

Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak suhих šljiva, groždica i datulja

Antunović, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:365007>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-13**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Marija Antunović
7835/BT**

**PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK
SUHIH ŠLJIVA, GROŽĐICA I DATULJA**

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, 2022.

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, tehnologiju slada i piva
na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak suhих šljiva, grožđica i datulja

Marija Antunović, 7835/BT

Sažetak:

Kefirni napitak je piće dobiveno fermentacijom vodene otopine saharoze s pomoću združene kulture kefirnih zrnaca sa ili bez dodatka sušenog voća. Mikroorganizmi koji su pretežito zastupljeni u kefirnim zrcima su bakterije mliječne kiseline, kvasci, bifidobakterije i bakterije octene kiseline. Kefirna zrnca korištena u ovom radu su iz kućnog uzgoja te im je mikrobiološki sastav nepoznat. Dodatkom sušenog voća u hranjivu podlogu osigurava se dodatan izvor nutrijenata, posebice ugljika i dušika, što djeluje pozitivno na rast i aktivnost mikroorganizama prisutnih u hranjivoj podlozi. U ovom završnom radu praćen je utjecaj i tijek proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak tri vrste sušenog voća (šljive, grožđice, datulje). Rezultati istraživanja su pokazali da je najveći porast udjela suhe tvari, u odnosu na početni udio, ostvaren u eksperimentima gdje su u hranjivu podlogu dodane datulje. Najviši prinosi produkata poput etanola, manitola, mliječne i octene kiseline zabilježeni su kod kefirnog napitka gdje su dodane suhe šljive, a gdje je istovremeno zamijećen i najveći utrošak supstrata. Zaključno, u svim eksperimentima uočen je pozitivan učinak dodatka sušenog voća na proizvodnju kefirnog napitka.

Ključne riječi: kefirni napitak, kefirna zrnca, sušeno voće, suhe šljive, suhe grožđice, suhe datulje

Rad sadrži: 37 stranica, 16 slika, 3 tablica, 36 literaturnih navoda, 1 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Mladen Pavlečić

Datum obrane: 19. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Production of kefir beverage with addition of dried plums, raisins and dates

Marija Antunović, 7835/BT

Abstract:

Kefir drink is a beverage obtained by fermentation of an aqueous solution of sucrose with the help of a combined culture of kefir grains with or without the addition of dried fruit. Microorganisms that are predominantly present in kefir grains are lactic acid bacteria, yeasts, bifidobacteria and acetic acid bacteria. The kefir grains used in this work are from domestic cultivation and their microbiological composition is unknown. The addition of dried fruit to the nutrient medium provides an additional source of nutrients, especially carbon and nitrogen, which has a positive effect on the growth and activity of microorganisms present in the nutrient medium. In this final paper, the influence and course of production of kefir drink with the addition of three types of dried fruit (plums, raisins, dates) was observed. The research results showed that the largest increase in the proportion of dry matter, compared to the initial proportion, was achieved in the experiments where dates were added to the nutrient medium. The highest yields of products such as ethanol, mannitol, lactic and acetic acid were observed in the kefir drink where prunes were added, and where the highest consumption of substrates was also observed. In conclusion, a positive effect of the addition of dried fruit on the production of kefir drink was observed in all experiments.

Keywords: kefir drink, kefir grains, dried fruit, dried plums, raisins, dried dates

Thesis contains: 37 pages, 16 figures, 3 tables, 36 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Mladen Pavlečić, PhD, Assistant Professor

Thesis defended: September 19th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	3
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. KEFIRNI NAPITAK I ZRNCA KEFIRNOG NAPITKA	4
2.2. MIKROORGANIZMI PRISUTNI U KEFIRNOM NAPITKU	6
2.2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE (BMK).....	8
2.2.2. BIFIDOBAKTERIJE	10
2.2.3. BAKTERIJE OCTENE KISELINE	12
2.2.4. KVASCI	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI.....	14
3.1.1. RADNI MIKROORGANIZMI	14
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE	14
3.1.3. KEMIKALIJE.....	14
3.1.4. APARATURA I PRIBOR	15
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE ZA ODRŽAVANJE KULTURE KEFIRNIH ZRNACA	17
3.2.2. PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA ZA PROIZVODNJU KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK VOĆA	17
3.3. ANALITIČKE METODE	18
3.3.1. PRIPREMA UZORKA ZA UPLC ANALIZU.....	18
3.3.2. ODREĐIVANJE UDJELA SUHE TVARI BIOMASE KEFIRNIH ZRNACA.....	18
3.4. ODREĐIVANJE POKAZATELJA USPJEŠNOSTI.....	20
3.4.1. POTROŠNJA SUPSTRATA (ΔS).....	20
3.4.2. KOEFICIJENT KONVERZIJE SUPSTRATA U PRODUKT ($Y_{P/S}$).....	20
3.4.3. PRINOS PRODUKTA (Y_P).....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21

4.1.	PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUŠENIH DATULJA	21
4.2.	PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUHIH GROŽĐICA.....	25
4.3.	PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUHIH ŠLJIVA	28
5.	ZAKLJUČCI.....	32
6.	PRILOZI	1
6.1.	BAŽDARNI PRAVCI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA UPLC ANALIZOM	1

1. UVOD

Kefirni napitak je blago kiselkasto fermentirano piće, dobiveno iz kefirnih zrnaca djelovanjem združene kulture mikroorganizama u vodenoj otopini saharoze s ili bez dodatka sušenog ili svježeg voća (Rosa i sur., 2017; Gulitz i sur., 2011), a fermentacija započinje dodatkom kefirnih zrnaca u vodenu otopinu saharoze određene koncentracije. Nakon 4 do 8 dana, pri sobnoj temperaturi, tekući dio fermentirane podloge se dekantira, a isprana kefirna zrnca mogu se ponovno koristiti u postupku sa svježom podlogom (Lynch i sur., 2021; Moinas i sur., 1980).

Kefir datira još od 2000. godine prije Krista, a originalno podrijetlo je nepoznato. Prvi puta se spominju još davne 1892. godine kada je Ward opisao tzv. biljku đumbirovog piva (engl. *Ginger-beer Plant*) (Stadie, 2013). Kefirni napitak, u novije doba, ima sve veću primjenu jer, osim svog probiotičkog djelovanja, pozitivno utječe i na toleranciju na glukozu, a ima i antibakterijski, hipokolesterolemijski, antihipertenzivni, protuupalni te antioksidativni učinak (Rosa i sur., 2017). Važno je istaknuti da kefirni napitak sadrži mikroorganizme, u najvećoj mjeri bakterije mliječne kiseline, posebice vrste *Lactobacillus*, dok bakterije octene kiseline te bifidobakterije imaju sekundarnu ulogu, ovisno o prisutnosti kisika. Kvasci, *Saccharomyces*, ali i ostale vrste imaju također važnu ulogu u proizvodnji i svojstvima kefirnog napitka (Lynch i sur., 2021). Do sada je provedeno nekoliko različitih eksperimenata, sa i bez dodatka sušenog voća, gdje se pokazalo da dodatak pozitivno utječe na dinamiku bioprocasa i finalni sastav napitka (Jelačić, 2021; Nejedly, 2021).

2. TEORIJSKI DIO

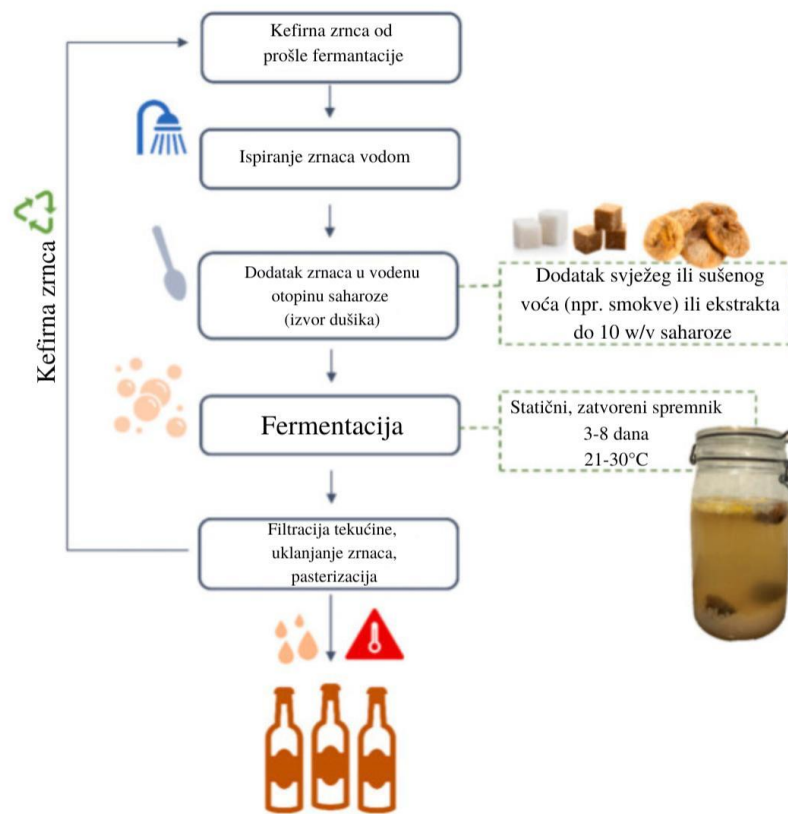
2.1. KEFIRNI NAPITAK I ZRNCA KEFIRNOG NAPITKA

Kefirni napitak karakterizira blago kiselkast okus te nizak udjel etanola i ugljikovog (IV) oksida. Uglavnom je proizvod kućne radinosti pri ne aseptičnim ili minimalno aseptičnim uvjetima (Horisberger, 1969; Pidoux i sur., 1988). Fermentacija je najčešće spontana i traje 4 do 8 dana, pri sobnoj temperaturi, pri čemu se izvor ugljika iz otopine prevodi u produkte metabolizma prisutnih mikroorganizama (etanol, glicerol, octena kiselina i manitol). U podlogu se može dodati sušeno ili svježe voće koje služi kao dodatan izvor dušika no njihovim dodatkom se preporučuje korak pasterizacije kako bi se izbjegao rast nepoželjnih patogenih vrsta (Lynch i sur., 2021; Randazzo, 2016).

Kefirna zrnca su prozirne, porozne, želatinozne granule, nalik karfiolu, promjera 5 do 20 mm (Horisberger, 1969; Waldherr i sur., 2010). Suha tvar prosječno im iznosi otprilike 10 do 14% (w/w). Građena su od polisaharida, po čijoj su cijeloj površini prisutni brojni mikroorganizmi.



Slika 1. Zrnca vodenog kefira (anonymous 1)



Slika 2. Shematski prikaz proizvodnje tradicionalnog kefirnog napitka (prema Lynch i sur., 2021)

2.2. MIKROORGANIZMI PRISUTNI U KEFIRNOM NAPITKU

Kefirna zrnca karakterizira veliki broj mikrobnih vrsta koje su u različitim međusobnim odnosima. Istraživanja su pokazala da bakterijsku populaciju zrnaca čine sojevi bakterija iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*; a odnedavno i *Bifidobacterium psychraerophilum/crudilactis* te sojevi kvasaca rodova *Saccharomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Zygotoruspora* i *Candida*. Koncentracija u kojoj su bakterije prisutne iznosi oko $10^6 - 10^8$ stanica po gramu dok za kvasce koncentracija iznosi $10^6 - 10^7$ stanica po gramu (Guiltz i sur., 2011; Marsh i sur., 2013). U Tablici 1. navedeni su neki od prisutnih mikroorganizama.u zrcima kefirnog napitka.

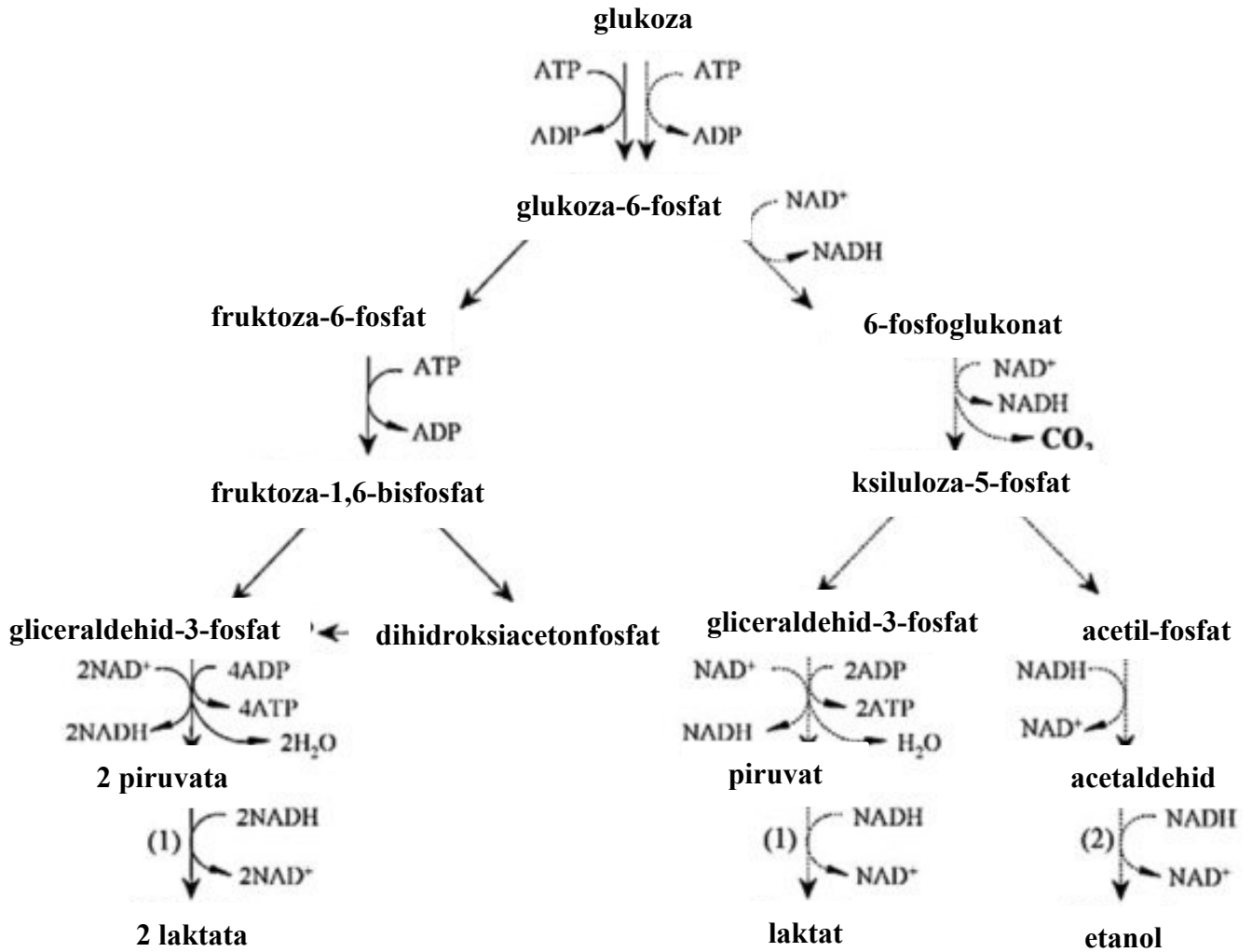
Tablica 1. Bakterije i kvasci izolirani iz vodenog kefira (Waldherr i sur., 2010)

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. pseudoplantarum</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. Dextranicum</i>	Pidoux, 1989
<i>Enterobacter hormachei</i>	Waldherr, 2010

<i>Gluconobacter frateuri</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 vinae</i>	Pidoux, 1989; Galli i sur., 1995
<i>Hanseniaspora yalbensis</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. Bakterije mliječne kiseline (BMK)

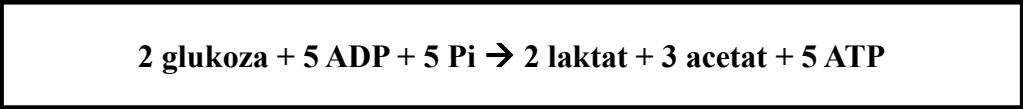
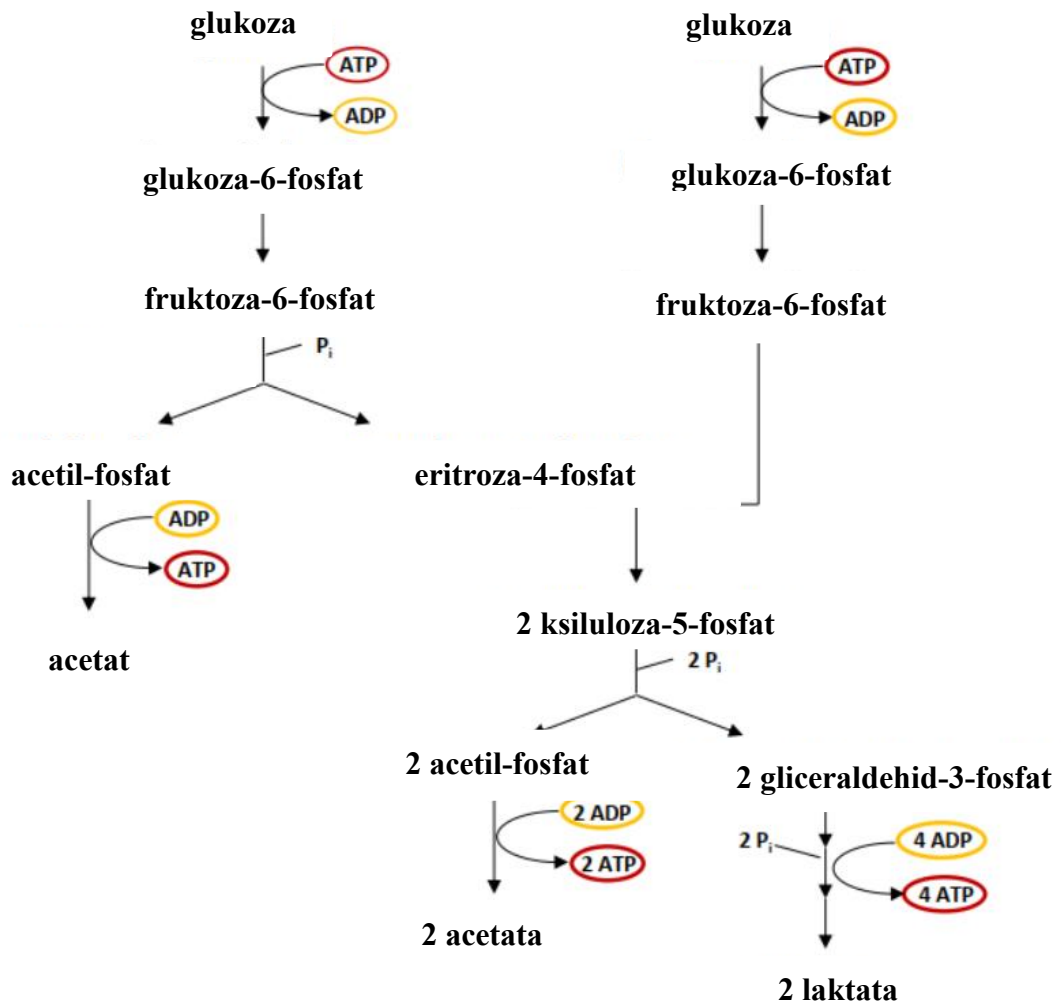
Bakterije mliječne kiseline imaju vodeću ulogu u proizvodnji ovog napitka. To su Gram-pozitivne, fakultativno anaerobne bakterije koje imaju sposobnost proizvodnje mliječne kiseline i ostalih produkata koji se mogu pronaći u kefirnom napitku. Najčešće su štapićastog ili sferičnog oblika, a najzastupljeniji rodovi unutar kefirnih zrnaca čine *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (Giulitz i sur., 2013). Prema načinu metaboliziranja šećera u konačne produkte, razlikujemo dvije skupine BMK, homofermentativne i heterofermentativne BMK. Homofermentativne bakterije mliječne kiseline razgrađuju šećer glikolizom odnosno, Embden-Meyeroff-Parnas putem te je konačni produkt laktat, za razliku od heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline koje razgrađuju šećer oksidativnim ogrankom puta pentoza fosfata, a produkti su ekvimolarne količine laktata, etanola i acetata. Ovisno o oksidacijsko-redukcijskom potencijalu sustava, toliko će nastati acetata i etanola (Axelsson, 2004; Stadie, 2013). Na Slici 3. prikazana je razlika metabolizma homofermentativnih i heterofermentativnih vrsta BMK.



Slika 3. Prikaz razlike metabolizma homofermentativnih i heterofermentativnih vrsta BMK (Anonymous 2)

2.2.2. Bifidobakterije

Ove bakterije, također prisutne u zncima, su Gram-pozitivne, striktno aerobne štapićaste bakterije. Nepokretne su, ne stvaraju spore te su različitih morfoloških oblika (Kršev i Malija,, 1993). Isprva su se smatrale bakterijama mliječne kiseline jer im je laktat glavni produkt metabolizma ugljikohidrata no danas se, zbog svojih filogenetskih i metaboličkih razlika, smještaju kao zasebna skupina (Ballongue, 2004). One se u novije vrijeme sve češće upotrebljavaju u proizvodnji fermentiranih mliječnih napitaka jer se konzumacijom tih proizvoda u organizam unose aktivne tvari koje povoljno utječu na mikrobiološki sastav u ljudskim crijevima (Kršev i Malija, 1993). U kefirnim su zncima zastupljene puno manje nego BMK te, za razliku od njih, imaju jedinstven metabolizam glukoze („bifidus shunt“), a njihova uloga u mješovitoj kulturi zasad nije u potpunosti razjašnjena (Xu i sur, 2019). Na Slici 4. prikazana je razlika homofermentativnog i heterofermentativnog puta kod BMK od metaboličkog puta vrste *Bifidobacterium* („bifidus shunt“).



Slika 4. „Bifidus shunt“ kod bifidobakterija (prema Stadie, 2013)

2.2.3. Bakterije octene kiseline

Bakterije octene kiseline (BOK) su Gram-negativne, nesporogene, štapićaste ili okrugle, obligatno aerobne bakterije. One obitavaju u različitim staništima koje sadrže fermentabilne šećere te su prvotno izolirane iz slatkih, kiselih ili alkoholom bogatih staništa poput voća, cvijeća te fermentirane hrane kao što su pivo i ocat gdje inače prirodno obitavaju. BOK se svrstavaju u porodicu *Acetobacteraceae* koja je podijeljena u dva roda – *Acetobacter* i *Gluconobacter*. Vrste roda *Acetobacter* preferiraju etanolom bogata staništa, dok *Gluconobacter* staništa bogata ugljikohidratima (Lynch i sur, 2019; Raspor i Goranovič, 2008).

Metabolizam BOK naziva se „oksidativna fermentacija“ te je taj proces specifičan jer uz pomoć alkohol-dehidrogenaze i acetaldehid-dehidrogenaze dolazi do nepotpune oksidacije etanola, ugljikohidrata i alkoholnih šećera do organskih kiselina, aldehida i ketona (Matsushita i Matsutani, 2016).

Ove bakterije imaju važnu ulogu u proizvodnji brojnih namirnica kao što su ocat, pivo i kefir, ali isto tako predstavljaju i indikator kontaminacije u drugim fermentacijama (Gullo i sur, 2014). U kefirnim zrnima je njihov udio 3-10% ukupne bakterijske populacije, a najzastupljenije vrste su *Acetobacter fabarum* i *Acetobacter orientalis* (Gulitz i sur, 2011).

2.2.4. Kvasci

Kvasci su eukariotski, jednostanični mikroorganizmi svrstani u carstvo gljiva (*Fungi*). Većinom su mezofili, a razmnožavaju se pupanjem. Karakterizira ih širok raspon pH vrijednosti u kojem mogu rasti (pH 4,5 – 7) a većina ih je otporna i na vrlo niske pH vrijednosti (Guerzoni i sur., 2013). Optimalna temperatura za rast za većinu kvasaca je oko 28°C.

Kao glavni izvor energije koriste glukozu koja se u aerobnim uvjetima glikolizom prevodi do piruvata u citosolu uz redukciju NAD⁺ do NADH. Najpoznatiji kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, sadrži topivi enzim invertazu, koja cijepa saharozu na glukozu i fruktozu koje se transportnim sustavom uz pomoć permeza prenose i koriste kao izvor ugljika (Shafiq i sur., 2003).

U zrnima vodenog kefir, pronađeni su brojni sojevi kvasca različitih karakteristika. Kvasci iz roda *Zygosaccharomyces* su osmotolerantni i mogu rasti na podlogama koje sadrže visoke koncentracije šećera i niske koncentracije aminokiselina, što je često slučaj u podlogama za proizvodnju kefirnog napitka. *Saccharomyces cerevisiae* bez prisutnosti kisika u podlozi, pretvara šećer u etanol i CO₂. Iako mogu izazvati kvarenje, kvasci su poželjni u sastavu kefirnih zrnaca i proizvodnji vodenog kefira (Stadie, 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada korištena 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. Hranjive podloge

Kultura kefirnih zrnaca korištena u ovom radu održavala se u Erlenmeyerovoj tikvici u otopini saharoze koncentracije 30 g/L pri temperaturi od 25 °C, bez dodatka sušenog voća. Ispitivanje utjecaja sušenog voća na proizvodnju kefirnog napitka i rast kefirnih zrnaca provedeno je u staklenkama u podlogama u kojima je koncentracija saharoze iznosila 60 g/L te je set od 10 staklenki (ukupno 30 staklenki) sadržavao po 10 g određene vrste sušenog voća (datulje, grožđice, šljive). Uzgoj u staklenkama je također proveden pri 25 °C. Korištene podloge tokom ovog istraživanja nisu bile sterilizirane.

3.1.3. Kemikalije

U Tablici 2. navedene su kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada, njihova čistoća i proizvođač.

Tablica 2. Kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu završnog rada

KEMIKALIJA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
SAHAROZA	99+%	Liofilchem, Italija
CINKOV SULFAT HEPTAHIDRAT	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
SUMPORNA KISELINA SUŠENE ŠLJIVE	za UPLC, 96 %	Merk, Njemačka
SUŠENE DATULJE GROŽDICE		EuroCompany99 d.o.o., Bosna i Hercegovina
		Nutrigold, Hrvatska
		Nutrigold, Hrvatska

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 Viasampler) 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.

3.1.4.2. Ostala aparatura

- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka)
- hladnjak i zamrzivač (Bosch, Njemačka)
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- sušionik ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska) 14
- centrifuga CF-10 visoke djelotvornosti (witeg Labortechnik GmbH, Njemačka)
- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- vodootporni prijenosni pH/mV-metar rezolucije 0,01 – HI9125 (Hanna Instruments, SAD)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema hranjive podloge za održavanje kulture kefirnih zrnaca

Hranjiva podloga za održavanje i umnažanje kefirnih zrnaca pripremljena je na način da se u 2 L vodovodne vode otopilo 60 g konzumnog šećera u Erlenmeyerovoj tikvici od 3 L.

Podloga se mijenjala svaka 2-3 dana te nije sadržavala dodano voće.

3.2.2. Priprema hranjivih podloga za proizvodnju kefirnog napitka uz dodatak voća

Hranjiva podloga za proizvodnju kefirnog napitka uz dodatak sušenog voća pripremljena je na način da se 270 g saharoze otopi u 4,5 L vodovodne vode tako da početna koncentracija šećera iznosi 60 g/L. Tako pripremljena podloga razdijeljena je u 30 staklenki na način da je svaku staklenku dodano 150 mL otopine koja je potom inokulirana s 10 % (m/V) vlažnih kefirnih zrnaca (15 g). Također, u sve staklenke je dodano po 10 g različitog sušenog voća (grožđice, datulje, šljive), ukupno 30 staklenki, što znači da je u svaki set od 10 staklenki bilo ukupno dodano po 100 g odabranog voća. Tako pripremljene staklenke lagano su zatvorene sa poklopcem te su stavljene u termostat na temperaturu od 25 °C. Ovaj postupak se izvodi pri neaseptičnim uvjetima te staklenke i voće nije prethodno sterilizirano, a sama proizvodnja kefirnog napitka i uzgoj kefirnih zrnaca praćen je tokom 32 dana.

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Priprema uzorka za UPLC analizu

Svakih 3-4 dana provedeno je uzorkovanje tekućeg dijela hranjive podloge iz 3 staklenke sa različitom vrstom voća dodanog u podlogu. U Eppendorf kiveti od 1,5 mL, u dvije paralele za svako voće, otpipetirano je 750 μ L tekućeg dijela hranjive podloge te 750 μ L otopine cinkovog sulfata heptahidrata koncentracije 100 g/L. Kivete su potom homogenizirane i ostavljene 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se istaložili prisutni proteini. Nakon toga, uzorci su centrifugirani tokom 5 minuta na 1350 o/min. Nakon centrifugiranja, ponovno je izuzeto po 750 μ L supernatanta u dvije nove kivete, te je u svaku kivetu dodano po 750 μ L demineralizirane vode kako bi se uzorci razrijedili za UPLC analizu. U konačnici početni uzorak je razrijeđen četiri puta. Preko filtra veličine pora 0,2 μ m uzorci su dodatno profiltrirani u vijalu koja se koristi za UPLC analizu.

3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari biomase kefirnih zrnaca

Udio suhe tvari kefirnih zrnaca određen je na početku i kraju uzgoja. Početna suha tvar je određena na način da je iz tikvice za održavanje inokuluma odvagano 10 g vlažnih kefirnih zrnaca koji su potom prebačeni u prethodno osušenu i izvaganu Petrijevu zdjelicu te su potom stavljeni na sušenje do konstantne mase u sušionik na temperaturu od 80 °C. Rađene su dvije paralele te je vrijednost početne suhe tvari uzeta kao srednja vrijednost ta dva mjerenja. Udio suhe tvari u zadnjem danu uzgoja određen je na način da je iz staklenki iz prevrele podloge odvojeno dodano sušeno voće te je te je ukupan preostali sadržaj iz staklenke ravnomjerno razdijeljen u nekoliko plastičnih Eppendorf kiveta od 50 mL koje su se potom išle na centrifugiranje pri 8000 o/min u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je dekantiran a istaložena kefirna zrnca su žlicom i spatulom prebačena na prethodno osušene i izvagane Petrijeve zdjelice. One su, kao i za početnu suhu tvar, stavljene na sušenje do konstantne mase u sušionik na temperaturu 80 °C. Masu suhe tvari dobijemo tako da se od mase izvagane Petrijeve zdjelice sa zncima nakon ustaljenja mase, oduzme masa prazne osušene zdjelice.

$$m_{s.tv.} = m_2 - m_1 \quad [1]$$

$m_{s.tv.}$ – masa suhe stvari [g]

m_1 – masa prazne osušene Petrijeve zdjelice [g]

m_2 – masa Petrijeve zdjelice s kefirnim zrnima nakon sušenja [g]

3.4. ODREĐIVANJE POKAZATELJA USPJEŠNOSTI

Tokom ovog istraživanja, kao pokazatelji uspješnosti, određeni su ukupna potrošnja supstrata, koeficijent konverzije supstrata u produkt i prinos produkta.

3.4.1. Potrošnja supstrata (ΔS)

$$\Delta S = S_0 - S \text{ [g/L]} \quad [2]$$

S_0 – početna koncentracija supstrata [g/L]

S – konačna koncentracija supstrata [g/L]

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

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

S_0, P_0 – početna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g/L]

S, P – konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g/L]

3.4.3. Prinos produkta (Y_P)

$$Y_P = P - P_0 \text{ [g/L]} \quad [4]$$

P – konačna koncentracija produkta [g/L]

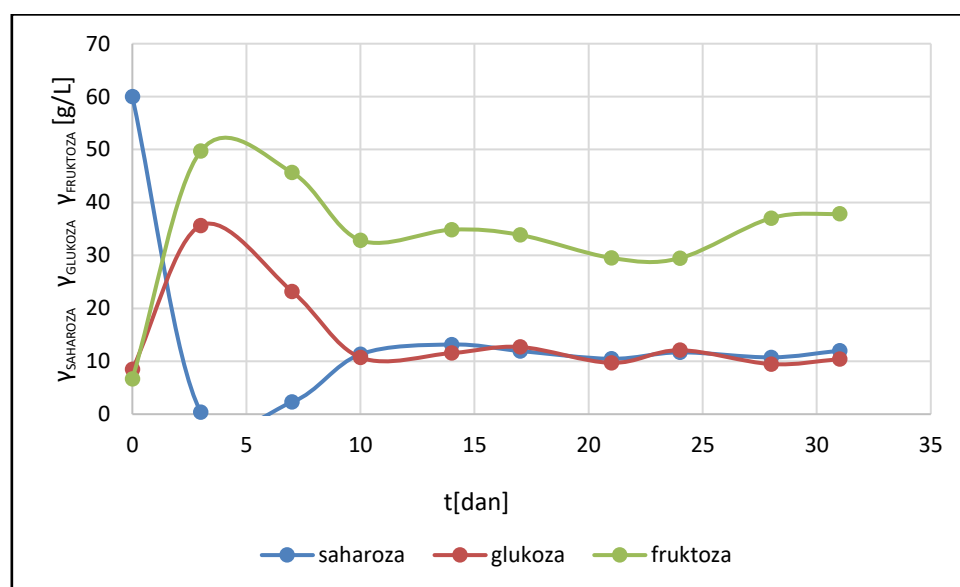
P_0 – početna koncentracija produkta [g/L]

4. REZULTATI I RASPRAVA

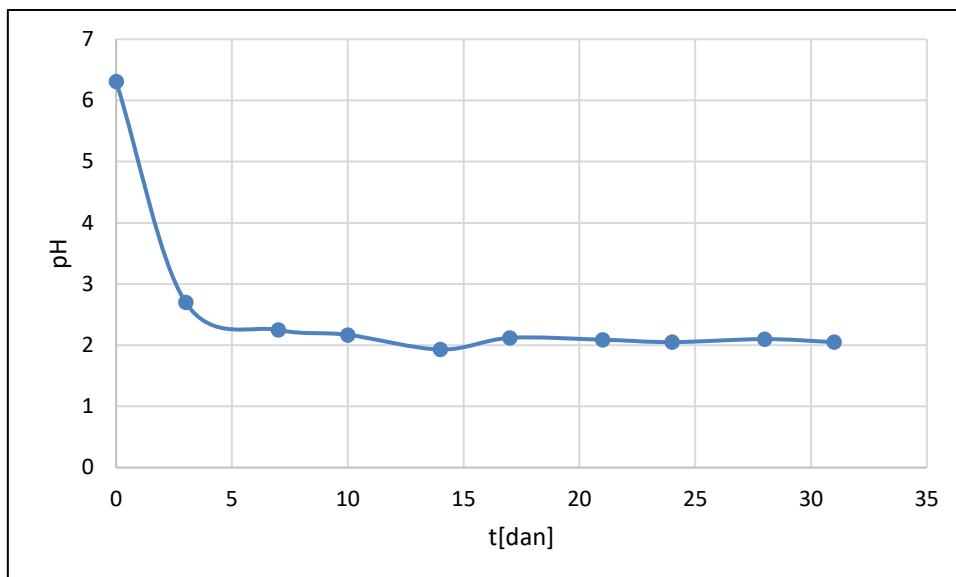
U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati istraživanja utjecaja dodatka sušenih datulja, grožđica i suhih šljiva na tijek proizvodnje kefirnog napitka. U poglavlju 4.1 prikazani su rezultati dobiveni uz dodatak sušenih datulja, dok su u preostala dva poglavlja prikazani rezultati proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih grožđica (4.2) te dodatak sušenih šljiva (4.3).

4.1. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUŠENIH DATULJA

U ovom poglavlju će biti prikazani rezultati istraživanja proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih datulja. Rezultati su prikazani na Slikama 5.-8.



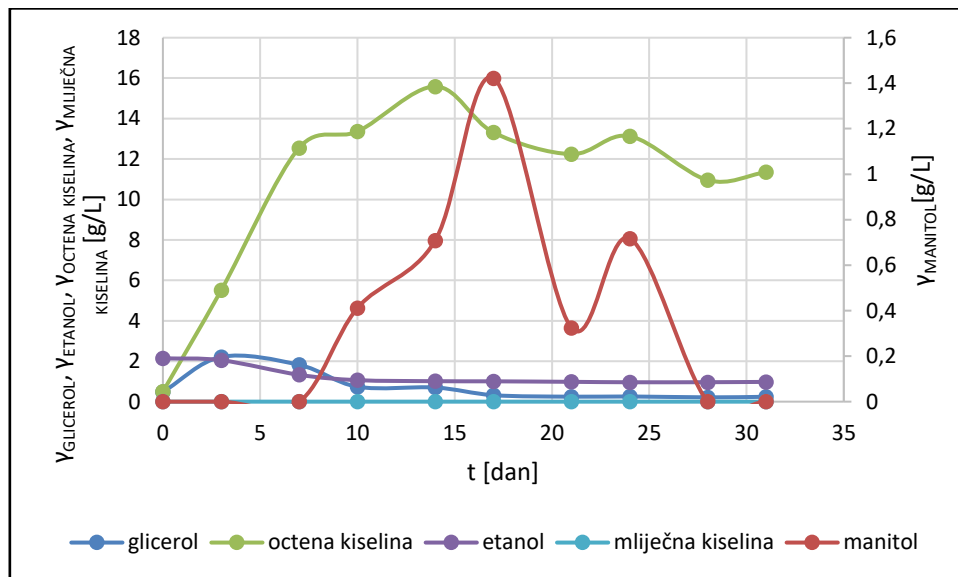
Slika 5. Promjena koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih datulja



Slika 6. Promjena pH vrijednosti podloge tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih datulja

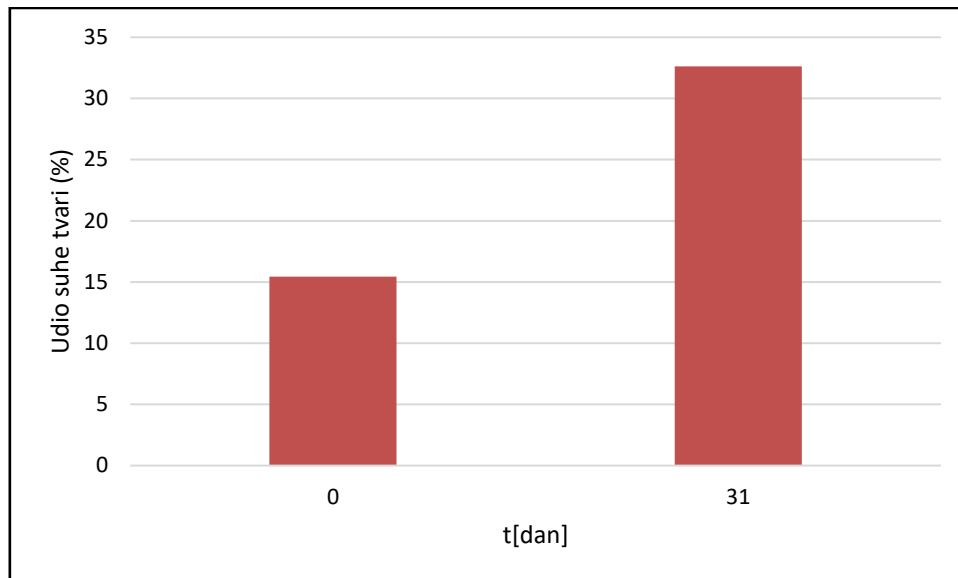
Na Slici 5. prikazana je dinamika potrošnje supstrata kada su u hranjivu podlogu dodane sušene datulje. U prva tri dana zabilježena je najveća brzina hidrolize saharoze što potkrepljuje činjenica da je u tom periodu zabilježena i najveća koncentracija glukoze i fruktoze u podlozi. S obzirom da je u prvih nekoliko dana pH podloge bio povoljniji za kvašćevu aktivnost, ponajviše za *S. cerevisiae*, (pH_{opt} 4,5- 5) ovakav rezultat je očekivan (Shafiq i sur, 2003). Bitno je za napomenuti da s obzirom da je u svim ostalim tikvicama do kraja fermentacije zabilježena prisutna ne hidrolizirana saharoza, koncentracija zabilježena u 3. i 6. danu najvjerojatnije je eksperimentalna greška. Od 3. do 10. dana uočena je potrošnja glukoze i fruktoze (Slika 5.), dok se koncentracija saharoze nije više značajnije mijenjala do kraja fermentacije. U tom periodu zabilježen je i značajniji porast koncentracije manitola i octene kiseline (Slika 7.), što je u skladu sa literaturnim navodom da neke od bakterija koje proizvode manitol, proizvode i veće količine octene kiseline (Vrancken i sur., 2010). Također, s obzirom da je pH vrijednost podloge već tada bio nizak postoji mogućnost da je došlo i do pojačane aktivnosti mikroorganizama prirodno prisutnih u kefirnim zrnima kao što je kvasac *Dekkera bruxellensis* koji dokazano može preživjeti niske pH vrijednosti podloge (Laureys i sur, 2018) koji i sintetizira octenu kiselinu. Osim ovog kvasca, u prijašnjim istraživanjima s kefirnim napitcima, dokazana je prisutnost bakterijske vrste odgovorne za proizvodnju polimera kefirana, bakterijom

mliječno-kiselog vrenja, *L. hilgardii* (Lynch i sur, 2021) . Ova činjenica je u skladu sa promjenom suhe tvari kefirnih zrnaca prikazanom na Slici 8.



Slika 7. Promjena koncentracije produkata tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih datulja

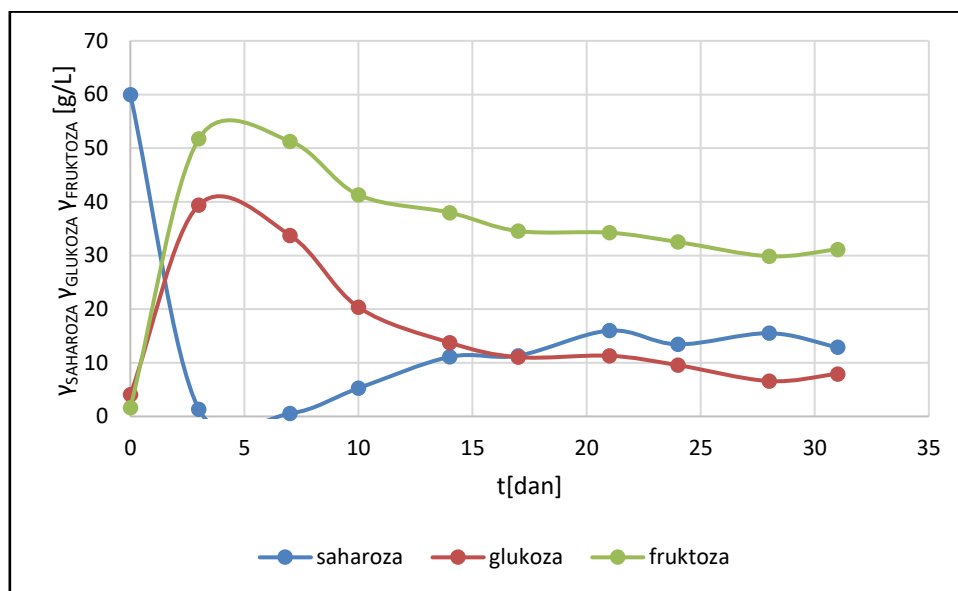
Bitno je za napomenuti da je od ostalih produkata zabilježena prisutnost etanola i glicerola i to na početku bioprocasa. Dio ovih produkata moguće je transferiran u podlogu prilikom inokulacije. Njihova koncentracija se nije značajnije mijenjala do kraja fermentacije što je i logično s obzirom da ovi produkti najvjerojatnije sintetizira kvasac *S. cerevisiae* čija aktivnost je svedena na minimum prema kraju eksperimenta. Utjecaj bakterija octene kiseline najvjerojatnije nije bio značajan, iz razloga što koncentracija etanola u podlozi nije bila značajnija te je glavina octene proizvedena bliže početku nego kraju eksperimenta što je u suprotnosti sa literaturnim navodima. Prisutnost manitola u podlozi ukazuje na to da su u jednom trenu postojali uvjeti za aktivnost mikroorganizama odgovornih za njegovu sintezu, kao npr. *Leuconostoc citreum* (Gulitz i sur., 2011). Bitno je istaknuti da je tokom ovog istraživanja ostvaren najveći prirast suhe tvari kefirnih zrnaca u odnosu na početnu vrijednost (Slika 8.).



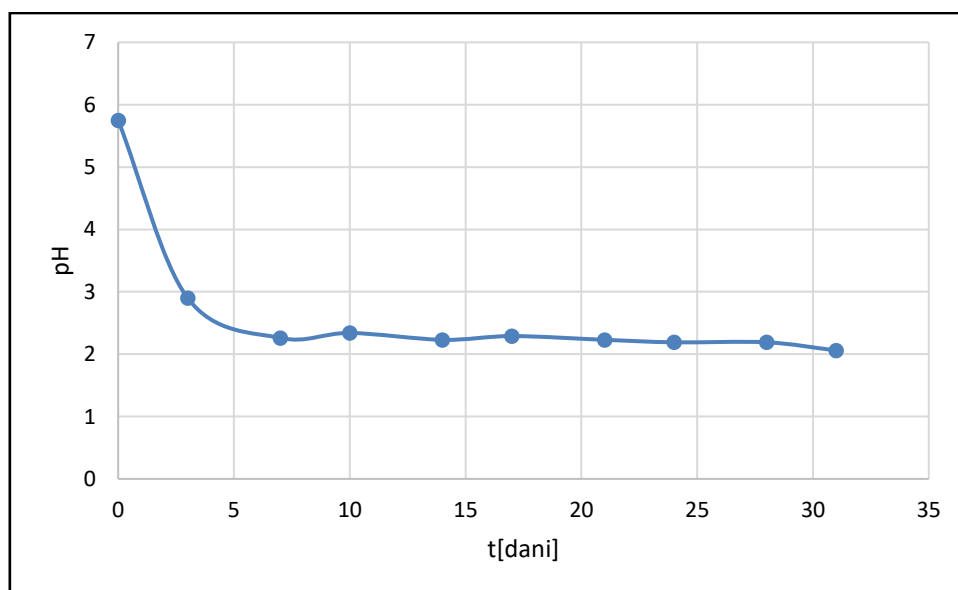
Slika 8. Promjena udjela suhe tvari kefirnih zrnaca tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih datulja

4.2. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUHIH GROŽĐICA

U ovom poglavlju će biti prikazani rezultati istraživanja proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih grožđica. Rezultati su prikazani na Slikama 9.-12.

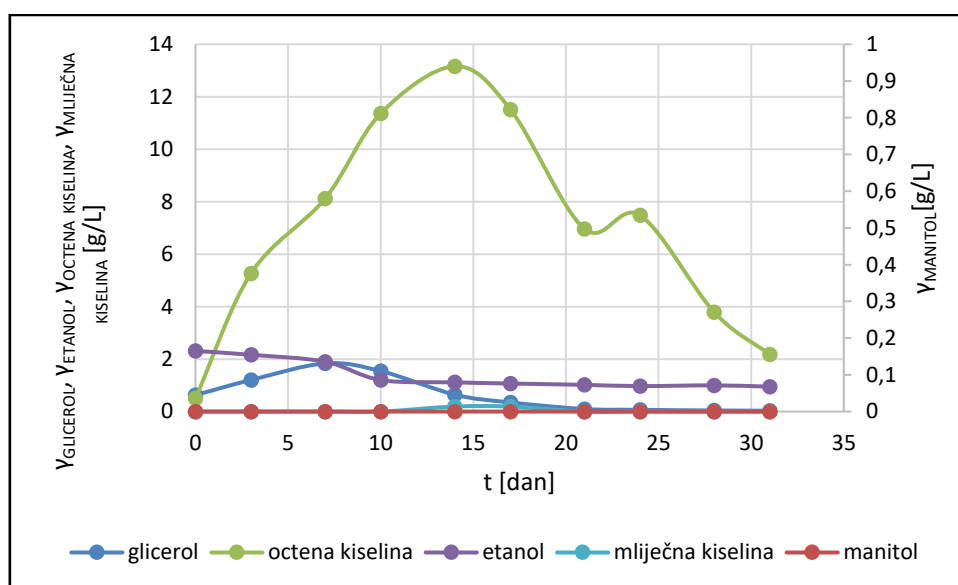


Slika 9. Promjena koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih grožđica



Slika 10. Promjena pH vrijednosti podloge tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih grožđica

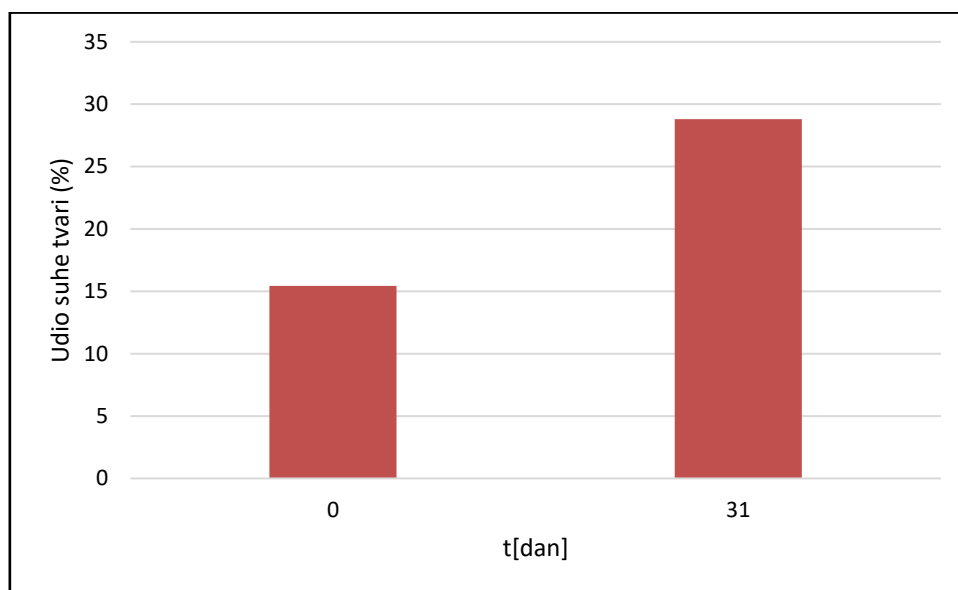
Na Slici 9. prikazana je potrošnja supstrata u hranjivoj podlozi uz dodatak suhih grožđica, a na Slici 10. promjena pH podloge. Kao i u prethodnom slučaju, i ovdje je vidljiva brz pad koncentracije saharoze s jedne, te značajnije povećanje koncentracija fruktoze i glukoze s druge strane. Također, u prvih nekoliko dana, pH podloge je bio u rasponu koji je bio povoljan za aktivnost kvasca *S. cerevisiae* tako da je ovakav rezultat najvjerojatnije posljedica njegove aktivnosti. Ovdje je bitno za naglasiti i da je početni pH bio niži nego kod eksperimenta sa datu-ljama ($pH_{\text{poč}} 6,31$), ali u konačnici poprimio je sličnu vrijednost prema kraju fermentacije. Inicijalno su zabilježene niske koncentracije etanola i glicerola, kao i u prethodnom eksperimentu, te se njihova koncentracija do kraja istraživanja nije značajnije mijenjala.



Slika 11. Promjena koncentracije produkata tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih grožđica

Snižavanjem pH vrijednosti podloge mikroba aktivnost nije iščeznula u potpunosti što je vidljivo na Slici 11. Porast koncentracije octene kiseline vidljiv je sve do 14. dana uzgoja, nakon čega je zabilježen trend smanjenja. Kao i u prethodnom slučaju za ovakve rezultate najvjerojatnije su zaslužni kvasac *D. bruxellensis* i BMK *L. hilgardii*. Nakon 10. dana uzgoja, zabilježena je i niska koncentracija mliječne kiseline čija se koncentracija nije značajnije mijenjala do kraja eksperimenta. Zanimljivo je za istaknuti činjenicu da je tokom ovog eksperimenta zabilježena „brza fermentacija“ te „siromašan sastav“ podloge u smislu nastanka različitih produkata. Ovakav ishod najčešće je karakteristika podloga sa niskom koncentracijom nutrijenata u podlozi. Ovakav rezultat dovodi do zaključka da, iako je u podlogu dodano sušeno voće,

očigledno nutrijenti prisutni u njemu nisu optimalni za rast i proizvodnju svih prisutnih mikroorganizama.

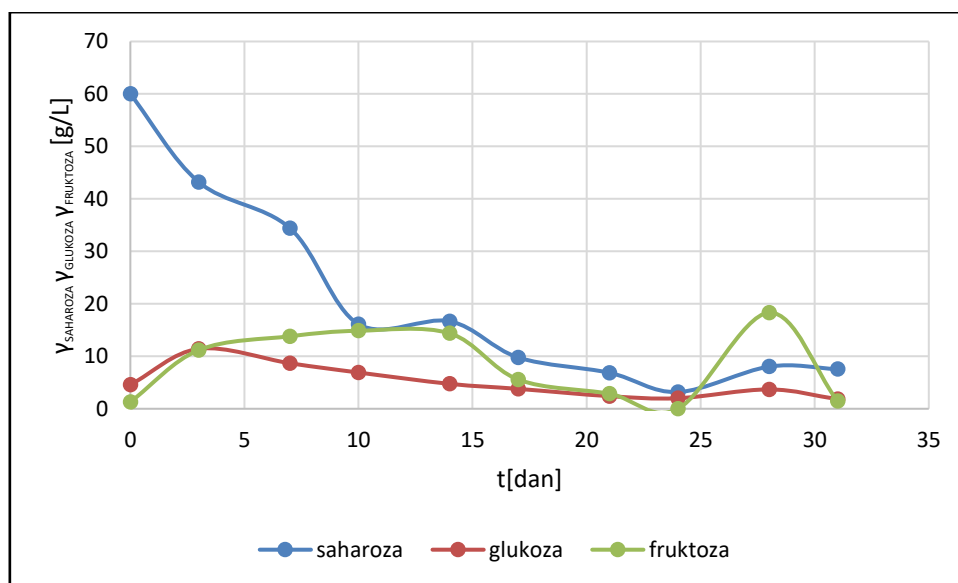


Slika 12. Promjena udjela suhe tvari kefirnih zrnaca tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih groždica

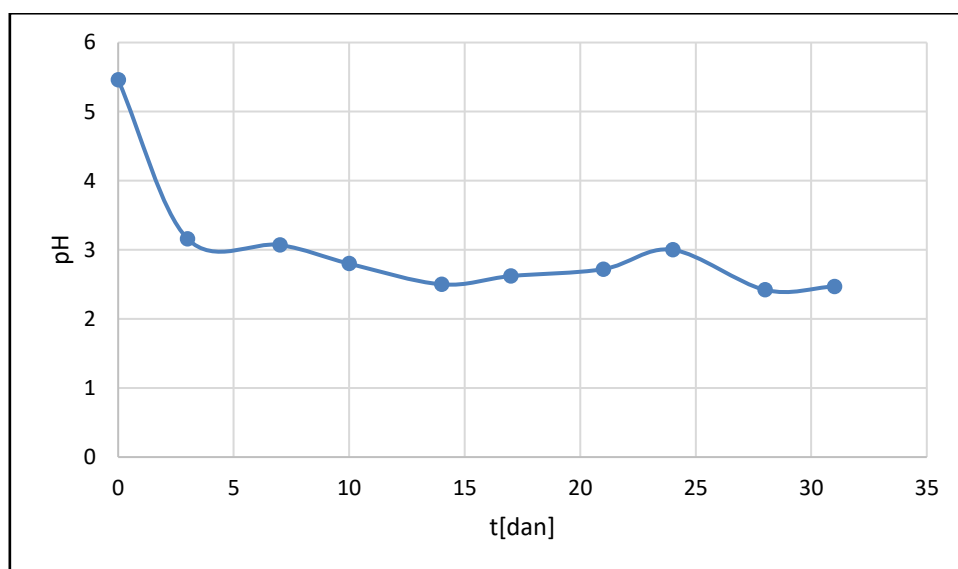
No, unatoč ovom rezultatu, i ovdje je zabilježeno gotovo udvostručeno povećanje suhe tvari zrnaca (Slika 12.), u odnosu na početnu vrijednost, što može dovesti do zaključka da su postignuti uvjeti pogodovali mikroorganizmima odgovornim za njihovu proizvodnju ili da je moguće došlo do prividnog povećanja suhe tvari zbog djelića voća koji se nisu mogli u potpunosti izdvojiti iz prevrele podloge na kraju bioprocesa. U ovom istraživanju proizvodnja manitola nije bila zabilježena.

4.3. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUHIH ŠLJIVA

U ovom poglavlju će biti prikazani rezultati istraživanja proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih šljiva. Rezultati su prikazani na Slikama 13.-16.

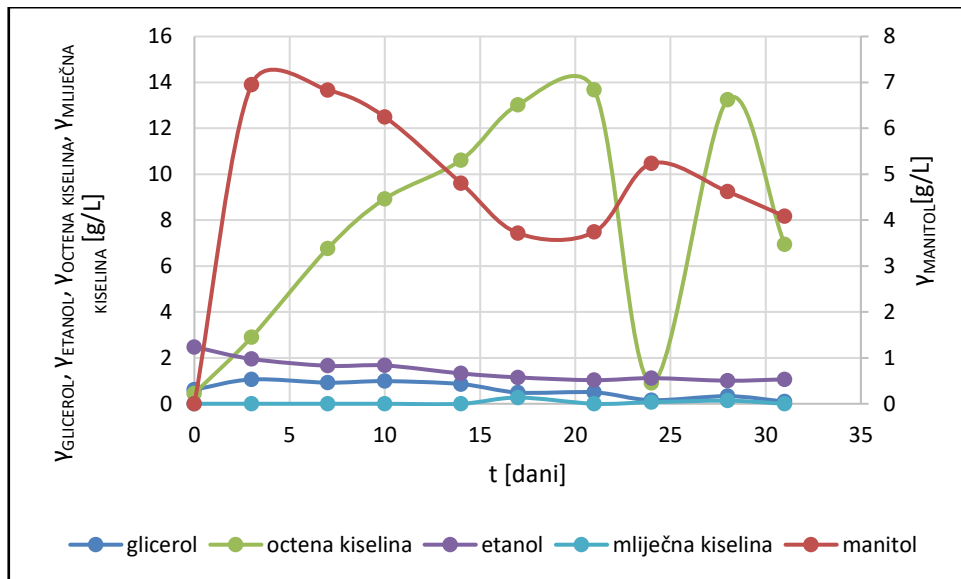


Slika 13. Promjena koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih šljiva

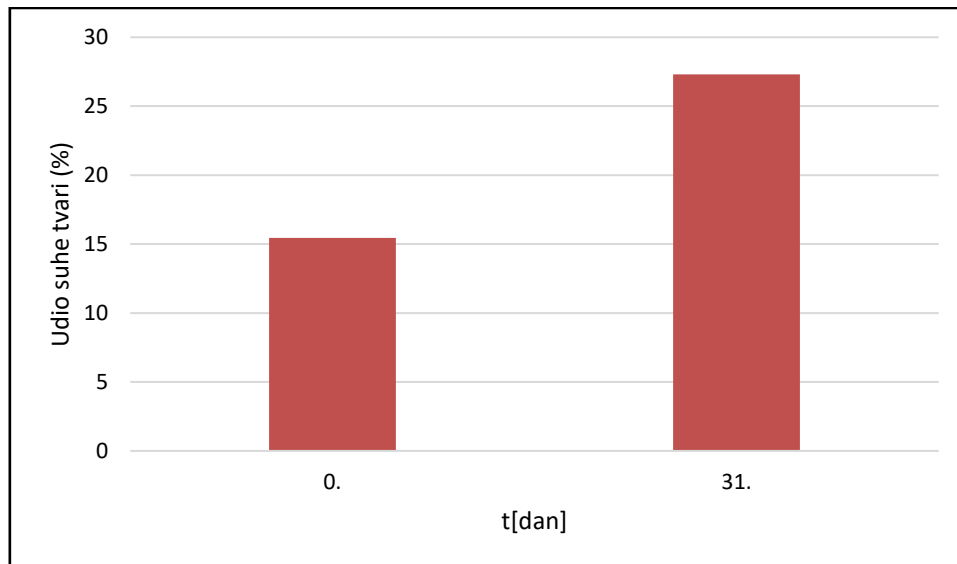


Slika 14. Promjena pH vrijednosti podloge tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhih šljiva

Na Slici 13. prikazana je promjena koncentracije saharoze, glukoze i fruktoze kao glavnih produkata hidrolize invertazom. U usporedbi sa ostalim eksperimentima gdje je dodano drugo suho voće, u ovom slučaju uočena je sporija hidroliza saharoze i njen najveći utrošak ako promatramo sva tri slučaja. Sporija fermentacija je najvjerojatnije posljedica dovoljne količine nutrijenata koji su neophodni za normalan rast i proizvodnju produkata prisutnih mikroorganizama u kefirnim zrnima. (Laureys i sur., 2018). I u ovom eksperimentu zabilježene su niske koncentracije glukoze i fruktoze kao i u prethodnom istraživanju (suhe datulje i suhe grožđice) koje najvjerojatnije potječu iz dodanog sušenog voća. Ukupno promatrano, u eksperimentu sa šljivama ostvaren je najveći utrošak saharoze te je zabilježeno sporije snižavanje pH podloge (Slika 14).



Slika 15. Promjena koncentracije produkata tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhих šljiva



Slika 16. Promjena udjela suhe tvari kefirnih zrnaca tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak suhих šljiva

Iako je ostvaren najveći utrošak supstrata, koncentracija glavnih produkata je bila u rasponu kao i u ostalim eksperimentima. U manjoj mjeri je došlo do sinteze produkata kao što su etanol i glicerol, dok je s druge strane uočena povećana proizvodnja octene kiseline, mliječne kiseline i manitola (Slika 15). Ova činjenica je najvjerojatnije posljedica povećane aktivnosti bakterija kojima su uvjeti u podlozi više odgovarali u odnosu na prisutne kvasce. Udio suhe tvari u odnosu na početnu vrijednost porastao je za 11,87% (sa početnih 15,5%) prikazano na Slici 16. Iako je kod sva tri eksperimenta sa dodatkom različitog sušenog voća zabilježen porast udjela suhe tvari može se zaključiti da su u sva tri slučaja uvjeti u podlozi bili povoljni za sintezu polimera koji je u najvećoj mjeri pridonio povećanju porasta udjela suhe tvari. Naime, dokazano je da postoje brojni faktori koji utječu na proizvodnju kefirna te da je jedan od bitnijih faktora omjer C/N u podlozi; što je taj omjer manji to je njegova sinteza veća. Također, dokazano je da broj prisutnih mikroorganizama nije od presudne važnosti te je moguća povećana proizvodnja iako je broj stanica nizak (Dailin i sur., 2016). U 32 dana, koliko su ukupno trajali eksperimenti, najveći utrošak supstrata zabilježen je u slučaju kada su u hranjivu podlogu dodane suhe šljive (Tablica 3.). Također, u tom slučaju je ostvaren i najveći prinos manitola. Što se tiče ostalih produkata, njihova prisutnost je zabilježena u početku bioprocasa što je najvjerojatnije posljedica inokulacije svježe hranjive podloge pa je dio ovih spojeva prenesen iz tikvice za inokulum. Prinosi pojedinih spojeva u tablici su izraženi kao 0, međutim to ne znači da nisu bili prisutni u podlozi, već da je njihova konačna koncentracija u odnosu na

početnu vrijednost bila snižena.

Tablica 3. Prikaz pokazatelja uspješnosti eksperimenata s dodatkom sušenog voća

PARAMETAR/VRSTA SUŠENOG VOĆA	DATULJE	GROŽĐICE	ŠLJIVE
ΔS [g/L]	48,01	47,10	52,45
Y_{ETOH} [g]	0	0	0
$Y_{\text{CH}_3\text{COOH}}$ [g]	10,86	1,66	6,49
Y_{MANITOL} [g]	0	0	4,08
Y_{GLICEROL} [g]	0	0	0
$Y_{\text{MLIJEČNA KISL/S}}$ [g/g]	0	0	0
$Y_{\text{ETOH/S}}$ [g/g]	0	0	0
$Y_{\text{CH}_3\text{COOH/S}}$ [g/g]	0,23	0,04	0,12
$Y_{\text{MANITOL/S}}$ [g/g]	0	0	0,08
$Y_{\text{GLICEROL/S}}$ [g/g]	0	0	0
$Y_{\text{MLIJEČNA KIS/S}}$ [g/g]	0	0	0

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem može se zaključiti slijedeće:

1. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak grožđica rezultirala je najmanjom količinom utrošenog supstrata po završetku eksperimenta dok je porast suhe tvari bio najveći s obzirom na početnu vrijednost, a iznosio je 17,17%
2. Dodatak datulja u vodenu otopinu saharoze na početku bioprocasa, imao je za rezultat sličan ishod fermentacije kao i eksperiment sa suhim grožđicama.
3. U slučaju kada su u podlogu dodane suhe šljive, zabilježena je najveća potrošnja supstrata ($\Delta S=52,45 \text{ g/L}$), pri čemu je ostvarena najniža promjena udjela suhe tvari ($\Delta s.tv.=11,87\%$). Manitol kao produkt aktivnosti bakterija mliječno-kiselog vrenja bio je prisutan u podlozi za cijelo vrijeme trajanja fermentacije.
4. Na temelju ostvarenih rezultata može se zaključiti da se datulje, grožđice i suhe šljive mogu koristiti u biotehnološkoj proizvodnji kefirnog napitka, s time da različiti nutrijenti prisutni u suhom voću utječu na različite udjele produkata u konačnom proizvodu (etanol, octena kiselina, glicerol, mliječna kiselina, manitol).

POPIS LITERATURE

1. Anonymous 1 <<https://revolutionfermentation.com/en/blogs/water-kefir/are-my-water-kefir-grains-sick-faq/>> Pristupljeno 19. kolovoza 2022.
2. Anonymous 2 <<https://brainstudy.info/images/what-bacteria-is-used-in-fermentation>> Pristupljeno 23. kolovoza 2022.
3. Axelsson L (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. U: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A (ured.) Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects, Marcel Dekker, NY, USA, str. 1-66.
4. Ballongue J (2004) Bifidobacteria and probiotic action. U: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A (ured.) Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects, Marcel Dekker, NY, USA, str. 67-124
5. Guerzoni ME, Serrazanetti DI, Vernocchi P, Gianotti A (2013) Physiology and biochemistry of sourdough yeasts. U: Gobbetti M, Gänzle M (ured.) Handbook on Sourdough Biotechnology, Springer, Boston, MA, USA, str. 155-181.
6. Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmann MA, Vogel RF (2011) The microbial diversity of water kefir. *Int J Food Microbiol* 151, 284-288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>
7. Gulitz, A., Stadie, J., Ehrmann, M. A., Ludwig, W., & Vogel, R. F. (2013). Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1082–1091. <https://doi.org/10.1111/jam.12124>
8. Gullo M, Verzelloni E, Canonico M (2014) Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochem* **49**, 1571-1579. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.003>

9. Guzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, Ç., & Greene, A. K. (2021). A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>
10. Horisberger, M. (1969). Structure of the dextran of the Tibi grain. *Carbohydrate Research*, 10(3), 379–385. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80897-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80897-6)
11. Jelačić Nives, Optimiranje uvjeta proizvodnje kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
12. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.007>
13. Laureys D, De Vuyst L (2014) Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl Environ Microbiol* 80, 2564-2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>
14. Laureys D, De Vuyst L (2017) The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *J Appl Microbiol* 122, 719-732. <https://doi.org/10.1111/jam.13370>
15. Leroi F, Pidoux M, (1993) Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *J Appl Bacteriol* 74, 48–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02995.x>
16. Leung TLF, Poulin R (2008) Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu* 58(2), 107.

17. Lynch KM, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK (2021) An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *Int J Food Microbiol* 345. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>
18. Lynch K M, Zannini E, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK (2019) Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18, 587.-625. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12440>
19. Kršev Lj, Malija M (1993) Probiotsko djelovanje Bifidobacterium vrsta. *Mljekarstvo* 43(2): 123-132.
20. Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD (2013) Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiol. Lett.* 348(1), 79-85. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12248>
21. Matsushita K, Matsutani M (2016) Distribution, evolution, and physiology of oxidative fermentation. U: Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N, Okamoto-Kainuma A (ured.), *Acetic acid bact.: Ecol and phys* (pp. 159–187). Tokyo, Japan: Springer Nature.
22. 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. <https://doi.org/10.1007/BF00406153>
23. Nejedly Petra, Utjecaj vrijednosti podloge na proizvodnju kefirnog napitka u bioreaktoru s miješalom (završni rad), *Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.*
24. Pidoux M, Brillouet JM, Quéméner B (1988) Characterization of the polysaccharides from *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnol Lett* 10(6), 415-420.

25. 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.
26. Pogačić T, Šinko S, Zamberlin Š, Samaržija D (2013) Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo* 63(1), 3-14. <https://hrcak.srce.hr/file/144662>
27. Randazzo W, Corona O, Guarcello R, Francesca N, Germanà MA, Erten, H, Settanni L (2016) Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiol*, 54, 40– 51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.018>
28. Raspor P, Goranovič D (2008) Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 28, 101-124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>
29. Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. do C. G. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(01), 82–96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
30. Shafiq K, Ali S, Ul-Haq I (2003) Time course study for yeast invertase production by submerged fermentation. *Int J Biol Stud* 3, 984-988. <https://doi.org/10.3923/jbs.2003.984.988>
31. Stadie J (2013) Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir. Doctoral dissertation, Technische Universität München, München
32. Stadie J, Gulitz A, Ehrmann MA, Vogel RF (2013) Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiol* 35(2): 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.009>
33. Vrancken G, Rimaux T, De Vuyst L, Mozzi F (2010) Low-calorie sugars produced by lactic acid bacteria. U: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM (ured.) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, 193–209.

<https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch11>

34. Waldherr FW, Doll VM, Meißner D, Vogel RF (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, 672-678.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.013>
35. Ward HM, (1892) V. the ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution to the study of fermentation-yeasts and bacteria. *Philos Trans R Soc London (B.)* 125–197
36. Xu D, Bechtner J, Behr J, Eisenbach L, Geißler AJ, Vogel RF (2019) Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. *Int J Food Microbiol* 290, 141-149.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.004>

6. PRILOZI

6.1. BAŽDARNI PRAVCI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA UPLC ANALIZOM

Prilog 1. Jednadžbe baždarnih pravaca pomoću kojih su određene koncentracije supstrata i produkata UPLC analizom

SPOJ	RETENCIJSKO VRIJEME t_R (min)	JEDNADŽBA BAŽDARNOG PRAVCA	R^2 (-)
SAHAROZA	4,248	$A = 135868\gamma_{\text{saharoza}} + 30686$ 0,9984	0,9984
GLUKOZA	4,98	$A = 143593\gamma_{\text{glukoza}} - 2189,5$	0,9998
FRUKTOZA	5,458	$A = 127449\gamma_{\text{fruktoza}} + 1301,4$	0,9999
ETANOL	10,44	$A = 53836\gamma_{\text{etanol}} - 15864$	0,9969
OCTENA KISELINA	8,167	$A = 68165\gamma_{\text{octena kiselina}} - 2182,8$	0,9983
MANITOL	5,766	$A = 161699\gamma_{\text{manitol}} + 25269$	0,9998
GLICEROL	6,984	$A = 105559\gamma_{\text{glicerol}} - 297,02$	1,0000
MLIJEČNA KISELINA	7,138	$A = 155475 \gamma_{\text{mliječna kiselina}} - 1042,7$	0,9999

A = površina

Izjava o izvornosti

Ja Marija Antunović izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis