

# Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak sušene papaje, brusnice i marelice

---

**Akalović, Petra**

**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:159:380630>

*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  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Petra Akalović  
7920/BT**

**PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK  
SUŠENE PAPAJE, BRUSNICE I MARELICE**

**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 sušene papaje, brusnice i marelice**

**Petra Akalović, 7920/BT**

## Sažetak:

Kefirni napitak je fermentirano piće dobiveno fermentacijom otopine saharoze s pomoću združene mikrobne kulture kefirnih zrnaca, uz mogućnost dodatka sušenog voća. Najzastupljeniji mikroorganizmi koji se pretežno nalaze na kefirnim zrnima (kefiran) su bakterije mliječne kiseline, kvasci te bakterije octene kiseline. Kefirna zrnca korištena za ovaj rad iz kućnog su uzgoja te im nije poznat točan mikrobiološki sastav. Dodatak sušenog voća u hranjivu podlogu predstavlja dodatni izvor nutrijenata, uglavnom ugljika i dušika, što pospješuje rast i aktivnost prisutnih mikroorganizama. U ovom završnom radu proučavan je utjecaj dodatka tri različite vrste sušenog voća (papaje, brusnice i marelice) na tijek proizvodnje kefirnog napitka. Rezultati ovog istraživanja pokazuju najveći porast udjela suhe tvari u odnosu na početnu vrijednost u slučaju kada je u podlogu dodana sušena papaja, dok su najveći prinosi produkata kao što su etanol, manitol i octena kiselina ostvareni uz dodatak sušene marelice gdje je i supstrat (saharoz) utrošen do kraja. Na temelju ovog istraživanja može se zaključiti da sve tri vrste sušenog voća imaju pozitivan efekt na proizvodnju i pokazatelje uspješnosti proizvodnje kefirnog napitka.

**Ključne riječi:** kefirni napitak, sušeno voće, kefirna zrnca, papaja, marelica, brusnica

**Rad sadrži:** 34 stranice, 15 slika, 4 tablice, 43 literaturna navoda, 1 prilog

**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:** 07. lipnja 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 papaya, cranberries and apricots**

**Petra Akalović, 7920/BT**

### **Abstract:**

Kefir drink is a fermented drink obtained by fermenting a sucrose solution by using a combined microbial culture of kefir grains, with the possibility of the addition of dried fruits. The most abundant microorganisms predominantly found on kefir grains (kefiran) are lactic acid bacteria, yeasts and acetic acid bacteria. The kefir grains used in this work are from domestic cultivation and their exact microbiological composition is unknown. The addition of dried fruits to the nutrient media is an additional source of nutrients, mainly carbon and nitrogen, which promotes the growth and activity of the present microorganisms. In this paper, the influence of addition of three different types of dried fruits (papaya, cranberry and apricot) on the course of water kefir production. The results of this study show the largest increase in the portion of dry matter in comparison to the initial value in the case when dried papaya was added to the media, while the highest yields of products such as ethanol, mannitol and acetic acid were obtained with the addition of dried apricot where the substrate (sucrose) was totally consumed. Based on this research, it can be concluded that all three types of dried fruits have a positive effect on the production and bioprocess efficiency parameters of kefir drink production.

**Keywords:** kefir drink, dried fruits, kefir grains, papaya, apricot, cranberry

**Thesis contains:** 34 pages, 15 figures, 4 tables, 43 references, 1 supplements

**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, assist prof.

**Thesis defended:** July 7<sup>th</sup> 2022

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. PROIZVODNJA VODENOG KEFIRNOG NAPITKA .....	2
2.2. MIKROBNI SASTAV ZRNACA VODENOG KEFIRA .....	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. MEĐUSOBNI ODNOSI MIKROORGANIZAMA PRISUTNIH U KEFIRNIM ZRNCIMA .....	9
2.4. USPOREDBA KEFIRNOG NAPITKA I MLIJEČNOG KEFIRA.....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>12</b>
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. RADNI MIKROORGANIZMI .....	12
3.1.2. KEMIKALIJE.....	12
3.1.3. HRANJIVE PODLOGE .....	13
3.1.4. APARATURA I PRIBOR .....	13
3.1.4.1. UREĐAJ ZA TEKUĆINSKU KROMATOGRAFIJU ULTRA-VISOKE DJELOTVORNOSTI (UPLC).....	13
3.1.4.2. OSTALA APARATURA .....	13
3.2. METODE RADA .....	14
3.2.1. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE ZA ODRŽAVANJE KULTURE KEFIRNIH ZRNACA.....	14

3.2.2.	PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA ZA PROIZVODNJU KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK VOĆA	14
3.3.	ANALITIČKE METODE .....	15
3.3.1.	PRIPREMA UZORKA ZA UPLC ANALIZU.....	15
3.3.2.	ODREĐIVANJE UDJELA SUHE TVARI BIOMASE KEFIRNIH ZRNACA.....	15
3.4.	ODREĐIVANJE POKAZATELJA USPJEŠNOSTI .....	16
3.4.1.	POTROŠNJA SUPSTRATA ( $\Delta S$ ) .....	16
3.4.2.	PRINOS PRODUKTA ( $Y_P$ ).....	16
3.4.3.	KOEFICIJENT KONVERZIJE SUPSTRATA U PRODUKT ( $Y_{P/S}$ ) .....	17
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>18</b>
4.1.	PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUŠENE PAPAJE.....	18
4.2.	PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUŠENIH BRUSNICA ...	22
4.3.	PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUŠENIH MARELICA...	26
<b>6.</b>	<b>POPIS LITERATURE .....</b>	<b>30</b>
7.	PRILOZI.....	1
7.1.	BAŽDARNI PRAVCI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA UPLC ANALIZOM .....	1

## 1. UVOD

Kefirni napitak je blago kiselkast alkoholni fermentirani napitak, proizveden fermentacijom otopine saharoze, s mogućim dodatkom svježeg ili sušenog voća, uz pomoć združene kulture mikroorganizama prisutnih u zrnima kefirnog napitka (Lynch i sur., 2021; Stadie i sur., 2013). Ovaj napitak konzumira se diljem svijeta, a najviše u Južnoj Americi, Istočnoj Europi i Rusiji (Lynch i sur., 2021). Najčešće se proizvodi u domaćinstvima te do danas nije razvijena značajnija industrijska proizvodnja kao ni definirana starter kultura kefirnih zrnaca (Lynch i sur., 2021).

Podrijetlo zrnaca vodenog kefira, kao i samog napitka, nije poznato. Prvi znanstveni opis zrnaca predstavio je Ward (1892) u kojem im je dao naziv „biljke đumbirovog piva“ (engl. *Gingerbeer plants*) te navodi da su donesena iz Krimskog rata od strane britanskih vojnika. Zatim ih Lutz (1899) opisuje kao „Tibi zrnca“ meksičkog podrijetla i povezuje ih sa kaktusima roda *Opuntia* sa čijih listova su skinuta. Nadalje, Kebler (1921) je prikupio niz naziva za zrnca koja se i danas koriste poput „kalifornijske pčele“, „afričke pčele“, „ale orasi“, „japanske pivske sjemenke“ (Waldherr i sur., 2010).

Današnja popularnost kefirnog napitka raste iz nekoliko razloga od kojih se ističu brzi razvoj novih trendova u prehrani, mogućnost proizvodnje napitka kod kuće te brojni pozitivni učinci fermentiranog kefirnog napitka na zdravlje potrošača kao što su antioksidativno, antibakterijsko i protuupalno djelovanje (Lynch i sur., 2021; Lynch i sur., 2019; Grishina i sur., 2011). Iz ovih razloga javlja se potreba za boljim razumijevanjem aktivnosti mikroorganizama unutar zrnaca te za razvojem kontroliranog procesa proizvodnje (Lynch i sur., 2021).

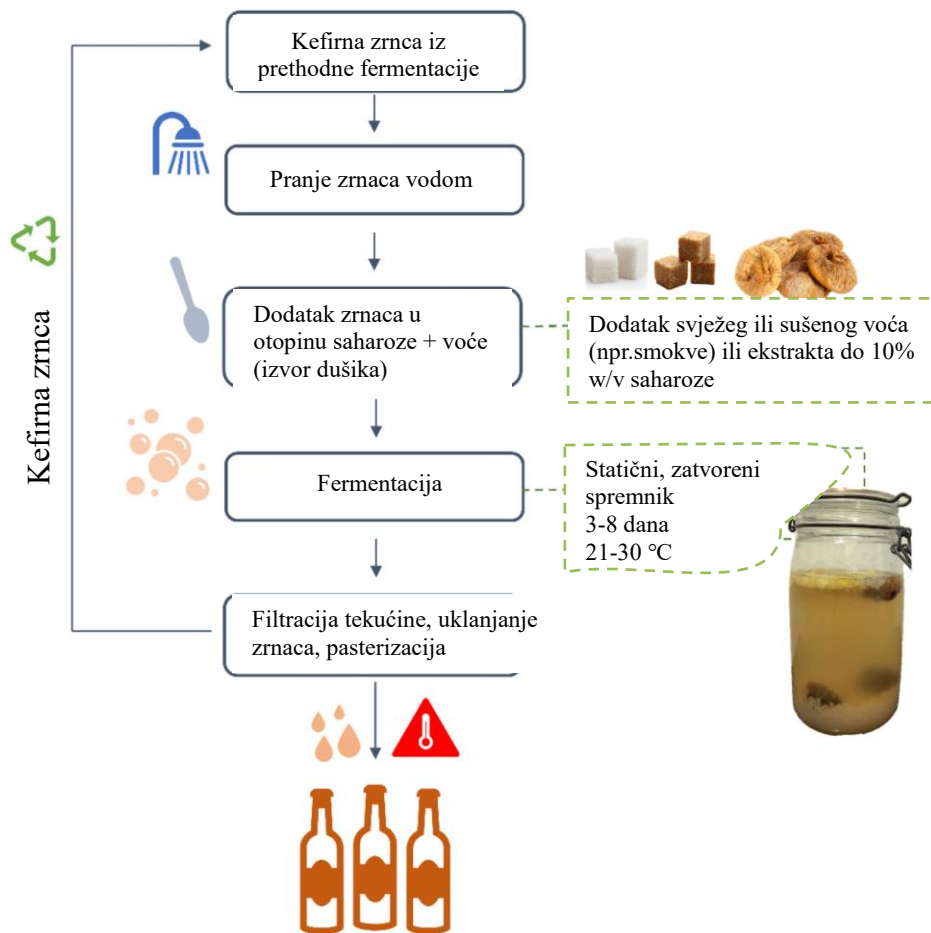
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PROIZVODNJA VODENOG KEFIRNOG NAPITKA

Kefirni napitak je fermentirano piće koje se dobiva inokulacijom vodene otopine saharoze, koja može sadržavati razno sušeno voće ili druge sastojke poput limuna, sa kefirnim zrnima (Laureys i De Vuyst, 2014). Otopina fermentira 2-4 dana na sobnoj temperaturi u anaerobnim uvjetima nakon čega se kefirna zrnca odvajaju od supernatanta, ispiru i koriste kao inokulum za novu fermentaciju. Kefirni napitak je blago sladak, kiselkast, te može sadržavati male količine etanola i octene kiseline (Moinas, 1980; Laureys i De Vuyst, 2014). Ukoliko se koristi sušeno voće, poželjno je provesti i postupak pasterizacije kefirnog napitka zbog mogućih nepoželjnih patogena koji se mogu naći na površini voća poput *Enterobacteriaceae* i/ili *Pseudomonas* (Randazzo, 2016). Tradicionalni postupak proizvodnje kefirnog napitka prikazan je na Slici 1.

Kao što je već prethodno navedeno, saharoza je glavni izvor ugljika, a dodano sušeno voće (npr. smokve) ili voćni ekstrakti služe kao dodatni izvor dušika (Lynch i sur., 2021). Do danas su istraženi i raznih drugih izvori ugljika i/ili dušika kao što su razno povrće (mrkva, soja, celer), voće (kokos, jagode, grožđe), melase (šećerna trska) (Fiorda i sur., 2017), a kao najbolji supstrat pokazale su se sušene smokve (Reiß, 1990).





Slika 1. Postupak proizvodnje tradicionalnog kefirnog napitka (prema Lynch i sur., 2021)

## 2.2. MIKROBNI SASTAV ZRNACA VODENOG KEFIRA

Kefirna zrnca se sastoje od polisaharidnog polimera i združene zajednice mikroorganizama u kojoj prevladavaju bakterije mliječne kiseline i kvasci (Waldherr i sur., 2010). Istraživanja su pokazala da se od bakterija u kefirnim zrcima najčešće pronalaze sojevi iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Acetobacter*, a od kvasaca su najčešći predstavnici rodova *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Zygorulaspora* i *Candida* (Marsh i sur., 2013). Vrijednosti koncentracija bakterija u zrcima kreću se u rasponu  $10^6$ - $10^8$  stanica/g, a kvasaca  $10^6$ - $10^7$  stanica/g (Gulitz, 2011). Budući da kompleksnu mikrobnu zajednicu u zrcima čini više od 50 različitih vrsta bakterija i kvasaca te zbog nepoznatog podrijetla zrnaca općenito,

mikrobni sastav i udio pojedinih vrsta u zrnima značajno ovisi o regiji iz koje potječu kao i o načinu i uvjetima kultivacije (Pogačić i sur., 2013). Tek nedavno je u zrnima otkrivena i vrsta *Bifidobacterium psychraerophilum/crudilactis* (Gulitz i sur., 2013).

Glavnina prisutnih mikroorganizama nalazi se upravo na samim kefirnim zrnima koja su izgrađena od polisaharida dekstrana čija sinteza se pripisuje bakterijskim vrstama iz rodova *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (Pidoux, 1989). Glavni produkti metabolizma mikroorganizama koji nastaju fermentacijom otopine saharoze su etanol, mliječna kiselina, glicerol, octena kiselina i manitol. Osim prethodno navedenih karakterističnih produkata, u kefirnom napitku mogu se pronaći i brojni drugi spojevi zaslužni za aromu kao što su 2-metil-1-propanol, izoamilni alkohol, etil acetat, izoamil acetat, etil heksanoat i etil oktanoat (Laureys i De Vuyst, 2014). Sama zrnca izgledom su prozirna i želatinozna, promjera 5-20 mm te svojim nepravilnim oblikom podsjećaju na cvjetaču (Waldherr i sur., 2010).

### 2.2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su Gram-pozitivne, nesporogene bakterije uglavnom kuglastog ili štapićastog oblika. BMK se usko povezuju sa proizvodnjom fermentirane hrane te sa normalnom mikroflorom zdravog probavnog sustava ljudi i životinja (Axelsson, 2004). Vrste BMK koje su pronađene u kefirnim zrnima u najvećoj mjeri pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (Gulitz i sur., 2013). U Tablici 1. nalaze se neke od najčešćih BMK pronađenih u kefirnim zrnima.

Prema metabolizmu šećera, BMK se mogu podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne pri čemu različiti putevi razgradnje šećera, rezultiraju i različitim konačnim produktima. Homofermentativne BMK razgrađuju šećer Embden-Meyerhoff-Parnas putem (glikolizom) te kao konačni produkt proizvode laktat, dok heterofermentativne BMK šećer razgrađuju oksidativnim ogrankom puta pentoza fosfata, a kao produkti nastaju ekvimolarne količine laktata, CO<sub>2</sub> te acetata ili etanola. Koliko će nastati acetata i etanola ovisi o oksidacijsko-redukcijskom potencijalu sustava (Axelsson, 2004; Kendler, 1983). Usporedba homolaktične i heterolaktične fermentacije glukoze te metaboličkog puta bifidobakterija tzv. „Bifidus shunt“ o kojem će više riječi biti kasnije, prikazan je na Slici 2.

U sastavu kefirnih zrnaca moguće je pronaći i vrstu *Lactobacillus hilgardii* za koju Pidoux i sur. (1988) te Waldher i sur. (2010) navode kako ima ključnu ulogu u sintezi egzopolisaharidnog matriksa (EPS) te u formiranju i rastu kefirnih zrnaca.

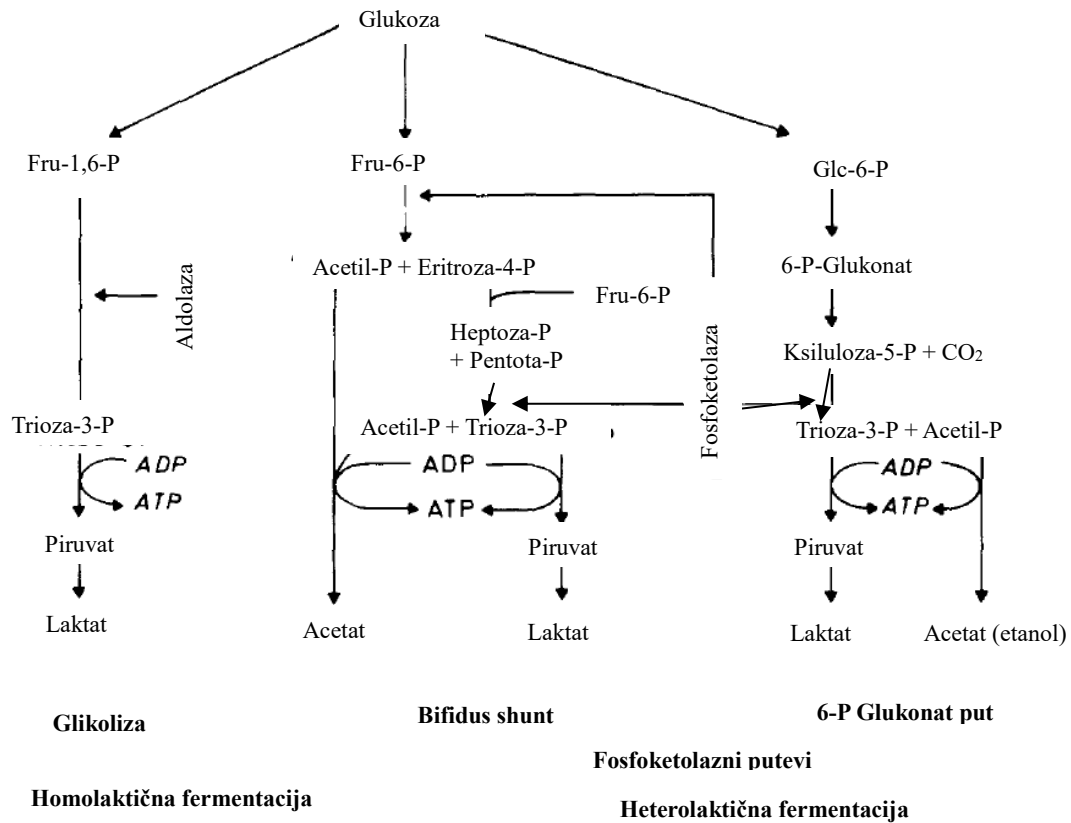
Tablica 1. Najzastupljenije homo- i heterofermentativne BMK pronađene u kefirnim zrcima (Gulitz i sur., 2013; Gulitz i sur., 2011)

<b>Homofermentativne BMK</b>	<b>Heterofermentativne BMK</b>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactococcus citreum</i>
<i>Lactobacillus hordei</i>	<i>Lactococcus mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	

#### 2.2.2. Bifidobakterije

Bifidobakterije (*Bifidobacterium*) su Gram-pozitivne, nesporogene, anaerobne bakterije koje se mogu pojaviti u raznim štapićastim oblicima od kratkih zaobljenih, vijugavih ili oblika slova Y. Od značajne su važnosti za zdravlje gastrointestinalnog trakta ljudi i toplokrvnih životinja pa čak i pčela (Socool i sur., 2010). Jedno vrijeme bile su klasificirane kao bakterije mliječne kiseline zbog činjenice da kao glavni produkt metabolizma proizvode laktat no u kasnijim istraživanjima utvrđene su filogenetske i metaboličke razlike te su izdvojene u zasebnu skupinu (Ballongue, 2004).

Metabolizam ugljikohidrata je različit od metabolizma homo- i heterofermentativnih BMK te se naziva „Bifidus shunt“ i prikazan je na Slici 2. Ovim putem razgradnje šećera kao produkti nastaju acetat i laktat u molarnom omjeru 3:2 (Kendler, 1983).



Slika 2. Shematski prikaz metaboličkih puteva razgradnje šećera kod bakterija mliječne kiseline i bakterija roda *Bifidobacterium* (prema Kendler, 1983)

Udio bifidobakterija u kefirnim zrnima je puno manji od udjela BMK, a među značajnijima se ističu *Bifidobacterium aquikefiri* i *Bifidobacterium tibiigranuli*, a njihova uloga u kefirnim zrnima do danas nije u potpunosti razjašnjena (Xu i sur., 2019). Ove bakterije inače su bitne za održavanje normalne crijevne mikroflore kod zdravih osoba zbog njihove sposobnosti proizvodnje određenih antimikrobnih supstanci čime sprječavaju razvoj patogena. Pokazalo se da mogu pospješiti obnavljanje crijevne mikroflore kod osoba koje su se liječile antibioticima (Malija i Kršev, 1993).

### 2.2.3. Bakterije octene kiseline

Bakterije octene kiseline (BOK) su Gram-negativne, nesporogene i obligatno aerobne. Stanice mogu biti ovalnog ili štapićastog oblika te se mogu pojaviti kao pojedinačne stanice, u paru ili u kratkim lancima (Malimas, 2017). Primarno su bile izolirane iz slatkih, kiselih, ili staništa bogatim alkoholom poput voća i cvijeća te iz fermentirane hrane u kojoj prirodno obitavaju poput octa i piva (Lynch i sur., 2019). BOK pripadaju porodici *Acetobacteraceae* koja je podijeljena na dva roda – *Acetobacter* i *Gluconobacter*. Vrste roda *Acetobacter* preferiraju staništa bogata etanolom, dok vrste roda *Gluconobacter* preferiraju staništa bogata ugljikohidratima (Raspor i Goranović, 2008).

Metabolizam bakterija octene kiseline je vrlo specifičan te se naziva „oksidativna fermentacija“ tijekom koje dolazi do nepotpune oksidacije etanola, ugljikohidrata i alkoholnih šećera do organskih kiselina, aldehida i ketona primarno uz pomoć određenih dehidrogenaza (Matsushita i Matsutani, 2016). BOK iz roda *Acetobacter* proizvode etanol koji zatim djelovanjem membranski vezanih dehidrogenaza prevode u octenu kiselinu. Ukoliko je u podlozi već prisutan etanol, dolazi do represije citratnog ciklusa te se odvija nepotpuna oksidacija octene kiseline a nakon iscrpljivanja etanola iz podloge doći će do oksidacije octene kiseline do CO<sub>2</sub> i vode. Za razliku od vrsta iz roda *Acetobacter*, vrste roda *Gluconobacter* ne posjeduju enzime citratnog ciklusa te ne mogu u potpunosti razgraditi octenu kiselinu pa energiju dobivaju nepotpunom oksidacijom alkohola ili ugljikohidrata što rezultira nastankom raznih kiselina, npr. glukonske kiselina iz glukoze (Stadie, 2013; Jakob i sur., 2012).

Bakterije octene kiseline imaju važnu primjenu u proizvodnji fermentiranih namirnica poput octa, piva i kefira no povezuje ih se i sa kvarenjem hrane i alkoholnih pića kao što su vino i voćni sokovi (Taban i Saichana, 2017). Nedavno je otkrivena i patogena bakterija octene kiseline, prva otkrivena prema trenutnim istraživanjima. Izolirana je iz limfnih čvorova osobe oboljele od kronične granumatozne bolesti i nazvana je *Granulibacter bethesdensis* (Greenberg i sur., 2006).

U odnosu na BMK, bakterije octene kiseline su manje zastupljene u kefirnim zrnima te njihov udio iznosi 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 koji se svrstavaju u carstvo gljiva. Razmnožavaju se pupanjem, uglavnom su mezofilni organizmi te im je optimalna temperatura za rast oko 28 °C (Kurtzman i sur., 2011). Sposobni su rasti u širokom rasponu pH vrijednosti (pH 4,5 – 7,0), ali većina može rasti i pri vrlo niskim pH vrijednostima (pH 2,5) (Guerzoni i sur., 2013).

Kvasci glikolizom prevode glukozu do piruvata pri čemu dolazi do redukcije  $\text{NAD}^+$  u NADH. U anaerobnim uvjetima NADH se reoksidira alkoholnom fermentacijom tako što se piruvat nastao glikolizom prevodi u acetaldehid koji se zatim reducira u etanol. U slučaju aerobnih uvjeta, piruvat se prvo transportira u mitohondrij, prevodi se u acetil-CoA te se oksidira putem citratnog ciklusa. Reducirani koenzimi NADH i  $\text{FADH}_2$ , nastali glikolizom i citratnim ciklusom, reoksidiraju se u respiratornom lancu te se oslobođena energija koristi za sintezu energije u obliku molekula ATP-a. Citratni ciklus dakle predstavlja katabolički put za dobivanje energije, ali i anabolički put u kojem nastaju intermedijeri potrebni za sintezu aminokiselina i nukleotida odnosno za sintezu tvari arome (Feldmann, 2005).

Najzastupljeniji kvasac u kefirnim zrnima je *Saccharomyces cerevisiae*. Iako ne može transportirati saharozu, koja se koristi u podlozi za proizvodnju kefirnog napitka, u stanicu, uz pomoć enzima invertaze prevodi molekulu saharoze na molekulu glukoze i fruktoze koje može transportirati u stanicu i koristiti kao izvore ugljika (Shafiq i sur., 2003). Također, *S. cerevisiae* je Crabtree pozitivan te u uvjetima visoke koncentracije glukoze može proizvesti etanol čak i u aerobnim uvjetima (Stadie, 2013). Ovaj kvasac od presudne je važnosti za sve ostale mikroorganizme koji inače ne bi mogli koristiti saharozu kao izvor ugljika.

Od ostalih kvasaca bitno je spomenuti i kvasac *Zygorhynchus florentina*. Naime, radi se o osmotolerantnoj vrsti koja može rasti u podlozi sa visokom koncentracijom šećera (do 90 g/L) i sa niskim udjelom aminokiselina što je karakteristika podloge u proizvodnji kefirnog napitka. Iako inače može uzrokovati kvarenje nekih namirnica, u proizvodnji kefirnog napitka je poželjna (Stadie, 2013).

### 2.3. MEĐUSOBNI ODNOSI MIKROORGANIZAMA PRISUTNIH U KEFIRNIM ZRNCIMA

Kefirna zrnca predstavljaju jedinstvenu mikrobnu zajednicu bakterija, kvasaca, a ponekad i filamentoznih plijesni, koje čine kompleksnu simbioitsku zajednicu (Pogačić i sur., 2013). Simbioiza predstavlja suživot različitih vrsta organizama, a u tipove simbioze ubrajaju se mutualizam, komenzalizam i parazitizam (Leung i sur., 2008).

Mutualizam je odnos dva ili više organizama u kojem oba organizma ili svi članovi imaju koristi jedni od drugih. Stadie i sur. (2013) navode da je u eksperimentu kokultivacije s kulturama bakterija *L. hordei* i *L. nagelii* sa kvascima *S. cerevisiae* i *Z. florentina* u omjeru bakterije : kvasci = 0,1 : 1, uočen bolji rast svih navedenih mikroorganizama nego kod kultivacije sa čistim kulturama što jasno pokazuje mutualizam kod ovih vrsta mikroorganizama.

Komenzalizam je simbioitski odnos u kojem jedan organizam ima korist, a drugi nema ni koristi ni štete. U slučaju kefirnih zrnaca ovakav odnos uočava se između kvasaca i bifidobakterija koji proizvode određene vitamine i aminokiseline koje onda ostali mikroorganizmi u zrcima mogu koristiti (Stadie i sur., 2013). Također, kvasac *S. cerevisiae* svojom invertaznom aktivnošću čini glukozu dostupnijom za ostale mikroorganizme.

Parazitizam je odnos kojem jedan organizam ima korist, ali na štetu drugoga. Tako je u kefirnim zrcima uočeno da su rast i proizvodnja laktata od strane *L. hilgardii* značajno poboljšani u prisutnosti kvasca *Z. florentina*, ali je rast kvasca značajno usporen (Leroi i Pidoux, 1993).

## 2.4. USPOREDBA KEFIRNOG NAPITKA I MLIJEČNOG KEFIRA

Pod pojmom „kefir“ u većini slučajeva misli se na mliječni kefir koji se dobiva iz kravljeg mlijeka. Međutim postoji značajna razlika između mliječnog kefira i kefirnog napitka. Osim što se razlikuju po boji i mirisu, razlike svakako postoje i u okusu, ali i konzistenciji. Mliječni kefir je neprozirne, bijele boje, mliječnog kiselkastog mirisa i okusa te je gust. Kefirni napitak s druge strane je proziran, žućkaste boje no može biti i crvenkast ovisno o dodanom voću. Fermentacije oba kefira su uglavnom spontane no razlika je što se za mliječni kefir često koriste definirane komercijalne starter kulture dok kod kefirnog napitka to nije slučaj (Lynch i sur., 2021). Za razliku od kefirnog napitka industrijska proizvodnja mliječnog kefira je široko rasprostranjena. U Tablici 2. prikazane su ostale važne razlike ova dva napitka, a na Slici 3. vidi se usporedba vanjskog izgleda zrnaca mliječnog kefira i kefirnih zrnaca.

Tablica 2. Usporedba kefirnog napitka i mliječnog kefira (prema Lynch i sur., 2021)

<b>KEFIRNI NAPITAK</b>	<b>MLIJEČNI KEFIR</b>
Proizvodi se pomoću kefirnih zrnaca	Proizvodi se pomoću zrnaca mliječnog kefira
Glavni supstrat otopina saharoze sa dodatkom sušenog voća ili voćnog ekstrakta	Glavni supstrat mlijeko goveda npr. kravlje ili kozje mlijeko
Velika raznolikost fermentabilnih supstrata	Mala raznolikost fermentabilnih supstrata
Zrnca su prozirna, sluzava i manje otporna	Zrnca su bijela ili krem boje i otpornija su
Egzopolisaharid zrnaca primarno se sastoji od $\alpha$ - glukana	Egzopolisaharid zrnaca primarno se sastoji od kefirana
Bakterije octene kiseline zastupljenije	Bakterije octene kiseline manje zastupljene
Vrste <i>Saccharomyces</i> kvasaca dominantne	Vrste <i>Saccharomyces</i> kvasaca u manjem udjelu
Vrste <i>Lactococcus</i> bakterija u manjem udjelu	Vrste <i>Lactococcus</i> bakterija dominantne
Vrste <i>Candida</i> kvasaca slabo prisutne	Vrste <i>Candida</i> kvasaca više prisutne
Prigodan za vegane i osobe intolerantne na laktozu	Nije prigodan za vegane i osobe intolerantne na laktozu





Slika 3. Usporedba izgleda zrnaca mliječnog kefira i kefirnih zrnaca (prema Dagtekin i Guzel-Seydim i sur., 2021)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

Za provođenje eksperimentalnog dijela ovog završnog rada, korištena su kefirna zrnca koja su održavana u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu.

##### 3.1.2. Kemikalije

Popis, čistoća i podrijetlo kemikalija korištenih u ovom radu za pripremu otopina i hranjivih podloga prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Čistoća i podrijetlo kemikalija korištenih za pripremu otopina i hranjivih podloga

<b>Kemikalija</b>	<b>Čistoća</b>	<b>Proizvođač</b>
Saharoza	99+%	Liofilchem, Italija
Cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
Sumporna kiselina	za UPLC, 96 %	Merk, Njemačka
Kandirane brusnice		EuroCompany99 d.o.o., Bosna i Hercegovina
Kandirana papaja		EuroCompany99 d.o.o., Bosna i Hercegovina
Sušene marelice		EuroCompany99 d.o.o., Bosna i Hercegovina

### 3.1.3. Hranjive podloge

Kultura kefirnih zrnaca korištena u ovom radu održavala se u Erlenmeyerovoj tikvici u otopini saharoze koncentracije 30 g/L na 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 sadržavao po 10 g određene vrste sušenog voća (papaja, marelica i brusnica). Uzgoj u staklenkama je također proveden pri 25 °C. Korištene podloge tokom ovog istraživanja nisu bile sterilizirane.

### 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, nalitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>, 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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)

- 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 u Erlenmeyer tikvici od 3 L na način da se u 2 L vodovodne vode otopilo 60 g konzumnog šećera. Podloga za održavanje kulture kefirnih zrnaca nije sadržavala dodano voće. Podloga je mijenjana svaka 2-3 dana

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

Podloga za proizvodnju kefirnog napitka uz dodatak sušenog voća pripremljena je na način da je u 4,5 L vodovodne vode otopljeno 270 g saharoze tako da je početna koncentracija šećera iznosila 60 g/L, a koja je potom razdijeljena u 30 staklenki. Svaka staklenka sa 150 mL otopine saharoze zatim je inokulirana sa 10 % (m/V) vlažnih kefirnih zrnaca (15 g). U svaki set od 10 staklenki dodano je po 10 g različitog sušenog voća (papaja, brusnica i marelica) tako da je bilo potrebno odvagati po 100 g sušenog voća za svaki set staklenki. Staklenke su zatim zatvorene poklopcima te stavljene u termostat na temperaturu od 25 °C. Niti podloge, niti voće dodano u staklenke nisu bili prethodno sterilizirani. 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 svake od 3 staklenke sa različitom vrstom dodanog voća te su uzorci pripremljeni za UPLC analizu kojom se određivala koncentracija supstrata i nastalih produkata tokom fermentacije. U Eppendorf plastične kivete od 1,5 mL, u dvije paralele za svaku staklenku (za svako voće), otpipetirano je po 750  $\mu$ L tekućeg dijela hranjive podloge te je u svaku kivetu dodano po 750  $\mu$ L otopine cinkovog sulfata heptahidrata koncentracije 100 g/L. Sadržaj kiveta je homogeniziran te su potom ostavljene 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se iz uzorka istaložili prisutni proteini. Nakon toga je uslijedilo centrifugiranje uzoraka kroz 5 minuta pri 1350 o/min. Po završetku centrifugiranja, iz svake kivete ponovno je izuzeto po 750  $\mu$ L supernatanta u dvije nove kivete te je u svaku ponovno dodano po 750  $\mu$ L demineralizirane vode kako bi se uzorci dodatno razrijedili. Tako pripremljeni uzorci dodatno su profiltrirani kroz filter veličine pora 0,2  $\mu$ m direktno u vijale koje su korištene za za UPLC analizu.

#### 3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari biomase kefirnih zrnaca

Udio suhe tvari kefirnih zrnaca određen je na početku uzgoja, u 20. danu uzgoja te zadnji dan uzgoja. Suha tvar na početku određena je tako da je iz tikvice za održavanje inokuluma odvagano 10 g kefirnih zrnaca. Zrnca su zatim prenesena u osušenu i izvaganu Petrijevu zdjelicu te su stavljena na sušenje do konstantne mase u sušionik na 80 °C. Početni udio suhe tvari određen je u 2 paralele te je kao vrijednost za izračun uzeta srednja vrijednost dva mjerenja. Udio suhe tvari u 20. i zadnjem danu uzgoja određen je na način kao i na početku uzgoja s tim da je u ovom slučaju iz staklenki najprije izuzeto sušeno voće a potom je cjelokupni sadržaj svake od tri staklenke ravnomjerno raspodijeljen u nekoliko plastičnih Eppendorf kiveta od 50 mL. Centrifugiranje uzoraka provedeno je pri 8000 o/min u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je dekantiran, a istaložena kefirna zrnca žlicom su prebačena na prethodno osušene i izvagane staklene Petrijeve zdjelice. Petrijeve zdjelice sa kefirnim zrnacima zatim su stavljene na sušenje do konstantne mase u sušionik na temperaturu

od 80 °C. Masa suhe tvari izračuna se tako da se od mase izvagane Petrijeve zdjelice sa zrcima nakon ustaljenja mase, oduzme masa prazne osušene zdjelice.

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

$m_{s.tv.}$  – masa suhe tvari [g]

$m_1$  – masa prazne osušene Petrijeve zdjelice [g]

$m_2$  – masa Petrijeve zdjelice sa kefirnim zrcima nakon sušenja [g]

### 3.4. ODREĐIVANJE POKAZATELJA USPJEŠNOSTI

Kao pokazatelji uspješnosti bioprocesa, tokom ovog istraživanja, određeni su ukupna potrošnja supstrata, prinos produkta te koeficijent konverzije supstrata u produkt.

#### 3.4.1. Potrošnja supstrata ( $\Delta S$ )

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

$S_0$  – početna koncentracija supstrata [g/L]

$S$  – konačna koncentracija supstrata [g/L]

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

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

$P$  – konačna koncentracija produkta [g/L]

$P_0$  – početna koncentracija produkta [g/L]

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

[4]

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

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

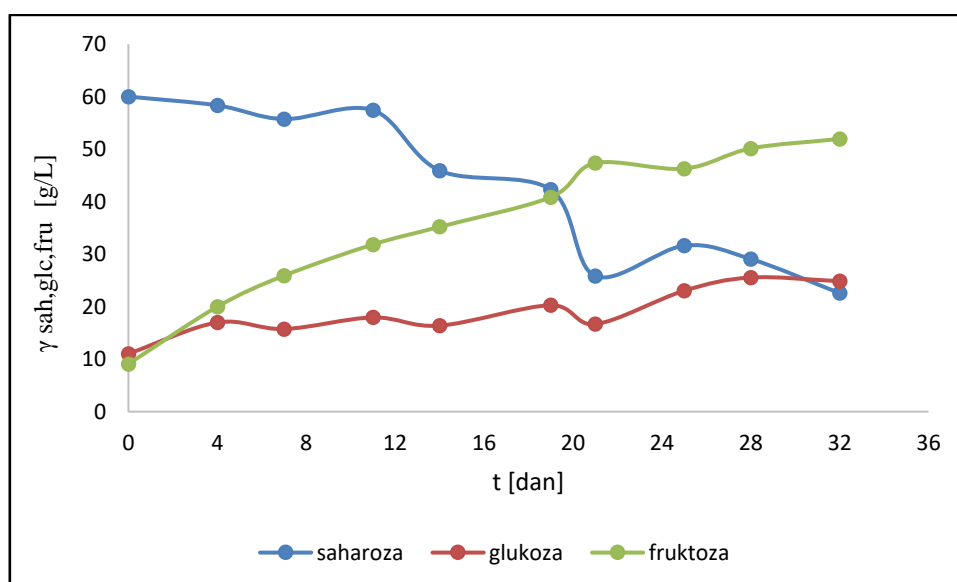
$S, P$  – konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g/L]

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom završnom radu proučavan je utjecaj 3 različite vrste sušenog voća (papaje, brusnice i marelice) kao dodatnog izvora nutrijenata na konačni sastav i promjenu pH kefirnog napitka te promjenu udjela suhe tvari kefirnih zrnca. Istraživanje je provedeno sa 30 staklenki tako da se jedna vrsta voća nalazila u 10 staklenki. Svaka staklenka sadržavala je 150 mL hranjive podloge uz saharozu kao glavni izvor ugljika u koncentraciji od 60 g/L temeljem prethodnih istraživanja (Kurtoić, 2020) te 10 % (m/V) kefirnih zrnaca. Fermentacija se provodila pri temperaturi od 25 °C te su uzorci za UPLC analizu iz seta od 3 staklenke uzimani svaka 3-4 dana. UPLC analizom supernatana određene su koncentracije produkata tijekom proizvodnje kefirnog napitka, pH je mjereno prijenosnim pH/mV-metrom, a udio suhe tvari na 0., 19. i 32. danu uzgoja određen je gravimetrijski.

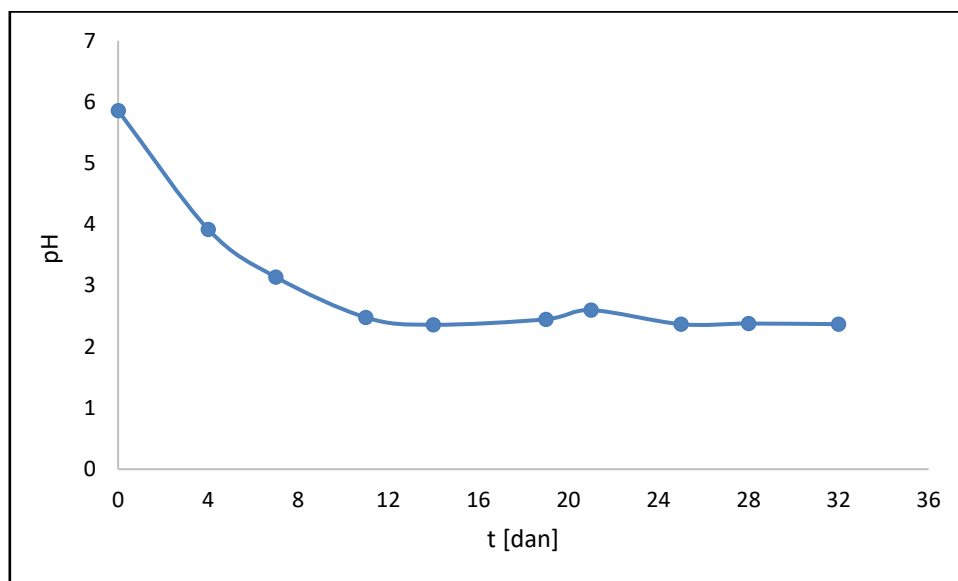
### 4.1. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUŠENE PAPAJE

U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati istraživanja proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušene papaje. Rezultati su prikazani na slikama 4. - 6.



Slika 4. Promjena koncentracije ugljikohidrata tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušene papaje

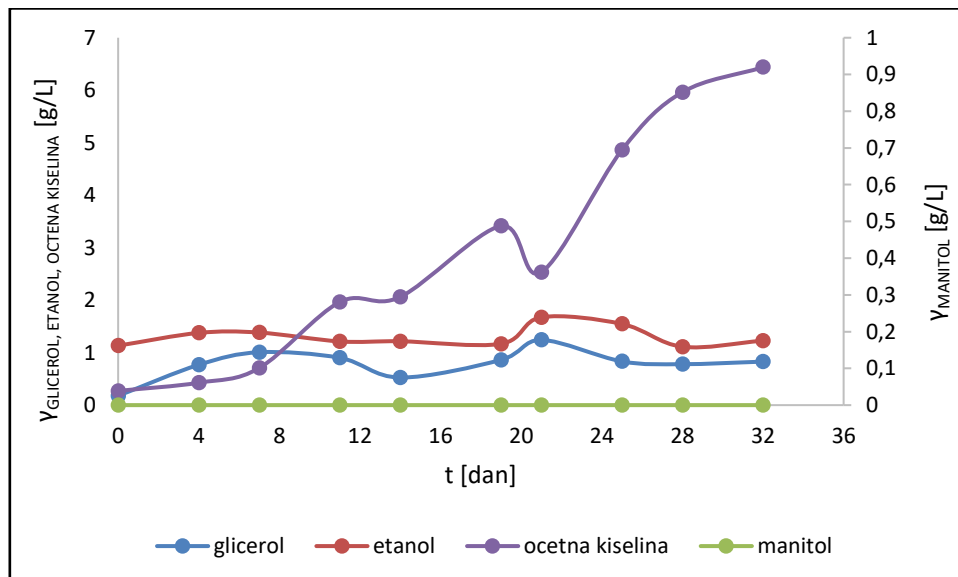




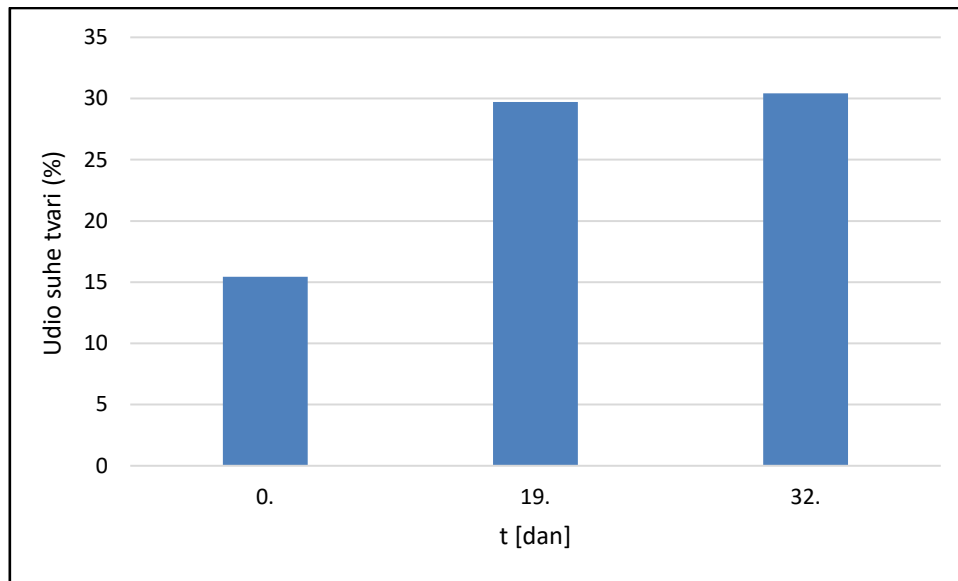
Slika 5. Promjena pH vrijednosti podloge tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušene papaje

Na Slici 4. vidljiv je ravnomjeren trend hidrolize saharoze od samog početka fermentacije pa skoro do kraja uzgoja s malim odstupanjem u 11. i 21. danu (moguća eksperimentalna greška). U prilog tome govori i promjena koncentracija glukoze i fruktoze koji nastaju cijepanjem molekule saharoze. U prvih 4-5 dana fermentacije dok je pH podloge bio viši, vrlo vjerojatno je doprinos hidrolitičke aktivnosti kvasca *S. cerevisiae* prirodno prisutnog u kefirnim zrnima bio viši nego prema kraju bioprocasa. Kao što je vidljivo na Slici 5., nakon 11. dana fermentacije pH podloge se ustalila oko vrijednosti od 2,5 pH jedinice i nije se značajnije mijenjala do kraja uzgoja. Međutim iako je pH podloge bio nizak, hidroliza saharoze nije zaustavljena što upućuje na zaključak da je i kod ovih pH vrijednosti podloge prisutan rast i aktivnost mikroorganizama koji imaju slično djelovanje kao i *S. cerevisiae*. Poznato je da se u kefirnim zrnima može pronaći i vrsta kvasca *Dekkera bruxellensis* koji može preživjeti pri tako niskom pH (Laureys i sur., 2018), a također može hidrolizirati saharozu. Osim djelovanja kvasca *D. bruxellensis* cijepanje molekule saharoze u podlozi mogla bi biti posljedica i djelovanja bakterije mliječne kiseline *L. hilgardii* koja također dobro podnosi niske pH vrijednosti, a jedna je od bakterija odgovornih za sintezu kefirana (egzopolisharidni matriks od kojeg su građena kefirna zrnca) i koja također može hidrolizirati saharozu na molekulu glukoze i fruktoze (Lynch i sur., 2021). U prilog tome ide i činjenica da je u ovom slučaju uočen

značajan porast udjela suhe tvari u odnosu na početak uzgoja (Slika 7). Ono što se nadalje može primijetiti jest činjenica da je zabilježena koncentracija fruktoze u podlozi iznimno visoka i ona zaostaje jer nije preferencijabilni izvor ugljika. Također, ovako visoke koncentracije mogu biti i posljedica njene prisutnosti u sušenom voću. Na deklaraciji proizvođač navodi kako je udio šećera u papaji 76%. To su i prirodno prisutni šećeri u voću (većim dijelom fruktoza), ali i dodani šećeri u obliku saharoznog sirupa budući da je voće dodano ošećereno. Dakle prisutni mikroorganizmi mogli su koristiti i saharozu koja potječe od sušenog voća te tako dodatno stvarati velike količine glukoze i fruktoze, a i same fruktoza i glukoza u podlozi mogle su potjecati od sušene papaje.



Slika 6. Promjena koncentracije produkata tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušene papaje



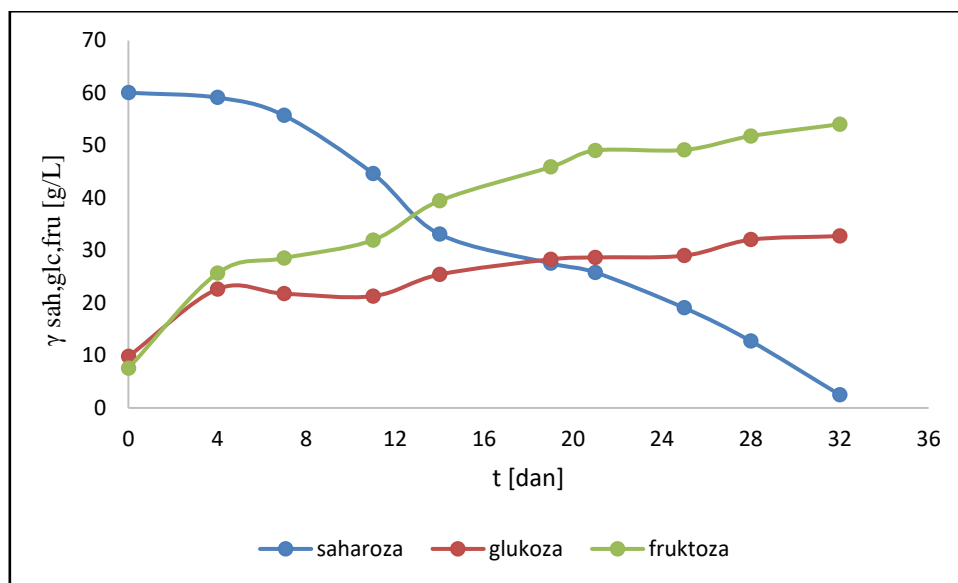
Slika 7. Promjena udjela suhe tvari kefirnih zrnaca tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušene papaje

Na Slici 6. prikazane su promjene koncentracije produkata nastalih tokom ovog istraživanja. U ovom slučaju nije zabilježen nastanak manitola, dok je kod ostala dva sušena voća zabilježen, a tome u prilog ide i visoka koncentracija fruktoze u podlozi. Naime, neke vrste heterofermentativnih BMK, npr. *Leuconostoc citreum*, koriste fruktozu za proizvodnju manitola (Gulitz i sur., 2011) no budući da manitol nije nastao, a koncentracija fruktoze je ostala visoka, može se pretpostaviti da tijekom uzgoja nisu bili postignuti optimalni uvjeti za njihovu aktivnost.

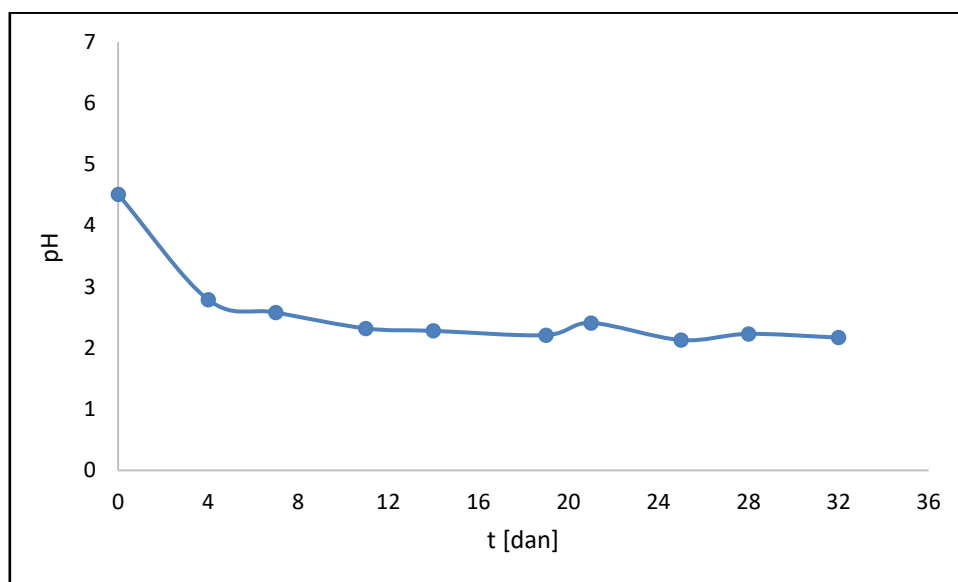
Na Slici 6. se također vidi da je koncentracija etanola tijekom cijelog uzgoja vrlo niska, vidljiv je blagi porast koncentracije na početku dok su uvjeti za aktivnost *S. cerevisiae* još bili povoljni, a nakon toga se ustalila pri čemu je maksimum koncentracije postignut 21. dan i iznosi 1,67 g/L. Octena kiselina je prisutna tijekom cijelog uzgoja, no najbrži porast koncentracije je upravo nakon 21. dana uzgoja kada se koncentracija etanola počinje smanjivati. Razlog tome može biti povećana aktivnost *D. bruxellensis* i *L. hilgardii* koje dokazano imaju sposobnost proizvodnje octene kiseline (Laureys i sur., 2018) ili zbog aktivacije bakterija octene kiseline koje troše etanol kao izvor energije te ga oksidiraju u octenu kiselinu. Međutim, zbog male koncentracije kisika u staklenci, doprinos bakterija octene kiseline je vjerojatno manje značajan.

#### 4.2. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUŠENIH BRUSNICA

U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati istraživanja proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih brusnica. Rezultati su prikazani na slikama 8. – 11.



Slika 8. Promjena koncentracije šećera tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih brusnica

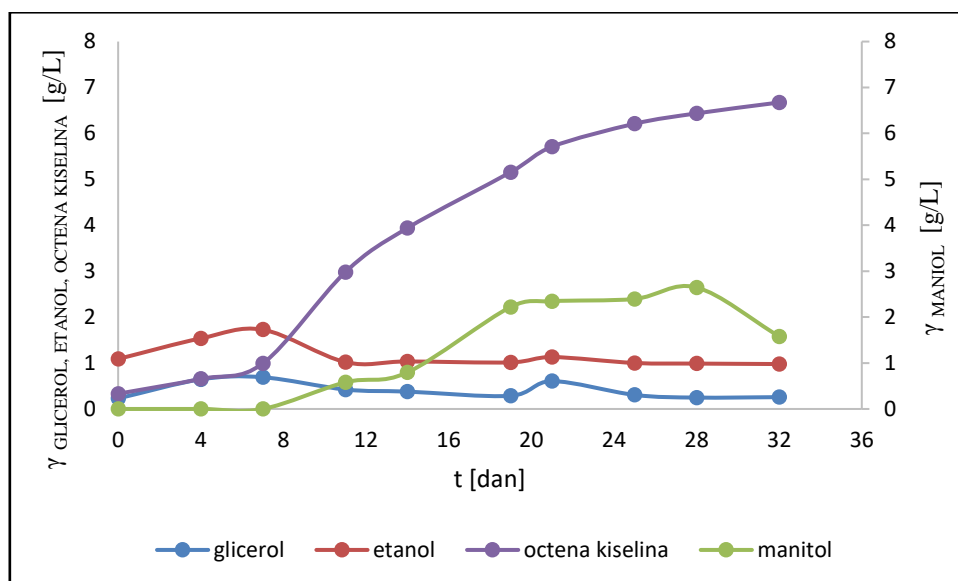


Slika 9. Promjena pH vrijednosti podloge tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih brusnica

Dinamika potrošnje supstrata u slučaju kada je u hranjivu podlogu na početku uzgoja dodana sušena brusnica prikazana je na Slici 8. Na Slici 9. vidljivo je da je početna pH vrijednost podloge u ovom slučaju nešto niža nego kod prethodnog eksperimenta (4,5 pH jedinica), što je ujedno i najmanja početna vrijednost pH podloge u sva 3 slučaja. Razlog tome može biti taj što su brusnice kao konzervans sadržavale i sumporni dioksid i limunsku kiselinu koji su dodatno mogli zakiseliti podlogu. Budući da je početna pH vrijednost iznosila 4,5, što je optimalni pH za aktivnost kvasca *S. cerevisiae*, promjene koncentracija glavnih izvora ugljika u podlozi u početnih nekoliko dana su očekivane. Koncentracija saharoze se kontinuirano smanjuje, intenzivnije nakon 7.dana da bi na kraju uzgoja bila skoro u potpunosti hidrolizirana. U Tablici 4. može se vidjeti da je tijekom fermentacije sa brusnicama ostvarena najveća potrošnja supstrata što za posljedicu ima i najveće zabilježene koncentracije glukoze i fruktoze u podlozi. Kao i kod prethodnog uzgoja, za ovakve rezultate pri niskim pH vrijednostima podloge najvjerojatnije su zaslužni kvasac *D. bruxellensis* i BMK *L. hilgardii*. Fruktoza i u ovom uzgoju zaostaje u podlozi međutim evidentno je da je hidroliza saharoze brža i izraženija u odnosu na brzinu potrošnje samog supstrata. I ovdje je bitno napomenuti da šećeri mogu potjecati i od samog voća pa tako prema deklaraciji sušene brusnice sadrže 73 g šećera na 100 g sušenih brusnica, što je slično kao i sušena papaja, međutim iz rezultata prikazanih u Tablici 4, može se zaključiti da je njihov doprinos ukupnoj koncentraciji manji nego u slučaju sušene papaje .

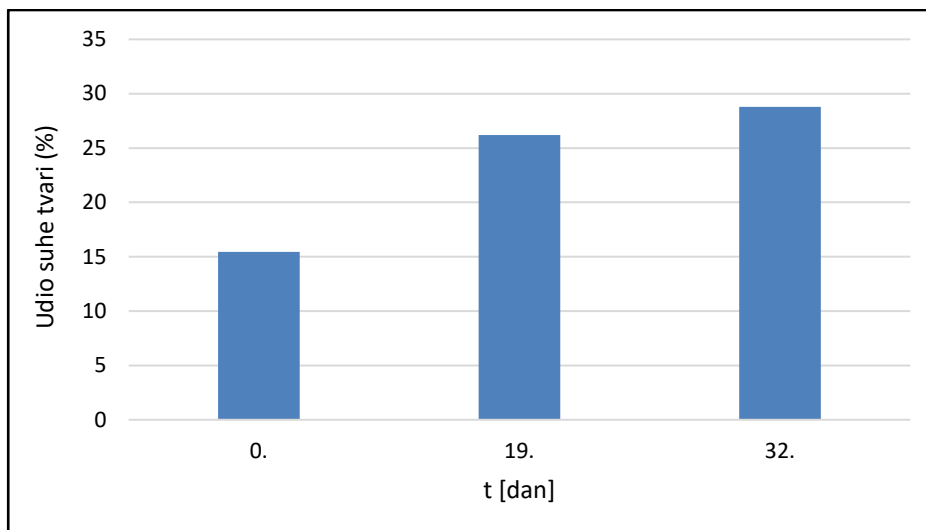
Tablica 4. Prikaz pokazatelja uspješnosti za eksperimente sa dodatkom sušenog voća

Parametar/vrsta sušenog voća	Papaja	Brusnica	Marelica
$\Delta S$ [g/L]	37,44	57,55	55,34
$Y_{Glc}$ [g]	13,83	22,94	12,93
$Y_{Fru}$ [g]	42,86	46,48	26,26
$Y_{Glicerol}$ [g]	0,65	0,03	1,62
$Y_{EtOH}$ [g]	0,12	0	0
$Y_{Manitol}$ [g]	0	1,58	7,94
$Y_{CH_3COOH}$ [g]	6,17	6,34	28,58
$Y_{Glicerol/S}$ [g/g]	0,0117	0,0005	0,0293
$Y_{EtOH/S}$ [g/g]	0,002	0	0
$Y_{Manitol/S}$ [g/g]	0	0,0275	0,1435
$Y_{CH_3COOH/S}$ [g/g]	0,1106	0,1102	0,5164



Slika 10. Promjene koncentracije produkata tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih brusnica

U ovom eksperimentu zabilježena je i značajnija količina proizvedenog manitola u odnosu na ostale eksperimente, i to pogotovo nakon 7.dana uzgoja. To bi značilo da su tada postignuti uvjeti za aktivnost već spomenutih heterofermentativnih BMK koje su odgovorne za njegovu proizvodnju. I ovdje je zabilježena slična dinamika odvijanja bioprocesa kao i u prethodnom eksperimentu. U početku se može vidjeti blagi porast koncentracije etanola da bi se njegova koncentracija ustalila nakon 11. dana uzgoja (Slika 10). Značajnija proizvodnja octene kiseline koincidira sa povećanjem koncentracije manitola, što bi moglo upućivati na činjenicu da neke od bakterija odgovornih za proizvodnju manitola mogu sintetizirati i octenu kiselinu (Vrancken i sur., 2010).

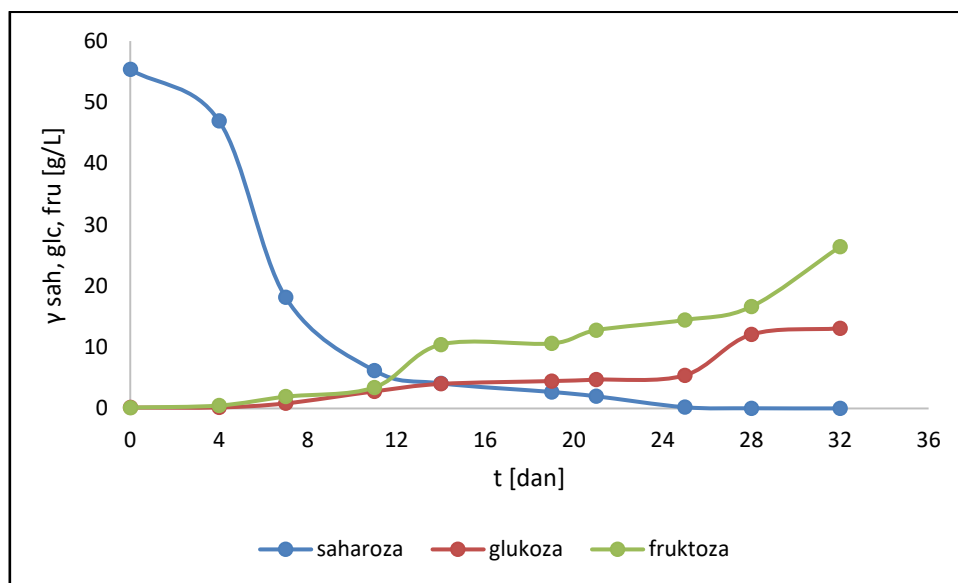


Slika 11. Promjena udjela suhe tvari tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih brusnica

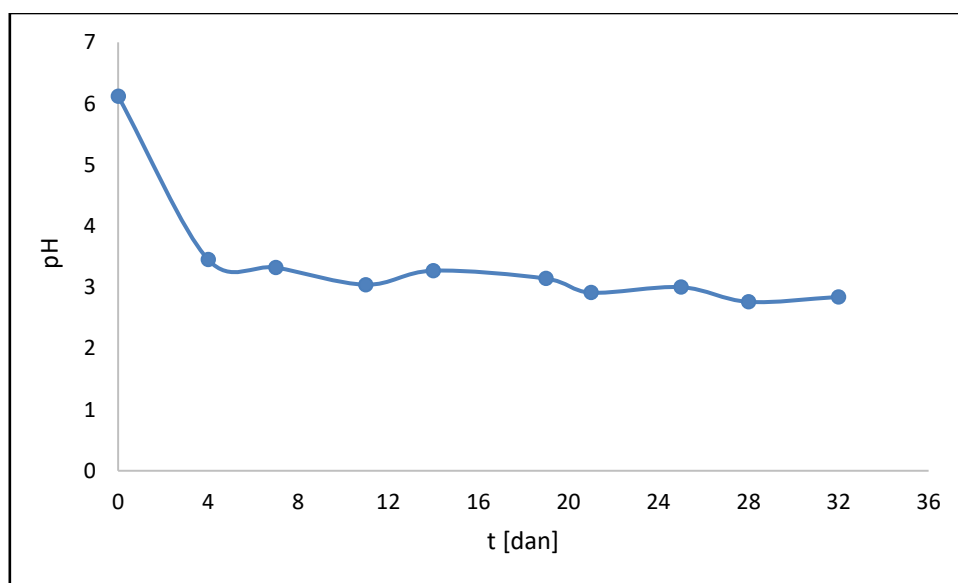
Promjena udjela suhe tvari (Slika 11) tijekom uzgoja sa sušenim brusnicama sličan je kao u prethodnom slučaju sa sušenom papajom. Povećanje udjela suhe tvari na kraju fermentacije je malo manje u odnosu na eksperiment sa papajom te iznosi 13,33 %. Razlog tome može biti malo niža konačna pH vrijednost podloge nego kod uzgoja sa papajom što predstavlja dodatan stres za mikroorganizme koji sintetiziraju egzopolisaharidni matriks .

#### 4.3. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA UZ DODATAK SUŠENIH MARELICA

U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati istraživanja proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušene papaje. Rezultati su prikazani na slikama 12. - 15.



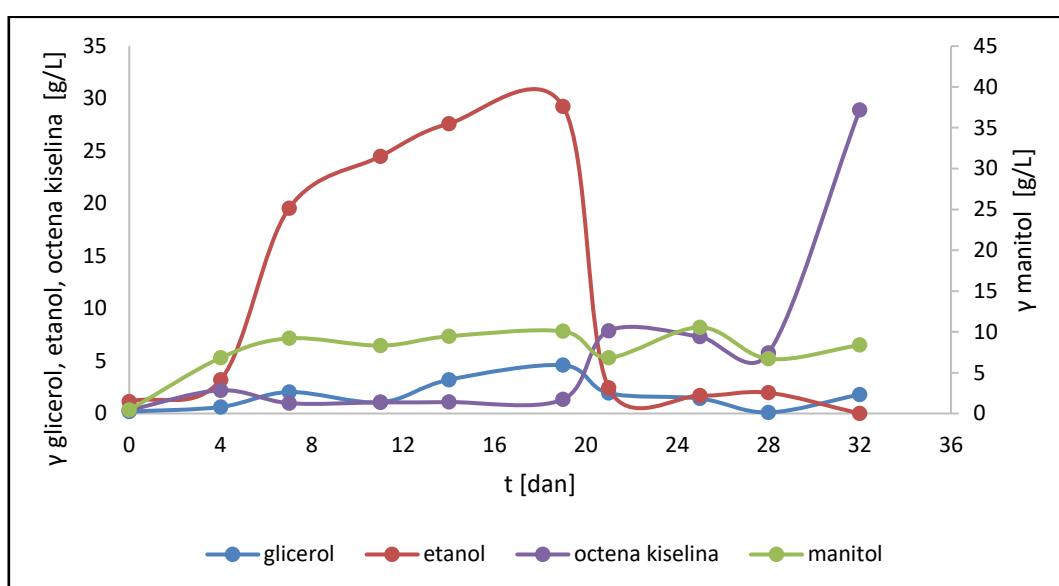
Slika 12. Promjena koncentracije šećera tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih marelica



Slika 13. Promjena pH vrijednosti podloge tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih brusnica



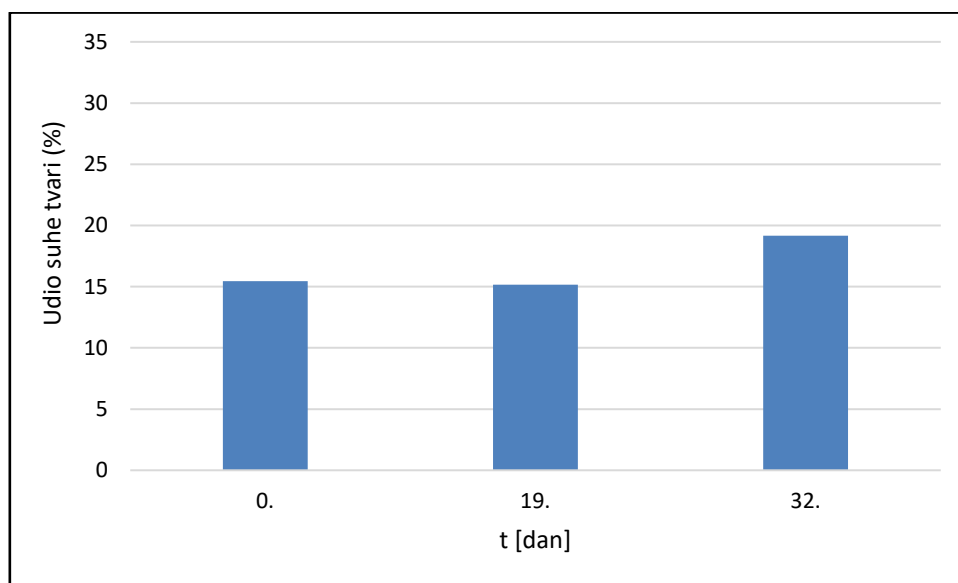
Na Slici 12. može se vidjeti da je do 12. dana uzgoja ostvareno najbrže smanjenje promjene koncentracije saharoze u podlozi ako promatramo sva tri eksperimenta. Inicijalni pH podloge (Slika 13) bio je najviši u sva tri slučaja i najvjerojatnije su ostvareni najbolji početni uvjeti za aktivnost *S. cerevisiae*. Također, ukupno gledano, u ovom slučaju zabilježen je uravnoteženija dinamika bioprocesa što se može vidjeti i iz krivulja glukoze i fruktoze čije su koncentracije manje u odnosu na uzgoje kada su u podlogu dodani papaja ili brusnice. Nakon 4. dana pH je iznosio nešto malo više od 3 pH jedinice i nije se više značajnije mijenjao.



Slika 14. Promjena koncentracije produkata tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih brusnica

Što se tiče produkata, ovdje su zabilježene najviše koncentracije etanola i glicerola u usporedbi sa ostalim podlogama gdje su dodani papaja i brusnice. Ovo je najvjerojatnije posljedica većeg udjela kvasca *S. cerevisiae* u startu što se odrazilo na bržu hidrolizu saharoze i više koncentracije alkohola u podlozi. Proizvodnja manitola je uočena praktički od početka samog uzgoja što se može pripisati činjenici da su postignuti optimalni uvjeti za mikroorganizme odgovorne za njegovu proizvodnju. U ovom slučaju ostvaren je i njegov najveći prinos (Tablica 4). Značajnija razlika može se uočiti i kod proizvodnje octene kiseline čija je koncentracija bila gotovo nepromijenjena tokom cijelog vremena trajanja istraživanja

da bi tek na kraju fermentacije bilo zabilježeno značajnije povećanje. Proizvodnja octene kiseline mogla bi biti posljedica povećane aktivnosti mikroorganizama kojima su odgovarali uvjeti u podlozi, npr. kvasac *D. bruxellensis* ili je došlo do povećane aktivnosti prirodno prisutnih bakterija octene kiseline koje inače pred kraj proizvodnje oksidiraju proizvedeni etanol iz hranjive podloge.



Slika 15. Promjena udjela suhe tvari tijekom proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak sušenih marelica

Kao što je uzgoj sa sušenim marelicama specifičan po koncentracijama supstrata i produkata, tako je slučaj i sa promjenom udjela suhe tvari. Naime, jedino tijekom ovog uzgoja je došlo do blagog pada u udjelu suhe tvari nakon 19.dana u iznosu od 0,7 %. Do tog vremena većina supstrata utrošena je na sintezu produkata, što je u suprotnosti od ostala dva eksperimenta kod kojih je vidljiv jasan trend porasta udjela suhe tvari. Međutim, prema kraju uzgoja ipak dolazi do blagog porasta u udjelu suhe tvari, upravo kada je koncentracija supstrata u podlozi minimalna, a uvjeti generalno nepovoljni za mikrobnu aktivnost.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ostvarenih tijekom ovog istraživanja može se zaključiti slijedeće:

1. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak sušene papaje rezultirala je najmanjom količinom utrošenog supstrata na kraju uzgoja te niskim koncentracijama glavnih produkata. Unatoč tome, ostvaren je najveći porast udjela suhe tvari u odnosu na početnu vrijednost od 14,97 %.
2. U slučaju kada je u podlogu dodana sušena brusnica ostvareni su slični rezultati kao i u slučaju kada je u podlogu dodana papaja.
3. Rezultati ostvareni kod uzgoja sa sušenim marelicama razlikuju se od prethodna dva eksperimenta. Iako je saharoza utrošena do kraja, u ovom slučaju zabilježene su najviše koncentracije etanola (29,26 g/L) i octene kiseline (28,91 g/L), a proizvodnja manitola zabilježena je tijekom cijelog vremena trajanja uzgoja. U ovom slučaju ostvaren je najmanji prirast suhe tvari u sva tri seta eksperimenata.
4. Na temelju ovog istraživanja može se zaključiti da se sušena papaja, marelica i brusnica mogu koristiti u biotehnološkoj proizvodnji kefirnog napitka. S obzirom na kompleksnost mikrobne zajednice i njihovu međusobnu interakciju, dobivene su različite koncentracije glavnih produkata (etanola, glicerola, octene kiseline i manitola) u podlozi, a dodatak neke vrste voća ima i pozitivan utjecaj na proizvodnju glavnog polisaharida (kefirana).

## 6. POPIS LITERATURE

1. 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.
2. 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.
3. Feldmann H (2005) Yeast metabolism. Yeast molecular biology, Adolf Butenandt-Institut, München.
4. Fiorda FA, de Melo Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK, Pagnoncelli MGB, de Vandenberghe LPS, Soccol CR (2017) Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - a review. *Food Microbiol* **66**, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>
5. 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.
6. Greenberg DE, Porcella SF, Stock F, Wong A, Conville PS, Murray PR, Zelazny AM (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.
7. 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.
8. Guzel-Seydim ZB, Gökırmaklı Ç, Greene AK (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>

9. Gulitz A, Stadie J, Ehrmann MA, Ludwig W, Vogel RF (2013) Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *J Appl Microbiol* **114**, 1-10. <https://doi.org/10.1111/jam.12124>
10. 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>
11. Jakob F, Steger S, Vogel RF (2012) Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads. *Eur Food Res Technol* **234**, 493-499. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1658-7>
12. Kandler O (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**(3), 209-224. <https://doi.org/10.1007/BF00399499>
13. Kebler L (1921) California bees. *J Amercian Pharm Assoc* **10**, 939–943.
14. Kurtoić D (2020) Optimiranje uvjeta uzgoja *tibicosa* na saharози (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
15. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. (2011) *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, London, UK, str. 2354.
16. 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>
17. 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>

18. 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>
19. 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>
20. Leung TLF, Poulin R (2008) Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu* **58**(2), 107.
21. Lutz ML (1899) Recherches biologique sur la constitution du Tibi. *Bull Soc Mycol Fr* **15**, 68-72.
22. 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>
23. 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>
24. Kršev Lj, Malija M (1993) Probiotsko djelovanje *Bifidobacterium* vrsta. *Mljekarstvo* **43**(2): 123-132.
25. Malimas T, Thi Lan Vu H, Muramatsu Y, Yukphan P, Tanasupawat S, Yamada Y (2017) Systematics of acetic acid bacteria. U: Sengun IY (ured.) *Acetic acid bact: Fundam and food appl* (pp. 3–43). Boca Raton, FL: CRC Press.
26. 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>

27. 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.
28. Moinas M, Horisberger M, Bauer H (1980) The structural organization of the Tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Arch Microbiol* **128**, 157-161. <https://doi.org/10.1007/BF00406153>
29. Pidoux M, Brillouet JM, Quéméner B (1988) Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnol Lett* **10**(6), 415-420.
30. 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.
31. Pogačić T, Šinko S, Zamberlin Š, Samaržija D (2013) Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo* **63**(1), 3-14. <https://hrcak.srce.hr/file/144662>
32. 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>
33. Raspor P, Goranovič D (2008) Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit Rev Biotechnol* **28**, 101-124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>
34. Reiß J, (1990) Metabolic activity of Tibi grains. *Zeitschrift für Leb und Forsch* **191**, 462–465. <https://doi.org/10.1007/BF01193095>
35. Riccardo Soccol C, Porto de Souza Vandenberghe L, Rigon Spier M, Bianchi Pedroni Medeiros A, Tiemi Yamaguishi C, De Dea Lindner J, Pandey A, Thomaz-Soccol V (2010) The Potential of Probiotics: A Review. The Potential of Probiotics. *Food Technol Biotechnol* **48** (4)

413–434. <https://hrcak.srce.hr/en/file/92463.html>

36. 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>

37. Stadie J (2013) Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir. Doctoral dissertation, Technische Universität München, München

38. 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>

39. Taban, B. M., & Saichana, N. (2017). Physiology and biochemistry of acetic acid bacteria. In I. Y. Sengun (Ed.), *Acetic acid bact: Fundam and food appl* (pp. 71–91). Boca Raton, FL: CRC Press.

40 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>

41. 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>

42. 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

43. 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>



## 7. PRILOZI

### 7.1. BAŽDARNI PRAVCI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA UPLC ANALIZOM

Prilog 1. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti

Spoj	Retencijsko vrijeme, $t_R$ (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Saharoza	4,248	$A = 135868\gamma_{\text{saharoza}} + 30686$	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
Manitol	5,766	$A = 161699\gamma_{\text{manitol}} + 25269$	0,9998
Glicerol	6,984	$A = 105559\gamma_{\text{glicerol}} - 297,02$	1,0000
Octena kiselina	8,167	$A = 68165\gamma_{\text{octena kiselina}} - 2182,8$	0,9983
Etanol	10,44	$A = 53836\gamma_{\text{etanol}} - 15864$	0,9969

A = površina

