

Optimizacija uvjeta proizvodnje kefirnog napitka na tršćanom šećeru

Piškor, Dominik

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:734225>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2020.

Dominik Piškor

1155/BPI

**OPTIMIZACIJA UVJETA
PROIZVODNJE KEFIRNOG
NAPITKA NA TRŠĆANOM
ŠEĆERU**

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. Mladena Pavlečića te uz pomoć doc. dr. sc. Antonije Trontel.

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Mladenu Pavlečiću na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, iznimnom strpljenju, uloženom trudu i susretljivosti tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na prenesenom znanju i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na pruženoj potpori i razumijevanju za vrijeme pisanja ovog diplomskog rada i 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

OPTIMIZACIJA UVJETA PROIZVODNJE KEFIRNOG NAPITKA NA TRŠĆANOM ŠEĆERU

Dominik Piškor, 1155/BPI

Sažetak:

Kefirni napitak, predstavlja funkcionalan proizvod, dobre nutritivne vrijednosti, dobiven fermentacijom šećerne hranjive podloge kroz 2-4 dana pri sobnoj temperaturi pomoću združene kulture kefirnih zrnaca. Također, pokazuje i probiotička svojstva te ima antihiperlipidemijski, antimutageni i antioksidativni utjecaj na čovjekov organizam. Iako pokazuje brojna pozitivna svojstva, industrijska proizvodnja kefirnog napitka još uvijek predstavlja izazov zbog nedovoljno istraženih uvjeta fermentacije te različitog i nedovoljno poznatog sastava združene kulture mikroorganizama. Za napredak u tehnologiji proizvodnje kefirnog napitka potrebno je optimizirati procesne parametre te ispitati utjecaj različitih izvora ugljika, što uvelike utječe na sam proces proizvodnje kefirnog napitka. U ovom istraživanju određene su optimalne temperature i koncentracije saharoze za proizvodnju kefirnog napitka (25 °C i 60 g L^{-1}) pri čemu je kao izvor ugljika korišten tršćani šećer. Također, ispitivan je i utjecaj dodatka sladila (eritrol, ksilitol i stevia) na proizvodnju kefirnog napitka na tršćanom šećeru prilikom čega nije utvrđen negativan utjecaj na sam bioproces, što bi značilo da ih se moglo dodati u finalni proizvod nakon, ali i za vrijeme fermentacije.

Ključne riječi: kefirni napitak, tršćani šećer, zaslađivači, optimizacija proizvodnje

Rad sadrži: 60 stranica, 33 slike, 16 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. Mladen Pavlečić

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Antonija Trontel

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Datum obrane: 20. listopad, 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

THE OPTIMISATION OF PROCESS PARAMETERS IN PRODUCTION OF KEFIR DRINK USING CANE SUGAR AS SUCROSE SOURCE

Dominik Piškori, 1155/BPI

Abstract:

Kefir drink represents a functional product, with great nutritive value, made by fermentation of sugary medium through 2-4 days at room temperature by consortium of microorganisms contained in water kefir grains. It also has proven probiotic properties, which has antihyperglycemic, antimutagenic, and antioxidative effects of human body. Although kefir drink has many positive properties, its industrial production is still very limited. Varying fermentation conditions, and poorly known consortium of microorganisms in water kefir grains makes the process of kefir drink production very hard to precisely define. The breakthrough in industrial production of kefir drink is possible only if the process parameters are well known. Different substrates could also have a great impact on kefir drink production, and they could also give better sensoric properties to the final product. In this study, the optimum temperature and substrate concentrations were defined (25 °C / 60 g L⁻¹). Cane sugar was the main source of sucrose, which was used to make the sugary medium, which was later sterilised and inoculated with 10 g of kefir drink grains. The effects of sweeteners (erythrol, xylitol and steviol) on production of kefir drink on cane were studied, where there were no negative effects of sweeteners on the bioprocess itself discovered, which makes them eligible to use after, but also during the fermentation process.

Keywords: kefir drink, cane sugar, sweeteners, production optimisation

Thesis contains: 60 pages, 33 figures, 16 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 Mladen Pavlečić, Assistant professor

Technical support and assistance: PhD Antonija Trontel, Assistant professor

Reviewers:

1. PhD Mladen Pavlečić, Assistant professor
2. PhD Božidar Šantek, Professor
3. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. PhD Blaženka Kos, Professor (substitute)

Paper defended: 20th October 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KEFIRNI NAPITAK I USPOREDBA S MLIJEČNIM KEFIROM	2
2.2. BIORAZNOLIKOST KEFIRNIH ZRNACA.....	3
2.2.1. Bakterije mliječne kiseline.....	4
2.2.2. Bifidobakterije	5
2.2.3. Bakterije octene kiseline	7
2.2.4. Kvasci.....	8
2.3. SIMBIOTSKI ODNOSI U KEFIRNIM ZRNCIMA	9
2.4. EGZOPOLISAHARIDNI MATRIKS I NJEGOVA SINTEZA.....	10
2.5. UPOTREBA KULTURE KEFIRNOG NAPITKA U DRUGE SVRHE	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Radni mikroorganizmi	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Hranjive podloge.....	16
3.1.4. Aparatura i pribor	16
3.2. METODE RADA.....	19
3.2.1. Priprava hranjivih podloga	19
3.2.2. Umožavanje biomase potrebne za provođenje uzgoja.....	19
3.2.3. Određivanje optimalne koncentracije i temperature za proizvodnju kefirnog napitka	20
3.2.4. Proizvodnja kefirnog napitka na tršćanom šećeru.....	20
3.2.5. Ispitivanje utjecaja različitih sladila na metabolizam šećera	21
3.3. ANALITIČKE METODE	21
3.3.1. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase zrnaca kefirnog napitka.....	21
3.3.2. Priprema uzoraka za UPLC analizu.....	22
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI.....	23
3.4.1. Prinos biomase (Y_x)	23
3.4.2. Prinos produkta (Y_p)	23
3.4.3. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ($Y_{x/s}$)	23
3.4.4. Koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{p/s}$)	24

3.4.5. Produktivnost (<i>Pr</i>).....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
4.1. REZULTATI DOBIVENI PRELIMINARNIM ISTRAŽIVANJEM	26
4.1.1. Određivanje optimalne temperature proizvodnje kefirnog napitka na konzumnom šećeru 26	
4.1.2. Fermentacija kefirnog napitka pri 25 °C i različitim koncentracijama supstrata	28
4.2. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA NA TRŠĆANOM ŠEĆERU	30
4.2.1. Proizvodnja kefirnog napitka pri različitim temperaturama i koncentraciji tršćanog šećera od 40 g L ⁻¹	31
4.2.2. Proizvodnja kefirnog napitka pri različitim temperaturama i koncentraciji tršćanog šećera od 60 g L ⁻¹	39
4.2.3. Rezultati utjecaja zaslađivača na proizvodnju kefirnog napitka	50
5. ZAKLJUČCI.....	56
6. LITERATURA	57
7. PRILOZI	61
7.1. JEDNADŽBE BAŽDARNIH PRAVACA ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PROIZVODA UPLC ANALIZOM	61
7.2. POPIS KRATICA.....	62

1. UVOD

U zadnjem desetljeću interes stanovništva za konzumacijom zdravih i funkcionalnih namirnica je u porastu, pa samim time i fermentiranim prehrambenim namirnicama koje pokazuju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. To uključuje njihov antioksidativni, antihiperглиkemijski i antimutageni utjecaj, međutim, bitno je naglasiti kako je pozitivan učinak na ljudsko zdravlje rezultat prisutnosti različitih mikroorganizama koji imaju probiotička svojstva (Grishina i sur., 2011). Kefirni napitak karakterizira kiselkast i voćni okus te niska koncentracija etanola, dostupan je širom svijeta no njegovo podrijetlo nije utvrđeno. Nagađa se kako polisaharidna zrnca prisutna u kefiru potječu s listova kaktusa roda *Opuntius*, a širom svijeta zrnca kefirnog napitka poznata su pod imenom „Tibicos“ ili „Tibi zrnca“ (Waldherr i sur., 2010).

Zrnca kefirnog napitka inače se sastoje od polisaharidnog polimera te združene kulture različitih mikroorganizama koju najčešće čine bakterije mliječne kiseline i različiti kvasci (Waldherr i sur., 2010). Sama zrnca su u obliku cvjetače, promjera 0,5-2 cm, prozirnog izgleda i elastične strukture.

Kefirni napitak najčešće se proizvodi u kućanstvima, a iako tijekom rukovanja nije postignuta antiseptičnost, fermentacija može trajati duži vremenski period. Iako se koristi već stoljećima u ljudskoj prehrani još uvijek postoje brojne nepoznanice. Temelj istraživanja su mikrobiološka raznolikost unutar samih zrnaca te ispitivanje strukturnih obilježja polisaharidnih molekula kefirnih zrnaca (Pidoux, 1989).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEFIRNI NAPITAK I USPOREDBA S MLIJEČNIM KEFIROM

Kefirni napitak predstavlja biotehnološki proizvod koji se najčešće dobiva fermentacijom podloga koje sadrže visoku koncentraciju šećera (konzumni šećer ili šećer iz nekog drugog izvora). U podlogu se tako može dodati i sušeno voće (najčešće sušene smokve) ili kriške limuna koji se uglavnom dodaju radi poboljšanja okusa, ali i unosom dodatnih nutrijenata koji mogu pozitivno utjecati na proces fermentacije (Marsh i sur., 2013).

Kefirni napitak trenutno se najčešće proizvodi u kućanstvima (Laureys i De Vuyst, 2014), no postoji i nekoliko malih tvrtki koje se bave njegovom proizvodnjom čiji se proizvodi često mogu pronaći na policama trgovina zdrave hrane (Marsh i sur., 2013). Sama proizvodnja kefirnog napitka je relativno kompleksan postupak, jer je fermentaciju teško kontrolirati pa može postati nestabilna, što dovodi do promjene sastava finalnog proizvoda. Također može doći i do problema usporavanja rasta kefirnih zrnaca što može utjecati na njihovo ponovno korištenje, ali i uzrokovati teškoće prilikom prijenosa u veće mjerilo (Laureys i De Vuyst, 2014).

Za fermentaciju kefirnog napitka odgovorni su mikroorganizmi prisutni u zrnacima kefirnog napitka koji čine združenu mikrobnu kulturu različitih vrsta kvasaca i bakterija. Za razliku od zrnaca mliječnog kefirna čiji se matriks sastoji od proteina, polisaharida (od kojih prednjači kefiran), različitih staničnih komponenata te mnogih drugih nedefiniranih sastojaka (Pogačić i sur., 2013), kod kefirnog napitka polisaharidni matriks građen je isključivo od dekstrana. Morfološka usporedba zrnaca kefirnog napitka i mliječnog kefirna prikazana je na slici 1.

Fermentacija podloge traje najčešće 2-4 dana pri sobnoj temperaturi, nakon čega se izdvaja supernatant koji se podvrgava daljnjoj obradi, dok se zrnca kefirnog napitka recikliraju. Kefirni napitak u konačnici ima slaktasto-kiselkasti okus, može sadržavati mali postotkak etanola (do 2 % vol vol⁻¹), te je lagano žućkaste boje. Često sadrži i voćne arome zbog različitih hlapivih spojeva koji uvelike pridonose aromi završnog proizvoda.

Nakon fermentacije u kefirni napitak mogu se dodavati i razni dodaci kako bi se utjecalo na finalni okus proizvoda. Tako se u gotovi proizvod mogu dodati voćni sokovi različitih okusa, ali i zaslađivači, čija se fermentabilnost i mogući utjecaji na završni proizvod ispitivala i u ovom diplomskom radu.



Slika 1. Usporedba morfologije zrnaca mliječnog i kefirnog napitka

2.2. BIORAZNOLIKOST KEFIRNIH ZRNACA

Glavni produkti tijekom proizvodnje kefirnog napitka su etanol, mliječna kiselina, glicerol, octena kiselina i manitol te brojni spojevi koji mu daju aromu. Od navedenih spojeva u najvećoj su koncentraciji prisutni 2-metil-1-propanol, izoamilni alkohol, etil acetat, etil heksanoat i etil oktanoat. Glavni utjecaj na njihovu prisutnost ima bioraznolikost i sastav kefirnih zrnaca. Od bakterijskih vrsti u kefirnom napitku najzastupljenije su bakterije iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Acetobacter* (Pidoux i sur., 1990). Osim njih, u združenoj kulturi zrnaca kefirnog napitka nalaze se i brojni kvasci; ponajprije iz rodova *Saccharomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Zygorulasporea* i *Candida* (Waldherr i sur., 2010). Procijenjeno je kako su bakterije prisutne u vodenim zrnacima u rasponu od $10^6 - 10^8$ CFU g^{-1} , dok su kvasci prisutni u količini od $10^6 - 10^7$ CFU g^{-1} (Gulitz i sur., 2011). Kefirna zrnca dokazano sadrže i druge brojne i različite mikroorganizme, ali je bitno naglasiti kako različita zrnca vodenih kefira pokazuju veliku raznolikost mikrobne populacije. Iz tog razloga potreban je sistematičan pristup mikrobiološkom istraživanju zrnaca vodenih kefira korištenih za pojedine eksperimente.

Tek je nedavno otkrivena prisutnost *Bifidobacterium psychraerophilum/crudilactis* (Stadie i sur., 2013), ali i nova vrsta iz roda *Oenococcus*, nazvane *Candidatus Oenococcus aquikefiri* (Verce i sur., 2019) u kefirnom napitku.

Kao potencijalna funkcionalna/zdrava hrana, bitno je naglasiti kako kefirni napitak sadrži mikroorganizme koji su probiotici i pozitivno utječu na ljudsko zdravlje, kao npr. mikroorganizmi iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, ali i *Saccharomyces* u manjoj mjeri.

2.2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (bakterije mliječne kiseline, BMK) znatno su prisutne u zrnima kefirnog napitka a prema načinu metabolizma šećera mogu se podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne BMK. Poznata su tri puta razgradnje heksoza kod bakterija mliječne kiseline, a zajedničko im je da razgrađuju fosforilirane heksoze samo gluko-konfiguracije. Međutim, međusobno se razlikuju prema metaboličkim putevima razgradnje izvora ugljika, što rezultira različitim finalnim proizvodima. Neke od najzastupljenijih BMK koje se nalaze u kefirnom napitku prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Homo- i heterofermentativne vrste BMK prisutne u vodenim kefirnim zrnima (Eckel i sur., 2020; Martinez-Torres i sur., 2016; Stadie i sur., 2013)

Homofermentativne vrste BMK	Heterofermentativne vrste BMK
<i>Lactobacillus hordei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus sactumensis</i>	
<i>Lactobacillus ghanensis</i>	
<i>Lactobacillus kefiri</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	

Homofermentativne BMK razgrađuju glukozu Embden-Meyerhof-Parnas putem razgradnje (glikoliza), gdje se molekula fruktoza 1,6 bisfosfata uz pomoć aldolaze cijepa na dvije trioze, koje daljnjom razgradnjom daju laktat kao završni produkt.

Kod heterofermentativnih BMK iz roda *Leuconostoc* razgradnja glukoze inicirana je oksidacijom glukoza-6-fosfata do 6-fosfoglukonata, iza koje slijedi dekarboksilacija i hidroliza pentoza-5-fosfata u C-2 i C-3 molekule.

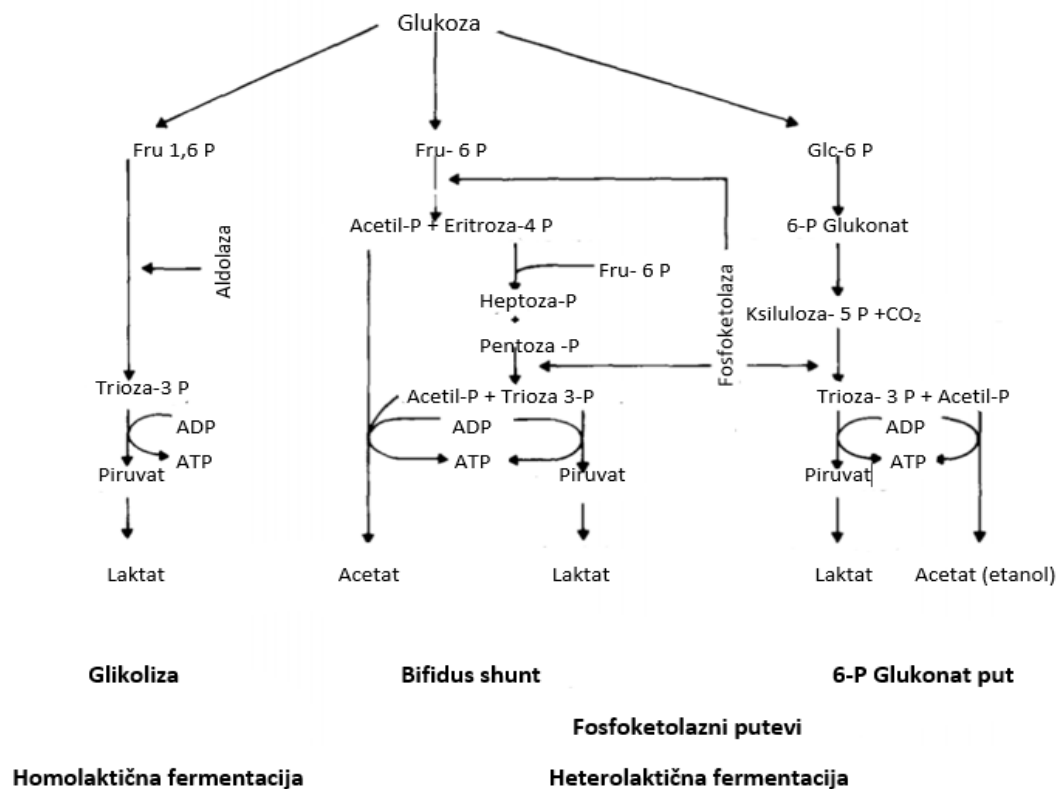
Time nastaju ekvimolarne količine CO₂, acetata (etanola) i laktata iz heksoza. Omjer količine nastalog acetata i etanola ovisi o oksidacijsko-redukcijskom potencijalu sustava (slika 2) (Kandler, 1983).

2.2.2. Bifidobakterije

Bifidobakterije su gram pozitivni mikroorganizmi koji su nekoć bili klasificirani kao bakterije mliječne kiseline upravo zbog toga što im je laktat glavni produkt metabolizma šećera. No, nakon 1974. godine, zbog filogenetskih i metaboličkih razlika u odnosu na bakterije mliječne kiseline, ipak su izdvojene u zasebnu skupinu (Grill, 1995). Što se tiče metabolizma ugljikohidrata, kod njih se susreće poseban metabolički put tzv. „Bifidus shunt“. Kod bifidobakterija, razgradnja ugljikohidrata je inicirana cijepanjem fruktoza-6-fosfata pomoću enzima fosfoketolaze na C-2 i C-4 molekule. Dok je C-2 molekula konvertirana u acetat, heptozna-7-fosfat se formira iz C-4 molekule i trioze dobivene cijepanjem dodatne molekule fruktoza-6-fosfata pomoću transketolaze. Cijepanjem heptozna-7-fosfata koji u reakciji s pentoza-6-fosfatom, uz pomoću enzima fosfoketolaze, u konačnici daje produkte acetat i laktat u molarnom omjeru 3:2 (Kandler, 1983). U usporedbi s BMK, one su znatno manje zastupljene u zrnima kefirnog napitka, a njihova prisutnost tek je nedavno otkrivena. Primjeri ovih bakterija su *Bifidobacterium aquikefiri* i *Bifidobacterium tibiigranuli*, a njihova uloga u mješovitoj kulturi zrnaca, za sada, još uvijek nije poznata. S obzirom da kefirni napitak na početku fermentacije sadrži nisku razinu dušika te nešto višu koncentraciju ugljikohidrata, to predstavlja dva izazova za proizvodne mikroorganizme; nisku koncentraciju aminokiselina s jedne te visok osmotski tlak s druge strane (Xu i sur., 2019). Zbog nedostatka ovih nutrijenata potrebno ih je osigurati iz drugih izvora (Stadie i sur., 2013). Poznato je kako neki kvasci imaju sposobnost sintetizirati aminokiseline pa je samim tim donesen zaključak kako su upravo oni odgovorni za sintezu ovih spojeva u kefirnom napitku.

Osim kvasaca, i bifidobakterije imaju sposobnost sinteze aminokiselina, ali i određenih vitamina (Ferrario i sur., 2014) što pridodaje na značaju njihovoj prisutnosti.

Osim navedenih, neki od ostalih produkata metabolizma ovih bakterija uključuju octenu, formijatnu i mliječnu kiselinu, a mogu i sintetizirati spojeve (npr. organske kiseline) koji utječu na aromu (Eckel i sur., 2020).



Slika 2. Glavni putevi razgradnje glukoze kod bakterija mliječne kiseline i bakterija roda *Bifidobacterium* (Kandler, 1983)

2.2.3. Bakterije octene kiseline

Bakterije octene kiseline su gram-negativne, štapićaste bakterije, te obligatni aerobi koji su vrlo otporni na niske vrijednosti pH. U prirodnom okruženju najčešće ih nalazimo na različitim staništima: od voća, cvjetova, zemlje te ostalim izvorima koji sadrže fermentabilne šećere.

U njih se ubrajaju rodovi *Acetobacter* koji preferiraju staništa bogata etanolom, dok one iz roda *Gluconobacter*, preferiraju staništa bogata ugljikohidratima (Raspor i Goranovič, 2008). Bakterije iz roda *Acetobacter* proizvode etanol kojeg potom oksidiraju u octenu kiselinu. Uz njegovu prisutnost dolazi do represije TCA ciklusa što rezultira nepotpunom oksidacijom finalnog proizvoda, dok u slučaju njegovog iscrpljivanja iz podloge, dolazi do oksidacije octene kiseline sve do CO₂ i H₂O. Za razliku od bakterija iz roda *Acetobacter*, one iz roda *Gluconobacter* uopće ne posjeduju enzime ciklusa trikarbonskih kiselina potrebnih za potpunu razgradnju acetata. Energiju dobivaju nepotpunom oksidacijom ugljikohidrata ili alkohola što rezultira sintezom različitih kiselina (npr. glukonska kiselina iz glukoze) (Jakob i sur., 2012). Bakterije octene kiseline imaju široku primjenu u biotehnologiji i proizvodnji hrane no unatoč tome još uvijek nisu u potpunosti istražene. Jedan od razloga tome leži u činjenici da ih je dosta teško uzgojiti na polučvrstim medijima što limitira njihovu upotrebu (Raspor i Goranovič, 2008). U usporedbi s BMK, bakterije octene kiseline puno su manje zastupljene u kefirnom napitku (3-10 % ukupne bakterijske populacije ovisno o podrijetlu kefirnih zrnaca), a ističu se *Acetobacter fabarum* i *Acetobacter orientalis* (Gulitz i sur., 2011).

Osim što su mogu biti korisne, nedavno je otkrivena i jedna vrsta bakterije octene kiseline koja je patogena, prva po dosadašnjim saznanjima. Pronađena je u limfnim čvorovima pacijenta koji je bolovao od kronične granulomatozne bolesti (CGD) koja dovodi do defektne proizvodnje superoksida i vodikovog peroksida (Segal i sur., 2000). Nazvana je *Granulibacter bethesdensis*, a karakterizira je to što je fakultativni metilotrof s optimalnom temperaturom za rast između 35 i 37 °C (Greenberg i sur., 2006).

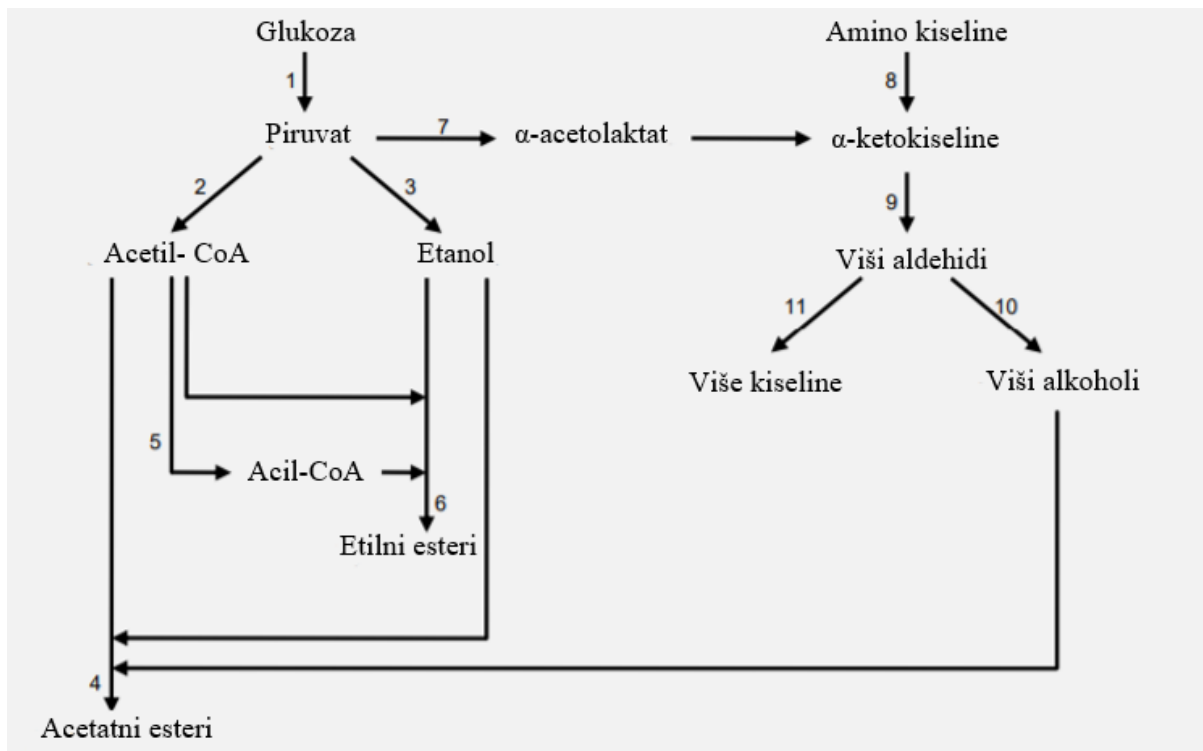
2.2.4. Kvasci

Kvasci metaboliziraju šećere glikolizom pri čemu se molekula šećera razgrađuje do piruvata uz redukciju NAD^+ u NADH . U slučaju da se radi anaerobnim uvjetima, molekula NADH se reoksidira alkoholnom fermentacijom na način da se piruvat najprije prevodi u acetaldehid koji se potom uz pomoć enzima alkohol dehidrogenaze reducira do etanola. Ako je kisik prisutan u podlozi, piruvat se najprije transportira u mitohondrij, a zatim prevodi u acetil-CoA i oksidira putem ciklusa trikarbonskih kiselina. Reducirani koenzimi NADH i FADH_2 dobiveni tijekom glikolize i TCA ciklusa reoksidiraju se preko respiratornog lanca kako bi se proizvela energija u obliku molekula ATP-a (Feldmann, 2005). Osim za dobivanje energije, citratni ciklus ima i važnu ulogu i u sintezi intermedijera potrebnih za sintezu aminokiselina, ali i za sintezu nukleotida (Feldmann, 2005). Kvasci imaju veliku ulogu tijekom sinteze tvari arome u proizvodnji kefirnog napitka, te je shema proizvodnje istih pomoću kvasaca prikazana na slici 3 (Pires i sur., 2014; Ravasio i sur., 2014).

Najzastupljeniji kvasac u zrnima kefirnog napitka je *Saccharomyces cerevisiae*. To je fakultativno anaeroban mikroorganizam koji može koristiti glukozu za rast biomase ili sintezu etanola zavisno o tome da li se radi o aerobnim ili anaerobnim uvjetima. Također, ovaj kvasac spada u Crabtree pozitivne što znači da u uvjetima visokih koncentracija glukoze, čak i u aerobnim uvjetima, može doći do nastanka etanola (De Dekken, 1966). U združenoj kulturi kefirnog napitka ovaj kvasac primarno proizvodi etanol, zbog anaerobnih uvjeta u kojima se odvija fermentacija, ali također ima i bitnu ulogu u sintezi aminokiselina i ostalih staničnih sastojaka koje drugi prisutni mikroorganizmi mogu koristiti za rast. Također, s obzirom da posjeduje enzim invertazu, omogućuje prevođenje saharoze u glukozu i fruktozu i na taj način omogućuje korištenje ovog izvora ugljika u proizvodnji kefirnog napitka (Shafiq i sur., 2003).

Od ostalih kvasaca prisutnih u vodenim kefirima bitno je spomenuti tek nedavno otkriven kvasac *Dekkera bruxellensis*, koji je inače odgovoran za spontanu fermentaciju belgijskog ale piva (Schifferdecker i sur., 2014). Zbog činjenice da se povezuje s kvarenjem vina i piva trenutno nije poznato ima li pozitivan ili negativan utjecaj u proizvodnji kefirnog napitka.

Osim navedenih kvasaca, u kefirnom napitku prisutni su još i kvasci *Candida californica* i *Pichia membranifaciens*. Zanimljivo je kako kod njih nije zabilježena proizvodnja etanola ni u jednoj fazi proizvodnje kefirnog napitka (Martinez-Torres i sur., 2016).



Slika 3. Proizvodnja (Ehrlichov put) spojeva arome pomoću kvasaca: 1-metabolizam ugljikohidrata; 2-kompleks piruvat dehidrogenaze; 3-piruvat dekarboksilaza i alkohol dehidrogenaza; 4-alkohol acetil esteraza; 5-sinteza masnih kiselina; 6-etanol acil esteraza; 7- α -acetolaktat sintaza; 8-transaminaza; 9-dekarboksilaza; 10-redukcija pomoću dehidrogenaze; 11- oksidacija pomoću dehidrogenaze (Pires i sur., 2014; Ravasio i sur., 2014)

2.3. SIMBIOTSKI ODNOSI U KEFIRNIM ZRNCIMA

Simbioza je kao pojam definirana 1879. godine od strane njemačkog mikologa Heinricha Anton de Bary-ija kao „suživot različitih organizama“. U tipove simbioze ubrajamo mutualizam, komenzalizam i parazitizam (Leung i sur., 2008). Mutualizam predstavlja simbiotski odnos dvaju ili više mikroorganizam pri čemu oba ili svi članovi imaju koristi jedni od drugih. Kod komenzalizma samo jedan član simbioze ima koristi u simbiotskom odnosu, dok drugi takvu korist nema. U slučaju parazitizma jedan organizam ima koristi na račun drugog.

Primjer komenzalizma u kefirnom napitku su sinteza određenih staničnih sastojaka (aminokiselina, vitamina itd.) koje proizvodi kvasac ili bakterija iz roda *Bifidobacterium*, koje onda ostali prisutni mikroorganizmi mogu iskoristiti. Također, invertazna aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* primjer je pozitivnog utjecaja na združenu kulturu u kefirnom napitku. Nadalje, sličan primjer vidljiv je i kod kvasca *Zygorulaspora florentina*, koji bolje raste pri nižim pH vrijednostima podloge, a koja je rezultat proizvodnje mliječne i octene kiseline od strane laktobacila (Stadie i sur., 2013).

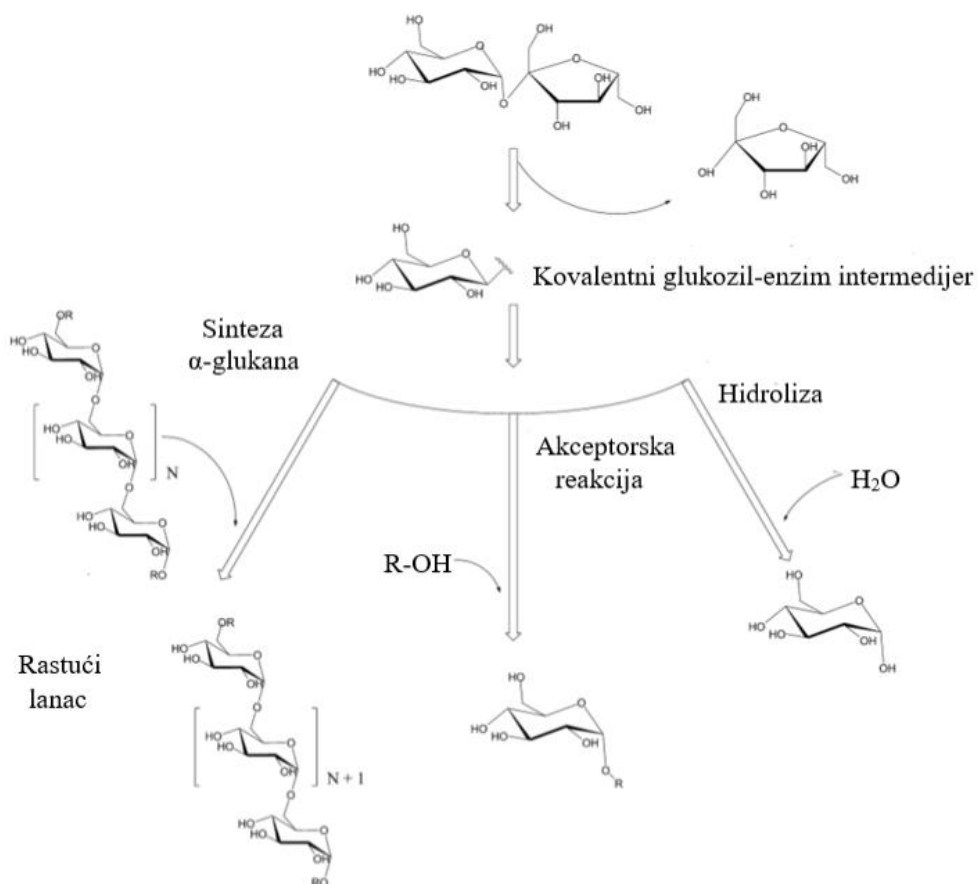
Kod kokultivacije s omjerom bakterije : kvasci = 0,1 : 1 s kulturama *L. hordei* i *L. nagelii* i kvascima *S. cerevisiae* i *Z. florentina* dokazan je bolji rast navedenih članova konzorcija u usporedbi s kultivacijom čistih kultura, što jasno ukazuje na međusobno pozitivno djelovanje ovih mikroorganizama (Stadie i sur., 2013).

No, kod kefirnih zrnaca primijećen je i negativan utjecaj jednog mikroorganizma na drugi. Naime u slučaju *L. hilgardii* i *Z. florentina*, gdje su CO₂, propionat, sukcinat, piruvat i acetat metaboliti kvasca odgovorni za bolji rast i sintezu mliječne kiseline kod bakterije *L. hilgardii*, rast kvasca *Z. florentina* drastično je usporen, a zabilježena je i snižena proizvodnja etanola i to do 65 % u usporedbi sa sintezom navedenih produkata čiste kulture *Z. florentina* (Leroi i Pidoux, 1993).

2.4. EGZOPOLISAHARIDNI MATRIKS I NJEGOVA SINTEZA

Bakterije mliječne kiseline poznate su kao proizvodnji različitih α -glukana i fruktana iz glukoze (Torino i sur., 2015) pri čemu je sinteza ovih egzopolisaharida katalizirana dekstransaharazama ili fruktansaharazama (slika 4). Ovi enzimi cijepaju vezu između glukoze i fruktoze u molekulama saharoze, otpuštajući jedan od monosaharida, dok drugi monosaharid prenose na akceptorsku molekulu, tj. rastući polisaharidni lanac (Leemhuis i sur., 2013). Molekule dobivene na ovaj način se dijele u skupine, zavisno o vrsti veza unutar polimernog lanca. Najbolje opisani α -glukani su dekstrani koji se sastoje od α -1,6 povezanih glukoznih jedinica pri čemu se njihova struktura može granati na različite načine (položaj O2, O3 i O4). Ostali, manje zastupljeni α -glukani su mutani (1,3- i 1,6- veze), alternani (naizmjenične 1,3- i

1,6- veze) i reuterani (1,4- i 1,6-veze). Fruktani su najčešće podijeljeni na fruktane levanskog tipa (β -2,6- veze) i fruktane inulinskog tipa (β -2,1-veze) (Zannini i sur., 2016).



Slika 4. Tipovi reakcija katalizirani glukansaharazama

Što se tiče α -glukana koje nalazimo u samom kefirnom napitku, najviše dominiraju dekstrani, razgranati na O-3 i O-2 poziciji, koji su slični strukturno, ali imaju različite molekulske mase (Fels i sur., 2018). Također, u kefirnom napitku pronađeni su i fruktani levanskog tipa. Na temelju navedenog, može se zaključiti kako kefirna zrnca sadrže povećan broj 1,3-povezanih glukoznih jedinica u usporedbi s vodenom otopinom samog kefira. Metilacijskom analizom i enzimskim fingerprintingom moguće je odrediti kako dekstrani u zrnima i kefirnom napitku sadrže različite količine istih strukturnih elemenata, što bi moglo značiti da su proizvedeni od strane različitih mikroorganizama (Fels i sur., 2018).

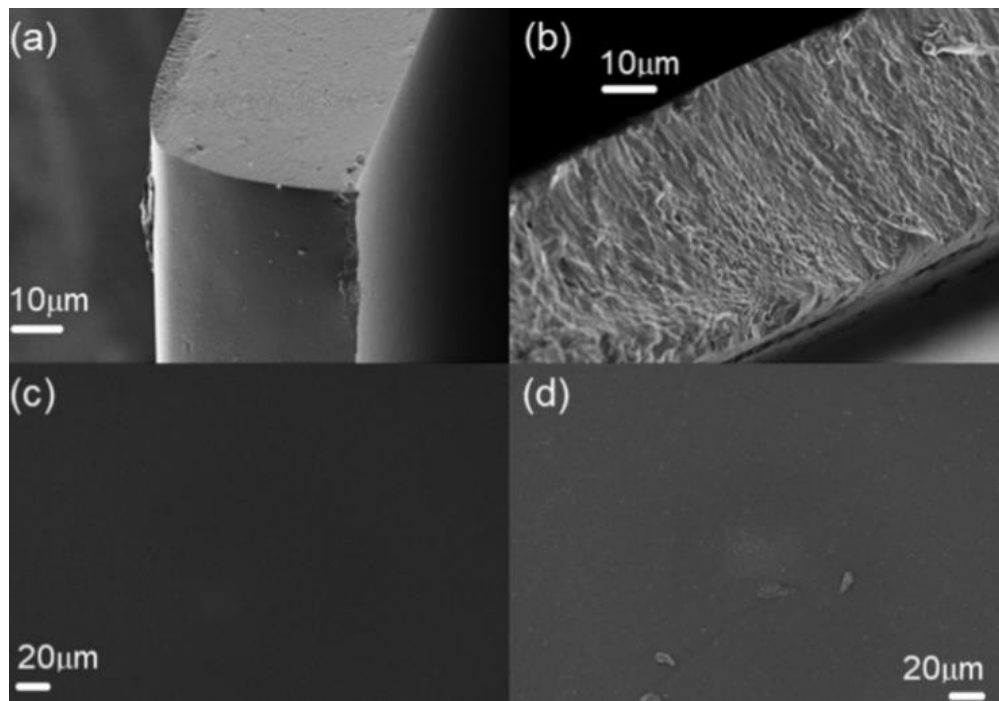
Brojna istraživanja ukazuju na činjenicu da su mnoge vrste bakterija mliječne kiseline, koje se prirodno nalaze u kefirnom napitku, sposobne proizvoditi egzopolisaharide, npr. *Lactobacillus casei*, ali i *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus hordei* te *Lactobacillus hilgardii*, koja se, između ostalog, smatra najbitnijim producentom dekstrana u kefirnom napitku (Pidoux i sur., 1988). Ovi i slični polisaharidi mogli bi postati predmet interesa u budućnosti zbog potencijalne upotrebe u prehrambenoj i biotehnološkoj industriji, stoga je potrebno dobro poznavanje procesa sinteze i proizvodnje istih (Waldherr i sur., 2010).

2.5. UPOTREBA KULTURE KEFIRNOG NAPITKA U DRUGE SVRHE

Drugačiji način upotrebe i iskorištavanja kefirnih zrnaca nakon fermentacije uključuje proizvodnju biorazgradivih materijala. Prvi korak u tom postupku je izdvajanje i pročišćavanje biopolimera iz biomase, korištenjem fizikalnih ili kemijskih procesa, s ciljem poboljšanja stvaranja navedenih polimera. Međutim, u novije vrijeme počelo se i s korištenjem cijele biomase zrnaca kefirnog napitka što u konačnici rezultira većom efektivnosti postupka i smanjenom količinom otpadnih tvari (Coma i sur., 2019). Kefirna zrnca najprije se moraju homogenizirati ultrazvukom, kako bi se rastavila njihova struktura, a potom toplinski obraditi zbog što boljeg izdvajanja samih biopolimera (Delgado i sur., 2018).

U proizvodnju biorazgradivih materijala bitan je i dodatak plastifikatora (u ovom slučaju glicerola), koji se dodaje u različitim omjerima, nakon čega je smjesu potrebno dobro izmiješati.

Bitno je naglasiti da se cijeli postupak provodi u vakuumu radi uklanjanja mjehurića zraka nastalih tijekom pripreme. Na kraju procesa provodi se funkcionalna karakterizacija materijala prilikom čega se istražuju mikrostrukturna, toplinska te mehanička i hidratacijska svojstva dobivenog materijala (Coma i sur., 2019). Biofilmovi dobiveni iz zrnaca kefirnog napitka pokazuju dobru homogenost i strukturiranost, ne sadrže pukotine te pokazuju zadovoljavajuću razinu prozirnosti (slika 5), a dodatak plastifikatora imao je pozitivan utjecaj na toplinska i mehanička svojstva dobivenih filmova (Coma i sur., 2019).



Slika 5. Mikroskopska snimka poprečnog presjeka (3000 x) filmova bez (a) i uz (b) upotrebu 30 % plastifikatora i mikroskopska snimka površine filmova (500 x) bez (c) i uz d) upotrebu plastifikatora (Coma i sur., 2019)

Nadalje, jedna od mogućnosti korištenja kefirnog napitka je i u proizvodnji silaže (u ovom slučaju silaže sirka) (Gonda i sur., 2019). Dosad su razvijeni različiti pristupi kako bi se smanjila kontaminacija silaže plijesnima, a Schnürer i Jonsson (2011) predložili su kako bi savršena starter kultura za silažu trebala sadržavati kombinaciju različitih mikroorganizama; kvasaca i bakterija mliječne kiseline. Kvasci su sposobni kontrolirati rast plijesni, pogotovo u prvom dijelu procesa siliranja, a doprinose i smanjenju koncentracije kisika u silaži. U uvjetima bez kisika bakterije mliječne kiseline mogu potpuno inhibirati rast plijesni sniženjem pH vrijednosti proizvodnjom na način da proizvode organske kiseline ili antimikrobne spojeve. Upotreba prirodnih mikrobnih združenih kultura primjenjiva je i u biokontroli biljnih patogena i sprječavanja mikrobnog kvarenja hrane i sirovina (Thakkar i Saraf, 2015), stoga bi upotreba ovih mikroorganizama mogla rezultirati efikasnijim procesima koji će imati manje negativnog utjecaja na okoliš.

Za kraj valja spomenuti i istraživanja koja idu u smjeru primjene zrnca kefirnog napitka u fitoremedijaciji zbog njihove sposobnosti vezanja teških metala (Cu, Mn, Cr, Pb i Ni). S obzirom na njihovu strukturu i na funkcionalne grupe od kojih se sastoje ova sposobnost može imati velik značaj s obzirom na sve veću mogućnost kontaminacije vode ili hrane teškim metalima kao posljedica ljudskog djelovanja (Volpi i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Za provođenje eksperimentalnog dijela diplomskog rada korištena su zrnca kefirnog napitka, koja se sastoje od združene kulture različitih mikroorganizama, od kojih većinu čine bakterije mliječne kiseline, te kvasci roda *Saccharomyces*.

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 kislina	za UPLC, 96 %	Merk, Njemačka
n-butanol	99+ %	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.3. Hranjive podloge

Kultura kefirnog napitka održavana je u vodenoj otopini saharoze koncentracije 100 g L^{-1} pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$, u staklenoj posudi u kojoj je volumen podloge iznosio 500 mL.

U preliminarnim istraživanjima kao supstrat za uzgoj korišten je konzumni šećer te su u istraživanju korištene otopine s koncentracijama od 20, 40, 60 i 80 g L^{-1} . Istraživanja su provedena u staklenkama ukupnog volumena 250 mL, a volumen hranjive podloge bio je 150 mL. Ova četiri uzgoja provedena su pri temperaturi od $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Također je provedeno i istraživanje optimalne temperature proizvodnje kefirnog napitka, gdje je korištena koncentracija saharoze bila 100 g L^{-1} . Staklenke od 250 mL napunjene su s 150 mL hranjive podloge te je uzgoj proveden pri 15, 20 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

U drugom dijelu istraživanja, hranjive podloge korištene u proizvodnji kefirnog napitka dobivene su otapanjem tršćanog šećera s 98 % suhe tvari, pri čemu su dobivene otopine sadržavale 40 i 60 g L^{-1} šećera. Uzgoji u ovom slučaju provedeni su pri različitim temperaturama od 20, 25, 30 i $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Hranjive podloge u kojima se ispitivao utjecaj zaslađivača na metabolizam saharoze (eritrol, ksilitol i stevia) sadržavale su navedene spojeve u koncentraciji od 20 g L^{-1} u sva tri slučaja, dok je početna koncentracija saharoze u svim uzorcima bila ista (20 g L^{-1}). Volumen podloge u staklenkama bio je 150 mL, a eksperimenti su provedeni na temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.4. Aparatura i pribor

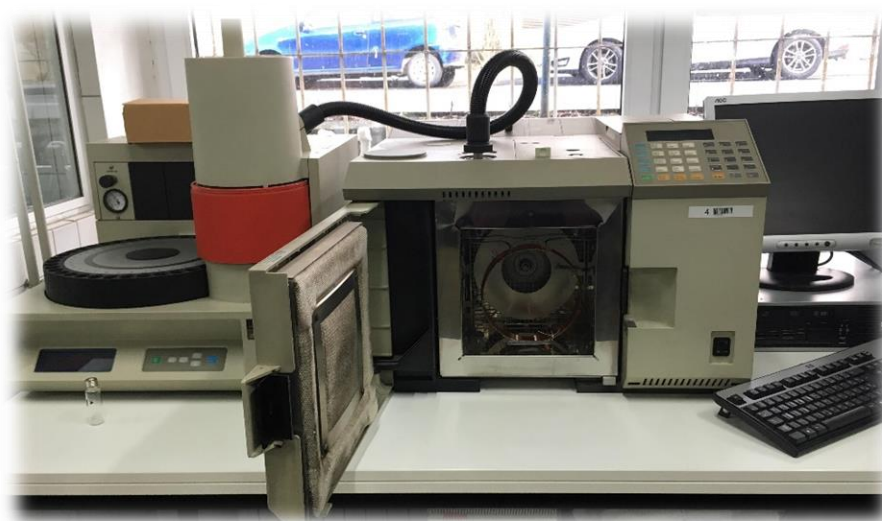
3.1.4.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti (UPLC)

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 (GC)

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 xy.) 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 6.).



Slika 6. 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);
- mikser EV-100, Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- magnetna mješalica Cimarec iTM Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)
- oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,20 μ m, 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- tresilica Certomat RM B.Braun Biotech International, Njemačka
- hladnjak i zamrzivač, Bosch, Njemačka

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprava hranjivih podloga

Hranjive podloge za preliminarna istraživanja dobivena su otapanjem izračunate mase konzumnog šećera (saharoze) u 150 mL vodovodne vode kako bi se postigle koncentracije od 20, 40, 60, i 80 g L⁻¹. Za pripremu otopina tršćanog šećera, u drugom dijelu ovog istraživanja, uzete su izračunate mase čiste saharoze pomnožene s koeficijentom 1,02 (zbog udjela vode od 2 %), te su pripremljene otopine s koncentracijom saharoze od 40 i 60 g L⁻¹. Za uzgoje na hranjivim podlogama koja su sadržavale sladila (ksilitol, eritrol i stevia) i konzumni šećer, pripremljene su otopine na način da su koncentracije zaslađivača bile jednake (20 g L⁻¹) i sve podloge su sadržavale istu početnu koncentraciju (20 g L⁻¹) konzumnog šećera. Nakon pripreme, sve otopine su sterilizirane u autoklavu na temperaturi 121 °C kroz 20 minuta te su ohlađene na temperaturu na kojoj se provodila fermentacija.

3.2.2. Umnožavanje biomase potrebne za provođenje uzgoja

Prije provođenja uzgoja potrebno je umnožiti biomasu kefirnih zrnaca kako bi dobili dovoljnu potrebnu za inokulaciju. Propagacija je provedena u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 250 mL u kojima je pripremljena hranjiva podloga koncentracije 100 g L⁻¹ bijelog konzumnog šećera, pri čemu je volumen podloge u tikvicama iznosio 100 mL. Tikvice sa hranjivim podlogama su zatim sterilizirane (121 °C/20 min) te su u njih dodane sušene smokve. Nakon hlađenja tikvice su inokulirane zrcima kefirnog napitka te začepljene vatenim čepom. Tako pripremljene, sadržaj tikvica termostatiran je na temperaturi od 25 °C kroz 14 dana.

3.2.3. Određivanje optimalne koncentracije i temperature za proizvodnju kefirnog napitka

U sklopu preliminarnih istraživanja određivana je optimalna temperatura za proizvodnju kefirnog napitka, pri čemu su eksperimenti rađeni na temperaturama od 15, 20 i 25 °C. U ovom slučaju fermentacije su provedene pri koncentraciji konzumnog bijelog šećera u koncentraciji od 100 g L⁻¹ uz volumen podloge od 100 mL u staklenkama od 250 ml pri čemu su sve staklene posude inokulirane s 10 g kefirnog zrnaca iz inokuluma. Pripremljeno je 5 staklenih posuda istog sastava (150 mL podloge koncentracije šećera od 100 g L⁻¹ i 10 g zrnaca kefirnog napitka). Tokom ovog istraživanja određivana je masa zrnaca tijekom fermentacije, te su iz svake posude pojedinačno uzorkovani supernatanti (1 mL) za UPLC analizu u sličnim vremenskim periodima (najčešće 3-4 dana) tijekom 14 dana uzgoja. U ovom dijelu preliminarnog istraživanja određivana je i optimalna koncentracija šećera za proizvodnju kefirnog napitka. Pripremljene su otopine u rasponu koncentracija (20-80 g L⁻¹) konzumnog bijelog šećera, volumena otopine 150 mL, te inokulirane s 10 g zrnaca kefirnog napitka. Za određivanje optimalne koncentracije pripremljeno je 5 staklenki identičnog sastava za svaku ispitivanu koncentraciju (150 mL podloge i 10 g zrnaca kefirnog napitka). Fermentacija je trajala 14 dana na 25 °C te je uzorkovanje provedeno iz svake staklenke zasebno u sličnim vremenskim periodima (3-4 dana). Vagana je masa kefirnih zrnaca tijekom uzgoja uzgoja, a također je provedena i UPLC analiza uzoraka radi praćenja tijeka same fermentacije.

3.2.4. Proizvodnja kefirnog napitka na tršćanom šećeru

Proizvodnja kefirnog napitka na tršćanom šećeru provedena je pri koncentracijama šećera (saharoze iz trske) od 40 i 60 g L⁻¹ i temperaturama od 20, 25, 30 i 40 °C. Staklene posude ukupnog volumena 250 ml sa 150 ml hranjive podlogom, prethodno sterilizirane i ohlađene na temperaturu uzgoja, inokulirane su s 10 ± 0,1664 g zrnaca kefirnog napitka uzetih iz matične otopine koncentracije 100 g L⁻¹, te zatim ispranih demineraliziranom vodom radi preciznije analize. Tijekom proizvodnje kefirnog napitka na tršćanom šećeru pripremljena je po jedna staklena posuda sa 150 mL hranjive podloge za svaku od zadanih koncentracija, te je uzorkovanje provedeno iz iste staklene posude kroz 31 dan fermentacije. Uzorkovanje se vršilo u rasponu od svaka 3-4 dana.

Tijekom uzorkovanja, u aseptičnim uvjetima, izuzeti su uzorci za provođenje UPLC analize (750 μL), dok je nakon završetka uzgoja provedena i GC analiza dvaju uzoraka te je izvagana i konačna masa zrnaca kefirnog napitka nakon fermentacije kako bi se izračunao prinos biomase.

3.2.5. Ispitivanje utjecaja različitih sladila na metabolizam šećera

U ovom dijelu istraživanja ispitivan je utjecaj sladila na metabolizam šećera kefirnog napitka. Sladila korištena u ovim eksperimentima bila su eritrol, ksilitol i stevia u koncentraciji od 20 g L^{-1} . Pripremljene hranjive podloge volumena 150 mL, osim navedene koncentracije sladila, sadržavale su i 20 g L^{-1} saharoze te su inokulirane s 10 g zrnaca kefirnog napitka na početku fermentacije. Ukupno vrijeme trajanja bioprocasa bilo je 31 dan. Analiza uzoraka uključivala je praćenje promjena koncentracija produkata tokom fermentacije kao i potrošnju supstrata (UPLC analitika), a određen je i prirast biomase kefirnih zrnaca vaganjem kefirnih zrnaca prije i nakon fermentacije.

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase zrnaca kefirnog napitka

U svrhu određivanja suhe tvari biomase, zrnca kefirnog napitka filtrirana su na filter papiru pomoću Büchnerovog lijevka. Prije same filtracije određene su mase osušenih i prethodno odvaganih čistih filter papira nakon čega je slijedila filtracija vakuumskom pumpom. Zrnca su stavljena na izvaganu petrijevu zdjelicu, zajedno s prethodno izvaganim filter papirom, te prebačena u sušionik gdje su sušena do konstantne mase pri 50 °C.

$$m_x = m_{ns} - m_{pz} - m_{fp} \quad (\text{g L}^{-1}) \quad [3-1]$$

m_{ns} - ukupna masa petrijeve zdjelice nakon sušenja [g]

m_{pz} - masa prazne petrijeve zdjelice [g]

m_{fp} – masa praznog filter papira [g]

3.3.2. Priprema uzoraka za UPLC analizu

Supernatant izuzet u aseptičnim uvjetima iz staklenih posuda korišten je za pripremu uzoraka za UPLC analizu. U plastične kivete (Eppendorfice) dodano je 750 μL supernatanta uzorka te 750 μL otopine cinkovog sulfata heptahidrata koncentracije 100 g L^{-1} . Dobivena otopina homogenizirana je tokom 20 sekundi uz pomoć vortexa te ostavljena na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta nakon čega je uslijedilo centrifugiranje tokom 10 minuta pri 7000 o/min.

Nakon završetka centrifugiranja, 200 μL supernatanta razrijeđeno je dodavanjem 800 μL demineralizirane vode. Tako pripremljeni uzorci profiltrirani su kroz filter veličine pora 0,20 μm . Tako pripremljeni uzorci korišteni su za UPLC analizu.

3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI

3.4.1. Prinos biomase (Y_X)

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

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

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

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 $[\text{g L}^{-1}]$

3.4.3. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$)

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

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

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

3.4.4. Koeficijent konverzije 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 [$g \ L^{-1}$],

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 [$g \ L^{-1}$]

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

t_U - ukupno vrijeme bioprocasa [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proveden je uzgoj zrnaca kefirnog napitka na različitim izvorima saharoze (konzumni šećer i tršćani šećer) pri različitoj koncentraciji supstrata. S obzirom da tršćani šećer može sadržavati različite dodatne minerale koji se inače izgube tijekom proizvodnje bijelog konzumnog šećera, ispitana je mogućnost njegove primjene u proizvodnji kefirnog napitka. Fermentacija se provodi najčešće pri sobnoj temperaturi uz anaerobne uvjete uzgoja kroz 2-4 dana tijekom čega dolazi do konverzije izvora ugljika u razne produkte (Laureys i sur., 2018). Istraživanje u sklopu ovog diplomskog rada provedeno je u svrhu boljeg razumijevanja utjecaja ključnih parametara u proizvodnji kefirnog napitka (temperatura i koncentracija šećera). Za određivanje optimalne temperature uzgoja korištene su temperature od 15, 20, i 25 °C dok je koncentracija šećera (bijelog) u podlozi bila 100 g L⁻¹. Nakon određivanja optimalne temperature uzgoja provedena su dodatna istraživanja u svrhu određivanja optimalne koncentracije šećera u podlozi. Uzgoji su provedeni pri 20, 40, 60 i 80 g L⁻¹ šećera pri temperaturi od 20 °C, uz konzumni šećer kao glavni izvor saharoze. Također ispitan je i utjecaj dodatka ksilitola, eritrola i stevije u postupku proizvodnje. Ispitivanje utjecaja zaslađivača provedeno je pri koncentracijama od 20 g L⁻¹, uz 20 g L⁻¹ saharoze, pri temperaturi od 25 °C, koja se u preliminarnim istraživanjima pokazala kao optimalna temperatura za proizvodnju kefirnog napitka.

4.1. REZULTATI DOBIVENI PRELIMINARNIM ISTRAŽIVANJEM

Cilj preliminarnog istraživanja bila je optimizacija procesa proizvodnje kefirnog napitka, pri čemu su promjenjivi parametri bili koncentracija saharoze u hranjivoj podlozi i temperatura uzgoja. Određivanje optimalne temperature provedeno je uz koncentraciju saharoze od 100 g L^{-1} pri 15, 20 i 25 °C. Zatim je na optimalnoj temperaturi od 25 °C proveden uzgoj s različitim koncentracijama saharoze u cilju određivanja njene optimalne koncentracije da se izbjegne negativan utjecaj na rast. Koncentracije pojedinih supstrata i produkata određene su UPLC analizom, a prikazane su niže navedenim tablicama.

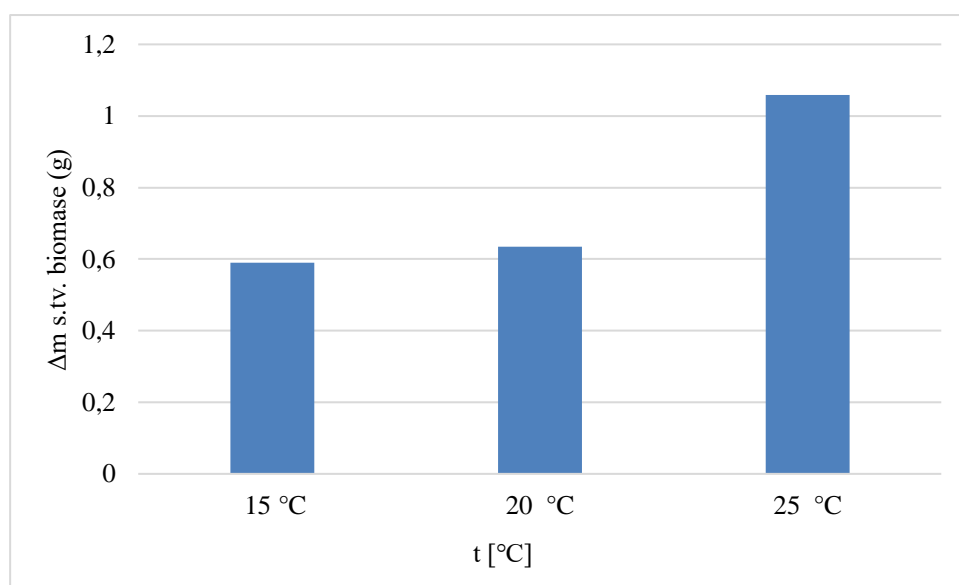
4.1.1. Određivanje optimalne temperature proizvodnje kefirnog napitka na konzumnom šećeru

Uzgoji u cilju određivanja optimalne temperature fermentacije provedeni su s hranjivom podlogom koncentracije saharoze od 100 g L^{-1} inokulirane sa 10 g zrnaca kefirnog napitka. Trajanje uzgoja bilo je 14 dana, te su UPLC analizom određene koncentracije metabolita i supstrata u supernatantu, dok je gravimetrijskom metodom određivan prinos suhe tvari biomase nakon sušenja (tablica 3).

Tablica 3. Koncentracije metabolita i supstrata dobivene UPLC analizom na kraju uzgoja

T (°C)	Masena koncentracija (g L^{-1})									
	Saharoza (g L^{-1})	Glukoza (g L^{-1})	Fruktoza (g L^{-1})	Glicerol (g L^{-1})	Manitol (g L^{-1})	Mliječna kiselina (g L^{-1})	Octena kiselina(g L^{-1})	Etanol (g L^{-1})	ΔS (g L^{-1})	$Y_{\text{etanol/S}}$ (g g^{-1})
15	67,7	9,1	12,7	0	0	0,4	0,4	3,2	32,3	0,099
20	64,6	7,7	12,4	0	0	0,5	0,9	3,8	35,4	0,107
25	51	9,9	23,3	0	0	0,4	0,8	5,3	49	0,108

Prema navedenoj tablici vidljivo je kako je najveća potrošnja supstrata bila pri temperaturi od 25 °C, dok je na istoj temperaturi vidljiv i najveći prinos većine praćenih produkata fermentacije. Međutim vidljivo je i kako je na kraju uzgoja preostala veća količina fermentabilnih šećera u sastavu kefirnog napitka, što može upućivati na inhibiciju supstratom pri ovoj koncentraciji šećera. Iz navedenog razloga koncentracija supstrata u hranjivoj podlozi od 100 g L⁻¹ više nije korištena u daljnjem tijeku istraživanja, već su dodatno ispitane koncentracije supstrata od 20, 40, 60 i 80 g L⁻¹.



Slika 7. Prinosi suhe tvari biomase pri različitim temperaturama nakon proizvodnje kefirnog napitka u trajanju od 14 dana

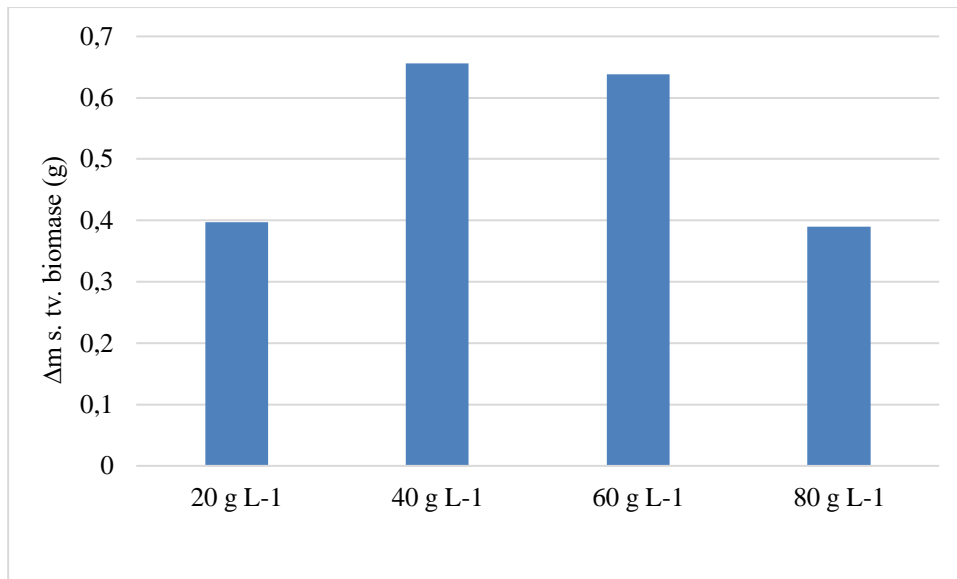
Slika 7 pokazuje slaganje s rezultatima prethodno navedenima u tablici 3, pri čemu je najveći prinos biomase zabilježen upravo pri 25 °C. Slabiji rezultati ostvareni pri nižim temperaturama u skladu su s očekivanjima, s obzirom da u sastavu zrnaca kefirnog napitka najvjerojatnije dominiraju različite vrste bakterija čija optimalna temperatura za rast, ovisno o vrsti, iznosi između 30 i 40 °C (Lorca i de Valdez, 1999).

4.1.2. Fermentacija kefirnog napitka pri 25 °C i različitim koncentracijama supstrata

U drugom dijelu preliminarnog istraživanja bilo je potrebno odrediti koncentracije supstrata kod kojih ne dolazi do inhibicije rasta združene kulture prisutne u kefirnom napitku. Eksperimenti su rađeni pri koncentracijama saharoze od 20, 40, 60 i 80 g L⁻¹ na temperaturi od 25 °C. Uzorci s različitim koncentracijama supstrata u hranjivoj podlozi inokulirani su sa 10 g zrnaca kefirnog napitka te je vrijeme fermentacije iznosilo 14 dana. Uzorkovanje je provedeno u razmaku 3-4 dana, te je napravljena UPLC analiza radi određivanja koncentracije supstrata i produkata u supernatantu (tablica 4).

Tablica 4. Rezultati uzgoja pri različitim koncentracijama saharoze na 25 °C nakon 14 dana

Saharoza (0. dan) (g L ⁻¹)	Saharoza (g L ⁻¹)	Glukoza (g L ⁻¹)	Fruktoza (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	ΔS (g L ⁻¹)	Y _{etanol/S} (g g ⁻¹)
20	2,8	2,9	6,8	0	0	0,22	0,76	2,1	17,2	0,1221
40	5,9	3,7	9,4	0	0	0,3	0,56	2,6	34,1	0,0762
60	33,2	4,8	10	0	0	0,34	0,52	2,5	26,8	0,0753
80	53,4	7,8	11,6	0	0	0,33	0,44	2,8	26,6	0,1052

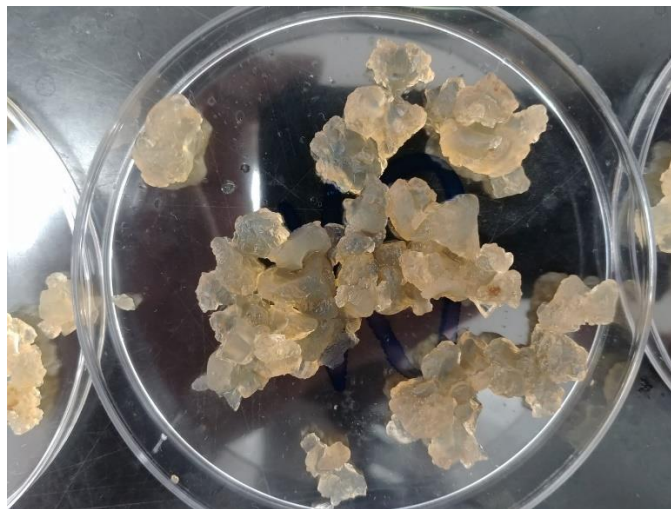


Slika 8. Prinosi biomase pri različitim koncentracijama supstrata nakon 14 dana uzgoja

Iz rezultata prikazanih u tablici 4 može se zaključiti kako su koncentracije supstrata od 40 i 60 g L⁻¹ pokazale najbolji omjer količine dobivenih produkata fermentacije i negativnog utjecaja viših koncentracija supstrata u podlozi. Kod koncentracije od 20 g L⁻¹ vidljivo je kako je supstrat skoro u potpunosti potrošen i koncentracije produkata u fermentiranoj podlozi su bile dosta niske s obzirom na ukupno trajanje bioprocasa. S druge strane, u eksperimentu s koncentracijom šećera od 80 g L⁻¹ vidljivo je kako je i dalje značajno izražena inhibicija fermentacije supstratom, što je rezultiralo visokom koncentracijom preostale saharoze u podlozi (53,4 g L⁻¹). Rezultati s biomasom združene kulture (slika 8) samo su potvrdili činjenicu da se mora postići kompromis između viših koncentracija supstrata i koncentracije glavnih produkata u finalnom proizvodu. Bitno je napomenuti da je i kod koncentracija saharoze u podlozi od 40 i 60 g L⁻¹ također rezultiralo relativno niskom koncentracijom produkata s obzirom na duljinu trajanja, ali upravo kod ovih koncentracija zabilježen je najveći prirast biomase, tako da su zbog te činjenice ove koncentracije bile korištene u daljnjim eksperimentima.

4.2. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA NA TRŠĆANOM ŠEĆERU

U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati proizvodnje kefirnog napitka na tršćanom šećeru. Zbog vlažnosti tršćanog šećera bilo je potrebno napraviti korekciju prilikom pripreme otopina zadanih koncentracija. Sušenjem vlažnog šećera i gravimetrijskom analizom izračunat je udio vode u tršćanom šećeru koji je iznosio 2 %. Samim time, prilikom računanja potrebnih masa za pripremu otopina, svaka masa je pomnožena koeficijentom 1,02 radi eliminacije pogrešaka prilikom pripreme hranjivih podloga. Pripremljene hranjive podloge također su inokulirane sa po 10 g zrnaca kefirnog napitka i uzgajane u anaerobnim uvjetima kroz 31 dan (slika 9). Izuzimanje uzoraka provedeno je u sličnim vremenskim razmacima, od 3-4 dana, dok je UPLC analizom praćena promjena koncentracije supstrata i produkata metabolizma. U sklopu ovog istraživanja napravljena je i GC analiza na kraju uzgoja, radi analize hlapljivih spojeva sintetiziranih tijekom fermentacije. Kako bi se potvrdili rezultati istraživanja na bijelom konzumnom šećeru i ovdje su provedeni eksperimenti pri različitim temperaturama.



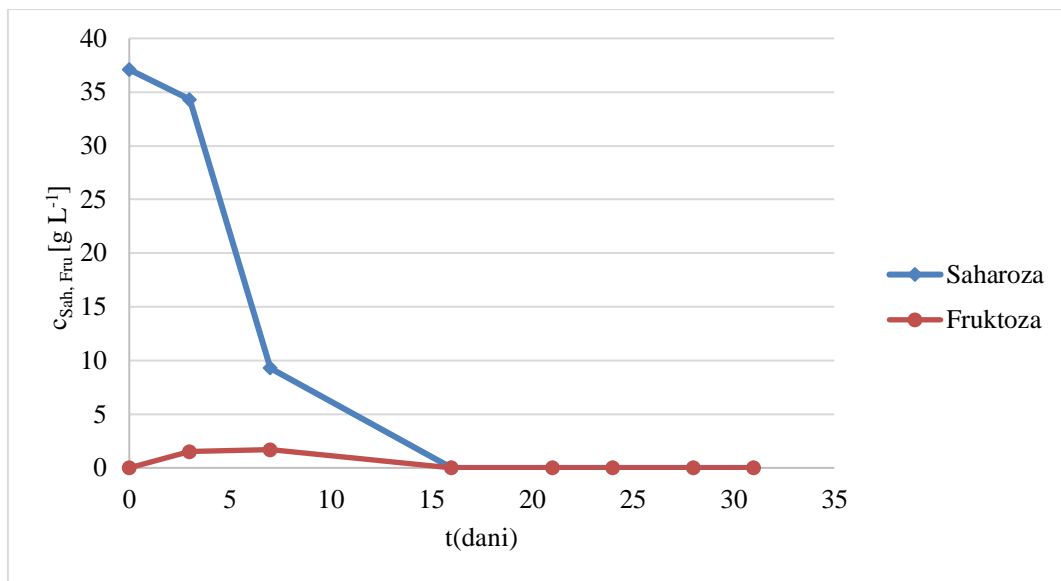
Slika 9. Zrnca kefirnog napitka korištena za fermentaciju tršćanog šećera

4.2.1. Proizvodnja kefirnog napitka pri različitim temperaturama i koncentraciji tršćanog šećera od 40 gL⁻¹

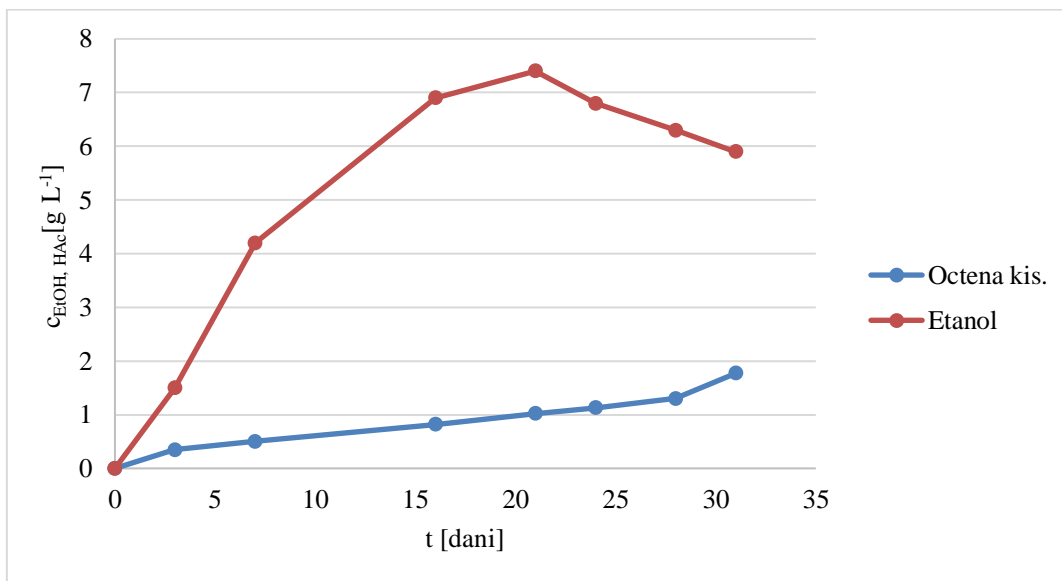
Proveden je uzgoj u trajanju od 31 dana za svaku od navedenih temperatura i koncentracija, te su prikazani rezultati dobiveni UPLC analizom supernatanta tijekom trajanja proizvodnje kefirnog napitka.

Tablica 5. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji tršćanog šećera od 40 g L⁻¹ i temperaturi 20 °C nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L ⁻¹)	Glukoza (g L ⁻¹)	Fruktoza (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)
0. dan	37,1	0	0	0	0	0	0	0
3. dan	34,3	0	1,5	0	0	0,3	0,35	1,5
7. dan	9,3	0	1,7	0	0	0,34	0,5	4,9
16. dan	0	0	0	0	0	0,48	0,82	6,9
21. dan	0	0	0	0	0	0,63	1,02	7,4
24. dan	0	0	0	0	0	0,78	1,13	6,8
28. dan	0	0	0	0	0	0,89	1,3	6,3
31. dan	0	0	0	0	0	1,13	1,77	5,9



Slika 10. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu s 40 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 20 °C

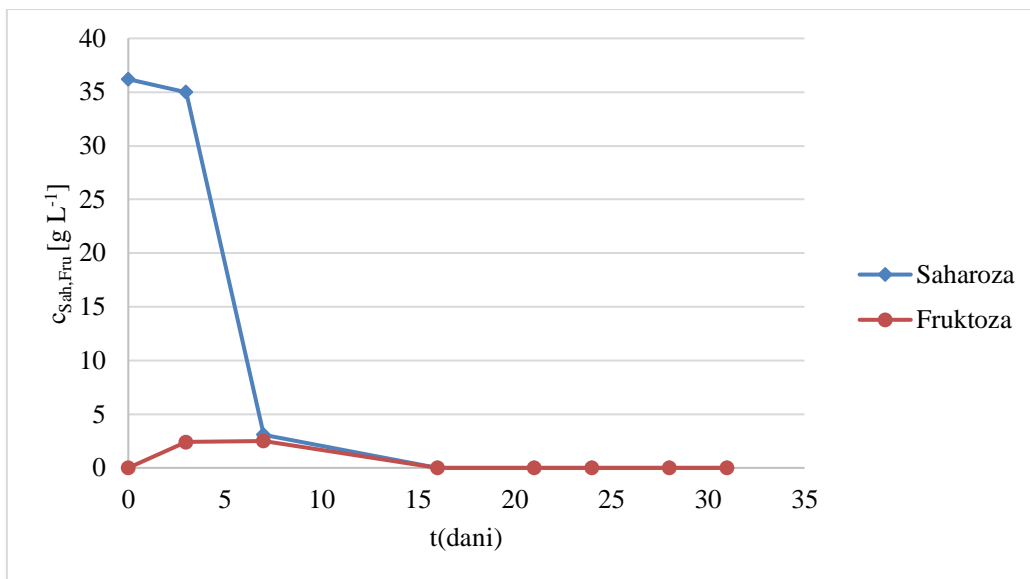


Slika 11. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u eksperimentu s 40 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 20 °C

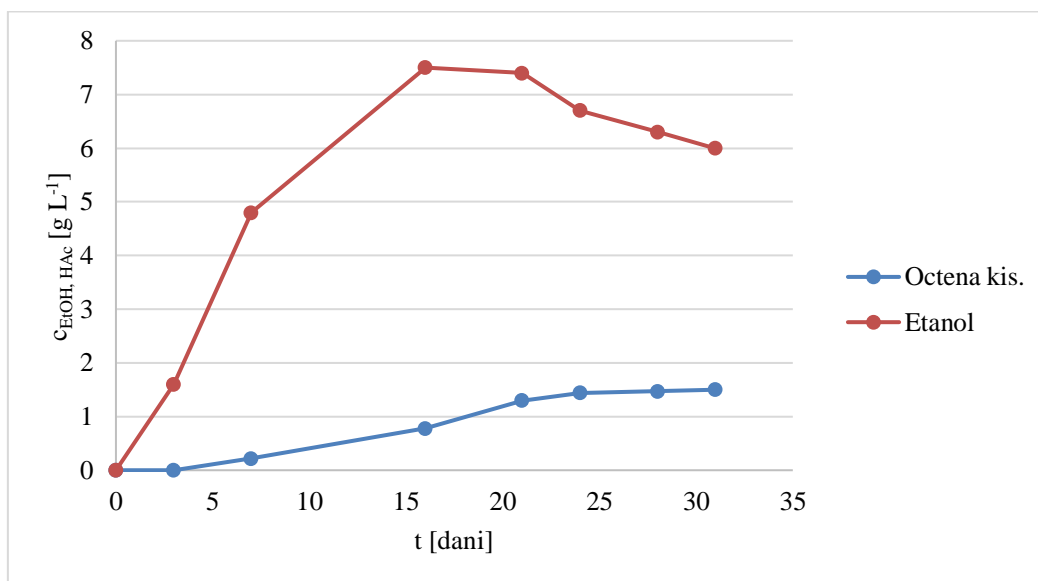
Tijekom uzgoja pri koncentraciji supstrata od 40 g L⁻¹ i temperaturi od 20 °C vidljivo je kako je potrošnja supstrata uz tršćani šećer kao izvor saharoze bila mnogo brža nego kod preliminarnih eksperimenata (slika 10), gdje se kao izvor supstrata koristio običan konzumni šećer. Također je vidljivo kako prema kraju fermentacije dolazi do djelomične oksidacije etanola u octenu kiselinu (slika 11), što je najvjerojatnije posljedica djelovanja *Acetobacter* bakterija koje su sastavni dio kefirnih zrnaca. Oksidacija etanola moguća je samo pri aerobnim uvjetima, koji su najvjerojatnije postignuti prilikom opetovanog uzorkovanja iz staklenih posudica.

Tablica 6. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji tršćanog šećera od 40 g L⁻¹ i temperaturi 25 °C nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L ⁻¹)	Glukoza (g L ⁻¹)	Fruktoza (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)
0. dan	36,2	0	0	0	0	0	0	0
3. dan	35	0	2,4	0	0	0,08	0	1,6
7. dan	3,1	0	2,5	0	0,01	0,288	0,22	4,8
16. dan	0	0	0	0	0	0,37	0,78	7,5
21. dan	0	0	0	0	0	0,18	1,3	7,4
24. dan	0	0	0	0	0	0,71	1,44	6,7
28. dan	0	0	0	0	0	0,71	1,47	6,3
31. dan	0	0	0	0	0	0,70	1,5	6



Slika 12. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu s 40 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 25 °C

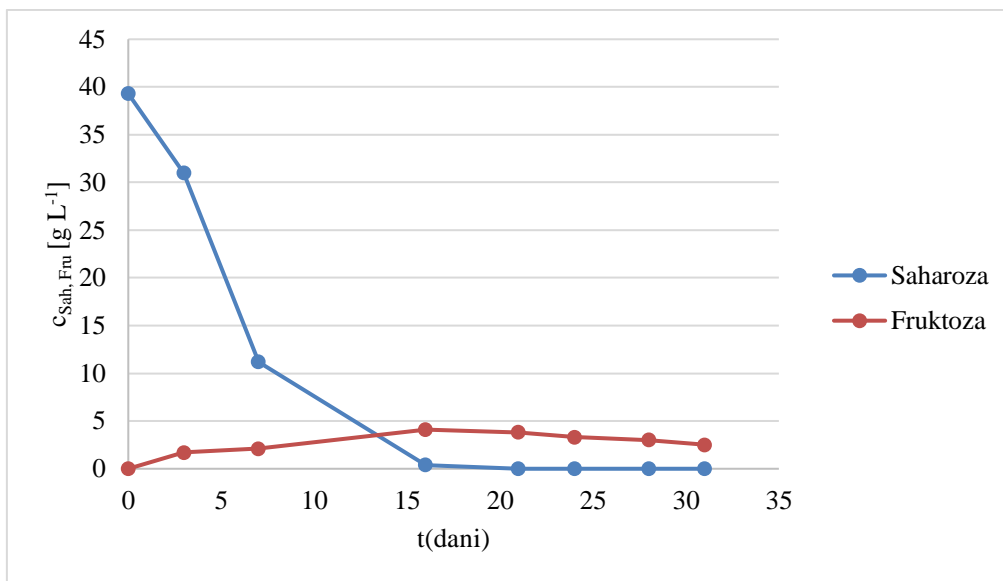


Slika 13. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u eksperimentu s 40 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 25 °C

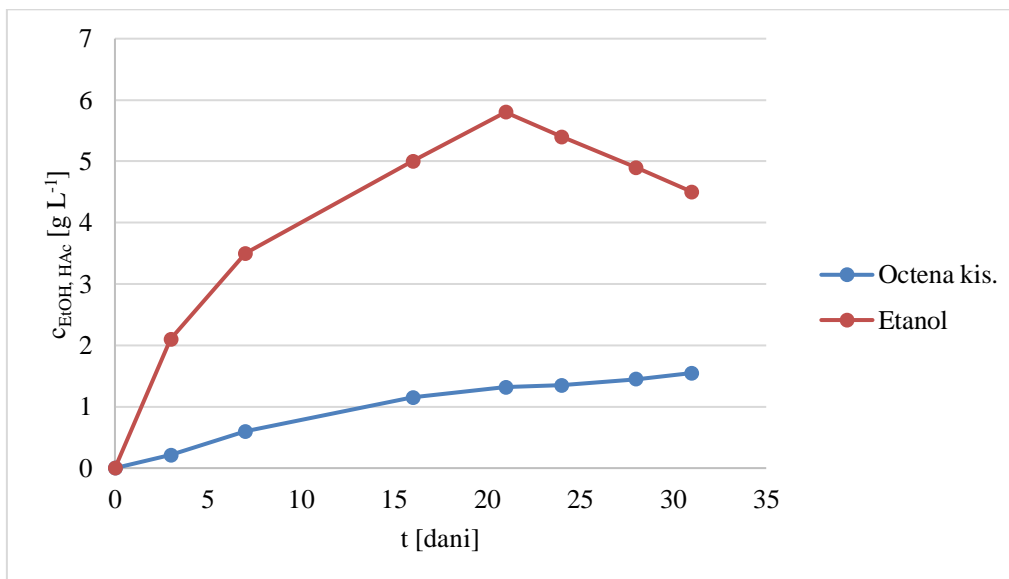
U eksperimentu s 40 g L^{-1} šećera i temperaturi $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (tablica 6) dobiveni su slični rezultati kao i kod temperature od $20 \text{ }^\circ\text{C}$, s razlikom u bržoj potrošnji saharoze, što je u skladu s preliminarnim istraživanjima provedenim na konzumnom šećeru. Supstrat je u konačnici potrošen (slika 12), a zabilježene koncentracije produkata metabolizma prisutnih mikroorganizama slične su onima iz prethodnog eksperimenta (slika 13). Također, pri kraju eksperimenta zabilježeno je smanjenje koncentracije etanola u vodenom kefiru, što je najvjerojatnije posljedica djelovanja bakterija octene kiseline.

Tablica 7. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji tršćanog šećera od 40 g L^{-1} i temperaturi $30 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L^{-1})	Glukoza (g L^{-1})	Fruktoza (g L^{-1})	Glicerol (g L^{-1})	Manitol (g L^{-1})	Mliječna kiselina (g L^{-1})	Octena kiselina (g L^{-1})	Etanol (g L^{-1})
0. dan	39,3	0	0	0	0	0	0	0
3. dan	31	0	1,7	0	0	0,54	0,21	2,1
7. dan	11,2	0	2,1	0	0	0,63	0,6	3,5
16. dan	0,4	0	4,1	0	0	0,7	1,15	5
21. dan	0	0	3,8	0	0	0,77	1,32	5,8
24. dan	0	0	3,3	0	0	0,87	1,35	5,4
28. dan	0	0	3	0	0	0,91	1,45	4,9
31. dan	0	0	2,5	0	0	0,91	1,55	4,5



Slika 14. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu s 40 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 30 °C

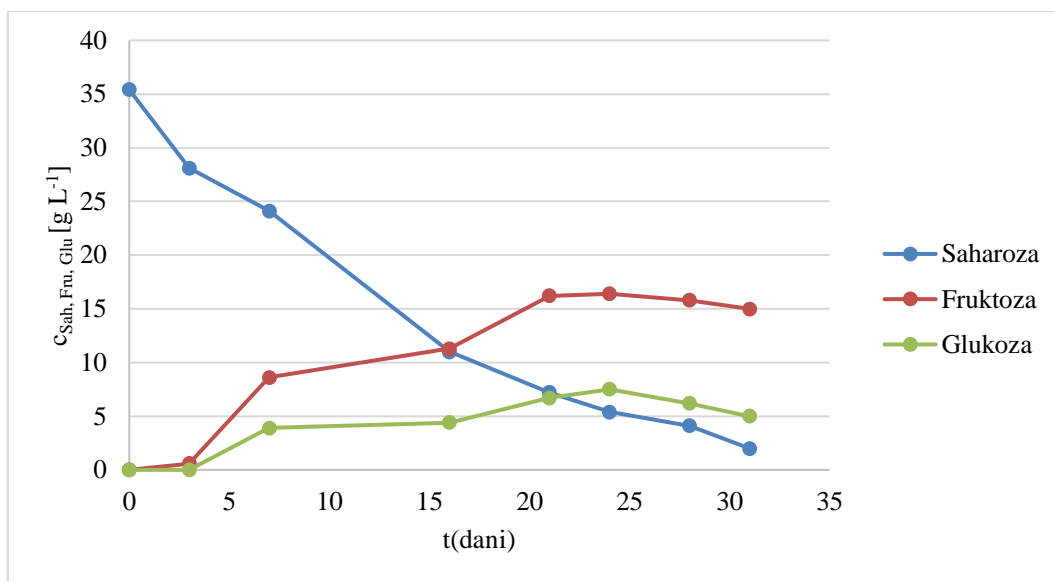


Slika 15. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u eksperimentu s 40 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 30 °C

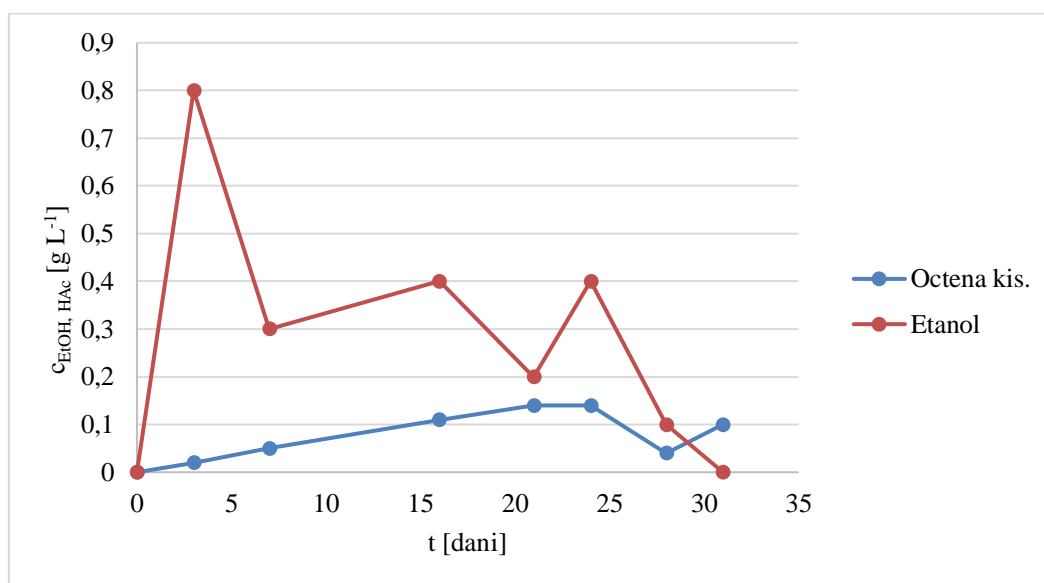
Rezultati dobiveni kod uzgoja gdje je koncentracija tršćanog šećera bila 40 g L^{-1} , a temperatura uzgoja $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (tablica 7), pokazuju kako je potrošnja supstrata i sinteza produkata nešto sporija nego u prethodna dva eksperimenta s obzirom da je 11. dana uzgoja preostalo $11,2 \text{ g L}^{-1}$ saharoze dok je pri temperaturama od 20 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ta koncentracija bila višestruko manja. Također je vidljivo da je i u ovom eksperimentu potrošen skoro sav izvor ugljika osim fruktoze koju mikroorganizmi posljednju koriste kao supstrat. Nakon 21. dana uočeno je smanjenje koncentracije etanola te povećanje koncentracije octene kiseline (slika 15), najvjerojatnije kao posljedica aktivnosti *Acetobacter* bakterija iako su u ovom eksperimentu, tokom cijelog vremena, zabilježene niže koncentracije etanola nego u prethodna dva slučaja. Saharozu je utrošena već nakon 16. dana uzgoja (slika 14) dok je istovremeno zabilježeno povećanje koncentracije fruktoze u podlozi kao posljedica invertazne aktivnosti kvasaca.

Tablica 8. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji tršćanog šećera od 40 g L^{-1} i temperaturi $40 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L^{-1})	Glukoza (g L^{-1})	Fruktoza (g L^{-1})	Glicerol (g L^{-1})	Manitol (g L^{-1})	Mliječna kiselina (g L^{-1})	Octena kiselina (g L^{-1})	Etanol (g L^{-1})
0. dan	35,4	0	0	0	0	0	0	0
3. dan	28,1	0	0,6	0	0	0,32	0,02	0,8
7. dan	24,1	3,9	8,6	0	0	0,44	0,05	0,3
16. dan	11	4,4	11,3	0	0	0,66	0,11	0,4
21. dan	7,2	6,7	16,2	0	0	0,75	0,14	0,2
24. dan	5,4	7,5	16,4	0	0	0,79	0,14	0,4
28. dan	4,1	6,2	15,8	0	0	0,77	0,14	0,1
31. dan	2	5	15	0	0	0,76	0,1	0



Slika 16. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu s 40 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 40 °C



Slika 17. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u eksperimentu s 40 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 40 °C

Rezultati uzgoja pri temperaturi od 40 °C (tablica 8) pokazuju kako ova temperatura nije optimalna za proces proizvodnje kefirnog napitka, s obzirom da je i nakon 31 dana zaostalo neutrošene saharoze, a i ostalih fermentabilnih šećera (glukoze i fruktoze) (slika 16).

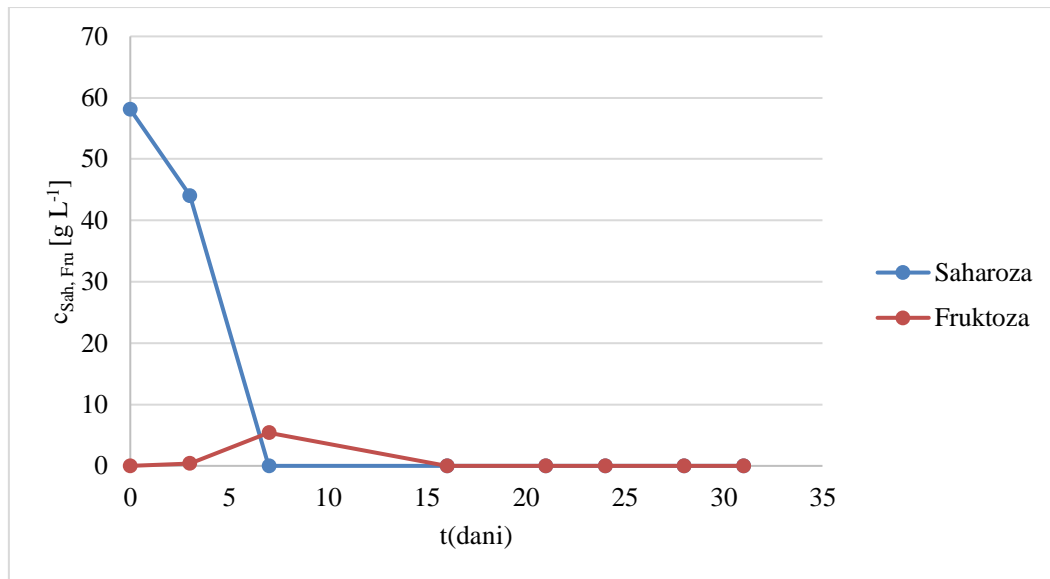
Glukoza i fruktoza u kefirnom napitku nastaju zbog invertazne aktivnosti kvasaca (*Saccharomyces*), koje kasnije bakterije mliječne kiseline mogu iskoristavati kao supstrat za rast, ali i za sintezu egzopolisaharidnog matriksa (Torino i sur., 2015). Međutim, s obzirom da je optimalna temperatura za rast kvasca 28 °C, na višoj temperaturi smanjena je brzina njegovog rasta kvasca, ali i invertazna aktivnost što dodatno utječe na rast prisutnih mikroorganizama (Slaa i sur., 2009). Također, na temelju tablice 8 može se zaključiti da je doprinos proizvodnji etanola uglavnom posljedica aktivnosti prisutnih kvasaca s obzirom da je pri ovoj temperaturi, osim smanjene invertazne aktivnosti, zabilježena i najniža koncentracija etanola od svih eksperimenata na tršćanom šećeru (slika 17).

4.2.2. Proizvodnja kefirnog napitka pri različitim temperaturama i koncentraciji tršćanog šećera od 60 g L⁻¹

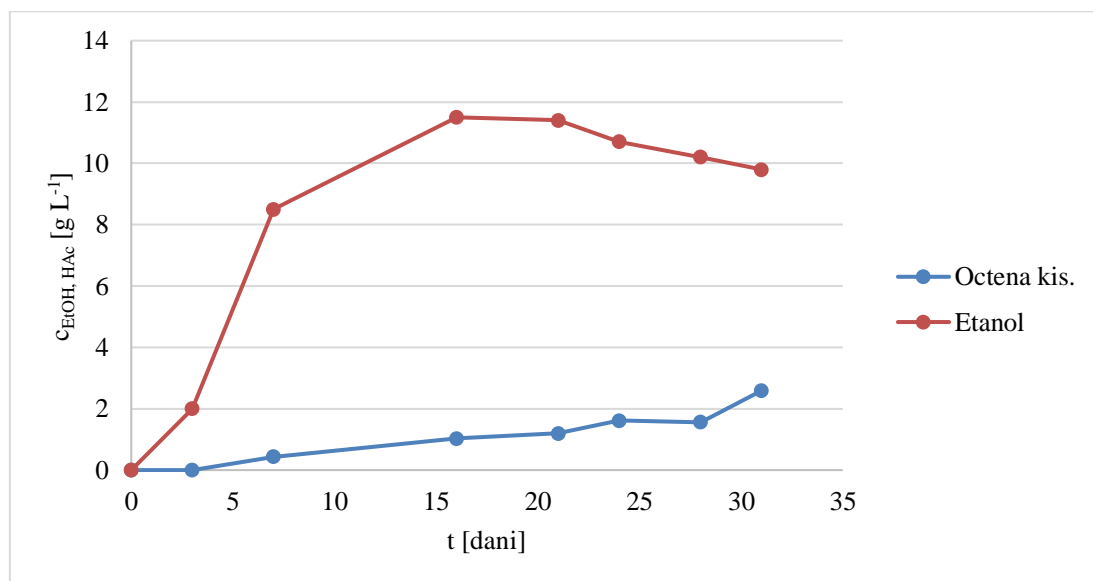
U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati dobiveni proizvodnjom kefirnog napitka pri temperaturama od 20, 25, 30 i 40 °C dok je koncentracija saharoze iz tršćanog šećera u podlogama iznosila 60 g L⁻¹.

Tablica 9. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji tršćanog šećera od 60 g L⁻¹ i temperaturi 20 °C nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L ⁻¹)	Glukoza (g L ⁻¹)	Fruktoza (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)
0. dan	58,1	0	0	0	0	0	0	0
3. dan	44,1	0	0,4	0	0	0,64	0	2
7. dan	0	0	5,4	0	0,96	0,79	0,43	8,5
16. dan	0	0	0	0	1,06	0,65	1,03	11,5
21. dan	0	0	0	0	1,07	0,55	1,2	11,4
24. dan	0	0	0	0	1,12	0,49	1,61	10,7
28. dan	0	0	0	0	0,84	0,47	1,56	10,2
31. dan	0	0	0	0	0,75	0,43	2,59	9,8



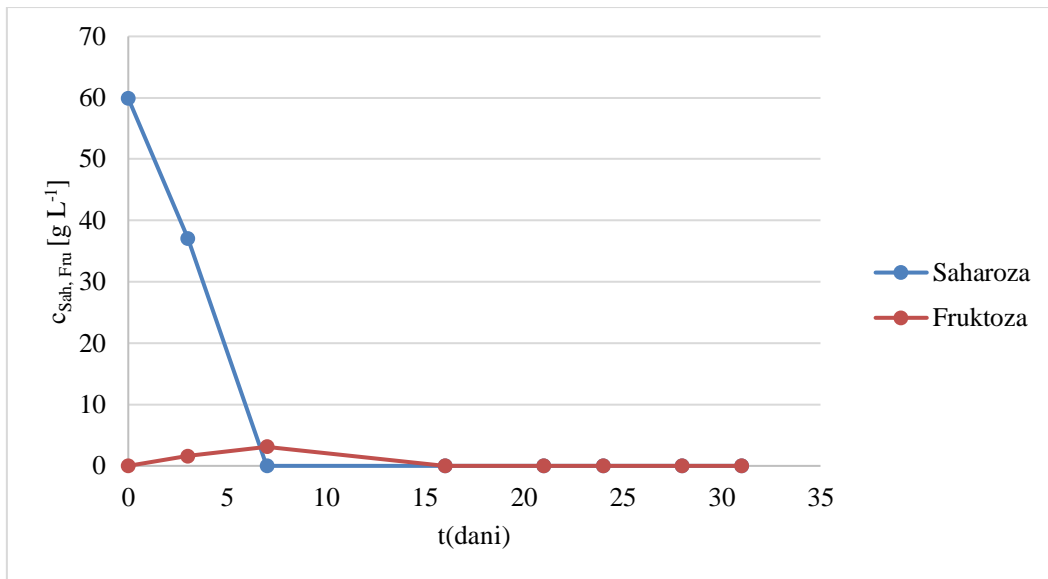
Slika 18. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu sa 60 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 20 °C



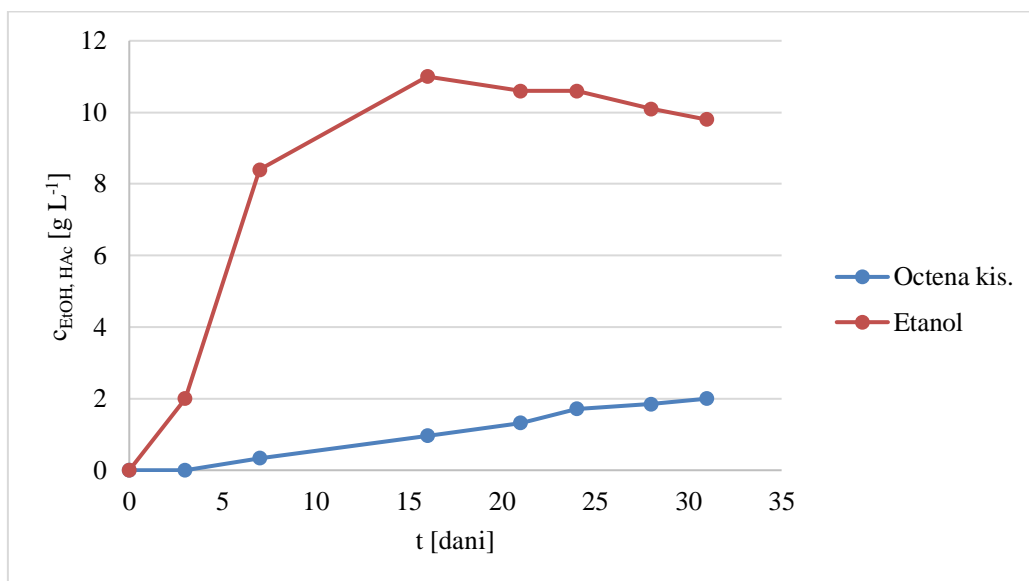
Slika 19. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u eksperimentu sa 60 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 20 °C

Tablica 10. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji tršćanog šećera od 60 g L⁻¹ i temperaturi 25 °C nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L ⁻¹)	Glukoza (g L ⁻¹)	Fruktoza (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)
0. dan	59,9	0	0	0	0	0	0	0
3. dan	37,1	0	1,6	0	0	0,16	0	2
7. dan	0	0	3,1	0	0,31	0,67	0,34	8,4
16. dan	0	0	0	0	0,57	0,76	0,96	11
21. dan	0	0	0	0	0,69	0,82	1,32	10,6
24. dan	0	0	0	0	0,63	0,89	1,71	10,6
28. dan	0	0	0	0	0,93	1,02	1,85	10,1
31. dan	0	0	0	0	0,97	1,06	2	9,8



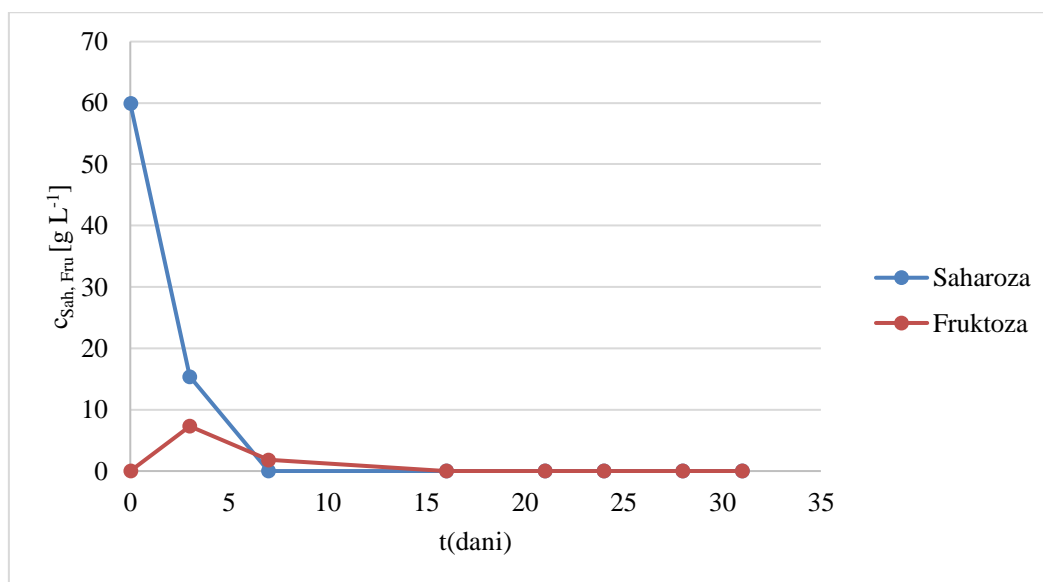
Slika 20. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu sa 60 g L^{-1} šećera i temperaturom od $25 \text{ }^\circ\text{C}$



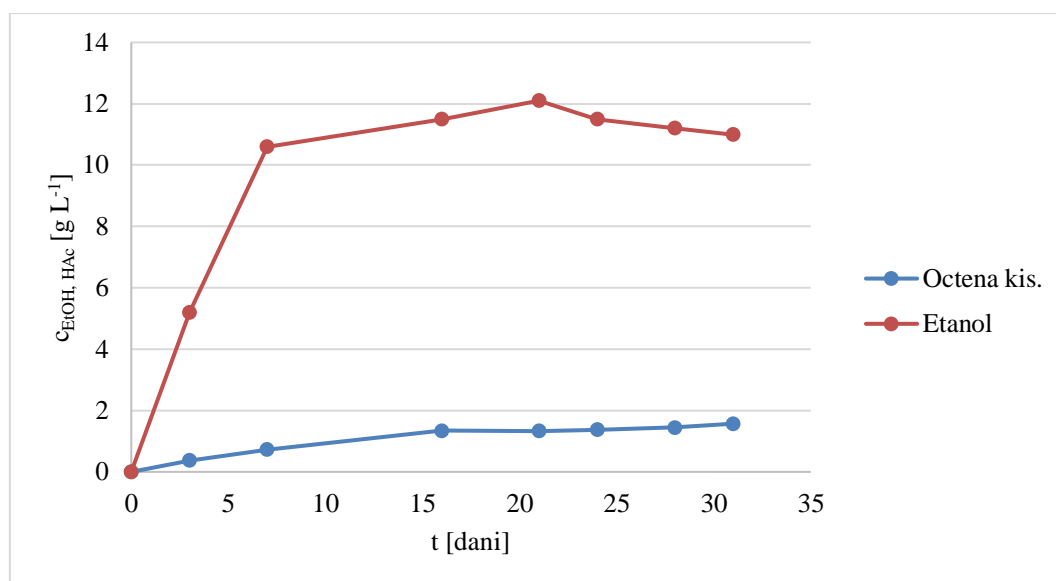
Slika 21. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u eksperimentu sa 60 g L^{-1} šećera i temperaturom od $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Tablica 11. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji tršćanog šećera od 60 g L^{-1} i temperaturi $30 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L^{-1})	Glukoza (g L^{-1})	Fruktoza (g L^{-1})	Glicerol (g L^{-1})	Manitol (g L^{-1})	Mliječna kiselina (g L^{-1})	Octena kiselina (g L^{-1})	Etanol (g L^{-1})
0. dan	59,9	0	0	0	0	0	0	0
3. dan	15,4	0	7,3	0	0,12	0,66	0,37	5,2
7. dan	0	0	1,8	0,1	0,18	0,71	0,73	10,6
16. dan	0	0	0	0	0,3	0,8	1,34	11,5
21. dan	0	0	0	0	0,53	0,88	1,33	12,1
24. dan	0	0	0	0	0,61	0,98	1,37	11,5
28. dan	0	0	0	0	0,65	1,15	1,45	11,2
31. dan	0	0	0	0	0,69	1,25	1,57	11



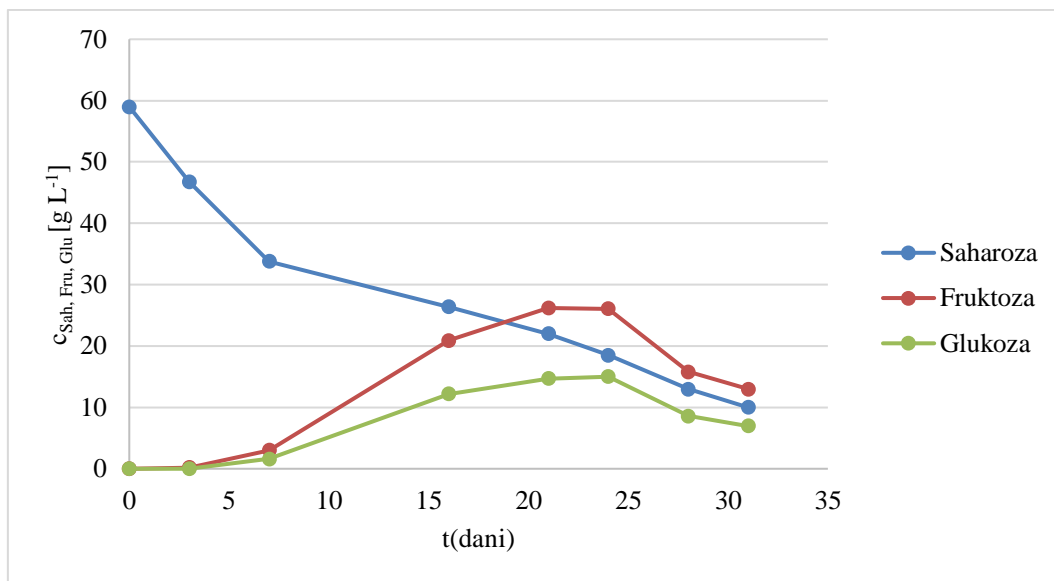
Slika 22. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu sa 60 g L^{-1} šećera i temperaturom od $30 \text{ }^\circ\text{C}$



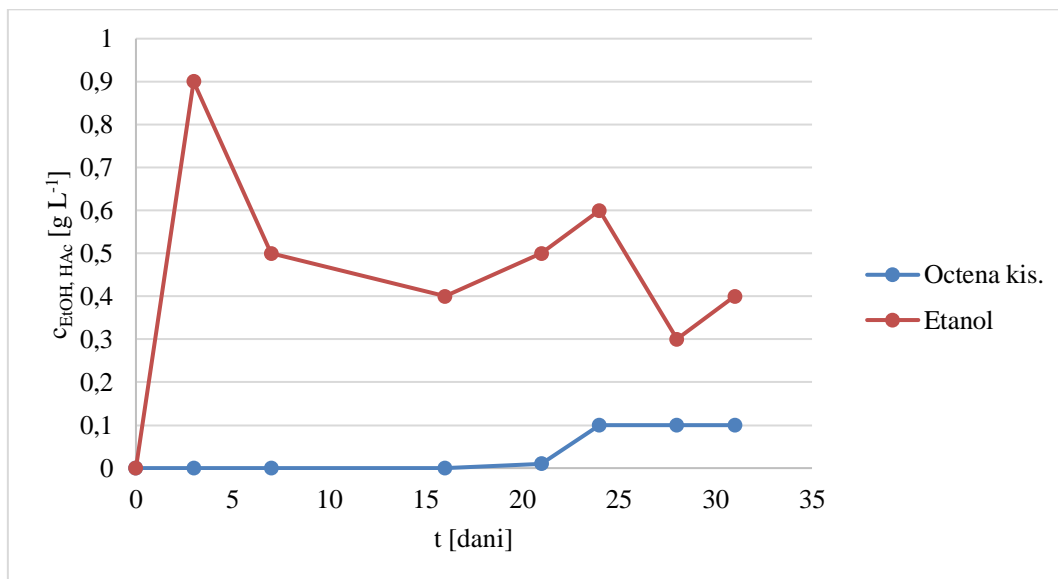
Slika 23. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u eksperimentu sa 60 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 30 °C

Tablica 12. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji tršćanog šećera od 60 g L⁻¹ i temperaturi 40 °C nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L ⁻¹)	Glukoza (g L ⁻¹)	Fruktoza (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)
0. dan	59	0	0	0	0	0	0	0
3. dan	46,8	0	0,2	0	0	0,27	0	0,9
7. dan	33,8	1,6	3	0	0,04	0,39	0	0,5
16. dan	26,4	12,2	20,9	0	0	0,51	0	0,4
21. dan	22	14,7	26,2	0	0	0,6	0,01	0,5
24. dan	18,5	15	26,1	0	0	0,71	0,1	0,6
28. dan	13	8,6	15,8	0	0	0,76	0,1	0,3
31. dan	10	7	13	0	0	0,77	0,1	0,4



Slika 24. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu sa 60 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 40 °C



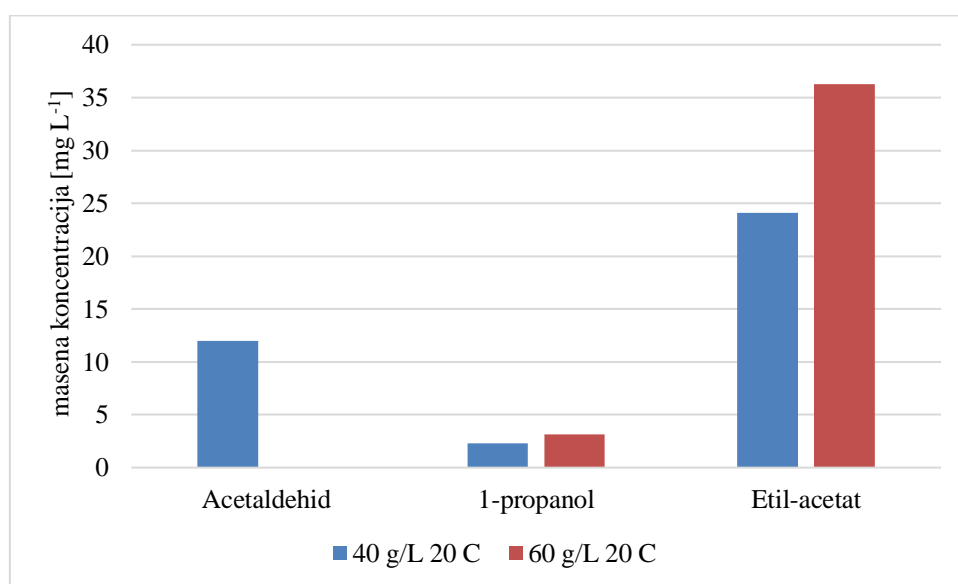
Slika 25. Promjena koncentracije metabolita u eksperimentu s 60 g L⁻¹ šećera i temperaturom od 40 °C

Rezultati dobiveni u eksperimentima s koncentracijom tršćanog šećera od 60 g L^{-1} slični su rezultatima dobivenima pri uzgojima s koncentracijom supstrata od 40 g L^{-1} pri temperaturama od 20, 25 i $40 \text{ }^\circ\text{C}$, kao što je vidljivo na tablicama 9, 10 i 12. Potrošnja supstrata i sinteza produkata bila je slična pa se na temelju toga može zaključiti da pri višoj koncentraciji supstrata u podlozi ne dolazi do značajnije inhibicije rasta združene kulture mikroorganizama. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima ostvarenim u dijelu istraživanja kada je konzumni šećer korišten kao supstrat. Jedina veća razlika u dobivenim rezultatima bila je u slučaju kada je temperatura fermentacije bila $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (tablica 11). Generalno, uzevši u obzir iskorištenje izvora ugljika i količinu produkata prisutnu u vodenom kefiru, može se zaključiti da je pri temperaturama do 30°C supstrat u eksperimentima bio u potpunosti potrošen dok je kod koncentracije šećera u podlozi od 40 i 60 g L^{-1} pri temperaturi $40 \text{ }^\circ\text{C}$ to nije bio slučaj. Više koncentracije produkata metabolizma prisutnih mikroorganizama zabilježene su, logično, kod eksperimenata s višim koncentracijama supstrata u podlozi. U usporedbi prvog dijela istraživanja na konzumnom šećeru i drugog dijela na tršćanom, upotreba tršćanog šećera rezultirala je sličnom dinamikom odvijanja bioprocasa. Pri nižim temperaturama (do $30 \text{ }^\circ\text{C}$), već nakon 7. dana fermentacije, došlo je do potrošnje fermentabilnih šećera (zaostala je uglavnom fruktoza u podlozi), a od produkata najveći udio čine octena kiselina i etanol. U tablici 13 sumarno su prikazani rezultati i pokazatelji uspješnosti kod eksperimenata s tršćanim šećerom. Najviši prinosi za octenu kiselinu ostvareni su kod uzgoja gdje su ostvareni najviši prinosi etanola (60 g L^{-1} saharoze i temperature uzgoja od 20 i $25 \text{ }^\circ\text{C}$) jer povećane koncentracije supstrata mogu utjecati na proizvodnju etanola i u aerobnim uvjetima dok je temperatura u tim eksperimentima bila blizu optimalne za bakterije iz roda *Acetobacter*.

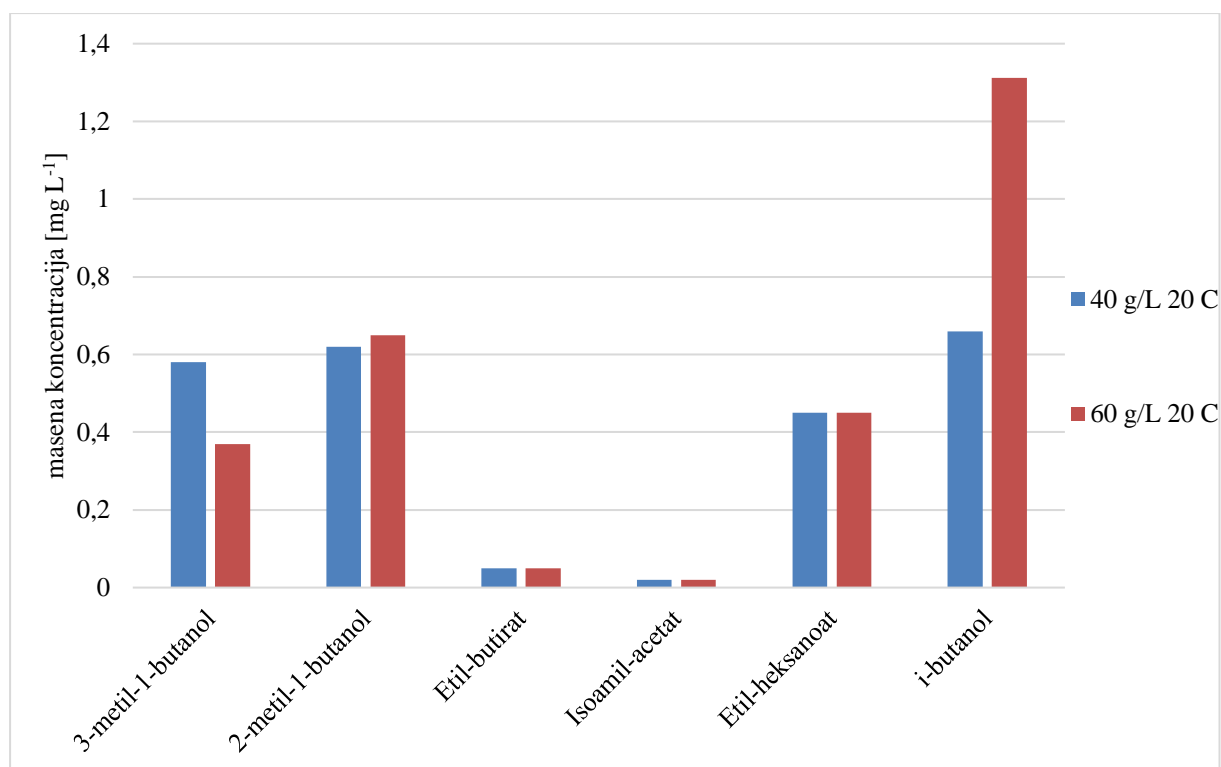
Tablica 13. Prikaz procesnih paramtera uzgoja dobivenih pri različitim koncentracijama tršćanog šećera i različitim temperaturama uzgojaf

Uzorak (c _{SAH} /T)	ΔS (g L ⁻¹)	Y _X (g L ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	Y _{P oct.} (g L ⁻¹)	Y _{P etanol} (g L ⁻¹)	Y _{P/Soctena} (g g ⁻¹)	Y _{P/S etanol} (g g ⁻¹)	Pr _{Octena} (g L ⁻¹ dan ⁻¹)	Pr _{EtOH} (g L ⁻¹ dan ⁻¹)
40/20°C	37,1	1,6859	0,0454	1,77	5,9	0,0477	0.1590	0,0571	0,1903
40/25 °C	36,2	1,0327	0,0285	1,5	6	0.0414	0.1657	0,0484	0,1935
40/30 °C	39,3	2,0045	0,051	1,55	4,5	0.0394	0.1145	0,05	0,1452
40/40 °C	33,4	3,6767	0,1101	0,1	0	0.003	0	0,00323	0
60/20 °C	58,1	0,2401	0,0041	2,59	9,8	0.0446	0.1687	0,0835	0,3161
60/25 °C	59,9	1,1413	0,0191	2	9,8	0.0334	0.1636	0,0645	0,3161
60/30 °C	59,9	1,1597	0,0194	1,57	11	0.0262	0.1836	0,0506	0,3548
60/40 °C	49	4,3432	0,0886	0,1	0,4	0.002	0.0082	0,0032	0,0129

Na kraju istraživanja provedena je GC analiza hlapljivih spojeva dvaju odabranih uzoraka. Za usporedbu su uzeti uzorci sa kraja uzgoja na 20 °C, uz koncentracije supstrata od 40 i 60 g L⁻¹. Rezultati analize hlapljivih spojeva prikazani su na slikama 26 i 27.



Slika 26. Grafički prikaz analize koncentracija komponenti arome kefirnog napitka >1 mg L⁻¹ pri temperaturi od 20 °C kod različitim koncentracija supstrata koncentracije



Slika 27. Grafički prikaz analize koncentracija tvari arome <math><1 \text{ mgL}^{-1}</math> pri temperaturi od 20 °C kod različitih koncentracija supstrata koncentracije

Što se tiče hlapljivih spojeva pronađenih u sastavu kefirnog napitka, oni odgovaraju standardnim spojevima pronađenim tijekom procesa proizvodnje (Laureys i sur., 2016). Na slikama 26 i 27 vidljivo je kako je proizvodnja tvari arome tijekom procesa proizvodnje kefirnog napitka limitirana, te oba uzorka sadrže najveće količine etil-acetata od svih detektiranih spojeva. Taj podatak nimalo ne čudi s obzirom da je pokazano kako se koncentracija etil acetata povećava tijekom cijelog trajanja procesa proizvodnje, dok koncentracije ostalih hlapivih spojeva rastu sve dok ne dođe do potpune potrošnje supstrata (Laureys i sur., 2017). Osim spojeva navedenih na gornjim slikama, u oba uzorka kefirnog napitka detektirana je i prisutnost etil-oktanoata, međutim nije ga bilo moguće kvantificirati, jer je njegova koncentracija bila preblizu granici kvantifikacije korištene metode.

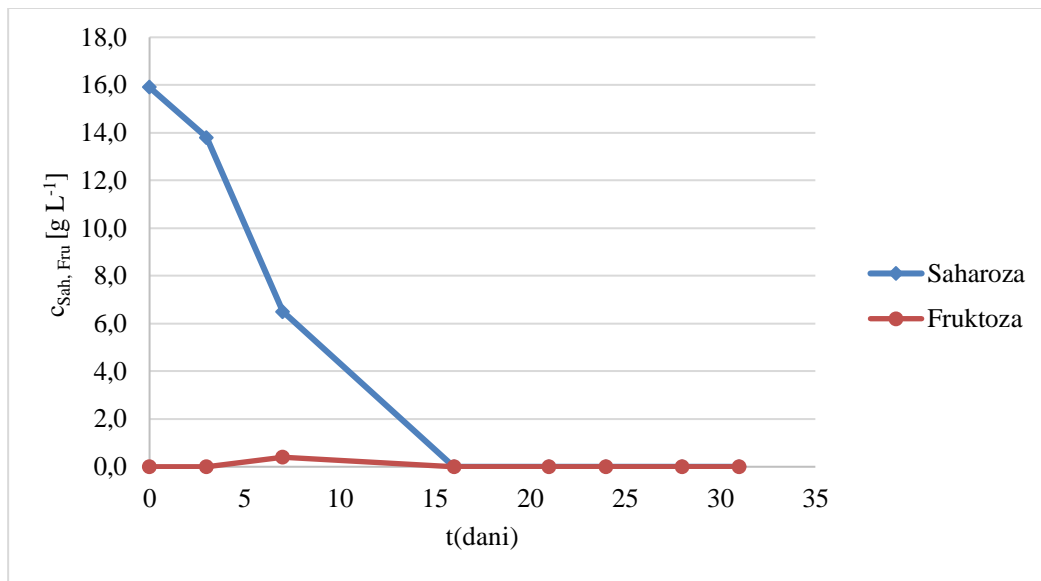
4.2.3. Rezultati utjecaja zaslađivača na proizvodnju kefirnog napitka

Za istraživanje o utjecaju zaslađivača na proizvodnju kefirnog napitka, prethodno su pripravljene hranjive podloge koje su sadržavale po 20 g L⁻¹ pojedinog zaslađivača (eritrol, ksilitol, stevia) i 20 g L⁻¹ tršćanog šećera. Podloge su sterilizirane (121 °C/20 min) te ohlađene na radnu temperaturu i inokulirane s 10 g zrnaca kefirnog napitka. Fermentacija se provodila kroz 31 dan pri temperaturi od 25°C, uz uzorkovanje svakih nekoliko dana, a koncentracije pojedinih komponenti u uzorcima određen su korištenjem UPLC analitike. Rezultati provedenih uzgoja uz dodatak eritrola prikazani su u tablici 14.

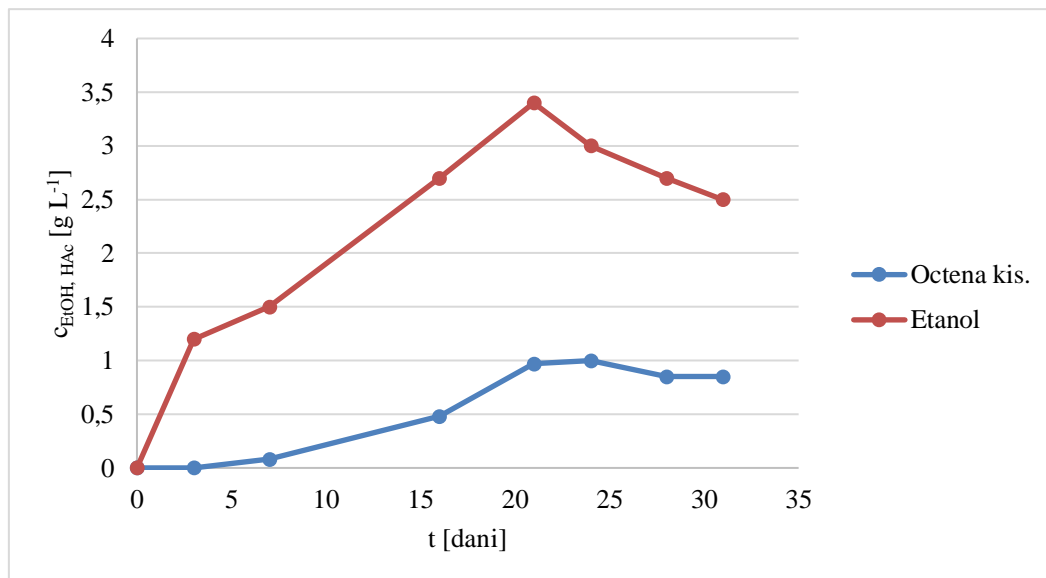
Tablica 14. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji eritrola i tršćanog šećera od 20 g L⁻¹ i temperaturi 25 °C nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L ⁻¹)	Glukoza (g L ⁻¹)	Fruktoza (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	Octena kiselina (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)
0. dan	15,9	0	0	0	0	0	0	0
3.dan	13,8	0	0	0	0	0	0	1,2
7. dan	6,5	0	0,4	0	0	0	0,08	1,5
16. dan	0	0	0	0	0	0	0,48	2,7
21. dan	0	0	0	0	0	0	0,97	3,4
24. dan	0	0	0	0	0	0	1	3
28. dan	0	0	0	0	0	0	0,85	2,7
31. dan	0	0	0	0	0	0	0,85	2,5

U navedenom eksperimentu koncentracija eritrola je tijekom cijelog vremena uzgoja ostala nepromijenjena (20 g L⁻¹), stoga se može zaključiti kako eritrol nije razgradiv od strane združene kulture zrnaca kefirnog napitka te s obzirom na slične rezultate kao i u prethodnim eksperimentima (slika 28 i 29), ovaj zaslađivač nema značajniji utjecaj na tijek fermentacije.



Slika 28. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu pri 25 °C i 20 g L⁻¹ saharoze i eritrola

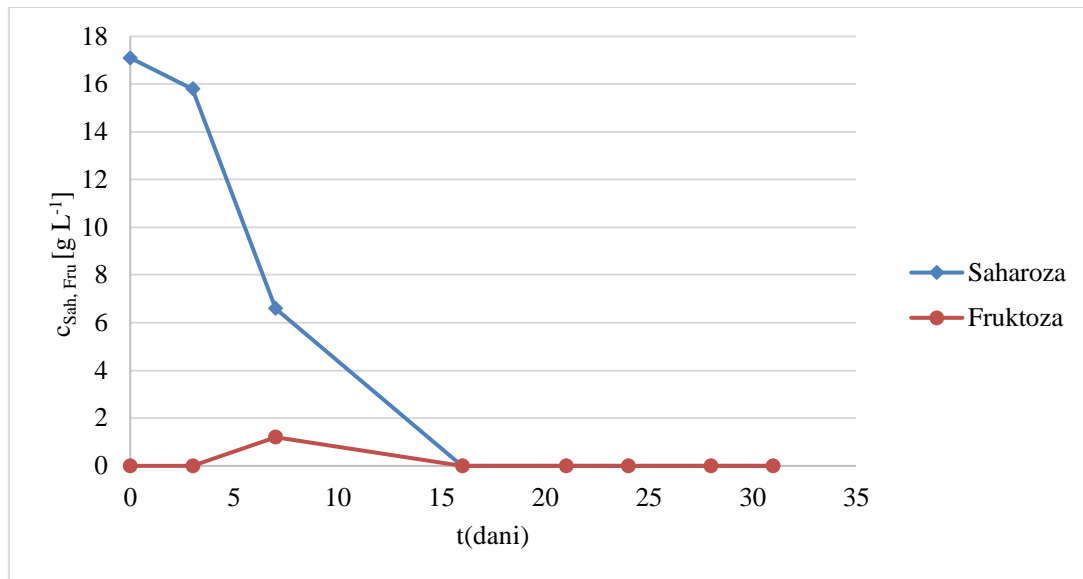


Slika 29. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u vremenu u eksperimentu s 25 °C i 20 g L⁻¹ saharoze i eritrola

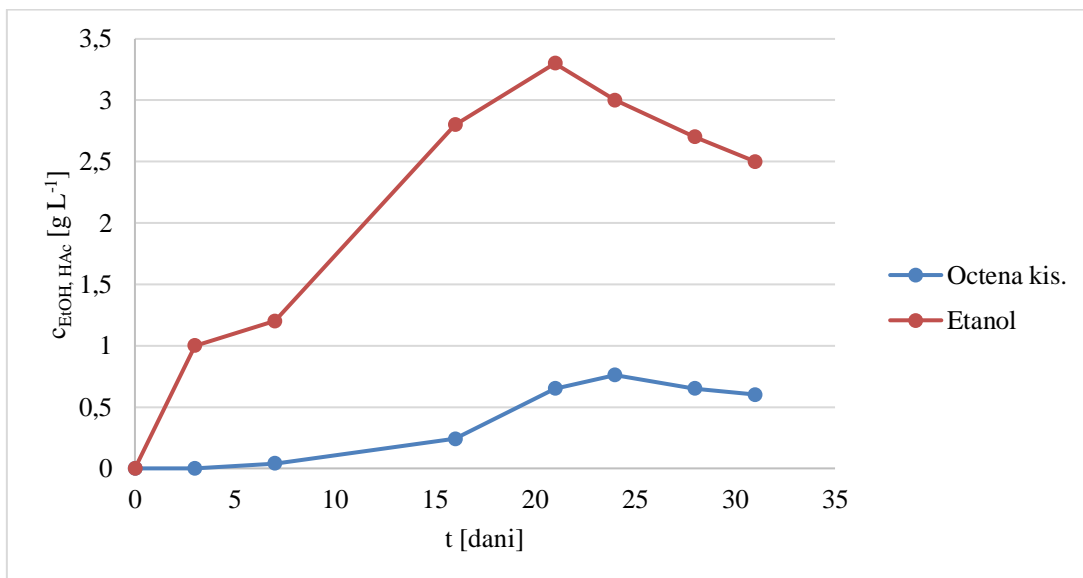
Tablica 15. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji ksilitola i tršćanog šećera od 20 g L^{-1} i temperaturi $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L^{-1})	Glukoza (g L^{-1})	Fruktoza (g L^{-1})	Glicerol (g L^{-1})	Manitol (g L^{-1})	Mliječna kiselina (g L^{-1})	Octena kiselina (g L^{-1})	Etanol (g L^{-1})
0. dan	17,1	0	0	0	0	0	0	0
3. dan	15,8	0	0	0	0	0	0	1
7. dan	6,6	0	1,2	0	0	0	0,04	1,2
16. dan	0	0	0	0	0	0	0,24	2,8
21. dan	0	0	0	0	0	0	0,65	3,3
24. dan	0	0	0	0	0	0	0,76	3
28. dan	0	0	0	0	0	0	0,65	2,7
31. dan	0	0	0	0	0	0	0,6	2,5

U navedenom eksperimentu koncentracija ksilitola je tijekom cijelog vremena uzgoja ostala nepromijenjena (20 g L^{-1}) (tablica 15), stoga se može zaključiti kako ksilitol i u ovom slučaju nije imao značajniji utjecaj na tijek fermentacije. Kao i u prethodnom eksperimentu s eritrolom i ovdje su zabilježene nešto niže koncentracije octene kiseline i etanola nego u eksperimentima bez dodanih zaslađivača. Od značajnijih komponenti zabilježene su koncentracije etanola od $3,5 \text{ g L}^{-1}$ te octene kiseline od nešto manje od 1 g L^{-1} (slika 30 i 31).



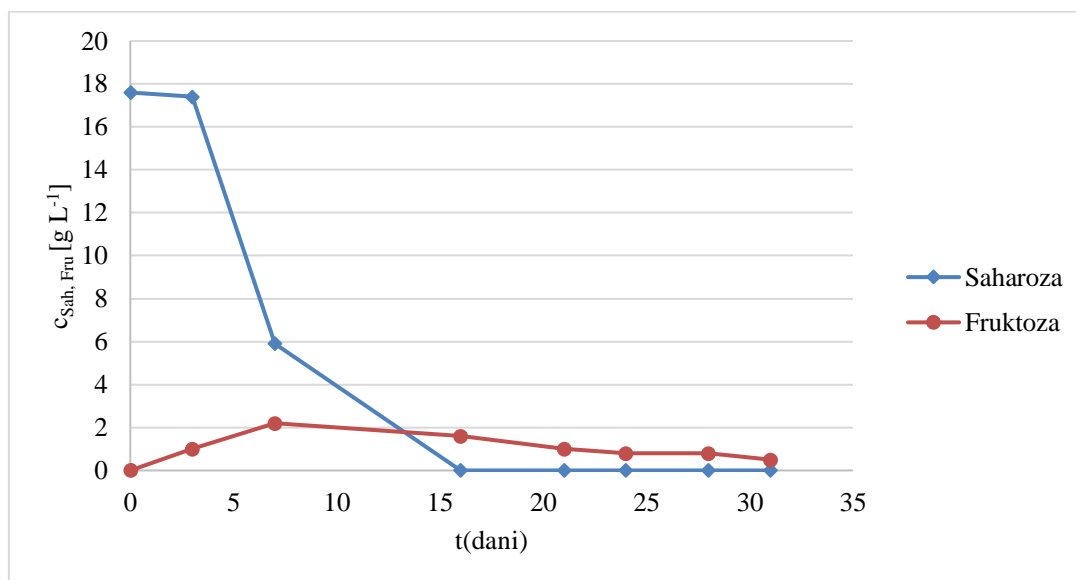
Slika 30. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu pri 25 °C i 20 g L⁻¹ saharoze i ksilitola



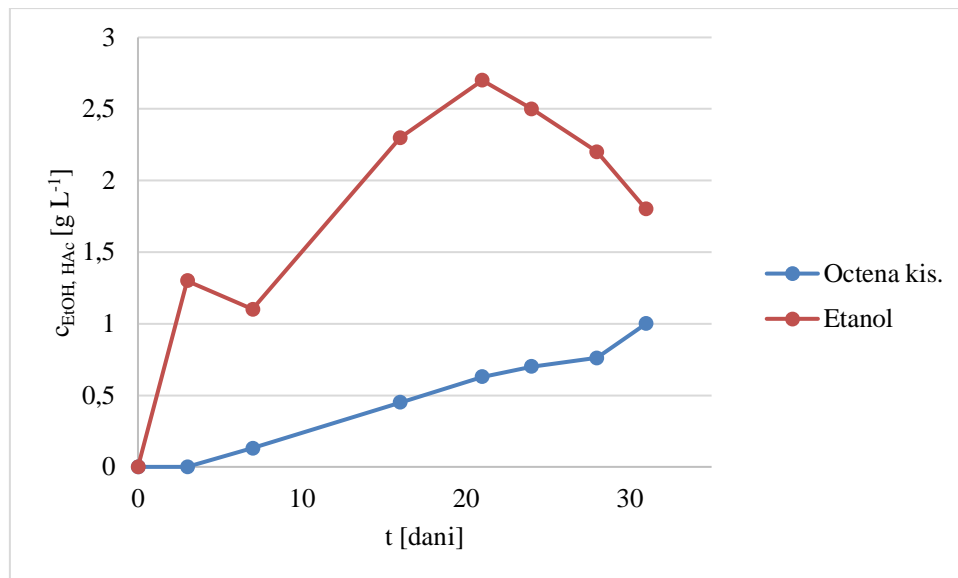
Slika 31. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u vremenu pri 25 °C i 20 g L⁻¹ saharoze i ksilitola

Tablica 16. Promjene koncentracije supstrata i produkata dobivene UPLC analizom tijekom uzgoja pri koncentraciji saharoze i stevie od 20 g L^{-1} i temperaturi $25 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon 31 dana uzgoja

Dan izuzimanja uzorka	Saharoza (g L^{-1})	Glukoza (g L^{-1})	Fruktoza (g L^{-1})	Glicerol (g L^{-1})	Manitol (g L^{-1})	Mliječna kiselina (g L^{-1})	Octena kiselina (g L^{-1})	Etanol (g L^{-1})	Stevia (g L^{-1})
0. dan	17,6	0	0	0	0	0	0	0	/
3. dan	17,4	0	1	0	0	0,37	0	1,3	/
7. dan	5,9	0	2,2	0	0	0,85	0,13	1,1	/
16. dan	0	0	1,6	0	0	0,99	0,45	2,3	/
21. dan	0	0	1	0	0	1,09	0,63	2,7	/
24. dan	0	0	0,8	0	0	1,16	0,7	2,5	/
28. dan	0	0	0,8	0	0	1,17	0,76	2,2	/
31. dan	0	0	0,5	0	0	1,23	1	1,8	/



Slika 32. Promjena koncentracije šećera u vremenu u eksperimentu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i 20 g L^{-1} saharoze i stevie



Slika 33. Promjena koncentracije octene kiseline i etanola u vremenu u eksperimentu pri 25 °C i 20 g L⁻¹ saharoze i stevie

Navedeni rezultati pokazuju kako su koncentracije eritrola, ksilitola i stevie (tablica 16), koji su dodani u hranjivu podlogu uz trščani šećer, tokom cijelog eksperimenta ostale nepromijenjene, što znači da ih prirodno prisutni mikroorganizmi u kefirnom napitku nisu mogli koristiti kao izvor ugljika, čak i kada su ostali izvori bili iscrpljeni (slika 32). Ustvari, fermentacija se provodila kao da zaslađivači uopće nisu dodani u hranjivu podlogu. Dinamika sva tri eksperimenta bila je gotovo identična gdje su koncentracije produkata metabolizma prisutnih mikroorganizama bile u vrlo sličnim rasponima koncentracija (slika 33). S obzirom na navedene rezultate, može se zaključiti kako zaslađivači nemaju značajniji učinak na proces proizvodnje kefirnog napitka. Iz tog razloga valja reći kako se zaslađivači vjerojatno mogu dodavati u određenim koncentracijama bilo na početku ili na kraju fermentacije bez nekog značajnijeg negativnog utjecaja na sam kefirni napitak.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata opisanih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Za proces proizvodnje kefirnog napitka optimalna temperatura uzgoja iznosi 25 °C, dok su najbolji rezultati postignuti pri koncentracijama konzumnog šećera kao supstrata u koncentraciji od 40 i 60 g L⁻¹.
2. Upotrebom tršćanog šećera kao izvora saharoze za provođenje fermentacije, značajno se povećava brzina potrošnja supstrata i brzina sinteze produkata metabolita, u usporedbi s čistim konzumnim šećerom.
3. Koncentracija saharoze od 60 g L⁻¹ bilo u obliku čiste saharoze ili saharoze iz dodanog tršćanog šećera, nije značajnije negativno utjecala na združenu kulturu mikroorganizama prisutnih u kefirnom napitku s jedne strane, dok je s druge strane ostvarena proizvodnja značajnijeg udjela produkata metabolizma.
4. U svrhu poboljšanja senzoričkih karakteristika finalnog proizvoda, moguće je dodati zaslađivače (eritrol, ksilitol, stevia) uz izvor ugljika kojeg će prisutni mikroorganizmi koristiti za rast i sintezu produkata. Na temelju našeg istraživanja, njihov dodatak na početku fermentacije nije imao za posljedicu negativan utjecaj na trajanje bioprocasa kao niti na smanjenje koncentracije proizvedenih produkata prisutnih u kefirnom napitku.

6. LITERATURA

1. Coma, M. E., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., Salvay, A. G. (2019) Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *Eur. Polym. J.* **120**, 109234.
2. De Dekken, R. H. (1966) The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* **44**(2), 149-156.
3. Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Wagner, J. R., Salvay, A. G. (2018) Hydration and water vapour transport properties in yeast biomass based films: A study of plasticizer content and thickness effects. *Eur. Polym. J.* **99**, 9-17.
4. Eckel, V. P., Vogel, R. F. (2020) Genomic and physiological insights into the lifestyle of Bifidobacterium species from water kefir. *Arch. Microbiol.* **202**, 1627-1637.
5. Feldmann, H. (2005). Yeast metabolism. *Yeast molecular biology*. München: Adolf Butenandt-Institut.
6. Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., Wefers, D. (2018) Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydr. Polym.* **89**, 296-303.
7. Ferrario, C., Taverniti, V., Milani, C., Fiore, W., Laureati, M., De Noni, I., Guglielmetti, S. (2014) Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J. Nutr.* **144**(11), 1787-1796.
8. Gonda, M., Garmendia, G., Rufo, C., León Peláez, Á., Wisniewski, M., Droby, S., Vero, S. (2019) Biocontrol of *Aspergillus flavus* in Ensiled Sorghum by Water Kefir Microorganisms. *Microorganisms.* **7**(8), 253.
9. Greenberg, D. E., Porcella, S. F., Stock, F., Wong, A., Conville, P. S., Murray, P. R., Zelazny, A. M. (2006) *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family Acetobacteraceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**(11), 2609-2616.
10. Grill, J. P., Manginot-Dürr, C., Schneider, F., Ballongue, J. (1995). Bifidobacteria and probiotic effects: action of Bifidobacterium species on conjugated bile salts. *Curr. Microbiol.*, **31**(1), 23-27.
11. Grishina, A., Kulikova, I., Alieva, L., Dodson, A., Rowland, I., Jin, J. (2011) Antigenotoxic effect of kefir and ayran supernatants on fecal water-induced DNA damage in human colon cells. *Nutr. Cancer*, **63**(1), 73-79.
12. Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2011) The microbial diversity of water kefir. *Int. J. Food Microbiol.* **151**(3), 284-288.

13. Jakob, F., Steger, S., Vogel, R. F. (2012). Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads. *Eur. Food Res. Technol.* **234**(3), 493-499.
14. Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**(3), 209-224.
15. Laureys, D., De Vuyst, L. (2014) Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**(8), 2564-2572.
16. Laureys, D., Cnockaert, M., De Vuyst, L., Vandamme, P. (2016) *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**(3), 1281-1286.
17. Laureys, D., Van Jean, A., Dumont, J., De Vuyst, L. (2017) Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Applied Microbiol. Biotechnol.* **101**(7), 2811-2819.
18. Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., De Vuyst, L. (2018) Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiol.* **73**, 351-361.
19. Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L. (2013) Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J. Biotechnol.* **163**(2), 250-272.
20. Leroi, F., Pidoux, M. (1993) Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *J. Appl. Bacteriol.* **74**(1), 54-60.
21. Leung, T. L. F., Poulin, R. (2008). Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu*, **58**(2), 107.
22. Lorca, G. L., de Valdez, G. F. (1999). The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiology*, **39**(2), 144-149.
23. Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., Cotter, P. D. (2013) Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiol. Lett.* **348**(1), 79-85.
24. Martínez-Torres, A., Gutiérrez-Ambrocio, S., Heredia-del-Orbe, P., Villa-Tanaca, L., Hernández-Rodríguez, C. (2016) Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. *Int. J. Food Sci & Technol.* **52**(2), 559-571.
25. Pidoux, M., Brillouet, J. M., Quémener, B. (1988). Characterization of the polysaccharides from *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnol. Lett.* **10**(6), 415-420.

26. Pidoux, M. (1989) The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**(2), 223-238.
27. Pidoux, M., Marshall, V. M., Zandoni, P., Brooker, B. (1990) Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. *J. Appl. Bacteriol.* **69**(3), 311-320.
28. Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., Vicente, A. A. (2014) Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**(5), 1937-1949.
29. Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., Samaržija, D. (2013) Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo.* **63**(1), 3-14.
30. Raspor, P., Goranovič, D. (2008) Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **28**(2), 101-124.
31. Ravasio, D., Walther, A., Trost, K., Vrhovsek, U., Wendland, J. (2014) An indirect assay for volatile compound production in yeast strains. *Sci. Rep.* **4**(1), 1-4.
32. Schifferdecker, A. J., Dashko, S., Ishchuk, O. P., Piškur, J. (2014). The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast*, **31**(9), 323-332.
33. Schnürer, J.; Jonsson, A. (2011) *Pichia anomala* J121: A 30-year overnight near success biopreservation story. *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**, 5–12.
34. 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**(3), 170-200.
35. Shafiq, K., Ali, S., Ul-Haq, I. (2003) Time course study for yeast invertase production by submerged fermentation. *Int. J. Biol. Stud.* **3**(11), 984-988.
36. Slaa, J., Gnode, M., Else, H. (2009) Yeast and fermentation: the optimal temperature. *J. Org. Chem.* **134**(1).
37. Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2013) Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiol.* **35**(2), 92-98.
38. Thakkar, A. Saraf, M. (2015) Development of microbial consortia as a biocontrol agent for effective management of fungal diseases in *Glycine max* L. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz.* **48**, 459–474.
39. Torino, M. I., Font de Valdez, G., Mozzi, F. (2015) Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Front. Microbiol.* **6**, 834.

40. 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.
41. Volpi, G., Ginepro, M., Tafur-Marinos, J., Zelano, V. (2019) Pollution abatement of heavy metals in different conditions by water kefir grains as a protective tool against toxicity. *J. Chem.* **2019**. 1-10.
42. Waldherr, F. W., Doll, V. M., Meißner, D., Vogel, R. F. (2010) Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiol.* **27**(5), 672-678.
43. Xu, D., Bechtner, J., Behr, J., Eisenbach, L., Geißler, A. J., Vogel, R. F. (2019) Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. *Int. J. Food Microbiol.* **290**, 141-149.
44. Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., Arendt, E. K. (2016) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**(3), 1121-1135.

7. PRILOZI

7.1. JEDNADŽBE BAŽDARNIH PRAVACA ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PROIZVODA UPLC ANALIZOM

Tablica 17. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Spoj	Retencijsko vrijeme, t_R (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Mliječna kiselina	7,138	$A = 155475\gamma_{\text{Mliječna}} - 1042.7$	0,9999
Octena kiselina	7,983	$A = 76519 \gamma_{\text{Octena}} + 1025.5$	0,9999
Etanol	9,598	$A = 100677 \gamma_{\text{EtOH}} + 1658.9$	0,9996
Fruktoza	5,624	$A = 112342\gamma_{\text{Fruktoza}} + 23079$	0,9999
Manitol	6,193	$A = 161699\gamma_{\text{Manitol}} + 25269$	0,9998
Glukoza	5,114	$A = 141110\gamma_{\text{Glukoza}} + 26565$	0,9989
Saharoza	4,436	$A = 135868\gamma_{\text{Saharoza}} + 30686$	0,9984

A= površina

7.2. POPIS KRATICA

Tablica 14. Popis kratica uz navedene oznake veličine, veličine i jedinice.

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
$Y_{X/S}$	koeficijent konverzije supstrata u biomasu	[g g ⁻¹]
$Y_{\text{etanol}/S}$	koeficijent konverzije supstrata u etanol	[g g ⁻¹]
$Y_{\text{octene kiselina}/S}$	koeficijent konverzije supstrata u octenu kiselinu	[g g ⁻¹]
$Pr_{X/S}$	produktivnost procesa proizvodnje biomase	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
Pr_{etanol}	produktivnost procesa proizvodnje etanola	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
$Pr_{\text{octena kiselina}}$	produktivnost procesa proizvodnje octene kiseline	[g L ⁻¹ h ⁻¹]

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.

Ime i prezime studenta