

# Fermentacija i fizikalno-kemijsko vrednovanje vodenog kefir s potencijalnim zdravstvenim učincima

---

**Mataga, Lucija**

**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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:952623>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Lucija Mataga**

0058220357

**FERMENTACIJA I FIZIKALNO-KEMIJSKO VREDNOVANJE VODENOG KEFIRA**  
**S POTENCIJALNIM ZDRAVSTVENIM UČINCIMA**

**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

**Fermentacija i fizikalno-kemijsko vrednovanje vodenog kefir s potencijalnim  
zdravstvenim učincima**

**Lucija Mataga, 0058220357**

**Sažetak:** Vodeni kefir je tradicionalan fermentiran napitak, a zahvaljujući svojim probiotičkim i prebiotičkim svojstvima, odlična je zamjena za mliječni kefir u veganskoj prehrani ili kod osoba koje su netolerantne na laktozu. U ovome radu istraživana su fiziološka, kemijska i antimikrobna svojstva vodenog kefir tijekom 10 dana fermentacije u negaziranoj vodenoj otopini različitih koncentracija saharoze (50, 80, 120 i 150 g/L). Tijekom fermentacije praćena je potrošnja supstrata i sinteza metabolita (organske kiseline i etanol). Glavni metaboliti fermentacije su bili mliječna i octena kiselina, uz niske koncentracije glukonske kiseline i etanola koji je biooksidacijom preveden u octenu kiselinu. Praćenjem prinosa vodenih kefirnih zrnaca i konačnim koeficijentom konverzije supstrata u biomasu, uočeno je da su pri koncentraciji od 50 g/L saharoze postignuti najbolji rezultati. Antimikrobna aktivnost testirana je na bakterijama *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* te kvascu *Candida albicans*. Primijećeno je izvrsno antimikrobno djelovanje na *S. typhimurium* i *P. aeruginosa*, te slabije na kvasac *C. albicans* i bakteriju *S. aureus*.

**Ključne riječi:** vodeni kefir, organske kiseline, antimikrobna aktivnost

**Rad sadrži:** 33 stranice, 14 slika, 4 tablice, 50 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:** 10. srpnja 2024.

## 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 and Malting and  
brewing technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

**Fermentation and physicochemical evaluation of water kefir  
with potential health effects  
Lucija Mataga, 0058220357**

**Abstract:** Water kefir is a traditional fermented drink, and thanks to its probiotic and prebiotic properties, it is an excellent substitute for milk kefir on a vegan diet or for people who are lactose intolerant. This paper investigated the physiological, chemical and antimicrobial properties of water kefir during 10 days of fermentation in a non-carbonated water solution with different concentrations of sucrose (50, 80, 120, and 150 g/L). Substrate consumption and metabolite synthesis (organic acids and ethanol) were monitored during fermentation. The primary fermentation metabolites were lactic and acetic acid, with low gluconic acid and ethanol concentrations converted into acetic acid by bio-oxidation. By monitoring the yield of water kefir grains and the final conversion coefficient of the substrate into biomass, it was observed that the best results were achieved at a concentration of 50 g/L of sucrose. Antimicrobial activity was tested on *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and the yeast *Candida albicans*. Excellent antimicrobial activity was observed against *S. typhimurium* and *P. aeruginosa*, and weaker against the yeast *C. albicans* and the bacterium *S. aureus*.

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

**Thesis contains:** 33 pages, 14 figures, 4 tables, 50 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:** July 10, 2024

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
<b>2. Teorijski dio</b>	<b>2</b>
2.1. FIZIKALNA SVOJSTVA ZRNCA VODENOG I MLIJEČNOG KEFIRA	2
2.2. KEMIJSKA SVOJSTVA ZRNCA VODENOG I MLIJEČNOG KEFIRA	3
2.3. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA VODENOG I MLIJEČNOG KEFIRA	4
2.3.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	4
2.3.2. BAKTERIJE OCTENE KISELINE	5
2.3.3. OSTALE BAKTERIJE	5
2.3.4. KVASCI	5
2.4. METABOLIČKE INTERAKCIJE I METABOLITI	6
2.4.1. METABOLIZAM SAHAROZE I DJELOVANJE KVASCA	6
2.5. PROIZVODNJA VODENOG I MLIJEČNOG KEFIRA	7
2.6. ZDRAVSTVENE POGODNOSTI KONZUMACIJE VODENOG I MLIJEČNOG KEFIRA	8
<b>3. Eksperimentalni dio</b>	<b>10</b>
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. APARATI	11
3.1.2. SIROVINE I MIKROORGANIZMI	11
3.2. METODE	12
3.2.1. PRIPRAVA STARTER KULTURE ZA FERMENTACIJU	12
3.2.2. PRIPRAVA VODENIH KEFIRNIH ZNACA ZA FERMENTACIJU	12
3.2.3. ODREĐIVANJE PH VRIJEDNOSTI	13
3.2.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MLIJEČNE KISELINE	13
3.2.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE OCTENE KISELINE	13
3.2.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GLUKONSKE KISELINE	13
3.2.7. ODREĐIVANJE ALKOHOLA KEMIJSKOM METODOM	14
3.2.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE REDUCIRAJUĆIH ŠEĆERA (RS METODA)	15
3.2.9. IZRAČUNAVANJE PRINOSA VODENIH KEFIRNIH ZRNACA I KOEFICIJENTA KONVERZIJE $Y_{x/s}$	15
3.2.10. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI DISK DIFUZIJSKOM METODOM	16
3.2.11. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA	16
<b>4. Rezultati i rasprava</b>	<b>17</b>
4.1. PROMJENA PH VRIJEDNOSTI	17
4.2. ETANOL I ORGANSKE KISELINE	18
4.3. PRINOS BIOMASE VODENIH KEFIRNIH ZRNACA I KOEFICIJENT KONVERZIJE SUPSTRATA U BIOMASU ( $Y_{x/s}$ )	22
4.4. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE FERMENTIRANOG VODENOG KEFIRA	24
<b>5. Zaključci</b>	<b>27</b>
<b>6. Popis literature</b>	<b>28</b>

## 1. UVOD

Danas se sve više ističe važnost zdrave crijevne mikrobiote, zbog čega je povećan interes za funkcionalnom fermentiranom hranom. Istraživanja pokazuju kako se mikrobiota zdravih pojedinaca značajno razlikuje od mikrobiote onih oboljelih od dijabetesa i pretilosti (Tiss i sur., 2020) te multiple skleroze (Chen i sur., 2016). Činjenica je da je rak debelog crijeva u porastu, kao i depresija, na čije simptome umirujuće djeluju probiotici koji sadržavaju bakterije roda *Lactobacillus* (Milani i sur., 2017). Kako bi spriječili navedene bolesti, ljudi se okreću probioticima kako bi ojačali i održavali svoju crijevnu mikrobiotu zdravom. Među hranom bogatom probioticima posebno se ističu tradicionalna fermentirana pića kao što su mliječni i vodeni kefir.

Mliječni kefir je popularni mliječni fermentirani napitak, no zbog prisutnosti teško probavljivog proteina kazeina i laktoze sve se više istražuje primjena i funkcionalnost vodenog kefira. Iako se oba kefira proizvode uporabom kefirnih zrnca, koji predstavljaju simbiotičku kulturu bakterija mliječne i octene kiseline te kvasaca, značajno se razlikuju po svojim fizikalnim, kemijskim i mikrobiološkim svojstvima.

Vodeni kefir je fermentirano piće na bazi vode koje je zahvaljujući svojim probiotičkim i prebiotičkim svojstvima odlična zamjena za mliječni kefir u veganskoj prehrani ili kod osoba koje su intolerantne na laktozu (Guzel- Seydim i sur., 2021).

Cilj ovog rada bio je fermentacijom vodenih kefirnih zrnaca u vodi dobiti funkcionalni probiotički napitak te ukazati na osnovne razlike između mliječnog i vodenog kefira na fizikalnoj, kemijskoj, mikrobiološkoj i funkcionalnoj razini. Izvor ugljika bila je saharoza iz smeđeg šećera koja je u uzorke dodana u različitim koncentracijama (50 g/L, 80 g/L, 120 g/L i 150 g/L). U podlogu su dodane suhe smokve kao izvor dušika te voćne arome. Tijekom 10 dana fermentacije vodenih kefirnih zrnaca praćeni su sljedeći parametri:

- promjena pH tijekom fermentacije;
- promjena koncentracije mliječne, octene i glukonske kiseline tijekom fermentacije;
- promjena koncentracije etanola tijekom fermentacije;
- promjena koncentracije glukoze tijekom fermentacije;
- prinos biomase vodenih kefirnih zrnaca i koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{x/s}$ ); i
- antimikrobna svojstva dobivenog vodenog kefira na određene patogene bakterije i kvasac

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Fizikalna svojstva zrnca vodenog i mliječnog kefir

Mliječni kefir (MK) i vodeni kefir (VK) tradicionalno se proizvode od različitih, no jedinstvenih želatinoznih čestica koje sadrže probiotike poznate kao “mliječna kefirna zrnca” i “vodena kefirna zrnca”. Ova dva različita napitka proizvedena fermentacijom izrazito se razlikuju prema svojim fizičkim i kemijskim svojstvima, kao i različitim mikrobiološkim sastavom. I mliječni i vodeni kefir imaju funkcionalna svojstva. Dok je mliječni kefir izvor značajnih količina proteina te probiotika i prebiotika, vodeni kefir može biti vrlo važan izvor probiotika, prebiotika i antioksidansa za vegane i osobe koje su alergične/netolerantne na mliječne proizvode. Oba ova napitka su važna zbog svojih potencijalnih zdravstvenih koristi.

Vodeni kefir je piće koje se dobiva fermentacijom vodenih otopina šećera koje sadrže zrnca vodenog kefir i izvor šećera, a mogu sadržavati i komade suhog ili svježeg voća ili povrća radi poboljšanja arome ili boje konačnog proizvoda (Tireki, 2022). Vodena kefirna zrnca su sivo-bijele boje, prozirna i čvrsta. Fermentacijom mogu poprimiti izvornu boju izvora šećera ili dodanog voća ili povrća. Veličina zrnca vodenog kefir može biti od nekoliko milimetara do nekoliko centimetara, a površina zrnca je glatka te nema vidljivih podjedinica u strukturi samog zrnca kao što je to kod zrnca mliječnog kefir koja su obično velika između 0,1 i 2 cm, bijele, kremaste boje i izgleda cvjetače, koja se ne mijenja tijekom fermentacije (Otlés i Acu, 2018). Obje vrste kefirnih zrnca (slika 1) se nakon fermentacije mogu izdvojiti od ostatka fermentirane otopine procjeđivanjem, isprati i spremite za ponovno korištenje (Guzel-Seydim i sur., 2021).



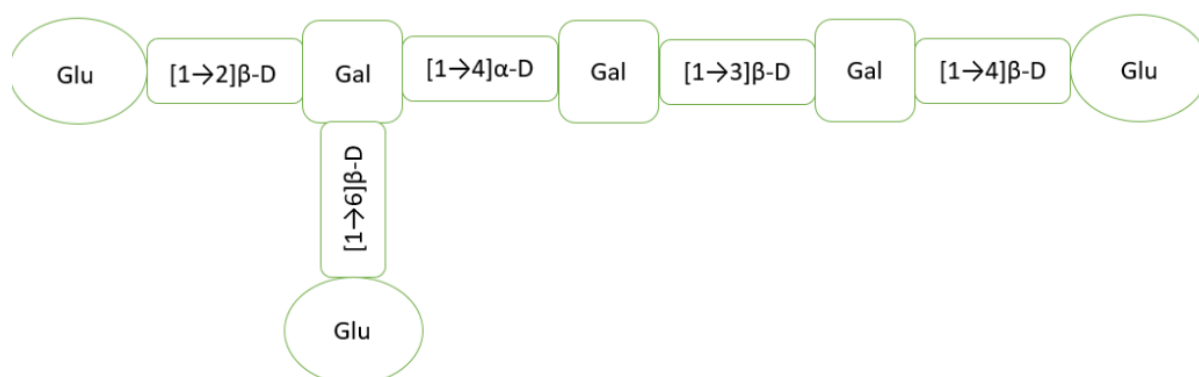
**Slika 1.** Usporedni prikaz izgleda mliječnih i vodenih kefirnih zrnaca (*prema* Guzel-Seydim i sur., 2021)

## 2.2. Kemijska svojstva zrnca vodenog i mliječnog kefira

Velika razlika između vodenih i mliječnih kefirnih zrnca je u tome što vodena kefirna zrnca previru saharozu, a mliječna kefirna zrnca fermentiraju laktozu. Vodena kefirna zrnca imaju matriks od dekstrana koji nastaje povezivanjem glukoze  $\alpha$ -D-(1→6) vezama s grananjima na  $\alpha$ -(1→3) mjestima (slika 2). Mikroorganizmi pronađeni u kulturi vodenih kefirnih zrnaca koji su odgovorni za sintezu dekstrana i razgranatih glukana su: *Lactobacillus hilgardii*, *L. nageli*, *L. casei* i *L. hordei* (Fels i sur., 2018; Laureys i sur., 2017; Davidovic i sur., 2015). Mliječna kefirna zrnca su specifična po tome što sadrže bakterijski polisaharid kefiran koji se sastoji od jednakog broja glukoznih i galaktoznih podjedinica, a sintetizira ga *Lactobacillus kefiranofaciens* (slika 3). Također, vodena kefirna zrnca ne mogu rasti u mlijeku jer *Lactobacillus hilgardii* ne metabolizira laktozu zbog čega se ne mogu sintetizirati esencijalni polisaharidi koji su vodenim kefirnim zrcima potrebni za rast (Martinez-Torres i sur., 2016).



**Slika 2.** Struktura polisaharida vodenog kefira (prema Moinas i sur., 1980)



**Slika 3.** Struktura polisaharida mliječnog kefira (prema Shahabi-Ghahfarrokhi i sur., 2015)



### 2.3. Mikrobiološka analiza vodenog i mliječnog kefir

Primarne kulture koje su identificirane u vodenom kefiru su bakterije mliječne kiseline roda *Lactobacillus*, bakterije octene kiseline roda *Acetobacter* i kvasci roda *Saccharomyces*. U zrnima vodenog kefir česti su i drugi rodovi bakterija i kvasaca, a o tome koji će rodovi biti dominantni ovisi geografsko podrijetlo kefirnih zrnaca te supstrati korišteni za fermentaciju (Lynch i sur., 2021).

#### 2.3.1. Bakterije mliječne kiseline

Najčešće vrste roda *Lactobacillus* koje se pojavljuju u zrnima vodenog kefir su *L. hilgardii* i *L. nagelii*, praćene vrstama *L. casei* i *L. paracasei*. *L. hilgardii* i *L. nagelii* su od iznimne važnosti jer su odgovorne za proizvodnju egzopolisaharida zrnaca vodenog kefir (Fels i sur., 2018). Zanirati i sur. (2015) su naglasili kako je ključan čimbenik u izolaciji bakterija mliječne kiseline vrsta hranjive podloge koja je uporabljena za uzgoj kulture. Ako se kao podloga za kultivaciju koristi MRS, dobiven od kisele sirutke, moguće je da će na podlozi porasti one vrste roda *Lactobacillus* koje su adaptirane za rast u kiselom mediju ili mliječnom mediju kao što je *L. casei*. Od roda *Lactobacillus* još su u identificirane vrste *L. hordei* i *L. satsumensis*. Učestalost pojavljivanja ovih vrsta u kefirnih zrnima ovisila je o geografskom podrijetlu zrnaca. Premda se u različitim istraživanjima vrsta *L. hordei* pojavljuje u različitim koncentracijama, Stadie i sur. (2013) navode kako je ona najzastupljenija bakterija u vodenom kefiru s 31,3 %, a zatim *L. nagelii* s 22,7 %. Još neke vrste roda *Lactobacillus* koje su često izolirane iz kefirnih zrnaca su *L. plantarum* (Pidoux i sur., 1988), *L. harbinensis*, *L. buchneri* i *L. kefir* (Verce i sur., 2019; Laureys i sur., 2018; Laureys i De Vuyst, 2017, 2014). Osim roda *Lactobacillus*, često identificirane bakterije su bakterije roda *Leuconostoc*, konkretno vrste *Leuc. mesenteroides* i *Leuc. citreum* (Gulitz i sur., 2013). Također, pojavljuju se i bifidobakterije poput *B. psychraerophilum* i *B. aquikefiri*, koje su pronađene samo u europskim zrnima vodnog kefir (Verce i sur., 2019; Laureys i sur., 2018; Laureys i De Vuyst, 2017, 2014; Gulitz i sur., 2013), a nedavno je otkrivena i nova vrsta *B. tibiigranuli*. Često su pronađeni i članovi roda *Oenococcus* uključujući *O. oeni* i *O. kitaharae* (Laureys i De Vuyst, 2017), a predložena je i nova vrsta, *Candidatus Oenococcus aquikefiri* (Verce i sur., 2020). U jednom istraživanju identificirane su i vrste roda *Pediococcus* (Galli i sur., 1995). Bakterije roda *Lactococcus* rijetko su identificirane u vodenim kefirnim zrnima budući da su one karakteristične za zrnca mliječnog kefir. Međutim, u nekim istraživanjima identificirana je vrsta *Lactococcus lactis* što može ukazivati na povijesnu povezanost zrnaca mliječnog i vodenog kefir ili na to da se mikroorganizmi karakteristični za mliječna kefirna zrnca mogu vremenom prilagoditi fermentaciji u šećernom, vodenom mediju (Zanirati i sur., 2015; Marsh i sur., 2013). Gledajući podatke malog broja istraživačkih grupa i

uzimajući u obzir geografsku raznolikost izoliranih vrsta može se zaključiti da je do danas proučavan tek mali broj kefirnih zrnaca te da se prava raznolikost zrnaca vodenog kefira tek treba u potpunosti razjasniti.

### 2.3.2. Bakterije octene kiseline

Osim bakterija mliječne kiseline, u vodenom kefiru se mogu detektirati i bakterije octene kiseline, prvenstveno one roda *Acetobacter*. Bakterije octene kiseline često nije moguće detektirati jer njihova prisutnost ovisi o dostupnosti kisika koji je ovim bakterijama potreban za rast (Laureys i sur., 2018). U istraživanjima su identificirane *A. lovaniensis*, *A. fabarum*, *A. tropicalis*, *A. indonesiensis* i *A. okenawensis* (Laureys i sur., 2018; Martínez-Torres i sur., 2017; Laureys i De Vuyst, 2014; Gulitz i sur., 2011). Ostale bakterije octene kiseline su rijetko identificirane kao što su bakterije roda *Gluconobacter*, *G. liquefaciens* i *G. roseus/oxydans* (Laureys i sur., 2018), te bakterije roda *Gluconacetobacter* (Marsh i sur., 2013).

### 2.3.3. Ostale bakterije

Bakterije roda *Zymomonas* su otkrivene u nekoliko uzoraka vodenih kefirnih zrnaca s različitih geografskih područja. Konkretno je otkrivena vrsta *Z. mobilis*, štapićasta, Gram-negativna bakterija koja proizvodi visoke količine etanola zbog čega je u antagonističkom odnosu sa *S. cerevisiae* (Marsh i sur., 2013). Također, ekstracelularno proizvodi levan iz saharoze na sličan način kao i bakterije mliječne kiseline (Doelle i sur., 1993). Premda je *Z. mobilis* u nekim uzorcima detektiran u visokim koncentracijama, njegova prisutnost u kefirnim zrnacima je nekonzistentna što naglašava složenost mikrobnih zajednica vodenog kefira.

### 2.3.4. Kvasci

*Saccharomyces cerevisiae* je najčešća vrsta kvasca identificiranog u vodenim kefirnim zrnacima dok su druge vrste roda *Saccharomyces* rjeđe prisutne poput *S. florentinus*, *S. pretoriensis* i *S. bayanus* (Verce i sur., 2019; Laureys i sur., 2018; Laureys i De Vuyst, 2017, 2014; Gulitz i sur., 2013, 2011). Kvasci roda *Dekkera* drugi su najčešći kvasci identificirani u vodenom kefiru. Nađene su vrste *D. bruxellensis* i *D. anomala*, a manja zastupljenost kvasaca roda *Dekkera* može biti zbog dugog vremena udvostručavanja kvasaca na uobičajenim hranjivim podlogama korištenim za rast kultura (Marsh i sur., 2013). Dio mikrobnog zajednice vodenih kefirnih zrnaca čine i kvasci iz roda *Zygorulasporea* i *Hanseniaspora*. Rod *Zygorulasporea* je karakteriziran jednom vrstom *Z. florentina*, a rod *Hanseniaspora* s *H. valbyensis* i *H. vineae* (Marsh i sur., 2013; Gulitz i sur., 2011). Prisutni su i kvasci roda *Lachancea*, prvenstveno *Lac. fermentati* (Marsh i sur., 2013; Gulitz i sur., 2011; da Miguel i sur., 2011) te kvasci roda *Candida* kao što su vrste *C. ethanolica* (Sarikkha i sur., 2015), *C. californica* (Martínez-Torres i sur.,

2017), *C. lambica*, *C. valida* (Pidoux, 1989) i *C. valdiviana* (da Miguel i sur., 2011). Rjeđe identificirana vrsta kvasca je *Torulaspota pretoriensis* (Marsh i sur., 2013; Galli i sur., 1995), te kvasci iz rodova *Pichia* (*P. cecembensis*, *P. membranifaciens*, *P. caribbica*, *P. fermentans*), *Kazachstania* (*Ka. aerobia*), *Kluyveromyces* (*Kl. lactis*) i *Yarrowia* (*Y. lipolytica*). Pronalazak kvasaca roda *Candida* i *Kluyveromyces*, koji su karakteristični za mliječni kefir, može indicirati da su vodena kefirna zrnca evolucijom nastala iz mliječnih kefirnih zrnaca koja su se prilagodila proizvodnji kefira iz šećernih, vodenih otopina (Fiorda i sur., 2017). Gulitz i sur. (2011) su pokazali da se kefirna zrnca pretežito sastoje od  $10^8$  laktobacila,  $10^6$  do  $10^8$  bakterija octene kiseline i  $10^6$  do  $10^7$  kvasaca po gramu zrna što dokazuje kako laktobacili znatno nadmašuju broj kvasaca čija je raznolikost znatno manja od bakterijskih.

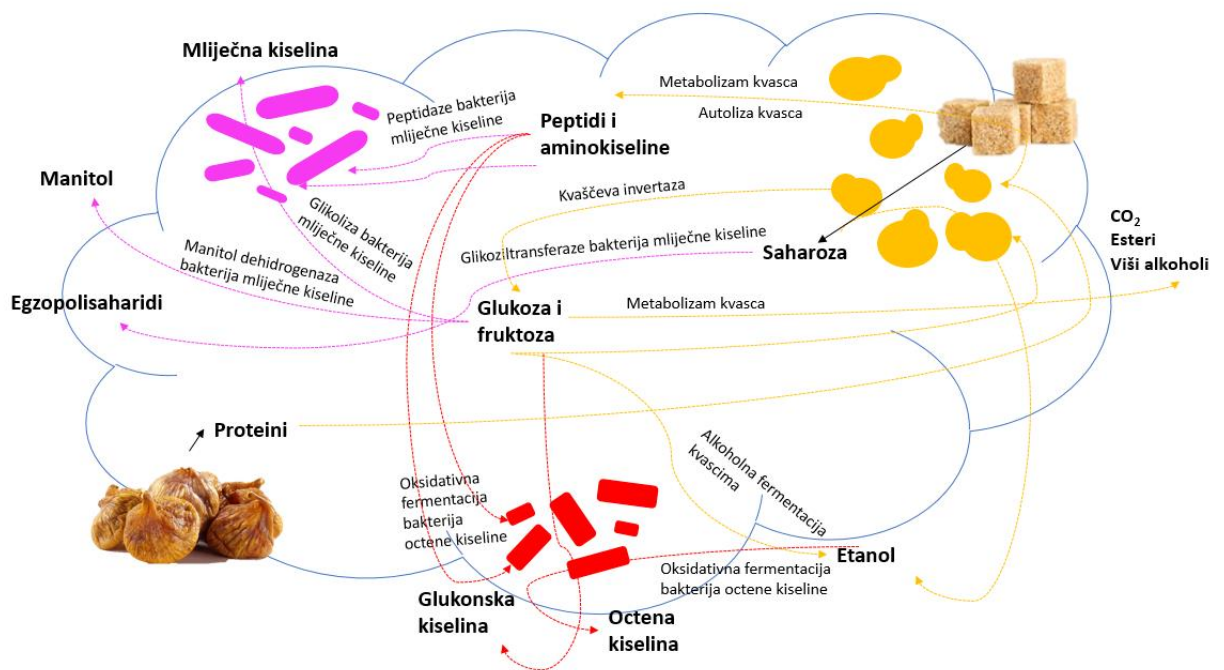
#### **2.4. Metaboličke interakcije i metaboliti**

Na slici 4 prikazane su glavne metaboličke interakcije koje se odvijaju između mikrobiote vodenog kefira te fermentacijskog medija. Slika se temelji na dosadašnjim otkrićima, a moguće je da postoje neotkrivene interakcije koje uključuju metabolite i vrste koje još nisu identificirane. To potvrđuje činjenica da svi dosadašnji pokušaji konstrukcije pojedinačnih zrna vodenog kefira, kombiniranjem pojedinačnih izoliranih sojeva bakterija i kvasaca, nisu bili uspješni (Xu i sur., 2018).

Izvor ugljika (saharoza) i izvor dušika (sušeno ili svježe voće i povrće) jednako su važni za rast, metabolizam i fermentacijski kapacitet mikrobiote zrna vodenog kefira. Zbog visokog udjela šećera i niskog udjela dušika u vodenom kefiru, nužna je mutualistička suradnja i izmjena metabolita između mikrobne zajednice vodenog kefira (Stadie, 2013).

##### **2.4.1. Metabolizam saharoze i djelovanje kvasca**

Kvasci hidroliziraju saharozu na glukozu i fruktozu djelovanjem  $\beta$ -D-fruktofuranozidaze (invertaze) i zatim apsorbiraju oslobođene monosaharide olakšanom difuzijom. Apsorbirane monosaharide kvasci koriste za svoj metabolizam te proizvodnju etanola i ugljikovog dioksida. Dio monosaharida ostaje dostupan bakterijama iz mikrobne zajednice vodenog kefira. Primarni izvor ugljika će određivati koji rodovi kvasca će biti dominantni. Sve bakterije mliječne kiseline pronađene u vodenim kefirima mogu sintetizirati kiseline iz saharoze (Bechtner i sur., 2019). Važno je naglasiti da je saharoza supstrat za sintezu dekstrana, glavnu strukturnu komponentu zrnaca vodenog kefira.



**Slika 4.** Primarni metaboliti i interakcije između mikrobiote vodenog kefir (prema Lynch i sur., 2021)

## 2.5. Proizvodnja vodenog i mliječnog kefir

Proizvodnja mliječnog kefir je standardiziranija nego proizvodnja vodenog kefir. Brojni znanstveni radovi istražuju i optimiziraju proizvodnju mliječnog kefir u velikim pogonima i količinama, dok se o komercijalnoj proizvodnji vodenog kefir trenutno nedovoljno zna jer nisu dovoljno istražene karakteristike vodenih kefirnih zrnaca i optimalni uvjeti fermentacije. Svake godine, broj radova o vodenom kefiru se povećava što dovodi do zaključka kako je ovo proizvod od velikog interesa te će u budućnosti biti dostupne i dodatne informacije o ovome proizvodu te će se uvesti standardizacija njegove proizvodnje. Za sada se u literaturi mogu pronaći radovi gdje se fermentacija vodenog kefir prati tijekom 24 sata (Arapović i sur., 2024; Fiorda i sur., 2017), 48 sati (Arapović i sur., 2024) i 72 sata (Gulitz i sur., 2011). Fermentacija se provodi na 25 °C za obje vrste kefir, iako se za vodeni kefir u nekim radovima navodi 21 °C kao optimalna temperatura fermentacije (Alsayadi i sur., 2013). Na početku fermentacije vodenih kefirnih zrnaca u vodenoj otopini su prisutni saharoza, glukoza, fruktoza i manitol, a kao produkti reakcije nastaju octena i mliječna kiselina, ugljikov dioksid i etanol (Laureys i De Vuyst, 2017). Nakon fermentacije u vodenom kefiru je identificirano 30 različitih kemijskih spojeva od kojih su za okus i aromu vodenog kefir najviše odgovorni prisutni metilni esteri koji potječu iz voća ili povrća dodanog na početku fermentacije (tablica 1). Za razliku od

mliječnog kefira, vodeni kefir sadrži više etanola i ugljikovog dioksida koji daje svježinu ovom probiotičkom napitku.

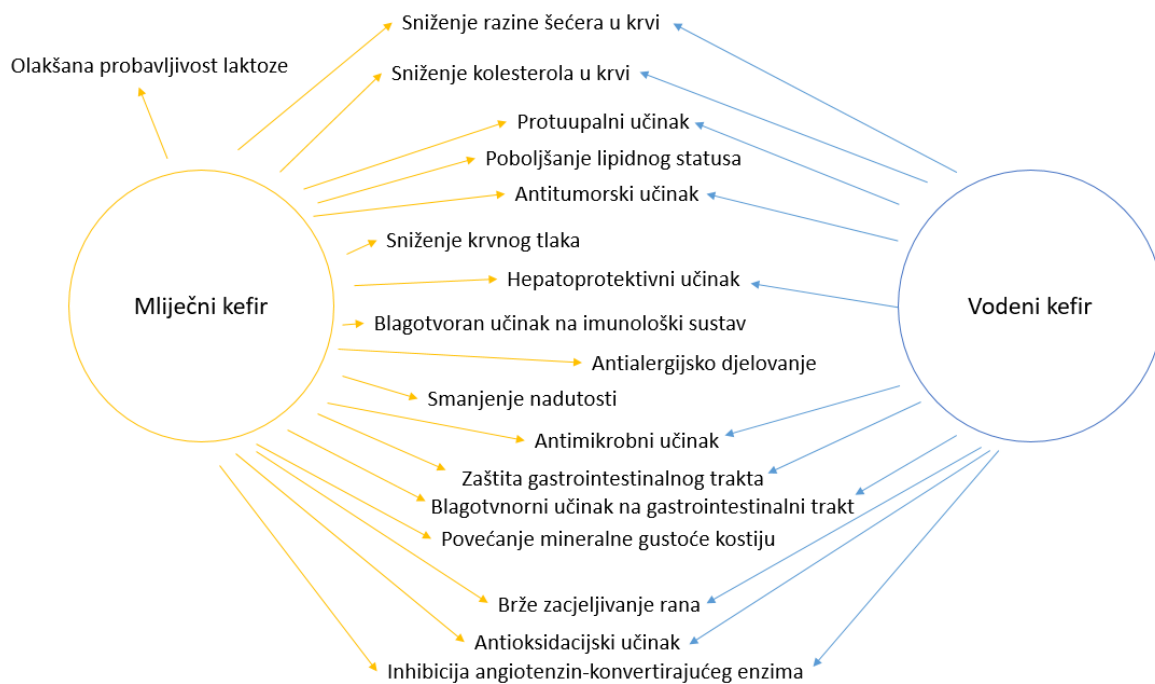
**Tablica 1.** Produkti fermentacije i komponente arome vodenog kefira

Naziv komponente	Literatura
2-metil-1-propanol, izoamil-alkohol, etil-acetat, izoamil-acetat, etil-heksanoat, etil-oktanoat, etil-dekanoat, etil-butanoat, etil-2-metil-butanoat	Laureys i De Vuyst, 2014
2-feniletal-acetat, etil-laktat, etil-butanoat, etil-2-metil-butanoat, etil-heptanoat, etil-nonanoat, etil-9-dekanoat, etil-benzenpropanoat, metil-oktanoat, izoamil-oktanoat, dietil-sukcinat, heksanoat, oktanoat, nonanoat, dekanoat, heksanal, furfural, benzaldehid, 1-oktanol, 1,3-propandiol, benzil-alkohol, 2-feniletanol, 4-etilfenol, 4-etil-gvajakol, 2,4-di-tert-butilfenol, butilirani hidroksitoluen, stiren	Laureys i De Vuyst, 2017

## 2.6. Zdravstvene pogodnosti konzumacije vodenog i mliječnog kefira

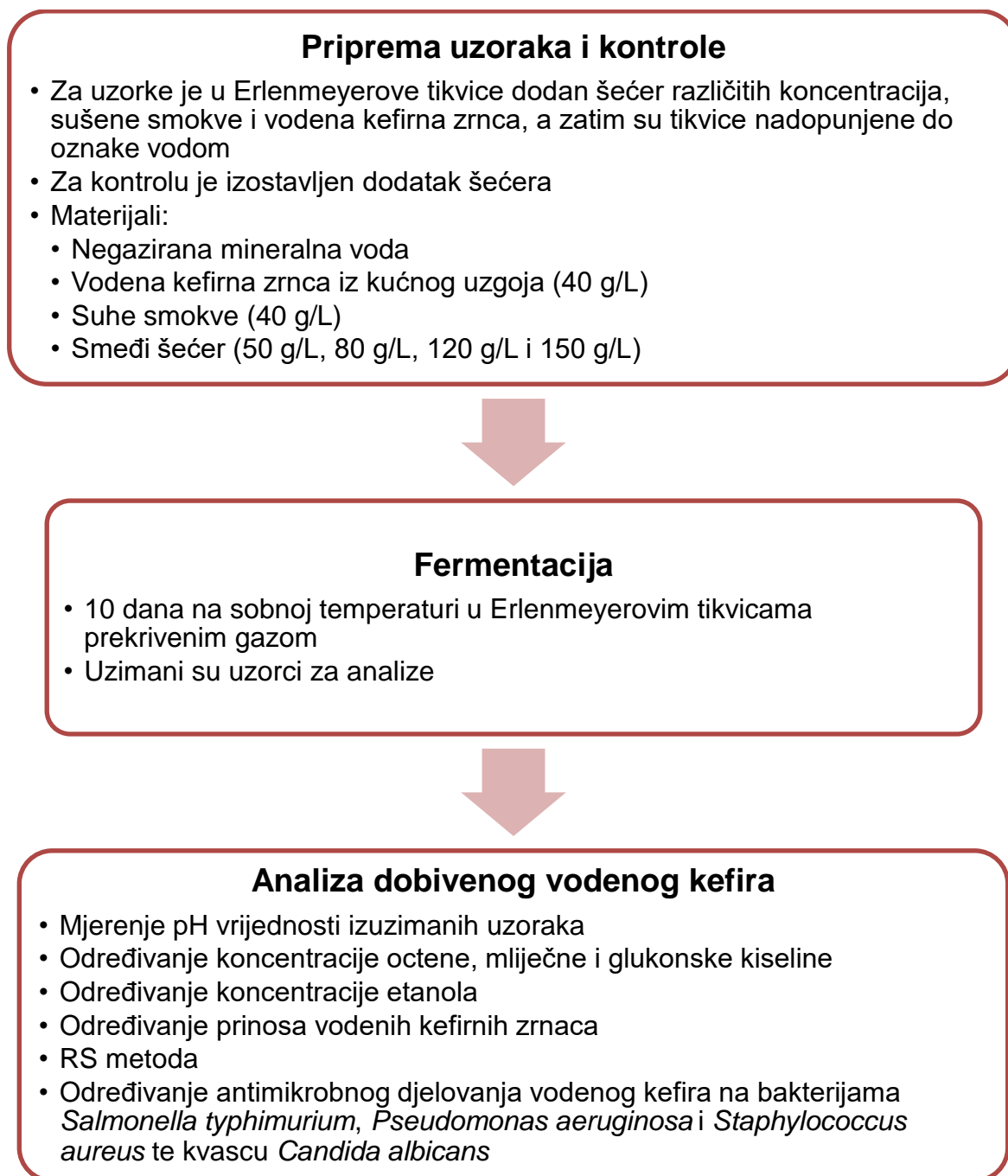
Provedena su mnoga istraživanja zdravstvenog učinka mliječnog kefira, dok se tek mali broj radova pozabavio zdravstvenim pogodnostima vodenog kefira (slika 5). Mliječni kefir sadrži raznoliku mikrobiotu i kemijske spojeve sintetizirane tijekom fermentacije koji pokazuju antimikrobno, antioksidacijsko, antihipertenzivno, antitumorsko, antialergijsko, antidijabetsko i protuupalno djelovanje te ima blagotvorni učinak na probavu, smanjenje kolesterola, imunološki sustav i anoreksiju (Rosa i sur., 2017). Zdravstveni učinci vodenog kefira slični su onima mliječnog kefira. Prednosti vodenog kefira nad mliječnim kefirom su dokazana u radu Rocha-Gomesa i sur. (2018) gdje se uspoređivao učinak vodenog i mliječnog kefira na biokemijske, nutritivne i fiziološke parametre kod štakora. Grupa koja je hranjena vodenim kefirom pokazivala je bolji lipidni status od grupe hranjene mliječnim kefirom te su razine ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola bile niže kod grupe hranjene vodenim kefirom. Drugo istraživanje Brasil i sur. (2019) dokazuje pozitivne učinke vodenog kefira na gastrointestinalni trakt te antioksidacijska svojstva. Alsayadi i sur. (2014) dokazali su eksperimentima na Wistar

štakorima antidijabetsko djelovanje vodenog kefir te pozitivne učinke na tjelesnu masu te lipidni i glukozni status. Dhar i Mohanty (2020) u svom radu pokazuju kako je COVID-19 smrtonosniji za stariju populaciju s mikrobnim disbalansom te bi upravo vodeni kefir mogao biti ključ održavanja crijevne homeostaze. Vodeni kefir kao probiotik pokazuje antivirusno djelovanje poticanjem urođenog i/ili stečenog imuniteta (Sundararaman i sur., 2020). Najveća zdravstvena prednost vodenog kefir je činjenica da je on prihvatljiva alternativa mliječnom kefiru za ljude intolerantne na laktozu te vegane. Konzumacijom vodenog kefir i ove dvije skupine ljudi bi mogle uživati u dokazanim probiotičkim svojstvima fermentiranih pića što ovaj proizvod čini izrazito zanimljivim komercijalnim proizvodom budućnosti.



**Slika 5.** Usporedba zdravstvenog učinka vodenog i mliječnog kefir (prema Guzel-Seydim i sur., 2021)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO



**Slika 6.** Shematski dijagram cjelokupnog tijeka istraživanja

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Aparati

- pH-metar "Methrom", model 744, Švicarska
- Analitička vaga "Mettler", Švicarska
- Digitalna analitička vaga "Shimadzu", Japan
- Tehnička vaga "Tehtnica", ET 1211, 0-1200 g, Slovenija
- Termostat Sutjeska, BiH

#### 3.1.2. Sirovine i mikroorganizmi

Vodena kefirna zrnca su dodana u 500 mL negazirane (prirodne) mineralne vode Radenska Naturelle, Radenska d.o.o., Radenci, Slovenija. Mineralni sastav upotrijebljene vode je prikazan u tablici 2.

**Tablica 2.** Sastav prirodne mineralne vode upotrijebljene u istraživanju

Analiza mineralnih sastojaka vode (mg/L)	
kationi	Ca <sup>2+</sup> (59); Mg <sup>2+</sup> (20); Na <sup>+</sup> (6,9); K <sup>+</sup> (0,7)
anioni	HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (280); Cl <sup>-</sup> (5,0); SO <sub>2</sub> <sup>2-</sup> (1,1); F <sup>-</sup> (<0,20)

Vodena kefirna zrnca su nabavljena iz kućnog uzgoja, Zagreb, Hrvatska. Saharoza je dodana u obliku svijetlog, organskog, smeđeg, kristalnog šećera od šećerne trske. Podrijetlo šećera je Brazil, a pakira ga Nutrigold d.o.o., distribuirana Tvornica zdrave hrane, Zagreb, Hrvatska. Sastav upotrijebljenog izvora saharoze prikazan je u tablici 3.

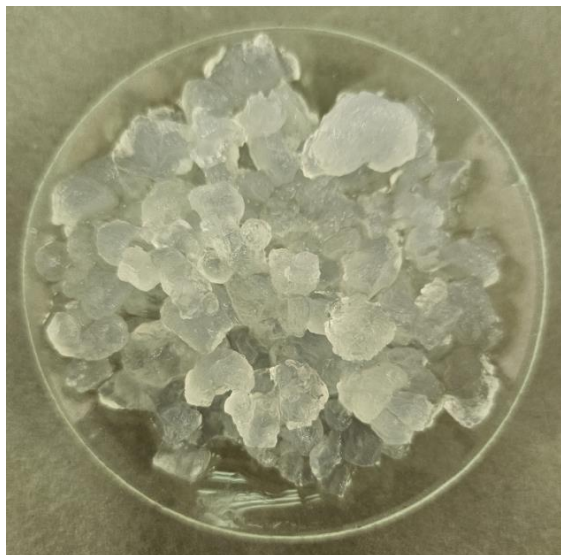
**Tablica 3.** Sastav organskog smeđeg šećera dobivenog preradom šećerne trske

Nutrijenti	Vrijednost na 100 g
masti	0 g
ugljikohidrati	99,5 g
vlakna	0 g
proteini	0,5 g
sol	0,0125 g

Upotrijebljena kefirna zrnca za fermentaciju negazirane mineralne vode uz dodatak različitih koncentracija šećera prikazana su na slici 7.



A)



B)



**Slika 7.** Fotografija vodenih kefirnih zrnaca (kontrolni uzorak) uporabljenih u istraživanju: A) inokulum; B) vodena kefirna zrnca na kraju 10 dana fermentacije (osebna fotografija)

Za testiranje antimikrobne aktivnosti uporabljeni su sojevi patogenih bakterija iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Testni mikroorganizmi bili su patogene bakterije *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Salmonella typhimurium* 3064, *Staphylococcus aureus* 3048 i kvasac *Candida albicans* 11.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprava starter kulture za fermentaciju

Starter kultura vodenih kefirnih zrnaca je pripravljena zajedno s „majčinskom hranjivom podlogom“ u negaziranoj mineralnoj vodi s dodatkom 50 g/L konzumnog šećera i 20 g kefirnih zrnaca je uzgajano u 100 mL negazirane mineralne vode na 28 °C u termostatu. Nakon 24 sata uzgoja, zrnca su isprana sterilnom destiliranom vodom i ponovno inokulirana u 100 mL negazirane mineralne vode, te je ovaj postupak proveden dva puta.

#### 3.2.2. Priprava vodenih kefirnih zrnaca za fermentaciju

Za proizvodnju napitaka su u 500 mL negazirane mineralne vode dodane različite koncentracije šećera (50, 80, 120 i 150 g/L) i 40 g/L vodenih kefirnih zrnaca. Fermentacija je trajala 10 dana.

### 3.2.3. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki drugi dan tijekom 10 dana fermentacije. Mjerenja su provedena pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

### 3.2.4. Određivanje koncentracije mliječne kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL stavljeno je 10 mL uzorka fermentiranog napitka i dodano je nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak titiran je otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Svaki mL 0,1 M NaOH ekvivalentan je 90,08 mg mliječne kiseline. Masena koncentracija mliječne kiseline (mg/mL) izračunata je prema jednadžbi:

$$\gamma(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}) = \frac{V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 90,08}{V(\text{uzorka})} \quad [1]$$

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 (10 mL)

### 3.2.5. Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentiranog napitka i 20 mL vode te je dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak titiran je otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija octene kiseline (g/L) izračunata je prema jednadžbi:

$$\gamma(\text{CH}_3\text{COOH}) = V(\text{NaOH}) \cdot f(\text{NaOH}) \cdot V(\text{uzorka}) \cdot 6 \quad [2]$$

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)

### 3.2.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL stavljeno je 25 mL uzorka i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titiran otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija glukonske kiseline (g/L) izračunata je prema jednadžbi:

$$\chi(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7) = \frac{V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 1,97}{V(\text{uzorka})} \quad [3]$$

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 (25 mL)

### 3.2.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Udjel alkohola u fermentiranim uzorcima određivan je kemijskom metodom koja se zasniva na oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) u kiselom mediju.

#### Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL je stavljeno 5 mL fermentiranog uzorka koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos uzorka i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu sa ravnim dnom od 50 mL i neutraliziran s 0,1 M NaOH. U Erlenmeyer tikvicu od 100 ml, u koju će se hvatati destilat, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 ml koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija je bila polagana i postupna i trajala je dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Po završetku destilacije, lula je isprana s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmeyer tikvicu u koju je uzorak predestilirao. Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Tijekom oksidacije alkohola utrošen je jedan dio bikromata, dok je drugi dio ostao u suvišku. Zatim je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje, dodano mu je oko 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20 %-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavljeno začepljeno 5 minuta.

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 oksidoredukcije 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. Određivanje koncentracije reducirajućih šećera (RS metoda)

U tikvicu s okruglim dnom od 250 mL je otpipetirano 1 mL uzorka, koji je razrijeđen s 24 mL destilirane vode. Pripremljenom uzorku je dodano 10 mL otopine A (Fehling I) i 10 mL otopine B (Fehling II) i kuhano točno 2 minute uz povratno hladilo. Nakon toga je uzorak ohlađen pod mlazom vode i dodano mu je 10 mL otopine C (30 %-tni KJ) i 10 mL otopine D (26 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Nakon homogenizacije, uzorku je dodano 2 mL škroba (1 %-tna otopina), te je titriran s 0,1 mol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> do prijelaza plave boje u boju puti (treba se zadržati jednu minutu).

Glukoza test (kontrola): U tikvicu s okruglim dnom od 250 mL je dodano 5 mL otopine glukoze (10 g/L) i 20 mL destilirane vode (ukupan volumen 25 mL) i ponovljen je prethodno opisan postupak.

Slijepa proba: U tikvicu s okruglim dnom od 250 mL je dodano 25 mL destilirane vode i ponovljen je prethodno opisan postupak.

Koncentracija reducirajućih šećera (RS) izračunata je prema jednadžbi:

$$\gamma \text{ (reducirajuće supstancije } \equiv \text{ RS)} = [50 (a - b)] / [(a - c) \cdot d] \quad (\text{g/L}) \quad [5]$$

a – volumen 0,1 mol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za slijepu probu (mL)

b - volumen 0,1 mol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za uzorak (mL)

c - volumen 0,1 mol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za kontrolu (glukoza test) (mL)

d - volumen uzorka uzet za analizu (mL)

### 3.2.9. Izračunavanje prinosa vodenih kefirnih zrnaca i koeficijenta konverzije Y<sub>x/s</sub>

Nakon 10 dana fermentacije, vodena kefirna zrnca su izdvojena iz Erlenmeyer tikvica i oprana u plastičnom cjedilu demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu pH vrijednost vode. Masa biomase vodenih kefirnih zrnaca (g) izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

Prinos biomase (Y<sub>kz</sub>) izračunat je prema jednadžbi:

$$P_x (\%) = (\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma}) \cdot 100 \quad [6]$$

Koeficijent konverzije supstrata u biomasu Y<sub>x/s</sub> (%) izračunat je prema jednadžbi:

$$Y_{x/s} (\%) = \frac{(\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma})}{(\gamma \text{ izvora C na početku fermentacije} - \gamma \text{ izvora C na kraju fermentacije})} \cdot 100 \quad [7]$$

### 3.2.10. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom

Antimikrobna aktivnost inhibicija rasta odabranih patogenih test mikroorganizama: bakterija vrsta *S. aureus*, *S. typhimurium* i *P. aeruginosa*, te kvasca *C. albicans* određivana je metodom disk radijalne difuzije.

Na podlogu čvrste hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici, na koju je prethodno naciepljen testni mikroorganizam, postavljeni su diskovi na koje je nakapano 10 µL vodenog kefira. Podloge su inkubirane u termostatu 24 h pri 28 °C (kvasci) i 48 h pri 37 °C (bakterije). Tijekom inkubacije istraživani uzorci su difundirali radijalno u agar tvoreći gradijent koncentracije i ovisno o njihovim antimikrobnim djelovanjima inhibirali rast mikroorganizma u okolini diska. Prozirna zona (halo zona) u kojoj nema vidljivog rasta naziva se zona inhibicije (ZI) i indikacija je osjetljivosti mikroorganizma prema mikroorganizmu s antimikrobnim djelovanjem.

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

### 3.2.11. Statistička analiza podataka

Podaci su statistički obrađeni pomoću ANOVA testova i višestrukih raspona testiranih pomoću softvera Origin 2022. Odstupanje se smatralo značajno različitim pri  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Vodeni kefir se po sastavu razlikuje od mliječnog kefira prema njegovoj kemijskoj strukturi, fizičkom izgledu i sastavu mikrobiote (Gökırmaklı i Güzel-Seydim, 2022). Proizvodi se u vodenoj otopini šećera uz dodatak vodenih kefirna zrnca pri 21–25 °C tijekom 48–96 h (Pendón i sur., 2022). Kako bi poboljšali okus napitka, mogu se dodavati jabuke, mandarine, dunja, grožđe, te bilo koje suho voće (Cufaoglu i Erdinc, 2023; Güzel-Seydim i sur., 2023; Lynch i sur., 2021; Moretti i sur., 2022; Pendón i sur., 2022).

U ovom je radu vodeni kefir proizveden fermentacijom vodenih otopina različitih koncentracija saharoze (smeđeg, nerafiniranog šećera) pomoću vodenih kefirnih zrnaca i dodatkom suhih smokvi. Odabir izvora ugljika (obično konzumnog šećera) i dušika (dobivenog iz sušenog voća) tijekom fermentacije, ključan je za poticanje vitalnosti i rast mikroorganizama unutar vodenih kefirnih zrnaca koji doprinose sintezi različitih produkata od kojih neki pokazuju i antimikrobnu aktivnost. U vodenom kefiru, specifične bakterije mliječne kiseline (BMK) služe kao izvor probiotika, istodobno djelujući antimikrobno i antifungalno zbog proizvodnje mliječne kiseline i bakteriocina (Gonda i sur., 2019). Tijekom 10 dana aerobne fermentacije na sobnoj temperaturi, praćeni su različiti parametri: promjena pH vrijednosti fermentiranog napitka, kinetika nastajanja mliječne, octene i glukonske kiseline, te koncentracije etanola, prinos biomase kefirnih zrnaca, kao i antimikrobno djelovanje fermentiranog napitka (slike 8-14, tablice 4-6).

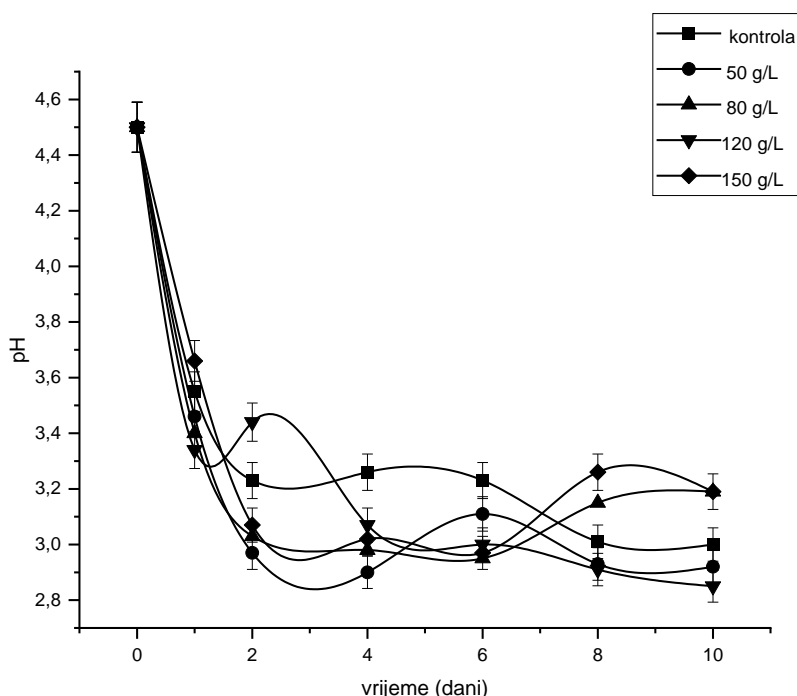
### 4.1. Promjena pH vrijednosti

Kvasac *S. cerevisiae* je odgovoran za hidrolizu saharoze djelovanjem izvanstanične glikozidaze, do glukoze i fruktoze. Kvasac zatim koristi te monosaharide u glikolizi za proizvodnju etanola i ugljičnog dioksida, osiguravajući vitalne peptide i aminokiseline bakterijama mliječne kiseline i drugim prisutnim mikroorganizmima. Bakterije iz roda *Lactobacillus* mogu asimilirati fruktozu za glikolizu ili pretvarajući ju u manitol aktivnošću manitol dehidrogenaze. Tijekom kasnije faze fermentacije, bakterije octene kiseline metaboliziraju glukonsku i octenu kiselinu u aerobnim uvjetima kako bi se postigao kiselkasti okus (Lynch i sur., 2021; Ras El Gherab i sur., 2019). Uočeno je da je konačni pH pića ispod 4, što predstavlja ključnu značajku sigurnosti pića. Ovaj pH učinkovito inhibira rast patogenih bakterija u piću, produžujući tako njegovo trajanje i povećava ukupnu sigurnost konzumacije (Phiri i sur., 2019).

U ovom je radu ispitivan utjecaj različitih koncentracija saharoze (smeđi šećer) na uspješnost proizvodnje vodenog kefira. Tijekom 10 dana fermentacije, od početne se pH vrijednosti svih

uzoraka (pH 4,5) naglo smanjivao do 2. dana, nakon čega je primijećen blagi pad pH vrijednosti (slika 8).

Ne postoji jednostavan odnos između pH vrijednosti metabolita i sadržaja nastalih kiselina. Smanjenje pH vrijednosti karakterizira nagli pad vrijednosti u prvim danima fermentacije, dok su kasnije promjene vrijednosti manje izražene (slika 8). Ovaj se fenomen može povezati s puferskim učinkom koji proizlazi iz reakcija između sintetiziranih organskih kiselina i minerala koji su sastavni dio podloge (Phiri i sur., 2019).



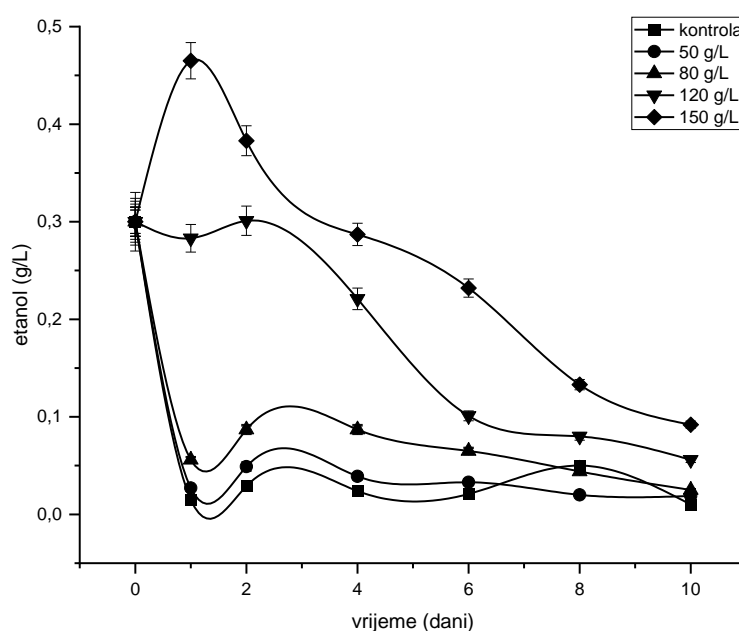
**Slika 8.** Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije vodenog kefir

#### 4.2. Etanol i organske kiseline

Vodeni kefir je zdrav i osvježavajući napitak kompleksnog sastava, a na tržištu se može naći kao bezalkoholno piće, čime koncentracija alkohola mora biti niža od 0,5 % vol/vol. Prema dostupnim literaturnim podacima, koncentracija etanola se povećava u prvom dijelu fermentacije i postiže svoju maksimalnu vrijednost u šestom danu, nakon čega se smanjuje (Chen i Liu, 2000).

Kvantifikacijom glavnih produkata vodenog kefir tijekom 10-dnevne fermentacije uočeno je da je jedan od prvih etanol, kao što je potvrđeno i u prijašnjim istraživanjima Laureys i De Vuyst (2014). U njihovom istraživanju, koncentracija etanola je nakon 196 h fermentacije (8

dana) iznosila 4,29 g/L. U ovom je radu izmjereno linearno povećanje koncentracije etanola samo u prvom danu fermentacije u uzorku s najvećom koncentracijom dodanog šećera od 150 g/L (0,465 g/L), dok je kod koncentracije od 120 g/L šećera bila relativno linearna do 2. dana fermentacije, kad je iznosila 0,301 g/L (slika 9). U svim ostalim uzorcima, koncentracija etanola je s početne (0,3 g/L) naglo, već u prvom danu pala na 0,056 g/L (80 g/L), 0,027 g/L (50 g/L) i 0,015 g/L (kontrola). Konačne vrijednosti koncentracije etanola nakon 10 dana fermentacije iznosile su 0,01 g/L (kontrola), 0,019 g/L (50 g/L), 0,025 g/L (80 g/L), 0,056 g/L (120 g/L) i 0,092 g/L (150 g/L). Dobiveni rezultati jasno ukazuju biooksidaciju etanola do octene kiseline u četvrtom danu fermentacije, što se može vidjeti i na slici 11, kada koncentracija octene kiseline linearno počinje rasti, a koncentracija etanola padati (slika 9).



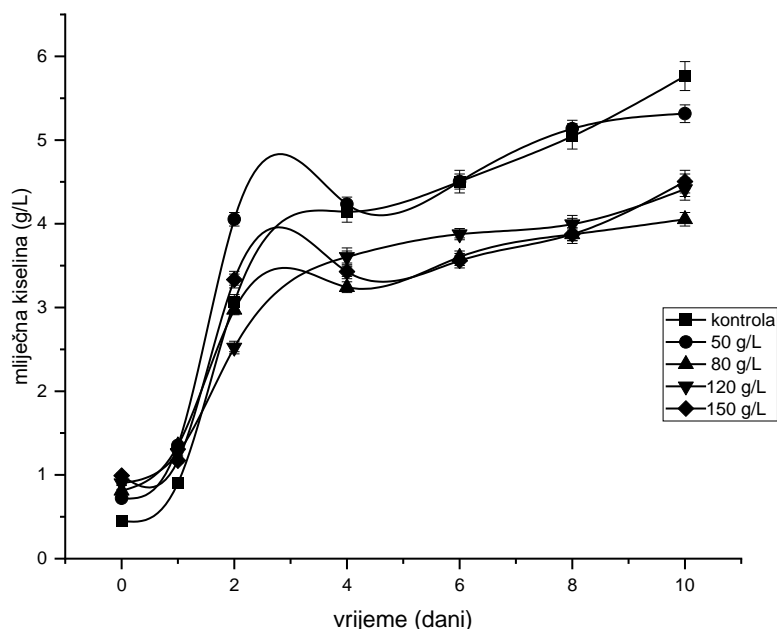
**Slika 9.** Kinetika nastajanja i biooksidacije etanola tijekom 10 dana fermentacije vodenog kefira

Mliječna, octena i glukonska kiselina uobičajeni su proizvodi mliječno-kiselog vrenja, octeno-kiselog vrenja i metabolizma glukoze. Kao rezultat toga, nalaze se u relativno visokim koncentracijama u fermentiranoj hrani. Organske kiseline imaju niz zdravstvenih učinaka i fizioloških funkcija kod ljudi. Na primjer, laktat ima imunomodulatoran učinak reguliranjem stanične mreže citokina i signalnog sustava crijevne sluznice. Limunska kiselina modulira aktivnost tirozinaze i tako inhibira melanogenezu u ljudskim stanicama. Octena kiselina i propionska ki-



selina poboljšavaju i moduliraju inzulinski odgovor produljenjem vremena sitosti kod ljudi. Organske kiseline djeluju antimikrobno na patogene mikroorganizme, što može biti korisno u promicanju kolonizacija crijeva korisnim mikroorganizmima, a ne patogenim (Coban, 2020). Koncentracija sintetiziranih organskih kiselina mijenjala se tijekom fermentacije, a kinetika nastajanja prikazana je na slikama 10-12.

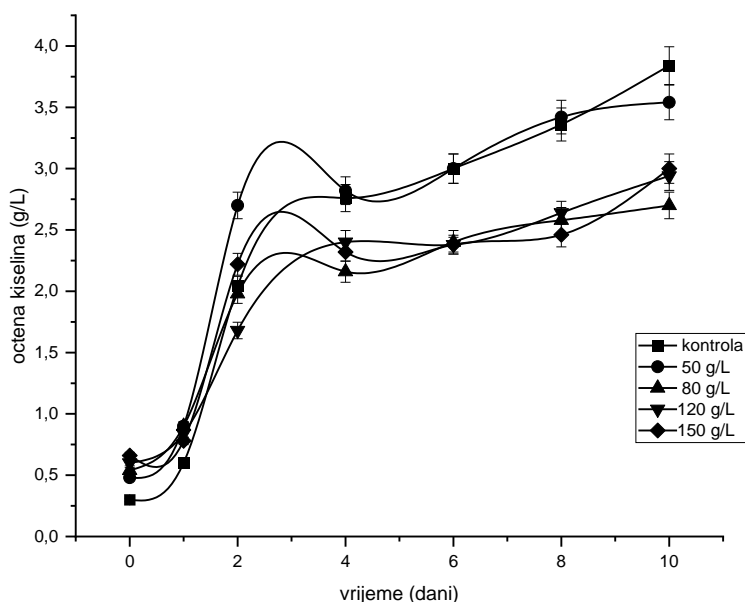
Mliječna kiselina jedna je od glavnih metabolita tijekom fermentacije napitaka dobivenih previranjem saharoze s dodatkom voća i vodenih kefirnih zrnaca. Kinetika nastajanja mliječne kiseline prikazana je na slici 10. Vidljivo je linearno povećanje koncentracije u prvih 3 dana fermentacije pri svim različitim početnim koncentracijama šećera, kao i u kontrolnom uzorku. Najveća koncentracija određena je na kraju procesa u kontrolnom uzorku (5,77 g/L), a tek nešto niža u uzorku s 50 g/L dodane saharoze (5,31 g/L). U uzorcima s dodanih 120 g/L i 150 g/L saharoze su određene relativno podjednake koncentracije mliječne kiseline (4,41 g/L i 4,50 g/L). Najniža koncentracija izmjerena je u uzorku s 80 g/L saharoze i iznosila je 4,05 g/L. U istraživanjima koji su proveli Martinez-Torres i sur. (2016), koncentracija mliječne kiseline je nakon 48 h bila 1,7 g/L, pri koncentraciji šećera od 50 g/L. U ovom je radu u tom vremenskom razdoblju postignuta vrijednost od 4,056 g/L, što je 2,39 puta veća koncentracija.



**Slika 10.** Kinetika nastajanja mliječne kiseline tijekom 10 dana fermentacije vodenog kefir

Nastajanje octene kiseline rezultat je metabolizma bakterija octene kiseline koje su dio simbiotske kulture vodenih kefirnih zrnaca. Njezin udjel je manji od udjela mliječne kiseline, no

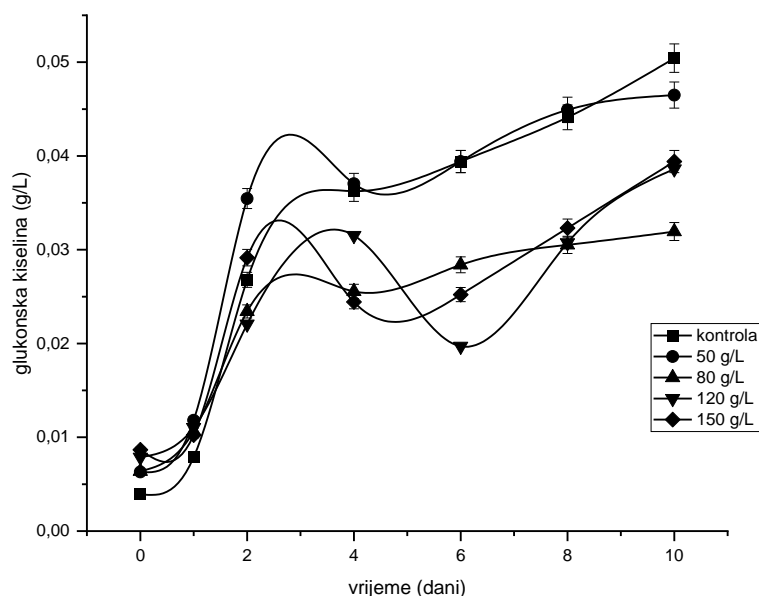
važan je zbog svog inhibicijskog djelovanja na patogene mikroorganizme i vrste koje izazivaju kvarenje namirnica (Martinez-Torres i sur., 2016). Kinetika nastajanja octene kiseline prikazana je na slici 11. Kao i kod mliječne kiseline, najveća koncentracije octene kiseline, nakon 10 dana fermentacije, izmjerena je u kontrolnom uzorku (3,84 g/L), a u uzorku kojem je dodano 50 g/L saharoze ta je vrijednost bila 3,54 g/L. Najniža koncentracija octene kiseline izmjerena je pri 80 g/L saharoze, dok su pri koncentracijama od 120 g/L i 150 g/L saharoze izmjerene blago više koncentracije (2,94 g/L i 2,99 g/L).



**Slika 11.** Kinetika nastajanja octene kiseline tijekom 10 dana fermentacije vodenog kefir

Uz mliječnu kiselinu koja je dominantna u vodenom kefiru, prisutna je i glukonska kiselina. Prema rezultatima mjerenja provedenih u ovom istraživanju, koncentracija glukonske kiseline je bila izrazito niska (slika 12), no može se uočiti linearni rast u prva 3 dana fermentacije kao i kod mliječne i octene kiseline. Isto tako, ponovno je najveća koncentracija izmjerena u kontrolnom uzorku (0,05 g/L), jedva primjetno manja kod 50 g/L šećera (0,047 g/L), dok su u ostalim koncentracijama izmjerene vrijednosti od 0,032 g/L do 0,039 g/L.

Sve fermentacije provedene su u statičnoj kulturi na sobnoj temperaturi, pri čemu im nije određivan mikrobiološki sastav. Upravo je to jedan od glavnih razloga što je uočeno određeno odstupanje između dobivenih rezultata u ovom radu i objavljenih u dostupnoj literaturi, jer su rezultat različitosti mikroflore koja je dio ekološkog izvorišta dodanih vodenih kefirnih zrnaca.



**Slika 12.** Kinetika nastajanja glukonske kiseline tijekom 10 dana fermentacije vodenog kefirna

#### 4.3. Prinos biomase vodenih kefirnih zrnaca i koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{x/s}$ )

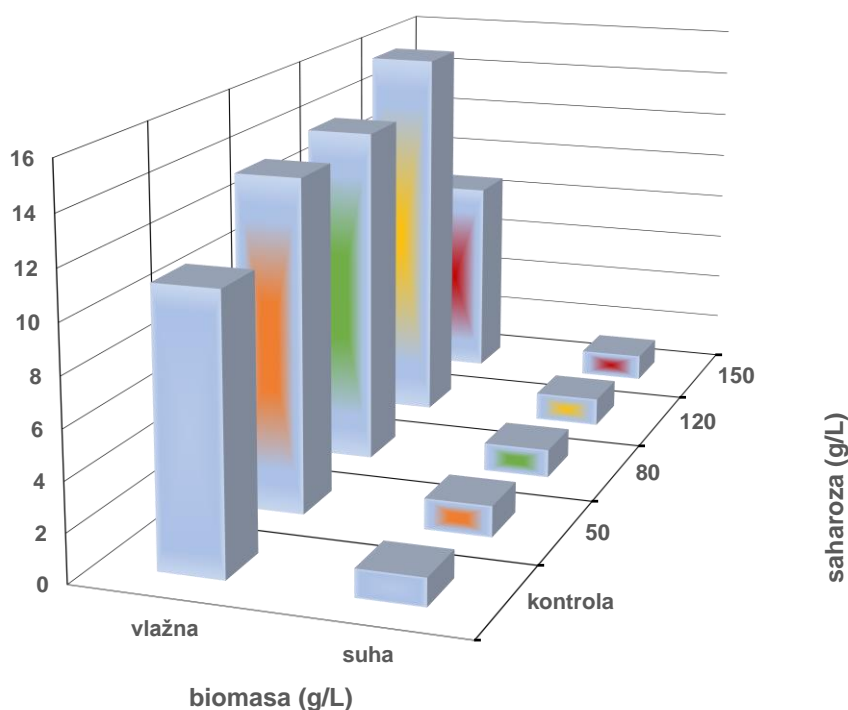
Vodena kefirna, želatinozna zrnca predstavljaju simbiotsku kulturu bakterija i kvasca ugrađenih u polisaharidnu matricu. Bakterije mliječne kiseline, kvasci i bakterije octene kiseline primarni su mikrobnj članovi vodenog kefirnog zrna. Među ostalim doprinosima, vrste bakterija mliječne kiseline proizvode egzopolisaharidnu matricu iz koje se formira kefirno zrno, dok kvasac pomaže bakterijama izvorom dušika koji mogu asimilirati. Međutim, koja točno vrsta prevladava unutar mikrobiote zrnaca ovisi o zemljopisnom podrijetlu, supstratu i uvjetima fermentacije.

Tijekom 10 dana fermentacije, prinos vodenih kefirnih zrnaca se mijenjao ovisno o koncentraciji dodane saharoze (tablica 4). Rezultati se ne mogu usporediti s dostupnim literaturnim podacima jer do sada nije niti jedno istraživanje provedeno na fermentacijama vodene otopine različitih koncentracija šećera s vodenim kefirnim zrnima. Ono što je važno istaknuti je da su za fermentacije uporabljene različite hranjive podloge, kao i početna pH vrijednost uporabljene podloga, te temperature pri kojima su fermentacije vođene, što uvelike utječe na tijek fermentacije i konačan proizvod.

**Tablica 4.** Prinos vodenih kefirnih zrnaca nakon 10 dana fermentacije u negaziranoj mineralnoj vodi s dodatkom suhih smokvi i različitih koncentracija saharoze

$\gamma$ saharoze (g/L)	$\gamma$ inokuluma (g/L)	$\gamma$ biomase (g/L)	$\gamma$ suhih smokvi (g/L)	Prinos biomase $P_x$ (%)
kontrola	7,21	8,60	7,19	1,39
50	8,01	11,14	7,68	3,13
80	8,00	13,69	7,63	5,89
120	8,00	14,10	7,92	6,10
150	8,03	15,95	7,40	7,92

Prinos biomase tijekom fermentacije usko je povezan s izvorom ugljika, odnosno supstratom. Prema dobivenim rezultatima, saharoza (50 g/L) je izvrstan supstrat jer je nakon 10 dana fermentacije izmjereno 13,69 g/L vlažne biomase, pri čemu je u kontrolnom uzorku izmjereno 11,42 g/L vlažne biomase (slika 13). Pri toj koncentraciji dodane saharoze je postignut najbolji odnos vlažne i suhe biomase u istraživanju jer je masa suhe biomase (50 g/L) iznosila 1,28 g/L, a u kontrolnom uzorku 1,14 g/L. U uzorcima s dodatkom viših koncentracija saharoze izmjeren jer je suha biomasa bila između 1,11 i 1,18 g/L.



**Slika 13.** Odnos vlažne biomase i suhe tvari vodenih kefirnih zrnaca nakon 10 dana fermentacije u negaziranoj mineralnoj vodi s dodatkom suhih smokvi i različitih koncentracija saharoze

Izvor ugljika u hranjivoj podlozi je uvijek zanimljiv za istraživanje kada se radi o simbiotskoj kulturi mikroorganizama koji tijekom metabolizma imaju svoj strogo propisani slijed. Koncentracija saharoze, koja je djelovanjem kvašćevog enzirnog sustava postala dostupna bakterijama mliječne i octene kiseline, smanjivala se do kraja fermentacije, no nije potpuno utrošena, što je rezultiralo vrlo ukusnim, blago slatkastim, a zbog nastalih kiselina, blago kiselkastim i osvježavajućim okusom.

Sve bakterije, prisutne u ovoj mješovitoj kulturi su sposobne uporabiti saharozu, glukozu i fruktozu kao izvor ugljika. Prema istraživanjima Lisdiyanti i sur. (2000), bakterije iz roda *Aceetobacter* rastu brže u prisutnosti mliječne kiseline, jer mogu oksidirati laktat i acetat do CO<sub>2</sub> i vode.

U ovom su radu, po prvi put, izračunati koeficijenti konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{x/s}$ ) koji su prikazani u tablici 5. Najbolji  $Y_{x/s}$  postignut je pri koncentraciji od 120 g/L (1,0549 g/g), dok je pri koncentraciji od 150 g/L dobiven vrlo niski rezultat (0,2117 g/g) u usporedbi s kontrolnim uzorkom (0,3976 g/g). Uzorci s 50 g/L i 80 g/L postigli su vrlo sličan  $Y_{x/s}$  (0,7497 g/g i 0,7925 g/g). Ovi rezultati se ne mogu usporediti ni s jednim literaturnim podatkom jer do sada nitko nije obratio pozornost na ovaj vrlo važan parametar. Isto tako, u ovom radu nije mjeren potpuni kemijski sastav biomase vodenih kefirnih zrnaca, pa nije bilo moguće izračunati iskorištenje procesa, a teorijski stupanj konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{x/s \text{ teor.}}$ ) nije literaturno zabilježen.

**Tablica 5.** Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ( $Y_{x/s}$ ) vodenih kefirnih zrnaca nakon 10 dana fermentacije u negaziranoj mineralnoj vodi s dodatkom suhih smokvi i različitih koncentracija saharoze

$\gamma$ saharoze (g/L)	$\gamma$ RS (S <sub>0</sub> ) (g/L)	$\gamma$ RS (S) (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)
kontrola	1,84	0,14	0,3976
50	0,73	0,41	0,7497
80	0,83	0,37	0,7925
120	1,09	0,52	1,0549
150	1,21	0,64	0,2117

#### 4.4. Antimikrobno djelovanje fermentiranog vodenog kefira

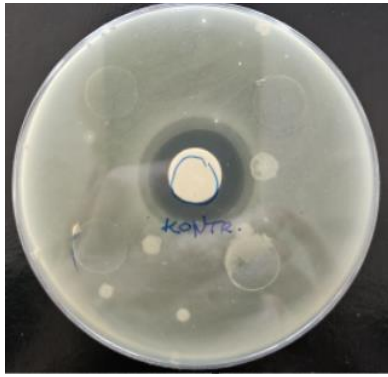
Zrnca vodenog kefira sadrže bakterije mliječne kiseline (najčešće *L. paracasei*, *L. parabuchneri*, *L. kefir*, *L. casei* i *L. lactis*), bakterije octene kiseline (*A. lovaniensis*) i kvasce (uglavnom *S. cerevisiae*), a razna istraživanja pokazala su potencijalna probiotička svojstva za

primjenu u razvoju funkcionalne hrane. U nekim mikroorganizmima vodenog kefira te probiotičke značajke uključuju sposobnost antagonističkog djelovanja protiv potencijalnih patogenih sojeva, adheziju na epitelne stanice, otpornost na simulirani želučani sok i žučne soli, preživljavanje prijenosa kroz gastrointestinalni trakt i potencijal za induciranje aktivacije imunološkog sustava sluznice crijeva (Romero-Luna i sur., 2020).

Zbog određivanja antimikrobne aktivnosti vodenog kefira, uzorci su testirani na hranjivim podlogama nacijepjenim patogenim bakterijama *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*, te kvascem *Candida albicans*. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 6, a fotografije uzoraka na slici 14. Može se uočiti da je prema gram<sup>-</sup> bakterijama (*P. aeruginosa* i *S. typhimurium*) postignuto izvrsno antimikrobno djelovanje jer su zone inhibicije bile veće od 20 mm, dok je gram<sup>+</sup> bakterija *S. aureus* bila otporna na antimikrobno djelovanje pri većim koncentracijama šećera (80, 120 i 150 g/L), dok su kod kontrolnog uzorka i dodatkom 50 g/L šećera postignute male zone inhibicije, no uglavnom je testni mikroorganizam „prerastao“ hranjivu podlogu (slika 14).

**Tablica 6.** Antimikrobna aktivnost vodenog kefira fermentiranog u negaziranoj mineralnoj vodi uz dodatak različitih koncentracija saharoze (zone inhibicije izražene u mm)

Koncentracija saharoze (g/L)	<i>S. auereus</i> (mm)	<i>P. aeruginosa</i> (mm)	<i>S. typhimurium</i> (mm)	<i>C. albicans</i> (mm)
kontrola	20*	30	26	11
50	-	27	25	20
80	-	24	21	-
120	15*	25	24	-
150	15*	24	25	8



*P. aeruginosa* (kontrola)



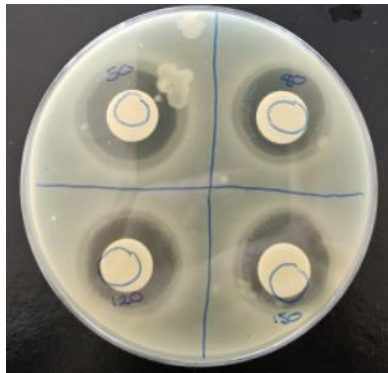
*S. typhimurium* (kontrola)



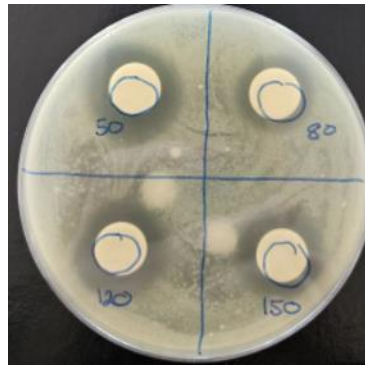
*S. aureus* (kontrola)



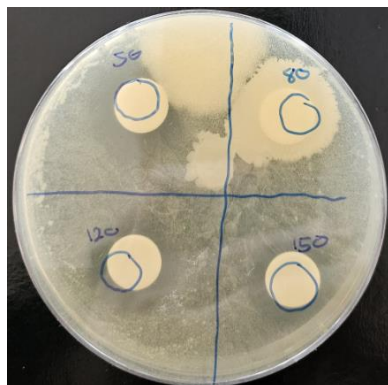
*C. albicans* (kontrola)



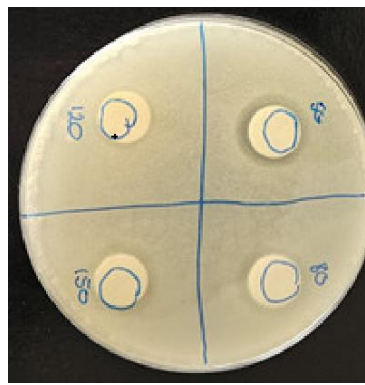
*P. aeruginosa* (sve koncentracije saharoze)



*S. typhimurium* (sve koncentracije saharoze)



*S. aureus* (sve koncentracije saharoze)



*C. albicans* (sve koncentracije saharoze)

**Slika 14.** Zone inhibicije ispitivanih mikroorganizama (osobna fotografija)

## 5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenih istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

1. Vodeni kefir je nutritivno vrijedan napitak bogat mineralima, a glavni metaboliti nakon fermentacije simbiotske kulture bakterija i kvasaca su organske kiseline (mliječna, octena i glukonska kiselina) te mali udjel alkohola.
2. U svim je uzorcima zabilježen pad pH vrijednosti i koncentracije etanola. Također, s protekom vremena, zabilježeno je povećanje koncentracije mliječne, octene i glukonske kiseline.
3. Najveći prinos biomase postignut je u eksperimentu sa dodatkom 150 g/L saharoze (7,92 g/L), no najbolji koeficijent konverzije supstrata u biomasu je postignut pri koncentraciji saharoze od 120 g/L (1,055 g/g). Rezultat se može objasniti zaostatkom neprevrelih šećera (glukoze i fruktoze) u vodenom kefiru s najvišom koncentracijom dodane saharoze.
4. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* i *S. aureus*, te kvasca *C. albicans*. Svi uzorci vodenog kefira pokazali su izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema *P. aeruginosa* i *S. typhimurium*, a nezadovoljavajuću prema *S. aureus* i *C. albicans*.



## 6. POPIS LITERATURE

Alsayadi M, Al Jawfi Y, Belarbi M i Sabri FZ (2013) Antioxidant potency of water kefir. *Jpn J Microbiol, Food Sci Biotechnol*, **2** (6), 2444 – 2447.

Alsayadi M, Al Jawfi Y, Belarbi M, Soualem-Mami Z, Merzouk H, Sari D i sur. (2014) Evaluation of anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities of water kefir as probiotic on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *JDM* **4**, 85–95. <https://doi.org/10.4236/jdm.2014.42015>

Arapović M, Puljić L, Kajić N, Banožić M, Kartalović B, Habschied K i sur. (2024) The Impact of Production Techniques on the Physicochemical Properties, Microbiological, and Consumer's Acceptance of Milk and Water Kefir Grain-Based Beverages. *Acs Sym Ser* **10**, 2. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010002>

Bechtner J, Xu D, Behr J, Ludwig C, Vogel RF (2019) Proteomic Analysis of *Lactobacillus nagelii* in the Presence of *Saccharomyces cerevisiae* Isolated From Water Kefir and Comparison With *Lactobacillus hordei*. *Front Microbiol* **10**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00325>

Brasil GA, Andrade Moraes FS, Prucoli Falsoni RM, Resende MS, Andrade TU, Lima EM (2019) Pretreatment with water kefir promotes a decrease in ulcer development in an ethanol-acidified ulcer model. *Faseb J*. **33** (S1). [https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1\\_supplement.760.2](https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.760.2)

Chen C, Liu BY (2000) Changes in major components of tea fungus metanolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol* **89**, 834-839.

Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Soldan MMP i sur. (2016) Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep-Uk* **6** (1). <https://doi.org/10.1038/srep28484>

Coban HB (2020) Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess Biosyst Eng* **43**, 569–591. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>

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

Da Miguel MGCP, Cardoso PG, Magalhães KT, Schwan RF (2011) Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. *World J Microb Biot* **27** (8), 1875–1884. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0646-6>

Davidovic ZS, Miljkovic GM, Antonovic GD, Rajilic-Stojanovic DM, Dimitrijevic-Brankovic IS (2015) Water kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hem Ind* **69** (6), 595–604. <https://doi.org/10.2298/HEMIND140925083D>

Dhar D, Mohanty A (2020) Gut microbiota and Covid-19-possible link and implications. *Virus Res* **285**, 198018. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198018>

Doelle HW, Kirk L, Crittenden R, Toh H, Doelle MB (1993) *Zymomonas mobilis*—Science and Industrial Application. *Crit Rev Biotechnol* **13** (1), 57–98. <https://doi.org/10.3109/07388559309069198>

Fels L, Jakob F, Vogel RF, Wefers D (2018) Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydr Polym* **189**, 296–303. doi:10.1016/j.carbpol.2018.02.037

Fiorda FA, de Melo-Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK, Pagnoncelli MGB, de Souza Vandenberghe LP i sur. (2017) Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. *Food Microbiol* **66**, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>

Galli A, Fiori E, Franzetti L, Pagani M, Ottogalli G (1995) Composizione microbiologica e chimica dei granuli di Kefir «di frutta». *Ann Microbiol Enzim* **45**, 85–95.

Gökırmaklı Ç, Güzel-Seydim ZB (2022) Water kefir grains vs. milk kefir grains: Physical, microbial and chemical comparison. *J Appl Microbiol* **132**, 4349–4358. <https://doi.org/10.1111/jam.15532>

Gonda M, Garmendia G, Rufo C, León Peláez Á, Wisniewski M, Droby S, Vero S (2019) Bio-control of *Aspergillus flavus* in ensiled sorghum by water kefir microorganisms. *Microorganisms* **7**(8), 253. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080253>

Gulitz A, Stadie J, Ehrmann M, Ludwig W, Vogel R (2013) Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *J Appl Microbiol* **114** (4), 1082–1091. <https://doi.org/10.1111/jam.12124>

Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmann MA, Vogel RF (2011) The microbial diversity of water kefir. *Int J Food Microbiol* **151** (3), 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>

Guzel-Seydim ZB, Gökırmaklı Ç, Greene AK (2021) A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends Food Sci Tech* **113**, 42–53. doi:10.1016/j.tifs.2021.04.041

Guzel-Seydim ZB, Şatır G, Gokırmaklı C (2023) Use of mandarin and persimmon fruits in water kefir fermentation. *Food Sci Nutr* (u tisku) <https://doi.org/10.1002/fsn33561>

Laureys D, Aerts M, Vandamme P, De Vuyst L (2018) Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiol* **73**, 351–361. doi:10.1016/j.fm.2018.02.007

Laureys D, De Vuyst L (2014) Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl Environ Microb* **80** (8), 2564–2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>

Laureys D, De Vuyst L (2017) The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *J Appl Microbiol* **122** (3), 719–732. <https://doi.org/10.1111/jam.13370>

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 Biot* **101** (7), 2811–2819. doi:10.1007/s00253-016-8084-5

Lynch KM, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK (2021) An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *Int J Food Microbiol* **345**, 109128. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.10

Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD (2013) Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *Fems Microbiol Lett* **348** (1), 79–85. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12248>

Martínez-Torres A, Gutiérrez-Ambrocio S, Heredia-del-Orbe P, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C (2016) Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. *Int J Food Sci Tech* **52** (2), 559–571. doi:10.1111/ijfs.13312

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J i sur. (2017) The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol R* **81** (4). doi:10.1128/mubr.00036-17

Moinas M, Horisberger M, Bauer H (1980) The structural organization of the Tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Arch Microbiol* **128**, 157–161. <https://doi.org/10.1007/BF00406153>

Moretti AF, Moure MC, Quiñoy F, Esposito F, Simonelli N, Medrano M, León-Peláez Á (2022) Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods*, **5**. 100123. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>

Otles S, Acu M (2018) Geleneksel fermente bir içecek: Su kefir. *Dünya Gıda*, 92–100.

Pendon MD, Bengoa AA, Iraporda C, Medrano M, Garrote GL, Abraham AG (2022) Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *J Appl Microbiol* **133**(1), 162–180. <https://doi.org/10.1111/jam.15385>

Phiri S, Schoustra SE, van den Heuvel J, Smid EJ, Shindano J, Linnemann A (2019) Fermented cereal-based Munkoyo beverage: Processing practices, microbial diversity and aroma compounds. *PLoS One*, **14**(10), e0223501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223501>

Pidoux M, Brillouet JM, Quemener B (1988) Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnol Lett* **10** (6), 415–420. <https://doi.org/10.1007/bf01087442>

Ras El Gherab FZ, Hassaine O, Zadi-Karam H, Karam NE (2019) Statistical optimization for the development of a culture medium based on the juice of waste-dates for growth of *Lactococcus lactis* LCL strain by using the plackett–burman and response surface methodology. *Waste Biomass Valori* **10**(10), 2943–2957. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0283-0>

Rocha-Gomes A, Escobar A, Soares JS, Silva AA, Dessimoni-Pinto NAV, Riul TR (2018) Chemical composition and hypocholesterolemic effect of milk kefir and water kefir in Wistar rats. *Rev Nutr* **31** (2), 137–145. <https://doi.org/10.1590/1678-98652018000200001>

Rosa DD, Dias MM, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, Maria do Carmo GP (2017) Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev* **30** (1), 82–96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>

Sarikkha P, Nitorisavut R, Poljungreed I (2015) Identification of bacteria and yeast communities in a Thai sugary kefir by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) analyses. *J Ind Technol* **11**.

Shahabi-Ghahfarrokhi I, Khodaiyan F, Mousavi M, Yousefi H (2015) Effect of  $\gamma$ -irradiation on the physical and mechanical properties of kefiran biopolymer film. *Int J Biol Macromol* **74**, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.038>

Stadie J (2013) Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir (Dissertation), Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technischen Universität München, München

Stadie J, Gulitz A, Ehrmann MA, Vogel RF (2013) Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiol* **35** (2), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.009>

Sundararaman A, Ray M, Ravindra PV, Halami PM (2020) Role of probiotics to combat viral infections with emphasis on COVID-19. *Appl Microbiol Biot* **104** (19), 8089–8104. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10832-4>

Tireki S (2022) Physicochemical and Sensory Parameters of Vegan Water Kefir Beverages Fermented with Different Fruits. *EJDR* **2** (4), 1–12. <https://doi.org/10.56038/ejrnd.v2i4.119>

Tiss M, Souiy Z, Abdeljelil N ben, Njima M, Achour L, Hamden K (2020) Fermented soy milk prepared using kefir grains prevents and ameliorates obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia and Liver-Kidney toxicities in HFFD-rats. *J Funct Food* **67**, 103869.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103869>

Verce M, De Vuyst L, Weckx S (2019) Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species. *Front Microbiol* **10**.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>

Verce M, De Vuyst L, Weckx S (2020) The metagenome-assembled genome of Candidatus *Oenococcus aquikefiri* from water kefir represents the species *Oenococcus sicerae*. *Food Microbiol* **88**, 103402. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103402>

Waldherr FW, Doll VM, Meißner D, Vogel RF (2010) Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiol* **27** (5), 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.013>

Xu D, Fels L, Wefers D, Behr J, Jakob F, Vogel RF (2018) *Lactobacillus hordei* dextrans induce *Saccharomyces cerevisiae* aggregation and network formation on hydrophilic surfaces. *Int J Biol Macromol* **115**, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.068>

Zanirati DF, Abatemarco M, De Cicco Sandes SH, Nicoli JR, Nunes AC, Neumann E (2015) Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* **32**, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>

## Izjava o izvornosti

Ja, **Lucija Mataga** 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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lucija Mataga', written in a cursive style.

---

Vlastoručni potpis