



SU KEFİRİ: Kimyasal Bileşimi ve Sağlık Üzerindeki Etkileri^A

Nurcan DEĞİRMENCİOĞLU*

ÖZ: Su kefiri, su kefiri tanelerinin su, şeker, kuru meyveler, limon vb. katkıları ilavesiyle oda sıcaklığında, 2-4 gün süreyle, anaerobik koşullarda fermantasyonuyla üretilmektedir. Meyvemsi, hafif asidik-hafif tatlı ve hafif alkol tadı ve aromasına sahip gazlı bir içecektir. Standart bir üretim yöntemi olmayan su kefirinin, üretiminde kullanılacak hammaddeler ve fermantasyon koşullarına bağlı olarak mevcut mikroflorası değişkenlik gösterebilmektedir. Bu derlemede, su kefiri tanelerinin fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilirliği ve sağlık üzerindeki etkilerinin açıklanması amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Fonksiyonel gıda, probiyotik, su kefiri.

WATER KEFİR: Chemical Composition and Effects on Health

Abstract: Water kefir is produced from water kefir grains, with the addition of additives water, sugar, dried fruits, lemon, etc., by the fermentation in anaerobic conditions for 2-4 days at room temperature. It is a fruity, slightly acidic-slightly sweet and carbonated beverage with a slight alcohol taste and aroma. Microflora of water kefir, which does not have a standard production method, may vary depending on the raw materials and fermentation conditions that can be used in its production. In this review, it is aimed to explain the usability of water kefir grains in functional food production and their effects on health.

Keywords: Functional food, probiotic, water kefir.

^A Yapılan bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir.

* **Sorumlu yazar/Corresponding Author:** Nurcan DEĞİRMENCİOĞLU, Bandırma Onyediy Eylül Üniversitesi, Bandırma Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Bandırma-Balıkesir, Türkiye, ndegirmencioğlu@bandirma.edu.tr, [OrcID 0000-0002-1186-3106](https://orcid.org/0000-0002-1186-3106)

Giriş

Dünya genelinde uzun zamandır kullanılıyor olmasına rağmen gerçek orjini hakkındaki ilk bilgiler 1889 yılında Beijerinck tarafından yayınlanan su kefirini, 1855 yılında Kırım'dan batı Avrupa'ya dönen İngiliz askerlerinin beraberlerinde ülkelerine getirdikleri bildirilmektedir (Marsh ve ark., 2013; Fiorda ve ark., 2017), Diğer bir teoriye göre ise Meksika kökenli *Opuntia* cinsi kaktüslerin tatlı yaprak öz sularından elde edilen polisakkaritlerin bakteri ve mayalar ile kümeleşerek oluşturdukları jel-kristal yapıdaki taneciklere verilen bir addır (Laureys ve De Vuyst, 2014).

Avrupa'da "su kefir" olarak adlandırılan ürün, elde edildiği yöreye göre "Tepache de Tibicos", "Tibi" -Tibi taneleri, "California bees"- Kaliforniya arıları, "African bees"-Afrika arıları, "Ale nuts"-Ale yemişleri, "Balm of Gilead"- pelesenk ağacı, "Bébées", "Japanese beer seeds"-Japon bira tohumları gibi farklı adlar alabilmektedir (Miguel ve ark., 2011; Laureys ve De Vuyst, 2014; Fiorda ve ark., 2017).

Gri-beyaz renkte, yarı saydam belirgin bir şekli olmayan su kefir taneleri (Şekil 1), su, şeker (sakkaroz, melas), taze veya kuru meyveler (incir, kayısı, üzüm vb.) ve isteğe göre değişen katkıların (limon vb.) ilavesiyle oda sıcaklığında ve anaerobik şartlarda 2-4 gün süreyle fermantasyona bırakılmakta, süre sonunda geçirgen bir malzeme (elek) yardımıyla, taneler ve sıvı kısım birbirinden ayrılmaktadır. Ayrılan taneler bir sonraki fermantasyonda kullanılırken, sıvı kısım ise doğrudan veya buzdolabında bekletildikten sonra tüketilebilmektedir (Fiorda ve ark., 2017; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a). Yapılan çalışmalarda, şeker (%6-10) ve su kefir taneleri (%6-31) kullanılarak hazırlanan karışımın 20-25 °C'de 24-72 saat süreyle fermente edilebileceği (Gulitz ve ark., 2011; 2013; Marsh ve ark., 2013; Laureys and De Vuyst, 2014, 2017a; Laureys ve ark., 2018; Verce ve ark., 2019) bildirilmekte, ancak su kefir üretimi çoğunlukla ev düzeyinde gerçekleştirildiğinden fermantasyon koşulları değişkenlik gösterebilmektedir.



Resim 1. Su kefir tanesi (Yazar tarafından çekilmiş fotoğraftır).

Fermantasyonda Etkili Mikroorganizmalar

Yapı olarak, süt kefir tanelerine benzeyen su kefir taneleri, maya ve bakteriler tarafından oluşturulan polisakkarit matriksi içinde tutulan simbiyotik bir konsorsiyumdur (Gulitz ve ark., 2011, 2013; Marsh ve ark., 2013; Laureys ve De Vuyst, 2014; Martínez-Torres ve ark., 2017; De Roos ve De Vuyst, 2018). Konsorsiyumdaki mikroorganizmalar, süt kefir ve kombu çayında fermantasyonu gerçekleştiren SCOBY

mikroflorasından farklılık göstermektedir (Fiorda ve ark., 2017; Değirmencioğlu ve ark., 2019). İlk kez 1892 yılında Dr.Ward tarafından su kefirinin mikrobiyal florası belirlenmiş olup, su kefirinin sıvı kısmı ve taneleri üzerinde yapılan çalışmalarda, laktik asit bakterileri (LAB), mayalar, fermantasyon süresinin uzaması veya fermantasyon sırasında ortamda oksijen bulunması durumuna bağlı olarak asetik asit bakterileri (AAB) ile diğer bazı mikroorganizmaların (Tablo 1) olduğu tespit edilmiştir (Pidoux, 1989; Magalhães ve ark., 2010; Oliveira ve ark., 2010; Waldherr ve ark., 2010; Gulitz ve ark., 2011; 2013; Miguel ve ark., 2011; Hsieh ve ark., 2012; Marsh ve ark., 2013; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; Li ve ark., 2016; Prado ve ark., 2015; Sarikkha ve ark., 2015, Zanirati ve ark., 2015; Laureys ve ark., 2016, 2018; Tang ve ark., 2016; Martínez-Torres ve ark., 2017; Verce ve ark., 2019). Fermantasyon koşullarının, mikroorganizmalar arasındaki dağılımı ve türler arasındaki çeşitliliği nasıl etki ettiği belirsizlik taşıdığından, son yıllarda moleküler teknikler kullanılarak su kefir fermantasyonu ve mikrobiyolojisiyle maya ve bakterilerin dağılımı üzerindeki sistematik çalışmalar halen devam etmektedir (Magalhães ve ark., 2010; Waldherr ve ark., 2010; Gulitz ve ark. 2011, 2013; Miguel ve ark. 2011; Hsieh ve ark. 2012; Marsh ve ark. 2013; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2016; 2017b; Fiorda ve ark., 2017).

Tablo 1. Su kefir florasında belirlenmiş mikroorganizmalar

Lactobacillus		Candida	
<i>L.harbinensis</i>	<i>L.satsumensis</i>	<i>C.californica</i>	<i>C.famata</i>
<i>L.hilgardii</i>	<i>L.sunkii</i>	<i>C.valida</i>	<i>C.kefyr</i>
<i>L.diolorans</i>	<i>L. hordei</i>	<i>C.lambica</i>	<i>C.inconspicua</i>
<i>L.nagelii</i>	<i>L.mali</i>	<i>C.colliculosa</i>	<i>Candidatus Oenococcus aquikefiri</i>
<i>L.ghanensis</i>	<i>L.brevis</i>	<i>C.magnoliae</i>	<i>C.valdiviana</i>
<i>L.casei subsp.casei,</i>	<i>L.kefiri</i>	<i>C.ethanolica</i>	
<i>L.paracasei</i>	<i>L.collinoides</i>		
<i>L.buchneri</i>	<i>L.kefirnofaciens</i>		
<i>L.parabuchneri</i>	<i>L.kefirgranum</i>		
<i>L.lactis subsp.cremoris,</i>	<i>L.parakefir</i>		
<i>L.plantarum</i>	<i>L.helveticus</i>		
<i>L.fructivorans</i>	<i>L.casei subsp.rhamnosus</i>		
Lactococcus		Saccharomyces	
<i>Lac.lactis</i>	<i>Lac.cremoris</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.florentinus</i> <i>S.pretoriensis</i>
		<i>S.bayanus</i>	
		<i>S.turicensis</i>	
Leuconostoc		Kluyveromyces	
<i>Leu.citreum</i>	<i>Leu.mesenteroides</i> spp.	<i>K.lactis</i>	<i>K.marxianus</i>
<i>Leu.mesenteroides</i>	<i>dextranicum</i>		
Acetobacter		Pichia	
<i>A.lovaniensis</i>	<i>A.okinawensis</i>	<i>P.membranifaciens</i>	<i>P.kudriavzevii</i>
<i>A.aceti</i>	<i>A.orientalis</i>	<i>P.cecembensis</i>	<i>P.caribbica</i>
<i>A.tropicalis</i>	<i>A.fabarum</i>	<i>P.occidentalis</i>	
<i>A.sicerae</i>			
Gluconobacter		Hanseniaspora	
<i>G.fraturei</i>	<i>G.liquefaciens</i>	<i>H.valbyensis</i>	<i>H.vinae</i>
<i>G.japonicus</i>			
Bifidobacterium		Zygosaccharomyces	
<i>B.psychraerophilum</i>	<i>B.aquikefiri</i> sp.nov.	<i>Z.fermentati</i>	
	<i>B.crudilactis</i>		
Pseudoarthrobacter		Diğer	
<i>Pseu.chlorophenolicus</i>	<i>Pseu.tropicalis,</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Enterobacter hormachei,</i>
<i>Pseu.orientalis</i>	<i>Pseu.okinawensis</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>
		<i>Torulaspota pretoriensis</i>	<i>Lanchancea fermentati</i>
		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Lanchancea meyersii</i>
		<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
		<i>Kazachstania aerobia</i>	<i>Galactomyces geotrichum</i>
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	

Konakçı sağlığı üzerinde pozitif sağlık etkisi elde edebilmek amacıyla, fermente gıdalarda bulunması önerilen canlı hücre sayısı 10^6 - 10^8 kob/mL olarak belirtilmekte, canlı hücre sayısı üzerinde etkili olan faktörlerin, fermantasyon sıcaklığı (25-32 °C), fermente edilebilir şeker çeşitliliği ve miktarıyla, yüksek miktarda azot kaynaklarının varlığı olduğu bildirilmektedir. Su keferi üretiminde kullanılan kuru meyveler, hem mikroorganizmaların bu ihtiyaçlarını karşılayabilmekte hem de fermantasyon bitiminde su keferini tüketecek insanlar için de önemli düzeyde vitamin, mineral, diyet lif ve antioksidan kaynağı teşkil etmektedir. Su keferi florasında bulunan mikroorganizmalar için benzer gelişme koşulları gerektiğinden, mikroorganizmalar arasındaki karşılıklı pozitif etkileşim hücre canlılığını stimüle etmektedir (Patel ve ark., 2017; Koh ve ark., 2018). Neve ve Heller (2002) ve Stadie ve ark. (2013) tarafından, su keferi fermantasyonunda mayalardan *Zygosaccharomyces florentinus* (*S.florentinus*) ve *S.cerevisiae* ile bakterilerden *L.hordei*, *L.hilgardii* ve *L.nagelii* arasında simbiyotik bir ilişki olduğu, fermantasyonun başlangıcında sakkarozun glukoz ve fruktoza parçalanması ve metabolize edilmesiyle ilişkili CO₂, pürivik asit, çeşitli organik asitler (propiyonik, asetik, suksinik asit b.), amino asit ve Vit B₆ gibi yan ürünler laktobasillerin gelişimini teşvik ederken, LAB'nin de ortamı asitlendirerek *Z.florentina*'nın gelişimini desteklediği bildirilmiştir. Schneedorf (2012), su keferi tanelerinde LAB:maya oranının 1:2 olduğunu, 4 °C'den daha düşük sıcaklıklar ile % 5'den daha yüksek KCl koşullarında dahi su keferi tanelerinin gelişebildiğini bildirmiştir.

Yapılan çalışmalarda, su keferi tanelerindeki bakteri sayısının 10^6 - 10^8 kob/g, maya sayısının ise 10^6 - 10^8 kob/g arasında (Pidoux, 1989; Gulitz ve ark., 2011; Magalhães ve ark., 2010, 2011; Marsh ve ark., 2013) değiştiği bildirilmektedir. Su keferi pH'sının 3.5'in altında olması nedeniyle enterokok ve *Enterobacteriaceae* gelişiminin görülmediği (Laureys ve De Vuyst, 2014) ifade edilmekte, kalite, güvenlik ve fonksiyonellik açısından ise Uluslararası Gıda Standartları (Codex Alimentarius) tarafından önerilen minimum 10^7 kob/mL canlı bakteri ve 10^4 kob/mL canlı maya sayılarına dikkat çekilmektedir (FAO/WHO, 2011; Koh ve ark., 2018). Laureys ve De Vuyst (2014) ise, su keferi tanelerinde mikroorganizma yoğunluğunun sıvı kısmındakine oranla daha fazla olduğunu, mayaların fermantasyon yan ürünlerini oluşturma sürecinde daha etkin rol oynadığını, LAB'nin sayılarının ise mayalara göre daha yüksek oranda bulunduğunu belirtmişlerdir.

Probiyotik mikroorganizmaların aktivitesi veya varlığıyla doğrudan ilişkili "probiyoaktif" kelimesi ilk kez 2010 yılında tanımlanmıştır. Bu bileşikler probiyotik mikroorganizmalar tarafından ya bazı maddelerden sentezlenebilmekte (bakteriyosin, EPS veya enzimler gibi) ya da gıda matriksindeki modifikasyonlar sonucunda (süt kazeininin hidroliziyle oluşan peptidler gibi) oluşabilmektedirler (Champagne ve ark., 2018). Konsorsiyumda bulunan bakteri veya mayalar, sakkarozu fermente ederek su keferi tanelerinin gelişmesi için gerekli, fonksiyonel özellikteki polimer bileşikler, yani eksopolisakkaritleri (EPS) üretmekte, ayrıca son ürünün aroma ve tekstürü üzerinde etkili olan çeşitli fermantasyon ürünlerini (laktik asit, asetik asit, etil alkol, CO₂, aroma maddeleri vb.) de meydana getirmektedirler (Gulitz ve ark. 2011; 2013; Miguel ve ark. 2011; Hsieh ve ark. 2012; Marsh ve ark. 2013; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017b; Champagne ve ark., 2018; Koh ve ark., 2018).

Laktik Asit Bakterileri

Su kefiri tanelerinin hızlı ve yeterli biçimde gelişebilmesi, konsorsiyumda bulunan *L.hilgardii*'nin, sakkarozdan eksopolisakkarit (EPS) oluşturma yeteneğine bağlıdır. *L.hilgardii* zorunlu heterofermentatif bir LAB'dir ve şarap, kakao gibi gıda maddelerinin fermantasyonunda da önemli rol oynamaktadır (Marsh ve ark., 2013; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017b). Ancak tüm *L.hilgardii* türleri EPS üretmediğinden tanelerde görülen hızlı büyümede, Laureys ve De Vuyst (2014; 2017a)'a göre *L.paracasei* ve *L.nagelii*'nin, Gulitz ve ark. (2011) ile Xu ve ark. (2018; 2019)'na göre *L.nagelii* ve *L.hordei*'nin, Côté ve ark. (2013) ile Waldherr ve ark. (2010)'na göre ise *L.satsumensis*'in de EPS üretebilme yeteneği açısından ön plana çıktığı, ayrıca *L.casei*, *L.brevis* ve *Leuconostoc*'ların da bu mikroorganizmalarla rekabet edebileceği belirtilmektedir (Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; 2017b). *L.hordei*'nin aynı zamanda amino asit biyosentezi ve dönüşümüne katkıda bulunduğu, *S.cerevisiae*'nin da kümeleşme ve biyofilm oluşumunu desteklediği bildirilmektedir (Xu ve ark., 2018; 2019).

Su kefiri florasında bulunan ve fakültatif heterofermentatif bir bakteri olan *L.harbinensis*, ilk kez fermente Çin sebzelerinden izole edilmiştir. Daha sonraları ise Fransız süt ineklerinden, sağlıklı bireylerin ağız florasından Parmigiano Reggiano peynirlerinden izole edilmiş, darıdan yapılan ekşi hamur fermantasyonunda rol oynadığı belirlenmiştir. Bu mikroorganizmanın en önemli özelliği antifungal bileşikler üreterek mayaları inhibe edebiliyor olmasıdır. Probiyotik karakterde ve fakültatif heterofermentatif bir diğer bakteri ise *L.casei*'dir. Sağlıklı insanların ağız florası, insan bağırsak sistemiyle çiğ ve fermente süt ve sebze ürünlerinde de bulunmakta, araştırmacılara göre su kefiri eko sistemi, ticari *L.casei* suşları için potansiyel kaynak teşkil etmektedir (Laureys ve De Vuyst, 2014).

Su kefiri mikroflorasında bulunan *Bifidobakter*ler ise, zorunlu anaerobik bakteriler olup, laktik aside nazaran daha çok asetik asit üretmektedir. Fermantasyondaki önemleri henüz açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte kültüre edilmesi zor olan bu türlerin, su kefirinden izole edilebilmeleri önem taşımaktadır (Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; 2017b). "Bifidus hattı" denilen yolla ve bu yol için anahtar enzim olan fruktoz 6-fosfat fosfoketolaz ile monosakkaritleri metabolize edebilen, oligosakkaritleri kullanarak oluşturduğu asit ve bakteriyosinlerle patojenleri inhibe edebilen (Stadie ve ark., 2013), barsaklarda K ve B grubu vitaminleri sentezleyebilen, sindirim sistemindeki karsinojenik ve putrefaktif bileşiklerin seviyesini de azaltabilen Bifidobakter'ler, su kefirinin fonksiyonel özelliğini arttıran mikroorganizmalardır (Laureys ve De Vuyst, 2014; Laureys ve ark., 2016; Fiorda ve ark., 2017). Ayrıca, soğukta gelişebilen (4 °C'ye kadar) ve aerobik koşulları seven *B.psychraerophilum* da, su kefiri tanelerinin dış kısımlarında izole edilmiş nadir *Bifidobacterium* türlerinden birisidir (Gulitz ve ark., 2013).

Mayalar

Su kefirinde belirlenmiş dominant maya *S.cerevisiae*'dir. Sakkarozun invertaz enzimiyle glukoz ve fruktoza parçalanması fermantasyonun başlangıcında laktobasillerin gelişimini ve laktik asit üretimini teşvik etmekte,

mayalar ise su kefirinin duyuşsal özelliklerine katkıda bulunarak, maya aromasının hissedilmesini, ferahlatıcı ve keskin tadın oluşumunu desteklemektedir (Magalhães ve ark., 2010). Ortalama % 9 şeker ve düşük amino asit içeriğinden dolayı mikroorganizmalar için zor bir besin ortamı olan su kefirinde, gıda bozulmalarına sebep olabilen ve su kefirinin yüksek şeker konsantrasyonlarında (ozmotolerant) gelişebilen *Zygosaccharomyces* cinsleriyle (Stadie, 2013; Xu, 2019), Belçika ale biralarının fermantasyonunda rol oynayan ve çoğunlukla bira ve şaraplarda bozulmaya yol açan *Zygorulaspora florentina* ve *D.bruxellensis*'e de rastlanılmaktadır (Marsh ve ark., 2013; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; 2017b).

Zygosaccharomyces florentinus ile birlikte *L.hilgardii* arasındaki pozitif etkileşime bağlı olarak bakteri canlılığında ve laktik asit üretiminde artış, maya miktarında önemli ölçüde azalma meydana gelmekte, mayanın oluşturduğu CO₂, pürivat, propiyonat, asetat ve süksinat gibi metabolitler bu süreçte *L.hilgardii*'nin gelişimini desteklemektedir (Leroi ve Pidoux, 1993; 1996; Stadie ve ark., 2013; Martínez-Torres ve ark., 2017). Stadie ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *Z.florentina*'nın *L.nagelii* ve *L.hordei* ile birlikte hücre miktarını arttırmak için karşılıklı işbirliği yapabildikleri tespit edilmiştir.

Marsh ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, *Zymomonas* cinsi mayaların su kefirinde dominant olduğu, Hsieh ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada ise, bu mayaların su kefirinin mikrobiyal populasyonunda yer aldığı, ama yüksek düzeylerde olmadığı belirlenmiştir. Adı geçen mayaların Amerika, Afrika ve Asya'nın tropikal bölgelerindeki bitkilerden elde edilen fermente içeceklerde önemli düzeylerde bulunduğu da ifade edilmiştir. *Saccharomyces*'ler gibi fermantasyon yeteneği olan *Zymomonas*'lar yüksek miktarlarda etanol oluşturabilmekte (Marsh ve ark., 2013), bunun yanı sıra oluşturduğu sorbitol ile de su kefirinin kıvamı, aroması üzerine de olumlu katkı sağlamaktadır (Panesar ve ark., 2006; Marsh ve ark., 2013). Antitümör, immunstimüle edici, prebiyotik ve lipit metabolizması üzerinde olumlu etkileri bulunan ve koyulaştırıcı özellikte bir polisakarit olan levan, *Zymomonas*'ların oluşturduğu önemli bir metabolitlerden birisidir (Marsh ve ark., 2013). *Hanseniaspora*, *Pichia* ve *Lachancea* gibi yüksek fermantasyon yeteneğine sahip maya cinsleri ise, fermantasyonun başlangıcında, *S.cerevisiae* ortama hakim olmadan önce görülebilmektedir (Fiorda ve ark., 2017).

Asetik Asit Bakterileri

Oksijen varlığı, su kefiri fermantasyonunda AAB'nin gelişimini teşvik eden en önemli gelişme faktörüdür. Ancak fermantasyonun başlangıcındaki yetersiz oksijen, AAB'nin enerji kaynağı olarak kullandıkları etil alkolün fermantasyon son aşamalarında meydana gelmesi gibi durumlar, AAB sayısında artışın sadece su kefiri tanelerinin canlandırılması ve yıkanması aşamalarında görülmesine sebep olmaktadır (Guiltz ve ark., 2013). Laureys ve ark. (2018), su kefirinde *A.fabarum* gibi yüksek oksijen içeren ortamlarda gelişebilen AAB'nin yanı sıra anaerobik koşullarda gelişebilen *A.indonesiensis*'in de izole edildiğini bildirmişlerdir. Yüksek asetik asit oluşumuyla sonuçlanan aerobik fermantasyonlar, su kefiri tanelerinin gelişiminde yavaşlamaya sebep olabilmekte, bu tür fermantasyonlar AAB'nin kullanabileceğinden daha az düzeyde etanol, laktik asit ve

meyvemsi ester bileşikleriyle daha yüksek oranda etil asetat oluşumuna sebep olmaktadır (Moens ve ark., 2014; Laureys ve De Vuyst, 2017b; 2018). Bunun yanı sıra aerobik şartlar ve AAB'nin oluşturduğu yüksek asetik asit *B.aquikefiri* gelişimini sınırlandırırken, 1 g/L'den daha yüksek asetik asit düzeyleri de *D.bruxellensis* gelişimini inhibe edebilmektedir (Yahara ve ark., 2007).

Su Kefiri Fermantasyonu Sırasında Meydana Gelen Fermantasyon Ürünleri

Su kefirini üretiminde kullanılan ana şeker kaynağı sakkaroz olmasına rağmen, su kefirinin sıvı kısmı glukoz ve fruktoz içermektedir. Mayaların sahip olduğu invertaz enzimi sakkarozun dönüşümünü gerçekleştirmekte, ortamdaki oksijen düzeyine bağlı olarak da LAB ve AAB'nin de faaliyetiyle çeşitli fermantasyon yan ürünleri (etanol, asetik asit, laktik asit vb.) meydana gelmektedir (Stadie, 2013). Su kefirinde belirlenmiş homofermentatif (*L.hordei*, *L.nagelii*, *L.casei* ve *L.satsumensis*) ve heterofermentatif (*Leu.mesenteroides*, *Leu.citreum* ve *L.hilgardii*) LAB, glukozu sırasıyla EMP ve pentoz fosfat yolu üzerinden fermantasyon yan ürünlerine dönüştürmektedir (Gulitz ve ark., 2011; 2013).

Fermantasyon sırasında sakkarozdan, fermantasyonun ilk 24 saatinde homopolisakkarit üretimi, 72.saatinde düşük konsantrasyonda olsa da gliserol, asetik asit ve mannitol, 8 günlük fermantasyon süresi sonucunda ise laktik asit ve etanol oluşumları gerçekleşmektedir. Fruktoz, mannitol oluşumu için karbon kaynağı olarak değerlendirilmekte, ayrıca konsorsiyum üyeleri için elektron alıcısı olarak da kullanılabilir (Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; 2017b; Laureys ve ark., 2019).

Fermantasyonda kullanılan diğer bir substrat glukoz olup, fruktoza oranla daha hızlı fermente edilmektedir. Asidik stres durumunda, su kefirini tanelerindeki büyüme yavaşladığından, EPS üretimi için kullanılmayan glukoz, asit üretimi amacıyla değerlendirilmektedir (Waldherr ve ark., 2010; Laureys ve De Vuyst, 2014; Verce ve ark., 2019).

Mikrobiyal EPS'ler bakteri, maya ve siyanobakterler tarafından biyosentezlenen, suda çözünmeyen, yarı saydam ve parlak görümlü, karbonhidrat içeren polimerler olup, su kefirini mikroorganizmaları için bir limandır (Luang-In ve ark., 2018; Laureys ve ark., 2019). İlk kez 1839 yılında belirlenen EPS'ler, homo- ve heteropolisakkarit olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Pek çok bakteri tarafından hücre duvarında tutuklu bulunan glukozil veya fruktozil transferaz enzimlerinin hücre dışı bir veya birkaç şeker monomeri arasında glukozidik bağ kurarak oluşturduğu, düşük veya yüksek molekül ağırlığına sahip ve mukoz yapıdaki homopolisakkaritlerdir. Glukozdan oluşan EPS'e glukan, fruktozdan oluşanlara ise fruktan adı verilmektedir (Stadie, 2013; Luang-In ve ark., 2018).

Su kefirini tanelerinin ana yapısı, temelde dekstrandan oluşan bir EPS matriksidir. Yapısı en çok incelenmiş α -glukan dekstran olup, dekstran α -1,6-bağlarıyla birbirine bağlanmış glukoz moleküllerinden oluşan düz zincire, tekrar eden α -1,3-, α -1,4- ve α -1,2 bağlarıyla dallanma gösteren yan zincirlerin bağlanmasıyla oluşmaktadır. Zincir uzunluğu ve bağların oranı, dekstranın reolojik özelliklerine etki etmekte, çözünürlüğü ve molekül ağırlığına bağlı olarak da endüstriyel uygulamalarda başarılı biçimde kullanılabilir (Waldherr ve ark.,

2010; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; Davidović ve ark., 2015; Jakubowski, 2017; Miljković ve ark., 2017; Fels ve ark., 2018). Daha az bilinen α -glukanlar mutan, alternan, reuteran iken, fruktanlar ise levan tipi ve inulin tipi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Torini ve ark., 2015; Zannini ve ark., 2016; Fels ve ark., 2018).

Glukan sukraz, glukoziltransferaz sınıfından ekstraselüler bir enzim olup, *Lactobacillaceae* ve *Streptococcaceae* familyasının *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* cinsine dahil mikroorganizmalar tarafından salgılanmakta, glukan üretimini katalize etmektedir (Waldherr ve ark., 2010; Stadie, 2013; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; Jakubowski, 2017; Miljković ve ark., 2017). Bu enzim, su kefirinde bulunan *L. hilgardii* dışında (Waldherr ve ark., 2010; Luang-In ve ark., 2018), *L. hordei*, *L. nagelii*, *L. mali*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. citreum*, *Candidatus O. aquikefiri* tarafından da salgılanmaktadır. Fruktan içeren EPS'lerin sentezlenebilmesi için ise, *Gluconobacteriaceae* (Waldherr ve ark., 2010; Gulitz ve ark., 2011; Jakob ve ark., 2012; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; Davidović ve ark., 2015; Jakubowski, 2017; Verece ve ark., 2019) üyelerine ve fruktan sukraz enzimine ihtiyaç bulunmaktadır. Fruktan sukraz, sakkarozun, dekstran polimer zincirlerine dönüşümünü sağlayan transfer reaksiyonlarını (glukozil transferaz enzimiyle) katalizleyerek fruktozun serbest kalmasını sağlamakta, uygun alıcılar varlığında oligosakkaritleri oluşturabilmektedir (Waldherr ve ark., 2010; Stadie, 2013; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; Jakubowski, 2017; Miljković ve ark., 2017). Bu açıdan değerlendirildiğinde su kefirinde bulunan ve EPS oluşturan mikroflora, süt kefirinde bulunan mikrofloradan farklılık göstermektedir (Fiorda ve ark., 2017).

Laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan, tanelerin büyümesinden sorumlu olan ve glukan EPS'in oluşumunda etkili olan glukan sukraz enziminin aktivitesi (Waldherr ve ark., 2010; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017b; Laureys ve ark., 2019) suyun tamponlama kapasitesine, yüksek Ca^{+2} iyonlarına ve 4.0-5.5 pH değerlerine bağlıdır. Asidik stres, glukan sukraz aktivitesini baskılayarak tanelerdeki büyümeyi olumsuz yönde etkilemekte, suyun yüksek Ca^{++} içeriği ve tamponlama kapasitesi de, tanelerin büyüme hızı, oluşan metabolitlerin konsantrasyonu ve mikroorganizma türlerinin dağılımı üzerinde etkili olmaktadır (Waldherr ve ark., 2010; Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; Laureys ve ark., 2019).

Su kefiri tanelerinin büyüme oranı üzerinde, yüzey alanının daha fazla olması nedeniyle küçük su kefiri taneleri ve üzerindeki yüksek canlı mikroorganizma sayısı, düşük karbonhidrat miktarıyla yüksek metabolit oranı etkili olmaktadır (Laureys ve De Vuyst 2017). Aynı zamanda yüksek tamponlama kapasitesi, asidik koşullarda daha rahat gelişebilen mayalarla karşılaştırıldığında LAB'nin gelişmesi ve metabolik faaliyetleri için avantaj sağlarken, tanelerin yavaş büyümesi aynı zamanda küçük kalmalarına, şeffaf görünümlü olmalarına, üretim sürecinde daha kolay kırılmalarına, gelişen canlı mikroorganizma sayısında artışına bağlı olarak hızlı bir fermantasyona ve daha fazla glukoz kullanımından dolayı da fermantasyon yan ürünlerinin miktarlarında değişime sebep olmaktadır (Laureys ve de Vuyst, 2017; Laureys ve ark., 2019). Ancak bazı araştırmacılar tarafından *Leu. mesenteroides*'in, düşük asitliğe tolerans gösteren diğer LAB ile karşılaştırıldığında sadece tamponlama kapasitesinin yüksek olduğu koşullarda gelişebildiği ve sakkarozdan EPS üretebildiği için, su kefiri tanelerinin büyümesinde etkili olmadığı ifade edilmektedir (Laureys ve ark., 2019).

Oksijenli veya oksijensiz koşullarda ve besin kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda kuru incir, kayısı ve üzüm kullanılarak su kefiri fermantasyonu yapılabilmektedir (Laureys ve ark., 2018). Ortamdaki besin

maddelerinin yetersizliği *L.hilgardii* ve *D.bruxellensis* gelişimini teşvik ederken, taze incir gibi yüksek besin içeriğine sahip hammaddeler ise *L.nagelii* ve *S.cerevisiae* gelişimi için bir avantaj oluşturmakta, oksijen ise yüksek asetik asit oluşturma yeteneğine sahip AAB'nin gelişimi için uygun ortamı hazırlamaktadır (Guiltz ve ark., 2017; Bechtner ve ark., 2019). Yüksek oranda besin maddesi içeren ortamlarda mikrobiyal cinslerdeki dağılımın değişmesine bağlı olarak etanol:asetik asit ile asetik asit:laktik oranlarında değişim meydana gelmekte, *L.hilgardii* (heterofermentatif) ve *D.bruxellensis*, *L.nagelii* (homofermentatif) ve *S.cerevisiae*'ye göre daha fazla asetat oluşturmaktadır (Laureys ve ark., 2018).

Fermantasyon sırasında oluşan ana metabolitlerden laktik asit; LAB'nin ürünü olup su kefirinin ekşi tadından sorumludur. Az miktarlarda etanol, asetat ve mannitol (*L.hilgardii*, *Candidatus O.aquikefiri* ve *B.aquikefiri*) de oluşturabilen LAB, fermantasyonun başlangıcında fruktozu kullanarak mannitol yerine asetat oluşturabilmekte (Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; 2017b), ayrıca, asetat üretiminin bir kısmı bifidobakterlerin faaliyetiyle de gerçekleşebildiğinden bifidobakter sayısı arttıkça asetat miktarı da artmaktadır (Laureys ve ark., 2017a; 2017b). Mannitol tatlı bir tada ve antioksidan aktiviteye sahip bir bileşiktir ve her iki özelliği de su kefir için istenilen özelliklerdir. Ancak mannitol üretimi, fruktozun heterofermentatif LAB tarafından elektron alıcısı olarak kullanımı sebebiyle düşük konsantrasyonlarda kalmaktadır (Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; 2017b).

Laktik asit gibi asetik asitin de oluşumundan öncelikle *L.hilgardii* ve ardından da *Acetobacter spp.* (*A.tropicalis*) sorumlu olup, özellikle *A.tropicalis* laktik asit bulunan ortamlarda daha iyi gelişerek laktat ve asetatları CO₂ ve suya okside edebilmekte, fermantasyonun son aşamalarında ise etanolü de okside ederek asetik asit oluşturmaktadır (Martínez-Torres ve ark., 2017).

Mayalar tarafından üretilen ana metabolitler etanol ve CO₂, daha az miktarlarda üretilenler ise gliserol ve asetik asittir. Hafif tatlı bir tada sahip gliserol aynı zamanda fermente içeceklerin viskozitesini arttırmakta ama lezzet ve aroma üzerine doğrudan etki etmemektedir (Laureys ve De Vuyst, 2014; 2017a; 2017b). Üretimde incir kullanıldığında veya ekosistemde *S.cerevisiae* bulunduğunda, bazı kofaktörlerin sentezlenmesi mümkün olabildiğinden, su kefir tanelerinin gelişimine katkıda bulunmakta (Verge ve ark., 2019), *S.cerevisiae* varlığına bağlı olarak gerçekleşen etanol oluşumu, su kefir florasında *L.hordei*'nin bulunmasıyla sınırlandırılabilir (Xu, 2019).

Su kefirinin sıvı fazında rastlanan tüm ester ve yüksek alkoller maya metabolizmasının ürünleri olup, mayaların yağ asidi biyosentezi yoluyla oluşturdukları etil esterlerin üretimi için hekzanoik asit, oktanoik asit ve dekanonik asitlere ihtiyaç bulunmaktadır. Şarap ve birada da bulunan bu uçucu aroma bileşiklerinden yola çıkarak su kefirini diğer fermente içeceklerle mukayese etmek fermente içeceklerde görülen kimyasal bileşikler arasındaki interaksiyonlardan dolayı zordur. Ancak etil asetat, 2-metil-1-propanol, isoamil alkol, isoamil asetat, etil hekzanoat, etil oktanoat ve etil dekonat gibi farklı aroma maddelerinin eşik değerlerinin meyvemsi ve çiçeksi katkı sağladığından, su kefirinin aroması üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Laureys ve De Vuyst, 2014).

Sağlık Üzerindeki Etkileri

Sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı, sentetik bileşikler yerine doğal antioksidanlara olan ilginin artması, alternatifler antioksidan kaynaklarının gündeme gelmesine sebep olmaktadır. Antioksidatif desteklerin veya antioksidan içeren gıdaların tüketimi, insan vücudundaki hücre ölümü veya doku hasarıyla sonuçlanan oksidatif reaksiyonları azaltabilmekte ve bu hasara bağlı olarak ortaya çıkan kanser, aterosklerozis, artirit gibi hastalıklardan koruyabilmektedir (Alsayadi ve ark., 2013).

Su kefirinin fonksiyonel/sağlık-iyileştirici bir gıda olarak görülmesi, sahip olduğu laktobasil, bifidobakter ve daha az miktarda ise *Saccharomyces* cinsi mikroorganizmalardan kaynaklanmakta (Folinge ve ark., 2010; Gulitz ve ark., 2013; Marsh ve ark., 2013), fermente edilebilir nitelikteki kaynaklara yüksek uyum sağlayabilmesi de yeni probiyotik ürünlerin geliştirilebilmesine imkan tanımaktadır (Yüksekdağ ve ark., 2004; Sabokbar ve ark., 2015; Corona ve ark., 2016; Fiorda ve ark., 2017; Koh ve ark., 2018).

Süt bazlı kefir ürünleri üzerinde yapılan pek çok çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, şeker kaynağı olarak laktoz içermesi, kolesterol düzeyi; laktoz intolerans ve kolesterol sorunları olan kişilerde sağlık problemlerine neden olabildiğini göstermekte, konsorsiyumunda çeşitli substratlara kolaylıkla adapte olabilen dost bakteri ve mayaların varlığı, düşük kalori içeriği, sıfır kolesterol ve laktoz içermeyen su kefirinin, süt bazlı kefir ürünlerine karşın bir alternatif olarak düşünülmesini sağlamaktadır (Fiorda ve ark., 2017; Koh ve ark., 2018), ayrıca vegan ve/veya vejeteryanlar için de önemli bir probiyotik kaynağı olarak dikkat çekmektedir (Fiorda ve ark., 2017).

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, sakkaroz varlığında laktik asit bakterilerince oluşturulan α -glukanların ürünün reolojik özelliklerini iyileştirmenin yanı sıra bağışıklık sistemini stimüle edici etki gösterdikleri, non-digestible olmaları sebebiyle de barsaklardaki bazı bakterilerin çoğalmasını etkileyebilecekleri belirlenmiştir (de Paiva ve ark., 2016).

Su kefirinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, 24 saatlik fermantasyon sonunda kullanılan su kefir tane oranında artışa (0.125-5 mg/mL) bağlı olarak DPPH yöntemine göre, antioksidan aktivite değerinde artış gözlemlendiği, su kefir mikroflorası tarafından oluşturulan intraselüler ve ekstraselüler metabolitlerinin bu aktiviteden sorumlu olduğu ifade edilmektedir (Alsayadi ve ark., 2013; Fiorda ve ark., 2016). Su kefir fermantasyonu sırasında oluşturulan mikrobiyal EPS'ler radikal süpürücü etkilerini; ya radikal zincir reaksiyonlardan türeyen serbest radikallerle reaksiyona girerek veya elektron vererek radikalleri daha stabil formlara dönüştürerek göstermekte ve bu etkinin indirgen özellikteki hidroksil ve -COOH, C=O ve -O- gibi diğer fonksiyonel gruplardan kaynaklandığı ifade edilmektedir (Luang-In ve ark., 2018).

Barsak hücrelerinin fırça görünümü dış membranlarına bağlı olan α -glukozidaz, kompleks karbonhidratları glukoz hidrolize ederek barsaklar tarafından emilimini sağlamakta, bu enzimin yetersizliği ve inhibisyonu, hidroliz sonucu glukoz seviyelerinde azalmaya ve emiliminde yavaşlamaya, buna bağlı olarak da kan glukoz seviyelerinde düşmeye sebep olabilmektedir (Lee ve ark., 2012; Serra-Barcellona ve ark., 2017). Su kefir tanelerinden izole edilen bazı LAB'nin α -glukozidaz aktivitesini inhibe edebilme özelliklerinin ve biyoaktif bileşikler oluşturabilme yeteneklerinin olduğu belirlenmiş olup, su kefirinin bu açıdan anti-hiperglisemik ve

hipolipidemik özellikte probiyotikler olarak değerlendirilebileceği ifade edilmiştir (Alsayadi ve ark., 2014; Panwar ve ark., 2014; Muganga ve ark., 2015; Zeng ve ark., 2016; Koh ve ark., 2017; 2018). Lin ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, diyetlerine su kefirinden izole edilen *L.mali* APS1 suşu ilave edilen obez farelerde kan glukoz seviyelerinin düzenlenmesinde olumlu sonuçlar elde edildiği belirlenmiştir.

Bazı LAB, kanlı ishale veya sitotoksik sonuçlara sebep olan bazı toksik patojenlerin geçişini engelleyen aktivitelerinin yanısıra, kırmızı kan hücrelerinin yıkımını stimule eden ve konakçı hücreye saldıran hemolitik aktivite de gösterebilmektedir (Hwang ve Park, 2015; Jovanovic´ ve ark., 2015). Ancak probiyotik karakterdeki LAB'nin hemolize sebep olmamaları önem taşımaktadır. Leite ve ark. (2015) ile Lin ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmalarda su kefirinden izole edilen LAB'nin hemolitik aktivite göstermedikleri tespit edilmiştir.

Laktoz intolerans ve kolesterol problemlerine sebep olan süt kökenli probiyotik ürünlere alternatif olabilecek ürünler geliştirmeye yönelik yapılan çalışmalarda (Fiorda ve ark., 2017); balkabağı püresinin, anti-diyabetik özelliği ve α -glukozidaz inhibitör aktivitesinden dolayı *L.mali* K8 için iyi bir substrat olduğu, adı geçen bakterinin depolama süresince 10^9 kob/mL düzeylerinde kaldığı, probiyotikler için tavsiye edilen sınırı (10^6 kob/mL) aştığı ve fonksiyonel özellikte meyve ve sebze ürünleri için bir probiyotik kaynağı olabileceği sonucuna varılmıştır (Koh ve ark., 2017; 2018).

Ayrıca su kefirinin, *Streptococcus pyogenes*, *S.salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* ve *Candida albicans* gibi gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından önem taşıyan patojenler üzerinde antimikrobiyal etkisinin bulunduğu da bildirilmiştir (Rodrigues ve ark., 2005; Schneedorf, 2012; Fiorda ve ark., 2017).

Sonuç

Laktik asit bakterileri ve maya florası açısından süt kefirine benzer bir floraya sahip olan su kefir taneleri, vegan beslenme şeklini benimsemiş, laktoz intolerans sorunu yaşayan veya alerjik bünyeli bireylerin tüketebileceği, farklı şeker kaynaklarını kullanabilmesi nedeniyle de farklı duysal ve fonksiyonel özelliklere sahip yeni içeceklerin üretiminde kullanılabilecek potansiyele sahiptir. Ancak, su kefir üretimi ve tüketiminin ev ölçeğinden endüstriyel ölçeğe aktarılabilmesi için detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Teşekkür Bilgi Notu

Makale araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanmıştır.

Kaynakça

- Alsayadi, M., Al Jawfi, Y., Belarbi, M., Soulem-Mami, Z., Merzouk, H., Sari, D.C., Sabri, F. and Ghalim, M. 2014. Evaluation of anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities of water kefir as probiotic on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Journal of Diabetes Mellitus*, 4(2): 85-94.
- Bechtner, J., Xu, D., Behr, J., Ludwig, C. and Vogel, R.F. 2019. Proteomic analysis of *Lactobacillus nagelii* in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from water kefir and comparison with *Lactobacillus hordei*. *Frontiers Microbiology*, 10:325.
- Champagne, C.P., da Cruz, A.G. and Daga, M. 2018. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Current Opinion in Food Science*, 22:160–166.
- Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., Moschetti, G. and Settanni, L. 2016. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT-Food Science and Technology*, 66: 572–581.
- Côté, G.L., Skory, C.D., Unser, S.M. and Rich, J.O. 2013. The production of glucans via glucansucrases from *Lactobacillus satsumensis* isolated from a fermented beverage starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16): 7265-7273.
- Davidović, S.Z., Miljković, M.G., Antonović, D.G., Rajilić-Stojanović, M.D. and Dimitrijević-Branković, S.I., 2015. Water kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hemijska Industrija*, 69(6): 595-604.
- De Paiva, I.M., da Silva Steinberg, R., Lula, I.S., de Souza-Fagundes, E.M., de Oliveira Mendes, T., Bell, M.J.V., Nicoli, J.R., Nunes, A.C. and Neumann, E. 2016. *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. *LWT-Food Science and Technology*, 72: 390-398.
- De Roos, J., and De Vuyst, L. 2018. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, 49: 115–119.
- Değirmencioğlu, N., Yıldız, E., Şahan, Y., Gültaş, M. ve Gürbüz, O. 2019. Fermentasyon Süresinin Kombü Çayı Mikrobiyotası ve Canlılık Oranları Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda*, 17(2): 200-211.
- FAO/WHO. 2011. Milk and Milk Products. CODEX Standard for Fermented Milks (CODEX STAN 243-2003). <http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf>. (Erişim tarihi: 20.03.2020).
- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R.F., and Wefers, D. 2018. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, 189: 296-303.
- Fiorda, F.A., de Melo Pereira, G.V., Thomaz-Soccol, V., Medeiros, A.P., Rakshit, S.K. and Soccol, C.R. 2016. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. *LWT - Food Science and Technology*, 86: 690-607.

- Fiorda, FA, de Melo Pereira G.V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S.K., Binder Pagnoncelli, M.G., Porto de Souza Vandenberghe, L., Soccol, C.R., Vinicius, G., Pereira, D.M., Assumpc, F., Thomaz-Soccol, V., Kumar, S., Giovana, M., Pagnoncelli, B., Porto, L., Vandenberghe, D.S. and Ricardo, C. 2017. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, 66: 86–95.
- Foligne, B, Dewulf, J, Vandekerckove, P., Pignede, G. and Pot, B. 2010. Probiotic yeasts: anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 16(17): 2134–2145.
- Gulitz A., Stadie J., Wenning M., Ehrmann M.A. and Vogel R.F. 2011. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3): 284-288.
- Gulitz, A., Stadie, J., Ehrmann, M.A., Ludwig, W. and Vogel, R.F. 2013. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 114: 1082–1091.
- Hsieh, H., Wang, S., Chen, T., Huang, Y. and Chen, M., 2012. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 157: 73-81.
- Hwang, J.Y., and Park, J.H. 2015. Distribution of six exotoxin genes and production of L2-HBL and nheA proteins in six *Bacillus cereus* isolates from infant formula and produce. *Food Science and Biotechnology*, 24: 379–382.
- Jakubowski, M. 2017. Potential and differences of selected fermented non-alcoholic beverages. *World Scientific News*, 72: 204-210.
- Jovanović, J.N., Nikolić, B., Šeatović, S., Zavišić, G., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B. and Knežević-Vukčević, J. 2015. Characterization of some potentially probiotic *Lactobacillus* strains of human origin. *Food Science and Biotechnology*, 24: 1781–1788.
- Koh, W.Y., Uthumporn, U., Rosma, A., Effarizah, M.E., Rosli, W.I. and Park, Y.H. 2018. Development of a novel fermented pumpkin-based beverage inoculated with water kefir grains: a response surface methodology approach. *Food Science and Biotechnology*, 27(2): 525-535.
- Koh, W.Y., Uthumporn, U., Rosma, A., Irfan, R. and Park, Y.H. 2017. Optimization of a fermented pumpkin-based beverage to improve *Lactobacillus mali* survival and α -glucosidase inhibitory activity: a response surface methodology approach. *Food Science and Human Wellness*, 7(1): 57-70.
- Laureys, D. and De Vuyst, L. 2014. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8): 2564-2572.
- Laureys, D. and De Vuyst, L., 2017a. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *Journal of Applied Microbiology*, 122: 719-732.

- Laureys, D., Aert, M., Vandamme, P. and De Vuyst, L. 2019. The buffer capacity and calcium concentration of water influence the microbial species diversity, grain growth, and metabolite production during water kefir fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2876.
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P. and De Vuyst L. 2018. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiology*, 73: 351-361.
- Laureys, D., Cnockaert, M., De Vuyst, L. and Vandamme, P. 2016. *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3): 1281-1286.
- Laureys, D., Van Jean, A., Dumont, J. and De Vuyst, L. 2017b. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101: 2811-2819.
- Lee, S.H., Park, M.H., Han, J.S., Jeong, Y., Kim, M. and Jeon, Y.J. 2012. Bioactive compounds extracted from Gamtae (*Ecklonia cava*) by using enzymatic hydrolysis, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Food Science and Biotechnology*, 21: 1149–1155.
- Leite, A.M.O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V.M.F., Mayo, B. and Delgado, S. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 98: 3622–3632.
- Leroi, F. and Pidoux, C. 1996. Influence of pH, temperature and initial yeast:bacteria ratio on the stimulation of *Lactobacillus hilgardii* by *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 138-146.
- Leroi, F. and Pidoux, M. 1993. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 74: 54-60.
- Lin, Y.C., Chen, Y.T., Hsieh, H.H. and Chen, M.J. 2016. Effect of *Lactobacillus mali* APS1 and *L. kefirifaciens* M1 on obesity and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Journal of Functional Foods*, 23: 580–589.
- Luang-In, V., Saengha, W., Yotchaisarn, M., Halaslova, M., Udomwong, P. and Deeseenthum, S. 2018. Microbial strains and bioactive exopolysaccharide procedures from Thai water kefir. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46(4): 403-415.
- Magalhães, K.T., Pereira, G.V.D., Campos, C.R., Dragone, G. and Schwan, R.F. 2011. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 693-702.
- Magalhães, K.T., Pereira, G.V.D., Dias, D.R. and Schwan, R.F. 2010. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 26: 1241–1250.
- Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P. and Cotter, P.D., 2013. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiol. Letters*, 348(1): 79-85.

- Martínez-Torres, A., Gutierrez-Ambrocio, S., Heredia-del-Orbe, P., Villa-Tanaca, L. and Hernandez-Rodríguez, C. 2017. Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(2): 559-571.
- Miguel, M.G.C.P., Cardoso, P.G., Magalhães, K.T. and Schwan, R.F. 2011. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian states. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8): 1875-1884.
- Miljković, M.G., Davidović, S.Z., Kralji, S., Šiler-Marinković, S.S., Rajilić-Stojanović, M.D. and Dimitrijević-Branković, S.I. 2017. Characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* T3, water kefir grains isolate. *Hemisjska Industrija*, 71(4): 351-360.
- Moens, F., Lefeber, T. and De Vuyst, L., 2014. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 1848-1857.
- Muganga, L., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. and Chen, W. 2015. Screening for lactic acid bacteria based on antihyperglycaemic and probiotic potential and application in synbiotic set yoghurt. *Journal of Functional Foods*, 16: 125–136.
- Neve, H. and Heller, K.J. 2002. The microflora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 54(4): 337-349.
- Oliveira, R.B., Pereira, M.A., Veiga, S.M.O., Schneedorf, J.M., Oliveira, N.M.S. and Fiorini, J.E. 2010. Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30: 1022–1026.
- Panesar, P.S., Marwaha, S.S. and Kennedy, J.F. 2006. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(4): 623–635.
- Panwar, H., Calderwood, D., Grant, I.R., Grover, S. and Green, B.D. 2014. *Lactobacillus* strains isolated from infant faeces possess potent inhibitory activity against intestinal alpha- and beta-glucosidases suggesting anti-diabetic potential. *European Journal of Nutrition*, 53(7): 1465–1474.
- Patel, A.R. 2017. Probiotic fruit and vegetable juices- recent advances and future perspective. *International Food Research Journal*, 24 (5): 1850-1857.
- Pidoux, M. 1989. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grains from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology*, 5, 223–238.
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, 6:1177.
- Rodrigues, K.L., Caputo, L.R.G., Carvalho, J.C.T., Evangelista, J. and Schneedorf, J.M. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(85): 404-408.

- Sabokbar, N., Khodaiyan, F. and Moosavi-Nasab, M. 2015. Optimization of processing conditions to improve antioxidant activities of apple juice and whey based novel beverage fermented by kefir grains. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6): 3422–3432.
- Sarikkha, P., Nitorisavut, R., Poljungreed, I. and Boonyarattanakalin, S. 2015. Identification of bacteria and yeast communities in a Thai sugary kefir by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analyses. *The Journal of Industrial Technology*, 11(2): 25-39.
- Schneedorf, J.M. 2012. Kefir D'Aqua and its properties. Intech Open Science, Brazil, 53-76.
- Serra-Barcellona, C., Habib, N.C., Honore', S.M., Sa'anchez, S.S. and Genta, S.B. 2017. Enhydrin regulates postprandial hyperglycemia in diabetic rats by inhibition of α -glucosidase activity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72: 156–160.
- Stadie, J. 2013. Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir (Doctoral dissertation, Technische Universität München), 139 p.
- Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. 2013. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*, 35: 92-98.
- Tang, H., Wang, H., Yu, H., Piao, C., Liu, J. and Hu, Y. 2016. *Galactomyces geotrichum* isolated from water kefir: Interaction with *Lactobacillus kefir*. *Italian Journal of Food Science*, 28(2): 287-297.
- Torino, M. I., de Valdez, G. F. and Mozzi, F. 2015. Biopolymers from lactic acid bacteria: Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 6: 834.
- Verce, M., De Vuyst, L. and Weckx, S. 2019. Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, 10: 479.
- Waldherr, F.W., Doll, V.M., Meibner, D. and Vogel, R.F. 2010. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* tmw 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology*, 27(5):672–678.
- Xu, D. 2019. Interaction between *Lactobacillus hordei*, *Lactobacillus nagelii* and *Saccharomyces cerevisiae* isolates from water kefir (Doctoral dissertation, technische Universität München), 185p.
- Xu, D., Fels, L., Wefers, D., Behr, J., Jakob, F. and Vogel, R.F., 2018. *Lactobacillus hordei* dextrans induce *Saccharomyces cerevisiae* aggregation and network formation on hydrophilic surfaces. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115: 236-242.
- Yahara, G.A., Javier, M.A., Tulio, M.J.M., Javier, G.R. and Guadalupe, A.U.M. 2007. Modeling of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 30: 389-395.
- Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y. and Aslım, B. 2004. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT - Food Science and Technology*, 37: 663–667.

- Zanirati, S.B.F., Abatemarco Jr., M., Sandes, S.H.C., Nicoli, J.R., Nunes, A.C. and Neumann, E. 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32: 70-76.
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A. and Arendt, E. K. 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 1121–1135.
- Zeng, Z., Luo, J., Zuo, F., Zhang, Y. and Ma, H. 2016. Screening for potential novel probiotic *Lactobacillus* strains based on high dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase inhibitory. *Journal of Functional Foods*, 20: 486–495.

