

Optimiranje uvjeta uzgoja tibicosa na saharozi

Kurtoić, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:049289>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Domagoj Kurtoić
1173/BPI

**OPTIMIRANJE UVJETA UZGOJA
TIBICOSA NA SAHAROZI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Antonije Trontel.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Antoniji Trontel na stručnom vodstvu, strpljenju, uloženom trudu i susretljivosti tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama što su mi uljepšali studentske dane.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj ljubavi, potpori i razumijevanju tijekom cjelokupnog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

OPTIMIRANJE UVJETA UZGOJA TIBICOSA NA SAHAROZI

Domagoj Kurtoić, 1173/BPI

Sažetak:

Tibicos ili zrnca „kefirnog napitka“ sastoje se od združene kulture bakterija i kvasca te polisaharida koje proizvode navedeni mikroorganizmi. Simbiotski odnos mikroorganizama omogućava zajedničku fermentaciju i dobivanje konačnog proizvoda – „kefirnog napitka“. Zrnca korištena za uzgoj su nabavljena iz privatnog kućnog uzgoja te je njihov točan mikrobiološki sastav nepoznat. U ovom radu provedeno je optimiranje uvjeta uzgoja kefirnog napitka (temperatura, različita koncentracija saharoze). Uzgoj je proveden u prethodno steriliziranim vodenim otopinama saharoze različitih koncentracije ($20 - 100 \text{ g L}^{-1}$) i pri različitim temperaturama uzgoja ($20 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$). Naknadno je određen utjecaj alternativnih supstrata šećernih alkohola (eritrola i ksilitola) te stevije na metaboličku aktivnost zrna kefirnog napitka. Alternativni supstrati nisu metabolizirani što ih čini upotrebljivima kao dodana sladila u konačnoj formulaciji proizvoda. Između testiranih vrijednosti za temperaturu fermentacije i različitih koncentracija saharoze kao optimalni uvjeti određene su temperatura od $30 \text{ }^\circ\text{C}$ i koncentracija saharoze od 40 g L^{-1} . Dinamika rasta zrnaca „kefirnog napitka“ i proizvodnje produkata u optimalnim uvjetima okarakterizirana je nekim osnovnim biokinetičkim parametrima ($Y_{\text{EtOH/S}} = 0,012 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{EtOH}} = 0,016 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$; $Y_{\text{Octena kis./S}} = 0,013 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{Octena kis.}} = 0,018 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$; $Y_{\text{Mliječna kis./S}} = 0,028 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{Mliječna kis.}} = 0,038 \text{ g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$).

Ključne riječi: tibicos, kefirni napitak, određivanje koncentracije metabolita, saharoza, eritrol, ksilitol, stevia

Rad sadrži: 52 stranice, 14 slika, 15 tablica, 44 literaturne reference, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: doc. dr. sc. Antonija Trontel

Pomoć pri izradi: Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Božidar Šantek
2. Doc. dr. sc. Antonija Trontel
3. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna, 2020

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

OPTIMIZATION OF TIBICOS CULTIVATION ON SUCROSE

Domagoj Kurtoić, 1173/BPI

Abstract:

Tibicos or „water kefir“ grains consist of a mixed culture of bacteria and yeast and polysaccharides produced by these microorganisms. The symbiotic relationship of microorganisms enables balanced fermentation and obtaining the final product – „water kefir“. The grains used for cultivation were obtained from private home cultivation and their exact microbiological composition is unknown. In this paper, the optimization of cultivation conditions (temperature, different sucrose concentration) was performed. The cultivation was carried out in previously sterilized aqueous solutions of sucrose of different concentrations (20 - 100 g L⁻¹) and at different growing temperatures (20 - 40 °C). The influence of alternative substrates of sugar alcohols (erythrol and xylitol) and stevia on the metabolic activity of water kefir grains was also determined. Alternative substrates are not metabolized which makes them useful as added sweeteners in the final product formulation. Between the tested values for the fermentation temperature and different sucrose concentrations, a temperature of 30 °C and a sucrose concentration of 40 g L⁻¹ were determined as optimal conditions. The dynamics of „water kefir grain“ growth and product production under optimal conditions was characterized by some basic biokinetic parameters ($Y_{\text{EtOH}/S} = 0.012 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{EtOH}} = 0.016 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$; $Y_{\text{Acetic acid.}/S} = 0.013 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{Acetic acid.}} = 0.018 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$; $Y_{\text{Lactic acid.}/S} = 0.028 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{\text{Lactic acid.}} = 0.038 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$).

Keywords: tibicos, water kefir, determination of metabolite concentration, erythrol, xylitol, stevia

Thesis contains: 52 pages, 14 figures, 15 tables, 44 references, 2 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Antonija Trontel, Assistant professor

Technical support and assistance: Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

Reviewers:

1. PhD Božidar Šantek, Full Professor
2. PhD Antonija Trontel, Assistant Professor
3. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor
4. PhD Blaženka Kos, Full Professor

Paper defended: 29th September, 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KEFIRNI NAPITAK.....	2
2.2. MIKROBIOLOŠKI SASTAV ZRNA KEFIRNOG NAPITKA.....	3
2.2.1. Kvasci.....	5
2.2.2. Bakterije mliječne kiseline	6
2.2.3. Bifidobakterije.....	8
2.2.4. Bakterije octene kiseline	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	10
3.1.2. Kemikalije	10
3.1.3. Hranjive podloge	11
3.1.4. Aparatura i pribor	11
3.2. METODE RADA.....	13
3.2.1. Priprava hranjivih podloga	13
3.2.2. Određivanje rasta i aktivnosti kefirnog napitka na različitim koncentracijama saharoze pri različitim temperaturama	13
3.3. ANALITIČKE METODE	14
3.3.1. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kefirnog napitka	14
3.3.2. UPLC analiza	14
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI	16
3.4.1. Prinos biomase zrnaca kefirnog napitka (Y_X).....	16
3.4.2. Prinos produkta (Y_P)	16
3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu zrnaca kefirnog napitka ($Y_{X/S}$).....	17
3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)	17
3.4.5. Produktivnost (Pr).....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. ODREĐIVANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE SAHAROZE ZA PROVOĐENJE FERMENTACIJE S POMOĆU ZRNACA KEFIRNOG NAPITKA.....	19
4.2. ODREĐIVANJE OPTIMALNE TEMPERATURE ZA PROVOĐENJE FERMENTACIJE S POMOĆU ZRNACA KEFIRNOG NAPITKA.....	22

4.2.1. Fermentacija s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 40 g L ⁻¹ pri različitim temperaturama	22
4.2.2. Fermentacija s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 60 g L ⁻¹ pri različitim temperaturama	32
4.3. ODREĐIVANJE RASTA I AKTIVNOSTI ZRNACA KEFIRNOG NAPITKA NA KSILITOLU, ERITROLU I STEVIJI.....	44
5. ZAKLJUČCI.....	46
6. LITERATURA.....	47
7. PRILOZI.....	53
7.1. BAŽDARNI PRAVCI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UGLJIKOHIDRATA, ALKOHOLA I KISELINA UPLC METODOM	53
7.2. RETENCIJSKA VREMENA LAKOHLAPLJIVIH SPOJEVA ODREĐENIH HS-GC-FID METODOM.....	54

1. UVOD

Prirodno fermentirana pića posjeduju brojne metaboličke, prehrambene, prebiotičke i probiotičke potencijale, ali u ovom trenutku većina potencijala ostaje neiskorištena i nedostupna krajnjem kupcu. Kefirni napitak može biti zanimljiva alternativa fermentiranim proizvodima na bazi mlijeka i probioticima koji nisu prikladni za osobe s alergijom na proteine mlijeka ili osobama s intolerancijom na laktozu. Dodatno, postoji mogućnost odabira specifičnih sojeva bakterija iz velikog broja mikroorganizama koji se nalaze u prirodno fermentiranim pićima te se mogu odabrati za razvoj novih probiotika (Frost i Sullivan, 2007).

U posljednje vrijeme potrošači su postali više zainteresirani za hranu i zdravlje, što je rezultiralo povećanom potražnjom za zdravom hranom i pićima (Frost i Sullivan, 2008). U prošlosti se zdravim proizvodima smatralo one sa smanjenom masnoćom, soli, šećerom ili kolesterolom, ali to se promijenilo u korist proizvoda s dodanom hranjivom i funkcionalnom vrijednošću, kao što su dodatak vitamina, prebiotika ili probiotika (Frost i Sullivan, 2007, 2010).

Jasan je trend prirodnih proizvoda bez aditiva i konzervansa. Jedinstvena organoleptička svojstva prirodno fermentiranih pića mogu rezultirati stvaranjem inovativnog fermentiranog proizvoda na bazi kefira kao što su sokovi (Corona i sur., 2016), pivo (Rodrigues i sur., 2016) i fermentirani voćni sokovi (Randazzo i sur., 2016). Ovi trendovi ukazuju na to da postoji tržišna prilika za komercijalno iskorištavanje prirodno fermentiranih pića poput kefirnog napitka.

Međutim, svojstva i sastav ovih prirodno fermentiranih pića značajno variraju ovisno o uvjetima fermentacije. S obzirom na njihovu složenost, uspješno komercijalno iskorištavanje zahtijeva detaljnu istragu i proces optimizacije. Stoga je cilj ovoga rada optimirati biotehnološku proizvodnju kefirnog napitka na saharozi te ispitati korištenja sladila (stevie, eritrola i ksilitola) kao izvora ugljika za rast i aktivnost zrnca kefirnog napitka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEFIRNI NAPITAK

Kefirni napitak je gazirani napitak pripremljen dodatkom zrna kefirnog napitka u smjesu vode, šećera i najčešće sušenog voća. Zrna kefirnog napitka sastoje se od združene kulture bakterija i kvasca te polisaharida koje proizvode navedeni mikroorganizmi te služe kao inokulum (Pogačić i sur., 2013; Gulitz i sur., 2011). Nakon 2 do 4 dana fermentacije na sobnoj temperaturi pripremljen je gazirani napitak kiselog, alkoholnog i voćnog okusa (Gulitz i sur., 2013).

Proučavanje strukturne organizacije zrna kefirnog napitka skenirajućom i transmisijskom elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da površina zrna kefirnog napitka sadrži veću količinu mikroorganizama nego unutrašnjost zrna, koja je izgrađena od dekstrana (Moinas i sur., 1980). Osnovni lanac dekstrana koji izgrađuje unutrašnjost zrna kefirnog napitka građen je od glukoznih podjedinica povezanih α -(1,6) glikozidnim vezama te sadrži bočne ogranke povezane α -(1,3) glikozidnim vezama. Učestalost grananja ovog glukana može se izraziti kao odnos α -(1,3) : α -(1,6) glikozidnim vezama iznosi 0,11 (Horisberger, 1969).

Za razliku od zrna kefirnog napitka, zrnca mliječnog kefira građena su od kefirana, polisaharida građenog od glukoze i galaktoze u jednakom omjeru, proteina i različitih staničnih komponenata te mnogih drugih nedefiniranih sastojaka (Pogačić i sur., 2013.) Kefirni napitak se pojavljuje diljem svijeta pod mnoštvom imena kao što su biljka đumbirovog piva, tibicos, tibetansko zrno, kalifornijska pčela, afrička pčela, ale orasi, zrno japanskog piva i zrno šećernog kefira (Gulitz i sur., 2013).

Zrna kefirnog napitka (slika 1) mogu biti bijele ili žute boje, prozirna, krhke strukture i netopljiva u vodi.



Slika 1. Zrna kefirnog napitka (vlastita fotografija)

2.2. MIKROBIOLOŠKI SASTAV ZRNA KEFIRNOG NAPITKA

Zrna kefirnog napitka sadrže združenu kulturu različitih vrsta kvasaca, bakterija mliječne kiseline i bakterije octene kiseline. Procjenjuje se kako su bakterije prisutne u vodenim zrnima u količini od $10^6 - 10^8$ stanica/g, dok su kvasci prisutni u količini od $10^6 - 10^7$ stanica/g zrna kefirnog napitka (Gulitz i sur., 2011). Kefirni napitaki iz različitih regija posjeduju drugačije vrste mikroorganizama. Popis pronađenih kvasaca i bakterija prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Popis pronađenih kvasaca i bakterija u zrnu kefirnog napitka iz različitih regija

Kvasci	Bakterije	Referenca
<i>Azymocandida mycoderma</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Acetobacteraceae</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i>	Ward, 1892
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Horisberger, 1969
<i>andida fimetaria</i> , <i>Candida acidothermophilum</i> , <i>Cryptococcus vini</i> , <i>Torulaspora pretoriensis</i> , <i>Zygorulaspora florentina</i>	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Pidoux i sur., 1988
<i>S. cerevisiae</i> , <i>Hanseniaspora valbyensis</i>	<i>Lb. casei</i>	Franzetti i sur., 1998
<i>S. cerevisiae</i> , <i>Kazachstania aerobia</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Lachancea meyersii</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>Lb. hilgardii</i> <i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Leuconostoc citreum</i>	Magalhães i sur., 2010
<i>Candida valdiviana</i> , <i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Pichia cecembensis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Ac. lovaniensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Gluconobacter liquefaciens</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lactobacillus satsumensis</i> , <i>Lactobacillus sunki</i>	Magalhães i sur., 2011
<i>H. valbyensis</i> , <i>Lachancea fermentati</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Z. florentina</i>	<i>Acetobacter fabarum</i> , <i>Acetobacter orientalis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lactobacillus hordei</i> , <i>Lactobacillus nagelii</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	Gulitz i sur., 2011
-	<i>Acetobacter</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i>	Gulitz i sur., 2013

2.2.1. Kvasci

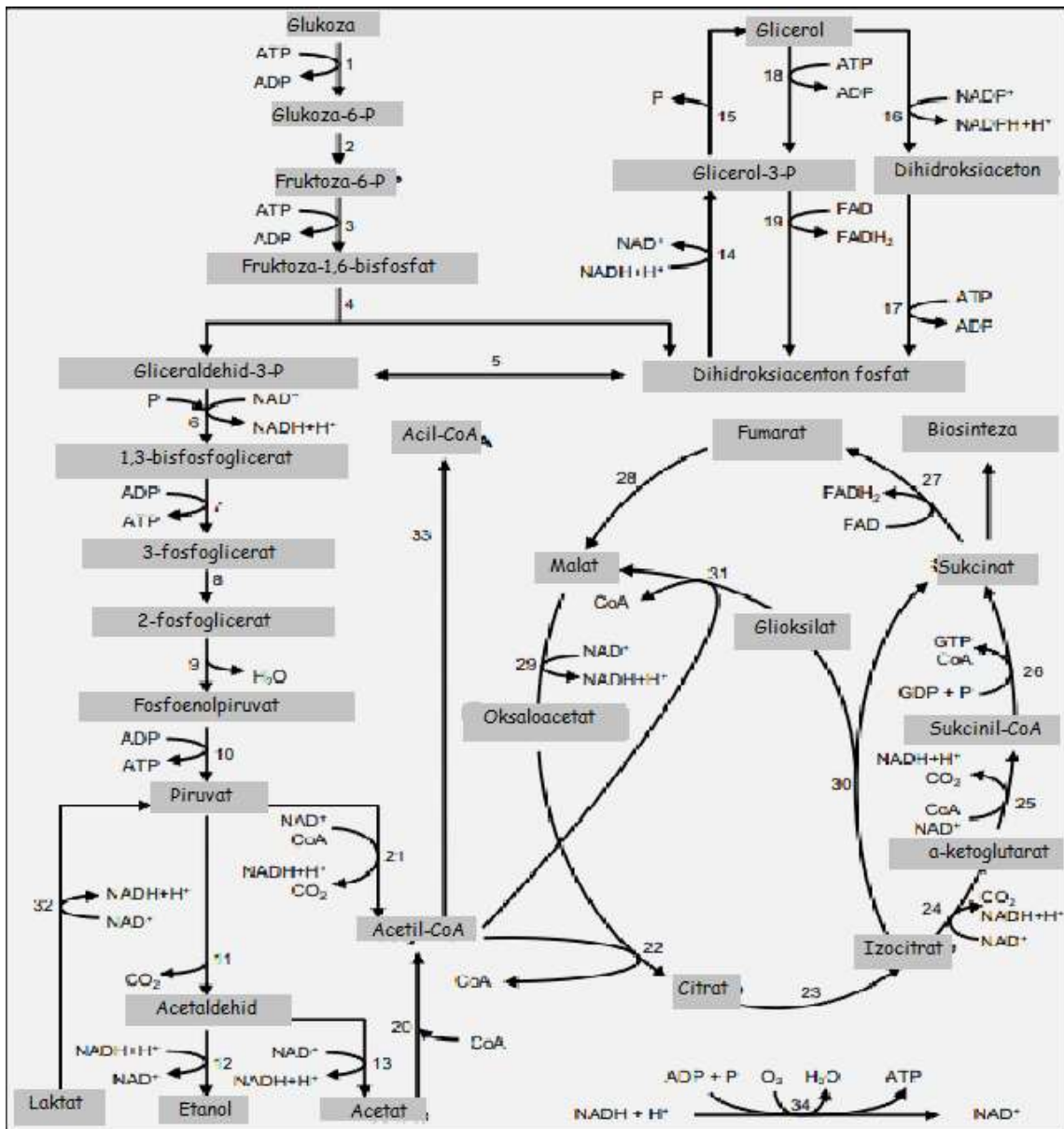
Kvasci su jednostanični eukariotski mikroorganizmi koji pripadaju carstvu gljiva. Razmnožavaju se najčešće nespolno pupanjem, no neke vrste se mogu i spolno razmnožavati, kao što je *Brettanomyces bruxellensis*. Većina kvasaca su mezofili, te imaju optimalnu temperaturu za rast u rasponu od 20 do 30 °C. Postoje i psihrofilni kvasci s optimalnom temperaturom za rast od 2 do 10 °C, kao što su kvasci iz rodova *Saccharomyces* i *Zygosaccharomyces*, dok svega nekolicina kvasaca se može kategorizirati kao termofilni kvasci s optimalnom temperaturom rasta većom od 40 °C (Kurtzman i sur., 2011), npr. kvasac *Candida austromarina* (Raspor i Zupan, 2006).

Kvasci mogu rasti u širokom rasponu pH vrijednosti, preferiraju „kiseli okoliš“ (pH 4,5–7,0), no većina raste i pri vrlo niskim pH vrijednostima od 2,5 jedinica. Većina kvasaca može tolerirati masenu koncentraciju saharoze do 50 %, dok oni iz roda *Zygosaccharomyces* kao ekstremno osmotolerantni mogu tolerirati i preko 70 % masene koncentracije saharoze u otopini. Kvasci izloženi stresnim uvjetima sposobni su brzo se adaptirati na nove uvijete zahvaljujući modifikaciji puteva genske ekspresije (Guerzoni i sur., 2013).

Metaboliziraju glukozu Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) putem u citosolu, konvertirajući glukozu u piruvat čime generiraju energiju u obliku ATP i reducirajućih koenzima NADH. Glavni metabolički putevi prikazani su na slici 2. U anaerobnim uvjetima piruvat se dekarboksilira u acetaldehid koji se zatim reducira u etanol radi reoksidacije NADH koenzima u NAD⁺. Aerobni uvjeti rasta uvjetuju konverziju piruvata u ugljikov dioksid, NADH i acetyl-CoA. Acetyl-CoA se razgrađuje u TCA ciklusu radi dobivanja energije u obliku ATP (Rodrigues i sur., 2006).

Kvasci mogu kao supstrat koristiti mnoge monosaharide i disaharide kao što su glukozu, fruktozu, galaktozu, maltozu i saharozu. Saharozu se hidrolizira na glukozu i fruktozu pomoću izvanstaničnih enzima invertaza, dok se maltoza transportira u stanicu pomoću maltoza permeaze, a zatim se hidrolizira do glukoze. Korištenje maltotrioze i viših maltosaharida ovisi o vrsti i soju kvasca (Steensels i sur., 2015; Walker, 2000).

Kvasce se rijetko povezuje s bolestima uzorkovanima trovanjem hranom. Vrste uobičajno pronađene u hrani su klasificirane kao oportunistni patogeni, kao što je slučaj sa *S. cerevisiae*, *W. anomalus* i *K. marxianus* (Daniel i sur., 2011).



Slika 2. Glavni metabolički putevi kod kvasca (Kurtzman i sur., 2011)

2.2.2. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su Gram-pozitivne bakterije okarakterizirane određenim morfološkim, metaboličkim i fiziološkim obilježjima (Axelsson, 2004). Vrste koje prevladavaju u fermentiranoj hrani su *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* i

Weissella. Riječ je o štapićastim ili sferičnim bakterijama koje se pojavljuju same, u grupama ili povezane u lance (Axelsson, 2004).

Prema svojem metabolizmu mogu biti klasificirane kao obligatno homofermentativne, fakultativno heterofermentativne i obligatno heterofermentativne (Pasteris i de Saad, 2009). Obligatno homofermentativne bakterije mliječne kiseline metaboliziraju glukozu EMP putem te proizvode laktat kao krajnji produkt pri čemu generiraju 2 mola ATP-a po molu glukoze. Piruvat se koristi kao akceptor elektrona te se reducira u laktat kako bi se reoksidirao NADH. Fakultativno heterofermentativne bakterije mliječne kiseline provode homolaktičnu fermentaciju glukoze i heterolaktičnu fermentaciju glukonata i pentoza. Pentoze se najprije konvertiraju u ksilulozu-5-fosfat koja ulazi u put heterolaktične fermentacije pri čemu nastaju mliječna kiselina i etanola u jednakim omjerima. Obligatno heterofermentativne bakterije metaboliziraju glukozu i pentoze putem pentoza fosfata (PPP) te provode heterolaktičnu fermentaciju gdje uz mliječnu kiselinu nastaje ugljikov dioksid i etanol kao krajnji produkti metabolizma. Tijekom fermentacije generira se 1 mol ATP-a po molekuli glukoze (Axelsson, 2004).

Bakterije mliječne kiseline su poznati proizvođači egzopolisaharida. Egzopolisaharidi mogu biti klasificirani kao homo- ili heteropolisaharidi (De Vuyst i De Vin, 2007). Heteropolisaharidi su sastavljeni od ponavljajućih jedinica od do osam ugljikohidratnih jedinica, najčešće glukoze i galaktoze, te se obično proizvode u niskim koncentracijama ($0,05 - 0,5 \text{ g L}^{-1}$). Ponavljajuće jedinice se sintetiziraju unutarstanično te se prenose u okolinu stanice gdje se polimeriziraju. Na sličan način se proizvodi i kefiran (Mukai i sur., 1990). Homopolisaharidi su građeni od jedne vrste monosaharida i obično se proizvode u visokim koncentracijama ($> 10 \text{ g L}^{-1}$). Najčešće su sintetizirani iz saharoze pomoću vanstaničnih enzima transglikolaza. Navedeni enzimi prenose jedan monosaharid od glikozidnog donora na akceptor, dekstran, dok drugi monosaharid otpuste u otopini (Degeest i De Vuyst, 1999). Egzopolisaharidi imaju različite komercijalne primjene, te se mogu koristiti kao emulgatori, nosači i stabilizatori hrane, pića, farmaceutskih pripravaka i drugih proizvoda (De Vuyst i Vaningelgem, 2003).

2.2.3. Bifidobakterije

Bifidobakterije su Gram-pozitivne bakterije, obligatni anaerobi, koji su nekada bili klasificirani kao bakterije mliječne kiseline, upravo zbog toga što im je laktat glavni produkt metabolizma šećera (Ballongue, 2004).

Metabolizam bifidobakterija se temelji na enzimu fruktoza-6-fofat fosfokatalazi te razgranji glukoze fosfoketolaznim putem poznatijim kao „*bifidus shunt*“. Glukoza se razgrađuje fosfoketolaznim putem u octenu i mliječnu kiselinu u omjeru 3 : 2. Bifidobakterije također mogu konvertirati piruvat u mravlju i octenu kiselinu ili mravlju kiselinu i etanol (Van der Meulen i sur., 2006). Također posjeduju enzime β -fruktofuranozidaze koje mogu hidrolizirati saharozu i fruktooligosaharide u glukozu i fruktozu (De Vuyst i sur., 2016). Brojni pripadnici skupine bifidobakterija, kao što su *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve* i *Bifidobacterium longum* mogu sintetizirati različite heteropolisaharide koji mogu poslužiti kao nosači stanica i za interakcije u komenzalizmu, ili pak kao zaštita od patogena. U nekim slučajevima ovi polisaharidi mogu biti supstrati za druge vrste mikroorganizama (Salazar i sur., 2015).

Bifidobakterije se obično povezuju s ljudskim probavnim traktom gdje imaju važnu ulogu u razgradnji kompleksnih polisaharida (De Vuyst i sur., 2016). Također su pronađene u fermentiranoj hrani kao što su sir, fermentirano mlijeko, mliječni kefir i kefirni napitak (Watanabe i sur., 2009; Delcenserie i sur., 2007).

2.2.4. Bakterije octene kiseline

Bakterije octene kiseline su Gram-negativne, štapićaste bakterije izrazito otporne na niske pH vrijednosti te su obligatni aerobi. Mogu oksidirati alkohole, monosaharide i šećerne alkohole. Glavni produkt metabolizma im je octena kiselina koju proizvode zahvaljujući membranski vezanima alkohol i aldehid dehidrogenazama.

Nalaze se u brojnim pripravcima kao što su tekila, palmino vino, cider, pivo, kefir (De ley i sur., 1984). Bakterije octene kiseline su uključene u brojne industrijske procese, kao što

je proizvodnja octa, te proizvodnja celuloze i sorboze (Gonzales, 2005). U nekim granama prehrambene industrije uzrokuju kvarenje proizvoda, npr. u vinarstvu (Bartowsky i Henschke, 2008).

Oksidiraju glukozu s dva alternativna puta. Prvi se odvija unutar stanice, a drugi izvan stanice. Izvanstanični put zahtjeva nastanak glukonske i ketoglukonske kiseline. Obje reakcije su katalizirane glukozna dehidrogenazama (Kulka i Walker, 1954). Bakterije octene kiseline su mezofilni mikroorganizmi s optimalnom temperaturom rasta između 25 i 30 °C. Neki sojevi, kao što *Gluconacetobacter azotocaptans* i *A. nitrogenifigens* mogu fiksirati atmosferski dušik (Dutta i Gachhui, 2006).

Nedavno je otkrivena vrsta bakterije octene kiseline koja je patogena. Pronađena je u limfnim čvorovima pacijenta koji je bolovao od kronične granulomatozne bolesti (Segal i sur., 2000). Nazvana je *Granulibacter bethesdensis*, a karakterizira je to što je fakultativni metilotrof. Preferira više optimalne temperature za rast (35 - 37 °C) za razliku od ostalih bakterija octene kiseline koje preferiraju optimalnu temperaturu između 25 i 30 °C.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu, kao radni mikroorganizmi, korištena su zrna kefirnog napitka dobivenog iz privatnog uzgoja (slika 1).

3.1.2. Kemikalije

Popis, čistoća i podrijetlo kemikalija korištenih u ovom radu za pripremu hranjivih podloga i otopina naveden je u tablici 2.

Tablica 2. Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu hranjivih podloga i otopina

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
saharoza	99+ %	Liofilchem, Italija
glukoza	99+ %	Fisher BioReagents, SAD
fruktoza	99+ %	Fisher BioReagents, SAD
octena kiselina	99+ %	Liofilchem, Italija
manitol	99+ %	Molekula, UK
glicerol	> 98 %	Acros Organics, SAD
etanol	99 %	Acros Organics, SAD
dl-mliječna kiselina	85 %	Sigma-Aldrich, SAD
stevia	99+ %	Acros Organics, Kina
ksilitol	99+ %	Sigma-Aldrich, SAD
eritrol	99+ %	Gram-Mol, Hrvatska
cinkov sulfat 7-hidrat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
sumporna kiselina	za UPLC, 96 %	Merk, Njemačka
<i>n</i> -butanol	99+ %	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.3. Hranjive podloge

Kultura kefirnog napitka održavana je u vodenoj otopini saharoze koncentracije 100 g L⁻¹. Kultura je čuvana staklenoj posudi volumena 500 mL.

Hranjive podloge koje su se koristile za određivanje rasta i aktivnosti kefirnog napitka na različitim koncentracijama supstrata sadržavale su 20, 40, 60, 80 i 100 g L⁻¹ otopine saharoze te otopine stevie, eritrola i ksilitola od 20 g L⁻¹. Uzgoj se odvijao u 150 mL podloge pomoću staklenih posuda volumena 250 mL.

3.1.4. Aparatura i pribor

3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), sastoji se od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H⁺, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim predkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL, a protok mobilne faze (0,0025 M H₂SO₄) 0,6 mL min⁻¹.

3.1.4.2. Sustav za plinsku kromatografiju

Sustav za plinsku kromatografiju sastoji se od dva uređaja: sustava za uzorkovanje Headspace Sampler 40XL (Perkin-Elmer, SAD) i plinskog kromatografa AutoSystem XL (Perkin-Elmer, SAD; slika 3) koji se sastoji od uređaja za grijanje kolone, kolone (ZB-5MS, Zebron Phenomenex 60 m x i.d. 0,24 mm ID x 0,50 μm d_r), FID detektora i računalnog programa (TotalChrome).



Slika 3. Plinski kromatogram „Perkin Elmer Autosystem XL-GC (Perkin Elmer, SAD) uz pripadajući sustav za uzorkovanje „Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL“ (Perkin Elmer, SAD)

3.1.4.3. Ostala aparatura

- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka)
- autoklav Sutjeska (Beograd, Jugoslavija);
- sušionik Instrumentaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprava hranjivih podloga

Zrnca kefirnog napitka korištena u ovom radu čuvana su u staklenoj posudi volumena 0,5 L s masenom koncentracijom saharoze od 100 g L^{-1} .

Podloge za uzgoj kefirnog napitka na saharozi pripremljene su tako što se u 0,150 L vodovodne vode otopila izračunata masa saharoze kako bi se postigle koncentracije od 20, 40, 60, 80 i 100 g L^{-1} . Podloge za uzgoj na stevi, eritrolu i ksilitolu pripremljene su na identičan način u koncentraciji od 20 g L^{-1} .

Tako pripremljene podloge u staklenim posudama volumena 250 mL sterilizirane su u autoklavu ($121 \text{ °C}/20 \text{ min}$).

3.2.2. Određivanje rasta i aktivnosti kefirnog napitka na različitim koncentracijama saharoze pri različitim temperaturama

Rast i aktivnost kefirnog napitka određivana je pri različitim koncentracijama supstrata te pri različitim temperaturama. Korišteni supstrati bili su saharoza, stevia, eritrol i ksilitol. Uzgoj kefirnog napitka proveden je u tekućim hranjivim podlogama pripremljenim kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. Za inokulaciju podloga korišteno je 10 g zrnaca kefirnog napitka.

Preliminarni uzgoji kefirnog napitka provedeni su pri različitim koncentracijama saharoze (20, 40, 60, 80 i 100 g L^{-1}) kako bi se odredila koncentracije saharoze koja ne inhibira rast kefirnog napitka. Navedeni uzgoji su provedeni pri temperaturi od 25 °C .

Nakon određivanja optimalnih uvjeta uzgoja, proveden je uzgoj kefirnog napitka pri koncentracijama od 40 i 60 g L^{-1} saharoze i 20 g L^{-1} stieve, eritrola i ksilitola, te pri temperaturama od 20, 25, 30 i 40 °C . Sve podloge u glavnom uzgoju su inokulirane s $10 \pm 0,1664 \text{ g}$ zrnaca kefirnog napitka i uzgajane 31 dan u anaerobnim uvjetima.

Nakon izuzimanja uzorka, uzorci su centrifugirani pri 6500 okretaja u minuti tijekom 5 minuta. Dobiveni supernatant korišten je za određivanje koncentracije supstrata i produkata

UPLC metodom (poglavlje 3.3.2.). Odabrani supernatanti uzoraka korišteni su za određivanje hlapivih spojeva HS-GC-FID metodom (poglavlje 3.3.3.). Na kraju i na početku uzgoja određena je koncentracija zrnaca kefirnog napitka (3.3.1.).

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase kefirnog napitka

Nakon izuzimanja uzorka, određen volumen uzoraka prenesen je u prethodno izvaganu plastičnu kivetu s čepom te je zatim stavljen na centrifugiranje 5 minuta pri 6000 okretaja/min (centrifuga SL 8R ThermoScientific; Waltham, Massachusetts, SAD). Nakon centrifugiranja supernatant je izdvojen, a talog je stavljen na sušenje u sušionik pri 100 °C do konstantne mase. Nakon toga kivete su ohlađene u eksikatoru te im je izvagana masa. Koncentracije biomase zrnaca kefirnog napitka X ($g L^{-1}$) određena je prema sljedećoj ovisnosti:

$$X = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{uz}} \quad (g L^{-1}) \quad [3-1]$$

m_{ok} - masa osušene kivete s biomasom [g]

m_{pk} - masa prazne kivete [g]

V_{uz} - volumen uzorka [L]

3.3.2. UPLC analiza

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) korištena je za praćenje koncentracije supstrata i produkata feremnacije u uzorcima izuzetim tijekom proizvodnje kefirnog napitka. Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M sumporna kiselina s protokom 0,6 mL min⁻¹. Volumen uzorka za

injektiranje je iznosio 10 μL . Za razdvajanje komponenti uzorka korištena je analitička kolona Rezex ROA-Organic Acid H+, (dimenzija 150 \times 7,8 mm, Phenomenex, SAD) s odgovarajućom predkolonom pri 30 °C. Detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID) primijenjen je za detekciju, a OpenLAB CDS računalni program za obradu podataka. Priprema uzorka za UPLC analizi provedena je kako je to opisano u poglavlju 3.3.2.1.

3.3.2.1. Priprema uzoraka za UPLC analizu

Supernatant dobiven nakon centrifugiranja korišten je za pripremu uzoraka za UPLC analizu. Po 750 μL supernatanta uzorka dodano je u 750 μL otopine cinkovog sulfata heptahidrata koncentracije 100 g L⁻¹. Dobivena otopina zatim se intenzivno izmiješala 20 sekundi i ostavila na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta. Nakon toga uzorci su centrifugirani 7 minuta na 6500 o/min. Centrifugiranjem su istaloženi proteini i nečistoće. Tako dobiven uzorak zatim je razrijeđen tako što smo 200 μL uzorka dodali u 800 μL demineralizirane vode. Razrijeđeni uzorci su zatim profiltrirani kroz filter s porama veličine 0,20 μm . Tako pripremljeni uzorci korišteni su za UPLC analizu.

3.3.3. Određivanje hlapivih komponenti plinskom kromatografijom (HS-GC-FID)

Analiza lako hlapivih spojeva kefirnog napitka (esteri, aldehidi i viši alkoholi) provedena je na plinskom kromatogramu „Perkin Elmer Autosystem XL-GC“ (Perkin Elmer, SAD) uz pripadajući sustav za uzimanje uzoraka „Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL“ (Perkin Elmer, SAD; slika 3).

Supernatant dobiven nakon centrifugiranja (poglavlje 3.2.2.) korišten je za pripremu uzoraka za GC analizu. 5mL supernatanta dodano je u GC vijalu zajedno s 4,9 mL 10 % otopine apsolutnog etanola i 100 μL 5 % otopine čistog *n*-butanola. Tako pripremljeni uzorci su korišteni za GC analizu.

Tablica 3. Uvjeti pri kojima se provodila analiza lako hlapivih komponenti

Kolona:	ZB-5MS (Zebron, Phenomenex), 60m x 0,25 mm I.D. x 0,50 μm d_f temp. limits -60 °C – 325/350 °C (isothermal/program)
Plin nosilac/ tlak	He / 2,74 bar
HS uvjeti	
O/N/T	80/100/110 °C
Vrijeme termostatiranja	20 min
vrijeme tlačenja uzorka	0,2 min
Vrijeme injektiranja	0,05 min
GC uvjeti	
Temperatura injektora	110 °C
Temperatura detektora	250 °C
Temperaturni program	35 °C, 5 min 10 °C/min, 60 °C 60 °C, 2 min 10 °C/min, 180 °C 180 °C, 7 min

3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI

3.4.1. Prinos biomase zrnaca kefirnog napitka (Y_X)

$$Y_X = X - X_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [3-2]$$

X_0 - početna koncentracija biomase zrnaca kefirnog napitka $[\text{g L}^{-1}]$

X - konačna koncentracija biomase zrnaca kefirnog napitka $[\text{g L}^{-1}]$

3.4.2. Prinos produkta (Y_P)

$$Y_P = P - P_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [3-3]$$

P_0 - početna koncentracija produkta $[\text{g L}^{-1}]$

P - konačna koncentracija produkta $[\text{g L}^{-1}]$

Gdje P može biti etanol (EtOH), octena kiselina (HAc) i mliječna kiselina (MK)

3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu zrnaca kefirnog napitka ($Y_{X/S}$)

$$Y_{X/S} = \frac{(X-X_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{Y_X}{\Delta S} \quad [g \ g^{-1}] \quad [3-4]$$

S_0, X_0 - početne koncentracije supstrata, odnosno biomase zrnaca kefirnog napitka [$g \ L^{-1}$],

S, X - konačne koncentracije supstrata, odnosno biomase zrnaca kefirnog napitka [$g \ L^{-1}$],

(Marić i Šantek, 2009).

3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)

$$Y_{P/S} = \frac{(P-P_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [g \ g^{-1}] \quad [3-5]$$

S_0, P_0 - početna koncentracija supstrata, odnosno produkta [$g \ L^{-1}$],

S, P - konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta [$g \ L^{-1}$],

(Marić i Šantek, 2009).

3.4.5. Produktivnost (Pr)

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_P}{t_U} \quad [g \ L^{-1} \ h^{-1}] \quad [3-6]$$

Y_X - prinos biomase zrnaca kefirnog napitka [$g \ L^{-1}$]

Y_P - prinos produkta [$g \ L^{-1}$]

t_U - ukupno vrijeme bioprocesa [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

Proizvodnja kefirnog napitka nema značajnu industrijsku proizvodnju, već je ista bazirana na proizvodnji za osobne potrebe u kućanstvu. Stoga uvjeti pri kojima se provodi fermentacije značajno variraju, npr. fermentacije se provode pri temperaturama od 21 do 25 °C tijekom 24 do 72 h i uz dodatak saharoze od 6 do 10 % (Verce i sur., 2019). Pronalaženje optimalnih uvjeta za provođenje fermentacije sa zrnima kefirnog napitka mogu pomoći ujednačavanju sastava samog konačnog proizvoda i povećanju produktivnost procesa proizvodnje.

U ovom radu su provedene fermentacije sa zrnima kefirnog napitka u vodenoj otopini saharoze različite koncentracije (20, 40, 60, 80 i 100 g L⁻¹) pri sobnoj temperaturi (25 °C) kako bi se odredila koncentracija saharoze koja nema inhibitorni učinak na rast i aktivnost zrnaca kefirnog napitka. Zatim su, s ciljem određivanja optimalne temperature za rast i aktivnost zrnaca kefirnog napitka, provedene fermentacije s zrnima kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 40 i 60 g L⁻¹ pri različitim temperaturama (20, 25, 30 i 40 °C).

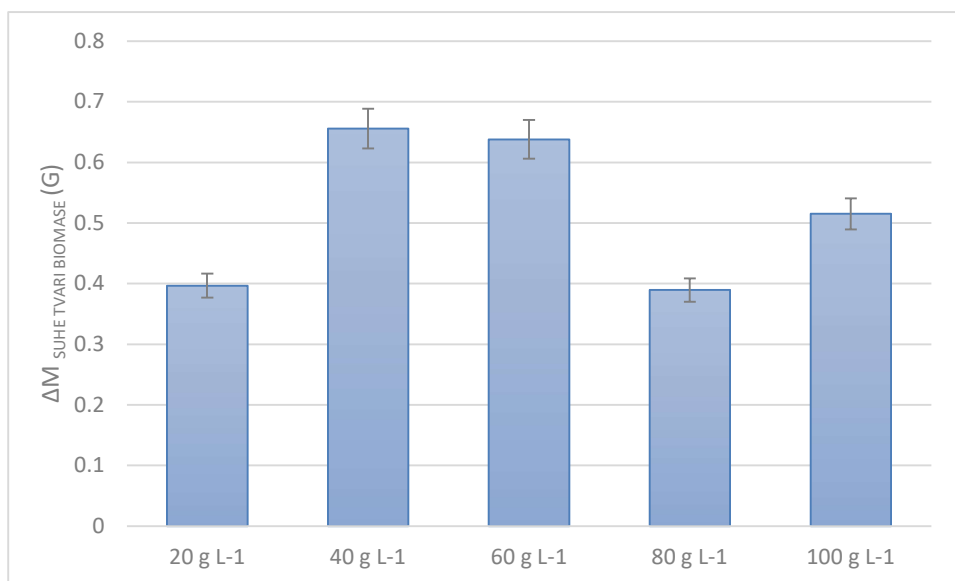
Dodatno, u svrhu formuliranja okusa konačnog proizvoda istražen je utjecaj različitih sladila, šećernih alkohola (ksilitol i eritrol) i stevije na rast i aktivnost mikroorganizama prisutnih u zrnima kefirnog napitka.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- a) Određivanje optimalne koncentracije saharoze za provođenje fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka
- b) Određivanje optimalne temperature za provođenje fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka
- c) Određivanje rasta i aktivnosti zrnaca kefirnog napitka na ksilitolu, eritrolu i stevii

4.1. ODREĐIVANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE SAHAROZE ZA PROVOĐENJE FERMENTACIJE S POMOĆU ZRNACA KEFIRNOG NAPITKA

Određivanje rasta i aktivnosti zrnaca kefirnog napitka provedeno je u vodenoj otopini saharoze različitih koncentracija (20, 40, 60, 80 i 100 g L⁻¹ saharoze) i pri 25 °C. Također, UPLC analizom (poglavlje 3.3.2.) određene su koncentracije supstrata i produkata poput etanola, octene i mliječne kiseline. Uzorci su ostavljeni 14 dana kako bi proučili učinak različitih koncentracija supstrata na aktivnost zrnaca kefirnog napitka, odnosno združene kulture mikroorganizama prisutnih u zrnacima kefirnog napitka. Na slici 4 prikazan je prirast suhe tvari biomase zrnaca kefirnog napitka pri različitim koncentracijama supstrata, a u tablici 4 prikazane su koncentracije supstrata, razgradnih produkata saharoze (glukoze i fruktoze), te produkata metabolizma združene kulture mikroorganizama prisutnih u zrnacima kefirnog napitka.



Slika 4. Prirast suhe tvari biomase zrnaca kefirnog napitka nakon 14 dana fermentacije

Iz rezultata prikazanih na slici 4, vidljivo je kako je najveći prirast suhe tvari biomase određen pri koncentraciji saharoze od 40 odnosno 60 g L⁻¹ ($\Delta m_{40 \text{ g L}^{-1}} = 0,6561 \text{ g}$, $\Delta m_{60 \text{ g L}^{-1}} = 0,6381 \text{ g}$). Pri koncentraciji saharoze od 20 i 80 g L⁻¹ prirast biomase kefirnog napitka je za oko 38 % manji od prirasta pri 40 odnosno 60 g L⁻¹ saharoze. Određivanje optimalne koncentracije supstrata korištene tijekom proizvodnje kefirnog napitka omogućuje povećanje

prinosa i produktivnost procesa, sprečavajući pojavu inhibicije supstratom, odnosno nedovoljne proizvodnje produkta fermentacije. Kako se prinos biomase zrnaca kefirnog napitka pri 40 i 60 g L⁻¹ gotovo i ne razlikuje, obje koncentracije su odabrane za daljnja istraživanja.

Tijekom rasta i aktivnosti zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze detektirani su etanol, octena i mliječna kiselina, čije su koncentracije navedene u tablici 4. Tijekom 14 dana fermentacije nije utrošena sva sharoza iz podloge. Osim saharoze, u podlogama su detektirane i relativno visoke koncentracije glukoze i fruktoze, što upućuje na značajnu invertaznu aktivnost kvasaca. Pri koncentraciji od 60 - 100 g L⁻¹ saharoze određena je najveća koncentracija mliječne kiseline ($\gamma_{MK} = 0,33 - 0,40$ g L⁻¹), a pri koncentraciji od 20 g L⁻¹ najveća koncentracija octene kiseline ($\gamma_{OK} = 0,76$ g L⁻¹). Iz navedenog, moglo bi se pretpostaviti da visoka koncentracija saharoze u podlozi ne djeluje jednako na sve mikroorganizme prisutne u zrcima kefirnog napitka, odnosno da mikroorganizmi prisutni u zrcima kefirnog napitka nemaju jednaku otpornost na inhibitorno djelovanje povišene koncentracije saharoze. Koncentracija etanola u podlogama varira od 2,10 do 2,80 g L⁻¹, te je najmanje etanola određeno pri koncentraciji saharoze od 20 g L⁻¹. Glicerol i manitol nisu detektirani.

Tablica 4. Koncentracije određenih metabolita UPLC analizom na kraju uzgoja u trajanju od 14 dana

Koncentracija saharoze (g L ⁻¹)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Fruktoza (g L ⁻¹)	Glukoza (g L ⁻¹)	Saharoza (g L ⁻¹)	ΔS (g L ⁻¹)	Y _{EtOH/S} (g g ⁻¹)
20 g L ⁻¹	0,22	0,76	2,10	0	0	6,80	2,90	2,80	17,2	0,12
40 g L ⁻¹	0,30	0,56	2,60	0	0	9,40	3,70	5,90	34,1	0,08
60 g L ⁻¹	0,34	0,52	2,50	0	0	10,00	4,80	33,20	26,8	0,08
80 g L ⁻¹	0,33	0,44	2,80	0	0	11,60	7,80	53,40	26,6	0,11
100 g L ⁻¹	0,40	0,40	2,70	0	0	23,30	9,90	51,00	49,0	0,05

$$\Delta S = S_0 - S \text{ (g L}^{-1}\text{)}$$

ΔS – utrošeni supstrat (g L⁻¹)

S₀ – početna koncentracija supstrata (g L⁻¹)

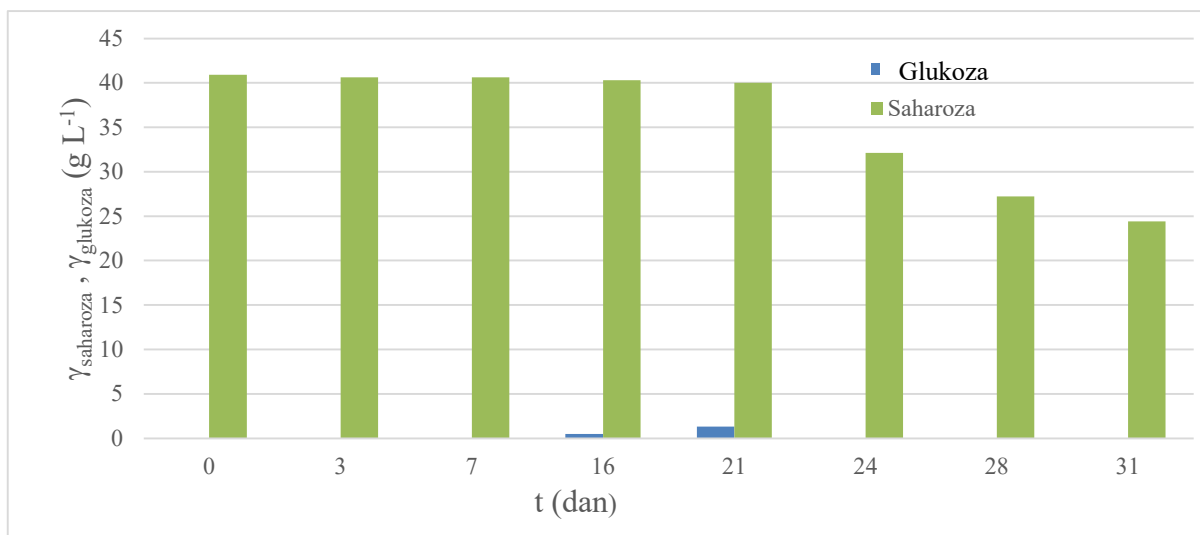
S – konačna koncentracija supstrata (g L⁻¹)

4.2. ODREĐIVANJE OPTIMALNE TEMPERATURE ZA PROVOĐENJE FERMENTACIJE S POMOĆU ZRNACA KEFIRNOG NAPITKA

Podloge koje sadržavaju saharozu u koncentracijama od 40 i 60 g L⁻¹ inokulirane su s $10 \pm 0,1664$ g zrnaca kefirnog napitka i uzgajane u anaerobnim uvjetima 31 dan pri različitim temperaturama (20, 25, 30 i 40 °C). UPLC analizom (poglavlje 3.3.2.) određene su koncentracije supstrata i produkata metabolizma poput etanola, octene kiseline i mliječne kiseline te GC analizom koncentracije hlapivih komponenti u odabranim uzorcima. Tijekom svih fermentacije određen je prirast biomase zrnaca kefirnog napitka, odnosno određena je koncentracija suhe tvari na kraju i početku uzgoja (poglavlje 3.3.1.). Rezultati ovog ispitivanja podijelili smo na određivanje rasta i aktivnosti kefirnog napitka pri koncentraciji saharoze od 40 g L⁻¹ i različitim temperaturama (poglavlje 4.2.1.) te pri koncentraciji od 60 g L⁻¹ i različitim temperaturama (poglavlje 4.2.2.).

4.2.1. Fermentacija s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 40 g L⁻¹ pri različitim temperaturama

Podloge sa saharozom koncentracije 40 g L⁻¹ inokulirane su sa $10 \pm 0,1664$ g zrnaca kefirnog napitka i fermentirane pri temperaturama od 20, 25, 30 i 40 °C kako bi proučili učinak različitih temperatura na metabolizam mikroorganizama prisutnih u zrnacima kefirnog napitka. Pretpostavka je da kulture prisutne u zrnacima kefirnog napitka imaju različite optimume za rast i proizvodnju različitih metabolita. Stoga je UPLC analiza (poglavlje 3.3.2.) korištena za određivanje koncentracije supstrata i različitih produkata fermentacije tijekom uzgoja (tablice 5-8 i slike 5-8) te je GC analizom (poglavlje 3.3.3.) određena koncentracija hlapivih komponenti na kraju uzgoja (tablica 14).



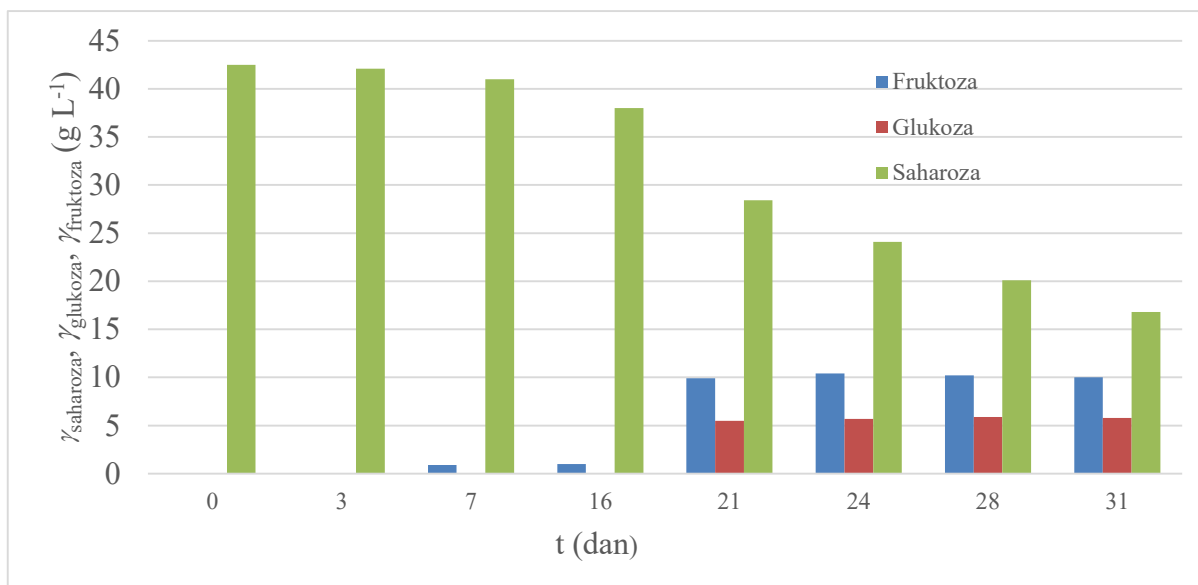
Slika 5. Prikaz promjene koncentracije saharoze i glukoze tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 40 g L⁻¹ pri 20 °C. Fruktaza nije detektirana u niti jednom uzorku

Tablica 5. Koncentracije metabolita proizvedenih s pomoću zrnaca kefirnog napitka tijekom fermentacije u otopini saharoze koncentracije 40 g L⁻¹ pri 20 °C

Vrijeme (dan)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0,20	0	0
7	0	0	0,20	0	0
16	0,17	0,21	0,20	0	0
21	0,38	0,33	0,30	0	0
24	0,41	0,40	0,50	0	0
28	0,46	0,46	0,70	0	0
31	1,13	0,56	0,80	0	0

Tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka pri 20 °C utrošeno je 16,5 g L⁻¹ saharoze (slika 5). Tijekom uzgoja zabilježen je vrlo niska koncentracije glukoze, dok fruktoza nije detektirana. Pojava glukoze i fruktoze u podlozi posljedica je invertazne aktivnosti kvasca prisutnih u zrnima kefirnog napitka (Laureys i De Vuyst, 2014).

UPLC analizom detektirani su etanol, mliječna kiselina i octena kiselina, dok drugi karakteristični metaboliti poput glicerola i manitola nisu detektirani tijekom ovog uzgoja. Maksimalna koncentracija etanola od 0,8 g L⁻¹ određena je nakon 31 dana uzgoja (tablica 5.). Octena kiselina detektirana je tek nakon 16. dana uzgoja te njena koncentracija raste do kraja uzgoja i konačnih 0,52 g L⁻¹. Mliječna kiselina također je detektirana 16. dan uzgoja te joj je na kraju uzgoja određena najveća koncentracija od 1,13 g L⁻¹.



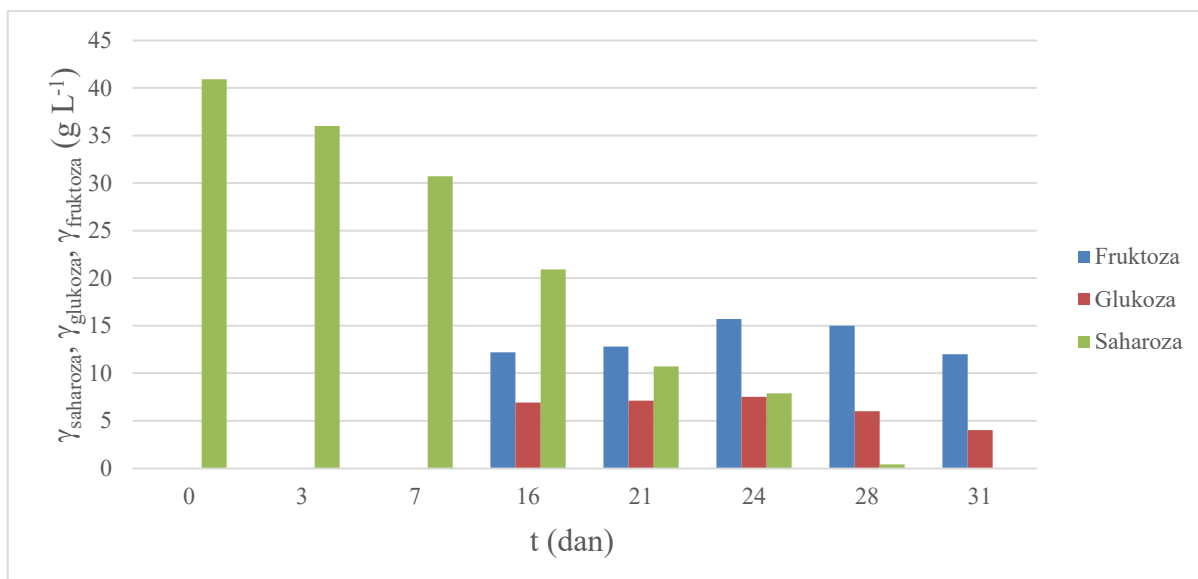
Slika 6. Promjena koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 40 g L⁻¹ pri 25 °C

Tablica 6. Koncentracije metabolita proizvedenih s pomoću zrnaca kefirnog napitka tijekom fermentacije u otopini saharoze koncentracije 40 g L⁻¹ pri 25 °C

Vrijeme (dan)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)
0	0	0	0	0	0
3	0,05	0	0,20	0	0
7	0,17	0,06	0,30	0	0
16	0,24	0,13	0,40	0	0
21	0,37	0,15	0,65	0	0
24	0,44	0,47	0,65	0	0
28	0,76	0,47	0,65	0	0
31	1,14	0,48	0,65	0	0

Potrošnja saharoze započinje nakon 16. dana uzgoja, što objašnjavamo duljom fazom prilagodbe na uvjete u kojima se nalazi mikroorganizmi. Tijekom ovog uzgoja iz podloge je utrošeno i/ili hidrolizirano $25,7 \text{ g L}^{-1}$ saharoze. Tijekom ovog uzgoja detektirane su i značajne koncentracije glukoze ($\gamma = 5,8 \text{ g L}^{-1}$) i fruktoze ($\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$; tablica 6).

Koncentracija etanola trećeg dana uzgoja iznosi $0,2 \text{ g L}^{-1}$ te raste do 21. dana uzgoja kada koncentracija raste do konačnih $0,65 \text{ g L}^{-1}$ na kraju uzgoja što je ujedno najveća zabilježena koncentracija etanola pri uzgoju na 40 g L^{-1} saharoze. Početak rasta koncentracije etanola poklapa se s početkom ubrzanog trošenja saharoze u uzorku. Octena kiselina je detektirana sedmog dan uzgoja u koncentraciji od $0,06 \text{ g L}^{-1}$ te njena koncentracija raste sve do zadnjeg dana uzorkovanja kada njena koncentracija iznosi $0,48 \text{ g L}^{-1}$. Mliječna kiselina detektirana je trećeg dana uzgoja te joj je na kraju uzgoja određena najveća koncentracija od $1,14 \text{ g L}^{-1}$. Manitol i glicerol nisu detektirani u cijelom trajanju uzgoja.



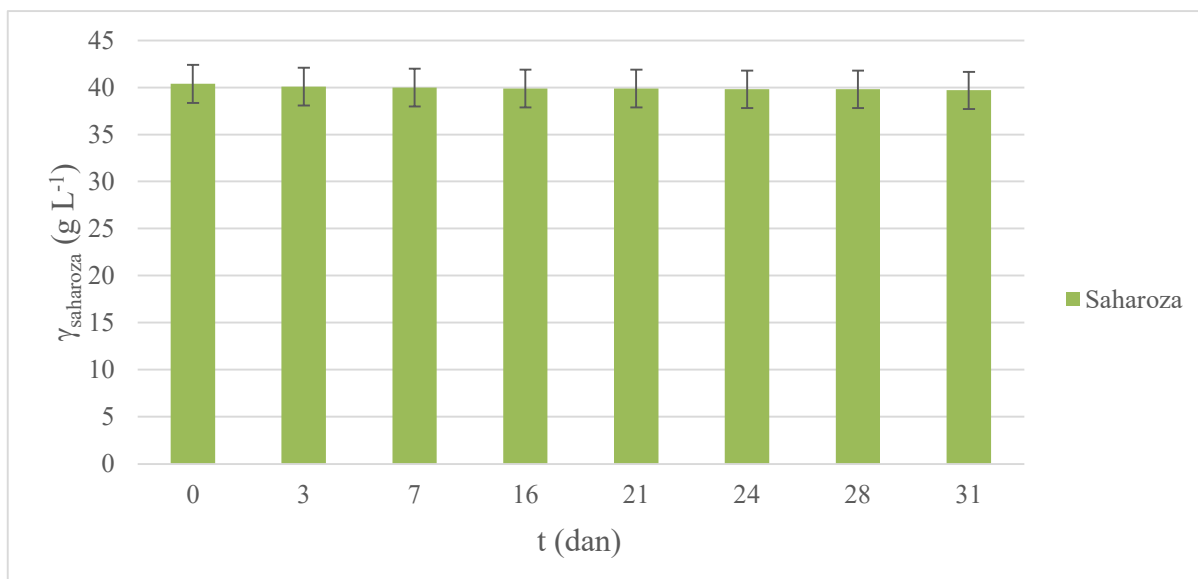
Slika 7. Promjena koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 40 g L⁻¹ pri 30 °C

Tablica 7. Koncentracije metabolita proizvedenih s pomoću zrnaca kefirnog napitka tijekom fermentacije u otopini saharoze koncentracije 40 g L⁻¹ pri 30 °C

Vrijeme (dan)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)
0	0	0	0	0	0
3	0,18	0	0,30	0	0
7	0,25	0,06	0,40	0	0
16	0,31	0,15	0,50	0	0
21	0,42	0,16	0,50	0	0
24	0,46	0,27	0,50	0	0
28	0,70	0,36	0,50	0	0
31	1,17	0,56	0,50	0	0

Potrošnja saharoze, u odnosu na fermentacije pri 20 °C odnosno 25 °C, vidljiva je već nakon 1. dana uzgoja, te je saharoza do kraja uzgoja potpuno iscrpljena iz podloge (slika 7). Vrlo visoke koncentracije fruktoze i glukoze detektirane su nakon 16 dana uzgoja što bi značilo da je aktivnost mikroorganizama prisutnih u zrnima kefirnog napitka nakon 16 dana vrlo mala, ali da invertazna aktivnost kvasca je i dalje vrlo visoka. Koncentracija ovih monosaharida raste do 24. dana uzgoja kada postižu koncentraciju od 15,7 g L⁻¹ za fruktozu i 7,5 g L⁻¹ za glukozu. Nakon 24. dana kada koncentracija saharoze pada ispod 7,9 g L⁻¹ započinje i paralelno trošenje fruktoze i glukoze. Promatrani uzgoj je jedini uzgoj od svih provedenih u sklopu ovog rada u kojem je u potpunosti potrošena sva saharoza. Iz toga zaključujemo kako je 30 °C optimalna temperatura za uzgoj kefirnog napitka pri 40 g L⁻¹ saharoze kao supstrata.

Etanol je detektiran trećeg dana uzgoja u koncentraciji od 0,3 g L⁻¹ te mu se koncentracija nastavlja povećavati do 16. dana uzgoja kada postiže 0,5 g L⁻¹. Do kraja uzgoja ne dolazi do daljnjeg porasta. Octena kiselina u koncentraciji od 0,06 g L⁻¹ detektirana je sedmog dana uzgoja te raste sve do zadnjeg dana uzgoja kada koncentracija iznosi 0,56 g L⁻¹. Mliječna kiselina detektirana je trećeg dana uzgoja te joj je na kraju uzgoja određena najveća koncentracija od 1,17 g L⁻¹. Manitol i glicerol nisu detektirani u cijelom trajanju uzgoja.



Slika 8. Promjena koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 40 g L⁻¹ pri 40 °C

Tablica 8. Koncentracije metabolita proizvedenih s pomoću zrnaca kefirnog napitka tijekom fermentacije u otopini saharoze koncentracije 40 g L⁻¹ pri 40 °C

Vrijeme (dan)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0,20	0	0
7	0	0	0,30	0	0
16	0	0	0,30	0	0
21	0	0	0,30	0	0
24	0,08	0,10	0,30	0	0
28	0,08	0,10	0,30	0	0
31	0,11	0,10	0,30	0	0

Tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 40 g L^{-1} pri temperaturi od $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ne dolazi do značajne promjene početne koncentracije saharoze (slika 8), a niti značajne koncentracije metabolita (tablica 8). Stoga se može zaključiti da je temperatura od $40 \text{ }^\circ\text{C}$ previsoka za rast i aktivnost mikroorganizama prisutnih u zrcima kefirnog napitka. Tijekom uzgoja nisu detektirane niti fruktoza niti glukoza što upućuje da kvasci prisutni u zrcima kefirnog napitka nemaju aktivnost pri ovoj temperaturu.

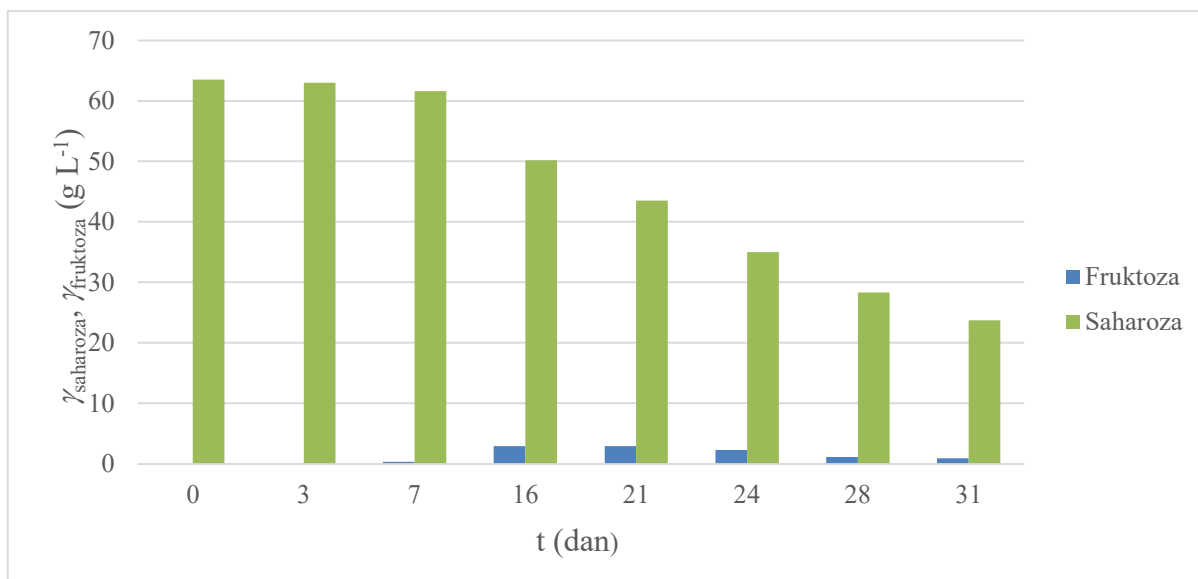
Pregled nekih procesnih parametara određenih za fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka pri različitim temperaturama prikazane su u tablici 9.

Tablica 9. Prikaz nekih procesnih parametra fermentacije saharoze ($\gamma = 40 \text{ g L}^{-1}$) s pomoću zrnaca kefirnog napitka

Uvjeti (S_0 / temp.)	ΔS (g L^{-1})	Y_X (g L^{-1})	$Y_{X/S}$ (g g^{-1})	$Y_{P \text{ EtOH}}$ (g L^{-1})	$Y_{P \text{ Octena}}$ kis. (g L^{-1})	Y_P Mliječna kis.. (g L^{-1})	$Y_{\text{EtOH}/S}$ (g g^{-1})	Y_{Octena} kis./S (g g^{-1})	$Y_{\text{Mliječna}}$ kis./S (g g^{-1})	Pr_{EtOH} (g L^{-1} dan^{-1})	Pr_{Octena} kis. (g L^{-1} dan^{-1})	$Pr_{\text{Mliječna}}$ kis. (g L^{-1} dan^{-1})
40 g L^{-1} $/20 \text{ }^\circ\text{C}$	16,5	0,012	0,001	0,80	0,56	1,13	0,005	0,034	0,068	0,026	0,018	0,036
40 g L^{-1} $/25 \text{ }^\circ\text{C}$	25,7	0,302	0,012	0,65	0,48	1,14	0,025	0,019	0,044	0,021	0,021	0,036
40 g L^{-1} $/30 \text{ }^\circ\text{C}$	40,9	0,599	0,015	0,50	0,56	1,17	0,012	0,013	0,028	0,016	0,018	0,038
40 g L^{-1} $/40 \text{ }^\circ\text{C}$	0,70	0,397	5,677	0,30	0,1	0,11	0,429	0,143	0,157	0,010	0,009	0,003

4.2.2. Fermentacija s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 60 g L^{-1} pri različitim temperaturama

Podloge sa saharozom koncentracije 60 g L^{-1} inokulirane su sa $10 \pm 0,1664 \text{ g}$ zrnaca kefirnog napitka i fermentirane pri temperaturama od 20, 25, 30 i $40 \text{ }^\circ\text{C}$ kako bi proučili učinak različitih temperatura na metabolizam mikroorganizama prisutnih u zrcima kefirnog napitka. Pretpostavka je da kulture prisutne u zrcima kefirnog napitka imaju različite optimume za rast i proizvodnju različitih metabolita. Stoga je UPLC analiza (poglavlje 3.3.2.) korištena za određivanje koncentracije supstrata i različitih produkata fermentacije tijekom uzgoja (tablice 10-13 i slike 9-12) te je GC analizom (poglavlje 3.3.3.) određena koncentracija hlapivih komponenti na kraju uzgoja (tablica 15).

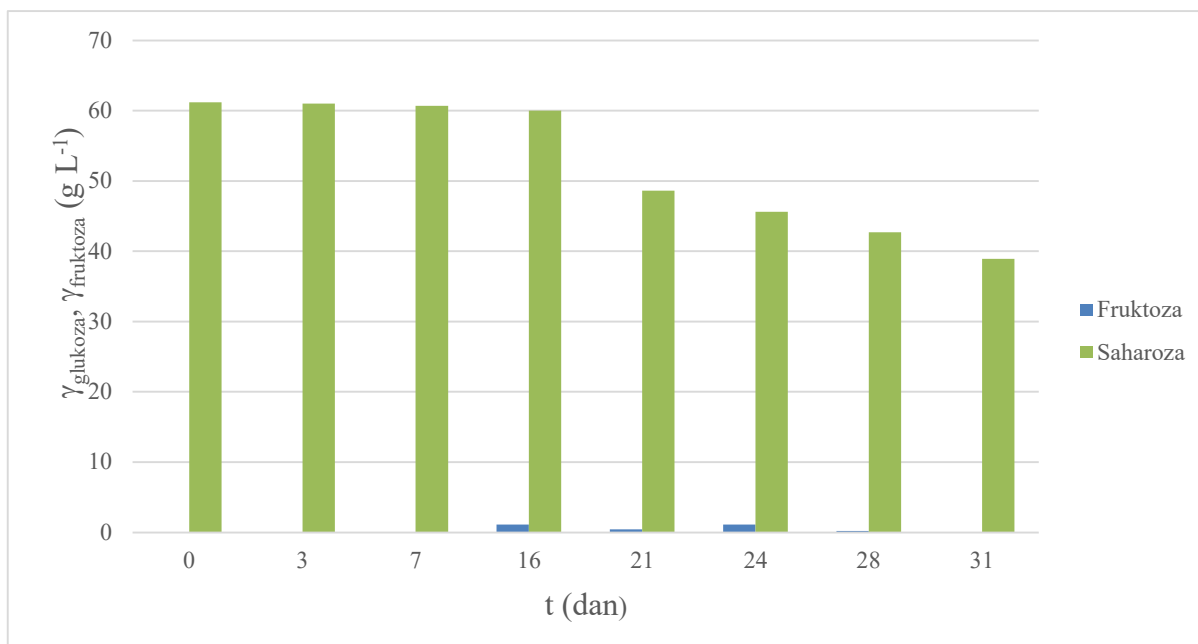


Slika 9. Promjena koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 60 g L⁻¹ pri 20 °C

Tablica 10. Koncentracije metabolita proizvedenih s pomoću zrnaca kefirnog napitka tijekom fermentacije u otopini saharoze koncentracije 60 g L⁻¹ pri 20 °C

Vrijeme (dan)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)
0	0	0	0,	0	0
3	0	0,09	0,20	0	0
7	0,13	0,12	0,20	0	0
16	0,46	0,27	0,35	0	0
21	0,45	0,32	0,40	0	0
24	0,48	0,37	0,40	0	0
28	0,78	0,41	0,45	0	0
31	0,86	0,45	0,45	0	0

Slično kao kod fermentacije provedene u podlozi s 40 g L^{-1} saharoze (poglavlje 4.2.1.) tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka pri $20 \text{ }^\circ\text{C}$ nije utrošena sva saharoza iz podloge (slika 9). Fruktioza je detektirana 7. dan uzgoja u koncentraciji od $0,3 \text{ g L}^{-1}$ te raste do $2,9 \text{ g L}^{-1}$, te se do kraja procesa potpuno iscrpljuje iz podloge. Tijekom uzgoja glukoza nije detektirana (slika 9). I tijekom ovog uzgoja UPLC analizom detektirani su etanol mliječna kiselina i octena kiselina, dok drugi karakteristični metaboliti poput glicerola i manitola nisu detektirani (tablica 10). Maksimalna koncentracija etanola od $0,45 \text{ g L}^{-1}$ određena je nakon 31. dana uzgoja (tablica 10) što je gotovo dvostruko manja vrijednost nego ona određena tijekom uzgoja pri 40 g L^{-1} saharoze (tablica 5). Octena koncentracija detektirana je u konačnoj koncentraciji od $0,45 \text{ g L}^{-1}$. Mliječna kiselina detektirana je sedmog dana uzgoja te joj je na kraju uzgoja određena najveća koncentracija od $0,86 \text{ g L}^{-1}$. Manitol i glicerol nisu detektirani u cijelom trajanju uzgoja. Iz navedenog može se zaključiti da uz nisku temperaturu fermentacije koncentracija saharoze od 60 g L^{-1} dodatno inhibira rast mikroorganizama prisutnih u zrcima kefirnog napitka.



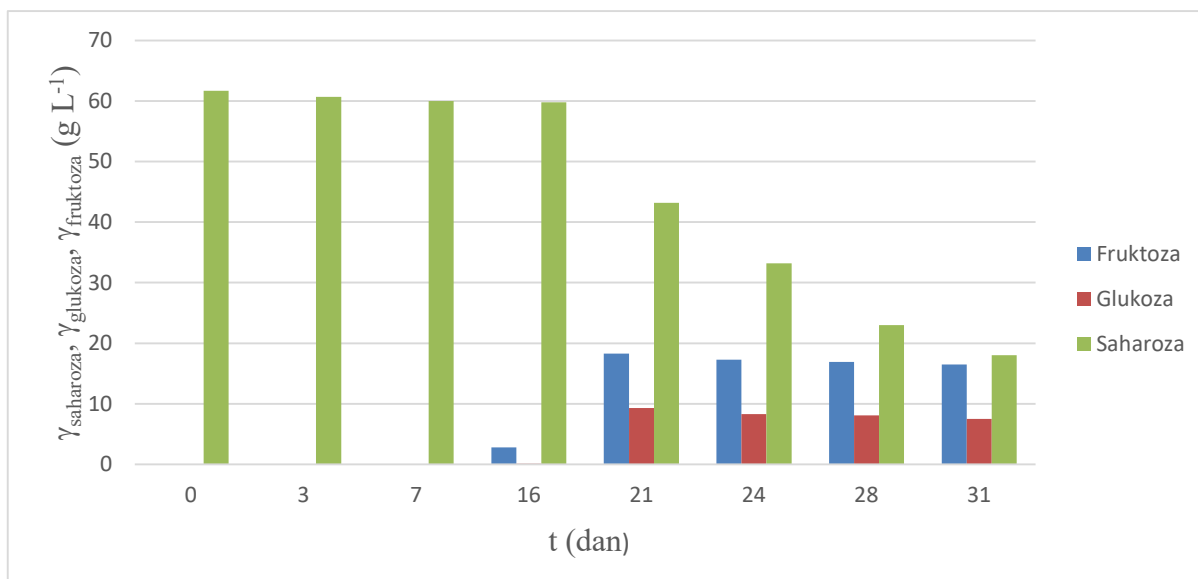
Slika 10. Promjena koncentracije saharoze i fruktoze tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 60 g L^{-1} pri $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Tablica 11. Koncentracije metabolita proizvedenih s pomoću zrnaca kefirnog napitka tijekom fermentacije u otopini saharoze koncentracije 60 g L^{-1} pri $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Vrijeme (dan)	Mliječna kiselina (g L^{-1})	Octena kiselina (g L^{-1})	Etanol (g L^{-1})	Glicerol (g L^{-1})	Manitol (g L^{-1})
0	0	0	0	0	0
3	0,	0	0,20	0	0
7	0	0	0,20	0	0
16	0,17	0,13	0,40	0	0
21	0,35	0,23	0,40	0	0
24	0,46	0,35	0,40	0	0
28	0,68	0,39	0,40	0	0
31	0,88	0,42	0,40	0	0

Tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u podlozi sa 60 g L⁻¹ saharoze i pri 25 °C utrošeno je svega 22,3 g L⁻¹ saharoze. Navedena vrijednost nešto je manja od utrška saharoze tijekom uzgoja u podlozi s manjom koncentracijom saharoze (slika 6, poglavlje 4.2.1.) Fruktaza je detektirana 16. dana uzgoja u koncentraciji od 1,1 g L⁻¹ (slika 10) te njena koncentracija varira do kraja uzgoja kada iznosi 0 g L⁻¹, a glukoza nije detektirana tijekom uzgoja, te je moguće da kombinirani učinak visoke koncentracije saharoze i temperature negativno utječe na invertaznu aktivnost, jer su tijekom uzgoja u podlozi s koncentracijom saharoze od 40 g L⁻¹ detektirane značajne koncentracije glukoze ($\gamma = 5,8 \text{ g L}^{-1}$) i fruktoze ($\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$; slika 6).

Etanol je detektiran trećeg dana uzgoja u koncentraciji od 0,2 g L⁻¹ te mu se koncentracija nastavlja povećavati sve do kraja uzgoja kada iznosi 0,4 g L⁻¹ (tablica 11). Octena kiselina detektirana je tek 16. dan uzgoja te iznosi 0,13 g L⁻¹. Mliječna kiselina također je detektirana 16. dana uzgoja te joj je na kraju uzgoja određena najveća koncentracija od 0,88 g L⁻¹. Manitol i glicerol nisu detektirani u cijelom trajanju uzgoja. Manitol i glicerol nisu detektirani u cijelom trajanju uzgoja (tablica 11).



Slika 11. Promjena koncentracije saharoze i fruktoze tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 60 g L⁻¹ pri 30 °C

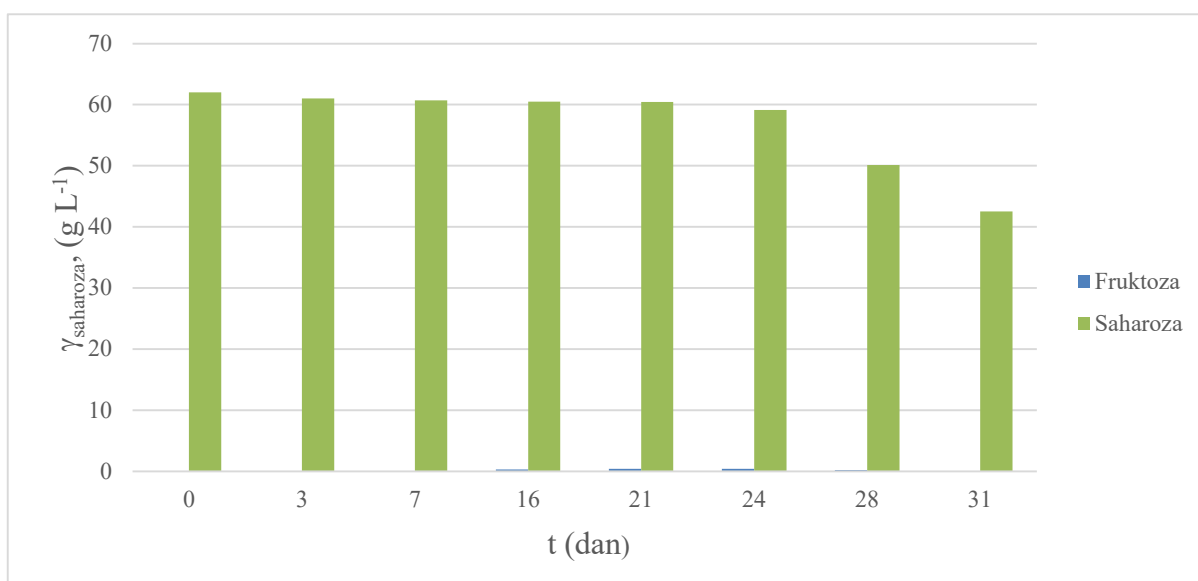
Tablica 12. Koncentracije metabolita proizvedenih s pomoću zrnaca kefirnog napitka tijekom fermentacije u otopini saharoze koncentracije 60 g L⁻¹ pri 30 °C

Vrijeme (dan)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0,10	0	0
7	0	0	0,10	0	0
16	0,17	0,13	0,20	0	0
21	0,29	0,30	0,50	0	0
24	0,46	0,38	0,50	0	0
28	0,72	0,47	0,50	0	0
31	0,90	0,50	0,50	0	0

Pri temperaturi uzgoja od 30 °C utrošena i/ili hidrolizirana je čak 43,7 g L⁻¹ saharoze. Tijekom ove fermentacije dekretirane su fruktoza u koncentraciji od 2,8 g L⁻¹ i glukoza u koncentraciji od 0,08 g L⁻¹. Padom koncentracije saharoze ispod 43,2 g L⁻¹ 21. dan uzgoja započinje paralelno trošenje fruktoze i glukoze (slika 11). Ako se ovi rezultati usporede s rezultatima fermentacija u podlozi sa saharozom koncentracije 40 g L⁻¹ pri 30 °C, jasno je da koncentracija od 60 g L⁻¹ ima inhibitorni učinak na rast mikroorganizama u zrcima kefirnog napitka jer je pri koncentraciji od 40 g L⁻¹, potrošnja saharoze započela već od 1 dana fermentacije i saharoza je u potpunosti je iscrpljena iz podloge (slika 7).

Slično tome u podlozi sa saharozom koncentracije 60 g L⁻¹ prisutne su puno niže koncentracije glukoze i fruktoze (slika 11) u odnosu na koncentracije ovih dvaju monosaharida određenih u podlozi sa saharozom koncentracije 40 g L⁻¹ (slika 7, poglavlje 4.2.1.). Stoga se može zaključiti da koncentracija saharoze od 60 g L⁻¹ ima inhibitorni učinak na kulture kvasce prisutnih u zrcima kefirnog napitka zbog manje invertazne aktivnosti.

Etanol je detektiran trećeg dana uzgoja u koncentraciji od 0,1 g L⁻¹. Koncentracija mu stagnira sve do početka ubrzanog trošenja saharoze te raste do kraja uzgoja i konačne koncentracije od 0,8 g L⁻¹ što je ujedno najveća postignuta koncentracija pri uzgoju sa 60 g L⁻¹ saharoze. Octena kiselina detektirana je 16. dan uzgoja u koncentraciji od 0,13 g L⁻¹ te njena koncentracija nastavlja rasti sve do kraja uzgoja kada iznosi 0,5 g L⁻¹ što je ujedno i najveća koncentracija octene kiseline postignuta pri uzgoju sa 60 g L⁻¹ saharoze. Mliječna kiselina detektirana je trećeg dana uzgoja te joj je na kraju uzgoja određena najveća koncentracija od 0,9 g L⁻¹. Manitol i glicerol nisu detektirani tijekom ovog uzgoja. Koncentracije produkata fermentacije tijekom ovog uzgoja (tablica 12) manje su od onih određenih tijekom fermentacija pri 40 g L⁻¹ saharoze u podlozi (tablica 7) što dodatno potvrđuje inhibitorni učinak koncentracije saharoze od 60 g L⁻¹ na rast i aktivnost mikroorganizama prisutnih u zrcima kefirnog napitka.



Slika 12. Promjena koncentracije saharoze i fruktoze tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u otopini saharoze koncentracije 60 g L⁻¹ pri 40 °C

Tablica 13. Koncentracije metabolita proizvedenih s pomoću zrnaca kefirnog napitka tijekom fermentacije u otopini saharoze koncentracije 60 g L⁻¹ pri 40 °C

Vrijeme (dan)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0,20	0	0
7	0	0	0,20	0	0
16	0	0	0,20	0	0
21	0	0,03	0,30	0	0
24	0,08	0,05	0,30	0	0
28	0,08	0,05	0,30	0	0
31	0,10	0,07	0,30	0	0

Tijekom 24 dana fermentacije koncentracija saharoze je približno konstantna (slika 12). Potrošnja saharoze započinje nakon 24 dana uzgoja što može bit i posljedica kontaminacije, iako nije bilo vidljivih znakova rasta drugih mikroorgnaizama. Tijekom ovog uzgoja detektirane su minimalne koncentracije produkata (octena kiselina i etanola) kako je prikazano u tablici 13. Manitol, glicerol i mliječna kiselina nisu detektirani kao u svim dosad prikazanim uzgojima. Slični rezultati određeni su i tijekom fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka i u podlozi s 40 g L^{-1} saharoze pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (slika 8, tablica 8; poglavlje 4.2.1.). Ovi rezultati potvrđuju da je $40 \text{ }^\circ\text{C}$ previsoka temperatura za rast i aktivnost mikroorganizama prisutnih u zrcima vodeno kefira.

Pregled nekih procesnih parametara određenih za fermentacije s pomoću zrnaca kefirnog napitka u podlozi sa 60 g L^{-1} saharoze pri različitim temperaturama prikazane su u tablici 14.

Tablica 14. Prikaz nekih procesnih parametra fermentacije saharoze ($\gamma = 60 \text{ g L}^{-1}$) s pomoću zrnaca kefirnog napitka

Uvjeti (S_0 / temp.)	ΔS (g L^{-1})	Y_X (g L^{-1})	$Y_{X/S}$ (g g^{-1})	$Y_{P \text{ EtOH}}$ (g L^{-1})	$Y_{P \text{ Octena}}$ kis. (g L^{-1})	$Y_{P \text{ Mliječna}}$ kis. (g L^{-1})	$Y_{\text{EtOH}/S}$ (g g^{-1})	$Y_{\text{Octena kis.}}$ /S (g g^{-1})	$Y_{\text{Mliječna}}$ kis. /S (g g^{-1})	Pr_{EtOH} (g L^{-1} dan^{-1})	Pr_{Octena} kis. (g L^{-1} dan^{-1})	$Pr_{\text{Mliječna}}$ kis. (g L^{-1} dan^{-1})
60 g L^{-1} /20 °C	39,8	2,65	0,067	0,45	0,45	0,86	0,011	0,011	0,021	0,014	0,015	0,027
60 g L^{-1} /25 °C	22,3	2,94	0,132	0,40	0,42	0,88	0,018	0,018	0,039	0,013	0,013	0,028
60 g L^{-1} /30 °C	43,7	2,72	0,062	0,50	0,50	0,90	0,011	0,011	0,020	0,016	0,016	0,029
60 g L^{-1} /40 °C	19,5	2,09	0,013	0,30	0,07	0,10	0,015	0,003	0,005	0,009	0,009	0,003

Tablica 15. Koncentracija hlapivih komponenti u vodenom kefiru pri različitim temperatura i početnim koncentracija saharoze

Uvjeti fermentacije (S ₀ / temp.)	acetaldehid (mg L ⁻¹)	1-propanol (mg L ⁻¹)	2-butanol (mg L ⁻¹)	etil-acetat (mg L ⁻¹)	3-metil-1-butanol (mg L ⁻¹)	etil-butirat (mg L ⁻¹)	isoamil - acetat (mg L ⁻¹)	etil-heksanoat (mg L ⁻¹)	etil-oktanoat (mg L ⁻¹)	<i>i</i> - butanol (mg L ⁻¹)
40 g L ⁻¹ /20 °C	/	2,14	/	0	/	0,05	0,02	0,45	0	0,72
40 g L ⁻¹ /25 °C	0	2,08	/	0	0,40	0,06	0,01	0,45	0	0,74
40 g L ⁻¹ /30 °C	0	/	/	0	0,38	0,05	0,02	0,45	0	0,70
60 g L ⁻¹ /25 °C	/	2,11	/	0	/	0,05	0,02	0,44	0	0,75
60 g L ⁻¹ /30 °C	0,48	2,28	/	0	/	0,06	0,01	0,44	0	0,67
60 g L ⁻¹ /40 °C	0	2,11	/	0	0,36	0,05	0,02	0,44	0	0,71

/ - nije pronađena komponenta u uzorku

0 –ispod granice kvantifikacije

Koncentracije hlapivih komponenti u vodenom kefiru mogu imati značajan utjecaj na aromu. Većina estera (isoamil-acetat, etil-heksanoat, etil-oktanoat) i viših alkohola prisutnih u vodenom kefiru potječu od metabolizma kvasca. Navedeni esteri prisutni su i u pivu i u vinu, iako direktna usporedba navedenih proizvoda s kefirnim napitkom nije moguća zbog kompleksnosti interakcija između svih spojeva prisutnih u gore navedenim proizvodima (Lauyers i De Vuyst, 2014).

Tijekom proizvodnje kefirnog napitka detektirani su 1-propanol, *i*-butanol i 3-metil-1-butanol (tablica 14). Osim navedenih viših alkohola detektirani su i kvantificirani slijedeći esteri: etil-butirat, isoamil-acetat i etil-heksanoat (tablica 14). Navedeni esteri daju vodenom kefiru ugodnu voćnu aromu (Laureys i De Vuyst, 2014).

Od određenih viših alkohola, 1-propanol detektiran je u najvećoj koncentraciji pri svim navedenim fermentacijama i ima vrijednost od 2,08 do 2,28 mg L⁻¹. *Iso*-butanol detektiran je u koncentraciji od 0,67 do 0,75 mg L⁻¹, a najmanju koncentracija detektirana je za 3-metil-1-butanol i iznosi od 0,36 do 0,40 mg L⁻¹ (tablica 14). Iz navedenih podataka može se zaključiti da ne postoji značajna razlika u koncentraciji hlapivih komponenti određenih pri 40 odnosno 60 g L⁻¹ saharoze.

Vrijednost za koncentraciju etil-heksanoat ($\gamma = 0,44-0,45$ mg L⁻¹) može se usporediti s vrijednošću određenom u radu autora Laureys i De Vuyst (2014) koji su odredili koncentraciju ovog estera od 0,37 mg L⁻¹. Ujedno je to ester s najvišom koncentracijom određenom tijekom proizvodnje kefirnog napitka u ovom radu (tablica 14). Etil-oktanoat i etil-acetat prisutni su u vrlo niskim koncentracijama u uzorcima kefirnog napitka proizvedenim u ovom radu.

4.3. ODREĐIVANJE RASTA I AKTIVNOSTI ZRNACA KEFIRNOG NAPITKA NA KSILITOLU, ERITROLU I STEVIJI

Podloge sa stevijom ($\gamma_{\text{stevia}} = 20 \text{ g L}^{-1}$), eritrolom ($\gamma_{\text{eritorol}} = 20 \text{ g L}^{-1}$), ksilitolom ($\gamma_{\text{ksilitol}} = 20 \text{ g L}^{-1}$) i saharozom ($\gamma_{\text{saharoza}} = 20 \text{ g L}^{-1}$) i podloga u kojoj su dodane stevia, eritrol i ksilitol u istoj koncentraciji inokulirani su s $10 \pm 0,1664 \text{ g}$ kefirnog napitka i ostavljeni 31 dan na temperaturi od $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi se istražila mogućnost korištenja navedenih sladila kao izvora ugljika za rast i aktivnost mikroorganizama prisutnih u zrcima kefirnog napitka. Sve podloge su nacijepnjene s istom šaržom inokuluma. Uzgoj na saharozi je služio kao kontrola. UPLC analizom određene su koncentracije konačnih metabolita i koncentracije supstrata (tablica 15).

S obzirom na podatke u tablici 15 vidljivo je kako mikroorganizmi prisutni u zrcima kefirnog napitka, u anaerobnim uvjetima u kojima je proveden uzgoj, ne mogu koristiti steviu, eritrol i ksilitol kao izvor ugljika za rast i aktivnost. Koncentracije svih dodanih sladila, stevije ili šećernih alkohola ostaju nepromijenjene i ne dolazi do proizvodnje karakterističnih proizvoda metabolizma bakterija i kvasaca prisutnih u zrcima kefirnog napitka.

Radi utvrđivanja „standardne“ aktivnosti zrnaca kefirnog napitka proveden je anaerobni uzgoj u podlozi sa saharozom s inokulumom iz iste šarže kojim su nacijepnjene i podloge sa sladilima. Tijekom uzgoja na saharozi detektirani su etanol, mliječna i octena kiselina, te su zbog invertazne aktivnost kvasaca prisutne i glukoza i fruktoza u podlozi.

Iako ova sladila nisu supstrati za proizvodnju kefirnog napitka, navedena sladila mogu se potencijalno koristiti kao poboljšivači okusa u formuliranju konačnog proizvoda na bazi kefirnog napitka. U ovom radu nije ispitano, ali potrebno bi bilo odrediti imaju li korištena sladila inhibitorni učinak na mikroorganizme prisutne u zrcima kefirnog napitka.

Tablica 15. Koncentracije supstrata i različitih produkata metabolizma određenih UPLC metodom na kraju fermentacije pri 25°C

Koncentracija saharoze (g L ⁻¹)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Fruktoza (g L ⁻¹)	Glukoza (g L ⁻¹)	Saharoza (g L ⁻¹)	Stevia (g L ⁻¹)	Eritrol (g L ⁻¹)	Ksilitol (g L ⁻¹)
20 g L ⁻¹ stevia	0	0	0	0	0	0	0	/	20	/	/
20 g L ⁻¹ eritrol	0	0	0	0	0	0	0	/	/	17	/
20 g L ⁻¹ ksilitol	0	0	0	0	0	0	0	/	/	/	17
20 g L ⁻¹ stevia + 20 g L ⁻¹ eritrol + 20 g L ⁻¹ ksilitol	0	0	0	0	0	0	0	/	20	36	
20 g L ⁻¹ saharoza	0,22	0,76	2,10	0	0	6,80	2,90	2,8	/	/	/

/ - nije pronađena komponenta u uzorku

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog rada može se zaključiti slijedeće:

1. Najveći prirast suhe tvari biomase određen je pri koncentraciji saharoze od 40 odnosno 60 g L⁻¹ ($\Delta m_{40 \text{ g L}^{-1}} = 0,6561 \text{ g}$, $\Delta m_{60 \text{ g L}^{-1}} = 0,6381 \text{ g}$). Pri koncentraciji saharoze od 20 i 80 g L⁻¹ prirast biomase kefirnog napitka je za oko 38 % manji od ovdje navedenih vrijednosti.
2. Između testiranih temperatura (20, 25, 30 i 40 °C) i početnih koncentracija saharoze u podlozi (40 i 60 g L⁻¹), optimalna temperatura za fermentaciju sa zrcima kefirnog napitka je 30 °C, dok optimalna koncentracija saharoze u podlozi iznosi 40 g L⁻¹.
3. Tijekom fermentacije s pomoću zrnca kefirnog napitka u podlozi sa saharozom koncentracije 60 g L⁻¹ primijećena je sporija potrošnja supstrata i proizvodnja nižih koncentracija metabolita, tj. inhibicija supstratom.
4. Temperatura uzgoja od 40 °C ima inhibitorni učinak na rast i aktivnost svih mikroorganizama prisutnih u zrcima kefirnog napitka.
5. Fermentirani kefirni napitak sadrži različite hlapive komponente, više alkohole i estere koji potječu uglavnom od metabolizma kvasca. Viši alkoholi koji su određeni u vodenom kefiru su 1-propanol, *i*-butanol i 3-metil-1-butanol, a od estera u fermentiranom kefirnom napitku prisutni su etil-butirat, isoamil-acetat i etil-heksanoat.
6. Mikroorganizmi prisutni u zrcima kefirnog napitka ne mogu za svoj rast i aktivnost koristiti ksilitol, eritrol i steviu, stoga se ova sladila mogu dodavati u kefirni napitak za formuliranje okusa konačnog proizvoda.

6. LITERATURA

1. Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. U: S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (ured.), Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, NY, USA, str. 1-66.
2. Ballongue, J. (2004) Bifidobacteria and probiotic action. U: S. Salminen, A. von Wright & A. Ouwehand (ured.), Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, NY, USA, str. 67-124.
3. Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. (2008) Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine e a review. *Int. J. Food Microbiol.* **125**, 60-70.
4. Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., Moschetti, G., Settanni, L. (2016) Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *Food Sci. Technol.* **66**, 572-581.
5. Daniel, H.-M., Moons, M.-C., Huret, S., Vrancken, G., De Vuyst, L. (2011) *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie Leeuwenhoek* **99**, 63-73.
6. Delcenserie, V., Gavini, F., Beerens, H., Tresse, O., Franssen, C., Daube, G. (2007) Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**, 381-389.
7. De Ley, J., Gills, M., Swings, J. (1984) Acetobacteriaceae. U: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9. izd., Krieg, N. R., and Holt, J. G., eds. Williams & Wilkins, London, str. 267-278.
8. De Vuyst, L., De Vin, F. (2007) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria. U: H. Kamerling (ured.), Comprehensive Glycosciences. Elsevier, Oxford, UK, str. 477-519.

9. De Vuyst, L., Vaningelgem, F. (2003) Developing new polysaccharides. U: B.M. McKenna (ured.), *Texture in Food: Semi-Solid Foods*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, str. 275-320.
10. De Vuyst, L., Selak, M., Moens, F., Rivière, A., Leroy, F. (2016) Bifidogenic and butyrogenic effects of inulin-type fructans and arabinoxylans. *J.Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **63**, S45.
11. Degeest B., De Vuyst, L. (1999) Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2863-2870.
12. Dutta, D., Gachhui, R. (2006) Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1899-1903.
13. Franzetti, L., Galli, A., Pagani, M.A., De Noni, I. (1998) Microbiological and chemical investigations on "sugar kefir" drink. *Ann. Microbiol. Enzim.* **48**, 67-80.
14. Frost, Sullivan (2007) *Strategic Analysis of the European Food and Beverage Probiotics Markets*. Frost i Sullivan, London, UK.
15. Frost, Sullivan (2008) *European Functional Beverages Market*. Frost i Sullivan, London, UK.
16. Frost, Sullivan (2010) *2020 Vision Global Food & Beverage Industry Outlook*. Frost i Sullivan, San Antonio, TX, USA
17. Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. (2011) The microbial diversity of water kefir. *Int. J. Food Microbiol.* **151**, 284-288.

18. Gulitz, A., Stadie, J., Ehrmann, M.A., Ludwig, W., Vogel, R.F. (2013) Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 1082-1091.
19. Gonzales, A. (2005) Application of molecular techniques for identification of acetic acid bacteria. PhD thesis, Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Spain.
20. Guerzoni, M.E., Serrazanetti, D.I., Vernocchi, P., Gianotti, A. (2013) Physiology and biochemistry of sourdough yeasts. In: M. Gobbetti & M. Gänzle (Eds.), Handbook on Sourdough Biotechnology. Springer, Boston, MA, USA, str. 155-181.
21. Horisberger, M. (1969) Structure of the dextran of the Tibi grain. *Carbohydr. Res.* **10**, 379-385.
22. Kulka, D., Walker, T. K. (1954) The ketogenic activities of Acetobacter species in a glucose medium. *Arch. Biochem. Biophys.* **50**, 169-179
23. Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011) The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier, London, UK, str. 2354.
24. Lauers, D., De Vuyst, L. (2014) Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **80(2)**, 2564–2572.
25. Magalhães, K. T., Pereira, G. V. D., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2010) Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1241-1250.
26. Magalhães, K. T., Pereira, G. V. D., Campos, C. R., Dragone, G., Schwan, R. F. (2011) Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Braz. J. Microbiol.* **42**, 693-702.

27. Marić, V., Šantek, B. (2009) Biokemijsko inženjerstvo, 1.izd., Golden Marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.
28. Moinas, M., Horisberger, M., Bauer, H. (1980) The structural organization of the tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Arch. Microbiol.* **128**, 157-161.
29. Mukai, T., Toba, T., Itoh, T., Adachi, S. (1990) Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefiranofaciens* K1. *Carbohydr. Res.* **204**, 227-232.
30. Pasteris, S.E., de Saad, A.M.S. (2009) Sugar-glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3853-3858.
31. Pidoux, M., Brillouet, J.M., Quemener, B. (1988) Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnol. Lett.* **10**, 415-420.
32. Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., Samaržija, D. (2013) Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo* **63**, 3-14.
33. Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germanà, M. A., Erten, H., Moschetti, G., Settanni, L. (2016) Development of new non-dairy beverages from mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiol.* **54**, 40-51.
34. Raspor, P., Zupan, J. (2006) Yeasts in extreme environments. U: C. A. Rosa, G. Peter. (ured.) Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin, Springer, str. 371-417
35. Rodrigues, F., Ludovico, P., Leão, C. (2006) Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. U: C. Rosa G. Péter (ured.), The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer, Heidelberg, Germany, str. 101-122.

36. Rodrigues, K. L., Araújo, T. H., Schneedorf, J. M., de Souza Ferreira, C., de Oliveira Isac Moraes, G., Coimbra, R. S., Rodrigues, M. R. (2016) A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. *J. Funct. Foods* **21**, 58-69.
37. Salazar, N., Gueimonde, M., De Los Reyes-Gavilán, C.G., Ruas-Madiedo, P. (2015) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* **56**, 1440-1453.
38. Segal B. H., Leto T. L., Gallin J. I., Malech H. L., Holland S. M. (2000) Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine* **79**, 170–200
39. Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J. (2015) *Brettanomyces* yeasts: from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **206**, 24-38.
40. Van der Meulen, R., Adriany, T., Verbrugghe, K., De Vuyst, L. (2006) Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD⁺ through its growth-associated production. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5204-5210.
41. Verce M., De Vuyst L., Weckx S. (2019) Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species. *Front. Microbiol.* **10**, 479.
42. Walker, G. M. (2000) *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, West Sussex, England, str. 353.
43. Ward, H. M. (1892) The ginger-beer plant and the organisms composing it; a contribution to the study of fermentation-yeasts and bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **183**, 125-197.

44. Watanabe, K., Makino, H., Sasamoto, M., Kudo, Y., Fujimoto, J., Demberel, S. (2009) *Bifidobacterium mongoliense* sp. nov., from airag, a traditional fermented mare's milk product from Mongolia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1535- 1540.

7. PRILOZI

7.1. BAŽDARNI PRAVCI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UGLJIKOHIDRATA, ALKOHOLA I KISELINA UPLC METODOM

Tablica 16. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva UPLC analizom

Spoj	Retencijsko vrijeme, t_R (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Mliječna kiselina	6,958	$A = 155475\gamma_{\text{Mliječna}} - 1042.7$	0,9999
Octena kiselina	7,955	$A = 76519 \gamma_{\text{Octena}} + 1025.5$	0,9999
Etanol	9,966	$A = 100677 \gamma_{\text{EtOH}} + 1658.9$	0,9996
Glicerol	7,181	$A = 133462\gamma_{\text{Mliječn}} + 5844.6$	0,9997
Fruktoza	5,467	$A = 112342\gamma_{\text{Fruktoza}} + 23079$	0,9999
Manitol	5,887	$A = 161699\gamma_{\text{Manitol}} + 25269$	0,9998
Glukoza	4,975	$A = 141110\gamma_{\text{Glukoza}} + 26565$	0,9989
Saharoza	4,258	$A = 135868\gamma_{\text{Saharoza}} + 30686$	0,9984

A= površina

7.2. RETENCIJSKA VREMENA LAKOHLAPLJIVIH SPOJEVA ODREĐENIH HS-GC-FID METODOM

Tablica 17. Retencijska vremena lakohlapivih spojeva

SPOJ	t _R /min
acetaldehid	4,14
propan-1-ol	6,37
butan-2-ol	7,46
etil-acetat	7,71
2-metil-propan-1-ol	8,23
N-butanol (IS)	9,51
3-metil-butan-1-ol	12,26
2-metil-butan-1-ol	12,43
etil-butirat	14,49
izoamil-acetat	16,80
etil-heksanoat	19,95
etil-oktanoat	24,25
2-feniletilacetat	26,11

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drgim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Domagoj Kurtoić