

# Utjecaj pH vrijednosti podloge na proizvodnju kefirnog napitka u bioreaktoru s miješalom

---

Nejedly, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:607533>

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**

**Prediplomski studij Biotehnologija**

**Petra Nejedly**

**7679/BT**

**UTJECAJ pH VRIJEDNOSTI PODLOGE NA PROIZVODNJU  
KEFIRNOG NAPITKA U BIOREAKTORU S MIJEŠALOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju,  
tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo  
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
Mentor: Doc. dr. sc. Mladen Pavlečić**

**Zagreb, 2021.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Biotehnologija

## **Utjecaj pH vrijednosti podloge na proizvodnju kefirnog napitka u bioreaktoru s miješalom**

Petra Nejedly, 7679/BT

### **Sažetak:**

Kefirni napitak je fermentirano piće proizvedeno dodavanjem kefirnih zrnaca u vodenu otopinu saharoze. Kefirna zrnca građena su od matriksa, načinjenog od dekstrana, i mikroorganizama, najviše kvasaca, bakterija mliječne kiseline, bifidobakterija te bakterija octene kiseline, odgovornih za provođenje fermentacije. Raspon optimalne pH vrijednosti za svaku je vrstu različit pa će kod određene pH vrijednosti podloge, udio pojedine vrste mikroorganizama varirati zajedno s koncentracijom produkata njihovog metabolizma. U konačnici, pH podloge utječe i na samu dinamiku odvijanja bioprocesa te posljedično i na pokazatelje uspješnosti. U ovom završnom radu uspoređena je dinamika odvijanja proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru s miješalom kao i njegov sastav tokom cijelog vremena trajanja fermentacije kod dvije različite pH vrijednosti podloge (pH 4 i pH 5). Utvrđeno je da je kod pH podloge 5 ostvareno kraće vrijeme fermentacije, a izvor ugljika je gotovo u potpunosti utrošen. Također, zabilježene su više koncentracije produkata, kao što su etanol, mliječna i octena kiselina, u odnosu na drugi eksperiment.

**Ključne riječi:** kefirni napitak, pH vrijednost, zrnca kefirnog napitka

**Rad sadrži:** 23 stranice, 5 tablica, 7 slika, 31 literaturnu referencu, 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

**Datum obrane:** 16. rujna 2021.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

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

**Scientific area: Biotechnical sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

## **Influence of substrate pH value on kefir beverage production in stirred tank reactor**

Petra Nejedly, 7679/BT

### **Abstract:**

Water kefir is a fermented beverage produced by adding kefir grains to an aqueous sucrose solution. Kefir grains are made of a matrix, made of dextran, and microorganisms, mostly yeasts, bifidobacteria and lactic and acetic acid bacteria, responsible for conducting fermentation. The range of optimal pH value for each species is different, so at a certain pH value of the media, the share of each type of microorganisms will vary together with the concentration of the products of their metabolism. Ultimately, the pH of the media affects the dynamics of the bioprocess and, consequently, the bioprocess efficiency parameters. This bachelor thesis compares the dynamics of water kefir production in a stirred tank bioreactor as well as its composition during the entire fermentation at two different pH values (pH 4 and pH 5) of the media. It was found that at pH 5, a shorter fermentation time was achieved and the carbon source was almost completely consumed. Also, higher concentrations of products like ethanol, lactic and acetic acid were recorded in comparison to the second experiment.

**Keywords:** kefir beverage, pH value, water kefir grains

**Thesis contains:** 23 pages, 5 tables, 7 pictures, 31 literature 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

**Defence date:** September 16<sup>th</sup> 2021

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. KEFIRNI NAPITAK I ZRNCA KEFIRNOG NAPITKA .....	2
2.2. MIKROORGANIZMI KEFIRNIH ZRNACA.....	3
2.2.1. Kvasci.....	5
2.2.2. Bakterije mliječne kiseline (BMK) .....	6
2.2.3. Bifidobakterije.....	7
2.3. ODNOSI IZMEĐU MIKROORGANIZAMA U KEFIRNIM ZRNCIMA.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	9
3.1. MATERIJALI .....	9
3.1.1. Radni mikroorganizmi .....	9
3.1.2. Hranjiva podloga .....	9
3.1.3. Kemikalije.....	9
3.1.4. Aparatura i pribor .....	10
3.2. METODE RADA.....	11
3.2.1. Priprema hranjive podloge za održavanje kulture kefirnog napitka .....	11
3.2.2. Proizvodnja kefirnog napitka u bioreaktoru s miješalom pri pH vrijednostima podloge od 4 i 5 pH jedinica.....	11
3.3. ANALITIČKE METODE .....	12
3.3.1. Priprema uzorka za UPLC analizu .....	12
3.3.2. Određivanje suhe tvari kefirnih zrnaca.....	12
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI.....	13
3.4.2. Prinos produkta ( $Y_p$ ) .....	13
3.4.4. Koeficijent konverzije supstrata u produkt ( $Y_{p/S}$ ).....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	14
5. ZAKLJUČAK.....	20
6. POPIS LITERATURE .....	21
7. PRILOZI.....	1
7.1. JEDNADŽBE BAŽDARNIH PRAVACA POMOĆU KOJIH SU ODREĐENE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PROIZVODA UPLC ANALIZOM.....	1
7.2. POPIS KRATICA.....	2

## 1. UVOD

Kefirni napitak je fermentirano piće, domaće proizvodnje, baziran na otopini saharoze uz dodatak suhog i svježeg voća (Gulitz i sur.,2011). Fermentacija započinje inokulacijom vodene otopine saharoze zrnima vodenog kefir. Nakon par dana fermentacije, pri sobnoj temperaturi, tekućina (napitak) se dekantira i dalje obrađuje, a kefirna zrnca se ispiru vodovodnom vodom i ponovo koriste za daljnju fermentaciju svježe podloge. Fermentacija i transfer zrnaca može se provoditi bez ikakvih sterilnih uvjeta, bez rizika kontaminacije (Moinas i sur., 1980). Kefirni napitak dostupan je po cijelom svijetu, ali i dalje nije poznato koje je pravo porijeklo njegovih zrnaca. Pretpostavlja se da polisaharidna zrnca potječu iz lišća biljke indijske smokve. Kao potencijalna funkcionalna hrana / hrana koja poboljšava zdravlje, važno je istaknuti da kefirni napitak sadrži mikroorganizme kojima je često pripisivano da pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. U prvom redu to su mikroorganizmi poput laktobacila i bifidobakterija, a u manjoj mjeri i kvasaca iz roda *Saccharomyces*. Kefirni napitak, dakle, predstavlja potencijalno učinkovito probiotičko sredstvo (Marsh i sur., 2013). U brojnim istraživanjima dokazano je da fermentirani proizvodi, koji sadrže bakterije mliječne kiseline (BMK), vrlo povoljno djeluju na zdravlje čovjeka. BMK utječu na apsorpciju kalcija i metabolizam kolesterola, poboljšavaju sastav crijevne mikrobne populacije te djeluju antimikrobno i antimutageno. Također, one su stoljećima sastavni dio ljudske prehrane, te se mogu smatrati prirodnim načinom opskrbe probavnog sustava aktivnim tvarima (Kršev,1996).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KEFIRNI NAPITAK I ZRNCA KEFIRANOG NAPITKA

Kefirni napitak dobiva se iz vodene otopine saharoze koja služi kao hranjiva podloga. Kefirna zrnca fermentacijom pretvaraju šećer iz otopine u produkte metabolizma, kao što su etanol, glicerol, mliječna i octena kiselina. Nakon 2 do 4 dana fermentacije, pri sobnoj temperaturi, izdvaja se supernatant koji se dalje obrađuje da bi se dobio krajnji proizvod, a zrnca se ispiru te se mogu ponovno koristiti za proizvodnju kefirnog napitka na svježoj podlozi. Sam proizvod je blago gazirano, kiselo piće s malim udjelom alkohola. Smokve, datulje, grožđice, limun i đumbir mogu se dodati u podlogu da bi se osigurali faktori rasta za prisutne mikroorganizme, a ujedno doprinose i ugodnom okusu kefirnog napitka (Moinas i sur., 1980). Također poznat i kao „Tibicos“ ili šećerni kefir, kefirni napitak razlikuje se od popularnijeg kefira na mliječnoj osnovi po tome što su zrnca kefirnog napitka građena uglavnom od dekstrana za čiju su sintezu zaslužne vrste BMK iz rodova *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (Marsh i sur., 2013, Laureys i sur., 2014). Sama zrnca (Slika 1.) su prozirna i porozna, želatinaste strukture (Horisberger, 1969). Građena su od polisaharida na čijoj se površini, kao i u unutrašnjosti, nalaze brojni mikroorganizmi uključujući različite vrste kvasaca te bakterije mliječne (BMK) i octene kiseline. Pojedinačno zrnce ima oblik sličan cvjetači i promjer od 5 do 20 mm (Waldherr i sur., 2010).



Slika 1. Zrnca kefirnog napitka (anonymous 1)

## 2.2 MIKROORGANIZMI KEFIRNIH ZRNACA

Kefirna zrnca predstavljaju jedinstveni živi ekosustav u prirodi, stvoren simbiotskim odnosom između bakterija i kvasaca, pri čemu takva struktura može sadržavati i više od 50 različitih vrsta (Pogačić i sur.,2013). Dosadašnja istraživanja pokazala su da bakterijsku populaciju samih zrnaca čine različiti sojevi bakterija iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Acetobacter*, dok se od kvasaca najčešće pojavljuju oni iz rodova *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Zygorulasporea* i *Candida* (Marsh i sur., 2013). Procjenjeno je da su bakterije prisutne u zrnima u koncentraciji otprilike  $10^6 - 10^8$  stanica po gramu, a kvasci su prisutni u koncentraciji od  $10^6 - 10^7$  stanica po gramu (Gulitz i sur, 2011). Tek nedavno je utvrđena i prisutnost bifidobakterija. U Tablici 1. prikazani su neki od mikroorganizama prisutnih u kefirnim zrnima.

Tablica 1. Bakterije i kvasci izolirani iz kefirnog napitka (Waldherr i sur., 2010)

VRSTE	LITERATURA
BAKTERIJE	
<i>Lactobacillus brevis</i>	Moinas i sur., 1980
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Pidoux, 1989; Waldherr, 2010
<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i>	Pidoux, 1989; Galli i sur., 1995
<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i>	Pidoux, 1989
<i>Lactobacillus casei subsp. Pseudopantarum</i>	Galli i sur., 1995
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pidoux, 1989
<i>Lactobacillus buchneri</i>	Galli i sur., 1995
<i>Lactobacillus collinoides</i>	Galli i sur., 1995
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Moinas i sur., 1980; Pidoux, 1989; Waldherr, 2010
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Pidoux, 1989
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides</i>	Galli i sur., 1995; Waldherr, 2010
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.</i>	Pidoux, 1989



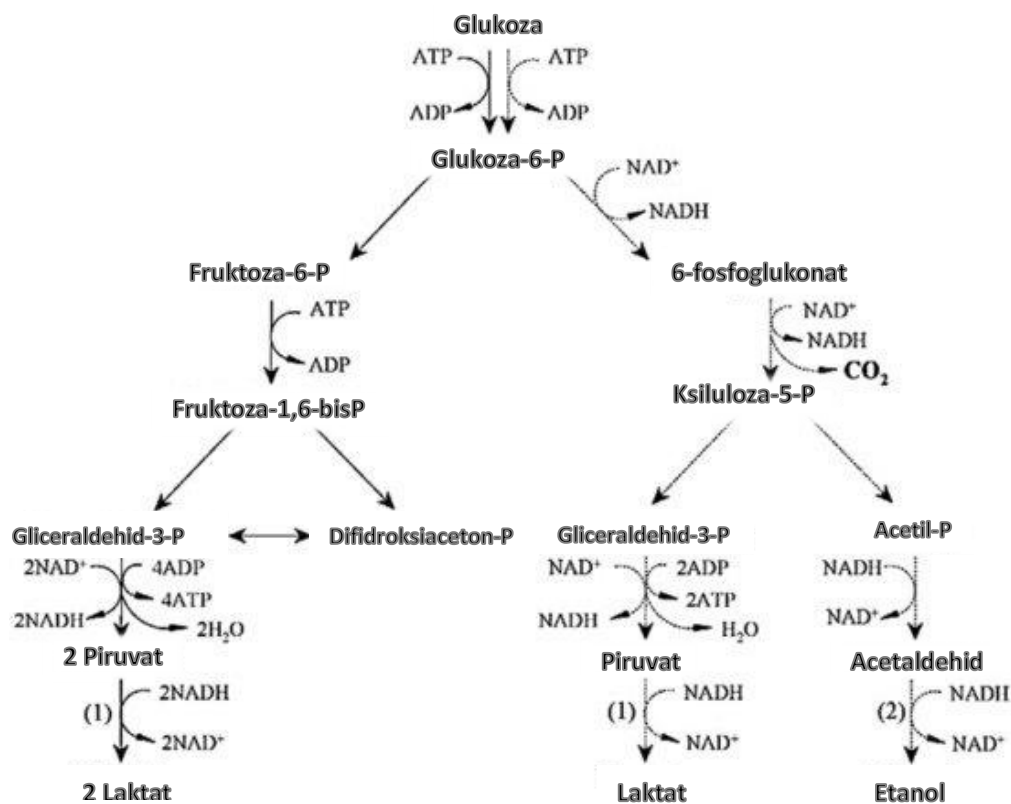
<i>Dextranicum</i>	
<i>Enterobacter hormachei</i>	Waldherr, 2010
<i>Gluconobacter frateurii</i>	Waldherr, 2010
KVASCI	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Waldherr, 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Moinas i sur., 1980; Galli I sur., 1995; Franzetti I sur., 1998
<i>Saccharomyces florentinus</i>	Galli i sur., 1995
<i>Saccharomyces pretoriensis</i>	Galli i sur., 1995
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	Pidoux, 1989; Neve and Heller, 2002
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	Pidoux, 1989; Galli i sur., 1995; Neve and Heller, 2002
<i>Hanseniaspora vinalis</i>	Pidoux, 1989; Galli i sur., 1995
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Franzetti i sur., 1998
<i>Kloeckera apiculata</i>	Pidoux, 1989; Franzetti i sur., 1998
<i>Candida lambica</i>	Pidoux, 1989
<i>Candida valida</i>	Pidoux, 1989

### 2.2.1. Kvasci

Kvasci su eukariotski mikroorganizmi svrstani u carstvo gljiva. Predstavljaju jednu od najvažnijih skupina mikroorganizama koji se koriste u prehrambenoj industriji za proizvodnju fermentirane hrane i pića. Mogu rasti u širokom rasponu pH vrijednosti, a preferiraju „kiseli okoliš“ (pH 4,5–7,0), ali većina ih može rasti i pri vrlo niskim pH vrijednostima (pH = 2,5; Guerzoni i sur., 2013). Optimalna temperatura za rast im je oko 28°C. Do energije za rast i sintezu produkata, dolaze glikolizom pri čemu se glukoza prevodi do piruvata. U nedostatku kisika, NADH se mora ponovo oksidirati putem alkoholnog vrenja (Dickinson i Kruckeberg, 2006). U zrnima kefirnog napitka pronađeni su brojni sojevi kvasaca s različitim svojstvima. Jedna od najistaknutijih značajki kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je sposobnost da brzo pretvara šećere u etanol i CO<sub>2</sub> kada nema prisutnog kisika u podozi (Dashko i sur., 2014). Nadalje, *Zygorulasporea florentina* je osmotolerantni kvasac, također prisutan u zrnima, pa može rasti na podlozi s visokom koncentracijom šećera. Inače može uzrokovati kvarenje hrane, ali u proizvodnji kefirnog napitka poželjan je jer se kefirni napitak ponekad uzgaja na podlozi s koncentracijom šećera i do 90 g L<sup>-1</sup> (Stadie, 2013).

## 2.2.2. Bakterije mliječne kiseline (BMK)

Pretvaranje ugljikohidrata u mliječnu kiselinu pomoću bakterija mliječno – kiselog vrenja, može se smatrati najvažnijim procesom fermentacije u prehrambenoj tehnologiji (Kandler, 1983). Bakterije mliječne kiseline (BMK) su gram-pozitivne bakterije koje koriste ugljikohidrate kao izvor energije za proizvodnju mliječne kiseline. Rodovi *Lactobacillus* i *Leuconostoc* najzastupljeniji su u kefirnim zrnima (Stadie, 2013). Prema načinu metaboliziranja šećera (glukoze), bakterije mliječne kiseline dijele se u dvije skupine, homofermentativne i heterofermentativne BMK (prikazano na Slici 2).

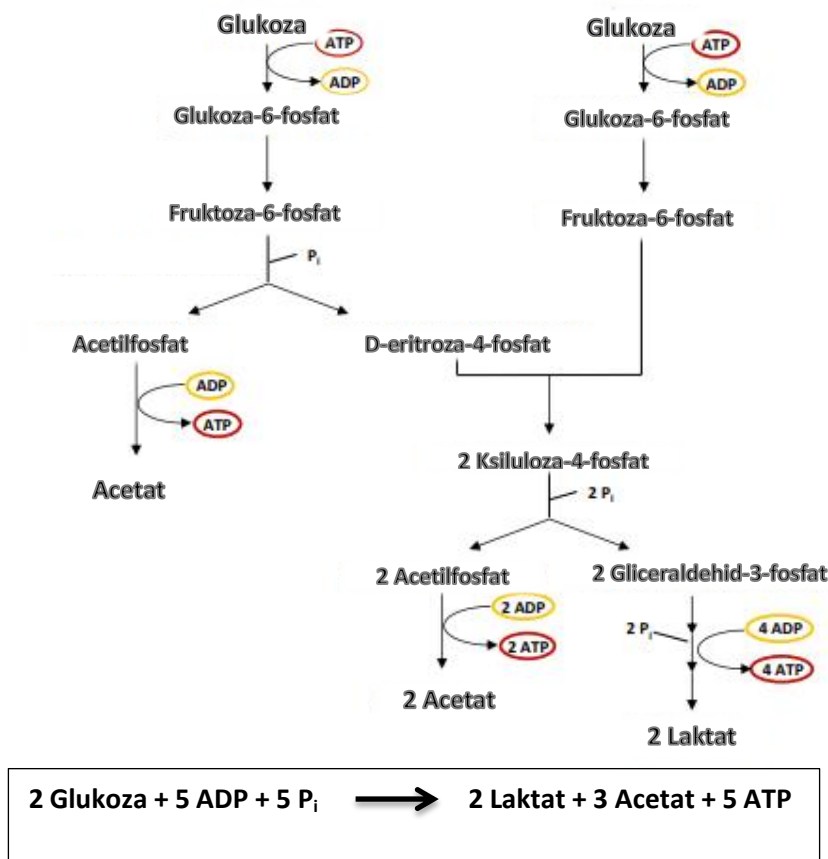


Slika 2. Razlika metabolizma glukoze kod homofermentativnih i heterofermentativnih BMK (anonymous 2)

Kod proizvodnje kefirnog napitka važno je spomenuti vrstu *Lactobacillus hilgardii*. Pidoux i sur. (1988) te Waldherr i sur. (2010) u svojim su istraživanjima dokazali važnost ove bakterije za sintezu EPS (egzopolisaharida) pa posljedično i za formiranje zrnaca tijekom fermentacije kefirnog napitka.

### 2.2.3. Bifidobakterije

Bifidobakterije (*Bifidobacterium*) su gram-pozitivne, anaerobne, nepokretne i nesporogene štapićaste bakterije (Malija i Kršev, 1993). U kefirnim zrnima su znatno manje zastupljene od bakterija mliječne kiseline, a vrste bifidobakterija pronađene u zrnima su *Bifidobacterium aquikefiri* i *Bifidobacterium tibiigranuli*. Ovi mikroorganizmi posjeduju jedinstven metabolizam glukoze, tzv. "bifidus shunt" (prikazano na Slici 3.), koji ih razlikuje od homofermentativnih i heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline.



Slika 3. Prikaz metabolizma glukoze kod bifidobakterija, tzv. "bifidus shunt" (Stadie, 2013)

Bifidobakterije imaju dokazan probiotički učinak. Mogu se razvijati i opstati u probavnom sustavu čovjeka te proizvoditi spojeve (inhibitore) koji sprječavaju rast patogenih bakterija (Kršev, 1996). Bitno je istaknuti i njihovu važnost pri obnavljanju crijevne flore kod pacijenata koji su liječeni antibioticima (Malija i Kršev, 1993).

### 2.3. ODNOSI IZMEĐU MIKROORGANIZAMA U KEFIRNIM ZRNCIMA

Bakterije i kvasci, a ponekad i filamentozne plijesni, u kefirnim zrnima žive u složenom simbiotskom odnosu koji kefirna zrnca čini jedinstvenom mikrobnom zajednicom u prirodi (Pogačić i sur., 2013). Simbioza se definira kao suživot različitih organizama i dijeli se na tri različite vrste odnosa (Stadie, 2013). Tako je npr. parazitizam odnos dvaju organizama u kojem jedan ima korist na štetu drugoga. Komenzalizam je suživot u kojem jedan organizam ima korist od drugog, dok drugi nema takve koristi, ali ni štet a mutualizam je odnos u kojem oba člana simbioze koriste jedan drugome. Primjer ovakvih odnosa su npr. bakterija *Lactobacillus hordei* koja profitira od kvasca *S. cerevisiae* jer joj kvasac povećava dostupnost aminokiselina, dok bakterija ublažava kiseli stres kvasca metabolizmom arginina kojeg kvasac osigurava (Bechtner i sur., 2019). Od ostalih primjera kompleksnosti i interakcija mikroorganizama kod proizvodnje kefirnog napitka, ističe se međusoban utjecaj bakterije *L. hilgardii* i kvasca *Z. florentina*. Dokazano je da su metaboliti kvasca odgovorni za dobrobit *L. hilgardii*, dok je rast *Z. florentina* drastično smanjen u uvjetima viših koncentracija mliječne kiseline u podlozi (Stadie i sur., 2013).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

Za provođenje eksperimentalnog dijela završnog rada upotrijebljena su zrnca kefirnog napitka koja su održavana u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

#### 3.1.2. Hranjiva podloga

Kultura kefirnih zrnaca koja se koristila u ovom istraživanju održavala se u vodenoj otopini saharoze koncentracije  $30 \text{ g L}^{-1}$  pri  $25^\circ\text{C}$  u Erlenmeyerovoj tikvici, bez dodatka sušenog voća. Ispitivanje utjecaja pH podloge na proizvodnju kefirnog napitka provedeno je u bioreaktoru s mješalom pri čemu je korištena ista podloga kao i za održavanje inokuluma, s tim da je korisni volumen bioreaktora bio 1 L.

#### 3.1.3. Kemikalije

U Tablici 2. navedene su kemikalije potrebne za pripremu otopina i hranjivih podloga korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada, te njihova čistoća i proizvođač.

Tablica 2. Kemikalije za pripremu otopina i hranjivih podloga te njihova čistoća i proizvođač

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Saharoza	99+%	Liofilchem, Italija
Natrijev hidroksid	99+%	Merck KGaA, Njemačka
Cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
Sumporna kiselina	Za UPLC, 96%	Merk, Njemačka

### 3.1.4. Aparatura i pribor

#### 3.1.4.1. Popis aparature i pribora

- analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka)
- centrifuga Tehnica (Železniki, Slovenija)
- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- centrifuga Bechman (Model J-21B)
- hladnjak i zamrzivač (Bosch, Njemačka)
- sušionik Instrumentaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska)
- tehnička vaga Tehnica (Železniki, Slovenija)
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- tresilica Certomat RM B.Braun Biotech International, Njemačka
- UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD

#### 3.1.4.2. Uređaj za provođenje tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), sadrži pumpu (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) te pećnicu, analitičku kolonu (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) čije su dimenzije 150×7.8 mm s odgovarajućim predkolonama, detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalni program 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 bio je (0.0025 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.6 mL min<sup>-1</sup>.

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Priprema hranjive podloge za održavanje kulture kefirnog napitka**

Hranjiva podloga korištena u oba eksperimenta pripremljena je na način da se u 2 L obične vodovodne vode otopilo 60 g konzumnog šećera, saharoze, bez dodatka sušenog voća.

### **3.2.2. Proizvodnja kefirnog napitka u bioreaktoru s miješalom pri pH vrijednostima podloge od 4 i 5 pH jedinica**

Utjecaj pH vrijednosti na proizvodnju kefirnog napitka ispitivan je u bioreaktoru s miješalom, u hranjivoj podlozi dobivenoj na način da se u 1 L vodovodne vode otopilo 30 g saharoze. Podloga se nije sterilizirala. Otopina je inokulirana s 10 % kefirnih zrnaca (m/V), pri čemu je u konačnici dodano 100 g vlažnih zrnaca u 1 L podloge. Tokom ovog istraživanja provedena su dva eksperimenta pri sobnoj temperaturi i dvije različite pH vrijednosti podloge (pH = 4, odnosno pH = 5). Konstantna pH vrijednost podloge održavana je na zadanoj vrijednosti pomoću otopine NaOH (0,75 M), koja je pripremljena otapanjem 12 g NaOH u 400 mL H<sub>2</sub>O. Doziranje lužine vršeno je automatski preko sustava za regulaciju pH vrijednosti. Za analizu i praćenje promjena tokom eksperimenta, izuziman je samo tekući dio hranjive podloge. Uzorkovanje se vršilo svakih 1 - 2 dana tijekom 11 dana uzgoja u kojem je pH vrijednost podloge iznosila 5, odnosno 18 dana u slučaju kada je pH vrijednost podloge iznosila 4.



### 3.3. ANALITIČKE METODE

#### 3.3.1. Priprema uzorka za UPLC analizu

Svakih 1 do 2 dana provedeno je uzorkovanje supernatanta i provedena je UPLC analiza uzoraka. Za njihovu pripremu iz bioreaktora je izuzeto 500  $\mu\text{L}$  tekućeg dijela podloge kojem je, u Eppendorf kiveti od 1,5 mL, dodano 500  $\mu\text{L}$  otopine cinkova sulfata heptahidrata koncentracije 100 g L<sup>-1</sup> (otopina je pripremljena otapanjem 5 g ZnSO<sub>4</sub> u 50 mL destilirane vode). Tako pripremljena otopina homogenizirana je pomoću vortexa te ostavljena 10 minuta da se istalože prisutni proteini u uzorku. Uzorak se nakon toga centrifugira tijekom 15 min pri brzini okretaja od 1350 o min<sup>-1</sup>. Po završetku centrifugiranja, izuteto je 750  $\mu\text{L}$  supernatanta i preneseno u novu kivetu, u koju je prethodno dodano 750  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Dobivena otopina dodatno je homogenizirana na vortexu te profiltrirana kroz filter čija veličina pora iznosi 0,2  $\mu\text{m}$ . Svi navedeni postupci provedeni su u 2 paralele. Ovako pripremljeni uzorci analizirani su korištenjem UPLC analitike.

#### 3.3.2. Određivanje suhe tvari kefirnih zrnaca

Udio suhe tvari kefirnih zrnaca određen je prethodno i iznosi 13,77 %. Na kraju eksperimenta, cjelokupna podloga iz bioreaktora podijeljena je u dvije kivete od 500 ml koje su zatim stavljene na centrifugu tokom 20 minuta na 2000 o min<sup>-1</sup>. Nakon centrifugiranja, supernatant je dekantiran, a talog prenesen u prethodno izvagane i osušene petrijeve zdjelice. U slučaju nezadovoljavajuće odvojenosti krutog i tekućeg dijela, dodatno je provedeno centrifugiranje tijekom 20 minuta na 8500 o min<sup>-1</sup>. Talog iz kiveta dodan je prethodno izdvojenom talogu u zdjelice koje su potom stavljene u sušionik na sušenje pri temperaturi od 80°C do ustaljenja mase. Masa suhe tvari izračuna se na način da se od ustaljene mase petrijeve zdjelice sa suhom tvari nakon sušenja oduzme masa prazne petrijeve zdjelice.

$$m_{st} = m_{ns} - m_{pz} \text{ [g]}$$

$m_{st}$  – masa suhe tvari [g]

$m_{ns}$  – masa petrijeve zdjelice sa suhom tvari nakon sušenja [g]

$m_{pz}$  – masa prazne petrijeve zdjelice [g]

### 3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI

U ovom poglavlju prikazan je način izračunavanja ključnih parametara promatranih tijekom izrade ovog završnog rada.

#### 3.4.2. Prinos produkta ( $Y_P$ )

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

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

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

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

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

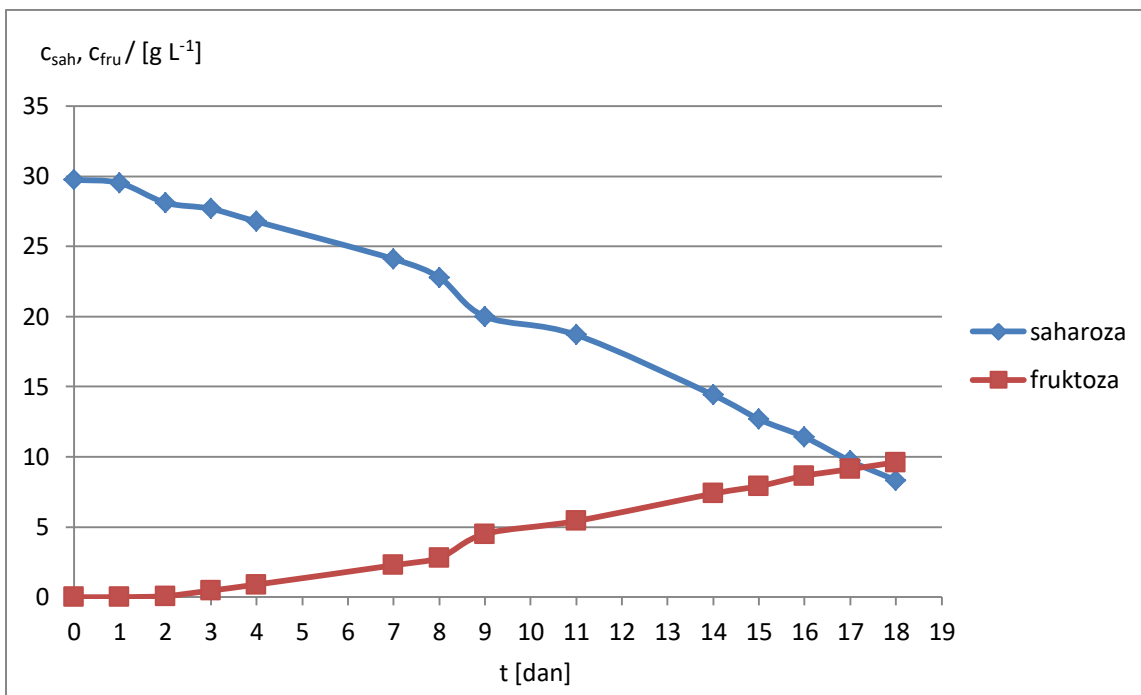
$S_0, P_0$  - početna koncentracija supstrata, tj. produkta [ $g \text{ L}^{-1}$ ],

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

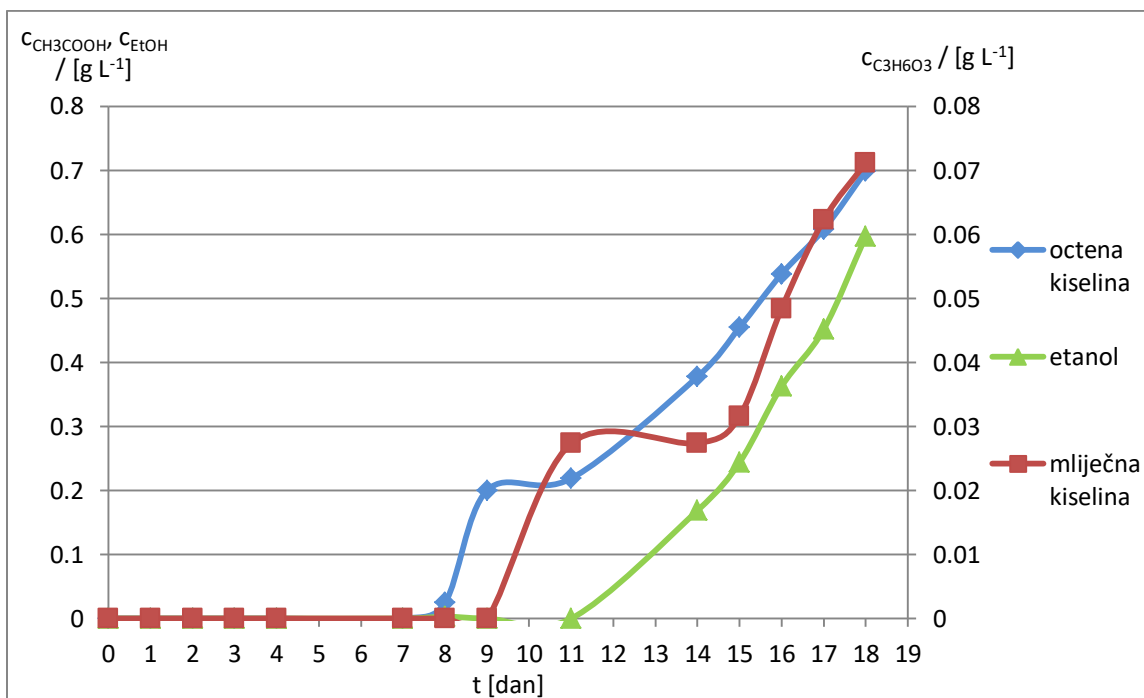
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju proučavan je utjecaj različite pH vrijednosti podloge na brzinu proizvodnje i sastav kefirnog napitka. Uzgoj je proveden kod pH vrijednosti podloge  $\text{pH} = 4$  i  $\text{pH} = 5$ . Eksperimenti su provedeni u bioreaktoru s miješalom a korisni volumena iznosio je 1 L. Nakon inokulacije nesterilne podloge kulturom kefirnih zrnaca, uključena je automatska regulacija pH podloge pomoću sustava integriranog u bioreaktor. S obzirom da je realno bilo očekivati snižavanje, tj. pad pH vrijednosti podloge s vremenom, za održavanje zadane koncentracije  $\text{H}^+$  iona u podlozi korištena je prethodno pripremljena 0,75 M otopina NaOH. Također, sprječavanje gradijenta koncentracije supstrata u podlozi kao i lokalne neujednačenosti pH vrijednosti podloge osigurano je korištenjem miješala. Broj okretaja je bio minimalan ( $35 \text{ o min}^{-1}$ ), u obje fermentacije, s obzirom da je bilo potrebno osigurati anaerobne uvjete te izbjeći mogućnost površinske aeracije podloge. U slučaju kad je pH podloge iznosio 4, zabilježeni su nešto lošiji rezultati u usporedbi s eksperimentom kod pH podloge 5. Ovi rezultati u skladu su s nekim sličnim istraživanjima vezanim uz proizvodnju kefirnog napitka gdje je zabilježen optimalan pH podloge u rasponu od 4,5 – 5,5 pH jedinica. Kod nekih istraživanja zabilježen je značajniji pad maksimalne specifične brzine rasta kefirnih zrnaca već kod pH vrijednosti podloge oko 4,5 (Plessas i sur.,2008). S obzirom da su kefirna zrnca ustvari sačinjena od mnoštva različitih mikroorganizama (mikrobni konzorcij) utoliko je optimizacija uvjeta fermentacije zahtjevnija. Naime, poznato je da kulturu kefirnih zrnaca sačinjavaju različiti kvasci te mnogobrojne vrste bakterija mliječne kiseline i octene bakterije. S obzirom da svi prisutni mikroorganizmi imaju određene koristi od ostalih prisutnih mikroorganizama (recimo bakterije mliječne kiseline od prisutnih kvasaca) možemo govoriti o određenoj vrsti zajedništva (mutualizam). Tako npr., stanice kvasca, u prvom redu *Saccharomyces cerevisiae*, su najzaslužnije za iniciranje fermentacije i vrlo su bitne u početnoj fazi proizvodnje kefirnog napitka. Poznato je da kvasac *S. cerevisiae* posjeduje invertaznu aktivnost koja mu omogućuje korištenje saharoze kao izvora ugljika (Shafiq i sur., 2003). Upravo ta aktivnost omogućuje i svim ostalim mikroorganizmima korištenje glukoze, koja nastaje cijepanjem saharoze pomoću ovog enzima, kao i sintezu mikrobnih metabolita. Također, s obzirom na činjenicu da je optimalan pH za rast stanica kvasca *S. cerevisiae* u rasponu 4,5 – 5, a u ovom slučaju pH podloge je održavan oko 4, jasno je da će se taj pH odraziti i na samu aktivnost kvašćevih stanica te posljednično i na samu dinamiku bioprocasa. U usporedbi s fermentacijom gdje je pH podloge održavan oko 5, zabilježeno je

znatno sporije trošenje saharoze (Slika 4.) iz hranjive podloge te je nakon ukupnog vremena trajanja bioprocesa od 18 dana, u podlozi zaostalo nešto manje od  $10 \text{ g L}^{-1}$  saharoze. Glukoza koja nastaje cijepanjem molekule saharoze djelovanjem enzima, preferencijalan je izvor ugljika kojeg mikroorganizmi odmah troše dok fruktoza zaostaje u podlozi. Nakon 18 dana fermentacije njena konačna koncentracija iznosila je oko  $10 \text{ g L}^{-1}$ . S obzirom da je trend povećanja koncentracija produkata kao što su mliječna i octena kiselina te etanol (Slika 5.) zabilježen tek nakon 8. dana uzgoja, može se zaključiti da inicijalno nisu postignuti aerobni uvjeti koji su nužni za njihov nastanak. S obzirom da je korisni volumen bio relativno mali (ukupni volumen bioreaktora je 2,5 L), u reaktoru je uz tekuću fazu bila prisutna i plinska faza, koja je inicijalno onemogućavala stvaranje anaerobnih uvjeta. Također, bitno je za napomenuti da je inokulum korišten tijekom ovog istraživanja održavan u podlozi koja je sadržavala samo vodovodnu vodu i saharozu bez ikakvih drugih dodataka (siromašna na nutrijentima). Naime, poznato je da se kod pripreve kefirnog napitka u podlogu često dodaje i sušeno voće, kao dodatan izvor nutrijenata za prisutne mikroorganizme, te je u nekim istraživanjima dokazan pozitivan učinak tih istih nutrijenata na dinamiku odvijanja bioprocesa kao i na količinu sintetiziranih produkata metabolizma. U istraživanju kojeg su proveli David Laureys i sur. (Laureys i sur., 2018), dokazan je značajan utjecaj koncentracije prisutnog kisika na mikrobiološku raznolikost u kefirnom napitku kao i utjecaj koncentracije prisutnih nutrijenata u hranjivoj podlozi na prisutnost i zastupljenost različitih vrsta kvasaca i bakterija. Inicijalno niska koncentracija nutrijenata u hranjivim podlogama koje su korištene u ovom istraživanju, vrlo je vjerojatno dovela do prevladavanja nekih vrsta bakterija mliječno-kiselog vrenja (npr. *Lactobacillus hilgardii*, obligatno heterofermentativna bakterija) u odnosu na ostale prisutne vrste mikroorganizama. Također, u sličnim podlogama, zabilježen je znatno manji udio kvasca *S. cerevisiae* u ukupnom broju mikroorganizama, a povećan je udio živih stanica kvasca *D. bruxellensis*. Oba navedena mikroorganizma, *L. hilgardii* kao i *D. bruxellensis* dokazano imaju sposobnost sinteze octene kiseline (Laureys i sur., 2018). U konačnici u slučaju kada je pH podloge održavan na vrijednosti 4, ostvareni su slijedeći pokazatelji uspješnosti bioprocesa:  $Y_{\text{EtOH}} = 0,5971 \text{ g L}^{-1}$ ,  $Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3} = 0,0712 \text{ g L}^{-1}$ ,  $Y_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 0,6989 \text{ g L}^{-1}$ . Koeficijenti konverzije bili su  $Y_{\text{EtOH/S}} = 0,0276 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3/\text{S}} = 0,0034 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{CH}_3\text{COOH/S}} = 0,0322 \text{ g g}^{-1}$ . Udio suhe tvari pao je s početnih 13,77 % na konačnih 6,98 %, što je u skladu s literaturnim navodima gdje je vrlo vjerojatno došlo do odumiranja biomase zbog nepovoljne pH vrijednosti podloge i otpuštanja polisaharida s polisaharidnog matriksa (Rimada i Abraham, 2001).

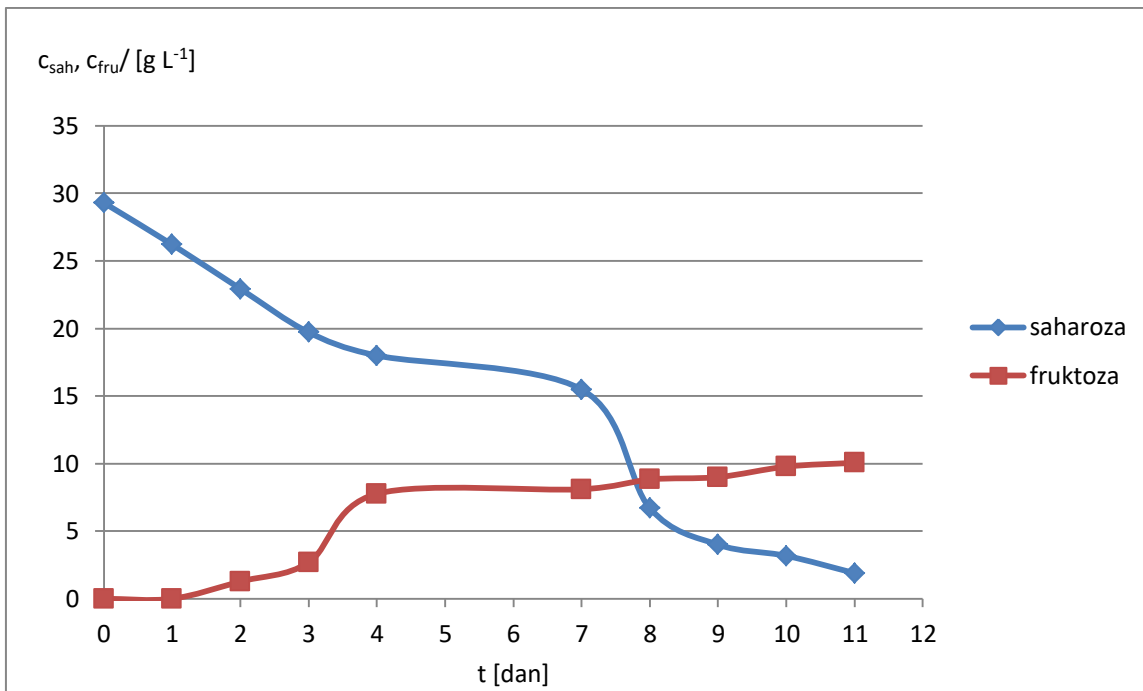


Slika 4. Promjene koncentracija saharoze i fruktoze u ovisnosti o vremenu za pH podloge 4

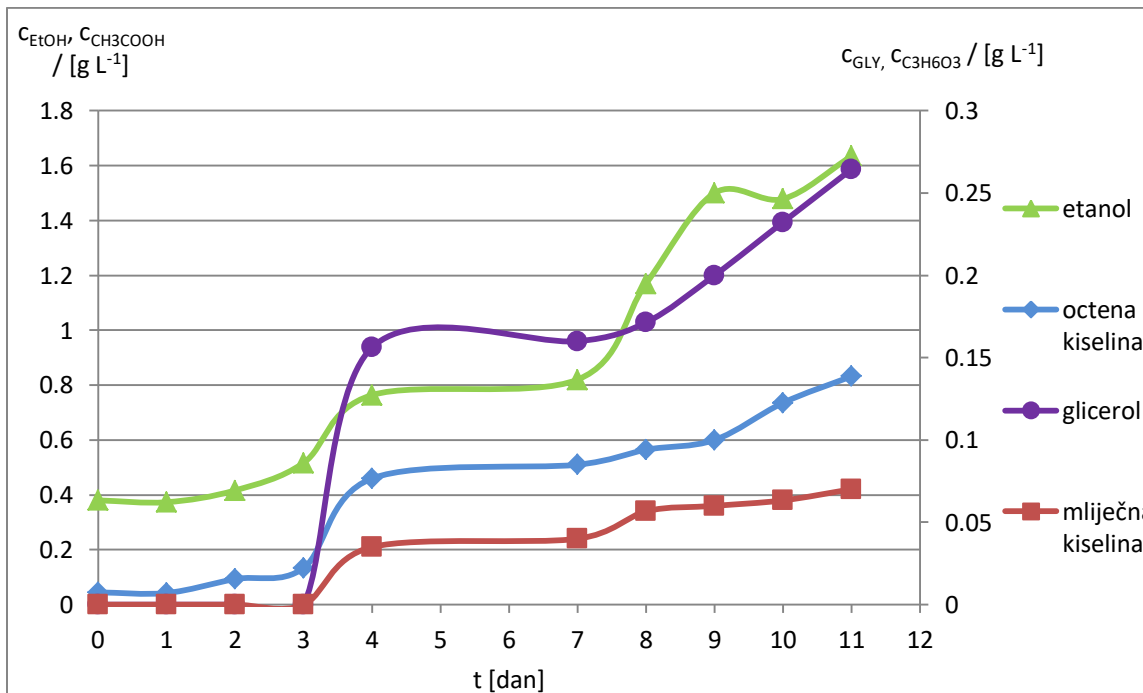


Slika 5. Promjena koncentracije etanola, mliječne i octene kiseline u ovisnosti o vremenu za pH hranjive podloge 4

U drugom eksperimentu, gdje je pH podloge također održavan konstantnim (pH = 5), ostvareni su nešto bolji rezultati. Cijeli eksperiment je značajnije kraće trajao pri čemu je gotovo u potpunosti utrošen izvor ugljika (Slika 6.). Glukoza je i u ovom slučaju bila preferencijalni izvor ugljika pri čemu, nakon hidrolize saharoze, u podlozi zaostaje fruktoza. Već nakon trećeg dana uzgoja može se primijetiti osjetan porast koncentracije zastupljenijih produkata kao što su etanol, glicerol, octena i mliječna kiselina (Slika 7.). S obzirom na identičan sastav podloge kao u prethodnom slučaju, kao i na činjenicu da je podloga bila limitirana s dodanim izvorom hranjivih nutrijenata, moguće je da je u jednom trenutku došlo do prevladavanja nekih vrsta mikroorganizama u podlozi, kao što su *L. hilgardii* i *D. bruxellensis*, koji su inače prisutni u kefirnim zrnima. Iako smanjena koncentracija hranjivih tvari u podlozi pozitivno utječe na udio octenih bakterija, zbog nedostatka kisika, vrlo vjerojatno je njihov doprinos ukupnoj koncentraciji proizvedene octene kiseline bio minimalan s obzirom na anaerobne uvjete. Također, kefirna zrnca mogu sadržavati i neke vrste bifidobakterija. Naime neke od tih vrsta posjeduju mogućnost metaboliziranja monosaharida posebnim metaboličkim putem, tzv. „bifidus shunt-om“ pri čemu nastaju produkti poput octene i mliječne kiseline (Stadie, 2013). Tako npr. bifidobakterija *B. aquikefiri* može egzistirati u uvjetima limitacije nutrijentima i nižih pH vrijednosti podloge. Uz sve navedeno, moguće je da je upravo njihov doprinos ukupno proizvedenoj količini octene i mliječne kiseline, najveći. Na kraju ovog dijela istraživanja ostvareni su slijedeći prinosi:  $Y_{\text{EtOH}} = 1,6345 \text{ g L}^{-1}$ ,  $Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3} = 0,0701 \text{ g L}^{-1}$ ,  $Y_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 0,8320 \text{ g L}^{-1}$ ,  $Y_{\text{GLY}} = 0,2644 \text{ g L}^{-1}$  te slijedeći koeficijenti konverzije:  $Y_{\text{GLY/S}} = 0,0094 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{EtOH/S}} = 0,0582 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3/\text{S}} = 0,0025 \text{ g g}^{-1}$  i  $Y_{\text{CH}_3\text{COOH/S}} = 0,0296 \text{ g g}^{-1}$ . U konačnici, suha tvar iznosila je 2,05 %.



Slika 6. Promjena koncentracija saharoze i fruktoze u ovisnosti o vremenu pri pH 5



Slika 7. Promjene koncentracija mliječne kiseline, octene kiseline, glicerola i etanola u ovisnosti o vremenu kod pH 5

Tablica 3. Pokazatelji uspješnosti proizvodnje kefirnog napitka pri pH vrijednosti podloge 4  
odnosno 5 pH jedinica

pH	$S_0-S$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{EtOH}}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{CH}_3\text{COOH}}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{GLY}}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{EtOH}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{CH}_3\text{COOH}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$Y_{\text{GLY}/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]
4	21,68	0,60	0,07	0,70	0	0,03	0,003	0,03	0
5	28,10	1,63	0,07	0,83	0,26	0,06	0,003	0,03	0,01



## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog eksperimentalnog rada i dobivenih rezultata opisanih u ovom završnom radu može se zaključiti:

1. Bioreaktor s miješalom može se koristiti u proizvodnji kefirnog napitka pri čemu je potrebno osigurati minimalan doticaj hranjive podloge s kisikom iz zraka te smanjiti utjecaj površinske aeracije.
2. Kod uzgoja provedenog pri pH podloge 4 jedinice, dobiveni su slijedeći podaci: prinosi produkata iznosili su  $Y_{\text{EtOH}} = 0,60 \text{ g L}^{-1}$ ,  $Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3} = 0,07 \text{ g L}^{-1}$ ,  $Y_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 0,7 \text{ g L}^{-1}$ , a koeficijenti konverzije bili su  $Y_{\text{EtOH}/S} = 0,03 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3/S} = 0,003 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{CH}_3\text{COOH}/S} = 0,03 \text{ g g}^{-1}$ .
3. Kada je uzgoj proveden pri pH vrijednosti podloge od 5 jedinica, proizvedena je 171,67 % veća koncentracija etanola, 18,57 % veća koncentracija octene kiseline i veća koncentracija glicerola ( $1,63 \text{ g L}^{-1}$  etanola,  $0,83 \text{ g L}^{-1}$  octene kiseline,  $0,26 \text{ g L}^{-1}$  glicerola). Bolji pokazatelji uspješnosti (koeficijenti konverzije:  $Y_{\text{GLY}/S}=0,01 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{EtOH}/S}=0,06 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3/S}=0,003 \text{ g g}^{-1}$  i  $Y_{\text{CH}_3\text{COOH}/S}=0,03 \text{ g g}^{-1}$ ) i kraće vrijeme proizvodnje upućuju na važnost kvasaca prilikom proizvodnje kefirnog napitka.
4. pH vrijednost podloge jedan je od parametara koji utječu na proizvodnju kefirnog napitka. S obzirom na kompleksnost sustava, s ciljem optimizacije proizvodnje, potrebno je provesti daljnja istraživanja.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Anonymous 1 <<https://www.peoplegreen.it/tag/vegano/>> Pristupljeno 21. kolovoza 2021.
2. Anonymous 2 <<https://brainstudy.info/images/what-bacteria-is-used-in-fermentation>> Pristupljeno 24. kolovoza 2021.
3. Ballongue J. (1993) Bifidobacteria and probiotic action. U: Lactic acid bacteria, Salminen S. i Wright A., ur., Marcel Dekker, Inc., New York, str. 357-428.
4. Bechtner J., Xu D., Behr J., Ludwig C., Vogel R. F. (2019) Proteomic Analysis of *Lactobacillus nagelii* in the Presence of *Saccharomyces cerevisiae* Isolated From Water Kefir and Comparison With *Lactobacillus hordei*. *Frontiers in Microbiology* **10**.
5. Bergey H., Holt J. (1994) Group I the Spirochetes. U: Bergey's manual of determinative bacteriology, 9. izd., Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A. i sur., ur., Williams & Wilkins, Baltimore, str. 27-38.
6. Dashko S., Zhou N., Compagno C., Piškur J. (2014) Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research* **14**(6): 826–832.
7. Dickinson J. R., Kruckeberg A. L. (2006) Carbohydrate Metabolism. U: Yeasts in Food and Beverages, Querol A., Fleet G. H., ur., Berlin, str. 215–242.
8. Franzetti L., Galli A., Pagani M.A., De Noni I. (1998) Microbiological and chemical investigations on "Sugar Kefir" drink. *Ann. Microbiol. Enzimol.* **48**: 67-80.
9. Fredrickson A. G. (1977) Behavior of Mixed Cultures of Microorganisms. *Annual Review of Microbiology* **31**(1): 63–88.
10. Galli A., Fiori E., Franzetti L., Pagani M.A., Ottogalli G. (1995) Composizione microbiologica e chimica dei granuli di Kefir "di frutta". *Ann. Microbiol. Enzimol.* **45**: 85-95.
11. Guerzoni M.E., Serrazanetti D.I., Vernocchi P., Gianotti A. (2013) Physiology and biochemistry of sourdough yeasts. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, M. Gobbetti, M. Gänzle, ur., Springer, Boston, MA, USA, str. 155-181.

12. Gulitz A., Stadie J., Wenning M., Ehrmann M. A., Vogel R. F. (2011) The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology* **151**(3): 284–288.
13. Horisberger M. (1969) Structure of the dextran of the Tibi grain. *Carbohydrate Research* **10**(3): 379–385.
14. Kandler O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**(3): 209–224.
15. Kršev Lj., Malija M. (1993) Probiotsko djelovanje *Bifidobacterium* vrsta. *Mljekarstvo, časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, **43**(2): 123-132.
16. Kršev Lj. (1996) Utjecaj bakterija mliječne kiseline na zdravlje ljudi. *Mljekarstvo, časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, **46**(1): 57-65.
17. 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.
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. Leroi F., Pidoux M. (1993) Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology* **74**(1): 48–53.
20. 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 Microbiology Letters* **348**(1): 79–85.
21. 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.
22. 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.

23. Plessas S., Koliopoulos D., Kourkoutas Y., Psarianos C., Alexopoulos A., Marchant R., Koutinas A. A. (2008) Upgrading of discarded oranges through fermentation using kefir in food industry. *Food Chemistry* **106**(1): 40–49.
24. Pogačić T., Šinko S., Zamberlin Š., Samaržija D. (2013) Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*. **63**(1): 3-14.
25. Rimada P. S., Abraham A. G. (2001) Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research* **68**(4).
26. 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.
27. Stadie J. (2013) Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir. Doctoral dissertation, Technische Universität München, München.
28. 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 Microbiology* **35**(2): 92–98.
29. 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.
30. 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 Microbiology* **27**(5): 672–678.
31. Xu D., Bechtner J., Behr J., Eisenbach L., Geißler A. J., Vogel R. F. (2018) Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. *International Journal of Food Microbiology*.

## 7. PRILOZI

### 7.1. JEDNADŽBE BAŽDARNIH PRAVACA POMOĆU KOJIH SU ODREĐENE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PROIZVODA UPLC ANALIZOM

Tablica 4. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracija spojeva UPLC analizom

Spoj	Retencijsko vrijeme, $t_R$ (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Mliječna kiselina	7,138	$A = 155475 \gamma_{C_3H_6O_3} - 1042,7$	0,9999
Octena kiselina	7,983	$A = 76519 \gamma_{CH_3COOH} + 1025,5$	0,9999
Etanol	9,598	$A = 100677 \gamma_{EtOH} + 1658,9$	0,9996
Glicerol	7,181	$A = 133462 \gamma_{GLY} + 5844,6$	0,9997
Fruktoza	5,624	$A = 112342 \gamma_{Fruktoza} + 23079$	0,9999
Manitol	6,193	$A = 161699 \gamma_{Manitol} + 25269$	0,9998
Glukoza	5,114	$A = 141110 \gamma_{Glukoza} + 26565$	0,9989
Saharoza	4,436	$A = 135868 \gamma_{Saharoza} + 30686$	0,9984

A - površina

## 7.2. POPIS KRATICA

Tablica 5. Popis kratice korištenih u ovom završnom radu

Kratice	Opis kratice	Mjerna jedinica
$Y_{\text{EtOH}}$	Prinos etanola	$[\text{g L}^{-1}]$
$Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3}$	Prinos mliječne kiseline	$[\text{g L}^{-1}]$
$Y_{\text{CH}_3\text{COOH}}$	Prinos octene kiseline	$[\text{g L}^{-1}]$
$Y_{\text{GLY}}$	Prinos glicerola	$[\text{g L}^{-1}]$
$Y_{\text{EtOH}/S}$	Koeficijent konverzije supstrata u etanol	$[\text{g g}^{-1}]$
$Y_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3/S}$	Koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu	$[\text{g g}^{-1}]$
$Y_{\text{CH}_3\text{COOH}/S}$	Koeficijent konverzije supstrata u octenu kiselinu	$[\text{g g}^{-1}]$
$Y_{\text{GLY}/S}$	Koeficijent konverzije supstrata u glicerol	$[\text{g g}^{-1}]$

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Nejedlý

Ime i prezime studenta