Fermentacija rižinog, bademovog, kravljeg i lješnjakovog mlijeka nacijepljenih kefirnim zrncima

Kožić, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:133432

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

KRISTINA KOŽIĆ
6529/BT

Fermentacija rižinog, bademovog, kravljeg i lješnjakovog mlijeka nacijepljenih kefirnim zrncima

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 2
Mentor : Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2015.

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

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

FERMENTACIJA RIŽINOG, BADEMOVOG, KRAVLJEG I LJEŠNJAKOVOG MLIJEKA NACIJEPLJENIH KEFIRNIM ZRNCIMA

Kristina Kožić, 6529/BT

Sažetak: Kefir je fermentirani mliječni napitak dobiven djelovanjem združene kulture bakterija mliječne kiseline i kvasaca, simbiotički snažno povezanih u strukturu koja se naziva kefirna zrnca. Sastav kefira različit je ovisno o čimbenicima kao što su tip mlijeka i mikrobiološki sastav radne kulture (kefirna zrnca ili komercijalno dostupna starter kultura). Cilj ovog rada bio je odrediti učinkovitost kefirnih zrnaca kao inokuluma za pripravu kefira od različitih tipova mlijeka (rižinog, bademovog, kravljeg i lješnjakovog). Uzorci mlijeka su inokulirani s 1,25 % kefirnih zrnaca i prirodno fermentirani pri 28 ºC tijekom 21-og dana uzgoja. Uočeno je da su promjene pH vrijednosti bile povezane sa simbiotskim metaboličkim aktivnostima bakterija i kvasaca te linearni odnos prinosa biomase kefirnih zrnaca i povećanja koncentracije glukonske, mliječne i octene kiseline. Rižino, bademovo i lješnjakovo mlijeko mogu poslužiti kao hranjiva podloga za proizvodnju napitaka sličnih kefiru proizvedenom na mlijeku.

Ključne riječi: fermentacija, kefirna zrnca, mliječni napitak, nastajanje organskih kiselina
Rad sadrži: 28 stranica, 10 slika, 1 tablica, 69 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf) formatu pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.
Mentor: *Izv. prof. dr. sc.Sunčica Beluhan*

Rad predan: rujan 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

FERMENTATION OF RICE, ALMOND, COW AND WALNUT MILKS INOCULATED WITH KEFIR GRAINS

Kristina Kožić, 6529/BT

Abstract: Kefir is a fermented milk beverage produced by action of lactic acid bacteria and yeasts that exist in powerful symbiotic association in kefir grains. The composition of kefir varies according to factors such as milk type and the microbiological composition of culture types (kefir grain or commercial starter culture). The aim of the present study was to evaluate the use of kefir grains as inoculum for the preparation of different milk types (rice, almond, cow and walnut) kefir. Milk samples were fermented naturally at 28 ^{o}C with 1.25 % kefir grains over a period up to 21 days. Changes in pH were related to the symbiotic metabolic activities of bacteria and yeasts. The yield of kefir grain biomass increased with fermentation time resulting in linear increment of gluconic, lactic and acetic acid formation. Rice, almond and walnut milks may serve as culture medium for the production of kefir-like beverages similar to milk kefir.

Keywords: Fermentation, kefir grains, milk beverage, organic acids formation
Thesis contains: 28 pages, 10 figures, 1 table, 69 references
Original in: Croatian
Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kaciceva 23, Zagreb
Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Final work delivered: September, 2015

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Kefir 2
2.2. Kemijski sastav kefira 4
2.3. Mikrobiološka svojstva kefira 6
2.4. Nutritivna svojstva kefira 9
2.5. Ostali učinci kefira 10
3. MATERIJALI I METODE RADA 11
3.1. Priprava kulture kefirnih zrnaca 11
3.2. Uporabljene vrste mlijeka 11
3.2.1. Kemijski sastav uporabljenih vrsta mlijeka 11
3.3. Priprava uzoraka 12
3.4. Određivanje mase biomase kefirnih zrnaca 12
3.4.1. Prinos biomase kefirnih zrnaca 12
3.5. Određivanje koncentracije ukupnih kiselina u kefiru 13
3.6. Određivanje koncentracije mliječne kiseline u kefiru 13
3.7. Određivanje koncentracije glukonske kiseline u kefiru 13
3.8. Određivanje koncentracije octene kiseline u kefiru 14
3.9. Određivanje pH vrijednosti kefira 14
4. REZULTATI 15
5. RASPRAVA 19
6. ZAKLJUČCI 21
7. LITERATURA 22

1. UVOD

Fermentirani mliječni napitci u koje se ubraja i kefir, namirnice su visoke prehrambene i biološke vrijednosti. Kefir je fermentirani mliječni proizvod viskozne teksture s malim udjelom alkohola. Tradicionalno se proizvodi od mlijeka životinjskog podrijetla (kravlje, ovčje, kozje) uz dodatak kefirnih zrnaca koja predstavljaju združenu kulturu mezofilnih, homofermentativnih i heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline i kvasaca te ponekad bakterija octene kiseline (Arslan, 2015).

Kefirna zrnca su male, čvrste, nepravilno oblikovane, žućkasto-bijele granule koje u određenim uvjetima mogu imati oblik cvjetače. Veličina kefirnih zrnaca u inokulumu utječe na pH, viskoznost i mikrobiološki profil krajnjeg proizvoda (Garrote i sur., 1998). S obzirom na njihovu slojevitu strukturu, održavanje kakvoće proizvoda može ponekad biti otežano pa je nužno optimirati uvjete proizvodnje, posebice ako se radi o napitcima koji nisu mliječnog, nego biljnog podrijetla (Cui i sur., 2013).

Mnogi probiotički pripravci su formulirani da sadrže određeni broj korisnih bakterija. Mikrobiološki i kemijski sastav kefira ukazuju da se radi o vrlo složenom probiotiku, s obzirom na veliki broj različitih bakterija i kvasaca, po čemu se razlikuje od drugih probiotičkih mliječnih pripravaka (Guzel-Seydim i sur., 2000a).

Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci iz kefirnih zrnaca putem metabolizma proizvode niz sastojaka koji kefiru daju jedinstveni okus i teksturu. Nakon fermentacije kefir sadrži brojne bioaktivne sastojke, a najvažniji je egzopolisaharid kefiran koji pozitivno utječe na probavu, metabolizam i imunološki sustav u ljudi (Balabanova i Panayotov, 2011).

Kefirna zrnca uspješno fermentiraju mlijeko većine sisavaca, a najčešća su kravlje, kozje i ovčje pri čemu se dobiva kefir s različitim organoleptičkim i nutritivnim svojstvima. No, kefirna zrnca mogu previrati i sojino, rižino i kokosovo mlijeko (Kesenkas i sur., 2013) kao i druge slatke tekućine uključujući voćni sok, kokosovu vodu ili sok od đumbira (Oner i sur., 2010). Takve fermentacije mogu rezultirati smanjenim prinosom biomase kefirnih zrnaca jer je istraživanjima dokazano da je laktoza nužna za sintezu kefirana (Farnworth, 2005).

U ovom radu su tijekom 21-og dana fermentacije kefira s kefirnim zrncima u rižinom, bademovom, kravljem i lješnjakovom mlijeku praćeni slijedeći parametri:

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

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kefir

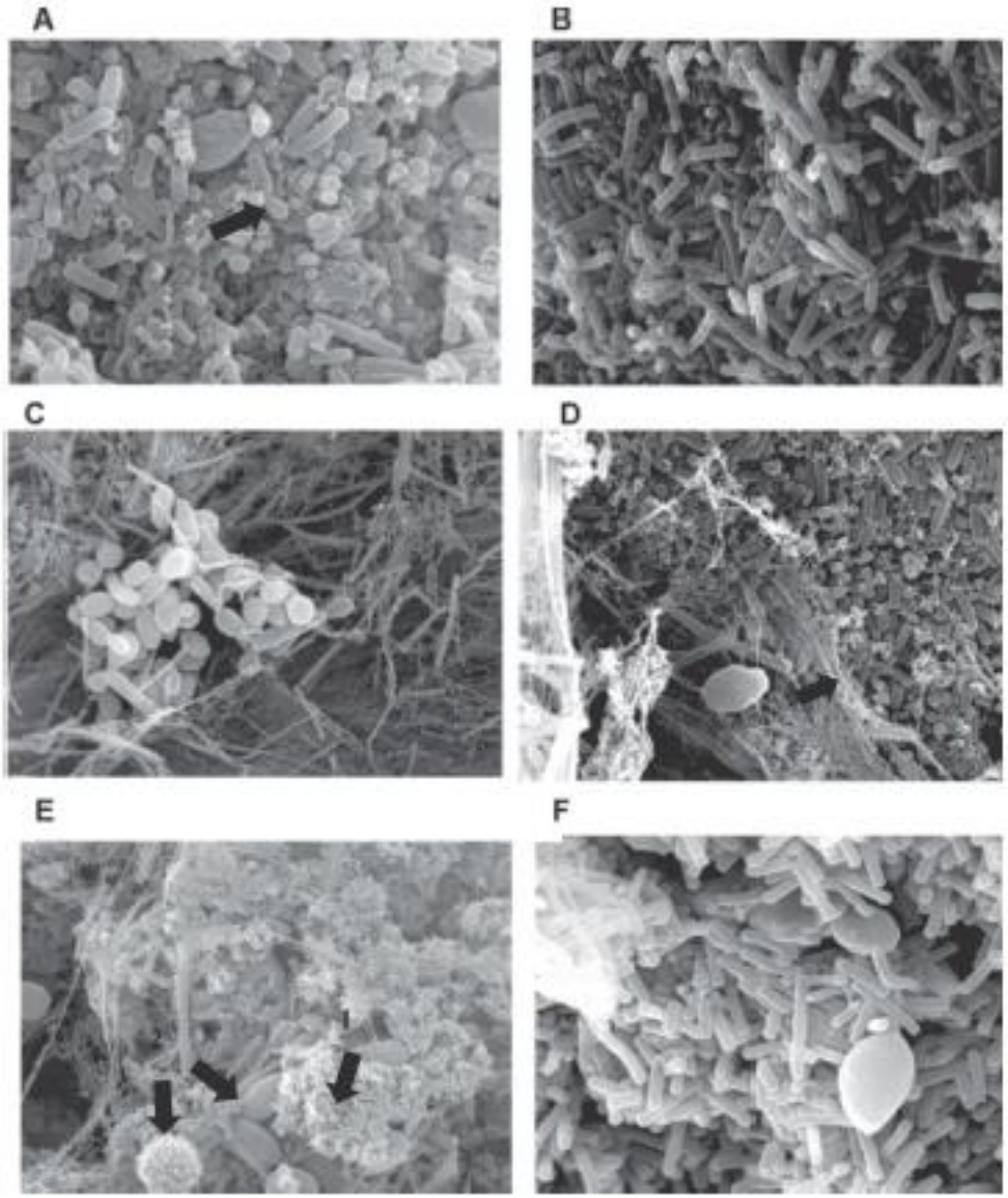
Kefir je fermentirani mliječni proizvod koji potječe iz područja Kavkaza (Tratnik i sur., 2006). Naziv je izvedenica riječi *kef* što znači "ugodan okus" na turskom jeziku (Machado de Oliveira Leite i sur., 2013; Guzel-Seydim i sur., 2000). Kefir je poznat i po nazivima *kefyr, kephir, kefer, kiaphur, knapon, kepi* i *kippi* (Sarkar, 2007). Iako se već stoljećima konzumira u Rusiji i zemljama središnje Azije poput Kazahstana i Kirgistana, sve je više popularan u zemljama Europe, Japanu te Sjedinjenim Američkim Državama zbog svojih nutritivnih vrijednosti i terapeutskog učinka (Otles i Cagindi, 2003). Prethodna istraživanja na kefiru pokazala su antimikrobno, imunološko, antitumorsko i hipokolesterolemičko djelovanje kefira te njegovu β-galaktozidaznu aktivnost (de Moreno i sur., 2006; Garrote i sur., 2000; Hertzler i Clancy, 2003; Liu i sur., 2006).

Kefir se radi od kefirnih zrnaca ili matičnih kultura uzgojenih iz kefirnih zrnaca. Kefirna zrnca su male, čvrste, žuto-bijele granule nepravilnog oblika koje variraju u promjeru od 3 do 35 mm i mogu tvoriti nakupine koje nalikuju na cvjetaču (Slika 1).



Slika 1. Makroskopski izgled kefirnih zrnaca (Machado de Oliveira Leite i sur., 2013)

Zrnca sadrže bakterije mliječne kiseline (*eng*. lactic acid bacteria, LAB) i razne vrste kvasaca povezane kazeinom i kompleksnim ugljikohidratima u polisaharidni matriks (Beshkova i sur., 2002; Guzel-Seydim i sur., 2005; Otles i Cagindi, 2003).



Slika 2. SEM fotografija strukture kefitnih zrnaca. A, C, E: vanjski sloj zrnaca; B, D, F: unutarnji dio zrnaca. strelice: A – koki; D: kefiran (polisaharid); E : (1) granule – koagulirani proteini; (2) različite vrste kvasaca (2)
(Machado de Oliveira Leite i sur., 2013)

Glavni polisaharid u toj strukturi je kefiran koji se sastoji od jednakih udjela glukoze i galaktoze (Rodrigues i sur., 2005; Zajsek i sur., 2011). Kefir visoke kvalitete je pjenast i nije previše viskozan (Guzel-Seydim i sur., 2000). Budući da su kefirna zrnca složene strukture, održavanje njihove kvalitete je problematično. Osim toga, kefir ima kratak rok trajanja. Primjena mikroorganizama izoliranih iz kefirnih zrnaca u današnje vrijeme je jednostavna (Bolla i sur., 2011) s obzirom na standardizaciju postupka proizvodnje kefira (Beshkova i sur., 2002) i na očuvanje željenih svojstava kefira. Uočeno je da je količina i raznolikost mikroorganizama u kefiru proizvedenog iz zrnaca veća od onog proizvedenog iz mikroorganizama izoliranih iz kefira, no starter kulture koje sadrže liofilizirane bakterije mliječne kiseline i kefirne kvasce se danas uobičajeno koriste u komercijalnoj proizvodnji kefira (Famworth, 2005).

Kefir sadrži združenu kulturu bakterija mliječnih kiselina iz rodova *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus* i različih vrsta kvasaca (*Candida* sp., *Kluyveromyces* sp., *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Zygosaccharomyces* sp.), a ponekad i bakterije octene kiseline (*Acetobacter* sp.) (de Moreno de LeBlanc i sur., 2006; Famworth, 2005; Guzel-Seydim i sur., 2011; Motaghi i sur., 1997; Witthuhn i sur., 2004). Simbiotska i metabolička aktivnost bakterijskih i kvaščevih vrsta stvara specifičan okus kefira (Tratnik i sur., 2006; Yuksekdag i sur., 2004a).

Kefirne kulture se također koriste kao starter kulture pri proizvodnji sira (Dimitrellou i sur., 2007) te se mogu koristiti u pečenju (Filipcev i sur., 2007). Mikroorganizmi u kefiru mogu proizvesti jednostanične proteine aerobnom fermentacijom sirutke (Paraskevopolou i sur., 2003). Skupina znanstvenika, Chen i sur., (2011), su proizveli kefir bombon koji ima zdrav učinak te je ukusan. Magalhaes i sur. (2011b) su odredili kemijska i senzorska svojstva kefira proizvedenog iz sirutke koristeći kefirna zrnca kao starter kulture te uočili dodatni potencijal kefira.

2.2. Kemijski sastav kefira

Sastav kefira je nejednoliko i nedovoljno opisan (Otles i Cagindi, 2003). Tip i volumen mlijeka utječu na njegova kemijska, senzorska i teksturna svojstva (Altay i sur., 2013). Nadalje, sastav kefirnih zrnaca i kultura te proces proizvodnje također utječu na kefirna svojstva (Otles i Cagindi, 2003).

Kefir obično sadrži 89 - 90 % vlage, 0,2 % lipida, 3 % proteina, 6 % šećera, 0,7 % pepela i 1% mliječne kiseline i alkohola (Sarkar, 2007). Kefir također sadrži 1,98 g/L CO_2 i 0,48 % alkohola (Beshkova i sur., 2002) te je volumni udjel ugljikovog dioksida (201,7–277,0 mL/L) razmjeran masenoj koncentraciji (10–100 g/L) kefirnih zrnaca (Garrote i sur., 1998).

Wszolek i sur. (2001) proučavali su svojstva kefira napravljenog u Škotskoj i Poljskoj koristeći kravlje, kozje i ovčje mlijeko s različitim starter kulturama. Što se tiče kemijskih svojstava, otkrili su da kefir sadrži od 10,6 % do 14, 9 % otopljenih tvari, 2,9 – 6,4 % sirovih proteina, 3,8 – 4,7 % ugljikohidrata i 0,7 – 1,1 % pepela. U drugim istraživanjima, Liutkevicius i Sarkinas (2004) su otkrili da kefirna zrnca sadrže 86,3 % vlage, 4,5 % proteina, 1,2 % pepela i 0,7 % masti. Magalhaes i sur., (2014) su otkrili da brazilski kefir sadrži 3,91 % proteina, 2,34 % masti i 9,62 % suhe tvari nakon 24 sata fermentacije.

Glavni produkti dobiveni tijekom fermentacije su mliječna kiselina, CO_2 i alkohol (Otles i Cagindi, 2003). L(+) mliječna kiselina je najzastupljenija organska kiselina dobivena tijekom fermentacije koja potječe od 25 % originalne laktoze u mlijeku. Količine etanola i CO_2 proizvedene tijekom fermentacije ovise o uvjetima proizvodnje (Farnworth, 2005).

Garcia Fontan i sur. (2006) proizveli su kefir od kravljeg mlijeka koristeći komercijalne starter kulture. Otkrili su da se sadržaj laktoze smanjio sa 4,92 % na 4,02 %, vrijednost L(+) mliječne kiseline je porasla s 0,01 % na 0,76 %, a pH vrijednost pala na 4,24 tijekom fermentacije koja je trajala 24 h. Nakon 24 h laktoza je razgrađivana sporije, pH je smanjen, koncentracija L(+) mliječne kiseline je zanemarivo smanjena dok je razina D(+) mliječne kiseline povećana (Garcia Fontan i sur., 2006). Öner i sur., (2010) istražili su svojstva kefira proizvedenog koristeći različite uzorke mlijeka (kravlje, kozje, ovčje) i različite tipove kultura (kefirna zrnca i komercijalne starter kulture). Otkrili su da tip starter kulture, period skladištenja i vrste mlijeka bitno utječu na promjenu pH vrijednosti. Nadalje, udjel mliječne kiseline rastao je od 1,4 do 17,4 mg/mL, a udjel octene od 2,10 do 2,73 mg/mL (Magalhaes i sur., 2011a).

Tradicionalni kefir napravljen od kozjeg mlijeka ima niski viskozitet i senzorička svojstva za razliku od kravljeg kefira i sadrži 0,04 – 0,3 % etanola (Sarkar, 2008). Tratnik i sur. (2006) otkrili su da je udio etanola u kravljem i kozjem kefiru obogaćen proteinima sirutke koncentracije 0,32 % odnosno 0,35 %. Tijekom fermentacijskog procesa pojavljuju se octena, mliječna, pirogrožđana, hipurinska, propanska, maslačna kiselina, diacetil i acetaldehid. Ovi sastojci imaju ulogu u aromi i okusu kefira (Ahmed i sur., 2013). Kesenkas i sur. (2011) izvijestili su da je udjel mliječne kiseline bio 107,80 – 282,40 mg/kg, udjel

limunske kiseline 1,79 – 5,08 mg/kg, pirogrožđane kiseline 0,17 –0,45 mg/kg i octene kiseline 0,38 – 0,66 mg/kg nakon 28 dana skladištenja.

Diacetil, acetoin i acetaldehid su najvažniji aromatski sastojci u kefiru. Diacetil proizvodi *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* i *Leuconostoc* sp.(Otles i Cagindi, 2003). Tijekom skladištenja, koncentracija acetaldehida je rasla dok je koncentracija acetoina opadala (Guzel-Seydim i sur., 2000). Yuksekdag i sur., (2004b) dokazali su da svih 21 izolata bakterija mliječne kiseline izoliranih iz različitih izvora turskog kefira proizvode acetaldehid u koncentracijama od 0,88 do 4,40 μg/mL.

Sabir i sur. (2010) izvijestili su da su udjeli mliječne kiseline i egzopolisaharida proizvedenih pomoću *sojeva Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp. *i Pediococcus* sp. 8,1–17,4 mg/L, odnosno 173 – 378 mg/L.

2.3. Mikrobiološka svojstva kefira

Brojne mikrobne vrste u kefiru i kefirnim zrncima su identificirane uporabom različitih mikrobioloških i molekularnih tehnika (Diosma i sur., 2014; Gao i sur., 2012; Pogačić i sur., 2013). Dobson i sur. (2011) su istražili vrste mikroorganizama u kefirnim zrncima koristeći analizu visoke propusnosti baziranu na sekvencioniranju. Leite i sur. (2012) su upotrebom PCR-a (lančana reakcija polimerazom) i gel-elektroforeze s denaturirajućim gelom dokazali da je kefir proizveden pomoću različitog spektra mikrobnih vrsta. Primarne mikrobne vrste koje su nađene u kefirnim zrncima su laktobacili (65 - 80 %) (Wouters i sur., 2002), a ostatak čine laktokoki i kvasci. Sastav populacije se može razlikovati ovisno o podrijetlu kefirnih zrnaca i metodama upotrebljavanih za pripremu hranjivih podloga za uzgoj kultura (Wang i sur., 2004). Čimbenici koji utječu na produljenje acidifikacije tijekom kefirne proizvodnje su veličina inokuliranih zrna, miješanje i temperatura inkubacije (Irigoyen i sur., 2003). Sarkar (2008) je u svojem istraživanju uočio dominaciju štapićastih bakterija mliječne kiseline u vanjskom sloju kefirnih zrnaca, većinske kvasce u jezgri te jednaki odnos bakterija i kvasaca u srednjoj zoni.

Kefirna mikroflora sadrži puno mikroorganizama, uključujući: *Lactobacillus kefir* (Magalhaes i sur., 2011a; Miguel i sur., 2010); *Lb. acidophilus* (Sabir i sur., 2010; Kok-Tas i sur., 2012*); Lb. Casei* (Magalhaes i sur., 2011a; Yuksekdag i sur., 2004b); *Lb. Helveticus* (Kok-Tas i sur., 2012; Yuksekdag i sur., 2004b); *Lb. Bulgaricus* (Yuksekdag i sur. 2004b*); Lb. parakefir* (Garbers i sur., 2004; Garrote i sur., 2001); *Lb. plantarum, Lb. delbrueckii*

subsp. *delbrueckii* (Witthuhn i sur., 2005); *Lb. rhamnosus, Lb. fructivorans, Lb. hilgardii* (Delfederico i sur., 2006); *Lb. Paracasei* (Magalhaes i sur., 2011a); *Lb. fermentum* (Garbers i sur., 2004; Witthuhn i sur., 2005*); Lb. crispatus, Lb. gallinarum* (Garbers i sur., 2004); *Lb. reuteri, Bifidobacterium bifidum* (Kok-Tas i sur., 2012); *Lb. brevis, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris* (Witthuhn i sur., 2005); *Streptococcus thermophilus* (Yuksekdag i sur., 2004a; Kok-Tas i sur., 2012*); Lactococcus lactis, Enterococcus durans* (Yuksekdag i sur., 2004a); *Pediococcus acidilactici, P. dextrinicus, P. pentosaceus* (Sabir i sur., 2010*); Acetobacter aceti* (Motaghi i sur., 1997*); A.lovaniensis* (Magalhaes i sur., 2011a); i *A. syzgii* (Miguel i sur., 2010).

Witthuhn i sur. (2004) uočili su da udjel, odnosno omjer bakterija mliječne kiseline i kvasaca u kefirnim zrncima varira u rasponu od $6,4 \times 10^4$ do $8,5 \times 10^8$ stanica/mL , odnosno $1,5 \times 10^5$ do $3,7 \times 10^8$ stanica/mL. Irigoyen i sur. (2005) izvijestili su da pored održive populacije od 10^8 stanica/mL laktobacila i laktokoka i 10^5 stanica/mL kvasca, kefir također sadrži i 10^6 stanica/mL bakterija octene kiseline nakon 24 h fermentacije. Količine kvasca u kefiru variraju, a određene vrijednosti kreću se u rasponu od 10^3 do 10^6 (Farnworth, 2005; Grønnevik i sur., 2011; Guzel-Seydim i sur., 2005; Irigoyen i sur., 2005; Simova i sur.,2002).

Miao i sur. (2014) su izolirali 49 vrsta bakterija mliječnih kiselina iz tibetskog kefira; odredili su soj FX-6 koji je bakteriocin-producent soja *Lb. paracasei* subsp. *tolerans.* Nalbantoglu i sur. (2014) metagenomskom analizom mikrobnih zajednica u kefirnim zrncima, dokazali su *Lb. kefiranofaciens* kao dominantnu vrstu.

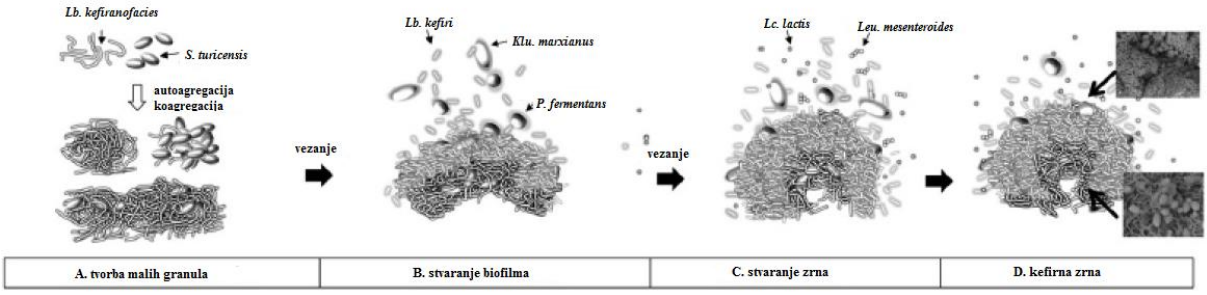
Leite i sur. (2012) identificirali *su Lb. kefiranofaciens* i *Lb. kefiri* kao glavne bakterijske populacije u svim kefirnim zrncima. Koristeći metagenomske metode, Gao i sur. (2013) po prvi put su identificirali *Shewanella, Acinetobacter, Pelomonas, Dysgonomonas, Weissella* i *Pseudomonas* u tibetskim kefirnim zrncima. Dobson i sur. (2011) su u uzorcima kefira detektirali *Pseudomonas sp*. i članove rodova *Enterobacteriaceae* and *Clostridiaceae*.

Kvasci i laktobacili su međusobno ovisni i njihova je prisutnost razmjerna s veličinom i strukturom kefirnih zrnaca te je tijekom proizvodnje kefira zabilježena simbioza između kvasaca, laktobacila i streptokoka (Sarkar, 2008).

Kvasci su poznati po tome što imaju ključnu ulogu u pripremi fermentiranih mliječnih proizvoda gdje omogućavaju dovoljnu koncentraciju hranjivih tvari bitnih za rast kao što su aminokiseline i vitamini, mijenjaju pH, proizvode etanol i CO_2. Kvasci u kefiru su manje proučavani nego što su to bakterije iako su kvasci u zrncima zaslužni za stvaranje okruženja koje je povoljno za rast kefirnih bakterija tako što proizvode metabolite koji doprinose okusu i teksturi kefira (Farnworth, 2005).

Kvasci koji su identificirani u kefiru su rodovi i vrste: *Zygosaccharomyces sp*. (Witthuhn i sur., 2004, 2005); *Candida lipolytica, C. holmii* (Witthuhn i sur., 2004); *C. inconspicua, C. maris* (Simova i sur., 2002); *C. kefyr* (Motaghi i sur., 1997;Witthuhn i sur., 2004, 2005*); C. lambica, C. krusei, Cryptococcus humicolus* (Witthuhn i sur., 2005); *Kluyveromyces marxianus* (Garrote i sur., 1998, 2001; Kok-Tas i sur., 2012; Loretan i sur., 2003; Simova i sur., 2002); *Klyveromyces lactis* (Loretan i sur., 2003; Magalhaes i sur., 2011a); *Saccharomyces cerevisiae* (Garrote i sur., 1997; Loretan i sur., 2003; Magalhaes i sur., 2011a; Motaghi i sur., 1997; Simova i sur., 2002; Witthuhn i sur., 2004); *S. fragilis, S. lactis* (Motaghi i sur., 1997); *S. lipolytic* (Garrote i sur., 1997); *Zygosaccharomyces rouxii, Torulaspora delbrus, T. delbrueckii, Debaryomyces hansenii* (Loretan i sur., 2003); *Kazachstania aerobia, Lachancea meyersii* (Magalhaes i sur., 2011a); i *Geotrichum candidum* (Garrote i sur., 1997; Witthuhn i sur., 2005).

Grønnevik i sur. (2011) su uočili da broj bakterija mliječnih kiselina u uzorcima kefira opada tijekom prva 4 tjedna skladištenja dok se razina kvasca povećava tijekom razdoblja skladištenja. Diosma i sur. (2014) izolirali su iz kefirnih zrnaca *S. cerevisiae* (15 sojeva), *S. unisporus* (6 sojeva), *Issatchenkia occidentalis* (4 soja) i *K. marxianus* (9 sojeva). Uraz i sur. (2012) odredili su *C. kefyr* i *C. famata* kao najzastupljenije vrste kvasaca u kefirnim uzorcima. Montanuci i sur. (2012) su otkrili da se kiselost kefira proizvedenog fermentacijom kefirnih zrnaca povećava tijekom skladištenja dok u kefirima fermentiranim sa starter kulturama nema promjene u kiselosti. Gao i sur. (2012) su prvi otkrili prisutnost *Pichia kudriavzevii* i *P. guilliermondii* u kefiru. Sefidgar i sur. (2014) potvrdili su prisutnost *S. cerevisiae* i *Lb. casei* subsp. *pseudo plantarum* koristeći metode uzgoja i biokemijske testove.



Slika 3. Shematski prikaz tvorbe kefirnih zrna (Wang i sur., 2012)

2.4. Nutritivna svojstva kefira

Kefir sadrži vitamine, minerale i esencijalne aminokiseline koji su djelotvorni u liječenju i homeostazi (Otles i Cagindi, 2003). Kefir sadrži vitamine B_1, B_2, B_5 i C. Na sadržaj vitamina u kefiru utječe vrsta izabranog mlijeka i mikrobiološke flore za proizvodnju (Sarkar, 2007). Liutkevicius i Sarkinas (2004) su odredili da kefir sadrži vitamine B_5, B_2 i B_1 u količini od 3, <5 i <10 mg/kg. Kefir također sadrži vitamine A i K te karoten (Otles i Cagindi, 2003). Kneifel i Mayer (1991) su odredili vitaminski sastav kefira proizvedenog iz različitih vrsta mlijeka. Otkrili su da je koncentracija vitamina obogaćena za više od 20 % tiaminom (ovčje mlijeko), piridoksinom (ovčje, kozje i kravlje mlijeko) i folnom kiselinom (ovčje, kozje i kravlje mlijeko).

Kefir sadrži djelomično probavljene proteine što olakšava probavu u ljudskom tijelu (Otles i Cagindi, 2003). Sastav animokiselina se mijenja tijekom fermentacije mlijeka pa kefir sadrži veću količinu treonina, serina, alanina, lizina i amonijaka nego mlijeko. Kefir također sadrži druge aminokiseline poput valina, izoleucina, metionina, lizina, fenilalanina i triptofana (Otles i Cagindi, 2003; Sarkar, 2007). Sadržaj esencijalnih aminokiselina u kefiru (mg/100g kefira) je: valin, 220; izoleucin, 262; metionin, 137; lizin, 376; treonin, 183; fenilalanin, 231; triptofan, 70 (Liutkevicius i Sarkinas, 2004). Yuksekdag i sur. (2004b) su demonstrirali proteolitičku aktivnost bakterija iz roda *Lactococcus* (13/21 sojeva). Kesenkas i sur. (2011) su odredili da je nakon 28 dana skladištenja količina tirozina bila 0,009-0,016 mg/g, a količina leucina 1,89-9,56 mmol/L. Triptofan, jedna od najvažnijih aminokiselina u kefiru, ima ključnu ulogu u živčanom sustavu čovjeka (Kasenkas i sur., 2013).

S obzirom na mineralni sastav, kefir je dobar izvor kalcija i magnezija. Fosfor (drugi po redu najzastupljeniji mineral u ljudskom tijelu koji sudjeluje u asimilaciji ugljikohidrata, lipida i proteina za rast i održavanje stanica te za energiju) je također zastupljen u velikim količinama u kefiru (Otles i Cagindi, 2003). Liutkevicius i Sarkinas (2004) su proučili makro- i mikroelemente u kefiru. Odredili su da su makroelementi prisutni u kefiru: kalij, 1,65 %; kalcij, 0,86 %; fosfor, 1,45 % i magnezij, 0,30 %, dok su mikroelementi prisutni u kefiru (mg/kg): bakar, 7,32; cink, 92,7; željezo, 20,3; mangan, 13,0; kobalt, 0,16 i molibden, 0,33 (Liutkevicius i Sarkinas, 2004).

Kefir je dobar izbor za ljude s intolerancijom na laktozu koja se nalazi pretežno u mlijeku. Količina laktoze u kefiru je manja dok je količina β-galaktozidaze povećana zbog fermentacije (Otles i Cagindi, 2003).

2.5. Ostali učinci kefira

Carasi i sur. (2012) su demonstrirali da S-layer proteini iz *Lb. kefir* uzrokuju značajan pad citopatske aktivnosti toksina *Clostridium difficile* na eukariotske stanice. Golowczyc i sur. (2007) su pokazali da određeni sojevi *Lb. kefir* i njihovi S-layer proteini inhibiraju adheziju i/ili ulazak *Salmonella enterica* u stanicu. Obrambenu djelatnost kefirana stanica Caco-2 od infekcije bakterijom *Bacillus cereus* su demonstrirali Medrano i sur. (2009). Infekcije bakterijom *B. cereus* su praćene citopatskim efektom poput odumiranja stanica, raspada F-aktina i uništavanja mikrovila (Medrano i sur., 2009). Učinak kefirana na citopatsku aktivnost *B. cereus* je proučen korištenjem raznih eksperimentalnih modela (kultura ljudskih enterocita i eritrocita) u radu Medrano i sur. (2008). Kakisu i sur. (2013) su pokazali da je citotoksična aktivnost toksina type-II Shiga prisutna u supernatantu suspenzije bakterije *Escherichia coli* O157:H7 soj-69160 smanjena zbog prisutnosti *Lb. plantarum* CIDCA 83114. Također su dokazali da molekule proteina u staničnoj membrani bakterije *Lactobacillus* sudjeluju u inhibiranju Shiga toksina. Kakisu i sur., (2011) su otkrili da je kombinacija *Lb. plantarum* CIDCA 83114 i *K. marxianus* CIDCA 8154, izoliranih iz kefirnih zrnaca, te *Str. thermophilus* CIDCA 321, izoliranog iz zanatskih starter kultura, inhibirala citopatsku aktivnost Shiga toksina u kulturi stanica. Medrano i sur. (2011) su uočili da kefiran za oralnu primjenu mijenja ravnotežu imunuloških mišjih stanica te povećava broj IgA+ stanica. U drugom istraživanju, dodatak kefira je uzrokovao ublažavanje infekcije uzrokovane *Giardia intestinalis* 7 dana nakon početka infekcije (Franco i sur., 2013). Kakisu i sur. (2007) su primijetili da kefirna zrnca inhibiraju rast i razmnožavanje spora *B. cereus*. Carasi i sur. (2014) su pokazali da određeni sojevi *E. durans*, izoliranih iz kefirnih zrnaca, djeluju inhibirajuće na razne Gram-pozitivne i Gram-negativne patogene bakterije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprava kulture kefirnih zrnaca

Starter kultura kefirnih zrnaca je pripravljena zajedno s „majčinskom hranjivom podlogom“ u kravljem mlijeku. 20 g kefirnih zrnaca je uzgajano u 100 mL steriliziranog kravljeg mlijeka na 28 ^{o}C u termostatu. Nakon 24 sata uzgoja, zrnca su isprana sterilnom destiliranom vodom i ponovno inokulirana u 100 mL sterilnog mlijeka te je ovaj postupak proveden četiri puta.



Slika 4. Matična kultura kefirnih zrnaca nakon 5 dana uzgoja u kravljem mlijeku.

3.2. Uporabljene vrste mlijeka

Uzgojena kefirna zrnca nacijepljena su na 4 vrste mlijeka:

- **rižino mlijeko** – Alpro, C.V.A, Wevelgem, Belgija
- **bademovo mlijeko sa šećerom** – Alpro, C.V.A, Wevelgem, Belgija
- **kravlje mlijeko, 2,8 % m.m.** – Meggle, Osijek, Hrvatska
- **lješnjakovo mlijeko** – Alpro, C.V.A, Wevelgem, Belgija

3.2.1. Kemijski sastav uporabljenih vrsta mlijeka

Kemijski sastav uporabljenih vrsta mlijeka prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav mlijeka uporabljenih u istraživanju (100 mL)

Sastojak	Rižino	Bademovo	Kravlje	Lješnjakovo
ugljikohidrati	9,5 g	3,0 g	4,6 g	3,1 g
Masti	1,0 g	1,1 g	2,8 g	1,6 g
proteini	0,1 g	0,5 g	3,3 g	0,4 g
vitamin D	0,75 μg	0,75 μg	0,75 μg	0,75 μg
vitamin B_2	-	0,21 mg	-	0,21 mg
vitamin B_{12}	0,38 μg	0,38 μg	-	0,38 μg
vitamin E	-	1,80 mg	-	1,8 mg
Kalcij	120 mg	120 mg	120 mg	120 mg
vlakna	-	0,2 g	-	0,3 g
Sol	0,09 g	0,13 g	0,1 g	0,13 g

3.3. Priprava uzoraka

Četiri vrste mlijeka (250 mL) je nacijepljeno s 12,5 g svježe uzgojene kulture kefirnih zrnaca (5 % tež/vol) i inkubirano pri 28 ^oC u termostatu tijekom 21-og dana. Svaka tri dana uzorci su procijeđeni kroz cjedilo s plastičnom mrežicom, a kefirna zrnca precijepljena u svježih 250 mL mlijeka. Kontrolni uzorci su bila mlijeka uporabljena u istraživanju.

3.4. Određivanje mase biomase kefirnih zrnaca

Masa biomase kefirnih zrnaca mjerena je svaka tri dana vaganjem Erlenmeyer tikvice (prije i nakon dodavanja 250 mL mlijeka) u kojoj je proveden uzgoj kefirnih zrnaca, odnosno kefira.

3.4.1. Prinos biomase kefirnih zrnaca

Prinos biomase (Y_x) kefirnih zrnaca je izračunat prema jednadžbi:

$$Y_x\ (\%) = [(X_t - X_0) / X_t] \cdot 100$$

gdje je:

Y_x = prinos biomase (g)

X_t = masa biomase nakon određenog vremena (g)

X_0 = početna masa biomase (inokulum) (g)

3.5. Određivanje koncentracije ukupnih kiselina u kefiru

Koncentracija ukupnih kiselina određena je titracijom s 0,1 M NaOH, uz fenolftalein kao indikator. 50 mL kefira je razrijeđeno istim volumenom vode i titrirano uz dodatak 5-6 kapi fenolftaleina. Koncentracija ukupnih kiselina je izražena u mL 0,1 M NaOH na 10 mL kefira. Utrošeni mL 0,1 M NaOH za titraciju kefira je pomnožen s faktorom 0,1 M NaOH i podijeljen s 5.

3.6. Određivanje koncentracije mliječne kiseline u kefiru

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

$$\gamma\ (CH_3CH(OH)COOH) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 90{,}08) / V\ \text{uzorka} \qquad (1)$$

gdje je:

V(NaOH) = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

M(NaOH) = molaritet NaOH (0,1 M)

Vuzorka = volumen uzorka (mL)

3.7. Određivanje koncentracije glukonske kiseline u kefiru

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

γ ($C_6H_{12}O_7$) = (V(NaOH) · M(NaOH).· 1,97) / Vuzorka (2)

gdje je:

V(NaOH) = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

M(NaOH) = molaritet NaOH (0,1 M)

Vuzorka = volumen uzorka (mL)

3.8. Određivanje koncentracije octene kiseline u kefiru

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

$\gamma(CH_3COOH) = V(NaOH) \cdot f(NaOH) \cdot V$uzorka. · 6,7 (3)

gdje je:

V(NaOH) = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

f(NaOH) = faktor 0,1 M NaOH (1,000)

Vuzorka = volumen uzorka (mL)

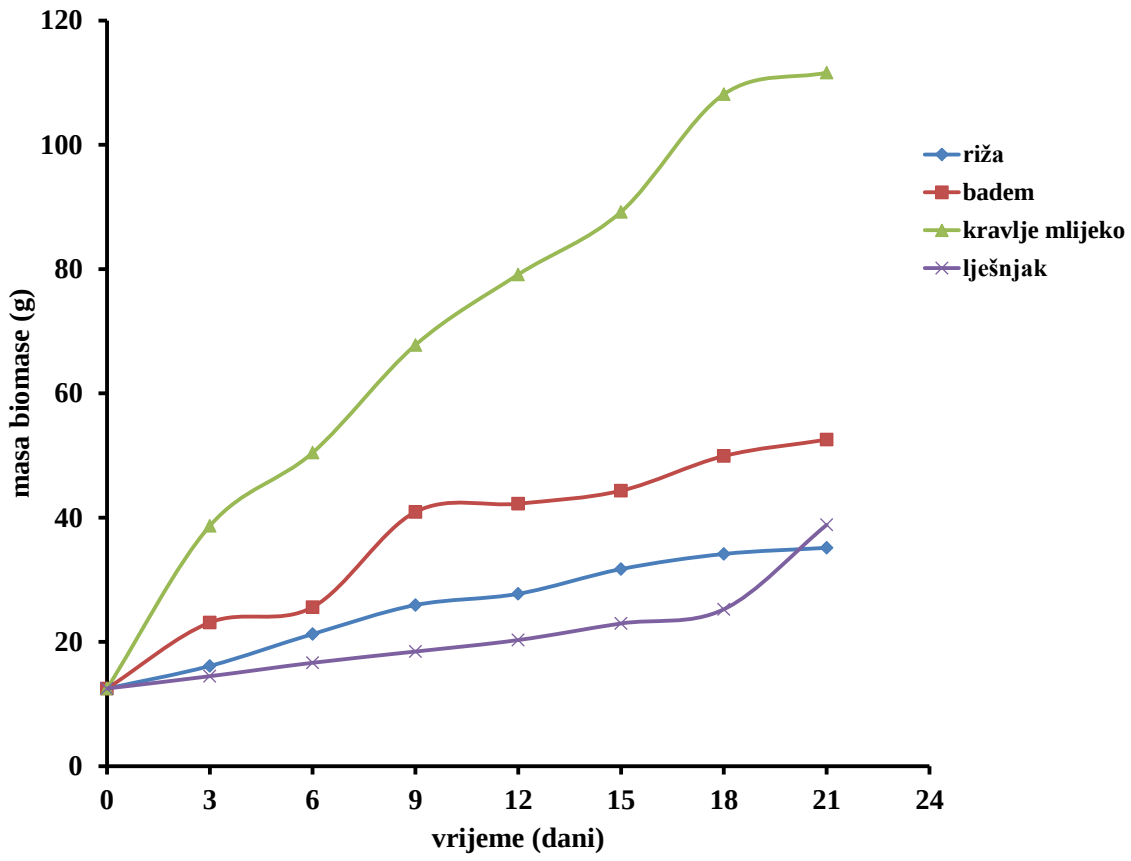
3.9. Određivanje pH vrijednosti kefira

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

4. REZULTATI

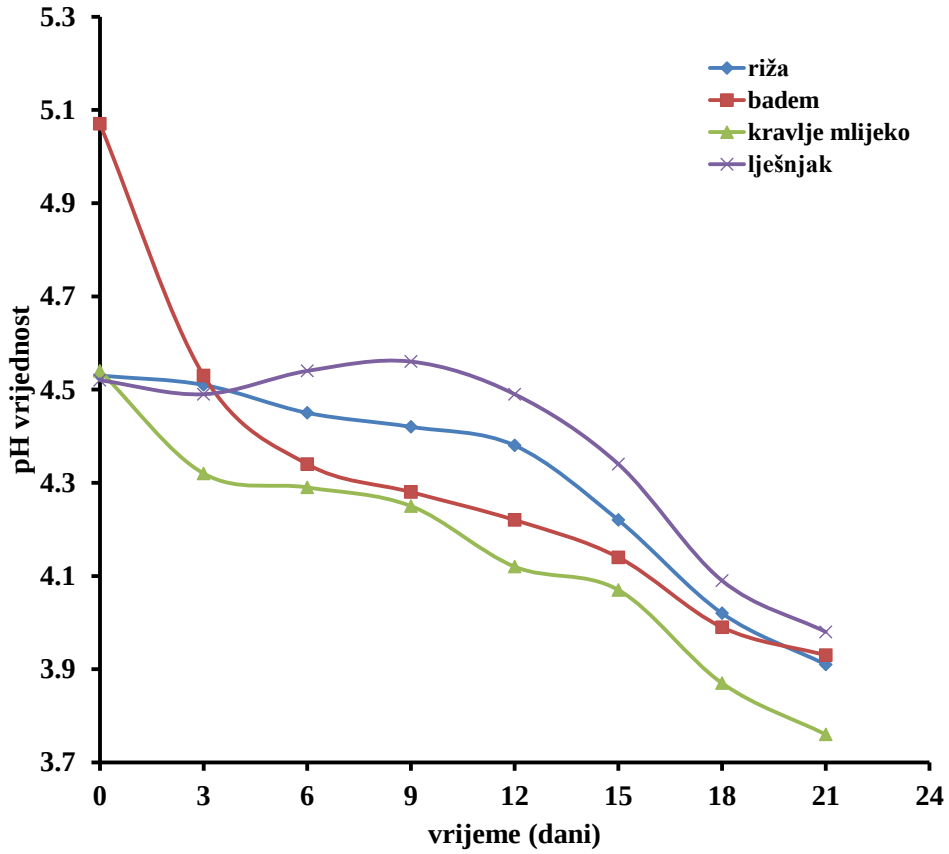
Posljednjeg je desetljeća povećan interes za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda koji imaju probiotička svojstva i time poboljšavaju zdravstveni status konzumenata (Ozer i Kirmaci, 2010). Kefir je osvježavajući mliječni proizvod, blago kiselog okusa i kremaste konzistencije. Dobiva se fermentacijom mlijeka pomoću združene kulture bakterija i kvasaca. U ovom je radu ispitivan uzgoj kefirnih zrnaca u četiri različite vrste mlijeka: kravljeg, životinjskog podrijetla te tri vrste biljnih mlijeka: rižinog, bademovog i lješnjakovog.

Tijekom 21-og dana fermentacije, masa biomase kefirnih zrnaca se mijenjala ovisno o vrsti mlijeka (Slika 5). Kao što je vidljivo na Slici 5, najveći je prinos biomase izmjeren tijekom uzgoja na kravljem mlijeku, nakon toga u bademovom mlijeku, a rižino i lješnjakovo mlijeko su bili najmanje pogodni za uzgoj i prinos biomase kefirnih zrnaca.

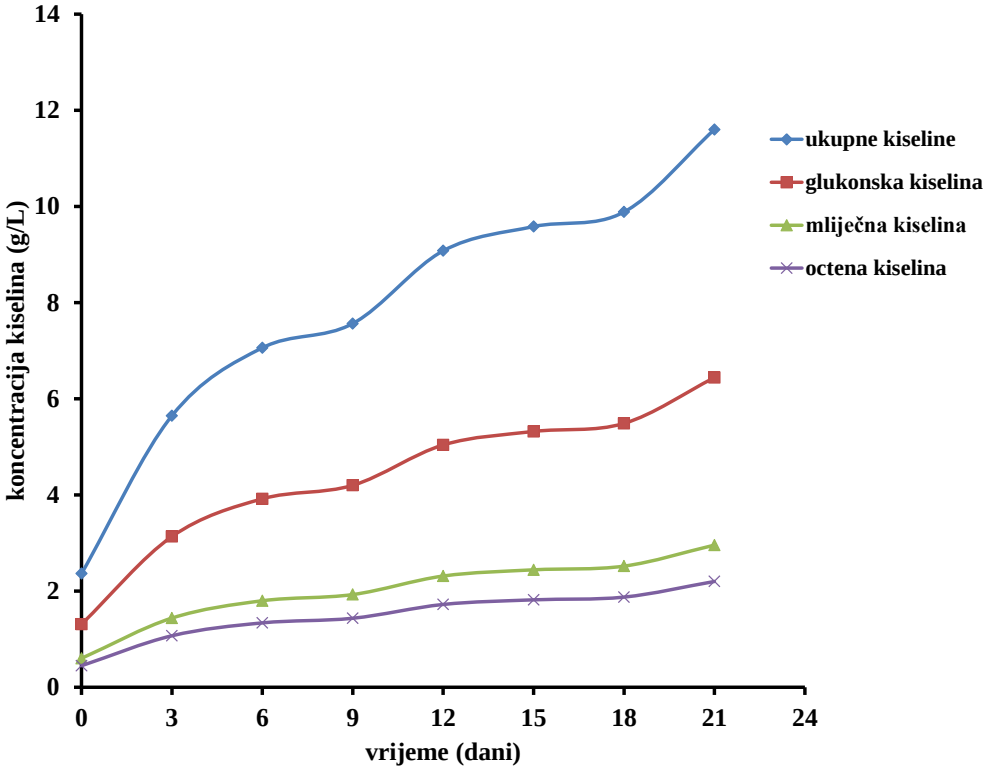


Slika 5. Prinos biomase kefirnih zrnaca tijekom 21-og dana uzgoja u različitim vrstama mlijeka

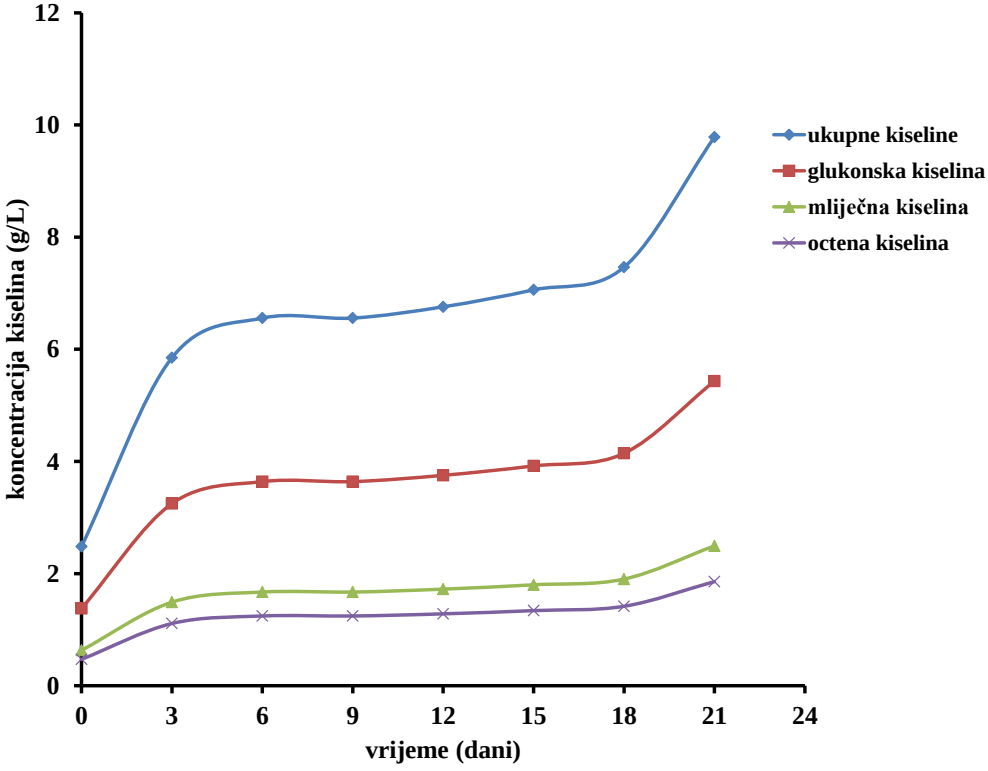
Tijekom pokusa mjerena je pH vrijednosti kefira (Slika 6) te koncentracija ukupnih kiselina kao i koncentracija glukonske, mliječne i octene kiseline (Slike 7 - 10) u svim uzorcima ispitivanih mlijeka.



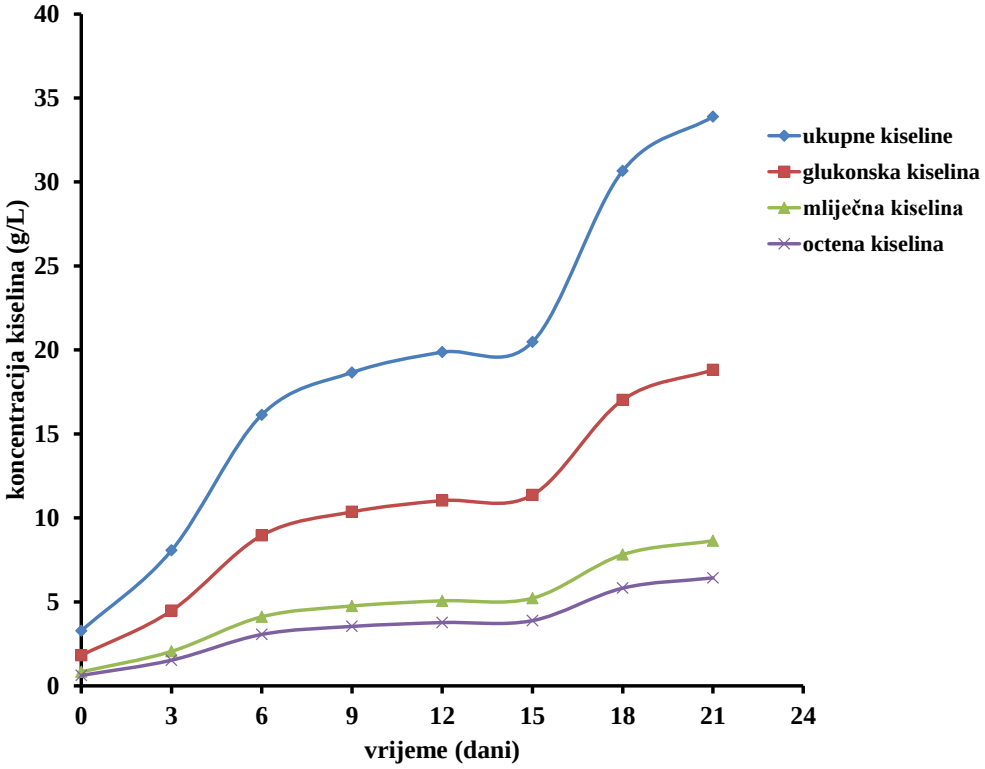
Slika 6. Promjena pH vrijednosti kefira tijekom 21-og dana uzgoja u različitim vrstama mlijeka



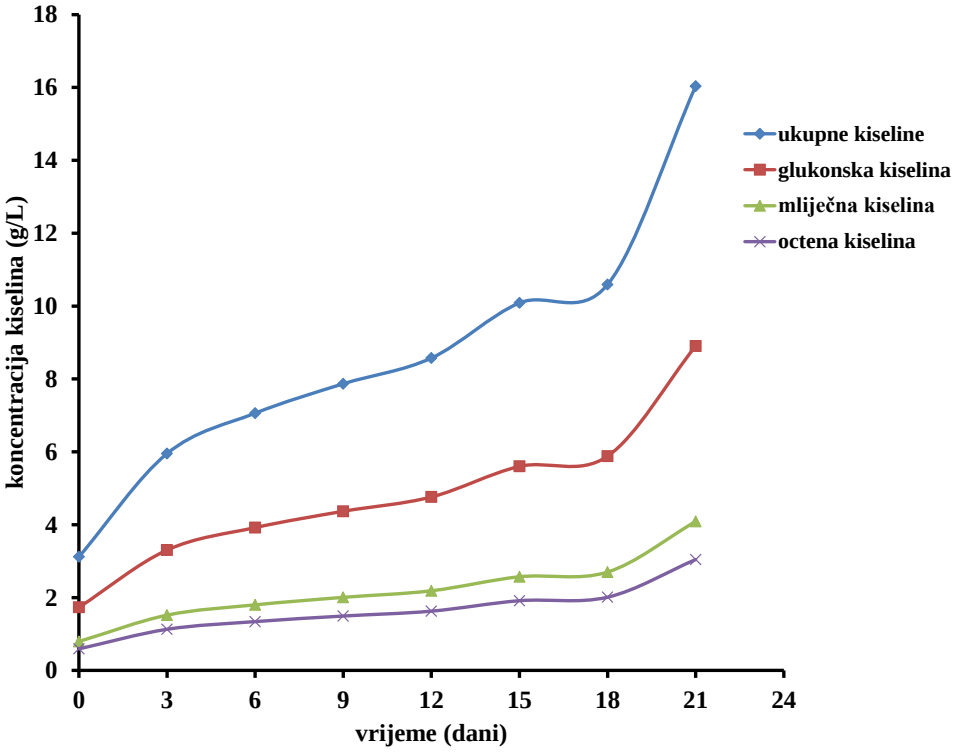
Slika 7. Promjena koncentracije kiselina tijekom 21-og dana uzgoja kefirnih zrnaca u rižinom mlijeku



Slika 8. Promjena koncentracije kiselina tijekom 21-og dana uzgoja kefirnih zrnaca u bademovom mlijeku



Slika 9. Promjena koncentracije kiselina tijekom 21-og dana uzgoja kefirnih zrnaca u kravljem mlijeku



Slika 10. Promjena koncentracije kiselina tijekom 21-og dana uzgoja kefirnih zrnaca u lješnjakovom mlijeku

5. RASPRAVA

Kefir je mliječni napitak dobiven fermentacijom različitih vrsta mlijeka pomoću združene kulture bakterija mliječne kiseline i kvasaca, a ponekad i bakterija octene kiseline (Chen i sur., 2008). Predstavlja blago kiseli napitak s malim udjelom alkohola koji se smatra probiotikom, odnosno funkcionalnom hranom (Hong i sur., 2009). Moderna proizvodnja kefira temelji se na kontinuiranom uzgoju kefirne kulture čija se biomasa povećava za 5 do 7 % na dan (Libudzisz i Platkiewitz, 1990).

Kefir sadrži združenu kulturu bakterija mliječnih kiselina iz rodova *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus* i različih vrsta kvasaca (*Candida* sp., *Kluyveromyces* sp., *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Zygosaccharomyces* sp.), a ponekad i bakterije octene kiseline (*Acetobacter* sp.) (Guzel-Seydim i sur., 2011) koji svojim simbiotskim i metaboličkim aktivnostima tvore specifični okus kefira (Tratnik i sur., 2006; Yuksekdag i sur., 2004a).

Kemijska, organoleptička i teksturna svojstva kefira su nejednolika, a ovise o podrijetlu i izvorištu kultura kefirnih zrnaca koje se koriste u fermentaciji, sastavu i porijeklu mlijeka ili napitaka od kojih se želi proizvesti kefir te uvjetima fermentacije (Otles i Cagindi, 2003).

U ovom je radu ispitivan uzgoj kefirnih zrnaca u četiri različite vrste mlijeka; kravljeg, životinjskog podrijetla, te tri vrste biljnih mlijeka: rižinog, bademovog i lješnjakovog. Do sada je, osim u mlijeku životinjskog podrijetla, zabilježeno samo jedno istraživanje na sojinom mlijeku (Oner i sur., 2003). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem su pokazali da je najveći prinos biomase postignut uzgojem u kravljem mlijeku (88,80 %), nešto manji u bademovom mlijeku (76,21 %), dok su uzgojem u rižinom i lješnjakovom mlijeku postignuti približno jednaki prinosi biomase kefirnih zrnaca (64,33 i 67,81 %) (Slika 5).

Glavne promjene pH vrijednosti tijekom uzgoja kefirnih zrnaca u ova četiri različita mlijeka (supstrata) su prikazane na Slici 6. Nagli pad pH vrijednosti zamijećen je već nakon 24 h uzgoja u bademovom i kravljem mlijeku, a istim se intenzitetom nastavio sve do kraja fermentacije i iznosio je 1 jedinicu (bademovo mlijeko) i 0,62 jedinice (kravlje mlijeko). Kod rižinog i lješnjakovog mlijeka, izraženiji pad pH vrijednosti je uočen tek 12-og dana uzgoja i nastavljen je do kraja istraživanja, no pH vrijednost se od početka do kraja fermentacije promijenila za samo 0,4 jedinice (Slika 6). Dobivene rezultate nije moguće usporediti s literaturnim podacima, osim kad se radi o kravljem mlijeku, gdje su rezultati usporedivi s rezultatima istraživanja Garcia Fontan i sur. (2006). Athanasiadis i sur. (2004) smatraju da je optimalna pH vrijednost kefira dobivenog fermentacijom sirutke 4,1. Prema tim autorima, pri toj pH vrijednosti, okus gotovog proizvoda je ujednačen s obzirom na hlapive kiseline što nije

zabilježeno kod drugih pH vrijednosti. U ovim istraživanjima su kefiri proizvedeni na sva četiri mlijeka imala konačni pH između 3,9 i 4,15 (Slika 6).

Kao što je i očekivano, kako se pH vrijednost uzoraka smanjivala, tako je rasla koncentracija ukupnih kiselina izraženih kao glukonska, mliječna i octena (Slike 7 – 10). U svim istraživanim uzorcima uočena je najveća koncentracija glukonske kiseline, dok su koncentracije mliječne i octene kiseline bile niže i podjednake. Ovi rezultati su u suglasju s rezultatima Guzel-Seydim i sur. (2000a) koji su uočili da kefir ima manji udjel mliječne kiseline nego jogurt, vjerojatno zbog svog heterofermentativnog, a ne homofermentativnog metabolizma pri čemu nastaju određene koncentracije CO_2 zbog kojeg je kefir pjenušavi napitak. Proizvodnja mliječne kiseline rezultat je metabolizma bakterija mliječne kiseline i od ogromne je važnosti zbog svog inhibirajućeg učinka na nepoželjne mikroorganizme, kako patogene, tako i one koji mogu izazvati kvarenje gotovog proizvoda (Magalhaes i sur., 2011). Prosječna koncentracija octene kiseline u prvih 24 h uzgoja bila je 0,2 g/L, no blago je rasla do kraja fermentacije te je u biljnim uzorcima mlijeka izmjereno oko 1,2 g/L. U kravljem mlijeku je koncentracija octene kiseline na kraju fermentacije iznosila 4,9 g/L (Slike 7 – 10).

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazali su da se tradicionalni način proizvodnje kefira može provesti i na mlijeku biljnog podrijetla, a ne samo životinjskog, što je uobičajeni način proizvodnje. Pri tome su dobiveni proizvodi imali pH, sastav kiselina i teksturu vrlo sličnu kefiru dobivenom od kravljeg mlijeka.

6. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Kefir je probiotički napitak dobiven fermentacijom mlijeka pomoću kefirnih zrnaca, odnosno združene kulture bakterija mliječne kiseline i kvasaca.

2. Istraživane su fermentacije rižinog, bademovog, kravljeg i lješnjakovog mlijeka tijekom 21-og dana s „domaćom“ kulturom kefirnih zrnaca pri 28 ^{o}C.

3. Najveći prinos biomase kefirnih zrnaca nakon 21-og dana fermentacije izmjeren je u kravljem mlijeku (88,80 %), malo manji u bademovom mlijeku (76,21 %), dok su prinosi u lješnjakovom (67,81 %) i rižinom mlijeku (64,33 %) bili približno isti.

4. U svim je uzorcima tijekom fermentacije pad pH vrijednosti kefira bio u korelaciji s povećanjem koncentracija glukonske, mliječne i octene kiseline.

7. LITERATURA

Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., Afreen, A. (2013). Kefir and health: A contemporary perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, **53**, 422–434.

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

Arslan, S. (2015). A review: chemical, microbiological and nutritional characteristic of kefir. *CyTa – Journal of Food*, **13**, 340-345.

Athanasiadis, L., Paraskepoulou, A., Bickas, G., Kiosscoglou, V. (2004). Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatment. *Biotech. Progress*, **20**, 1091-1095.

Balabanova, T., Panayotov, P. (2011). Obtaining functional fermented beverages by using kefir grains. *Proc. Food. Sci*., **1**, 1653-1659.

Beshkova, D. M., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I., Spasov, Z. N. (2002). Pure cultures for making kefir. *Food Microb*., **19**, 537–544.

Bolla, P. A., Serradell, M. L., de Urraza, P. J., De Antoni, G. L. (2011). Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *J. Dairy Res*., **78**, 15–22.

Carasi, P., Trejo, F. M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L., Serradell, M. D. L. (2012). Surface proteins from Lactobacillus kefir antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. *Anaerobe*, **18**(1), 135–142.

Carasi, P., Jacquot, C., Romanin, D. E., Elie, A. M., De Antoni, G. L., Urdaci, M. C., Serradell, M. A. (2014). Safety and potential beneficial properties of *Enterococcus* strains isolated from kefir. *Int. Dairy J*., **39**, 193–200.

Cui, X.-H., Chen, S.-J., Wang, Y., Han, J.-R. (2013). Fermentation conditions of walnut milk beverage inoculated with kefir grains. *LWT-Food Sci. Technol*., **50**, 349-352.

Delfederico, L., Hollmann, A., Martinez, M., Iglesias, N. G., De Antoni, G., Semorile, L. (2006). Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *J. Dairy Res.*, **73**, 20–27.

De Moreno de LeBlanc, A., Matar, C., Farnworth, E. R., Perdigon, G. (2006). Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. *Cytokine*, **34**, 1–8.

Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World J. Microb. Biotechnol.*, **30**, 43–53.

Dobson, A., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Ross, P., Hill, C. (2011). High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microb. Lett*., **320**, 56–62.

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

Franco, M. C., Golowczyc, M. A., De Antoni, G. L., Pérez, P. F., Humen, M., Serradell, M. D. L. (2013). Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *J. Med. Microbiol*., **62**, 1815–1822.

Gao, J., Gu, F., Abdella, N. H., Ruan, H., He, J. (2012). Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. *J. Food Sci*., **77**, 425–433.

Garbers, I. M., Britz, T. J., Witthuhn, R. C. (2004). PCR-based denaturing gradient gel electrophoretictypification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World J. Microb. Biotechnol.*, **20**, 687–693.

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

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

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

Golowczyc, M. A., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. (2007). Protective action of *Lactobacillus* kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int. J. Food Microbiol.*, **118**, 264–273.

Grønnevik, H., Falstad, M., Judith, A. N. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *Int. Dairy J*., 21, 601–606.

Guzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., Bodine, A. B. (2000). Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *J. Food Comp. Analysis*, **13**, 35–43.

Guzel-Seydim, Z., Seydim, A. C., Greene, A. K. (2000). Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *J. Dairy Sci*., **83**, 275–277.

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

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

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

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

Kakisu, E., Abraham, A. G., Farinati, C. T., Ibarra, C., De Antoni, G. L. (2013). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Dairy Res.*, **80**, 64–71.

Kesenkas, H., Dinkci, N., Seckin, K., Kinik, O., Gönc, S., Ergönül, P. G., Kavas, G. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of soymilk kefir. *African J. Microbiol. Res*., **5**, 3737–3746.

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

Kneifel, W., Mayer, H. K. (1991). Vitamin profiles of kefirs made from milks of different species. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **26**, 423–428.

Kok-Tas, T., Ekinci, F. Y., Guzel-Seydim, Z. B. (2012). Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. *Int. J. Dairy Technol.*, **65**, 126–131.

Kök-Taş, T., İlay, E., Öker, A. (2014). Pekmez ve Erik Kullanılarak Üretilen Kefirlerin Bazı Kalite Kriterlerinin Belirlenmesi. *Türk Tarım– Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **2**, 86–91 (in Turkish).

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

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

Liutkevicius, A., Sarkinas, A. (2004). Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass. *Veterinarija ir Zootechnika*, **25**, 64–70.

Loretan, T., Mostert, J. F., Viljeon, B. C. (2003). Microbial flora associated with South African house hold kefir. *South African J. Sci.*, **99**, 92–94.

Machado De Oliveira Leite, A. M., Lemos Miguel, M. A., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., Flosi Paschoalin, V. M. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Brazilian J.Microbiol*., **44**, 341–349.

Magalhaes, K. T., de Melo Pereira, G. V., Campos, C. R., Dragone, G., Schwan, R. F. (2011a). Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian J.Microbiol*., **42**, 693–702.

Medrano, M., Hamet, M. F., Abraham, A. G., Pérez, P. F. (2009). Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by Bacillus cereus infection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **96**(4), 505– 513.

Medrano, M., Pérez, P. F., Abraham, A. G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *Int. J. Food Microbiol.*, **122**,17-23.

Medrano, M., Racedo, S. M., Rolny, I. S., Abraham, A. G., Pérez, P. F. (2011). Oral administration of kefiran induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *J. Agric. Food Chem*., **59**, 5299–5304.

Miao, J., Guo, H., Ou, Y., Liu, G., Fang, X., Liao, Z., Cao, Y. (2014). Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. Tolerans FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control*, **42**, 48–53.

Miguel, M. G. D. C. P., Cardoso, P. G., Lago, L. D. A., Schwan, R. F. (2010). Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Res. Int.*, **43**, 1523–1528.

Montanuci, F. D., Pimentel, T. C., Garcia, S., Prudencio, S. H. (2012). Effect of starter culture and inulin addition on microbial viability, texture, and chemical characteristics of whole or skim milk kefir. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **32**, 850–861.

Motaghi, M., Mazaheri, M., Moazami, N., Farkhondeh, A., Fooladi, M. H., Goltapeh, E. M. (1997). Short communication: Kefir production in Iran. *World J. Microb. Biotechnol*, **13**, 579–581.

Otles, S., Cagindi, O. (2003). Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan J. Nutrition*, **2**, 54–59.

Öner, Z., Karahan, A. G., Çakmakcı, M. L. (2010). Effects of different milk types and starter cultures on kefir. *Gıda*, **35**, 177–182.

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

Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., Samaržija, D. (2013). Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*, **63**, 3–14.

Rodrigues, K. L., Gaudino-Caputo, L. R., Tavares-Carvalho, J. C., Evangelista, J., Schneedorf, J. M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **25**, 404–408.

Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., Onal-Darilmaz, D. (2010). Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and P*ediococcus* spp. strains isolated from kefir. *J. Food Sci.*, **75**, 568–573.

Sarkar, S. (2007). Potential of kefir as a dietetic beverage–A review. *British J. Nutrition*, **109**, 280–290.

Sefidgar, S. A. A., Gharekhani, S., Ghasempour, M. (2014). Identification of yeasts and bacteria isolated from Iranian kefir drink. *Jundishapur J. Microbiol*., **7**, e10707.

Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Industrial Microb. Biotechnol.*, **28**, 1–6.

Tratnik, L., Bozanic, R., Herceg, Z., Drgalic, I. (2006). The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. *Int. J. Dairy Technol*., **59**, 40–46.

Uraz, G., Akkuzu, S., Özcan, S., Sevimay, I. (2012). Isolation of yeast from microflora of kefir. *J. Biotechnol.*, **161S**, 19–48.

Wang, Y. F., Huo, G. C., Liu, L. B. (2004). Isolation and identification of the lactic acid bacteria from kefir grains. *China Dairy Ind*., **32**,17–19.

Witthuhn, R. C., Schoeman, T., Britz, T. J. (2004). Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *Int. J. Dairy Technol*., **57**,33–37.

Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J*., **12**, 91–109.

Wszolek, M., Tamime, A. Y., Muir, D. D., Barclay, M. N. I. (2001). Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *LWT – Food Sci. Technol*., **34**, 251–261.

Yuksekdag, Z. N., Beyatli, Y., Aslim, B. (2004a). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefirs with natural probiotic. *LWT – Food Sci. Technol.*, **37**, 663–667.

Yuksekdag, Z. N., Beyatli, Y., Aslim, B. (2004b). Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. *Nahrung*, **48**, 218–220.

Zajsek, K., Kolar, M., Gorsek, A. (2011). Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *Int. J. Dairy Technol*, **64**, 544–548.