

Хранителни характеристики и антимикробен потенциал на козя суроватка, ферментирана с кефирни зърна

Весна Левков^{1*}, Елизабета Цонева², Наташа Георговска¹, Даниела Беличовска¹

¹Университет „Св. Св. Кирил и Методий“, Скопие, Институт по животновъдство, Скопие, Република Северна Македонија

²Институт за обществено здраве на Република Северна Македонија, Скопие, Република Северна Македонија

Nutritional Characteristics and Antimicrobial Potential of Goat Whey Fermented with Kefir Grains

Vesna Levkov^{1*}, Elizabeta Coneva², Natasha Gjorgovska¹, Daniela Belichovska¹

¹Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Institute of Animal Science Skopje, R. N. Macedonia

²Institute of Public Health of Republic of North Macedonia, Skopje R. N. Macedonia
* E-mail: vesna.levkov.1@istoc.ukim.mk

РЕЗЮМЕ

Суроватката от козе мляко е интересна за потребителите на здравословна и функционална храна. Хранителната стойност на суроватката, по-добрата усвояемост на протеина от казеина, участието в активирането на имунната система, бактерицидните характеристики, както и положителното влияние върху инхибирането на алергичните реакции правят тази напитка търсена на пазара. Млечните индустрии, които произвеждат голямо количество суроватка, трябва да въведат процеси за възстановяване на всички млечни твърди вещества и тези процеси трябва да бъдат рентабилни и екологични. Целта на настоящото

SUMMARY

The goat milk whey is interesting for the consumers of healthy and functional food.

Whey nutritive value, better protein digestibility than the casein, participation in immune system activation, bactericide characteristics as well as positive influence in allergic reaction inhibition makes this beverage to be in demand in the market.

The dairy industries that create large amount of whey have to introduce processes to recover all of the milk solids and this processes need to be cost-effective and environmental friendly. The aim of the present study was to evaluate the nutritional characteristics of

изследване е да се оценят хранителните характеристики на търговската козя суроватка и нейния антимикробен потенциал след ферментация с кефирни зърна. Пробите от козя суроватка са взети от пазар. Ферментацията е проведена при стайна температура (25 °C) за 24 часа. За извършване на ферментацията на суроватката са използвани различни количества кефирни зърна (2%, 5% и 10%). Стойността на pH, титруемата киселинност и процентното съдържание на млечна киселина се променят значително ($p < 0.05$) след процеса на ферментация, докато другите изследвани физико-химични характеристики показват незначителни промени. Антимикробният потенциал на ферментиралата напитка е установен чрез допълнителна инокулация на култури от щам *E.coli* ATCC 8739 и коагулаза положителни *Staphylococcus aureus* ATCC9610. След 24 часа инкубация при 37 °C, в суроватка, ферментирала с 10% кефирни зърна, не е регистриран растеж на добавени щамове. Антиоксидантният капацитет на ферментиралата суроватка също е анализиран. Резултатите от анализа на общия брой на микроорганизмите (TPC), редуционната сила и 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH), показват антиоксидантния потенциал на ферментирала козя суроватка и възможността ѝ за защита от свободните радикали.

Ключови думи: козя суроватка, кефирни зърна, антимикробен потенциал, физико-химични характеристики, антиоксидантен капацитет

УВОД

Козето мляко и продуктите от него се считат за част от качествена, балансирана храна, която привлича

commercial goat whey and its antimicrobial potential after fermentation with kefir grains.

The samples of goat whey were collected from a market. The fermentation was carried out at a room temperature (25 °C) in time of 24 hours. Different quantities of kefir grains (2%, 5% and 10%) were used to perform the fermentation of the whey. The pH value, titratable acidity and percentage of lactic acid changed significantly ($p < 0.05$) after the fermentation process while the other examined physico-chemical characteristics shows insignificant changes.

The antimicrobial potential of fermented beverage was performed by additional inoculation of strain cultures *E.coli* ATCC 8739 and coagulase positive *Staphylococcus aureus* ATCC9610. After 24 hours incubation at 37 °C, in whey fermented with 10% kefir grains, no growth of added strains was recorded.

The antioxidant capacity of fermented whey was also analyzed. The results of TPC, reducing power and DPPH, show antioxidant potential of fermented goat whey and its possibility of protection against free radicals.

Key words: goat whey, kefir grains, antimicrobial potential, physico-chemical characteristics, antioxidant capacity

INTRODUCTION

The goat milk and its products are considered as a part of a quality, balanced food which draws attention

вниманието поради своя различен състав в сравнение с кравето мляко. Основната хранителна стойност на козето мляко (съдържание на протеини, мазнини, лактоза, общо количество твърди вещества) изглежда подобна на кравето мляко, но структурата на хранителните вещества е различна. Според Lima et al., (2018) и Campos et al., (2022) козето мляко съдържа къси и средни мастни киселини (капронова, каприлова и капринова киселина), отговорни за характерната му миризма и вкус. Масните глобули в млякото са по-малки отколкото в кравето мляко и могат директно да се използват като източник на енергия, без да се отлагат в мастната тъкан. От друга страна авторите подчертават, че протеиновият състав на козето мляко е такъв, че съдържа повече α_2 казеин, отколкото α_1 , който се счита за една от основните причини за млечни алергии. Суроватката от козе мляко привлича вниманието като подходяща матрица/основа за създаване на напитки, тъй като притежава благоприятни биологични и хранителни характеристики и технологичен капацитет за тяхното създаване и развитие (Lopes et al., 2012). Тази напитка допринася за поддържането на добро физиологично и здравословно състояние на организма и може да го подобри. Според Hernández-Ledesma et al. (2011) съставът на козята суроватка може да модулира активността на физиологичната функция и може да бъде в състояние да намали риска от хронични заболявания, което прави тази напитка „функционална храна“. Суроватъчните протеини според Mangano et al. (2019) се считат за по-добър източник на протеин от другите източници като казеин, яйца, соя или месо, което показва хранителното качество на суроватката. Като основен страничен продукт на млечната

because of their composition that is divergent compared to the cow milk. Basic nutritional value of goat milk (content of proteins, fat, lactose, total solids) seems similar to cow milk but the structure of these nutrients is different.

According to Lima et al., (2018) and Campos et al., (2022) goat milk contains short and medium fatty acids (caproic, caprylic and capric acid) responsible for its characteristic odor and flavor. The milk fat globules are smaller than in the cows' milk and can be directly used as a source of energy, without their deposition in adipose tissue.

On the other hand authors emphasized that the protein composition of the goat milk is such that contains more α_2 casein than α_1 which is considered as one of the major cause of milk allergies.

The goat milk whey draw attention as a good **matrix** to create beverages, because possess favorable biological and nutritional characteristics and technological capacity for their creation and developing (Lopes et al., 2012).

This beverage contributes in maintaining good physiological and health body condition or can improve it. According to the Hernández-Ledesma et al. (2011) the composition of goat whey can modulate the activity of physiological function and can be capable to reduce the risk of chronic diseases making this beverage a “functional food”.

The whey proteins according to Mangano et al. (2019) are considered as a better protein sources than the other sources like casein, egg, soy or meat indicating the nutritional quality of the whey.

As a major byproduct of dairy industry the

промишленост, суроватката рядко се използва в течна форма и се обработва допълнително предимно в извара, суроватка на прах или суроватъчни екстракти (протеини и лактоза). Преработката на суроватка започва през 70-те години на миналия век и до днес са разработени различни напитки на основата на суроватка (Jeličić et al., 2008).

В Македония, козята суроватка се произвежда при производството на сирене (бяло саламурено сирене, кашкавал или бито сирене) в млечната промишленост или във фермите. Суроватката се преработва допълнително главно в извара или се използва като добавка към храна за животни. Напоследък този вторичен продукт се появява като свежа напитка на пазарите. По време на производството на сирене в домакинствата и млечната промишленост се образува голямо количество суроватка. Важно е този вторичен продукт да не се изхвърля, защото причинява замърсяване на околната среда (богат на органични вещества) и се препоръчва допълнителна обработка или употреба. Технологиите на преработка трябва да бъде рентабилна и екологична (Londero et al., 2011), така че ферментацията на течна суроватка с кефирни зърна е една от възможностите за преработка на суроватка в качествена функционална напитка.

Характеристиките на ферментиралата суроватка с помощта на кефирни зърна са изследвани от различни автори (Londero et al., 2011, 2012; Balabanova and Panayotov, 2011; Megalhães et al., 2011; Shukla and Kushwaha 2017), което показва, че напитките от ферментирала суроватка могат да бъдат интересна алтернатива за използване на суроватка от сирене. Кефирните зърна са симбиотична асоциация на млечнокисели бактерии,

which was rarely used in liquid form and it was additionally processed mostly to cottage cheese, whey powder or whey extracts (proteins and lactose). The whey processing started during the 1970's and until today different whey based beverages have been developed (Jeličić et al., 2008).

In Macedonia the goat whey is produced during cheese manufacturing (white brined cheese, kashkaval or beaten cheese) in dairy industry or farmhouses. The whey is further processed mainly in cottage cheese, or is used as supplement in animal feed. Lately this byproduct has appeared as a fresh beverage in the markets.

During cheese production in households and dairy industry large amount of whey has been created. It is important this byproduct not to be discarded because causes environmental pollution (rich in organic matter), and further processing or use is recommended.

The technology of processing need to be cost-effective and environmental friendly (Londero et al., 2011), so the fermentation of liquid whey with kefir grains is one of the possibilities of whey processing into a quality functional beverage.

Characteristics of the fermented whey using kefir grains has been investigated by different authors (Londero et al., 2011, 2012; Balabanova and Panayotov, 2011; Megalhães et al., 2011; Shukla and Kushwaha 2017) indicating that fermented whey beverages can be interesting alternative for cheese whey utilization.

Kefir grains are symbiotic association of lactic acid bacteria, yeasts and acetic

дрожди и оцетна киселина, заобиколени от кефиран, който представлява водоразтворими полизахариди (Megalhães et al., 2011). Кефирните зърна обикновено се състоят от *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. kefir* and *L. parakefiri*. От видовете *Lactococcus* присъстват: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* и популацията от дрожди се състои от *Sacharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *K. turicensis*, *Kliveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Debariomyces occidentalis* (Londero et al., 2012, de Oliviera Leite et al., 2013). Микроорганизмите от кефирните зърна са отговорни за химичните промени на суроватката по време на ферментация като протеолиза, консумация на лактоза, производство на летливи съединения и органични киселини (Megalhães et al., 2010). Те също имат пробиотични характеристики, подобряващи здравословното състояние на потребителите, като например: подобряват равновесието на чревната флора, защитават лигавицата, облекчават симптомите на непоносимост към лактоза, стимулират имунната система и показват антибактериална активност и антиоксидантен потенциал (Megalhães et al., 2011; Weschenfelder et al., 2018).

Целта на настоящето изследване бе да се определят хранителните характеристики, антимикробния потенциал и антиоксидантния капацитет на търговската козя суроватка след ферментация с различно количество кефирни зърна. Беше предизвикателство да се определят възможностите за приготвяне на качествена напитка чрез прост технологичен процес, както и да се оцени нейната евентуална

acid surrounded by kefiran, water soluble polysaccharide matrix (Megalhães et al., 2011).

Kefir grains usually consist of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. kefir* and *L. parakefiri*. From *Lactococcus* species contains: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* and the yeasts population consists of *Sacharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *K. turicensis*, *Kliveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Debariomyces occidentalis* (Londero et al., 2012, de Oliviera Leite et al., 2013).

The microorganisms from kefir grains are responsible for chemical changes of whey during fermentation like proteolysis, lactose consumption, production of volatile compounds and organic acids (Megalhães et al., 2010).

They also have probiotic characteristics improving the health state of the consumers like: improving intestinal flora balance and mucosal defense, relief of the lactose intolerance symptoms, stimulation of immune system, and shows antibacterial activity and antioxidant potential (Megalhães et al., 2011; Weschenfelder et al., 2018).

The aim of this study was to determine nutritional characteristics, antimicrobial potential and antioxidant capacity of commercial goat whey after its fermentation with different amount of kefir grains.

It was challenging to determine the possibilities of making quality beverage using simple technological process and also to evaluate its possible antibacterial activity.

антибактериална активност.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Обект на настоящето изследване е суроватка, получена от пазарите, която се продава в готова за употреба форма, произведена от две различни мандри. Пробите от суроватка до процеса на ферментация са съхранявани в хладилник при температура 4°C и са ферментирали в рамките на срока на годност на продукта. Ферментиралите проби, които не могат да бъдат анализирани веднага, са съхранени при температура от -18 °C.

За ферментацията на суроватка са използвани 500 ml продукт. Суроватката се поставя в еднолитрови стерилни стъклени бутилки и се инокулира с 2%, 5% и 10% кефирни зърна в стерилни условия. Суроватката е оставена да ферментира 24 часа при стайна температура (23-25 °C). След ферментацията, пробите от суроватка се филтрират през стерилно пластмасово сито и се събират в стерилни ерленмайерови колби. Микробиологичните анализи на продуктите са извършени същия ден, а химичните анализи и антиоксидантната активност на неферментиралата и ферментирала суроватка са извършени през следващите дни или бяха замразени.

Антимикробните характеристики на ферментиралата суроватка са изследвани с допълнителна инокулация с щамове *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 9610, след отстраняване на кефирните зърна.

Химически анализ на суроватката

Неферментирала и ферментиралата суроватка са подложени на допълнителни химични анализи: определяне на общо количество сухи вещества чрез сушене при температура 105°C до достигане

MATERIALS AND METHODS

The object of this study was the whey obtained from markets which is selling in ready to use form, produced from two different dairies.

The whey samples until the fermentation process were kept refrigerated at a temperature of 4°C and fermented within the shelf life of the product. The fermented samples that couldn't be analyzed immediately were kept at a temperature of -18 °C.

For the whey fermentation 500 ml of product was used. The whey was put out in one-liter sterile glass bottles and inoculated with 2%, 5% and 10% kefir grains in sterile conditions. The whey was left to ferment 24 hours at room temperature (23-25 °C).

After the fermentation, the whey samples were filtered through a sterile plastic sieve and collected in sterile Erlenmeyer flasks.

The microbiological analyses of products were performed the same day and the chemical analyses and antioxidant activity of non-fermented and fermented whey were performed in the following days or were frozen.

Antimicrobial characteristics of fermented whey were examined with additional inoculation with *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9610 strains, after removing kefir grains.

Chemical analyses of whey

The not-fermented and fermented whey were subject of further chemical analyses: determination of total solids by drying on temperature of 105°C till constant weight; determination of crude proteins by Kjeldahl method (Nx6.38); determination of lipids by method of

на постоянно тегло; определяне на сурови протеини по метода на Kjeldahl (Nx6.38); определяне на липиди по метода на Gerber; определяне на пепел чрез изгаряне в продължение на 8 часа при температура 600°C; лактозата е определена по метода на Lane-Eynon. Резултатите са изразени като проценти. pH е измерена с pH-метър, а титруемата киселинност е определена чрез Soxhlet-Henkel, с титруване с n/10 NaOH. Резултатите са изразени като SH°. Процентът на млечна киселина е изчислен по метода на Purnomo и Muslimin, (2012) **по следната формула:**

$\text{mlNaOH} \times 0.009 / \text{тегло на суроватка (g)} \times 100$

Микробиологични анализи

Микробиологичните анализи на ферментирала и неферментирала суроватка са извършени чрез определяне на общи аеробни бактерии, коагулаза положителни *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, дрожди и плесени и *Lactobacillus* sp. Анализите са направени по следните методи: Общ брой аеробни бактерии (ISO 4833: 2013), коагулаза положителни *Staphylococcus* (ISO 6888-1:1999), *E.coli* (ISO 16649-1,2:2017), дрожди и плесени (ISO21527) -1,2:2008), *Lactobacillus* върху Рогоза агар при 30°C. След допълнителна инкубация с *E.coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 9610, пробите от суроватка са култивират съответно върху хромогенен колифор агар и агар на Бърд-Паркър, след което са инкубирани за 24 часа при 37°C.

Измерване на общо фенолно съдържание (ОФС)

ОФС на всяка проба е определено според метода на Folin-Ciocalteu (Sabokbar and Khodalyan, 2016). Накратко 0.2 mL разредена напитка е добавена към 1 mL реагент Folin-Ciocalteu (предварително разреден 10-кратно с дестилирана

Gerber; determination of ash by incineration for 8 hour at temperature of 600°C; lactose was determinate by Lane-Eynon method.

The results were expressed as percent. pH was measured by pH-meter and the titratable acidity was determinate by Soxhlet-Henkel titrated with n/10 NaOH. Results were expressed as SH°. Percentage of lactic acid by method of Purnomo and Muslimin, (2012). Calculation of lactic acid was performed **according to formula:**

$\text{mlNaOH} \times 0.009 / \text{weight of whey (g)} \times 100\%$

Microbiological analyses

Microbiological analyses of fermented and not-fermented whey were performed by determination of total aerobic bacteria, coagulase positive *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, Yeasts an moulds and *Lactobacillus* sp. Analyses were made according following methods: Total number of aerobic bacteria (ISO 4833: 2013), Coagulase positive *Staphylococcus* (ISO 6888-1:1999), *E.coli* (ISO 16649-1,2:2017), Yeasts and moulds (ISO21527-1,2:2008), *Lactobacillus* on Rogosa agar at 30°C.

After additional incubation with *E.coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9610 whey samples were cultivated on Chromogenic coliform agar and Baird-Parker respectively and incubated 24h at 37°C.

Measurement of total phenolic content (TPC)

The TPC of each sample was determined according to Folin-Ciocalteu method (Sabokbar and Khodalyan, 2016). Briefly 0.2 mL of diluted beverage was added to 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (prediluted 10-fold with distilled water) and shaken well. Mixture was

вода), след което се разклаща добре. Сместа се оставя да престои при стайна температура за 8 минути. След това 0.8 mL натриев карбонат (7.5 %) се добавя към сместа, разклаща се и се оставя при стайна температура за 30 минути. Абсорбцията се измерва при 765 nm в спектрофотометър. ТРС е изчислен чрез начертаване на калибрационна крива на галовата киселина и е изразен като милиграми от галовата киселина еквивалентни на литър проба. Осем различни разреждания (в диапазона от 0.22 mg GA/L-80 mg GA/L) са използвани, за да се получи калибрационната крива на галовата киселина.

Редукционна сила

Редукционната сила на напитките е измерена по метода на Oyaizu (Sabokbar and Khodalyan, 2016). 2.5 mL от всяка напитка се смесват с 2.5 mL буферен разтвор на натриев фосфат (0.2 M, pH=6.6) и 2.5 mL калиев фероцианид (1%). Сместа се инкубира при 50 °C в продължение на 20 минути. След това към нея се добавят 2.5 mL трихлороцетна киселина (1%) и получената смес се центрофугира при 1400 g за 10 минути. Горният слой от разтвора (5 mL) се смесва с 5 mL дестилирана вода и 1 mL железен хлорид (0,1 %). Абсорбцията на сместа е измерена при 700 nm в спектрофотометър. По-голямата абсорбция показва по-голяма редукционна сила.

2,2 – дифенил-1-пикрилхидразил DPPH радикал-улавяща активност

Пробите са анализирани по метода на Deeseenthum и Pejovic, (2010). Приготвя се разтвор от 0.004% (w/v) DPPH радикал в 95% етанол. Три милилитра етанолов разтвор на DPPH се смесват с 0.1 ml проба или 95% етанол (като контрола), разбъркват се добре и се инкубират 30 минути в тъмна стая при стайна температура. Измерва се абсорбцията на всяка проба при 517 nm. Антиоксидантната

allowed to stand at room temperature for 8 min.

Then 0.8 mL of sodium carbonate (7.5 %) was added to mixture, shaken and left at room temperature for 30 min. Absorbance was measured at 765 nm in a spectrophotometer.

The TPC was assessed by plotting the gallic acid calibration curve and expressed as milligrams of gallic acid equivalents per liter of sample. Eight different dilutions (in the range of 0.22 mg GA/L-80 mg GA/L) were used to get the gallic acid calibration curve.

Reducing power

The reducing power of beverages was measured according to the Oyaizu's method (Sabokbar and Khodalyan, 2016). 2.5 mL of each beverage was mixed with 2.5 mL of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH=6.6) and 2.5 mL of potassium ferricyanide (1 %). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Then 2.5 mL of trichloroacetic acid (1%) was added to the mixture and mixture was centrifuged at 1400 g for 10 min. The upper layer of solution (5 mL) was mixed with 5 mL of distilled water and 1 mL of ferric chloride (0.1 %). The absorbance of the mixture was measured at 700 nm in a spectrophotometer. Greater absorbance shows greater reducing power.

2,2 – dyphenil-1-pycrylhydrazyl DPPH radical scavenging

The samples were analysed according method by Deeseenthum and Pejovic, (2010). The 0.004% (w/v) DPPH radical solution in 95% ethanol was prepared. Three milliliters of ethanolic DPPH solution was mixed with 0.1 ml of sample or 95% ethanol (as a control), vortex well and incubated 30 minutes in dark room at room temperature. Absorbance of each sample at 517 nm was measured. The antioxidant activity

активност е дадена като процент от DPPH радикал-улавящата активност, изчислена като

$$\frac{1}{\text{Регулиране на абсорбцията} - \text{абсорбция на екстракт}} \times 100$$

x100

Статистически анализ

Статистическият анализ на получените резултати е извършен с помощта на компютърна програма Excel 2007. Статистическата значимост между групите е определена чрез еднопосочен дисперсионен анализ (ANOVA). Стойностите са представени като средна(и) \pm статистическа грешка за всяка променлива

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите, получени от химически анализи на неферментирала и ферментирала суроватка, са представени в Таблица 1. Суровите протеини намаляват, когато процентът на кефирните зърна, използвани за ферментация, се увеличава ($0.94 \pm 0.05 - 0.71 \pm 0.01$). Концентрацията на общите липиди не се променя значително, както и процентът на общите сухи вещества ($6.43 \pm 0.06 - 6.88 \pm 0.01$) и общата пепел ($0.40 \pm 0.01 - 0.48 \pm 0.01$). Последните две показват тенденция на намаляване с увеличаване на концентрацията на кефирните зърна, използвани за ферментация (Таблица 1). Въпреки че процентното съдържание на лактоза намалява ($4.24 \pm 0.01 - 4.02 \pm 0.03$), в резултат на ферментацията промените в нейната стойност не са значими. За разлика от тези показатели, стойността на рН, титруемата киселинност и процентът на млечна киселина се променят значително ($p < 0.05$) след процеса на ферментация. Стойността на рН намалява от 6.33 ± 0.07 (неферментирала суроватка) до 3.64 ± 0.02 (суроватка, ферментирала с 10% кефирни зърна) и стойността на

was given as percentage of DPPH scavenging, calculated as:

$$\frac{1}{\text{Control absorbance} - \text{extract absorbance}} \times 100$$

Statistical analyses

The statistical analysis of the obtained results was performed using the computer program Excel 2007. The statistical significance between the groups was determined by one-way analysis of variance (ANOVA). The values are presented as mean(s) \pm statistical error for each variable

RESULTS AND DISCUSSION

Results obtained from chemical analyses of not-fermented whey and fermented whey are presented in Table 1. The crude proteins were decreasing as percent of kefir grains used for fermentation increased ($0.94 \pm 0.05 - 0.71 \pm 0.01$).

The concentration of total lipids didn't change significantly as well as the percent of total solids ($6.43 \pm 0.06 - 6.88 \pm 0.01$) and total ash ($0.40 \pm 0.01 - 0.48 \pm 0.01$). The last two shows tendency of decreasing as a concentration of kefir grains used for fermentation increased (Table 1).

Although the percentage of lactose was decreasing ($4.24 \pm 0.01 - 4.02 \pm 0.03$) as a result of fermentation the changes of its value were not significant. Unlike this parameters the pH value, titratable acidity and percentage of lactic acid changed significantly ($p < 0.05$) after the fermentation process.

The pH value decreased from 6.33 ± 0.07 (not fermented whey) to 3.64 ± 0.02 (whey fermented with 10% kefir grains) and the value of titratable acidity ($2.87 \pm 0.11 \text{ SH}^\circ - 20.67 \pm 1.33 \text{ SH}^\circ$) and lactic acid ($0.065 \pm 0.003\% - 0.46 \pm 0.03\%$) increases

титруемата киселинност (2.87 ± 0.11 SH°- 20.67 ± 1.33 SH°) и млечната киселина ($0.065 \pm 0.003\%$ - $0.46 \pm 0.03\%$) се увеличава в резултат на активността на млечнокиселите бактерии на кефирните зърна. Тези резултати са в съответствие с Levkov et al., (2021), въпреки че проучването на авторите е върху непастеризирана краве суроватка. Стойността на рН и титруемата киселинност на суроватката, ферментирала с 5% кефирни зърна, е по-ниска от резултатите на Shi et al., (2018), вероятно поради разликите във ферментиралото вещество (козе мляко) и микробния състав на кефирните зърна. Концентрацията на общи протеини, липиди и пепел е по-ниска в сравнение с резултатите на Londero et al., (2011), Weschenfelder et al., (2018) и Levkov et al., (2021). Има възможност за предварителна обработка на козята суроватка в мандрите преди пускането ѝ на пазара като свежа напитка. Според Megalhães et al., (2010) съставът на суроватката зависи от характеристиките на млякото, технологията на производство на сирене и подсирване и условията на ферментация на суроватката.

as a result of activity of kefir grains lactic acid bacteria.

These results are in accordance with Levkov et al., (2021) although the authors survey was on cow unpasteurized whey. The pH value and titratable acidity of whey fermented with 5% kefir grains is lower than the results of Shi et al., (2018) probably due to the differences in the fermented matrix (goat milk) and microbial composition of kefir grains.

The concentration of total proteins, lipids and ash are lower compared to the results of Londero et al., (2011), Weschenfelder et al., (2018), and Levkov et al., (2021). There is a possibility of pre-processing of the goat whey in the dairies before its releasing on the market as a fresh beverage.

According to Megalhães et al., (2010) the whey composition depends of the milk characteristic, technology of cheese making and renneting and the whey fermentation conditions.

Таблица 1. Химичен състав на суроватка след ферментация с различно количество кефирни зърна

Table 1. Chemical composition of whey after fermentation with different amount of kefir grains

	Общо количество сухи вещества Total solids %	Суров протеин Crude protein %	Липиди Lipids %	Лактоза Lactose %	Пепел, % Ash, %	pH	Титруема киселинност Titratable acidity SH°	Млечна киселина Lactic acid %
Суроватка Whey	5.56 ±0.10	0.94 ±0.05	0.23 ±0.06	4.24 ±0.01	0.40 ±0.01	6.33 ±0.07a	2.87 ±0.11a	0.065 ±0.003a
Суроватка с 2% к. з. Whey with 2% k. g.	6.43 ±0.06	0.84 ±0.01	0.27 ±0.06	4.11 ±0.01	0.43 ±0.01	4.12 ±0.01b	10.07 ±0.30b	0.23 ±0.01b

Суроватка с 5% к. з. Whey with .5% k. g.	6.61 ±0.01	0.76 ±0.01	0.27 ±0.06	4.04 ±0.02	0.47 ±0.02	3.74 ±0.02b	15.27 ±2.21b	0.34 ±0.05b
Суроватка с 10% к. з. Whey with .10% k. g.	6.88 ±0.01	0.71 ±0.01	0.23 ±0.06	4.02 ±0.03	0.48 ±0.01	3.64 ±0.02b	20.67 ±1.33c	0.46 ±0.03c
Р стойност P value	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	<0.05	<0.05	<0.05

к. ф. - кефирни зърна; SH° - Soxlet Hencel degrees, n.s. без значимост
k.g. - kefir grains; SH° - Soxlet Hencel degrees, n.s. not significant

Микроорганизмите, присъстващи във ферментирала и неферментирала суроватка, обогатена с щамове *E.coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 9610, са показани на Фиг.1. В неферментиралата суроватка броят на общите аеробни бактерии, лактобацили, дрожди и плесени е 4,76, 4,90 и 4,89 log CFU/g. Тенденция към намаляване на броя им се наблюдава при суроватка, ферментирала с различно съдържание на кефирни зърна. Както се очаква, тези групи микроорганизми са най-слабо представени в суроватката, ферментирала с 10% кефирни зърна (съответно 4,25, 4,30, 4,21 log CFU/g). След добавяне на щамове *E.coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 9610 техният брой в неферментирала суроватка е съответно 4,10 и 3,42 log CFU/g. След 24-часова ферментация суроватката, ферментирала с 5% кефирни зърна, съдържа 1,85 log CFU/g *E.coli* ATCC 8739 и 1,25 log CFU/g *Staphylococcus aureus* ATCC 9610. В суроватката, ферментирала с 10% кефирни зърна, тези добавени щамове не са установени (Фиг. 1).

Микробиологичните анализи показват инхибиторния потенциал на ферментационния процес. Според Londero et al., (2011, 2012) инхибиторната активност на ферментиралата суроватка се дължи на органична киселина, млечна и оцетна киселина, произведени от

The microorganisms present in fermented and non-fermented whey enriched with *E.coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9610 strains are shown in Fig.1. In non-fermented whey the number of total aerobic bacteria, lactobacilli, yeasts and molds were 4.76, 4.90 and 4.89 log CFU/g.

A tendency to reduce their number was observed in whey fermented with different content of kefir grains. As it is expected this groups microorganisms were least presented in the whey fermented with 10% kefir grains (4.25, 4.30, 4.21 log CFU/g respectively).

After addition of *E.coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9610 strains their number in non-fermented whey was 4.10 and 3.42 log CFU/g respectively. After 24 hour fermentation the whey fermented with 5% kefir grains contains 1.85 log CFU/g *E.coli* ATCC 8739 and 1.25 log CFU/g *Staphylococcus aureus* ATCC 9610. In the whey fermented with 10% kefir grains this added strains were not determinate (Fig.1).

From the microbiological analyses the inhibitory potential of fermented way can be noted. According to Londero et al., (2011, 2012) inhibitory activity of the fermented whey is due to organic acid lactic and acetic acid produced by the kefir grains during fermentation processes or bioactive peptides, which

кефирните зърна по време на ферментационни процеси или биоактивни пептиди, които са резултат от протеолитичната активност на кефирните зърна. Самото понижаване на рН стойността в резултат на ферментацията няма инхибиторен ефект върху патогенните бактерии. Според авторите, разпадането на млечната киселина в бактериалната клетка понижава вътреклетъчното рН, което въздейства на клетъчните метаболитни функции и осмоларитета на мембраната. От друга страна, инхибиторната активност също зависи от първоначалния брой патогенни бактерии. Ако той е по-нисък, патогенните бактерии не могат да оцелеят от инхибиращия ефект на ферментиралата суроватка. Антибактериалната активност на ферментиралата суроватка вероятно е свързана с микробния състав на кефирните зърна, тяхната способност да произвеждат бактериоцини и биоактивни вещества (Weschenfelder et al., 2018, Biadała et al., 2020). Качеството и съставът на суроватката като субстрат на ферментация, обработката, опаковането и съхранението на крайния продукт, химичните процеси по време на ферментацията влияят върху антибактериалната активност и характеристиките на изследваните микроорганизми (Weschenfelder et al., 2018). Според авторите поведението на микроорганизмите в храните може да бъде свързано с присъщи характеристики на храната. Хидролизираната суроватка има антибактериален потенциал, който инхибира бактериалния растеж в сравнение с нехидролизираната суроватка, поради освобождаването на антимикробни пептиди, които могат да навлязат в бактериалните клетки, причинявайки лизис и клетъчна смърт (Ferreira Campos, 2022)

are result of kefir grains proteolytic activity.

The reduction of pH value itself, as a result of fermentation, has not inhibitory effect on pathogenic bacteria.

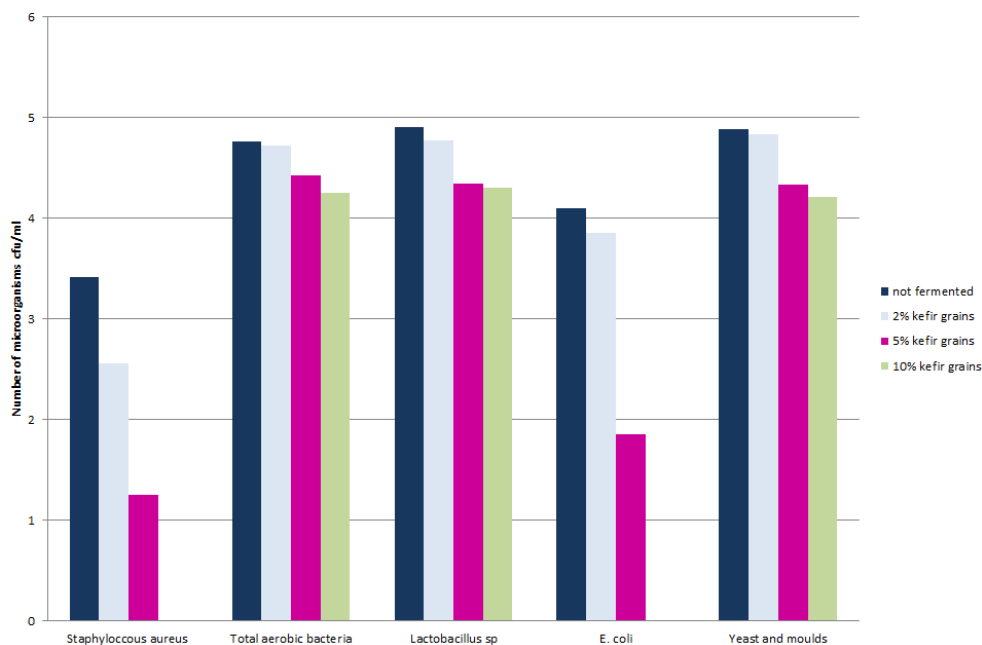
According to authors lactic acid dissociation in bacteria cell lowers the intracellular pH and that affects cellular metabolic functions and membrane osmolarity. On the other hand the Inhibitory activity also depends of initial number of pathogenic bacteria. If it is lower, the pathogenic bacteria can't survive the inhibitory effect of fermented whey.

Antibacterial activity of fermented whey is probably associated with microbial constitution of kefir grains, their ability to produce bacteriocins and bioactive substances (Weschenfelder et al., 2018, Biadała et al., 2020).

The quality and composition of the whey as a substrate of fermentation, handling, packaging and storage of the end product, the chemical processes during fermentation influence the antibacterial activity and the characteristics of evaluated microorganisms (Weschenfelder et al., 2018).

According to the authors behavior of the microorganisms in food can be associated with intrinsic characteristic of food.

The hydrolyzed whey have antibacterial potential causing bacterial growth inhibition compared to non-hydrolyzed whey, because of releasing antimicrobial peptides that can enter bacteria cells causing lysis and cell death (Ferreira Campos, 2022)



Фиг. 1. Микробиологични характеристики на суроватка, ферментирана с различно количество кефирни зърна и добавени *E. coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 9610

Fig. 1. Microbiological characteristics of whey fermented with different amount of kefir grains and *E. coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9610 added

Проучванията на антиоксидантния капацитет на продуктите от козе мляко са повече съсредоточени върху млякото или ферментирали млечни продукти (кисело мляко, кефир, сирене) и показват, че те притежават радикалулавяща способност (Liu et al., 2004, Pihlanto, 2006, Yilmaz-Ersan et al., 2016, Shi et al., 2018, Chávez-Servín et al., 2018), но има малко данни за антиоксидантното въздействие на ферментирала суроватка.

Антиоксидантният капацитет на ферментирала суроватка с кефирни зърна е оценен чрез използване на три различни метода: общо фенолно съдържание (TPC), редуccionна сила и DPPH радикалулавяща активност. Има разлика в антиоксидантния капацитет между козята суроватка, произведена в две различни мандри

The studies of antioxidant capacity of goats dairy products are more focused on milk or fermented milk products (yogurt, kefir, cheese) and indicates that they possess capacities to scavenge radicals (Liu et al., 2004, Pihlanto, 2006, Yilmaz-Ersan et al., 2016, Shi et al., 2018, Chávez-Servín et al., 2018) but little data is available for antioxidant effects of fermented whey.

The antioxidant capacity of fermented whey with kefir grains was evaluated by using three different methods total phenolic contents (TPC), reducing power and DPPH radical scavenging activity.

There is a difference in antioxidant capacity between the goat whey produced in two different dairies (Table

(Таблица 2).

Общият брой микроорганизми (TPC), добър източник на естествени антиоксиданти, открити в млечните продукти, произхождащи от фуражите, и тяхното съдържание, зависи от годишния сезон, растителния състав на пасищата и състава на усвоения фураж (Chávez-Servín et al., 2018). Съдържанието им в неферментирала суроватка е 65.2 mg Ga/L и 98.2 mg Ga/L (таб.2). След добавяне на кефирни зърна, TPC се повиши във всички проби от ферментирала суроватка, достигайки най-висока стойност от 197.1 mg Ga/L (мандра А) и 87,7 mg Ga/L (мандра В) в суроватка, ферментирала с 10% кефирни зърна. Тези резултати са различни в сравнение с Yilmaz-Ersan et al., (2016), които наблюдават намаляване на стойността на TPC чрез увеличаване на времето за ферментация на кефир от козе мляко. Повишената радикалулавяща активност на ферментиралата суроватка вероятно е резултат от микробиота на кефира, способна да произвежда органична киселина и пептиди чрез лизис на суроватъчна лактоза и суроватъчен протеин (Suetsuna et al., 2000, Yilmaz-Ersan et al., 2016).

2).

The TPC, good sources of natural antioxidants, found in milk products originated from the feed and their content depends on year season, plant composition of pastures and composition of ingested forages (Chávez-Servín et al., 2018).

Their content in non-fermented whey is 65.2 mg Ga/L and 98.2 mg Ga/L (Tab.2). After addition of kefir grains the content of TPC increased in all samples of fermented whey, reaching highest value of 197.1 mg Ga/L (dairy A) and 87.7 mg Ga/L (dairy B) in whey fermented with 10% kefir grains.

These results are different compared to the Yilmaz-Ersan et al., (2016), who observed reduction in TPC value by increasing the fermentation time in goat milk kefir.

The increased scavenging activity of fermented whey is probably a result of kefir microbiota capable to produce organic acid and peptides by whey lactose and whey protein lysis (Suetsuna et al., 2000, Yilmaz-Ersan et al., 2016).

Таблица 2. Въздействие на различна концентрация на кефирни зърна върху антиоксидантния капацитет на суроватъчен кефир

Table 2. Effect of different concentration of kefir grains on antioxidant capacity of the whey kefir

Суроватка ферментирана с кефирни зърна Fermented whey with kefir grains	TPC (mg Ga/L)	Редукционна сила (абсорбция при 700 nm) Reducing power (absorbance at 700 nm)	инхибиране на DPPH DPPH % inhibition	Суроватка ферментирана с кефирни зърна Fermented whey with kefir grains	TPC (mg Ga/L)	Редукционна сила (абсорбция при 700 nm) Reducing power (absorbance at 700 nm)	инхибиране на DPPH DPPH % inhibition
	A				B		
0% к.з. / k.g.	98.2	0.980	81.67	0% к.з. / k.g.	65.8	0.794	79.26
2% к.з. / k.g.	187.3	0.922	88.57	2% к.з. / k.g.	83.7	0.816	81.99
5% к.з. / k.g.	189.1	0.907	94.55	5% к.з. / k.g.	80.6	0.782	90.86

k.g.				k.g.			
10% к.з. /	197.1	0.902	92.92	10% к.з. /	87.7	0.804	86.49
k.g.				k.g.			

к.з. – кефирни зърна; А- суроватка произведена в мандра А; В- суроватка произведена в мандра Б
 k.g. – kefir grains; A-whey produced in dairy A; B- whey produced in dairy B

Резултатите, получени от измерването на редукионната сила (Таблица 2), показват тенденция на понижаване в суроватка (мандра А), ферментирала с различно количество кефирни зърна, докато в суроватка от мандра Б след ферментацията има тенденция на увеличаване на абсорбцията при 700 nm. Според Oyaizu (1986), повишената абсорбция при 700 nm показва увеличаване на редукионната сила. Повишена редукионна сила се отбелязва след ферментация на суроватка от мандра Б. Резултатите за редукионната сила, получени в настоящето проучване, са по-високи от резултатите на Liu et al., (2003), които изследват антиоксидантната активност на кефир от козе мляко. Авторите посочват, че млякото може да бъде източник на биоактивни протеини и пептиди (с антиоксидантен капацитет), като последните могат да бъдат активирани чрез ензимна протеолиза или обработка на храната.

Стойностите на инхибиране на DPPH (Таблица 2.) в неферментирала суроватка са малко по-високи в суроватка от мандра А, след това в мандра В. След добавяне на кефирни зърна в суроватката, DPPH радикал-улавяща активност се увеличава във ферментирала суроватка от двете мандри с изключение на суроватката, ферментирала с 10% кефирни зърна. Тези резултати са сходни с изследванията на Liu et al., (2004), Yilmaz-Ersan et al., (2016) и са по-високи в сравнение с Shi et al., (2018). Авторите подчертават повишената активност на ферментиралото мляко (кефир) по отношение на DPPH радикал-улавяща активност в сравнение с неферментирало мляко,

The results obtained from measurement of reducing power (Tab.2) shows tendency of decreasing in whey (dairy A) fermented with different amount of kefir grains, while in whey from dairy B after the fermentation there is a tendency of increasing of absorbance at 700 nm.

According to Oyaizu, (1986) increased absorbance at 700 nm indicates an increase in reducing power. Increased reducing power was noted after fermentation of whey from dairy B. Results of reducing power obtained in this study are higher than the results of Liu et al., (2003) who studied antioxidant activity of goat milk kefir.

The authors indicate that milk can be a source of bioactive proteins and peptides (with antioxidant capacity) and the last one can be activated by enzymatic proteolysis or food processing.

The DPPH inhibition values (Table 2.) in non-fermented whey are slightly higher in whey from dairy A, then in dairy B. After the addition of kefir grains in whey, DPPH radical scavenging activity increases in fermented whey from both dairies with the exception of whey fermented with 10% kefir grains.

These results are similar with the research of Liu et al., (2004), Yilmaz-Ersan et al., (2016) and were higher compared to the Shi et al., (2018). The authors emphasized the enhanced activity of fermented milk (kefir) regarding scavenging the DPPH radical in comparison to non-fermented milk probably as a result of activity of kefir

вероятно в резултат на активността на микробиотата на кефира.

Въпреки че разликите в състава на кефирните зърна влияят на антиоксидантния капацитет на ферментиралата суроватка, както и на съответните методи за измерване, резултатите показват антиоксидантния потенциал на ферментиралата козя суроватка и възможността ѝ за защита от свободните радикали.

ИЗВОДИ

Проучването показва, че търговската козя суроватка чрез проста технология на ферментация с кефирни зърна може да се превърне в напитка с добри хранителни характеристики. Химичните характеристики на ферментиралата суроватка не се променят значително след ферментацията с изключение на рН, титруема киселинност и съдържание на млечна киселина. Суроватката, ферментирала с кефирни зърна, показва антимикробна активност срещу *E. coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 9610. Тези щамове бактерии не са открити след процес на ферментация с 10% кефирни зърна. Антиоксидантният потенциал на ферментиралата суроватка и нейната защита от свободните радикали прави тази напитка потенциален естествен антиоксидант. Необходими са допълнителни изследвания, за да се докаже, че тази напитка, произведена с проста технология на ферментация, е добра и безопасна за консумация и нейният антиоксидантен капацитет е задоволителен, така че може да се използва като хранителна добавка в храненето на хора и животни.

microbiota.

Although the differences in kefir grains composition affects the antioxidant capacity of fermented whey as well as corresponding methods for measurement, the results shows antioxidant potential of fermented goat whey and its possibility of protection against free radicals.

CONCLUSIONS

The study demonstrates that commercial goat whey by simple technology of fermentation with kefir grains can be transfer in beverage with good nutritional characteristics.

Chemical characteristics of fermented whey did not change significantly after fermentation with exception of pH, titratable acidity and content of lactic acid. The whey fermented with kefir grains shows antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9610.

These strains of bacteria were not detected after process of fermentation with 10% of kefir grains. The antioxidant potential of fermented whey and its protection against free radicals makes this beverage to be considered as a potential natural antioxidant. Further investigations are needed to prove that this beverage made with simple fermentation technology is good and safe for consumption, and its antioxidant capacity is satisfy, so can be used as food supplement in human and animal nutrition.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Balabanova, T. and P. Panayotov**, 2011. Obtaining functional fermented beverages by using kefir grains. *Procedia Food Science*, 1, 1653-1659.
2. **Biadała A., T. Szablewski, M. Lasik-Kurduś and R. Cegielska-Radziejewska**, 2020. Antimicrobial activity of goat's milk fermented by single strain of

kefir grain microflora. *European Food Research and Technology*, 246, 1231-1239.

3. **Hernández-Ledesma, B., M. Ramos and J. Á. Gómez-Ruiz**, 2011. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, 101 (1–3), 196–204.

4. **Chávez-Servín H. M., H. M. Andrade-Montemayor, C. Velázquez Vázquez, A. A. Barreyro, T. García-Gasca, R. A. F. Martínez, A. M. O. Ramírez and K. de la Torre-Carbot**, 2018. Effects of feeding system, heat treatment and season on phenolic compounds and antioxidant capacity in goat milk, whey and cheese. *Small Ruminant Research*, 160, 54-58.

5. **De Oliveira Leite A. M., M. A. L. Miguel, R. S. Peixoto, A. S. Rosado, J. T. Silva and V. M. F. Passchoalin**, 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology* 44 (2), 341-349.

6. **Deeseenthum, S. and J. Pejovic**, 2010. Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from Thai Jasmine rice milk. *Biotechnology* 9 (3), 332–337

7. **Ferreira Campos, M. I., A. K. De Sousa Lima, J. H. P. L. Neto, J. M. C. de Oliveira and T. S. Gadelha**, 2022. Artigo de revisão: Propriedades biológicas das proteínas e peptídeos do soro do leite caprino. *Research, Society and Development*, 11 (1), 1-22.

8. **ISO 4833:2013**. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms

9. **ISO 6888-1:1999**. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium

10. **ISO 16649-1,2:2017**. Microbiology of food and animal feeding - General methods for the β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 2: colonies counting method at 44 ° C using 5-bromo-4-chlorine-3-indolil- β - D-glucuronide Microbiology of the food chain -Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide

11. **ISO21527-1,2:2008**. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95

12. **Jeličić, I., R. Božanić and Lj. Tratnik**, 2008. Whey based beverages – new generation of dairy products. *Mljekarstvo* 58 (3), 257-274.

13. **Levkov, V., E. Coneva , N. Gjorgovska, N. Mateva and D. Belichovska**, 2021. Changes of nutritional characteristics of whey fermented with kefir grains-a preliminary results. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, 5 (4), 424-433

14. **Reis Lima, M. J., E. Teixeira-Lemos, J. Oliveira, L. P. Teixeira-Lemos, A. M. C. Monteiro and J. M. Costa**, 2018. Nutritional and Health Profile of Goat Products: Focus on Health Benefits of Goat Milk. In: *Goat Science* (Kukovics, S. ed.), IntechOpen London,189-232. 10.5772/66562

15. **Liu, J. R., Y. Y. Lin, M. J. Chen, L. J. Chen and C. W. Chen**, 2005. Antioxidative activities of kefir. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18 (4), 567-573.

16. **Londero A., R. Quinta, A. G. Abraham, R. Sereno, G. De Antoni and G. L.**

Garrote, 2011. Inhibitory activity of cheese whey fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, 74 (1), 94-100.

17. Londero A., M. F. Hamet, G. De Antoni, G. L. Garrote and A. G. Abraham, 2012. Kefir grains as starter for whey fermentation at different temperature: chemical and microbiological characterization. *Journal of Dairy Research* 79, 262-271.

18. Lopes, F. B., M. C. Da Silva, E. S. Miyagi, M.C.S. Fioravanti, O. Facó, R. F. Guimarães, O. A. d. C Júnior and C. M. McManus, 2012. Spatialization of climate, physical and socioeconomic factors that affect the dairy goat production in Brazil and their impact on animal breeding decisions. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 32 (11), 1073–1081.

19. Mangano, K. M., Y. Bao and C. Zhao, 2019. Nutritional Properties of Whey Proteins. In: *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd.

20. Megalhães K. T., M. A. Pereira, A. Nicolau, G. V. Dragone G.de Melo Pereira, L. Domingues, J. A. Teixeira, J. B. de Almeida Silva and R. F. Schwan, 2010. Production of fermented cheese whey based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology* 101, 8843-8850.

21. Megalhães K. T., G. Dragone, G. V. de Melo Pereira, J. M. Oliveira, L. Domingues, J. A. Teixeira, J. B. Almeida e Silva and R. F. Schwan, 2011. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry* 126, 249-253.

22. Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

23. Pihlanto, A., 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306-1314

24. Sabokbar, N. and F. Khodaiyan, 2016. Total phenolic content and antioxidant activities of pomegranate juice and whey based novel beverage fermented by kefir grains. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (1), 739-747.

25. Shi, X., H. Chen, Y. Li, J. Huang and Y He, 2018. Effects of kefir grains on fermentation and bioactivity of goat milk. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Thchnology*, XXII, (1), 43-50.

26. Shukla P. and A. Kushwaha, 2017. Development of probiotic beverage from whey and orange juice. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 7 (5), p.1-4.

27. Suetsuna, K., H. Ukeda and H. Ochi., 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 128–131.

28. Weschenfelder, S., M. P. Paim, C. Gerhardt, H. H. C. Carvalho and J. M. Wiest, 2018. Antibacterial activity of different formulations of cheese and whey produced with kefir grains. *Revista Ciência Agronômica*, 49 (3), 443-449.

29. Yilmaz-Ersan, L., T. Ozcan, A. Akpinar-Bayazit and S. Sahin, 2016. The antioxidative capacity of kefir produced from goat milk. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 7 (1), 22-26