

# Mikrobni sastav kefirnih zrna

*Tomislav Pogačić\*, Sanja Šinko, Šimun Zamberlin, Dubravka Samaržija*

Zavod za mljekarstvo, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,  
Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

Received - Prispjelo: 07.12.2012.  
Accepted - Prihvaćeno: 15.02.2013.

## Sažetak

Bakterije i kvasci, a ponekad i filamentozne plijesni u kefirnim zrnima žive u složenom simbiotskom odnosu koji kefirna zrna čini jedinstvenom mikrobnom zajednicom u prirodi. Složenost i kompleksnost njihove fizičke i mikrobne strukture razlogom su što su kefirna zrna još uvijek mikrobiološki nedovoljno i nepotpuno istražena. U istraživanju mikrobnog sastava kefirnih zrna koriste se različiti mikrobiološki i molekularni pristupi. Razvojem metagenomike, bazirane na identifikaciji bez kultivacije, otvaraju se nove mogućnosti identifikacije do sada još neidentificiranih mikrobnih vrsta sadržanih u kefirnom zrnju. Do sada je identificirano preko 50 vrsta mikroorganizama prisutnih u kefirnom zrnju. U radu su prikazane do danas identificirane mikrobne vrste sadržane u kefirnim zrnima različitog podrijetla. Također, radi tehnološkog i mikrobiološkog značenja koja imaju kefirna zrna sama po sebi, u radu su detaljnije prikazani molekularni eksperimentalni pristupi koji se koriste u istraživanju njihove mikrobne bioraznolikosti.

*Ključne riječi:* kefir, kefirna zrna, molekularne metode, mikrobne vrste

## Uvod

Kefir je specifični mliječni proizvod iz skupine fermentiranih mlijeka gdje se hidroliza laktoze tijekom fermentacije događa istovremenim djelovanjem bakterija i kvasaca sadržanih u kefirnim zrnima. Premda je mliječna kiselina glavni metabolit, zbog djelovanja kvasaca kefir sadrži i značajne količine CO<sub>2</sub>, te varijabilnu količinu alkohola. Zbog asocijativnog rasta različitih mikrobnih vrsta u kefiru se tijekom fermentacije stvaraju i drugi organski spojevi poput bioaktivnih peptida, egzopolisaharida, bakteriocina kojima se pripisuje probiotički učinak na humano zdravlje (Kosikowski i Mistry, 1999; Stepaniak i Fetliński, 2003; Lopitz-Otsoa i sur., 2006; Hong i sur., 2010).

Mikrobnu populaciju kefirnih zrna čine brojne vrste bakterija mliječne kiseline, bakterija octene kiseline, kvasaca i filamentoznih plijesni koje su unutar mikrobne zajednice razvile kompleksan simbiotski odnos (Marshall i sur., 1984; Farnworth,

2005). Također, zastupljenost pojedinih mikrobnih vrsta unutar kefirnog zrna određena je područjem nastanka (Angulo i sur., 1993; Lin i sur., 1999). Znanstvenim studijama, između ostalog, pokušava se objasniti unutrašnja i vanjska fizička struktura kefirnog zrna koja predstavlja jedinstven eko sustav u prirodi. Međutim, zbog brojnosti vrsta i fenomena njihove asocijacije, mikrobiološki, kefirna zrna još uvijek su nedovoljno i nepotpuno istražena (Leite i sur., 2012; Wang i sur., 2012). U istraživanju sastava mikrobne populacije kefirna koriste se različite mikrobiološke i molekularne metode identifikacije izolata, te noviji metagenomski molekularni pristupi bazirani na identifikaciji mikrobne populacije bez kultivacije mikroorganizama na hranjivim podlogama (Unsal, 2008; Leite i sur., 2012; Gao i sur., 2013). Istraživanje jedinstvenog eko sustava koji je svojstven za kefirna zrna ima višestruku znanstvenu namjenu. Osim opisa, te izolacije mikrobnih vrsta koje se mogu koristiti za sastav mikrobnih kultura, svrha istraživanja kefirnih zrna temelji se i na izolaciji izolata s

\*Dopisni autor/Corresponding author: Tel./Phone: +385 (0)1 239 3646; E-mail: tpogacic@agr.hr

potencijalno drugačijim probiotičkim i biokemijskim karakteristikama (Hertzler i Clanci, 2003; Santos i sur., 2003; Liu i sur., 2005; Farnworth, 2005; Lopitz-Otsoa i sur., 2006; Powel, 2006; Ferreira i sur., 2010; Hong i sur., 2010; Magalhães i sur., 2011; Dimitreli i Antoniou, 2011; Purnomo i Muslimin, 2012).

Na osnovu znanstvenih istraživanja provedenih u posljednjih nekoliko godina svrha ovog rada je bila sažeto prikazati rezultate istraživanja mikrobne populacije kefirnih zrna. Također, zbog značenja koja općenito kefirna zrna imaju u tehnološkom i mikrobiološkom smislu u radu su detaljnije prikazani molekularni eksperimentalni pristupi koji se koriste u istraživanju mikrobne bioraznolikosti kefirnih zrna.

## Kefir

Kefir je tradicionalno fermentirano mlijeko koje se već tisućama godina proizvodi i konzumira u područjima od istočne Europe do Mongolije. Izvorno, vjeruje se, kefir je potekao iz planinskih predjela Kavkaza ili Kavkazije gdje su ga prema predaji tadašnji starosjedioci dobili izravno od proroka Muhameda (Gaware i sur., 2011). Ime kefir najvjerojatnije je izvedeno iz turske riječi *kefy* ili *keif* koja znači sreća, zadovoljstvo (Kurman i sur., 1992). Osim imena kefir, za isti proizvod koriste se i sljedeća imena: kepyr, kephir, kefer, kiaphur, knapson, kepi i kiipi (Ratray i O'Connell, 2011).

Industrijski, kefir se najviše proizvodi u Rusiji i ostalim zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza, potom u Poljskoj, Švedskoj, Mađarskoj, Norveškoj, Finskoj, Njemačkoj, Češkoj, Danskoj i Švicarskoj. Kefir proizvode i Grčka, Austrija i Brazil (Saloff-Coste, 1996). U smislu etničkog proizvoda, popularnost kefira posljednjih godina raste u SAD-u i Japanu. Prema dostupnim podacima u Hrvatskoj kefir u relativno malim količinama proizvodi svega nekoliko mljekara isključivo dodatkom komercijalne kulture.

U proizvodnji kefira koriste se različite tehnologije, ali u osnovi one se mogu opisati kao tradicionalni ili industrijski procesi proizvodnje. Tradicionalni način proizvodnje zadržao je direktnu inokulaciju mlijeka kefirnim zrnima (matična kultura) ili se mlijeko inokulira tehničkom kulturom pripremljenom iz matične kulture. Suprotno, u proizvodnji kefira pojam industrijski procesi podrazumijeva korištenje komercijalnih uglavnom DVS kultura (Wszolek i

sur., 2006). Komercijalne kulture sadrže izolate različitih vrsta bakterija mliječne kiseline i/ili kvasaca izoliranih iz kefirnih zrna. U usporedbi s kefirom proizvedenim iz kefirnih zrna, kefir proizveden čistom kulturom u značajnijoj mjeri izgubio je svoju autentičnost (Otles i Caginidi, 2003; Farnworth, 2005; Garcia Fontán i sur., 2006; Wszolek i sur., 2006). Gubitak autentičnosti najčešće je vezan na relativno mali broj različitih mikrobnih vrsta sadržanih u čistoj kulturi. Međutim, u Poljskoj proizvode kefir inokulacijom mlijeka vlastitom liofiliziranom kulturom proizvedenom od kefirnih zrna. Ovim načinom proizvodnje "modificirani" kefir je manje kiseli od tradicionalnog i karakterizira ga kremastija konzistencija. Međutim, uz značajno poboljšanje stalnosti kvalitete njegova autentičnost nije značajnije izmijenjena (Libudzisz i Piatkoiewicz, 1990; Muir i sur., 1999).

Neovisno o načinu proizvodnje i vrste kulture prema Codex Alimentarius standardu (Codex Stan 243-2003) tipična mikrobna populacija kefira mora sadržavati *Lb. kefiri* i vrste *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Acetobacter* (pripremljena od kefirnih zrna), te još kvasce koji fermentiraju laktozu (*Kluyveromyces marxianus*) i kvasce koji ne fermentiraju laktozu (*Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces exigous*) kada se za kulturu koriste kefirna zrna. Prema istom standardu, tipični kefir mora sadržavati najmanje 2,8 % proteina, manje od 10 % masti, najmanje 0,6 % mliječne kiseline, a postotak alkohola nije određen. Ukupan broj specificiranih mikroorganizama iz kulture mora biti najmanje  $10^7$  cfu/mL, a broj kvasca ne manji od  $10^4$  cfu/mL.

Nakon potpune fermentacije koja uključuje i tri dana hladnog zrenja tipični kefir ima pH vrijednost između 4,2-4,7, sadrži između 0,8-1,2 % mliječne kiseline, 0,5-0,7 % etanola i približno 0,20 % CO<sub>2</sub>. Osim tih spojeva, kefir sadrži i različite spojeve arome poput acetaldehida, diacetila i acetoina, druge organske kiseline poput mravlje, octene i/ili propionske, te izoamilni alkohol u tragovima (Wszolek i sur., 2006). Također, mnogobrojne znanstvene studije potvrđuju da kefir osim nutritivne vrijednosti za humani organizam ima i snažno probiotičko djelovanje (Farnworth, 2005; Lopitz-Otsoa i sur., 2006; Ratray i O'Connell, 2011).

## Kefirna zrna

Kefirna zrna predstavljaju jedinstveni živi ekosustav u prirodi, stvoren simbiotskim odnosom između bakterija i kvasaca. Kompleksna mikrobna zajednica kefirnog zrna sadrži više od 50 različitih vrsta bakterija i kvasaca te, ovisno o podrijetlu, više vrsta filamentoznih plijesni (Angulo i sur., 1993; Garrote i sur., 2001; Jukić i sur., 2001; Stepaniak i Fetliński, 2002; Sarkar i sur., 2008; Wang i sur., 2008). Međutim, omjer i broj pojedinačnih mikrobnih vrsta unutar kefirnog zrna značajno je određen podrijetlom i načinom kultivacije (Koroleva i sur., 1988; Tamime i Marshall, 1997; Ferreira i sur., 2010). Osim brojnih mikrobnih vrsta, kefirno zrno čini spužvasto fibrilarna struktura sa retikularnim laminarnim matriksom te vlaknaste nakupine koje se posebice u centru zrna granaju i međusobno povezuju dugim lancima. Ova kompleksna struktura izgrađena je od proteina, polisaharida, različitih celularnih elemenata i brojnih drugih još uvijek nedefiniranih komponenata. Polisaharidnu komponentu s približno 25 % težine suhog zrna čini u vodi topljiva supstanca kefiran. Kefiran koji u svojoj složenoj egzopolisaharidnoj strukturi sadrži D-glukozu i D-galaktozu u omjeru 1:1 odgovoran je za međusobno povezivanje mikrobne zajednice kefirnog zrna (La Rivière i sur., 1967; Kander i Kunath, 1983; Marshall i sur., 1984; Micheli i sur., 1999). Također, pretpostavlja se da kefiran drži mikrobnu zajednicu u kefirnom zrnu u simbiozi na način da mikrobna populacija egzistira prema točno određenoj zakonitosti. Periferni dio zrna gotovo isključivo čine bakterije, a u centru dominiraju kvasci. Područja između centra i perifernog dijela kefirnog zrna sadrže i bakterije i kvasce, ali se njihov omjer progresivno mijenja ovisno o udaljenosti od centra zrna (Bottazzi i Bianchi, 1980; Lin i sur., 1999). Tako su homofermentativne *Lactobacillus* vrste koje tvore kefiran poput bakterija *Lb. kefiri* i *Lb. kefiranofaciens* unutar kefirnog zrna različito smještene. *Lb. kefiranofaciens* se nalazi u središtu kefirnog zrna, gdje su uvjeti rasta anaerobni i gdje je prisutan etanol, a *Lb. kefiri* na perifernom dijelu. Na perifernom dijelu matriksa smješteni su i laktobacili, te kvasci koji ne tvore kefiran i oni uglavnom ne mogu proći kroz polisaharidni dio u njegovu unutrašnjost (Zhou i sur., 2007; Dimitreli i sur., 2011). Dominantne mikrobne vrste perifernog sloja su i bakterija *Leuconostoc mesenteroides* te kvasac

*Kluyveromyces marxianus* (Lin i sur., 2007). Do sada su iz kefirnog zrna izolirane brojne vrste laktokoka, laktobacila, streptokoka, vrsta roda acetobakter, kvasaca i plijesni (FAO/WHO, 2001).

Neke od vrsta poput *Lb. kefiri* ili *Lb. kefiranofaciens* imenovane su prema kefiru. Prema omjeru zastupljenosti mikrobnih vrsta, a ovisno o podrijetlu, kefirno zrno sadrži približno  $10^9$  laktokoka, između  $10^7$ - $10^8$  *Leuconostoc* vrsta,  $10^7$ - $10^8$  termofilnih laktobacila,  $10^4$ - $10^5$  kvasaca i  $10^4$ - $10^5$  bakterija octene kiseline, a od filamentoznih plijesni *Geotrichum candidum* (Kurman i sur., 1992). Međutim, potrebno je naglasiti da struktura mikrobne populacije niti jednog kefirnog zrna nije jednoznačno određena, već je specifična.

Veličina kefirnih zrna je između 0,2-3 cm i nepravilnog su oblika koji izgledom nalikuju karfiolu. Ona su sluzava, ali imaju čvrstu konzistenciju. Opetovanom inokulacijom u mlijeko kefirna zrna povećavaju svoju masu za približno 25 % i imaju karakteristični miris. Boja kefirnih zrna je boja slonovače, ili je ona blijedo-žučkasta (Wszolek i sur., 2006; Gaware i sur., 2011).

Kefirna zrna do ponovne upotrebe konzerviraju se konvencionalnim načinom sušenja na temperaturi od 33 °C ili sušenjem u vakuumu. U povoljnim i ujednačenim uvjetima konzerviranja, zrna ostaju stabilna više godina bez gubitka aktivnosti (Wszolek i sur., 2006). Ponovna aktivacija kefirnih zrna postiže se njihovom uzastopnom inkubacijom u pastereziranom ili rekonstituiranom mlijeku (Sarkar i sur., 2008). Osušena zrna tijekom inkubacije najprije sporim a kasnije bržim rastom ponovno poprimaju mekanu strukturu, te se započinju formirati nova kefirna zrna.

## Bioraznolikost mikrobnih vrsta

Zbog kompleksnog mikrobnog sastava kefirnog zrna, izolacija i identifikacija pojedinačnih vrsta vrlo su metodološki zahtjevne i složene. U tom smislu, ne iznenađuje činjenica da je mikrobni sastav kefirnog zrna u literaturi različito interpretiran. Uz različito podrijetlo kefirnih zrna, izbor metoda za mikrobnu identifikaciju koje su korištene u brojnim studijama u svakom slučaju jedan je od značajnih čimbenika te različitosti.

## Kultivacija i izolacija bakterija i kvasaca

Za istraživanje sastava mikrobne populacije kefirnih zrna koriste se različiti mikrobiološki i molekularni eksperimentalni pristupi. Najzastupljeniji i još uvijek najprihvaćeniji eksperimentalni pristup je klasična kultivacija mikroorganizama na više ili manje selektivnim hranjivim podlogama (Jukić i sur., 2001; Irigoyen i sur., 2005; Wang i sur., 2008; Chen i sur., 2008; Chen i sur., 2009) te molekularna identifikacija izolata. U istraživanju mikrobne populacije kefirnih zrna zadnjih godina primjenjuje se i identifikacija bez kultivacije i izolacije izolata (metagenomska identifikacija) (Leite i sur., 2012; Gao i sur., 2013), bazirana na amplifikaciji mikrobne DNA (određenog gena ili regije gena) izolirane direktno iz uzorka (Juste i sur., 2008; Ndoye i sur., 2011).

Najčešće podloge koje se koriste za klasičnu kultivaciju mikrobnih vrsta su standardne komercijalne podloge za kultivaciju laktobacila (MRS agar, LAW agar, Rogosa agar, LamVab), laktokoka (M17 agar), *Leuconostoc* vrsta (MSE agar) i kvasaca (Sabouraud agar, potato dextrose agar) (Simova i sur., 2006; Irigoyen i sur., 2005; García-Fontán i sur., 2006; Wang i sur., 2008). Također, neselektivna hranjiva podloga PCA (Plate count agar) najčešće se koristi za utvrđivanje ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija (García-Fontán i sur., 2006, Wan, i sur., 2012).

Pročišćavanje izolata standardni je postupak koji je nužno provesti da bi bili sigurni da mikroorganizam izoliran iz jedne kolonije predstavlja samo jedan izolat - jednu bakterijsku vrstu, što nužno ne mora biti nakon prvog postupka kultivacije. Zbog toga je nužno provesti jednu, dvije ili tri subkultivacije na istim hranjivim podlogama u istim uvjetima (temperatura, sa ili bez prisutnosti kisika). Također, nakon svake kultivacije, izolirane kolonije se moraju pregledati pod mikroskopom da se utvrdi radi li se o čistom izolatu ili više morfotipova, te da li je potrebno provesti još jedan postupak subkultivacije na hranjivoj podlozi da bi se dobio jedan "čisti" izolat (Caprette, 2005), koji se koristi za izolaciju mikrobne genomske DNA za daljnju molekularnu identifikaciju.

Kultivacija, pročišćavanje i izolacija mikroorganizama su vrlo osjetljive i važne mikrobiološke tehnike, te sama kultivacija i/ili izolacija mogu ponekad predstavljati mnogo veći problem od molekularne identifikacije koja ponekad može biti rutina. To je

važno naglasiti zato jer mnoge autohtone mikrobne vrste su vrlo teško kultivabilne na standardnim komercijalnim hranjivim podlogama. Također, rutinska upotreba standardnih komercijalno dostupnih podloga koje su razvijene zadnjih 30-ak godina može pogodovati rastu uvijek istih mikrobnih vrsta neovisno o stvarno prisutnom broju vrsta u istraživanom uzorku (Neviani i sur., 2009; Vartoukian i sur., 2009), prezentirajući samo djelomičnu sliku mikrobne populacije koja će biti kultivirana na hranjivoj podlozi.

Iz razloga što se za identifikaciju mikroorganizama koriste većinom molekularne metode bazirane na izoliranoj DNA i/ili RNA, u daljnjem tekstu su prikazane osnove molekularne identifikacije mikroorganizama.

## Molekularna identifikacija

### *Izolacija DNA iz izolata*

Izolacija genomske mikrobne DNA iz izolata, od klasičnog postupka izolacije bazirane na primjeni fenol-kloroforma, doživjela je značajan razvoj. Danas se u rutinskim izolacijama DNA većinom koriste komercijalni kitovi renomiranih proizvođača (Promega, Quiagen, Machenery Nagel, Fermentas, Roche...) te se izolacija provodi prema protokolu proizvođača. Stoga će biti navedene samo neke generalne specifičnosti izolacije DNA iz izolata. Za izolaciju DNA iz izolata potrebno je koloniju (prethodno pročišćenu sa 2-3 subkultivacije) inokulirati u tekuće hranilište, koje osigurava rast bakterija u vremenskom periodu od 12-24 sata. Vrijeme inkubacije izolata od 12-24 sata obično je dovoljno da se dobije potrebna gustoća stanica za izolaciju DNA. Međutim, za neke izolate, da bi se osigurao dovoljan broj stanica, vrijeme inkubacije može biti i 48 sati, ili je potrebna još jedna inokulacija (transplant) izolata u tekuće hranilište. Naime, treba uvažiti činjenicu postojanja specifičnog svojstva svakog izolata koji se ne može unaprijed predvidjeti. Od uzgojenih stanica u čistoj kulturi, za izolaciju DNA iz tekućeg hranilišta uzima se uzorak od 1-2 mL, ili se volumen uzorka određuje iskustvenom procjenom zamućenja medija, ili mjerenjem njegove optičke gustoće. Protokoli za izolaciju DNA u većoj ili manjoj mjeri međusobno se razlikuju, odnosno postoje mnogobrojne varijacije vrlo sličnih protokola. Obično su te razlike u koncentraciji pojedinih reagensija, ili je sastav pojedinih reagensija proizvođačka tajna i točan sastav nije poznat. Među-

tim, za učinkovitu izolaciju DNA većini protokola zajednička je prvotna liza bakterijske stanične stijenke uz dodatak enzima lizozima i proteinaze K. Nakon izolacije, koncentracija DNA ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) određuje se metodom spektrofotometrije ili elektroforetskim metodama (gel elektroforeza). Taj postupak je važan da bi u sljedećem koraku kod PCR amplifikacije znali točno koliko mikrolitara DNA treba dodati za određenu koncentraciju DNA ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) u reakcijskoj smjesi (Kuchta i sur., 2006). Koncentracija DNA u PCR reakcijama najčešće varira od 20 do 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , što ovisi o mnogo faktora.

Međutim, ponekad se primjenjuju i mnogo jednostavniji protokoli za izolaciju DNA, bazirani samo na razgradnji (lizi) stanične stijenke, te se lizirana stanica koristi kao kalup (engl. template DNA) za PCR reakciju (Juste i sur., 2008; Ndoye i sur., 2011), ili se za PCR reakciju uzima cijela kolonija (colony-PCR) bez ikakvog postupka izolacije DNA ili prethodne lize stanice (Unsal, 2008).

#### Identifikacija izolata PCR metodama

Identifikacija izoliranih mikroorganizama metodama baziranim na lančanoj reakciji polimeraze (PCR *polymerase chain reaction*) primjenjuje se od sredine 80-ih godina 20-og stoljeća (Stefan i sur., 1988). U tom razdoblju razvijeno je i uvedeno mnogo varijacija PCR metode kojom se umnaža određeni ciljani gen ili varijabilna regija gena *in vitro* (Bartlett i Stirling, 2003). U PCR reakcijsku smjesu dodaju se početnice (umjetno sintetizirani oligonukleotidi smijera 5'-3' i 3'-5'), izolirana DNA (DNA kalup), enzim *Taq* polimeraza, deoksiribonukleotidi (A,T,C,G), pufer i sterilna voda. Magnezij koji se također dodaje može biti sastavni dio pufera ili se dodaje posebno. PCR reakcijska smjesa priređuje se najčešće u volumenu od 25 ili 50  $\mu\text{L}$ . Sama PCR reakcija sastoji se od tri glavne faze ciklusa: faze denaturacije dvolančane molekule DNA, faze sparivanja početnica i faze produljivanja lanaca (Kuchta i sur., 2006). PCR metoda je bazirana na djelovanju enzima *Taq* polimeraze, izoliranog iz bakterije *Thermus aquaticus* kojoj su prirodna staništa termalni izvori, te zbog toga ne gubi sposobnost umnažanja DNA na temperaturama PCR reakcije, generalno, 60-95 °C (Kuchta i sur., 2006).

Optimizacija pojedinih faza PCR reakcije (temperatura, ponavljanja ciklusa), te koncentracije po-

jedinih reagencija (početnice, DNA, enzim, deoksiribonukleotidi), najčešći su problemi koji se mogu pojaviti tijekom izvođenja eksperimenata. Također, potencijalni problemi mogu biti i kontaminacija početnica ili bilo koje reagencije ili neaktivnost enzima *Taq* polimeraze. Uzroci neuspješnosti eksperimenta ponekad se vrlo teško otkrivaju, a kod nekih izolata nikada. Osnovni cilj PCR reakcije jest umnožiti (amplificirati) ciljani gen ili regiju gena važnu za identifikaciju mikroorganizma. Najčešći cilj amplifikacije kod bakterija je 16S rRNA gen ili jedna od varijabilnih regija (VI-V9) 16S rRNA gena (Cardenas i Tiedje, 2008), za čiju se amplifikaciju koriste univerzalne ili rod specifične početnice (engl. primer). Kod kvasaca najčešći cilj umnožavanja je D1 regija 26S rRNA gena (Cocolin i sur., 2002.; Wang i sur., 2008). U slučajevima kada se radi s većim brojem izolata za određene izolate, da bi se dobio valjani rezultat ponekad je potrebno mijenjati ili uvjete PCR reakcije ili početnice, jer primijenjeni protokol nužno ne mora biti jednako učinkovit za sve izolate.

U daljnjim koracima pročišćuje se PCR produkt te se najčešće koristi enzimatska digestija umnoženog PCR produkta s kombinacijom enzima (2, 3 ili 4 enzima) koji su specifični za enzimatsku razgradnju umnoženog PCR produkta. Kombinacijom različitih restriksijskih enzima dobivaju se različiti profili specifični za točno određenu vrstu (Mancini i sur., 2012). Produkti dobiveni PCR reakcijom i enzimatskom digestijom razlikuju se brojem baznih parova i razdvajaju se elektroforezom u agaroznom ili poliakrilamidnom gelu kako bi se dobili specifični profili (Lushai i sur., 1999; Kuchta i sur., 2006; Copola i sur., 2008). Identifikaciju dobivenih profila moguće je provesti na 2 načina. Prvi je usporedba dobivenih profila s profilima referentnih sojeva bakterija mliječne kiseline, a drugi koji se može provesti neovisno o prvom, ali i kao nadopuna prvom, jest sekvenciranje 16S rRNA gena od izolata reprezentativnih profila (Copola i sur., 2008; Mancini i sur., 2012). Dobivene sekvence se uspoređuju s nekom od raspoloživih baza podataka dostupnih na internetu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Kod nekih vrsta točna identifikacija usporedbom dobivenih profila moguća je upotrebom samo jednog restriksijskog enzima, ali kod nekih vrsta, genetski vrlo bliskih, potrebno je primijeniti 3 ili 4 enzima za uspješnu identifikaciju izolata jer profili genetski vrlo bliskih mikrobnih vrsta, dobiveni primjenom jednog

ili 2 enzima, u nekim slučajevima mogu biti identični što onemogućava identifikaciju vrste.

Jedan od mogućih postupaka molekularne identifikacije izolata, neovisan o enzimatskoj digestiji i sekvenciranju 16S rRNA gena je korištenje vrsta-specifičnih početnica za dokazivanje prisutnosti točno određene vrste. Takva molekularna identifikacija ne koristi se često zbog toga što je u radu potrebno primijeniti mnogo vrsta - specifičnih početnica, odnosno onoliko koliko se vrsta očekuje. Međutim, ovaj pristup može biti konačna potvrda za identifikaciju vrsta ili podvrsta koje nije moguće sa 100 %-tnom sigurnošću identificirati drugim metodama, te se može primijeniti za konačnu potvrdu identifikacije (Temmerman i sur., 2004). Također, ako rezultat sekvenciranja 16S rRNA gena ne daje potpuno jasnu identifikaciju, već ostavlja mogućnost da se radi o 2 ili 3 genetski bliske vrste, konačnu potvrdu identifikacije moguće je provesti sa vrsta - specifičnim početnicama (Temmerman i sur., 2004) ili DNA-DNA hibridizacijom (Goris i sur., 2007).

### Metagenomska identifikacija

Kultiviranje mikrobne populacije omogućuje djelomičan uvid u strukturu mikrobne populacije kompleksnih zajednica zbog toga što mnoge vrste nisu kultivabilne ili je kultivacija i izolacija vrlo upitna (Giraffa i Neviani, 2001; Copola i sur., 2008; Leite i sur., 2012). Metagenomska identifikacija, bez kultiviranja i izolacije mikroorganizama, predstavlja širok spektar mogućnosti istraživanja strukture i dinamike mikrobne populacije bilo kojeg mikrobnog sustava (Huson i sur., 2009). Takvim molekularnim pristupom moguće je izolirati ukupnu mikrobnu DNA (ili RNA) iz kefiru ili kefirnog zrna, za što se koriste komercijalni kitovi raznih proizvođača, te PCR reakcijom umnožiti ciljanu regiju 16S rRNA gena kod bakterija ili 26S rRNA gena kod kvasaca (što su najčešći ali ne i jedini ciljevi umnožavanja), zbog dobivanja uvida u strukturu mikrobne zajednice (Ünsal, 2008; Zhou i sur., 2009; Cruz i sur., 2010; Gao i sur., 2013). U istraživanju mikrobne populacije kefiru identifikacijom bez kultivacije najčešće korištene metode su PCR-DGGE (denaturirajuća gradijent gel elektroforeza) i u zadnjih nekoliko godina pirosekvenciranje (Wang i sur., 2008; Ninane i sur., 2007; Chen i sur., 2008; Miguel i sur., 2010; Leite i sur., 2012). Također, korištena je i metoda kloniranja amplificirane DNA (izolirane

direktno iz kefirnog zrna) u *E. coli* te sekvenciranje VI i V2 regije 16S rRNA gena (Veronique i sur., 2007).

PCR-DGGE metodom, ukupnu izoliranu mikrobnu DNA umnoženu u PCR reakciji, detektira se na poliakrilamidnom gelu kao fragmente (iste veličine s obzirom na broj baznih parova, ali specifičnog nukleotidnog slijeda za svaku mikrobnu vrstu) koji migriraju u gelu do različitog položaja (Muyzer i Smalla, 1998). Identifikacija DNA fragmenata je moguća ili usporedbom položaja fragmenta s položajem fragmenta referentnog soja, ili sekvenciranjem fragmenata izreznanih s različitih položaja u gelu (Muyzer i Smalla, 1998; Copola i sur., 2008; Jianzhong i sur., 2009). Za usporedbu položaja fragmenata u gelu, gelovi se normaliziraju i analiziraju bioinformatičkim programima, a najčešće korišteni su BioNumerics i GelCompare.

Međutim, jedan od glavnih nedostataka istraživanja strukture kompleksnih mikrobni zajednica, jest da vrste koje su prisutne u malom broju najčešće neće biti amplificirane ili njihova DNA uopće neće biti izolirana (Ercolini, 2004). Novija metoda koja se primjenjuje tek u zadnjih nekoliko godina u istraživanju mikrobne populacije kefiru jest pirosekvenciranje (Dobson i sur., 2011; Leite i sur., 2012). Pirosekvenciranje je automatizirana i sofisticirana tehnika koja se bazira na sintezi jednolančane DNA i detekciji nukleotidnih sekvenci (Magra i sur., 2012). Glavna prednost te metode jest da omogućuje uvid u strukturu minorne mikrobne populacije prisutne u istraživanom mikrobnom sustavu (Quigley i sur., 2012).

### Mikrobne vrste kefirnih zrna

Različitim mikrobiološkim i molekularnim tehnikama identificirane su brojne mikrobne vrste iz kefirnog zrna i iz kefiru. Raznolikost identificiranih vrsta bakterija i kvasaca evidentno potvrđuje kompleksnu mikrobnu strukturu tog prirodnog mikrobnog sustava. Prema recentnim znanstvenim izvorima, mikrobnu populaciju kefirnog zrna čini više od 50 različitih vrsta mikroorganizama (tablica 1). Vrlo vjerojatno će se taj broj povećavati daljnjim razvojem metagenomske identifikacije, ali i usavršavanjem klasične kultivacije, jer niti jedan pristup nije savršen i ne može dati potpuni uvid u strukturu mikrobne populacije.

Tablica 1. Identificirane mikrobnne vrste kefirnog zrna

	Mikroorganizam	Referenca*
1	<i>Acetobacter fabarum</i>	Gao i sur., 2012
2	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	Unsal, 2008
3	<i>Acetobacter syzygii</i>	Unsal, 2008
4	<i>Acinetobacter</i>	Gao i sur., 2013
5	<i>Bifidobacterium spp</i>	Leite i sur., 2012
6	<i>Candida inconspicua</i>	Simova i sur., 2002
7	<i>Dysgonomonas</i>	Gao i sur., 2013
8	<i>Enterococcus faecium</i>	Unsal, 2008
9	<i>Geotrichum candidum</i>	Timara, 2010
10	<i>Gluconobacter japonicus</i>	Miguel i sur., 2012
11	<i>Halococcus spp.</i>	Leite i sur., 2012
12	<i>Kazachstania aerobia</i>	Magalhães i sur., 2011
13	<i>Kazachstania exigua</i>	Zhou i sur., 2009
14	<i>Kazachstania unispora</i>	Zhou i sur., 2009
15	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Zhou i sur., 2009
16	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Zhou i sur., 2009
17	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	Simova i sur., 2002
18	<i>Lachancea meyersii</i>	Magalhães i sur., 2011
19	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Leite i sur., 2012
20	<i>Lactobacillus brevis</i>	Simova i sur., 2002
21	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Leite i sur., 2012
22	<i>Lactobacillus casei</i>	Zhou i sur., 2009
23	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Magalhães i sur., 2011
24	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i>	Simova i sur., 2002
25	<i>Lactobacillus crispatus</i>	Leite i sur., 2012
26	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Simova i sur., 2002
27	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Unsal, 2008
28	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Unsal, 2008
29	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	Leite i sur., 2012
30	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	Leite i sur., 2012
31	<i>Lactobacillus kefiri</i>	Unsal, 2008
32	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Magalhães i sur., 2011
33	<i>Lactobacillus parakefiri</i>	Leite i sur., 2012
34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gao i sur., 2012
35	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	Miguel i sur., 2012
36	<i>Lactobacillus uvarum</i>	Miguel i sur., 2012
37	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Zhou i sur., 2009
38	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Unsal, 2008
39	<i>Leuconostoc lactis</i>	Gao i sur., 2012
40	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Unsal, 2008
41	<i>Pelomonas</i>	Gao i sur., 2013
42	<i>Pichia fermentans</i>	Wang i sur., 2008
43	<i>Pichia guilliermondii</i>	Gao i sur., 2012
44	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Gao i sur., 2012
45	<i>Pseudomonas putida</i>	Zhou i sur., 2009
46	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zhou i sur., 2009
47	<i>Saccharomyces martiniae</i>	Zhou i sur., 2009
48	<i>Saccharomyces turicensis</i>	Wang i sur., 2008
49	<i>Saccharomyces unisporus</i>	Zhou i sur., 2009
50	<i>Shewanella</i>	Gao i sur., 2013
51	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Simova i sur., 2002
52	<i>Weissella</i>	Gao i sur., 2013

\*Tablica daje pregled do sada identificiranih mikroorganizama kefirnog zrna, ne precizirajući da li je mikroorganizam po prvi puta identificiran u tom radu, i da li je identificiran samo u tom radu

Unsal (2008) je izolirao i identificirao PCR-DGGE metodom iz kefirnog zrna *Acetobacter syzygii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus kefir/parabuchneri* i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, dok je metagenomskim pristupom bez izolacije identificirao u kefiru: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus helveticus*, *Acetobacter lovaniensis*. U tom radu je podjednak broj mikroorganizama identificiran sa oba pristupa. Međutim, Zhou i sur. (2009) identificirali su PCR-DGGE metodom bez izolacije 10 bakterijskih vrsta u kefirnom zrnu: *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* te 7 vrsta kvasaca: *Kazachstania unispora*, *Kazachstania exigua*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces martiniae*, *Saccharomyces unisporus*. Tih 17 mikroorganizama je do sada vjerojatno najveći broj identificiranih mikroorganizama u jednoj studiji. Gao i sur. (2012) izolirali su i identificirali iz tibetskog kefira 11 vrsta mikroorganizama: *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Kazachstania unispora*, *Acetobacter fabarum*, *Pichia guilliermondii*. Simova i sur., (2002) izolirali su i identificirali iz kefirnog zrna *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida inconspicua*, *Candida maris*. Wang i sur., (2008) iz kefirnog su zrna izolirali i identificirali kvasce *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces turicensis*, *Pichia fermentans* i *Saccharomyces unisporus*. Jianzhong i sur. (2009) istražili su sastav mikrobne populacije tibetskog kefira PCR-DGGE metodom bez prethodne kultivacije mikroorganizama. Za PCR reakciju korištene su početnice 338F-GC i 518R za bakterijsku DNA, a cilj umnažanja je bila V3 regija 16S rRNA gena, a za DNA kvasaca su korištene početnice NL1GC i LS2. Na taj način identificirane su vrste bakterija: *Pseudomonas sp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefirano-*

*faciens*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, te kvasci: *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Kazachstania exigua* (Jianzhong i sur., 2009). Leite i sur., (2012) za istraživanje mikrobne populacije kefira iz Brazila umnožili su V3 regiju 16S rRNA gena, s univerzalnim početnicama F357-GC i R518. Specifične početnice su također korištene za identifikaciju bakterija mliječne kiseline: Lac1 i Lac2-GC za identifikaciju bakterija iz rodova *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Weissella*, te početnica Lac3 za bakterije iz rodova *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* i *Vagococcus*. D1 domena 26S rRNA gena kvasaca umnožena je pomoću početnica NLI-GC i LS2. Sve GC početnice sadržavale su 39 bp GC nukleotida, kako bi se spriječila potpuna denaturacija produkata (Leite i sur., 2012). Istraživanjem strukture mikrobne populacije brazilskog kefira pirosekvenciranjem i DGGE metodom, uspoređen je potencijal obje metode u metagenomskoj identifikaciji mikrobne populacije (Leite i sur., 2012). DGGE metodom je identificirano samo 5 vrsta mikroorganizama: *Lb. kefiranofaciens*, *Lactococcus lactis*, *Lb. kefir*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Kazachstania unispora*, a pirosekvenciranjem su utvrđene sve mikrobne vrste kao i DGGE metodom, ali i predstavnici rodova *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Halococcus*, te niz predstavnika laktobacila koji nisu identificirani DGGE metodom: *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lb. parakefir*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. buchneri*, te jedan predstavnik laktokoka *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Leite i sur., 2012). Potrebno je naglasiti da su neke od ovih vrsta bile zastupljene sa manje od 1 % u ukupnoj populaciji što naglašava potencijal pirosekvenciranja u istraživanju strukture kompleksnih i nepotpuno istraženih mikrobnih zajednica kao što je kefir (Leite i sur., 2012). Također, Gao i sur., (2013) u tibetanskim kefirnim zrnima po prvi put su identificirali bez kultivacije vrste iz rodova *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Pelomonas*, *Dysgonomonas*, *Weissella* i *Pseudomonas*. Upravo saznanja o mikrobnoj populaciji kefirnog zrna, za koju se do sada nije znalo da je sastavna komponenta mikrobne populacije kefirnog zrna, otvara nova pitanja o značaju i utjecaju te populacije na specifične karakteristike kefira. Navedeni rezultati istraživanja strukture mikrobne populacije



kefirnog zrna dokazuju da se brojnost identificiranih mikrobnih vrsta povećava primjenom novijih molekularnih metagenomskih metoda u identifikaciji i taj trend će se nastaviti. To također ukazuje na manji potencijal identifikacije bazirane na kultiviranju mikroorganizama na podlogama razvijenim prije 30-ak ili više godina, jer činjenica jest da razvoj novih hranjivih podloga nije bio intenzivan koliko je intenzivan razvoj metagenomske identifikacije (Huson i sur., 2009; Vieites i sur., 2010; Quigley i sur., 2011; Delmont i sur., 2011).

## Zaključak

Istraživanja autohtone mikrobne populacije kefirnih zrna primjenom suvremenih mikrobioloških i molekularnih metoda daju nova saznanja o kompleksnosti mikrobnog sustava kefirnog zrna, što je do sada rezultiralo s više od 50 identificiranih vrsta mikroorganizama. Izolacija mikroorganizama iz kefirnih zrna, zbog njihove daljnje tehnološke i probiotičke karakterizacije, potencijalno može rezultirati sojevima s potpuno novim karakteristikama. Daljnji razvoj metagenomike, bazirane na identifikaciji mikrobnih zajednica bez kultivacije, i nove spoznaje o mikrobnom sastavu kefiru potvrđuju da je do sada izolirana mikrobna kultura samo jedan dio kompleksnog mikrobnog sustava koji utječe na specifična svojstva kefiru. Međutim, klasična kultivacija i izolacija i dalje će ostati nezamjenjive za detaljnu karakterizaciju mikrobnih izolata i otkrivanje novih sojeva.

## *Microbiota of kefir grains*

### Summary

Kefir grains represent the unique microbial community consisting of bacteria, yeasts, and sometimes filamentous moulds creating complex symbiotic community. The complexity of their physical and microbial structures is the reason that the kefir grains are still not unequivocally elucidated. Microbiota of kefir grains has been studied by many microbiological and molecular approaches. The development of metagenomics, based on the identification without cultivation, is opening new possibilities for identification of previously non-isolated and non-identified microbial species from the kefir grains. Considering recent studies, there

are over 50 microbial species associated with kefir grains. The aim of this review is to summarise the microbiota composition of kefir grains. Moreover, because of technological and microbiological significance of the kefir grains, the paper provides an insight into the microbiological and molecular methods applied to study microbial biodiversity of kefir grains.

*Key words:* kefir, kefir grains, molecular methods, microbial species

## Literatura

1. Angulo, L., Lopez, E., Lema, C. (1993): Mikroflora present in kefir grains of the galician region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research* 60, 263-267.
2. Bartlett, J.M.S., Stirling, D. (2003): A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology* 226, 3-6.
3. Beshkova, D.M., Simova, E.D., Frengova, G.I., Simov, Z.I., Dimitrov, Zh.P. (2003): Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal* 13, 529-535.
4. Bottazzi, M.S., Bianchi, F. (1980): A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule. *Journal of Applied Bacteriology* 48, 265-268.
5. Caprette, D.R. (2005): Laboratory Studies in Applied Microbiology, Advanced Laboratory, Bioc-318. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/bios318/pure.htm>. Accessed 21.1.2013.
6. Cardenas, E., Tiedje, J.M. (2008): New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 544-549.
7. Chen, H.C., Wang, S.Y., Chen, M.J. (2008): Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 25, 492-501.
8. Chen, T., Wang, S., Chen, K., Liu, J., Chen, M. (2009): Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Science* 92, 3002-3013.
9. Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. (2002): An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast population in raw milk. *International Dairy Journal* 12, 407-411.
10. Copola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D. (2008): Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. *Dairy Products*, 31-90.
11. Codex Alimentarius (2003): Codex Standard for Fermented Milks (Codex stand 243-2003) CCNEA document (CA/NEA 13/7/6).

12. Cruz, M.G., Pedrozo, M., Gomes-Cardoso, P., Assis Lago, L., Freitas-Schwan, R. (2010): Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International* 43, 1523-1528.
13. Delmont, T.O., Malandain, C., Prestat, E., Larose, C. (2011): Perspective - Metagenomics mining for microbiologist. *The ISME Journal*, 1-7.
14. Dimitreli, G., Antoniou, K.D. (2011): Effect of incubation temperature and caseinates on the rheological behaviour of Kefir. *Proceedia Food Science* 1, 583-588.
15. 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 Microbiology Letters* 320, 56-62.
16. Ercolini, D. (2004): PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56, 297-314.
17. FAO/WHO (2001): CODEX Standard for Fermented milks, [http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp).
18. Farnworth, E.R. (2005): Kefir - a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* 2, 1-17.
19. Ferreira, I.M., Pinho, O., Monteiro, D., Faria, S., Cruz, S., Perreira, A., Roque, A.C., Tavares, P. (2010): Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. *Journal of Dairy Science* 93, 27-31.
20. Gao, J., Gu, F., Abdealla, N.H., Ruan, H., He, J. (2012): Investigation on Culturable microflora in Tibetan Kefir Grains from Different Areas of China. *Journal of Food Science* 77 (8), 425-433.
21. Gao, J., Gu, F., He, J., Xiao, J., Chen Q., Ruan, H., He, G. (2013): Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir. *European Food Research and Technology* (doi: 10.1007/s00217-013-1912-2).
22. García-Fontán, M.C., Martínez, I., Carballo, J. (2006): Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal* 16, 762-767.
23. Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L. (2001): Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research* 68, 639-652.
24. Gaware, V., Kotade, R., Dolas, K. (2011): The magic of kefir: a Review History of Kefir. *Pharmacologyonline* 1, 376-386.
25. Giraffa, G., Neviani, E. (2001): DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 67, 19-34.
26. Goris, J., Konstantinidis, K.Z., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M. (2007): DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (1), 81-91.
27. Gultiz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M., Vogel, R.F. (2011): The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology* 151, 284-288.
28. Hertzler, S.R., Clancy, S.M. (2003): Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose malabsorption. *Journal of the American Dietetic Association* 103, 582-587.
29. Hong, W.S., Chen, Y.P., Chen, M.J. (2010): The anti-allergic effect of kefir lactobacilli. *Journal of Food Science* 75, 244-253.
30. Huson, D.H., Richter, D.C., Mitra, S., Auch, A.F., Schuster, S.C. (2009): Methods for comparative metagenomics. *BMC Bioinformatics* 10 (Suppl 1):S12 (doi:10.1186/1471-2105-10-S1-S12).
31. Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., Ibanez, F.C. (2005): Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry* 90, 613-620.
32. Jianzhong, Z., Xiaolia, L., Hanhub, J., Mingsheng, D. (2009): Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* 26, 770-775.
33. Jukić, M., Gregurek, Lj., Tratnik, Lj. (2001): Istraživanje mikroflora radne kulture proizvedene od kefirnih zrnaca različitog podrijetla. *Mljekarstvo* 51 (2), 135-149.
34. Juste, A., Thomma, B.P.H.J., Lievens, B. (2008): Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* 25, 745-761.
35. Kander, O., Kunath, P. (1983): *Lactobacillus kefir* sp.nov, a component of the microflora of Kefir. *Systematic and Applied Microbiology* 4, 286-294.
36. Koroleva, N.S. (1988): Technology of kefir and kumys. *IDF Bulletin* 227, 96-100.
37. Kosikowski, F.V., Mistry, V.V. (1999): Fermented Milks/ Kefir. Cheese and Fermented Milks, Vol. 1. Origin and principles. Third Edition, Second Printing, F.V. Kosikowski, L.L.C. SAD, 61-64.
38. Kuchta, T., Drahovská, H., Pangallo, D., Siekel, P. (2006): Application of Polymerase Chain Reaction to Food Analysis, VUP Food Research Institute, Bratislava, Slovakia.
39. Kurman, J.A., Rašić, J.Lj., Kroger, M. (1992): Encyclopedia of Fermented Fresh Milk Products, An APV Book, New York.
40. La Rivière, J.W., Kooiman, P., Schmidt, K. (1967): Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grains by *Lactobacillus brevis*. *Archiv für Mikrobiologie* 59, 269-278.
41. Leite, B., Mayo, C.T.C.C., Rachid, R.S., Peixoto, J.T., Silva, V.M.F., Paschoalin Delgado, S. (2012): Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology* 31, 215-221.
42. Libudzisz, Z., Piatkiewicz, A. (1990): Kefir production in Poland. *Dairy Industries International* 55, 31-32.
43. Lin, T.Y., Chien, C.M.F. (2007): Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry* 24, 631-637.

44. Lin, C., Chen, H., Lin, J. (1999): Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeast isolated from kefir grains in Taiwan. *Australian Journal of Dairy Technology* 54, 14-18.
45. Liu, J.-R., Chen, M.-J., Lin, C.-W. (2005): Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2467-2474.
46. Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elgueabal, N., Garaizar, J. (2006): Kefir: A symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología* 23, 67-74.
47. Lushai, G., Anderson, K.P. (1999): Techniques in Molecular Ecology: A Researchers Guide.
48. Magalhães, K.T., Dragone, G., de Melo Pereira, G.V., Oliveira, J.M., Domingues, L., Teixeira, J., Almeida e Silva, J.B., Schwan, R.F. (2011): *Food Chemistry* 126, 249-253.
49. Magra, T.I., Antoniou, K.D., Psomas, E.I. (2012): Effect of Milk Fat, Kefir Grain Inoculum and Storage Time on the Flow Properties and Microbiological Characteristics of Kefir. *Journal of Texture Studies* 4, 299-308.
50. Mancini, A., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E., Gatti, M. (2012): Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA<sup>Ala</sup>-23S rDNA RFLP. *Journal of Microbiological Methods* 91, 380-390.
51. Marshall, V.M., Cole, W.M., Brooker, B.E. (1984): Observation on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *Journal of Applied Bacteriology* 57, 491-497.
52. Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., Crescenzi, V. (1999): Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 69-74.
53. Miguel, M.G.C.P., Cardoso, P.G., Lago, L.A., Schwan, R.F., 2010. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International* 42, 1523-1528.
54. Muir, D.D., Tamime, A.Y., Wszolek, M. (1999): Comparison of the sensory profiles of kefir, buttermilk and yogurt. *International Journal of Dairy Technology* 52, 129-135.
55. Muyzer, G., Smalla, K. (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 27-141.
56. Ndoye, B., Rasolof, E.A., LaPointe, G., Roy, D. (2011): A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science and Technology* 91, 495-524.
57. Neviani, E., De Dea Lindner, J., Bernini, V., Gatti, M. (2009): Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium. *Food Microbiology* 26, 240-245.
58. Ninane, V., Mukandayambaje, R., Berben, G. (2007): Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing of 16S rDNA variable regions. *Journal of AOAC International* 90, 1111-1117.
59. Otlés, S., Cagindi, O. (2003): Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition* 2, 54-59.
60. Powel, E.J. (2006): Bacteriocins and bacteriocin producers present in kefir and kefir grains. Master thesis, Faculty of Agrisciences, Stellenbosch University.
61. Purnomo, H., Muslimin, L.D. (2012): Chemical characteristics of pasteurised goat milk and goat milk kefir prepared using different amount of Indonesian kefir grains and incubation times. *International Food Research Journal* 19, 791-794.
62. Rattray, F.P., O'Connell, M.J. (2011): Kefir. *Encyclopedia of Dairy Science*, Elsevier, Ltd. 518-524.
63. Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2011): Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150, 81-94.
64. Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T., Ross, P., Fitzgerald, G., Cotter, D. (2012): High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (16), 5717-5723.
65. Saloff-Coste, C.J. (1996): Kefir. Nutritional and health benefits of yoghurt and fermented milks. *Danone World Newsletter* 11, 1-7.
66. Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J.M., Marquina, D. (2003): The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. *Systematic and applied Microbiology* 26, 434-437.
67. Sarkar, S. (2008): Biotechnological innovations in kefir production: a review. *British Food Journal* 110, 283-295.
68. 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. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, 1-6.
69. Simova, E., Simov, Z., Beshkova, D., Frengova, G., Dimitrov, Z., Spasov, Z. (2006): Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them. *International Journal of Food Microbiology* 107, 112-123.
70. Stepaniak, L., Fetliński, A. (2003): Kefir, *Encyclopedia of Dairy Science*, Ed. Roginski, H., Fuqua, J.W., Fox, P.F. Academic Press, London, 1049-1054.
71. Stefan, R.J., Atlas, R.M. (1988): DNA Amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental-samples. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 9, 2185-2191.
72. Tamime, A.Y., Marshall, V.M.E. (1997): Microbiology and technology of fermented milks. U *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Ed. Law, B.A. 2nd, Blackie Academic and Professional, London, 57-152.
73. Temmerman, R., Huys, G., Swings, J. (2004): Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology* 15, 348-359.

74. Timara, A.V. (2010): Comparative study of kefir lactic microflora Anale le Universită Ńii din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, *Zootehnie si Tehnologii de Industrie Alimentară*, 2010.
75. Unsal, B. (2008): Phylogenetic analysis of bacterial communities in kefir by metagenomics. Master thesis. Graduate School of Engineering and Sciences. İzmir Institute of Technology.
76. Vartoukian, S., Palmer, R., Wade, W.G. (2009): Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 309, 1-7.
77. Veronique, N., Radegonde, M., Berben, G. (2007): Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions. *Journal of AOAC International* 90 (4), 1111-1117.
78. Vieites, J.M., Guazzatoni, M.E., Beloqui, A., Golyshin, P.N., Ferrer, M. (2010): Molecular Methods to Study Complex Microbial Communities. U Knjizi: Wolfgang R. Streit and Rolf Daniels (eds), *Metagenomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. DOI 10.1007/978-1-60761-823-2\_1. Springer Science+Business Media, LLC 2010.
79. Wang, S.Y., Chen, H.C., Liu, J.R., Lin, Y.C., Chen, M.J. (2008): Identification of Yeasts and Evaluation of their Distribution in Taiwanese Kefir and Viili Starters. *Journal of Dairy Science* 91, 3798-3805.
80. Wang, S.Y., Chen, K.N., Lo, Y.M., Chiang, M.L., Chen, H.C., Liu, J.R., Chen, M.J. (2012): Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology* 32, 1-12.
81. Withuhn, R.C., Schoeman, T., Cilliers, A., Britz, T.J. (2005): Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of Kefir grains. *Food Microbiology* 22, 337-344.
82. Wszolek, M., Kupiec-Teahan, B., Skov Guldager, H., Tamime, A.Y. (2006): Production of Kefir, Koumiss and Other related Products. U knjizi: *Fermented Milks*, edited by A.Y. Tamime, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 174-216.
83. Zhou, J., Liu, X., Huang, K., Dong, M., Jing, H. (2007): Application of the Mixture Design to Design Formulation of Pure Cultures in Tibetan Kefir. *Agricultural Sciences in China* 11, 1383-1389.
84. Zhou, J., Xiaoli, L., Hanhu, J., Mingsheng, D. (2009): Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* 26, 770-775.