline. Dakle koncentracija saharoze je padala tijekom fermentacije. Otopine su imale značajno različit sadržaj saharoze – vodena otopina šećera imala je puno veću koncentraciju nego otopina s dodatkom smokvi, ali u obje otopine koncentracija se smanjivala u prva 24 sata, a zatim nije bilo značajne promjene do kraja fermentacije. Vinska i limunska kiselina nisu određene u vodenoj otopini šećera, ali jesu u otopini s dodatkom smokve na početku fermentacije i njihova se koncentracija tijekom fermentacije smanjivala. S druge strane, koncentracija jabučne kiseline dosegla je maksimum nakon 24 sata fermentacije, a koncentracija mliječne i octene kiseline povećavala se tijekom fermentacije. Međutim, koncentracija octene kiseline bila je viša nego koncentracija mliječne kiseline. Također, određena je visoka koncentracija etil acetata u uzorcima vodenog kefir. Kad je kao supstrat korištena otopina smokve, postignute su veće koncentracije octene kiseline nego kod drugih otopina voća i povrća (Gökırmaklı i sur., 2023). Koncentracija etanola rasla je linearno dok nije dosegla 10%

(vol/vol), a zatim je počela padati jer je etanol biooksidacijom preveden u octenu kiselinu pomoću bakterija octene kiseline (Cufaoglu i Erdinc, 2023).

Stabilnost fenola i antioksidansa mijenja se ovisno o pH pa se tijekom fermentacije mijenja sadržaj i struktura fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet. Točnije, u vodenoj šećernoj otopini promjene nisu bile značajne, no u otopini s dodatkom smokve antioksidacijski se kapacitet povećao. Međutim, promjena pH nije utjecala samo na fenole i antioksidanse već i na druge spojeve koji su se u konačnici metabolizirali u egzopolisaharide, ugljikov dioksid, etanol, octenu kiselinu, glicerol, mliječnu kiselinu, manitol i razne aromatske spojeve. Primarni spojevi detektirani u vodenom kefiru na bazi šećerne otopine su acetaldehid, etanol, etil acetat, benzen, 2-etilheksanol, oksimi, 1,2,3-trimetili, metoksi-fenili i 2-feniletanol, a u vodenom kefiru na bazi otopine smokve acetaldehid, etanol, izoamil alkohol, etilni esteri, 3-butenol, acetoin(3-hidroksibutanon), octena kiselina, 2-etilheksanol, furfural alkohol, 2,3-butandiol, benzil alkohol, etil acetat, izobutil alkohol, kapronska kiselina, heksanol, 3-metili, etil laktat, oktanol i 2-feniletanol. Koncentracija octene kiseline i etil acetata dostigla je maksimum nakon 48 sati fermentacije (Gökırmaklı i sur., 2023).

Zannini i sur. (2023) su proučavali utjecaj različitih supstrata na konačan sastav organskih kiselina koristeći zrnca vodenog kefiru jednakog sastava s različitim supstratima – ekstrakte jabuke, grožđica i smokve, u dvije četverodnevne fermentacije sa svakim supstratom. Uočena je veća koncentracija ukupnih kiselina na kraju druge četverodnevne fermentacije što indicira na prilagodbu mikroorganizama na hranjivu podlogu. Kada je kao supstrat korišten ekstrakt jabuke, na trećem i četvrtom danu druge fermentacije izmjerena je veća koncentracija octene kiseline nego u prvoj fermentaciji, točnije omjer octene i mliječne kiseline povećao se sa 1:1 u prvoj fermentaciji na 2:1 na kraju druge fermentacije. Koncentracija mliječne kiseline bila je konstantna tijekom fermentacija. Kada je kao supstrat korišten ekstrakt grožđica, koncentracija octene kiseline bila je relativno konstantna, razina glukonske kiseline se povećala, a mliječne kiseline smanjila u drugoj fermentaciji. Smatra se da je navedena promjena koncentracija posljedica promjene u dominantnom mikroorganizmu zbog prilagodbe na supstrat. Naime, broj ili metabolički kapacitet bakterija mliječne kiseline se smanjio, a broj bakterija octene kiseline povećala. Fermentacija s ekstraktom smokve dala je najraznolikiji profil organskih kiselina. Sve ispitane kiseline su potvrđene, uključujući limunsku i jantarnu kiselinu. U fermentaciji jabučnog i smokvinog ekstrakta glukonska je kiselina u početku bila dominantna, ali joj se koncentracija tijekom fermentacije smanjivala dok je koncentracija octene kiseline rasla. Dakle, promjena u razinama organskih kiselina posljedica je promjene dominantnog mikroorganizma, promjena u metabolizmu i obrascu hranjenja. Osim organskih kiselina, kemijska analiza pokazala je manji udjel proteina,

određenih minerala i mikronutrijenata poput kalcija, kalija, selenija, bakra, željeza, fosfora i natrija u vodenom kefiru na bazi ekstrakta jabuke, ali veći udio vitamina C, folata i riboflavina.

Gökırmaklı i sur. (2023) također su analizirali vitamine u vodenom kefiru. Vitamini B₁ (tiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin) i B₆ (piridoksin) određeni su metodom koja je uključivala ekstrakciju vitamina, tretman kiselinom za razdvajanje i kvantifikaciju pomoću HPLC-a. Puferska otopina C₂H₃NaO₂ u prisutstvu NaCN na 100 °C u trajanju 30 minuta iskorištena je za ekstrakciju vitamina B₇ (biotina) i B₁₂ (kobalamina), a vitamin C određen je pomoću HPLC-a reverznih faza. S obzirom da se vitamin B₁₂ uglavno nalazi u hrani životinjskog podrijetla, vodeni kefir važan je izvor tog vitamina za vegane i vegetarijance, a nedostatak vitamina B₂ najšire je raširen nedostatak pojedinog vitamina u zemljama u razvoju te bi vodeni kefir mogao postati bitna namirnica za suzbijanje tog problema.

2.5.3. Senzorska analiza

Povećanje koncentracije octene kiseline može pridonjeti gubitku voćnog okusa vodenog kefira i pridonjeti neprijatno kiselom okusu i aromi, ali u odgovarajućoj koncentraciji može doprinjeti i ugodnoj aromi. Etil oktanoat i etil dekanat važni su spojevi arome jer pridonose voćnoj, odnosno cvjetnoj aromi. 2-etilheksanol i 2,3-butandiol doprinose mirisu uzoraka poput ruže. Vodeni kefir na bazi vodene otopine šećera bio je slabije ocjenjen nego vodeni kefir s dodatkom smokve, vjerojatno radi nižih koncentracija sastojaka, ali je i dalje ocjenjen iznadprosječno.

Vodeni kefir na bazi vodene šećerne otopine klasificira se kao piće s cvjetnim i blagim alkoholnim notama dok je vodeni kefir na bazi otopine smokve ima više voćni okus. Također uzorci fermentirani 24 sata preferirani su naspram onih fermentiranih 48 sati (Gökırmaklı i sur., 2023). Prisutnost kvasaca u vodenom kefiru doprinosi povećanju senzorne kvalitete jer daje osvježavajuć i oštar okus (Cufaoglu i Erdinc., 2023).

2.6. UTJECAJ NA ZDRAVLJE

Potencijalna svojstva vodenog kefira koja utječu na ljudsko zdravlje, pod utjecajem su mnogih varijabli, uključujući vrstu supstrata, temperaturi i trajanju fermentacije. Unatoč razlici u supstratu, vodeni kefir ima sličnu mikrobiotu kao mliječni kefir, što znači da imaju sličan utjecaj na zdravlje. Mnoga istraživanja potvrdila su benefite konzumacije mliječnog kefira dok je na vodenom kefiru proveden mali broj istraživanja (Cufaoglu i Erdinc., 2023).

2.6.1. Probiotička svojstva

Neka od provedenih istraživanja proučavala su svojstva mikroorganizama iz zrnaca vodenog kefira poput nepatogenosti, toleranciju na gastrointestinalne uvjete, prijanjanje na sluznicu gastrointestinalnog trakta, mogućnost kolonizacije i kompetitivnu ekskluziju patogena i zaključilo se da ti mikroorganizmi imaju probiotička svojstva. Dakle, pozitivan utjecaj vodenog kefira na zdravlje povezan je upravo s prisutnošću probiotika, a vrste roda *Bifidobacterium* najkorisniji su probiotički mikroorganizmi koji podupiru ljudski imunostni sustav (Cufaoglu i Erdinc, 2023). Ostala terapijska svojstva povezana s modulacijom crijevnog mikrobioma uključuju poboljšani probavni sustav, smanjenje utjecaja pretilosti na organizam, smanjenu srčanu hipertrofiju, kontrolu glukoze u plazmi, protualergijsku aktivnost, smanjenu hipertrofiju bubrega i anti-mutagene efekte (Dahiya i Nigam, 2023).

Funkcionalna kakvoća probiotika u vodenom kefiru izravno je ovisna o količini konzumiranog vodenog kefira, tj. količini probiotika u njemu. Istraživanja su potvrdila imunomodularne, protuupalne, antikancerogene, antioksidativne, antihiperlipidemijske, antihiperlipidemijske i antimikrobne efekte vodenog kefira. Unatoč sakupljenim podacima, ne može se zaključiti da svaki proizvod ima iste učinke, s obzirom na to da svi vodeni kefir nemaju isti konačni i početni mikrobiološki i kemijski sastav te da su probiotička svojstva ovisna o sojevima. Probiotici imaju pozitivan utjecaj na imunostni i probavni sustav, ali potrebno je provesti klinička istraživanja kako bi se potvrdili navodni pozitivni utjecaji na zdravlje (Cufaoglu i Erdinc, 2023).

Laktobacili su također važan dio vodenog kefira jer imaju velik utjecaj na zdravlje. Kod individualaca sa sindromom iritabilnog crijeva (IBS-om) zabilježen je pad broja laktobacila u crijevima te je uočeno da se konzumacijom probiotika smanjuju simptomi poput abdominalnih bolova i nadutosti dok je u istraživanju dijabetesa tipa 2 konzumacija kefira i drugih fermentiranih namirnica koji sadržavaju laktobacile dobra prevencija te bolesti. Uočena je i važnost konzumacije probiotika u osoba s emocionalnim poremećajima. Naime, probiotici smanjuju simptome depresije te je otkriven pad u broju laktobacila u crijevima osoba s multiplom sklerozom u usporedbi sa zdravim osobama. To je zbog toga što indol aldehidi proizvedeni od strane laktobacila imaju protuupalni efekt na glija stanice mozga što limitira upalu centralnog živčanog sustava. Također, iako kefir nema direktan *in vitro* utjecaj na tumorske stanice, ima utjecaj na anti-tumorske mehanizme. Frakcije kefira koje nisu topljive u vodi (mikroorganizmi) povećavaju aktivnost NK stanica (stanice prirodni ubojice) koje su citotoksične za tumorske stanice. U osoba inficiranih HIV virusom, osoba s dijabetesom tipa 1 i osoba s tumorom debelog crijeva uočen je smanjen broj laktobacila u crijevima te bi te osobe također imale korist od konzumacije vodenog kefira (Arapović i sur., 2024).

Proučavana su i antimikrobna i antivirusna svojstva povezana s probiotičkim sojevima (Dahiya i Nigam, 2023). Istraživanja su pokazala da probiotici mogu inhibirati rast raznih štetnih bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *S. typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Shigella* sp. i *Staphylococcus aureus* te filamentoznih funga poput *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Rhizopus* sp. i *Penicilium* sp. (Moretti i sur., 2022). Što se tiče antivirusnih svojstava, proučavan je peptid izoliran iz sira dobivenog od sjemenki soje proizveden pomoću bakterije *L. delbrueckii* zbog svoje učinkovite inhibicije SARS-CoV-2 glavne proteaze i s1 glikoproteina što čini kefir potencijalnim prehranbenim suplementom u borbi protiv COVID-19 (Dahiya i Nigam, 2023).

2.6.2. Prebiotička svojstva

Vodeni je kefir radi svog kemijskog sastava karakteriziran i kao prebiotik (Tavares i sur., 2023). Prebiotici su neprobavljivi sastojci hrane koji stimuliraju rast i/ili aktivnost mikroorganizama koji imaju pozitivno djelovanje u organizmu domaćina (Yoo i sur., 2024). Prebiotici sadržani u vodenom kefiru su fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi te drugi oligosaharidi, kao i inulin i lakuloza (Tavares i sur., 2023). Fruktooligosaharidi spadaju u fruktane, skupinu čiji benefiti uključuju gastrointestinalno olakšanje, indukciju apoptotskog učinka na stanice raka debelog crijeva, smanjenje razine kolesterola i triglicerida te modulaciju imunskog sustava. U istu skupinu ubrajamo inulin koji dodatno poboljšava apsorpciju željeza, magnezija i kalcija. Benefiti galaktooligosaharida su selektivna stimulacija korisnih mikroorganizama, poboljšana reakcija imunskog sustava, smanjenje proizvodnje toksičnih spojeva, poboljšana apsorpcija minerala i smanjeni simptomi pretilosti i dijabetesa. Laktuloza se u debelom crijevu metabolizira u kiseline koje povlače vodu u debelo crijevo i omekšavaju stolicu, pa se laktuloza može koristiti kao laksativ (Yoo i sur., 2024).

2.6.3. Vitamini i minerali

Osim probiotika, vodeni kefir sadrži vitamine (B skupine i C), kalcij, magnezij, bakar i natrij, koji također imaju važnu ulogu u ljudskom tijelu. Vitamini su važni kofaktori u metaboličkim reakcijama i tijelo ih ne može samo proizvesti već ih moramo unositi hranom, kalcij je važan za zdravlje kostiju i imunski sustav, bakar pomaže u zarastanju rana, magnezij je ključan za sintezu proteina, očuvanje zdravog imunskog sustava i prenošenje živčanih signala dok natrij također ima mnogo važnih uloga poput očuvanja normalne funkcije srca i stabilnost elektrolita. Osim toga ovi minerali ključni su za stabilnost zrnaca vodenog kefira i rast biomase (Gökırmaklı i sur., 2023).

2.6.4. Uklanjanje mikotoksina

Prema istraživanju Ouyanga i sur. (2024) vodeni kefir dobro sredstvo za uklanjanje mikotoksina iz ljudske i životinjske hrane. Naime, procijenjeno je da je oko 60-80% ljudske i stočne hrane kontaminirano mikotoksinima, tj. sekundarnim metabolitima filamentoznih funga rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, što predstavlja prijetnju zdravlju ljudi i životinja. Dokazano je da se konzumacijom vodenog kefira iz metabolizma uklanja aflatoxin B1 (AFB1), najtoksičniji od kontaminanata, koji pokazuje hepatotoksično, teratogeno, karcinogeno i imunosupresivno djelovanje na ljude i životinje i koji predstavlja veliku prijetnju javnom zdravstvu i sigurnosti te velike financijske gubitke. Mikotoksini se mogu uklanjati i kemijskim i fizikalnim metodama, ali biološke pokazuju određene prednosti poput sigurnosti, jednostavnosti, minimalnog utjecaja na kvalitetu proizvoda i isplativosti. Zbog toga je korištenje biomaterijala kao adsorbenata postalo jedno od najobećavajućih pristupa uklanjanja AFB1. Otkriveno je da se neke bakterije i kvasci poput *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Saccharomyces* i *Enterococcus*, ponašaju kao bio-adsorbenti koji mogu uspješno ukloniti AFB1. Ovim istraživanjem pokazano je da vodeni kefir koji sadrži rodove *Lactobacillus*, *Phenyllobacterium*, *Acetobacter*, *Sediminibacterium*, *Kodamaea*, *Saccharomyces*, *Issatchenkia* i druge, može efektivno detoksificirati AFB1 u koncentracijama od 1 do 5 µg/mL u pH vrijednostima od 3 do 9 pri temperaturama od 4 do 45 °C. Osim adsorbiranja, vodeni kefir može metabolizirati AFB1 u druge metabolite. U usporedbi s mliječnim kefirom, vodeni kefir pokazao 20% veću uspješnost i adsorbentski kapacitet od mliječnog kefira te se pokazao kao uspješan čimbenik u smanjenju mutagenosti AFB1 i njegovom uklanjanju iz hrane.

2.7. USPOREDBA MLIJEČNOG I VODENOG KEFIRA

Vodeni kefir sličan, ali zaseban proizvod od mliječnog kefira s razlikama u strukturi (slika 3), mikrobiološkoj kompoziciji i konačnom proizvodu (tablica 1) (Arapović i sur., 2024). Mliječni kefir viskoznan, neproziran mliječni napitak dok je vodeni kefir manje viskoznan i poluproziran, ali dodatkom voća ili povrća napitak postaje manje proziran (Guzel-Seydim i sur., 2021). Mliječni kefir proizvodi se u industrijskoj skali, najčešće iz kravljeg i kozjeg mlijeka, dok se vodeni kefir tradicionalno proizvodi kućnim fermentacijama iz otopine šećera, najčešće s dodatkom voća (Lynch i sur., 2021).

Tablica 1. Svojstva mliječnog i vodenog kefir

Mliječni kefir	Vodeni kefir
proizveden sa zrnima mliječnog kefir	proizveden sa zrnima vodenog kefir
viskozno, neprozirno piće	manje viskozno, polu-prozirno piće
glavni supstrat je mlijeko (kravlje i kozje)	glavni supstrat je vodena otopina saharoze s dodanim voćem ili voćnim ekstraktima
manja raznolikost supstrata	velika raznolikost supstrata
zrnca su bijele ili krem boje i otpornija	zrnca su prozirna, sluzava i manje otporna
egzopolisaharidni matriks sastavljen primarno od kefirana	egzopolisaharidni matriks od α -glukana
bakterije octene kiseline manje zastupljene	više prevladavajuće bakterije octene kiseline
kvasci roda <i>Saccharomyces</i> u manjim koncentracijama	kvasci roda <i>Saccharomyces</i> dominantni
bakterije roda <i>Lactococcus</i> dominantne	bakterije roda <i>Lactococcus</i> rjeđe prisutne
često prisutni kvasci roda <i>Candida</i>	kvasci roda <i>Candida</i> rijetko nađeni
nije prikladan za vegane i osobe netolerantne na laktozu	prikladan za vegane, vegetarijance i osobe s netolerancijom na laktozu

Vodnom kefiru se kao supstrat osim voća može dodati i različito povrće, žitarice ili mlijeko na biljno bazi što čini velik spektar supstrata dok je mliječni kefir ograničen sa supstratima te se osim kravljeg i kozjeg još koriste ovčje, devino, magarčevo i bizonovo te kokosovo, rižino, sojino i mlijeko od lješnjaka. Dakle, mliječni kefir ograničen je na supstrate na bazi mlijeka ili sirutke te biljna mlijeka (Guzel-Seydim i sur., 2021). U skladu s time, razlika je i u sastavu disaharida koju zrnca fermentiraju. Naime, u vodenom kefiru razgrađuje se saharoza, dok se u mliječnom kefiru razgrađuje laktoza (Arapović i sur., 2024).

Zrnca mliječnog kefir mala su, zrnastog oblika, bijele do bež boje, poput voska i tvrde konzistencije, nalik kokicama, a zrnca vodenog kefir su glatka, mekana, nalik kamenoj soli, prozirna, ali im se boja mijenja ovisno o dodanom supstratu (slika 3). Suha tvar mliječnog kefir sačinjena je od 58% polisaharida, 30% proteina, 7% masti i 5% pepela, ali sadržaj može varirati ovisno o podrijetlu zrnaca. Sadržaj suhe tvari vodenog kefir nije istraživani, ali je poznato da se zrnca i vodenog i mliječnog kefir mogu ponovno koristiti nakon provedene fermentacije ako se izdvoje i podlože procesu sušenja (Guzel-Seydim i sur., 2021).



Slika 3. Zrnca mliječnog i vodenog kefira (prema Guzel-Seydim i sur., 2021)

Unatoč različitim supstratima, oba proizvoda imaju sličnu zajednicu bakterija u kojoj prevladavaju bakterije mliječne kiseline, ali je zajednica kvasaca značajno različita. Naime, u vodenom kefiru dominiraju kvasci roda *Saccharomyces*, dok su kvasci roda *Candida* rijetko nađeni, a u mliječnom kefiru kvasci roda *Saccharomyces* čine manjinu dok su kvasci roda *Candida* često prisutni (Lynch i sur., 2021). Općenito, vodeni kefir ima raznolikiju zajednicu kvasaca nego mliječni kefir (Guzel-Seydim i sur., 2021). Što se bakterija tiče, mliječni kefir sadrži približno 50% *Lactobacillus*, 20% *Leuconostoc*, 10% *Streptococcus*, 8% *Pediococcus*, 7% *Lactococcus* i 5% ostalih rodova bakterija dok vodeni kefir sadrži približno 70% *Lactobacillus*, 10% *Leuconostoc*, 10% *Acetobacter*, 5% *Bifidobacterium* i 5% ostalih rodova bakterija (Guzel-Seydim i sur., 2021). Egzopolisaharidi u mliječnom kefiru proizvode bakterije vrste *Lactobacillus kefiranofaciens* i to su uglavnom kefirani, dok u vodenom kefiru *L. hilgardii* i *L. nageli* proizvode dekstran i razgranate glukane (Arapović i sur, 2024). S obzirom da *L. hilgardii* ne razgrađuje laktozu, biomasa vodenog kefira ne raste kada se kao supstrat koristi mlijeko (Guzel-Seydim i sur., 2021).

Postoje dva načina proizvodnje mliječnog kefira – tradicionalna i industrijska metoda. U tradicionalnoj metodi kefirna se zrnca dodaju pasteriziranom mlijeku dok se u industrijskoj metodi pasteriziranom mlijeku dodaju izolirane kulture. U tradicionalnoj metodi koristi se 2-3% (tež/vol) zrnca mliječnog kefira u inokulumu i inkubiraju na 25°C tijekom 20-24 sata dok pH ne dosegne

4,6. S druge strane, vodeni se kefir fermentira i do nekoliko dana, a istraživanja su pokazala da je preferirana temperatura fermentacije 21 °C (Guzel-Seydim i sur., 2021), a inokulum sadrži 6-30% (tež/vol) zrnaca (Moretti i sur., 2022). Vodeni se kefir ne proizvodi u industrijskim uvjetima i proizvodnja nije standardizirana kao što je slučaj kod mliječnog kefira. Oba se pića čuvaju na 4 °C (Guzel-Seydim i sur., 2021).

Mliječna kiselina, acetaldehid, ugljikov dioksid, acetoin i male količine etanola proizvedene tijekom fermentacije doprinose organoleptičnim svojstvima mliječnog kefira, dok su u fermentaciji vodenog kefira značajni produkti octena i mliječna kiselina, ugljikov dioksid i etanol. Identificirano je više od 50 sastojaka arome mliječnog kefira, dok je kod vodenog kefira oko 30 od kojih mnogo pripada skupini metilnih estera deriviranih iz voća korištenog u fermentaciji. Mliječni kefir blago je kiselog okusa s neznatnom količinom ugljikovog dioksida i s obzirom da je količina etanola mala, okus je alkohola neprimjetan. S druge strane, vodeni je kefir slađi, gaziraniji i s većim udjelom etanola. Oba se pića kategoriziraju kao osvježavajuća (Guzel-Seydim i sur., 2021).

Mliječni kefir značajan je izvor probiotika, prebiotika i proteina, dok vodeni kefir osim probiotičkih svojstava im značajna antioksidacijska svojstva te može biti značajan dio prehrane osoba s netolerancijom na laktozu i vegane (Arapović i sur., 2024). Skupina ljudi koja je konzumirala vodeni kefir imala je bolji profil masti u krvi od skupine koja je konzumirala mliječni kefir. Također, razine kolesterola i LDL-a bile su niže u skupini koja je konzumirala vodeni kefir što može biti posljedica općenito većeg udjela masti u mliječnom kefiru (Guzel-Seydim i sur., 2021).

Prema istraživanju Arapović i sur. (2024), vodeni je kefir sadržavao više zdravstveno korisnih bakterija nego mliječni kefir i veći rast u koncentraciji octene, mliječne i glukonske kiseline, ali je mliječni kefir fermentiran 24 sata bolje senzorski ocjenjen od vodenog, dok je vodeni kefir fermentiran 48 sati bio na drugom mjestu, a vodeni kefir fermentiran 48 sati na trećem, te se smatra da je to posljedica veće količine glukonske kiseline u mliječnom kefiru.

3. ZAKLJUČCI

1. Vodeni je kefir probiotičko piće dobiveno fermentacijom vodene šećerne otopine kao izvora ugljika, te s dodatkom voća, povrća, orašastih plodovima ili žitarica kao izvorom dušika, pomoću zrnaca vodenog kefira.
2. Zrnca čine simbiotičku skupinu različitih mikroorganizama poput bakterija mliječne i octene kiseline te kvasaca u polisaharidnom matriksu od dekstrana i levana, a zbog nestabilnosti zrnaca, proizvodnja vodenog kefira za sada je limitirana na kućne fermentacije.
3. Od bakterija mliječne kiseline dominira rod *Lactobacillus*, a značajni su i rodovi *Leuconostoc*, *Bifidobacteria*, *Oenococcus*, *Pediococcus* i *Lactococcus*. Što se tiče bakterija octene kiseline, značajni su rodovi *Acetobacter*, *Gluconobacter* i *Gluconoacetobacter*, a od kvasaca *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Zygorulaspora* i *Hanseniaspora*.
4. Fermentacija sa zrcima vodenog kefira prirodno je zaštićen proces zbog niskog pH i proizvodnje etanola. Ovisno o korištenom supstratu postoje razlike u konačnom mikrobiološkom i kemijskom sastavu te senzoriци proizvoda.
5. Iako mliječni i vodeni kefir imaju sličnu mikrobiološku zajednicu, postoji razlika u strukturi i izgledu zrnaca, konačnom sastavu, proizvodnji i senzoričkim svojstvima.

4. POPIS LITERATURE

Arapović M, Puljić L, Kajić N, Banožić M, Kartalović B, Habschied K, Mastanjević K (2024) The Impact of Production Techniques on the Physicochemical Properties, Microbiological, and Consumer's Acceptance of Milk and Water Kefir Grain-Based Beverages. *Fermentation*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation10010002>

Cufaoglu G, Erdinc A (2023) An alternative source of probiotics: Water kefir. *Food Front*, 21-31, 4(1). <https://doi.org/10.1002/fft2.200>

Dahiya D, Nigam P (2023) Therapeutic and Dietary Support for Gastrointestinal Tract Using Kefir as a Nutraceutical Beverage: Dairy-Milk-Based or Plant-Sourced Kefir Probiotic Products for Vegan and Lactose-Intolerant Populations. *Fermentation*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation9040388>

De Oliveira I, Rolim V, Gaspar R, Rossini D, de Souza R, Bogsan C(2022) The Technological Perspectives of Kombucha and Its Implications for Production. *Fermentation*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation8040185>

Gökırmaklı Ç, Şatır G, Guzel-Seydim Z (2024) Microbial viability and nutritional content of water kefir grains under different storage conditions. *Food Sci Nutr*, 4143-4150, 12(6). <https://doi.org/10.1002/fsn3.4074>

Gökırmaklı Ç, Yüceer Y, Guzel-Seydim Z (2023) Chemical, microbial, and volatile changes of water kefir during fermentation with economic substrates. *Eur Food Res Technol*, 1717-1728, 249(7). <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04242-9>

Guzel-Seydim Z, Gökırmaklı Ç, Greene A (2021) A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends Food Sci Technol*, 42-53, 113. doi.org/10.1111/jam.15532

Güzel-Seydim Z, Şatır G, Gökırmaklı Ç (2023) Use of mandarin and persimmon fruits in water kefir fermentation. *Food Sci Nutr*, 5890-5897, 11(10). doi.org/10.1002/fsn3.3561

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B i sur. (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 11:506–14.

Laureys D, Van Jean A, Dumont J, De Vuyst L (2017) Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2811-2819, 101(7). <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8084-5>

Lynch K, Wilkinson S, Daenen L, Arendt E(2021) An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *Int J Food Microbiol*, **345**. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>

Moretti A, Moure M, Quiñoy F, Esposito F, Simonelli N, Medrano M, Leòn-Peláez Á (2022) Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods*, **5**. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>

Ouyang W, Liao Z, Yang X, Zhang X, Zhu X, Zhong Q, Wang L, Fang X, Wang J (2024) Microbial Composition of Water Kefir Grains and Their Application for the Detoxification of Aflatoxin B1. *Toxins*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/toxins16020107>

Talvares P, Mamona C, Nascimento R, dos Anjos E, de Souza C, Almeida R, Mamede M, Magalhães-Guedes K (2023) Non-Conventional Sucrose-Based Substrates: Development of Non-Dairy Kefir Beverages with Probiotic Potential. *Fermentation*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation9040384>

Yemos nourishing cultures (2024) Water kefir history, <https://www.yemoos.com/pages/water-kefir-history>. *Pristupljeno 15. srpnja 2024*.

Yoo S, Jung S, Kwak K, Kim J (2024) The Role of Prebiotics in Modulating Gut Microbiota: Implications for Human Health. *Int J Mol Sci*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/ijms25094834>

Zannini E, Lynch K, Nyhan L, Sahin A, O'Riordan P, Luk D, Arendt E (2023) Influence of Substrate on the Fermentation Characteristics and Culture-Dependent Microbial Composition of Water Kefir. *Fermentation*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation9010028>

Izjava o izvornosti

Ja Valerija Vidan izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis