

Optimiranje uvjeta proizvodnje kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru

Jelačić, Nives

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:001498>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Nives Jelačić

**OPTIMIRANJE UVJETA
PROIZVODNJE KEFIRNOG
NAPITKA U HORIZONTALNOM
ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM
BIOREAKTORU**

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

Zahvaljujem svojem mentoru doc. dr. sc. Mladenu Pavlečiću na stručnom vodstvu, uloženom trudu i strpljenju te susretljivosti prilikom izrade i pisanja diplomskog rada. Također zahvaljujem gospođi Gordani Vučić koja nam je osigurala radnu kulturu za naše istraživanje.

Zahvaljujem se svojim kolegama i prijateljima te PBF porodici što su mi studentske dane učinili nezaboravnima.

Najviše zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj potpori i razumijevanju za vrijeme studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

OPTIMIRANJE UVJETA PROIZVODNJE KEFIRNOG NAPITKA U HORIZONTALNOM ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU

Nives Jelačić, univ. bacc. ing. biotechn.
0058206354

Sažetak:

Kefirni napitak je fermentirani proizvod s blagotvornim učinkom na zdravlje. Dobiva se fermentacijom hranjive podloge u kojoj se nalazi šećer djelovanjem združene kulture mikroorganizama koja se sastoji od bakterija octene kiseline, bakterija mliječne kiseline te kvasaca. Zrnca korištena za ovaj rad su iz kućnog uzgoja i nije poznat točan mikrobiološki sastav. Preliminarnim istraživanjima u manjem mjerilu utvrđena je optimalna količina početne količine inokuluma od 10 % (m/V) koja je potom korištena za daljnja istraživanja u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB-u). U ovom diplomskom radu također je ispitana mogućnost proizvodnje kefirnog napitka u ovoj vrsti bioreaktora pri čemu je ispitivan utjecaj procesnih parametara kao što su brzina okretanja (3, 5, 7 okr/min) te vrsta rotacije bioreaktora (kontinuirana ili intervalna). Najbolji rezultati ostvareni su u slučaju kada je korištena intervalna rotacija s 3 minute rotacije pri čemu je brzina okretanja bioreaktora iznosila 7 okr/min. Ovim istraživanjem dokazana je mogućnost korištenja HRCB-a u biotehnološkoj proizvodnji kefirnog napitka.

Ključne riječi: kefirni napitak, HRCB, intervalna rotacija, konstantna rotacija

Rad sadrži: 47 stranica, 27 slika, 5 tablica, 34 literaturne reference, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Mladen Pavlečić

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. doc. dr. sc. Antonija Trontel (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Mladen Pavlečić (mentor)
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

Datum obrane: 1. prosinac 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

THE OPTIMISATION OF PROCESS PARAMETERS IN KEFIR DRINK PRODUCTION IN HORIZONTAL ROTATING TUBULAR BIOREACTOR

*Nives Jelačić, univ. bacc. ing. biotechn.
0058206354*

Abstract:

Kefir drink is fermented product with a beneficial health effect. It is made by fermentation of nutrient medium which contains sugar by the action of a mixed culture of microorganisms consisting of acetic acid bacteria, lactic acid bacteria and yeasts. The grains used in this research are from domestic cultivation and the exact microbiological composition is unknown. By preliminary research in smaller scale the optimal initial inoculum of 10 % (m/V) was determined, and was then used for further reasearch in a horizontal rotating tubular bioreactor (HRTB). In this master thesis also the possibility of kefir drink production in this bioreactor type was examined, where the influence of process parameters such as rotation speed (3, 5, 7 rpm) and bioreactor rotation type (continuous or interval) was also examined. The best results were obtained when interval rotation with 3 minutes of rotation was used, where the rotation speed was set to 7 rpm. This research proved the possibility of using HRTB in the biotechnological kefir drink production.

Keywords: kefir drink, HRTC, interval rotation, continuous rotation

Thesis contains: 47 pages, 27 figures, 5 tables, 34 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Mladen Pavlečić, PhD, Assistant professor

Reviewers:

1. Antonija Trontel, PhD, Assistant professor (president)
2. Mladen Pavlečić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor (member)
4. Blaženka Kos, PhD, Full professor (substitute)

Paper defended: December 1st 2021

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1.	KEFIRNI NAPITAK	2
2.2.	MIKROBNI SASTAV ZRNACA KEFIRNOG NAPITKA	3
2.2.1.	Bakterije mliječne kiseline	3
2.2.2.	Bakterije octene kiseline	7
2.2.3.	Bifidobakterije.....	7
2.2.4.	Kvasci.....	9
2.3.	SASTAV EGZOPOLISAHARIDNOG MATRIKSA	10
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1.	MATERIJALI	12
3.1.1.	Radna kultura	12
3.1.2.	Kemikalije.....	12
3.1.3.	Hranjive podloge.....	13
3.1.4.	Aparatura i pribor.....	13
3.2.	METODE RADA.....	14
3.2.1.	Priprema hranjive podloge	14
3.2.2.	Umnažanje biomase kefirnih zrnaca	15
3.2.3.	Određivanje optimalne količine inokuluma za proizvodnju kefirnog napitka	15
3.2.4.	Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u	16
3.3.	ANALITIČKE METODE.....	16
3.3.1.	UPLC analiza	16
3.3.2.	Određivanje udjela suhe tvari biomase kefirnog napitka	17
3.4.	ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI	18
3.4.1.	Potrošnja supstrata (ΔS).....	18

3.4.2.	Prinos produkata (Y_P)	18
3.4.3.	Koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)	19
3.4.4.	Produktivnost (Pr)	19
4.	REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1.	ODREĐIVANJE OPTIMALNE KOLIČINE INOKULUMA U PROIZVODNJI KEFIRNOG NAPITKA.....	20
4.2.	PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA PRI KONSTANTNOJ VRTNJI HRCB-A.....	25
4.2.1.	Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 3 okr/min	25
4.2.2.	Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 5 okr/min	29
4.2.3.	Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 7 okr/min	31
4.3.	PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA KORIŠTENJEM INTERVALNE ROTACIJE	35
4.3.1.	Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 3 minute pri brzini rotacije od 7 okr/min	35
4.3.2.	Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 9 minuta pri brzini rotacije od 7 okr/min	38
5.	ZAKLJUČCI.....	43
6.	LITERATURA.....	44

1. UVOD

U današnje vrijeme s razvojem ubrzanog načina života sve se više pažnje posvećuje zdravoj prehrani. Pritom se često teži brzim rješenjima i namirnicama koje pridonose blagotvornom učinku na zdravlje. Jedan od takvih proizvoda je i kefirni napitak. Povezuje ga se s probiotičkim, protuupalnim, antioksidativnim te antibakterijskim djelovanjem (Lynch i sur., 2019). Mnogi se pozitivni učinci kefirnog napitka vežu upravo uz fermentacijsko djelovanje bakterija mliječne kiseline i kvasaca koji proizvode bioaktivne komponente poput polisaharida i peptida (Lynch i sur., 2019).

Podrijetlo kefirnog napitka nije poznato, ali postoje opisi zrnaca prema kojima bi se dalo naslutiti da je riječ upravo o zncima kefirnog napitka. Tako primjerice postoji teorija da je tzv. biljka đumbirovog piva (engl. *Ginger-beer Plant*) donesena od strane britanskih vojnika iz Krimskog rata. Druga pak teorija povezuje zrnca (tzv. *Tibi zrnca*) s meksičkim kaktusima roda *Opuntia* s čijih su listova skinuta. Danas se za kefirni napitak koriste mnogi sinonimi kao što su primjerice „kalifornijske pčele“, „afričke pčele“, „ale orasi“, „japanske sjemenke piva“ ili pak „šećerna zrna kefira“ (Stadie, 2013).

Obzirom da postoji tržište na koje bi se mogli plasirati ovakvi fermentirani proizvodi, potrebno je istražiti i optimizirati sam proces industrijske proizvodnje. Budući da je proizvodnja još uvijek nedovoljno istražena, svrha ovog rada bila je upravo približiti jedan od načina proizvodnje u većem mjerilu. Istraživanje je provedeno u horizontalnom rotirajućem biorekatoru korištenjem različitih brzina i različitog tipa rotacije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEFIRNI NAPITAK

Kefirni napitak je piće blago slatkog, kiselkastog okusa i voćne arome, žućkaste boje, pjenušavo i blago alkoholno. Dobiva se inokulacijom kefirne kulture u vodu kojoj je dodan konzumni šećer. Zrnca kefirnog napitka čine združeni mikroorganizmi odnosno razne vrste bakterija i kvasaca. Zrnca su poglavito izgrađena od dekstrana koji je građen od glukoznih podjedinica povezanih α -(1,3) i α -(1,6) glikozidnim vezama. Otopina fermentira 2-4 dana pri sobnoj temperaturi u anaerobnim uvjetima nakon čega se zrnca izdvajaju iz napitka te se mogu koristiti u drugom postupku fermentacije (Laureys i De Vuyst, 2014). Kao izvor faktora rasta za mikroorganizme nerijetko se u podlogu dodaje sušeno voće kao što su primjerice smokve, datulje i grožđice dok se limun dodaje za poboljšanje arome (Moinas i sur., 1980).

Proizvodnja kefirnog napitka odvija se uglavnom na razini kućanstva pri čemu se kefirna zrnca prenose od osobe do osobe zahvaljujući činjenici da se biomasa umnožava tijekom fermentacije (Laureys i De Vuyst, 2014). S druge strane, industrijska proizvodnja nije zaživjela budući da je teško kontrolirati proces fermentacije zbog kompleksnog sastava mikrobne biomase u kefirnim zrcima. Pritom nastaju različiti krajnji produkti, a problem također može predstavljati i odumiranje biomase (Laureys i De Vuyst, 2017).

Poznatiju inačicu kefirnog napitka predstavlja mliječni kefir. Njegova su zrnca građena od proteina, raznih staničnih elemenata te polisaharida kefirana koji je pak sastavljen od glukoznih i galaktoznih monomernih jedinica. U slučaju mliječnog kefira fermentaciju osim bakterija i kvasaca provode i filamentozne plijesni. Zrnca je moguće konzervirati sušenjem te ih nanovo koristiti (Pogačić i sur., 2013).

2.2. MIKROBNI SASTAV ZRNACA KEFIRNOG NAPITKA

Zrnca vodenog kefira čine različiti mikroorganizmi od kojih ključnu ulogu u fermentaciji imaju bakterije mliječne kiseline (BMK), primjerice vrste *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus nagelii* i *Lactobacillus paracasei* te kvasci vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Glavni je supstrat saharoza koju mikroorganizmi konvertiraju u egzopolisaharidni matriks, etanol, mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, ugljikov dioksid, glicerol, manitol te razne aromatske spojeve (Laureys i De Vuyst, 2017). Osim navedenih produkata, tijekom proizvodnje vodenog kefira na saharozi mogu nastati i razni esteri te viši alkoholi kao rezultat djelovanja prisutnih kvasaca (Laureys i De Vuyst, 2017). Kvantificirani su primjerice acetaldehid, 1-propanol, 3-metil-1-butanol, etil-butirat, izoamil-acetat i butanol (Kurtoić, 2020).

Broj bakterija mliječne kiseline prisutnih u zrcima kefira iznosi oko 10^8 stanica/g, bakterija octene kiseline 10^6 - 10^8 stanica/g, a broj kvasaca varira u rasponu od 10^6 - 10^7 stanica/g (Gulitz i sur., 2011). Također, u zrcima su nedavno otkrivene i neke vrste bifidobakterija (Gulitz i sur., 2013).

2.2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su Gram-pozitivne bakterije, najčešće štapićastog ili sferičnog oblika koje se pojavljuju same ili u skupinama/lancima. Koriste ugljikohidrate kao izvor energije pri čemu kao glavni krajnji produkt metabolizma nastaje mliječna kiselina. BMK se tradicionalno koriste kao starter kulture u procesima prerade mlijeka, mesa, povrća pri čemu prerađeni proizvodi imaju nisku pH vrijednost radi proizvedene mliječne kiseline što djeluje inhibirajuće na mnoge druge mikrobnе vrste sprječavajući pritom kvarenje proizvoda (Axelsson, 2004). U kefirnim zrcima pronađene vrste BMK pripadaju poglavito rodovima *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (Gulitz i sur., 2013).

S obzirom na konačne produkte, kod ovih bakterija se razlikuju homolaktična i heterolaktična fermentacija pri čemu homofermentativne vrste BMK prevode heksoze Embden-Meyerhoff-Parnas putem (glikolizom) do laktata kao glavnog produkta u uvjetima suviška supstrata.

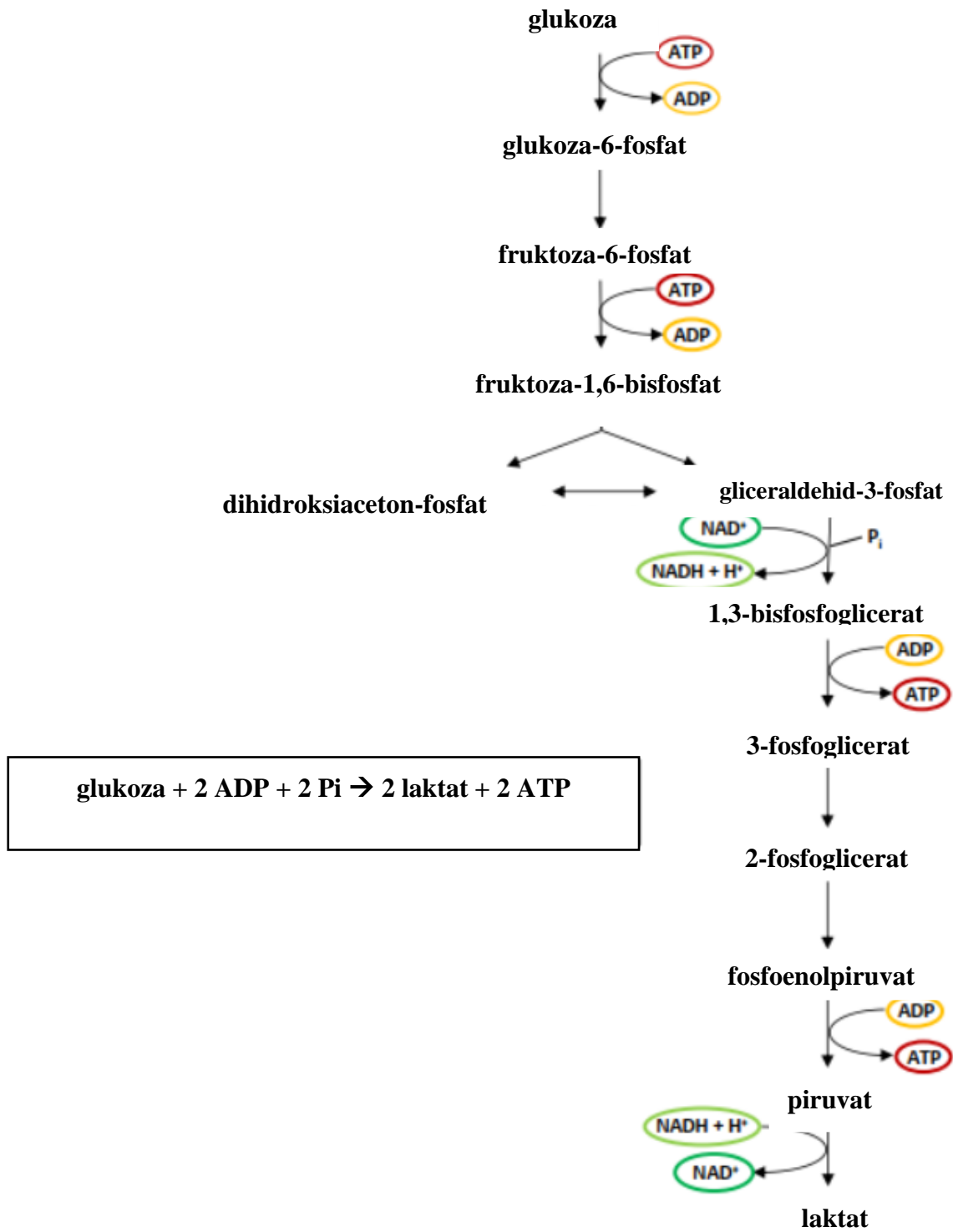
Heterofermentativne BMK s druge strane, metaboliziraju heksoze i/ili pentoze pentoza fosfatnim putem do ekvimolarnih količina laktata, etanola i acetata (Stadie, 2013). U tablici 1 prikazane su najčešće homo- i heterofermentativne vrste BMK u kefirnim zrnima.

Tablica 1. Homo- i heterofermentativne vrste bakterija mliječne kiseline u zrnima vodenog kefira (Gulitz i sur., 2013; Gulitz i sur., 2011)

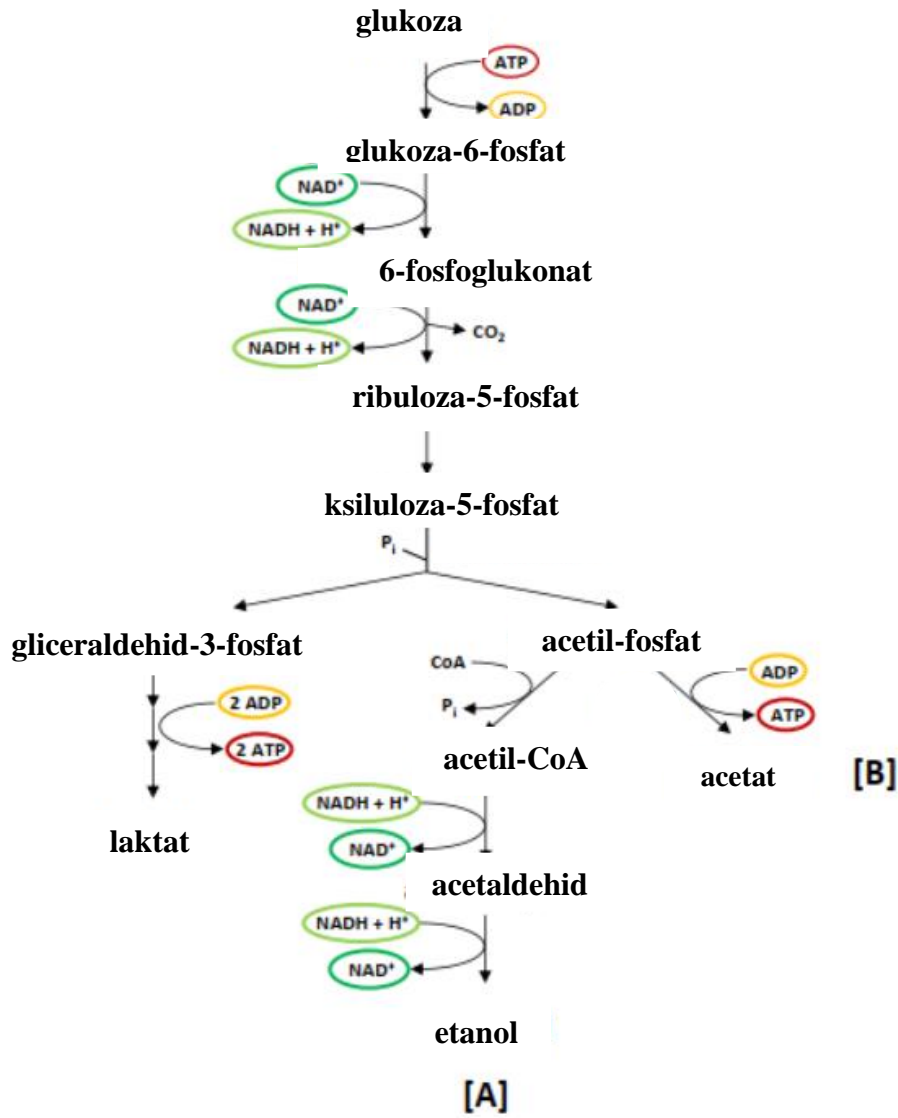
Homofermentativne BMK	Heterofermentativne BMK
<i>Lactobacillus hordei</i>	<i>Lactococcus mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Lactococcus citreum</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	

Na slici 1 prikazana je homolaktična fermentacija glukoze do laktata. Homofermentativne BMK glukozu razgrađuju glikolizom do piruvata koji se potom reducira uz pomoć enzima laktat dehidrogenaze do laktata uz oksidaciju NADH u NAD⁺. Ukoliko nema limitacije izvorom ugljika, iz jedne molekule glukoze dobivaju se dvije molekule mliječne kiseline i dvije molekule ATP-a (Stadie, 2013; Axelsson, 2004).

Kod heterolaktične fermentacije (slika 2) glukoza se oksidativnim ogrankom pentoza fosfatnog puta prevodi do ksiluloza-5-fosfata koji se u reakciji fosfoketolaze cijepa na gliceraldehid-3-fosfat i acetil-fosfat. Gliceraldehid-3-fosfat se dalje reakcijama glikolize prevodi do piruvata koji potom reducira u laktat. Dobiveni acetil-fosfat se prevodi u acetil-CoA koji se potom reducira sve do etanola uz regeneraciju reduciranih koenzima NADH oksidacijom u NAD⁺ (Stadie, 2013; Axelsson, 2004). U slučaju metabolizma pentoza ne dolazi do redukcije koenzima te se stoga nastali acetil-fosfat prevodi direktno u acetat djelovanjem acetat-kinaze (Gänzle, 2015).



Slika 1. Metabolizam homofermentativnih vrsta BMK (prema Stadie, 2013)



[A] glukoza + ADP + Pi

→ laktat + etanol + CO₂ + ATP

[B] glukoza + 2 fruktoza + 2 ADP + 2 Pi → laktat + acetat + CO₂ + 2 ATP + 2 manitol

Slika 2. Metabolizam heksoza heterofermentativnih vrsta BMK (prema Stadie, 2013)

2.2.2. Bakterije octene kiseline

Bakterije octene kiseline (BOK) su Gram-negativne, nesporogene bakterije štapićastog i okruglog oblika. Obligatni su aerobi te se mogu naći u različitim staništima koja sadrže fermentabilne šećere. Porodica je podijeljena u dva roda – *Acetobacter* i *Gluconobacter*. Vrste roda *Acetobacter* preferiraju staništa bogata etanolom, a vrste roda *Gluconobacter* preferiraju ona bogatija na ugljikohidratima (Raspor i Goranovič, 2008).

Bakterije iz roda *Acetobacter* mogu proizvoditi etanol koji potom djelovanjem membranski vezanih enzima alkohol-dehidrogenaze i acetaldehid-dehidrogenaze prevode u octenu kiselinu. Ukoliko je u podlozi već prisutan etanol, dolazi do represije citratnog ciklusa zbog čega se odvija nepotpuna oksidacija octene kiseline. Nakon što se iz podloge iscrpi sav etanol, vrste roda *Acetobacter* oksidiraju octenu kiselinu do ugljikovog dioksida i vode. S druge strane vrste roda *Gluconobacter* ne posjeduju enzime citratnog ciklusa te uopće ne mogu potpuno razgraditi octenu kiselinu već energiju dobivaju nepotpunom oksidacijom ugljika ili alkohola te pritom sintetiziraju različite kiseline, npr. glukonsku kiselinu iz glukoze (Stadie 2013; Jakob i sur., 2012).

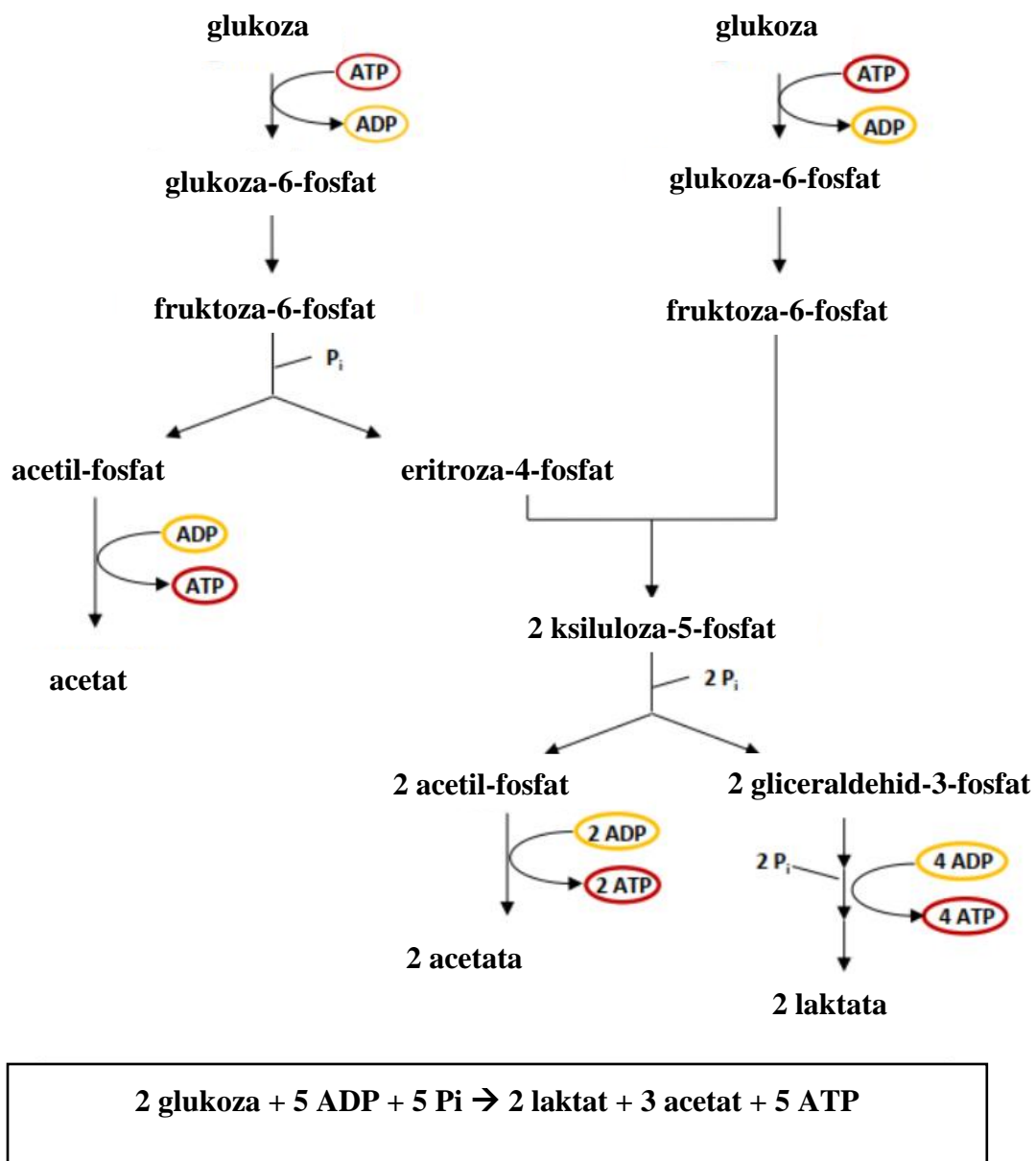
Vrste roda *Acetobacter* u današnje vrijeme imaju važnu ulogu u industrijskoj proizvodnji octa, ali s druge strane predstavljaju kontaminante u nekim drugim vrstama fermentacija (Gullo i sur., 2014).

U odnosu na BMK, octene bakterije su manje zastupljene u kefirnom napitku pri čemu njihov udio iznosi od 3-10 % ukupne bakterijske populacije. Najzastupljenije vrste ovih bakterija u zrnima vodenog kefira su *Acetobacter fabarum* i *Acetobacter orientalis* (Gulitz i sur., 2011).

2.2.3. Bifidobakterije

Bifidobakterije spadaju u skupinu Gram-pozitivnih bakterija, nepokratne su, štapićaste, ne stvaraju spore te su obligatni anaerobi. Obzirom da im je glavni produkt metabolizma ugljikohidrata laktat, nekoć su bili klasificirani u skupinu BMK, ali su danas zbog filogenjskih i metaboličkih razlika u odnosu na BMK smještene u zasebnu skupinu (Ballongue, 2004).

Metabolički put *Bifidobacterium* vrsta razlikuje se od homo- i heterofermentativnog puta kod BMK i naziva se „*bifidus shunt*“ koji je prikazan na slici 3.



Slika 3. „Bifidus shunt“ kod bifidobakterija (prema Stadie, 2013)

Bifidobakterije za razliku od BMK imaju enzim fruktoza-6-fosfat-fosfoketolazu koji im omogućuje fosforolitičko cijepanje fruktoza-6-fosfata na acetil-fosfat i eritroza-4-fosfat (Eckel i sur., 2019). U metabolički put ulaze dvije molekule glukoze koje se fosforiliraju te izomeriziraju u 2 molekule fruktoza-6-fosfata. Prva se molekula fruktoza-6-fosfata cijepa na acetil-fosfat i eritrozu-4-fosfat. Nastali acetil-fosfat se defosforilira u acetat, a eritroza-4-fosfat ulazi u reakcije pregradnje s drugom molekulom fruktoza-6-fosfata iz kojih na posljetku nastaju dvije molekule ksiluloza-5-fosfata. One se potom cijepaju na dva gliceraldehid-3-fosfata i dva acetil-fosfata iz kojih na posljetku defosforilacijom nastaju dva acetata i dva laktata (Eckel, 2020).

U kefirnim zrnima bifidobakterije su znatno manje prisutne od BMK, a najčešće vrste su *Bifidobacterium aquikefiri* i *Bifidobacterium tibiigranuli*. Njihova uloga u mješovitoj kulturi zrnaca zasad nije u potpunosti razjašnjena (Xu i sur., 2019).

Ove bakterije važan su dio ljudskog i životinjskog probavnog trakta gdje imaju probiotički učinak i važnu ulogu u obnavljanju crijevne mikroflore kod osoba koje su uzimale antibiotike u terapiji (Stadie, 2013). Proizvode inhibitorne spojeve (kisljine s niskom vrijednosti pH) koji sprječavaju rast patogenih bakterija (Kršev, 1996). Također mogu proizvoditi i bakteriocine te blokirati adhezijske receptore za patogene i razne toksične spojeve zbog čega imaju blagotvoran učinak na zdravlje (Collado i sur., 2005).

2.2.4. Kvasci

Kvasci su eukariotski jednostanični mikroorganizmi koji se razmnožavaju pupanjem. Svrstavaju se u carstvo gljiva te su većim dijelom mezofili. Neke vrste iz rodova *Saccharomyces* i *Zygosaccharomyces* su psihrofilni i mogu rasti pri temperaturama od tek 2 °C. Postoje i termofilne vrste koje preferiraju temperature više od 40 °C, primjerice *Candida austromarina* (Kurtzman i sur., 2011). Mogu rasti u širokom rasponu pH vrijednosti od pH 4,5 – 7,0 dok ih je velik broj otporan i na vrlo niske pH vrijednosti (Guerzoni i sur., 2013).

Kvasci kao glavni izvor energije koriste glukozu koju glikolizom u aerobnim uvjetima prevode do piruvata u citosolu uz redukciju NAD⁺ u NADH. Iako *Saccharomyces cerevisiae* ne može transportirati saharozu u stanicu, on sadrži topivi enzim invertazu koja cijepa saharozu na

glukoze i fruktoze za koje postoje transportni sustavi, permeaze, te ih na taj način može koristiti kao izvore ugljika (Shafiq i sur., 2003). Piruvat nastao glikolizom se iz citosola transportira u mitohondrij te prevodi u acetil-CoA koji potom ulazi u citratni ciklus (TCA). Reducirani koenzimi NADH i NADH₂ dobiveni tijekom glikolize i TCA reoksidiraju se u respiratornom lancu pri čemu se oslobođena energija koristi za sintezu energije u obliku molekula ATP-a (Stadie, 2013; Feldmann, 2005). Citratni ciklus predstavlja i katabolički put za proizvodnju energije, ali i anabolički put jer u njemu nastaju intermedijari potrebni za sintezu aminokiselina i nukleotida odnosno za sintezu tvari arome (Feldmann, 2005). U aerobnim uvjetima kada je u podlozi prisutna visoka koncentracija supstrata (2-5 g/L) dolazi do tzv. „Crabtree-evog efekta“ gdje višak glukoze djeluje inhibitory na enzime citratnog ciklusa i respiratornog lanca zbog čega dolazi do nakupljanja piruvata nastalog glikolizom. Taj se piruvat zatim prevodi u etanol u procesu alkoholne fermentacije uz oksidaciju NADH iako su uvjeti aerobni (Stadie, 2013).

U vodenom kefiru česte su vrste i *Zygosaccharomyces* koje su osmotolerantne i mogu rasti u podlogama s visokim koncentracijama šećera od oko 90 g/L i niskom koncentracijom aminokiselina što je čest slučaj u proizvodnji kefirnog napitka. Iako je zabilježeno da mogu uzrokovati kvarenje hrane, ovi su kvasci poželjni u fermentaciji vodenog kefira (Stadie, 2013).

2.3. SASTAV EGZOPOLISAHARIDNOG MATRIKSA

Polisaharidi su spojevi visoke molekularne mase te se sastoje od mnoštva monosaharida povezanih glikozidnim vezama. U prirodi imaju različite funkcije te tako neki služe kao tvari koje tvore strukture poput celuloze i hitina, dok drugi mogu služiti kao rezervne tvari (škrob, glikogen) ili tvari koje vežu vodu (agar, pektin) (Stadie, 2013).

Egzopolisaharidi (EPS) predstavljaju polisaharide koje mikroorganizmi tvore izvan stanice. Ti polisaharidi izgrađuju zrnca koja mogu poslužiti kao skladište hranjivih tvari, kao zaštita od dehidracije ili pak toksina i osmotskog stresa, ali i kao sredstvo za imobilizaciju stanica prisutnih mikroorganizama (Stadie, 2013).

Prema Zannini i sur. (2016), obzirom na sastav gradivnih jedinica, egzopolisaharid se dijele na heteropolisaharide sastavljene od različitih monomera te na homopolisaharide sastavljene od

jedne vrste monomera. Tako se primjerice EPS-i sastavljeni od glukoze nazivaju glukani dok su oni sastavljeni od fruktoze fruktani. Glukani se također dijele i ovisno o vrsti veza između monomernih jedinica pa tako postoje dekstrani (α -1,6-veze), mutani (1,3- i 1,6- veze), alternani (naizmjenične 1,3- i 1,6- veze) te reuterani (1,4- i 1,6-veze). Fruktani se dijele na one levanskog tipa (β -2,6- veze) te inulinskog tipa (β -2,1- veze).

Kao glavni proizvođači glukana i fruktana iz saharoze navode se bakterije mliječne kiseline (Korcz i Varga, 2021). U kefirnom napitku od egzopolisaharida najviše ima dekstrana, ali pronađeni su i fruktani levanskog tipa (Fels i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radna kultura

Tijekom ovog istraživanja korištena su kefirna zrnca iz privatnog uzgoja. Kefirna zrnca su održavana u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Kemikalije

U tablici 2 nalazi se popis kemikalija korištenih u ovom radu za pripremu hranjivih podloga i otopina te njihova čistoća i naziv proizvođača.

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

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Saharoza	99+ %	Liofilchem, Italija
Glukoza	99+ %	Fisher BioReagents, SAD
Fruktoza	99+ %	Fisher BioReagents, SAD
Octena kiselina	99+ %	Liofilchem, Italija
Manitol	99+ %	Molekula, UK
Glicerol	> 98 %	Acros Organics, SAD
Etanol	99 %	Acros Organics, SAD
DL-Mliječna kiselina	85 %	Sigma-Aldrich,SAD

3.1.3. Hranjive podloge

Hranjiva podloga korištena za umnažanje biomase kefirnih zrnaca te uzgoje u staklenkama i bioreктору predstavlja vodenu otopinu saharoze različitih koncentracija. Za potrebe umnažanja kefirnih zrnaca kao i za sve druge uzgoje, vodena otopina saharoze nije bila sterilizirana. Bitno je za napomenuti da tokom ovog istraživanja podloga nije sadržavala nikakve druge sastojke osim konzumnog šećera i vodovodne vode.

3.1.4. Aparatura i pribor

3.1.4.1. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB) je konstruiran kao cilindrična posuda od nehrđajućeg čelika ukupnog volumena 30 L. Postavljen je na ležajeve koji omogućuju rotaciju cijelog bioreaktora. Opremljen je sustavom za regulaciju rotacije. Duljina mu je 0,60 m, a unutarnji promjer 0,25 m. Na stijenkama u unutrašnjosti bioreaktora nalaze se dvije lopatice dimenzija 0,04 m visine i 0,60 m duljine koje osiguravaju bolje miješanje i homogenizaciju sadržaja.

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

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

3.1.4.3. Ostala aparatura

- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka)
- hladnjak i zamrzivač (Bosch, Njemačka)
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- centrifuga Bechman (Model J-21B)
- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- sušionik Instrumentaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga korištena za umnažanje i održavanje kefirnih zrnaca pripremljena je u Erlenmeyer tikvici volumena 3 L na način da je 60 g konzumnog šećera odnosno saharoze dodano u 2 L vodovodne vode pri čemu je koncentracija saharoze iznosila 30 g/L.

Za preliminarna istraživanja gdje je cilj bio određivanje optimalne koncentracije inokuluma, korištene su podloge u kojima je koncentracija saharoze iznosila 60 g/L. U velikoj tikvici od 5 L pripremljena je podloga na način da je u 3 L vodovodne vode dodano 180 g šećera. Podloga je potom raspoređena u 20 staklenih posudica ukupnog volumena 250 mL s poklopcem pri čemu je korisni volumen podloge u svakoj iznosio 150 mL. Tijekom uzgoja su staklenke temperirane u termostatu pri temperaturi od 25 °C.

U dijelu istraživanja u kojem je korišten horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB), podloga koncentracije šećera 30 g/L pripremljena je na način da je u 1,5 L vodovodne vode dodano 45 g saharoze. Podloga je s inokulumom prebačena preko lijevka u HRCB gdje se vršio uzgoj pri sobnoj temperaturi s obzirom da bioreaktor nije bio opremljen sustavom za regulaciju temperature.

3.2.2. Umnažanje biomase kefirnih zrnaca

Kefirna zrnca bilo je potrebno umnažati kako bi se osigurale dovoljne količine biomase za provođenje eksperimenata. Tekuća hranjiva podloga u kojoj je koncentracija saharoze iznosila 30 g/L, mijenjana je svaka 2-3 dana na način da su kefirna zrnca odvojena od podloge filtracijom, isprana pod mlazom vode te kasnije vraćena u svježju podlogu. Tikvica je bila začepljena vatenim čepom i termostatirana na temperaturi od 25 °C.

3.2.3. Određivanje optimalne količine inokuluma za proizvodnju kefirnog napitka

U preliminarnom istraživanju provedena je proizvodnja kefirnog napitka s dvije različite početne količine dodanih kefirnih zrnaca. Koncentracija saharoze u podlozi iznosila je 60 g/L budući da su istraživanja pokazala da pri tim koncentracijama supstrata ne dolazi do inhibicije prisutnih mikroorganizama (Kurtoić, 2020). Pripremljeno je 20 staklenki od 250 mL koje su napunjene sa 150 mL identične hranjive podloge koncentracije saharoze 60 g/L. Od toga je 10 staklenki inokulirano s 15 g, a preostalih 10 staklenki s 20 g zrnaca. Svaka 2-3 dana izuzimani su uzorci iz staklenki koji su potom bili analizirani. Fermentacija je trajala 30 dana pri temperaturi od 25 °C koja se pokazala kao optimalna za uzgoj (Piškor, 2020). Tokom cijelog vremena trajanja eksperimenta praćena je i promjena pH vrijednosti. Na kraju fermentacije, kefirna zrnca iz staklenki s različitim početnim masama dodanog inokuluma su izuzeta iz preostale tekuće podloge te su centrifugirana i osušena do konstantne mase kako bi se utvrdio udio suhe tvari na kraju uzgoja.

3.2.4. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u

U drugom dijelu istraživanja ispitana je mogućnost korištenja horizontalnog rotirajućeg cijevnog bioreaktora (HRCB-a) u proizvodnji kefirnog napitka pri čemu je istraživana utjecaj brzine kao i vrste rotacije bioreaktora na tijek fermentacije. U bioreaktor ukupnog volumena 30 L dodano je 1,5 L podloge koja je inokulirana s 10 % (m/V) inokuluma, na temelju zaključaka preliminarnog istraživanja, tako da je u konačnici u tekuću hranjivu podlogu dodano 150 g vlažnih zrnaca kefirnog napitka. Ukupno su provedena 3 eksperimenta s tri različite brzine okretaja bioreaktora (3, 5 i 7 okr/min). Eksperimenti su trajali do trenutka dok više nije bilo značajnije potrošnje šećera u podlozi.

Na temelju rezultata dobivenih u eksperimentima s konstantnom rotacijom, u daljnjem istraživanju s intervalnom rotacijom bioreaktora korištena je brzina od 7 okr/min. Provedena su ukupno dva eksperimenta pri čemu je u jednom slučaju vrijeme rotacije iznosilo 3, a drugom 9 minuta. Preostalo vrijeme unutar jednog sata (57 odnosno 51 minutu) bioreaktor je bio u mirovanju. Kao i u prethodnom slučaju, fermentacija je trajala do trenutka kada više nije bilo značajnije promjene koncentracije supstrata u podlozi. Tokom cijelog vremena trajanja eksperimenata, osim promjene koncentracije supstrata, praćena je i promjena koncentracija svih nastalih produkata. Također, praćena je i promjena pH vrijednosti podloge te je određen udio suhe tvari zrnaca na početku i kraju svakog uzgoja.

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. UPLC analiza

Tijekom svih eksperimenata u sklopu ovog diplomskog rada izuzeti su tekući uzorci hranjive podloge u kojoj su se nalazila zrnca kefirnog napitka. U uzorcima su određivane koncentracije supstrata i produkata koji su nastali tokom fermentacije. Prethodno UPLC analizi

uzorci su centrifugirani s ciljem uklanjanja proteina i ostalih komponenti koje bi mogle dovesti do oštećenja kolone.

U dvije Eppendorf kivete, u paraleli je otpipetirano 500 μL tekućeg dijela kefirnog napitka i 500 μL otopine cinkova sulfata heptahidrata koncentracije 100 g/L. Otopina je homogenizirana 20 sekundi pomoću vibromješača te ostavljena 10 minuta da se istalože proteini. Potom je uslijedilo dodatno centrifugiranje tijekom 15 minuta na 13500 okr/min da bi se odvojio supernatant od čvrstog dijela podloge. Po završetku centrifugiranja otpipetirano je po 750 μL otopine iz svake kivete u dvije nove kivete te im je dodana jednaka količina demineralizirane vode kako bi se uzorci dodatno razrijedili. Tako pripremljeni uzorci profiltrirani su kroz filter s porama veličine 0,2 μm i kao takvi korišteni za UPLC analizu.

3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari biomase kefirnog napitka

Početni udio suhe tvari određivan je na način da je izvagano 20 g vlažnih kefirnih zrnaca koji su stavljeni u prethodno osušenu i izvaganu Petrijevu zdjelicu. Nakon sušenja do konstantne mase iz razlike pune i prazne Petrijeve zdjelice dobivena je masa suhe tvari u 20 g zrnaca.

U eksperimentima s različitom količinom dodanog inokuluma, suha tvar je određena na kraju bioprocesa na način da je sadržaj staklenke preliven u prethodno izvagane Eppendorf kivete od 50 mL i centrifugiran pri 8500 okr/min 10 minuta. Potom je odliven supernatant, a kivete s biomasom stavljene su u sušionik i sušene do konstantne mase nakon čega su ponovno izvagane te je iz razlike u masi kivete zabilježena masa suhe tvari.

Kod eksperimenata u HRCB-u, na kraju fermentacije, kompletan sadržaj bioreaktora je ispražnjen i raspodijeljen u šest plastičnih kiveta od 500 mL koje su zatim centrifugirane 20 min pri 5000 okr/min. Supernatant je dekantiran, a biomasa je žlicom fizički prenesena u prethodno osušene i izvagane Petrijeve zdjelice. Dodatno, eventualno zaostali dijelovi biomase iz prvog centrifugiranja, isprani su i ponovno preneseni u prethodno osušene i izvagane Eppendorf kivete od 50 mL koje su potom centrifugirane 10 min na 8500 okr/min. Supernatant je odbačen, a kivete su zajedno s Petrijevim zdjelicama stavljene u sušionik na sušenje pri 80 °C do konstantne mase. Nakon sušenja i hlađenja u eksikatoru izračunata je masa suhe tvari prema formuli:

$$m_x = m_2 - m_1 \text{ [g]} \quad [1]$$

m_x - masa suhe tvari [g]

m_1 - masa prazne Petrijeve zdjelice ili Eppendorf kivete [g]

m_2 - masa Petrijeve zdjelice ili Eppendorf kivete sa suhom tvari nakon sušenja [g]

3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI

Kao pokazatelji uspješnosti procesa za svaki uzgoj određena je ukupna potrošnja supstrata, prinos produkata, koeficijenti konverzije supstrata u produkt te produktivnost (Marić i Šantek, 2009).

3.4.1. Potrošnja supstrata (ΔS)

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

S_0 - početna koncentracija supstrata [g]

S – konačna koncentracija supstrata [g]

3.4.2. Prinos produkata (Y_P)

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

P_0 - početna koncentracija produkta [g]

P - konačna koncentracija produkta [g]

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

$$Y_{P/S} = \frac{(P-P_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [\text{g/g}] \quad [4]$$

Y_P – prinos produkta [g]

ΔS – potrošnja supstrata [g]

3.4.4. Produktivnost (Pr)

$$\text{Pr} = \frac{Y_P}{t_U} \quad [\text{g/g dan}] \quad [5]$$

Y_P – prinos produkta [g]

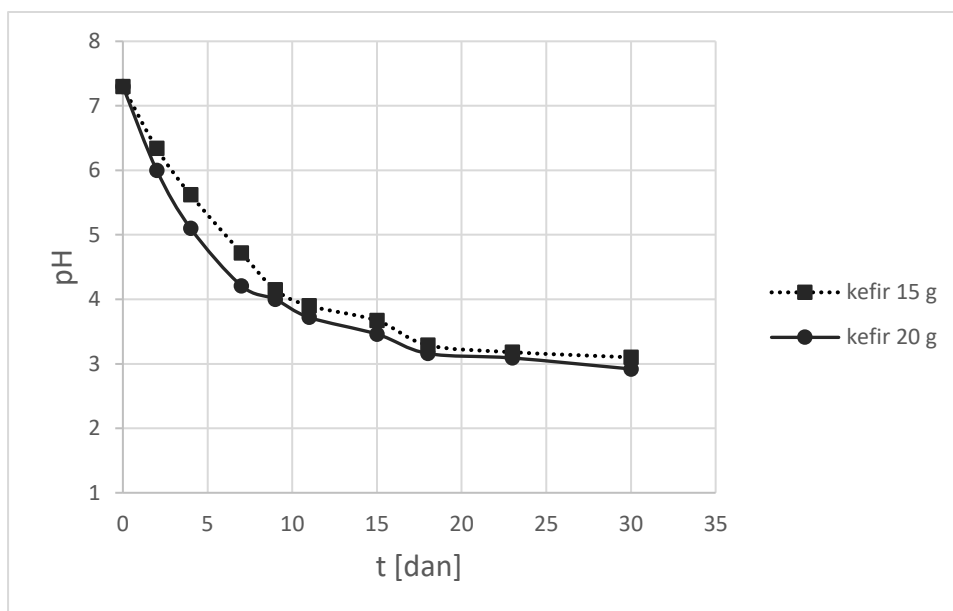
t_u – ukupno trajanje uzgoja [dan]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ovog diplomskog rada proučavan je utjecaj početne količine inokuluma na tijek i dinamiku odvijanja postupka proizvodnje kefirnog napitka te mogućnost korištenja HRCB-a u proizvodnji istog. U ovom poglavlju su prikazani i diskutirani rezultati dobiveni tijekom ovog istraživanja.

4.1. ODREĐIVANJE OPTIMALNE KOLIČINE INOKULUMA U PROIZVODNJI KEFIRNOG NAPITKA

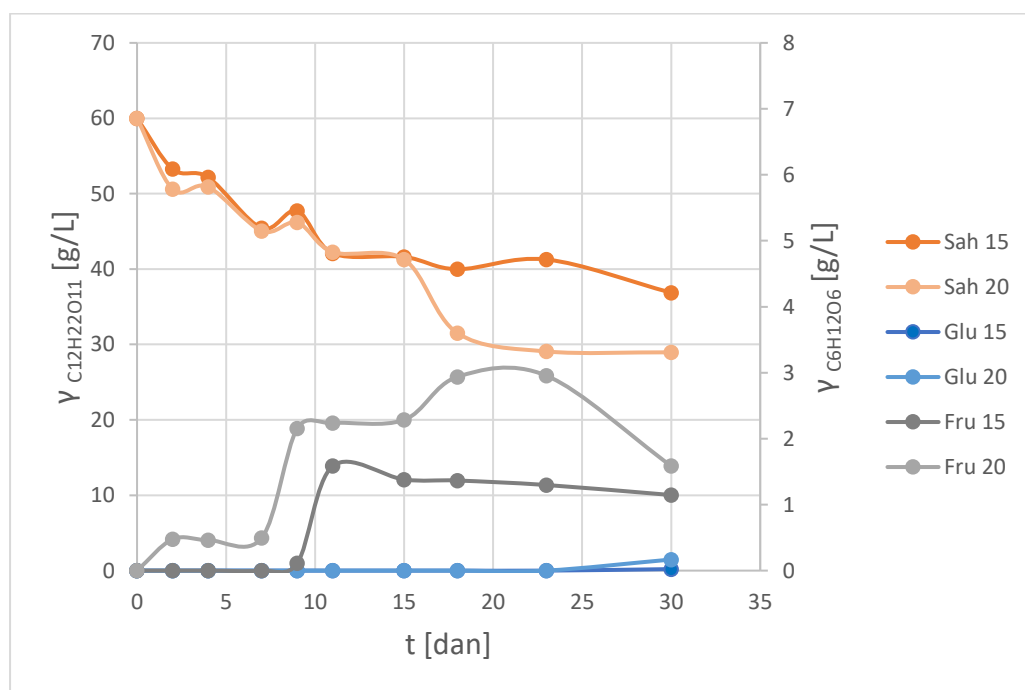
U ovom dijelu istraživanja su prikazani rezultati dobiveni preliminarnim istraživanjem u staklenkama s različitom početnom masom dodanog inokuluma. U jednom setu staklenki korišteno je 10 % (m/V) dodanih kefirnih zrnaca, a u drugom 13 % (m/V). Koncentracija saharoze u podlozi iznosila je 60 g/L temeljem rezultata prethodnih istraživanja (Kurtoić, 2020), a fermentacija se provodila pri temperaturi od 25 °C pri čemu su svaka 2-3 dana izuzimani uzorci za analizu.



Slika 4. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod eksperimenata u staklenkama s različitom početnom masom inokuluma

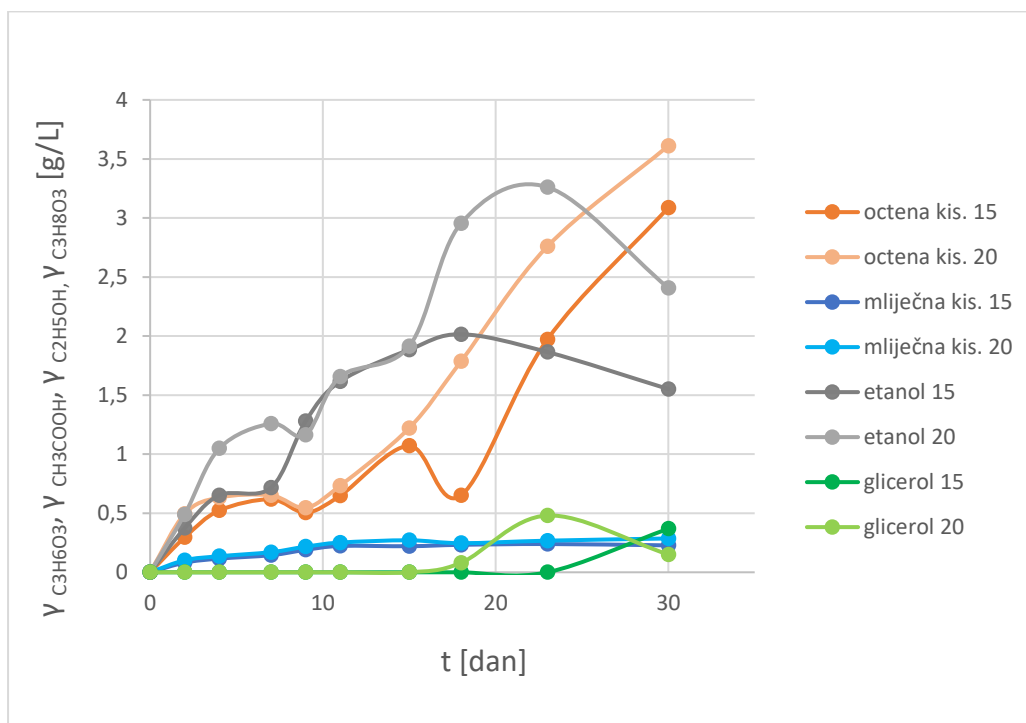
Iz rezultata prikazanih na slici 4 vidljivo je da pH vrijednost na početku uzgoja (0. dan) iznosi 7,3 dok posljednji dan uzgoja (30. dan) pH vrijednost iznosi 3,1 za uzgoj s početnom masom kefirnih zrnaca od 15 g odnosno 2,92 za uzgoj s početnom masom zrnaca od 20 g. Dinamika promjene ovog pokazatelja je slična u oba eksperimenta iako je u slučaju dodatka veće količine kefirnih zrnaca na početku fermentacije uočena nešto brža promjena što je i logično s obzirom na veću aktivnost prisutnih mikroorganizama. Smanjenje promjene pH vrijednosti u oba slučaja uočeno je nakon 18 dana kultivacije.

Slična dinamika uočena je i kod potrošnje supstrata (saharoze) u oba eksperimenta, prikazano na slici 5. U slučaju kada je početna količina inokuluma iznosila 20 g, na kraju eksperimenta je utrošena veća količina supstrata. Daljnja nemogućnost potrošnje saharoze ima veze s padom pH vrijednosti koja primarno utječe na sve prisutne mikroorganizme pa tako i kvasce koji su odgovorni za hidrolizu glavnog izvora ugljika.

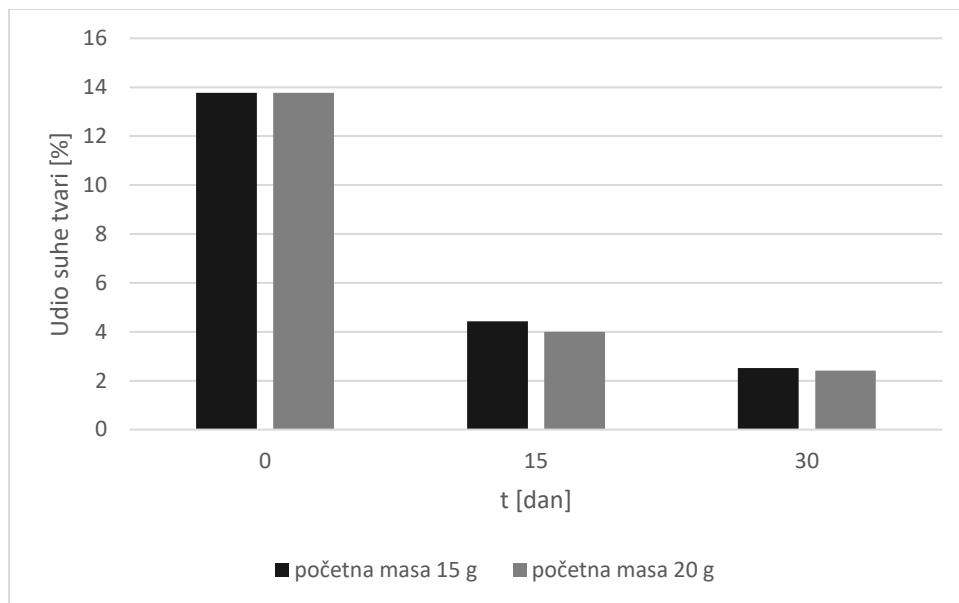


Slika 5. Promjena koncentracije šećera u ovisnosti o vremenu kod eksperimenata u staklenkama s različitim početnom masom inokuluma

Koncentracije produkata fermentacije prikazane su na slici 6. Vidljivo je kako su koncentracije mliječne kiseline, octene kiseline i etanola tijekom uzgoja bile više kod onih uzgoja s većom početnom masom inokuluma. Tijekom preliminarnih istraživanja nije bio zabilježen nastanak manitola dok je glicerol nastao u malim količinama pred kraj uzgoja i iznosio je 0,37 g/L za uzgoj s 15 g odnosno 0,15 g/L za uzgoj s 20 g. Koncentracija etanola počela se smanjivati pred kraj fermentacije, što je vrlo vjerojatno posljedica oksidacije u octenu kiselinu djelovanjem prisutnih bakterija. U skladu s time na kraju eksperimenta zabilježene su nešto više koncentracije octene kiseline u podlozi.



Slika 6. Promjene koncentracija produkata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenata u staklenkama s različitim početnom masom inokuluma



Slika 7. Promjena udjela suhe tvari u ovisnosti o vremenu kod eksperimenata u staklenkama s različitim početnom masom inokuluma

Što se tiče promjene udjela suhe tvari (slika 7) vidljivo je kako je došlo do značajnijeg pada udjela ako se usporedi početak, sredina i kraj eksperimenata. U oba slučaja, u eksperimentima s 15 i 20 g dodanih kefirnih zrnaca, došlo je do približno jednakog pada udjela, međutim nešto manji gubitak je uočen nakon 15. dana u slučaju dodatka manje količine inokuluma. Na raspad polisaharidnog matriksa mogla je utjecati primjerice niska vrijednost pH, a također je moguće da je dio polisaharidnog matriksa, zbog stresnog okruženja, iskorišten od strane prisutnih mikroorganizama kao dodatan izvor ugljika.

Pokazatelji uspješnosti ovog dijela istraživanja prikazani su u tablici 3. U slučaju veće količine dodanog inokuluma ostvareni su nešto veći prinosi produkata, koeficijenti konverzije te produktivnost bioprocesa. Očekivano, u tom slučaju utrošena je i veća količina supstrata. Ukupno gledano u ovom dijelu istraživanja nisu uočene značajnije razlike kada je dodana veća količina zrnaca na početku fermentacije pa je u daljnjim eksperimentima korišteno 10 % m/V zrnaca za inokulaciju podloge.

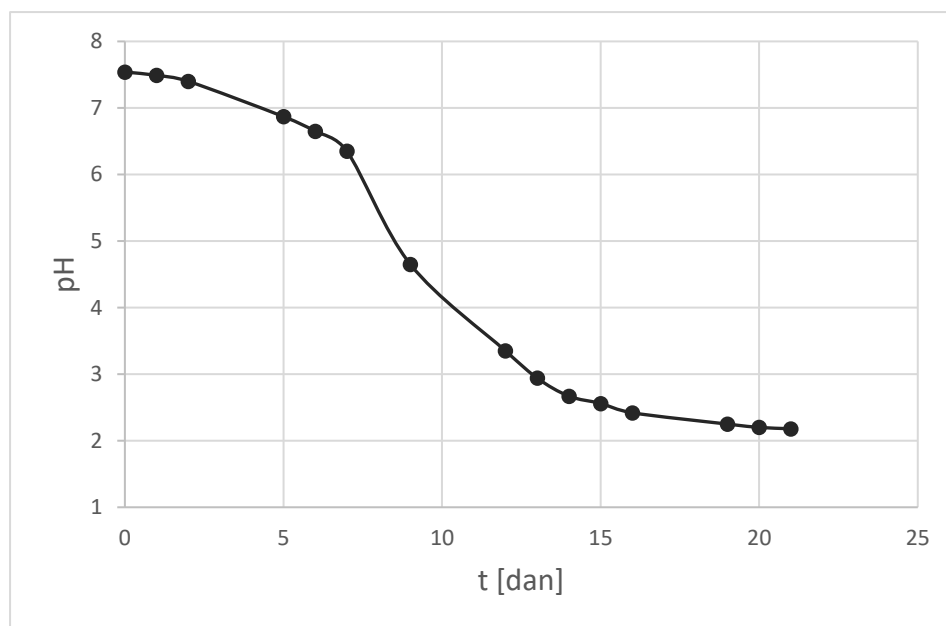
Tablica 3. Prikaz pokazatelja uspješnosti za uzgoje kod eksperimenata u staklenkama s različitom početnom masom inokuluma

Parametar / masa kefirnih zrnaca	15 g	20 g
ΔS [g]	23,1399	31,0462
$Y_{C_3H_6O_3}$ [g]	0,2277	0,2862
Y_{CH_3COOH} [g]	3,0880	3,6111
Y_{EtOH} [g]	1,5517	2,4076
$Y_{C_3H_8O_3}$ [g]	0,3689	0,1512
$Y_{C_6H_{14}O_6}$ [g]	0	0
$Y_{C_3H_6O_3/s}$ [g/g]	0,0098	0,0092
$Y_{CH_3COOH/s}$ [g/g]	0,1335	0,1163
$Y_{EtOH/s}$ [g/g]	0,0671	0,0775
$Y_{C_3H_8O_3/s}$ [g]	0,0160	0,0049
$Y_{C_6H_{14}O_6/s}$ [g/g]	0	0
$Pr (C_3H_6O_3)$ [g/g dan]	0,0076	0,0095
$Pr (CH_3COOH)$ [g/g dan]	0,1030	0,1204
$Pr (EtOH)$ [g/g dan]	0,0517	0,0802
$Pr (C_3H_8O_3)$ [g/g dan]	0,0123	0,0050
$Pr (C_6H_{14}O_6)$ [g/g dan]	0	0

4.2. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA PRI KONSTANTNOJ VRTNJI HRCB-A

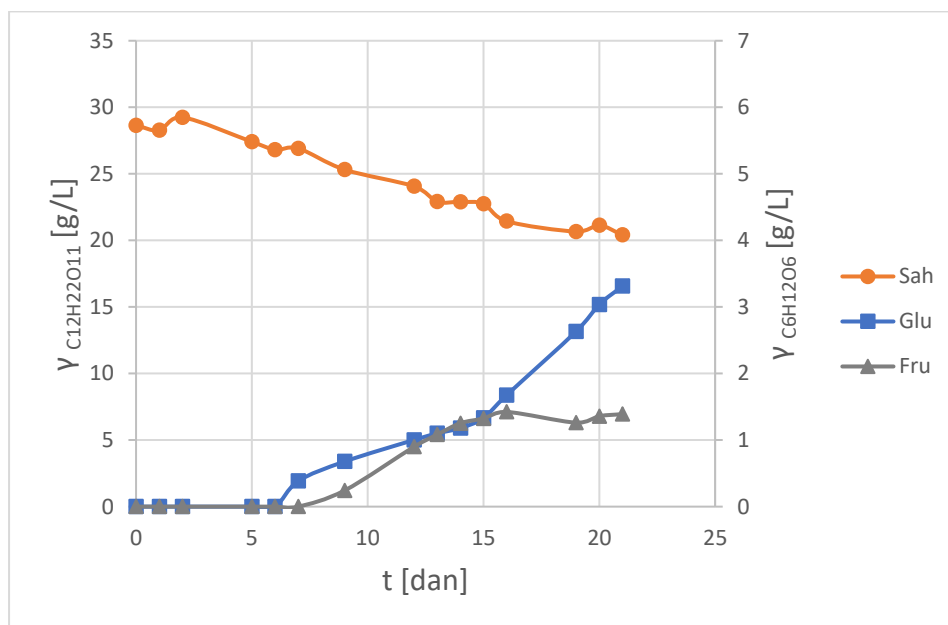
U ovome poglavlju su prikazani rezultati ostvareni prilikom proizvodnje kefirnog napitka u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije gdje su ukupno provedena tri eksperimenta s različitim brzinama okretanja (3, 5 i 7 okr/min). U eksperimentima je korišteno 10 % (m/V) inokuluma, odnosno 150 g kefirnih zrnaca dodano je u 1,5 L hranjive podloge. Također, s obzirom da u prethodnom istraživanju saharoza na kraju fermentacije nije bila u potpunosti utrošena, u eksperimentima u HRCB-u korištena je inicijalna koncentracija saharoze od 30 g/L. Kao i u svim prethodnim eksperimentima, tokom cijelog vremena trajanja fermentacije praćena je promjena koncentracija supstrata i produkata UPLC analizom, promjena pH vrijednosti podloge te promjena udjela mase suhe tvari. Uzgoji pri konstantnoj vrtnji HRCB-a su trajali 21, 15 te 13 dana.

4.2.1. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 3 okr/min



Slika 8. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 3 okr/min

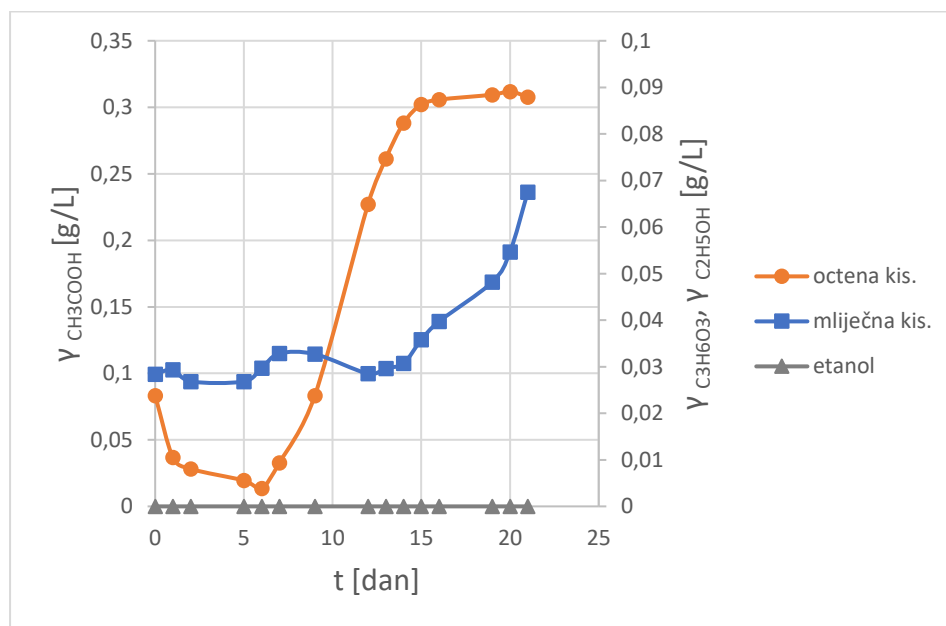
Na slici 8 vidljivo je da je pH vrijednost kod uzgoja s konstantnom vrtnjom od 3 okr/min nakon 7. dana pala s početne vrijednosti 7,54 na 4,65. Do kraja drugog tjedna uzgoja zabilježen je pad ispod 3 pH jedinice dok je zadnjih nekoliko dana uzgoja pH vrijednost bila približno konstantna i iznosila je 2,18. U usporedbi s preliminarnim istraživanjima u staklenkama gdje pH vrijednost nije od početka počela naglo padati, iz ovih rezultata može se zaključiti da su u slučaju fermentacije u HRCB-u postignuti bolji uvjeti za aktivnost mikroorganizama prisutnih u kefirnim zrnima. Također, s obzirom na činjenicu da je bilo prisutno miješanje tokom cijelog vremena trajanja fermentacije osiguran je bolji prijenos mase u sustavu.



Slika 9. Promjena koncentracija šećera u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 3 okr/min

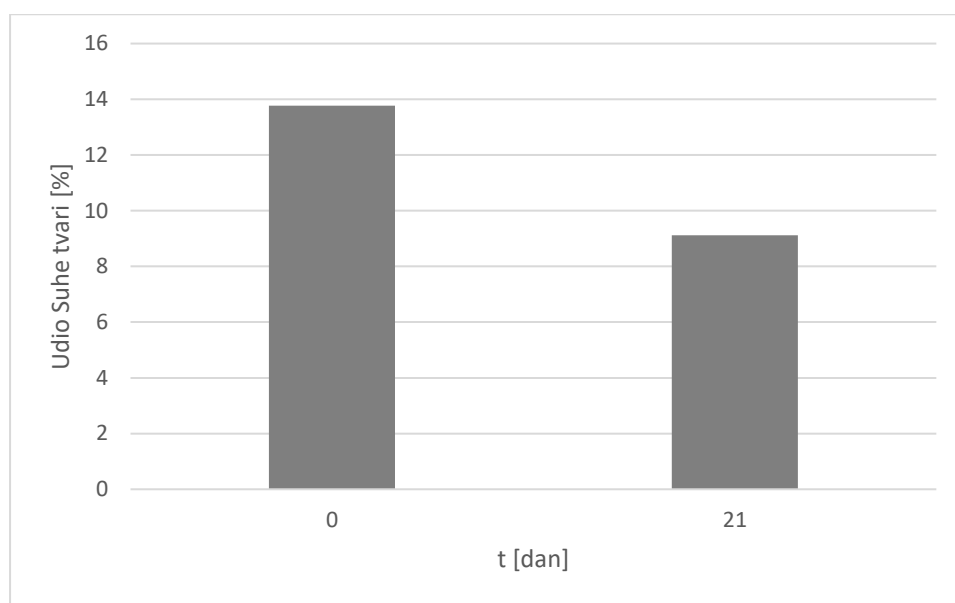
Bitno je za istaknuti da se saharoza nije značajnije trošila sve do 7. dana fermentacije (slika 9). Tada, s obzirom da je pH podloge bio povoljniji za aktivnost stanica kvasca, uočena je nešto brža potrošnja saharoze iz podloge da bi se pred kraj njena koncentracija ustalila na oko 20 g/L. Generalno gledajući cijeli bioproces je relativno dugo trajao, a razlog tome bi mogao biti nedostatak nutrijenata koji se inače dodaju kulturi kefirnih zrnaca da bi se pospješio njihov rast i sinteza produkata. Također, dokazano je da upravo taj nedostatak nutrijenata te eventualna prisutnost kisika

ima značajan utjecaj na mikrobiološki sastav kefirnih zrnaca te posljedično i na koncentracije praćenih produkata (slika 10) (Laureys i sur., 2018). Dobiveni rezultati su u skladu s prethodno navedenim istraživanjem te je i u našem slučaju nedostatna količina nutrijenata zajedno s prisutnim kisikom, čija koncentracija nije praćena tokom ovih eksperimenata, značajno doprinijela prevladavanju nekih vrsta bakterija i kvasaca u podlozi. U prvom redu bakterije mliječno-kiselog vrenja *Lb. hilgardii* te kvasca *D. bruxellensis* koji su inače prirodno prisutni u zrcima vodenog kefiru. Prevladavanje ovih vrsta mikroorganizama u podlozi značajno utječe na konačan sastav kefirnog napitka te je uočeno dulje trajanje bioprocesa te povećana proizvodnja octene kiseline u odnosu na količinu proizvedenog alkohola i mliječne kiseline (Laureys i sur., 2018). Ovoj tezi ide u prilog i činjenica da je upravo pri nižim pH vrijednostima zabilježeno povećanje koncentracija mliječne i octene kiseline, a upravo je optimalan pH za rast *Lb. hilgardii* 4,3 – 4,6 (Waldherr i sur., 2010) što je relativno nisko pH područje kada je riječ o bakterijama mliječno-kiselog vrenja. Nadalje, za neke vrste *D. bruxellensis* je dokazano da mogu preživjeti pri pH podloge od samo 2 pH jedinice (Laureys i sur., 2018). S obzirom da tokom cijelog vremena trajanja proizvodnje kefirnog napitka nije uočena značajnija količina proizvedenog etanola, vrlo vjerojatno nisu bili osigurani optimalni uvjeti za rast i proizvodnju kvasca *S. cerevisiae*.



Slika 10. Promjena koncentracija produkata u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 3 okr/min

Ono što je interesantno u dobivenim eksperimentalnim rezultatima vezano uz graf na slici 9 koji prikazuje promjenu dva produkta hidrolize saharoze - glukoze i fruktoze, jest da njihova koncentracija nakon 10 dana počinje rasti iako nisu postojali optimalni uvjeti za rast kvasaca *S. cerevisiae*, a s time niti invertazna aktivnost. Ovakvi rezultati vrlo su vjerojatno povezani s djelovanjem prethodno navedene bakterije *Lb. hilgardii* koja je jedna od nekoliko vrsta bakterija koje dokazano imaju mogućnost proizvodnje egzopolisaharida dekstrana pri čemu dolazi do hidrolize saharoze i nastanka ovih produkata (Lynch i sur., 2021).

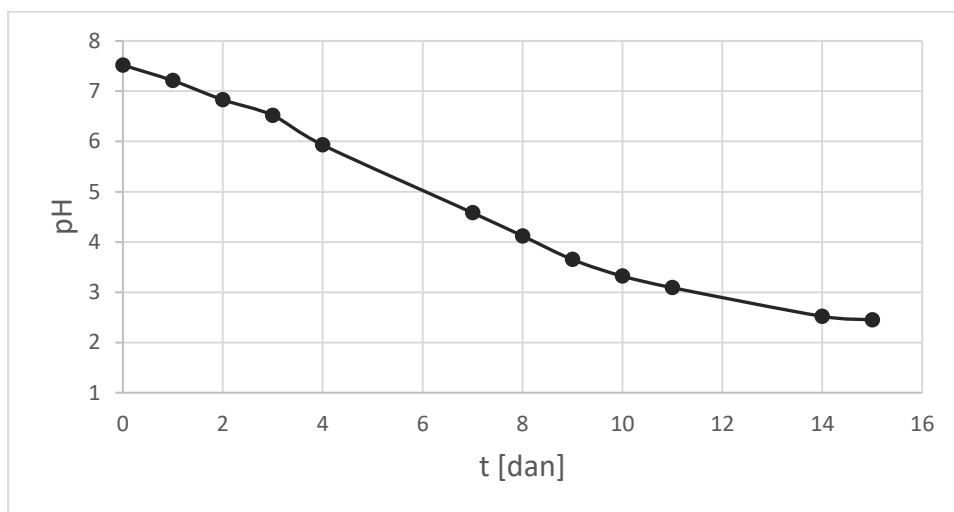


Slika 11. Promjena udjela suhe tvari u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 3 okr/min

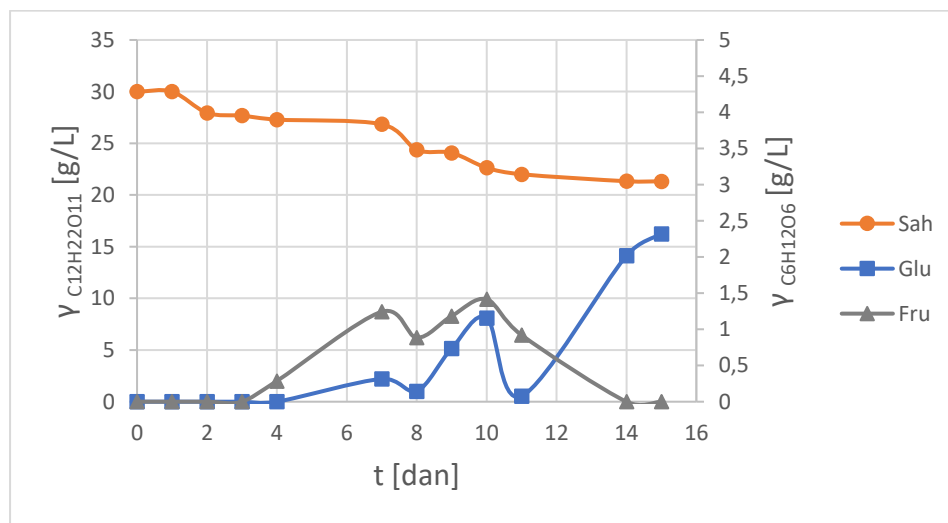
Udio suhe tvari na kraju uzgoja bio je 4,65 % manji u odnosu na početnu vrijednost (slika 11). Rezultati su u ovom slučaju bolji nego kod preliminarnih istraživanja gdje je zabilježen pad udjela suhe tvari u iznosu od 11,25 % odnosno 11,36 % u odnosu na početnu vrijednost (slika 7) što potkrepljuje činjenica da je moguće bila više izražena aktivnost bakterija odgovornih za sintezu EPS-a. Do raspada polisaharidne strukture zrnaca kefirnog napitka i u ovom je slučaju došlo zbog nepovoljnih uvjeta, prvenstveno zbog niske pH vrijednosti podloge, a moguće i zbog konstantne rotacije bioreaktora (Davidović i sur., 2015).

4.2.2. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 5 okr/min

Na slici 12 prikazana je promjena vrijednosti pH tijekom konstantne vrtnje pri 5 okr/min koja pada gotovo linearano s početne vrijednosti 7,52 na 2,45 nakon 15 dana uzgoja. Potrošnja saharaže (slika 13) također se ubrzala nakon 7. dana kada je pH vrijednost iznosila otprilike 4,5.

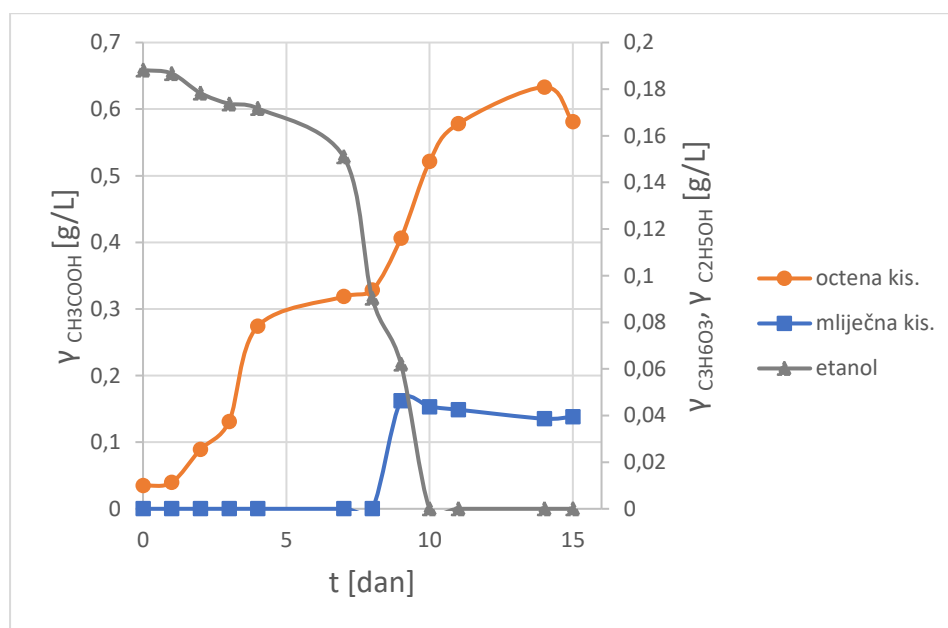


Slika 12. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 5 okr/min

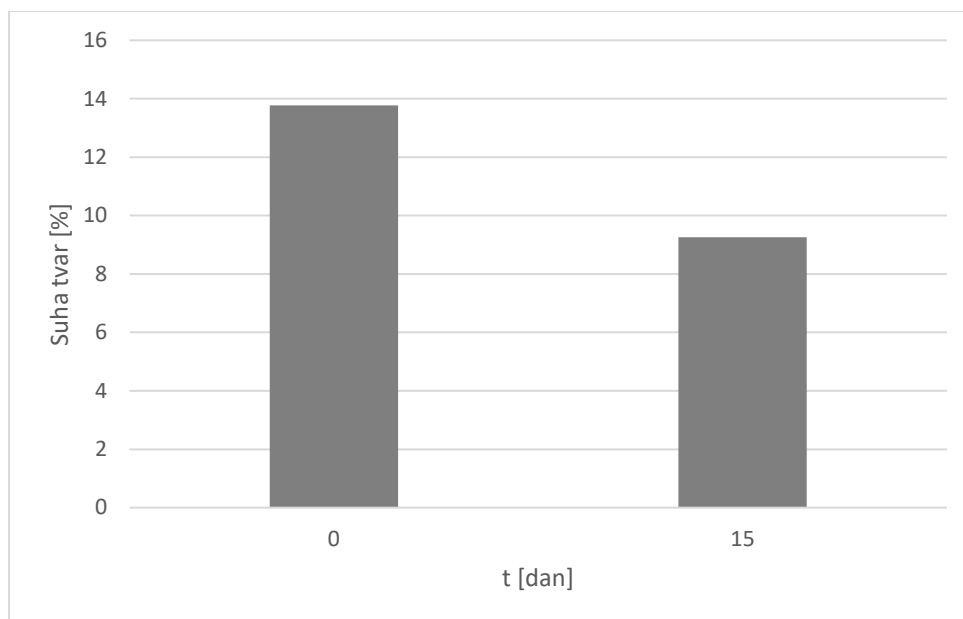


Slika 13. Promjena koncentracija šećera u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 5 okr/min

Promjene navedenih parametara gotovo se poklapaju s promjenama zabilježenim tijekom uzgoja kod konstantne vrtnje HRCB-a pri brzini 3 okr/min. Veće razlike zabilježene su samo kod promjena koncentracija produkata. Tako je primjerice na slici 14 zabilježen nastanak otprilike dva puta veće koncentracije octene kiseline u odnosu na prijašnji uzgoj. Poznato je naime da su neke vrste roda *Acetobacter* zaslužne za proizvodnju octene kiseline iz etanola u kefirnom napitku (Lynch i sur., 2021). Ovoj činjenici ide u prilog i promjena koncentracije etanola u podlozi koji je na kraju eksperimenta u potpunosti utrošen. Nastanak mliječne kiseline zabilježen je tek nakon 8. dana kada je pH vrijednost iznosila otprilike 4 pH jedinice što predstavlja pogodne uvjete za već spomenutu bakteriju mliječno-kiselog vrenja *Lb. hilgardii* koja je vjerojatno i u ovom uzgoju bila zaslužna za njen nastanak. Aktivnost ove bakterije očituje se i u promjenama koncentracija glukoze i fruktoze koje su zabilježene pred kraj fermentacije. Dokazano je da ima sposobnost proizvodnje EPS-a pri čemu nastaju slobodna glukoza i fruktoza (Laureys i sur., 2019).



Slika 14. Promjena koncentracija produkata u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 5 okr/min

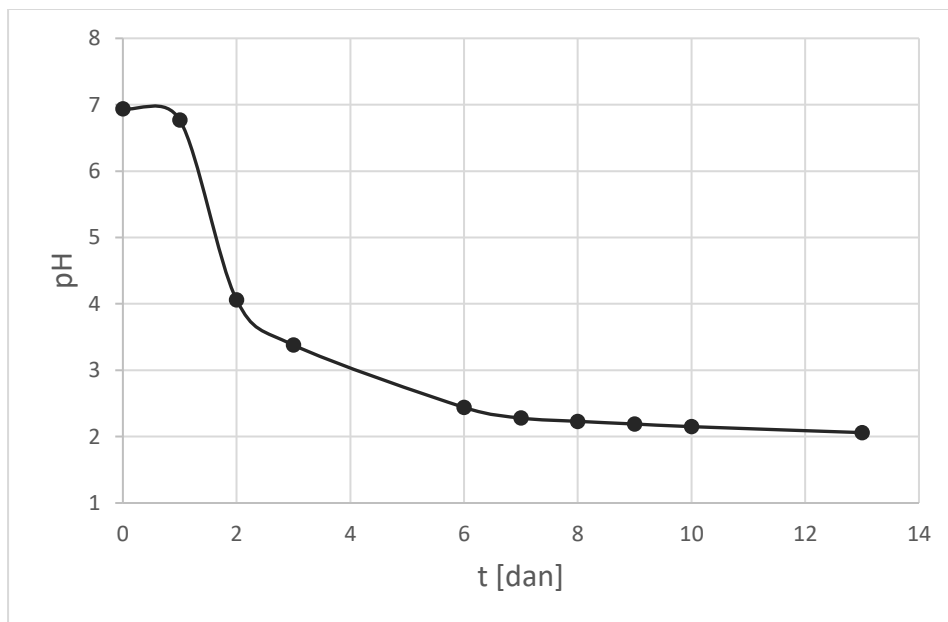


Slika 15. Promjena udjela suhe tvari u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 5 okr/min

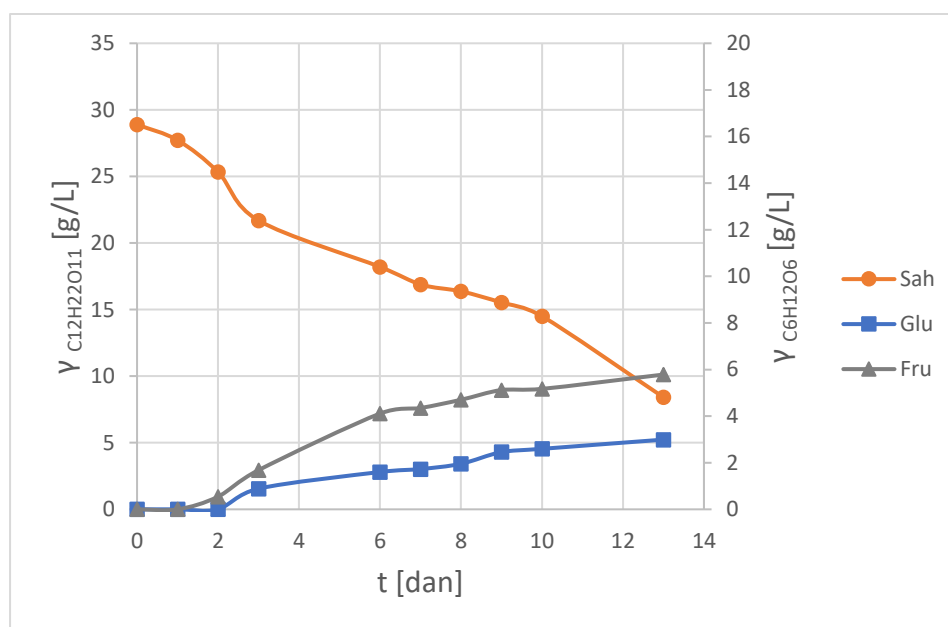
Udio suhe tvari minimalno se razlikuje u odnosu na prijašnji uzgoj te je došlo do smanjenja od 4,51 % naspram početnog udjela što je vidljivo na slici 15, što je rezultat sličan ostvarenom u prethodnom eksperimentu.

4.2.3. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 7 okr/min

Promjena pH vrijednosti tijekom konstantne rotacije HRCB-a pri 7 okr/min prikazana je na slici 16. Nagli pad zabilježen je već nakon drugog dana kada je iznosio oko 4 pH jedinice. Do kraja uzgoja ta se vrijednost spustila do 2,06 pH jedinica što je ujedno i najniža zabilježena vrijednost u svim eksperimentima. Ovo je najvjerojatnije posljedica nešto veće mikrobne aktivnosti što potkrepljuje i činjenica da ovaj pad koincidira s brзом potrošnjom izvora ugljika kojeg je u podlozi nakon 13 dana uzgoja zaostalo 8,4 g/L (slika 17).

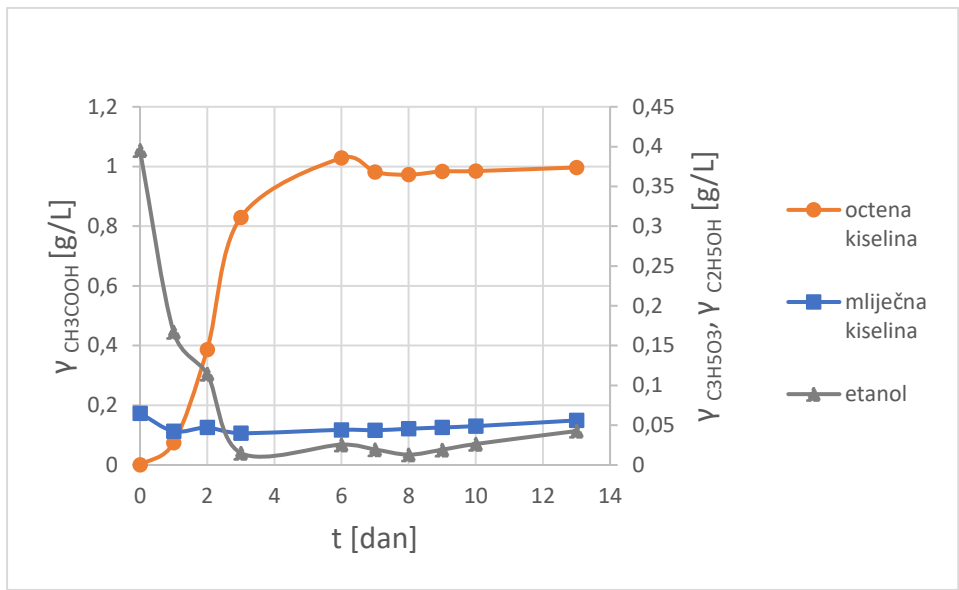


Slika 16. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 7 okr/min

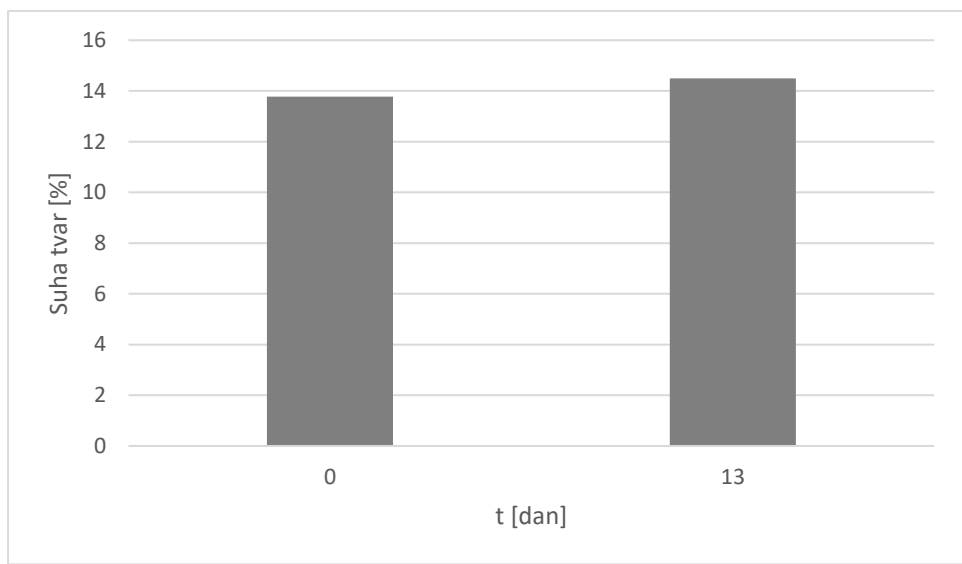


Slika 17. Promjena koncentracija šećera u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 7 okr/min

Izvor ugljika utrošen je u prvom redu za sintezu octene kiseline čije su koncentracije najviše u ovom eksperimentu (slika 18), ali i u odnosu na ostale produkte. Blagi porast koncentracije ostalih produkata kao što su etanol i mliječna kiselina uočeni su pred kraj bioprocesa.



Slika 18. Promjena koncentracija produkata u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 7 okr/min



Slika 19. Promjena udjela suhe tvari u ovisnosti o vremenu kod konstantne rotacije bioreaktora pri brzini od 7 okr/min

Također, upravo je ovaj uzgoj karakterističan i po tome što je došlo do porasta suhe tvari na kraju fermentacije u iznosu od oko 0,73 % (slika 19) tako da je vrlo vjerojatno dio supstrata utrošen na sintezu egzopolisaharidnog matriksa. Ovaj rezultat je u skladu s činjenicom da je pred kraj istraživanja uočeno povećanje koncentracija produkata hidrolize saharoze - glukoze i fruktoze iako je pH podloge bio nepovoljan za aktivnost stanica kvasca.

U tablici 4 sumarno su pokazani rezultati uspješnosti bioprocesa proizvodnje kefirnog napitka pri različitim brzinama rotacije HRCB-a.

Tablica 4. Prikaz izračunatih procesnih parametara za uzgoje kod konstantne brzine rotacije

Parametar / brzina vrtnje	3 okr/min	5 okr/min	7 okr/min
ΔS [g]	8,2374	8,6759	20,4854
$Y_{C_3H_6O_3}$ [g]	0,0391	0,0395	0,0110
Y_{CH_3COOH} [g]	0,2245	0,5463	0,9969
Y_{EtOH} [g]	0	0	0
$Y_{C_3H_8O_3}$ [g]	0	0	0
$Y_{C_6H_{14}O_6}$ [g]	0	0	0
$Y_{C_3H_6O_3/S}$ [g/g]	0,0047	0,0046	0,0005
$Y_{CH_3COOH/S}$ [g/g]	0,0273	0,0630	0,0487
$Y_{EtOH/S}$ [g/g]	0	0	0
$Y_{C_3H_8O_3/S}$ [g]	0	0	0
$Y_{C_6H_{14}O_6/S}$ [g/g]	0	0	0
$Pr(C_3H_6O_3)$ [g/g dan]	0,0019	0,0026	0,00004
$Pr(CH_3COOH)$ [g/g dan]	0,0107	0,0364	0,0769
$Pr(EtOH)$ [g/g dan]	0	0	0
$Pr(C_3H_8O_3)$ [g/g dan]	0	0	0
$Pr(C_6H_{14}O_6)$ [g/g dan]	0	0	0

Generalno gledano, u ovom dijelu istraživanja može se zaključiti da je veća brzina okretaja HRCB-a imala pozitivan učinak i na proizvodnju kefirnog napitka i na kraće vrijeme trajanja fermentacije. Bolje izmješavanje imalo je za posljedicu bolji prijenos nutrijenata i sprječavanje lokalnih gradijenata koncentracije kako supstrata tako i produkata. Ovo je vrlo važno za napomenuti

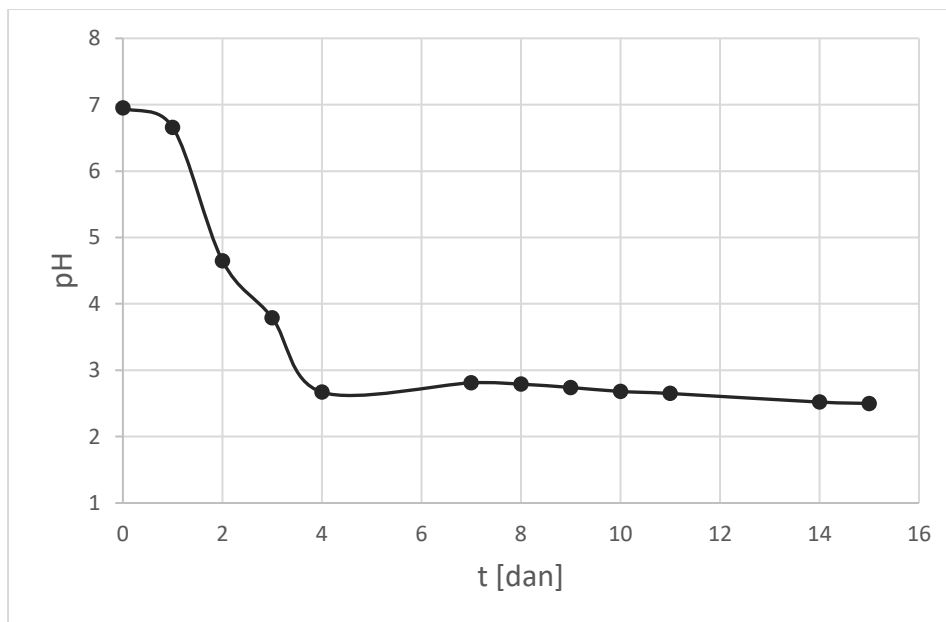
jer je na taj način spriječen negativan utjecaj kiselina kao inhibitora na aktivnost prisutnih mikroorganizama. Za bolji sastav kefirnog napitka na kraju fermentacije potrebno je provesti dodatnu optimizaciju procesa s posebnim naglaskom na limitaciju izloženosti procesa kisiku iz zraka kao i osiguravanju svih nutrijenata koji značajno utječu na mikrobiološki sastav zrnaca kefirnog napitka pa tako i na sastav ciljanih produkata.

4.3. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA KORIŠTENJEM INTERVALNE ROTACIJE

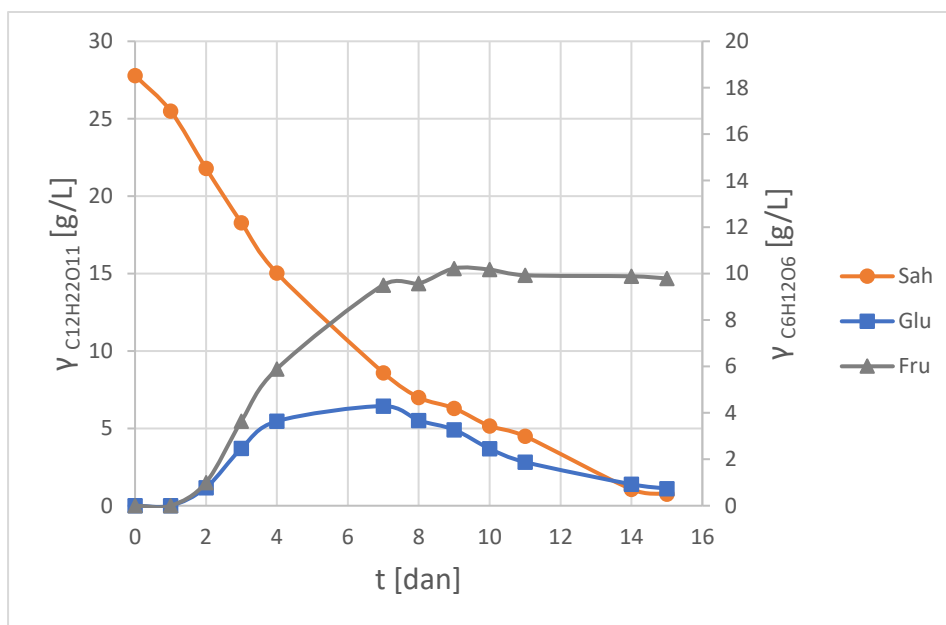
U ovom poglavlju su prikazani rezultati proizvodnje kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije. Intervalna rotacija provedena je na način da se bioreaktor okretao određenom brzinom unutar jednog sata pri čemu je ostatak vremena sustav bio u mirovanju. Provedena su dva eksperimenta s vremenima rotacije od 3 i 9 minuta (57 i 51 minuta mirovanje). Na temelju rezultata ostvarenih u eksperimentima s konstantnom rotacijom odlučeno je da će se koristiti brzina od 7 okr/min. I u ovim eksperimentima je korišteno 10 % (m/V) inokuluma te 1,5 L hranjive podloge pri čemu je početna koncentracija saharoze iznosila 30 g/L. Uzgoji su provedeni na sobnoj temperaturi s obzirom na činjenicu da bioreaktor ne posjeduje sustav za regulaciju temperature. Tokom cijelog vremena trajanja fermentacije praćena je promjena koncentracije supstrata i nastalih produkata UPLC analizom, vrijednost pH podloge te promjena udjela suhe tvari.

4.3.1. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 3 minute pri brzini rotacije od 7 okr/min

U ovom dijelu istraživanja zabilježena je slična dinamika odvijanja bioprocasa kao i u eksperimentu s konstantnom rotacijom bioreaktora pri čemu je brzina rotacije iznosila 7 okr/min. U usporedbi sa svim rezultatima koji su dobiveni tokom izrade ovog diplomskog rada, u ovom slučaju zabilježen je najviši utrošak saharoze (slika 21).

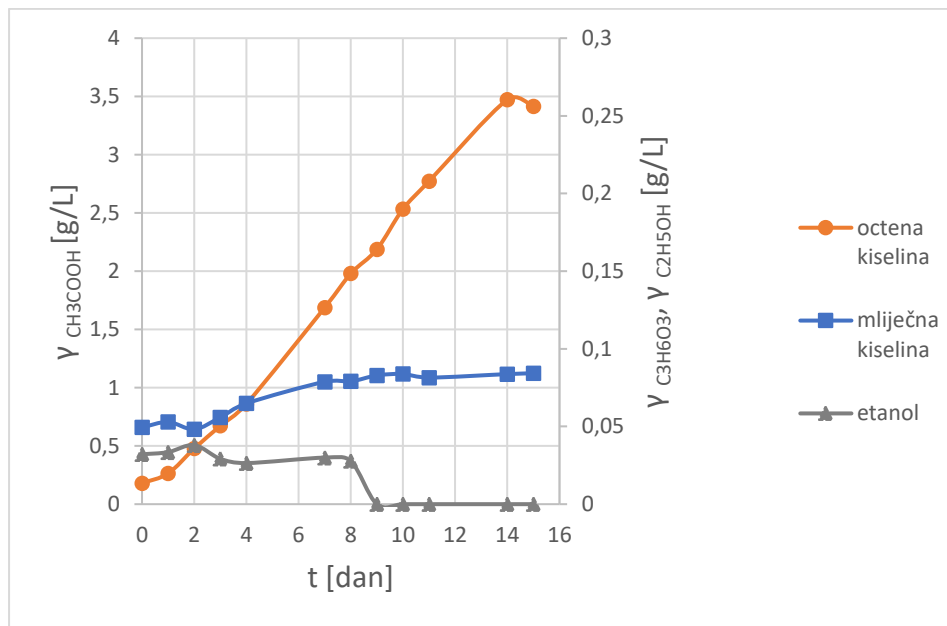


Slika 20. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije bioreaktora u trajanju 3 min/h



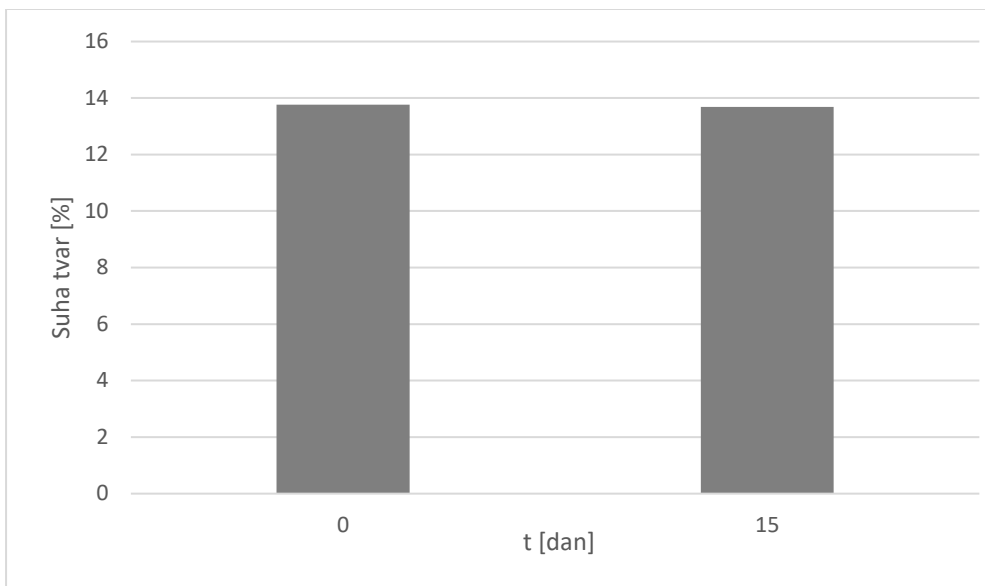
Slika 21. Promjena koncentracija šećera u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije bioreaktora u trajanju 3 min/h

Povećana mikrobnost vidljiva je na slici 22 gdje je koncentracija proizvedene octene kiseline čak 3 puta veća u usporedbi s uzgojem gdje je korištena kontinuirana rotacija. U prvih nekoliko dana fermentacije, s obzirom da je pH podloge bio u granicama optimalnim za rast kvasca *S. cerevisiae*, povećana mu je aktivnost što je vidljivo po porastu koncentracija glukoze i fruktoze u podlozi.



Slika 22. Promjena koncentracija produkata u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije bioreaktora u trajanju 3 min/h

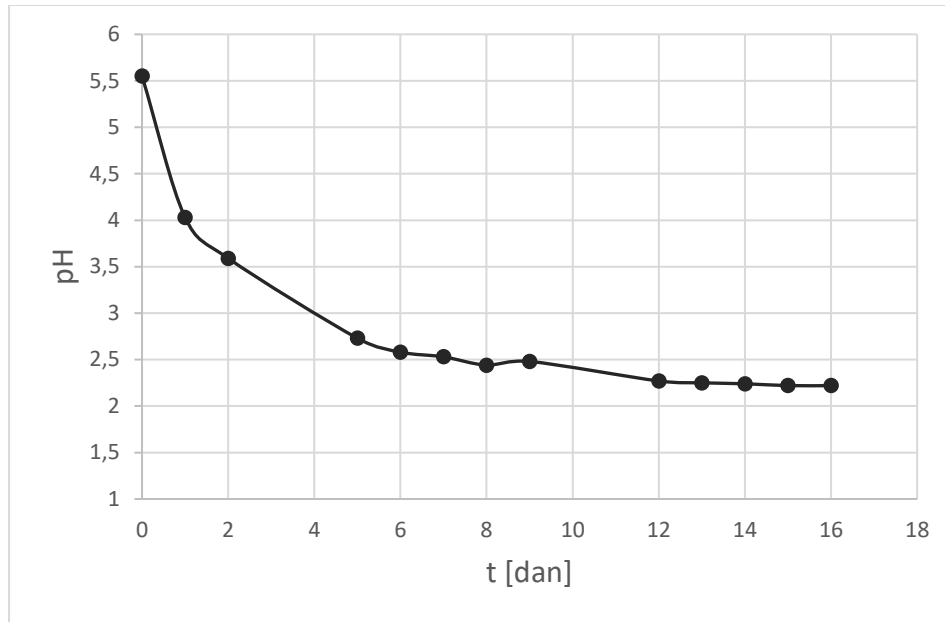
Daljnijim smanjenjem pH vrijednosti podloge (slika 20) smanjena je kvašćeva pa tako i invertazna aktivnost pri čemu se glukoza u podlozi primarno troši, a zaostaje fruktoza čija je koncentracija na kraju iznosila 10 g/L (slika 21). Uočen je i blagi porast koncentracije etanola u dijelu dok je postojala kvašćeva aktivnost. S protekom vremena koncentracija mu se smanjuje s obzirom da je došlo do njegove oksidacije. Također, kao i u prethodnim eksperimentima, zbog podloge siromašne na nutrijentima, i ovdje je vjerojatno došlo do prevladavanja nekih vrsta bakterija mliječno-kiselog vrenja, a moguće i kvasaca što je već prethodno objašnjeno. Postotak suhe tvari (slika 23) ostao je gotovo nepromijenjen što znači da nije došlo do značajnije denaturacije niti sinteze u datim uvjetima.



Slika 23. Promjena udjela suhe tvari u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije bioreaktora u trajanju 3 min/h

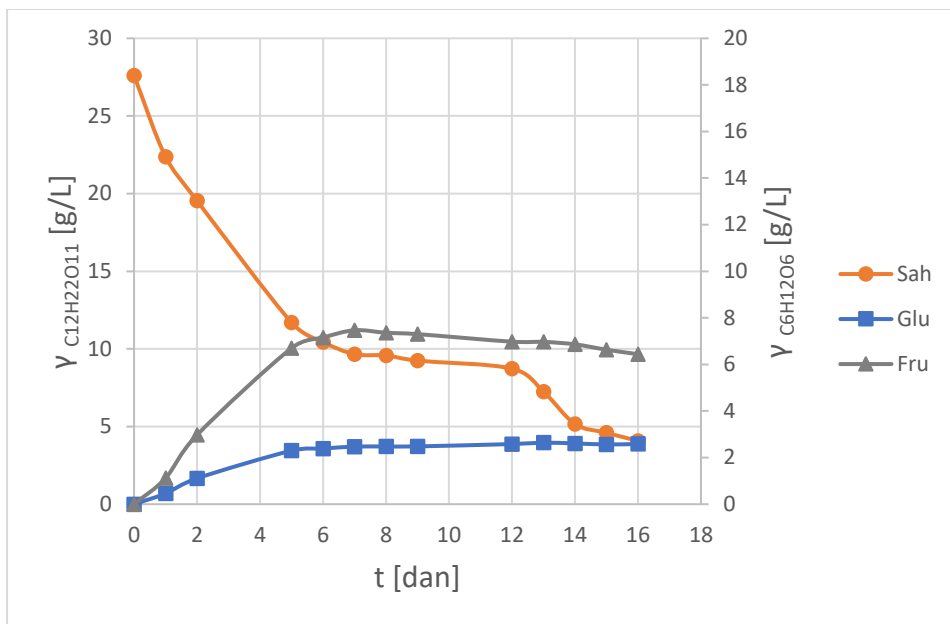
4.3.2. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 9 minuta pri brzini rotacije od 7 okr/min

Posljednji eksperiment s intervalnom rotacijom proveden je na način da je brzina rotacije, kao i u prethodnom slučaju, iznosila 7 okr/min. Razlika između ovog i prethodnog eksperimenta s intervalnom rotacijom jest da je u ovom slučaju faza rotacije produžena za dodatnih šest minuta te je iznosila 9 minuta. Preostalo vrijeme, 51 minutu unutar jednog sata, sustav je bio u mirovanju.

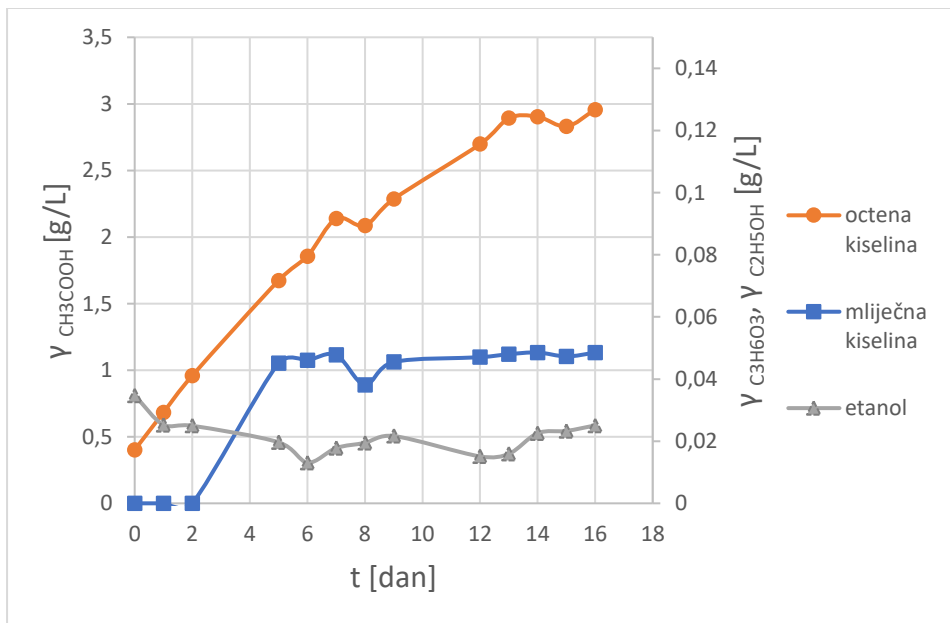


Slika 24. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije bioreaktora u trajanju 9 min/h

Dinamika i ostvareni rezultati su slični u usporedbi s prethodnim eksperimentom. Najveća brzina potrošnje saharoze (slika 25) zabilježena je u prvih 6 dana fermentacije nakon čega njena potrošnja značajnije opada. Ovaj rezultat je posljedica značajnijeg pada pH vrijednosti podloge (slika 24) što se primarno reflektira na aktivnost kvasca *S. cerevisiae* koji primarno omogućuje korištenje saharoze za sve prisutne mikroorganizme. Razlika između ovog i prethodnog slučaja, gdje je daljnja potrošnja glukoze zabilježena i kod niskih pH vrijednosti, jest da nakon 6. dana kada je pH podloge pao ispod 2,5 pH jedinica nije zabilježena daljnja potrošnja produkata hidrolize saharoze. Hidroliza se jednim dijelom nastavila, međutim znatno sporije i moguće da je to posljedica djelovanja prisutnih bakterija mliječno-kiselog vrenja koje imaju sposobnost hidrolize tog disaharida.

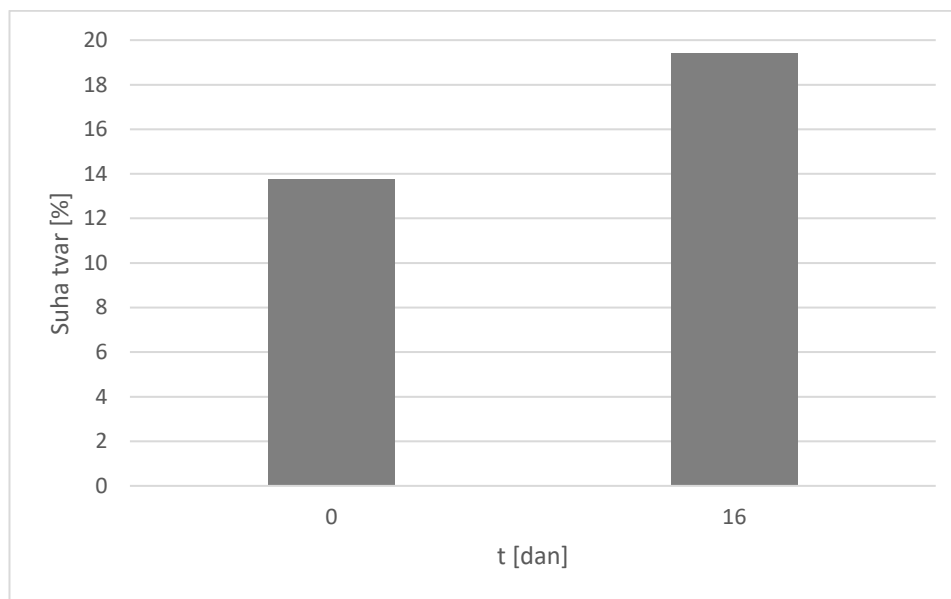


Slika 25. Promjena koncentracija šećera u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije bioreaktora u trajanju 9 min/h



Slika 26. Promjena koncentracija produkata u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije bioreaktora u trajanju 9 min/h

S obzirom da nakon 6. dana nisu zabilježene daljnje promjene produkata detektiranih u tekućem dijelu podloge, osim octene kiseline (slika 26), očigledno je da je zbog prisutnih inhibitora u podlozi mikroba aktivnost svedena na minimum ili u potpunosti zaustavljena. Također, konačan sastav podloge odgovara rezultatima sličnih istraživanja gdje je utvrđeno da izloženost kulture kefirnih zrnaca zraku te podloga siromašna na nutrijentima uzrokuju veće omjere proizvedene octene i mliječne kiseline s obzirom na količinu proizvedenog etanola. Za takav ishod odgovorne su u prvom redu neke od vrsta prisutnih bakterija te kvasac *D. bruxellensis* za kojeg je utvrđeno da može rasti u podlogama s jako niskim pH vrijednostima (pH=2). Također, ovaj kvasac dokazan je producent octene kiseline te je vjerojatno njegova aktivnost utjecala na konačnu koncentraciju u podlozi.



Slika 27. Promjena udjela suhe tvari u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije bioreaktora u trajanju 9 min/h

Na slici 27 se može uočiti porast udjela suhe tvari na kraju fermentacije od čak 5,63 % u odnosu na početnu vrijednost što je najveći zabilježeni udio tijekom svih uzgoja. Ovakav povećan prinos suhe tvari mogao bi se objasniti kao odgovor mikroorganizama na stresne uvjete u podlozi odnosno niske vrijednosti pH. U tablici 5 prikazane su vrijednosti procesnih parametara ostvarenih

kod korištenja intervalne rotacije bioreaktora u proizvodnji kefirnog napitka. Potrošnja supstrata kao i prinosi produkata vidljivo su veći za uzgoje kod intervalne rotacije u odnosu na uzgoje pri konstantnoj rotaciji (tablica 4) iako su i u ovom slučaju, zbog samih uvjeta fermentacije, ostvareni mali prinosi mliječne kiseline i etanola na kraju postupka.

Tablica 5. Prikaz izračunatih procesnih parametara za uzgoje kod intervalne rotacije

Parametar / trajanje vrtnje po satu	3 min	9 min
ΔS [g]	27,0274	25,5248
$Y_{C_3H_6O_3}$ [g]	0,0348	0,0485
Y_{CH_3COOH} [g]	3,2366	2,5556
Y_{EtOH} [g]	0	0
$Y_{C_3H_8O_3}$ [g]	0	0
$Y_{C_6H_{14}O_6}$ [g]	0	0
$Y_{C_3H_6O_3/S}$ [g/g]	0,0013	0,0021
$Y_{CH_3COOH/S}$ [g/g]	0,1198	0,1086
$Y_{EtOH/S}$ [g/g]	0	0
$Y_{C_3H_8O_3/S}$ [g]	0	0
$Y_{C_6H_{14}O_6/S}$ [g/g]	0	0
$Pr(C_3H_6O_3)$ [g/g dan]	0,0023	0,0030
$Pr(CH_3COOH)$ [g/g dan]	0,2158	0,1597
$Pr(EtOH)$ [g/g dan]	0	0
$Pr(C_3H_8O_3)$ [g/g dan]	0	0
$Pr(C_6H_{14}O_6)$ [g/g dan]	0	0

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ostvarenih tokom ovog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Preliminarnim istraživanjem provedenim u staklenkama s različitom početnom količinom dodanog inokuluma utvrđene su minimalne razlike u dinamici odvijanja fermentacije kefirnog napitka. U slučaju veće količine dodanog inokuluma u konačnici je utrošeno nešto više saharoze dok su koncentracije konačnih produkata bile neznatno više.
2. S obzirom na minimalne razlike u rezultatima kod fermentacije u staklenkama za daljnja istraživanja u HRCB-u korišteno je 10 % m/V kefirnih zrnaca kao inokulum. Također s obzirom na činjenicu da je u podlozi na kraju fermentacije zaostalo dosta neiskorištene saharoze, njena inicijalna koncentracija u fermentacijama u biorektoru bila je 50 % manja u odnosu na uzgoj u staklenkama.
3. Kod eksperimenata s konstantnom rotacijom HRCB-a najviše supstrata je utrošeno u eksperimentu gdje je korištena brzina rotacije od 7 okr/min. U tom slučaju zabilježene su i najviše koncentracije produkata, octene kiseline (0,689 g/L) i etanola (0,043 g/L) u usporedbi s preostala dva eksperimenta s konstantnom rotacijom. Također, fermentacija je u tom slučaju trajala najkraće (13 dana), te je u konačnici uočen prirast suhe tvari biomase, najvjerojatnije kao odgovor na stresne uvjete kojima su mikroorganizmi bili izloženi (nizak pH).
4. Najbolji rezultati i prinosi produkata tokom ovog istraživanja ostvareni su korištenjem intervalne rotacije biorektora pri čemu su ostvarene minimalne razlike u masi utrošenog supstrata kao i sintezi produkata u dva provedena eksperimenta. Razlog navedenim rezultatima i dinamici odvijanja bioprocasa leži u činjenici da je u slučaju konstantne rotacije vrlo vjerojatno došlo do denaturacije, a moguće i ispiranja mikroorganizama s površine zrnaca koja praktički služi kao sredstvo za imobilizaciju. Kod intervalne rotacije sustav je bio većinom u mirovanju, i na taj način su izbjegnute navedene pojave.
5. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor moguće je koristiti u biotehnološkoj proizvodnji kefirnog napitka, međutim s obzirom na kompleksnost proizvodnje i brojne parametre koji utječu na tijek odvijanja fermentacije, potrebno je provesti dodatna istraživanja s ciljem daljnje optimizacije proizvodnje.

6. LITERATURA

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.

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.

Collado MC, Hernandez M, Sanz Y (2005) Production of Bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium strains. *J Food Prot* **68**, 1034-1040. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.1034>

Davidović SZ, Miljković MG, Antonović DG, Rajilić-Stojanović MD, Dimitrijević-Branković SI (2015) Water Kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hem Ind* **69**, 595-604. <https://doi.org/10.2298/HEMIND140925083D>

Eckel VPL (2020) Lifestyle and functional properties of lactobacilli and bifidobacteria in water kefir (doktorski rad) Technische universität München, München.

Eckel VPL, Ziegler LM, Vogel RF, Ehrmann M (2019) Bifidobacterium tibiigranuli sp. nov. isolated from homemade water kefir. *Int J Syst Evol Microbiol* **70**, 562-1570. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003936>

Feldmann H (2005) Yeast metabolism. Yeast molecular biology, Adolf Butenandt-Institut, München.

Fels L, Jakob F, Vogel RF, Wefers D (2018) Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydr Polym.* **89**, 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>

Gänzle MG (2015) Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Opin Food Sci* **2**, 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>

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.

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>

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>

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>

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>

Korc E, Varga L (2021) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends Food Sci Technol* **110**, 375-384. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>

Kršev Lj (1996) Utjecaj bakterija mliječne kiseline na zdravlje ljudi. *Mljekarstvo* **46**, 57-65. <https://hrcak.srce.hr/94983>

Kurtoić D (2020) Optimiranje uvjeta uzgoja *tibicosa* na saharozi (diplomski rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (2011) *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, London, UK, str. 2354.

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>

Laureys D, Aerts M, Vandamme P, De Vuyst L (2019) The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation. *Front Microbiol* **10**, 2876. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02876>

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>

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>

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>

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>

Marić V, Šantek B (2009) Biokemijsko inženjerstvo, 1.izd., Golden Marketing -Tehnička knjiga, Zagreb.

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>

Piškor D (2020) Optimizacija uvjeta proizvodnje kefirnog napitka na tršćanom šećeru (diplomski rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Pogačić T, Šinko S, Zamberlin Š, Samaržija D (2013) Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo* **63**, 3-14. <https://hrcak.srce.hr/98224>

Raspor P, Goranović D (2008) Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit Rev Biotechnol* **28**, 101-124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>

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>

Stadie (2013) Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir (doktorski rad) Technische Universität München, München.

Waldherr FW, Doll VM, Meißner D, Vogel R F (2010) Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiol*, **27**, 672-678. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.013>

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>

Zannini E, Waters DM, Coffey A, Arendt EK (2016) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 1121-1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>

PRILOZI

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

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

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

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta