

Proizvodnja kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem

Nejedly, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:729867>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Petra Nejedly

PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA U BIOREAKTORU S ČVRSTIM SLOJEM

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

Zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Mladenu Pavlečiću na pruženoj prilici izrade ovog diplomskog rada, stručnim savjetima, susretljivosti te izdvojenom vremenu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

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

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj potpori i razumijevanju za vrijeme pisanja ovog diplomskog rada i tijekom cjelokupnog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA U BIOREAKTORU S ČVRSTIM SLOJEM

Petra Nejedly, univ. bacc. ing. biotechn.

0058213831

Sažetak:

Kefirni napitak je fermentirani proizvod s probiotičkim učinkom. Dobiva se fermentacijom vodene otopine šećera, s mogućnošću dodatka voća kao izvora faktora rasta za sve mikroorganizme prisutne u kefirnim zrnima. U preliminarnom dijelu ovog istraživanja ispitan je utjecaj različitog vremena trajanja ekstrakcije (30 min, 45 min i 60 min) suhih smokvi na sastav podloge za proizvodnju kefirnog napitka u staklenkama te je utvrđeno da je najveća koncentracija šećera u hranjivoj podlozi postignuta nakon 60 minuta ekstrakcije. Na temelju rezultata preliminarnog istraživanja u drugom dijelu ovog diplomskog rada korišteno je upravo to vrijeme ekstrakcije (60 minuta) za pripremu hranjive podloge za proizvodnju kefirnog napitka, u bioreaktoru s čvrstim slojem, kod tri različite brzine protoka podloge ($7,2 \text{ mL min}^{-1}$, 28 mL min^{-1} i 112 mL min^{-1}). Najbolji rezultati postignuti su uz protok od 112 mL min^{-1} jer je u tom uzgoju postignut najbolji prijenos mase u sustavu te je postignuta veća koncentracija različitih produkata karakterističnih za kefirni napitak. Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu mogućnost upotrebe ovog tipa bioreaktora za proizvodnju kefirnog napitka u većem mjerilu.

Ključne riječi: kefirni napitak, zrnca kefirnog napitka, ekstrakt smokve, protok, bioreaktor s čvrstim slojem

Rad sadrži: 46 stranica, 16 slika, 9 tablica, 42 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mladen Pavlečić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mario Novak
2. izv. prof. dr. sc. Mladen Pavlečić
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos

Datum obrane: 18. prosinca 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing
Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

PRODUCTION OF WATER KEFIR DRINK IN A FIXED-BED BIOREACTOR

Petra Nejedly, univ. bacc. ing. biotechn.
0058213831

Abstract:

Water kefir drink is a probiotic drink. It is obtained by fermentation of an aqueous solution of sugar, with the possibility of adding fruit as a source of growth factors for microorganisms found in water kefir grains. In preliminary part of this research, the influence of different extraction times of dried figs for the preparation of a medium for production of water kefir drink was examined. The highest concentration of extracted substrate in the medium was achieved after 60 minutes. Identical medium was used in the second part of this research where the possibility of using a fixed-bed bioreactor was examined. Three experiments with different medium flow rates were conducted. Experiment conducted with the flow rate of 112 mL min^{-1} showed best results because the best transport of the mass in the system has been achieved. Possibility of using fixed-bed bioreactor in the production of water kefir drink was proved.

Keywords: water kefir, water kefir grains, fig extract, flow, fixed-bed bioreactor

Thesis contains: 46 pages, 16 figures, 9 tables, 42 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Mladen Pavlečić, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Mario Novak, PhD, Assistant professor
2. Mladen Pavlečić, PhD, Assistant professor
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor
4. Blaženka Kos, PhD, Full professor

Thesis defended: December 18th, 2024

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KEFIRNI NAPITAK.....	2
2.2. KEFIRNA ZRNCA.....	4
2.3. USPOREDBA KEFIRNOG NAPITKA I MLIJEČNOG KEFIRA.....	5
2.4. MIKROORGANIZMI PRISUTNI U ZRNCIMA KEFIRNOG NAPITKA.....	6
2.4.1. Bakterije mliječne kiseline.....	7
2.4.2. Bakterije octene kiseline.....	7
2.4.3. Bifidobakterije.....	8
2.4.4. Kvasci.....	9
2.5. MEĐUSOBNi UTJECAJ MIKROORGANIZAMA PRIRODNO PRISUTNIH U ZRNCIMA KEFIRNOG NAPITKA.....	10
2.6. UPOTREBA SUŠENOG VOĆA U PROIZVODNJI KEFIRNOG NAPITKA.....	11
2.7. BIOREAKTOR S ČVRSTIM SLOJEM.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Hranjiva podloga.....	13
3.1.2. Radni mikroorganizmi.....	13
3.1.3. Kemikalije.....	14
3.1.4. Aparatura i pribor.....	14
3.1.4.1. Bioreaktor s čvrstim slojem.....	14
3.1.4.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti (UPLC).....	15
3.1.4.3. Ostala aparatura i pribor.....	15
3.2. METODE RADA.....	16
3.2.1. Priprema hranjive podloge.....	16
3.2.2. Preliminarna proizvodnja kefirnog napitka u staklenkama.....	16
3.2.3. Proizvodnja kefirnog napitka u bioreктору s čvrstim slojem kod različitih protoka hranjive podloge.....	17
3.3. ANALITIČKE METODE.....	18
3.3.1. Priprema uzorka za UPLC analizu.....	18
3.3.2. Određivanje suhe tvari zrnaca kefirnog napitka.....	18
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI.....	20

3.4.1. Potrošnja supstrata (ΔS).....	20
3.4.2. Prinos produkta (Y_p).....	20
3.4.3. Produktivnost (Pr).....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. UTJECAJ RAZLIČITOG VREMENA EKSTRAKCIJE SUHIH SMOKVI NA SASTAV PODLOGE ZA PROIZVODNJU KEFIRNOG NAPITKA U STAKLENKAMA.....	21
4.2. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA U BIOREAKTORU.....	31
5. ZAKLJUČCI.....	42
6. LITERATURA.....	43

1. UVOD

Fermentirana hrana i pića, u novije vrijeme, privlače sve veću pažnju potrošača zbog činjenice da jačaju imunitet i općenito pozitivno utječu na zdravlje čovjeka. Djeluju kao antioksidansi i antikarcinogeni te posjeduju protuupalno i probiotičko djelovanje (Tireki, 2022). Jedan od takvih proizvoda je upravo i kefirni napitak (engl. water kefir). To je tradicionalno i blago gazirano piće, karakterizirano voćnim i kiselkastim okusom, s visokim udjelom mliječne kiseline (do 2 %) i relativno malim udjelom alkohola (uobičajeno manje od 1 %) koje se dobiva nakon što kefirna zrnca provedu fermentaciju vodene otopine šećera u koju se može dodati sušeno ili svježe voće (Moretti i sur., 2022). Opisani napitak raširen je po cijelom svijetu, ali porijeklo kefirnih zrnaca i dalje ostaje nepoznanica. Pretpostavka je da polisaharidni matriks zrnca potječe iz mesnatog lišća kaktusa indijske smokve. Važno je istaknuti da kefirni napitak sadrži mikroorganizme (probiotike) uz koje se često veže pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Spominju se, na primjer, bakterije iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, ali i kvasci iz roda *Saccharomyces* (Marsh i sur., 2013). Bakterije mliječne kiseline djeluju blagodatno na sastav crijevne mikrobne kulture, utječu na metabolizam kolesterola i apsorpciju kalcija te djeluju antimikrobno i antimutageno. Bakterije mliječne kiseline su već stoljećima sastavni dio ljudske prehrane i mogu se smatrati prirodnim načinom opskrbe probavnog sustava aktivnim tvarima (Nejedly, 2021). U proizvodnji kefirnog napitka, saharoza se većinom koristi kao izvor ugljika dok svježe ili sušeno voće predstavlja izvor dušika. Premda postoje brojni izvori ugljika i dušika, poput grožđa, jagoda, jabuka ili mrkve, koji se mogu koristiti u proizvodnji kefirnog napitka, najčešće se koriste svježe ili sušene smokve (Tireki, 2022). Eksperimenti prikazani u ovom diplomskom radu, provedeni su s ciljem ispitivanja mogućnosti korištenja hranjive podloge dobivene ekstrakcijom suhih smokvi, pri različitim vremenima zadržavanja, u proizvodnji kefirnog napitka. Na temelju rezultata dobivenih u preliminarnom dijelu izrade ovog diplomskog rada (uzgoj u staklenkama) provedeno je ispitivanje mogućnosti korištenja bioreaktora s čvrstim slojem u biotehnološkoj proizvodnji kefirnog napitka.

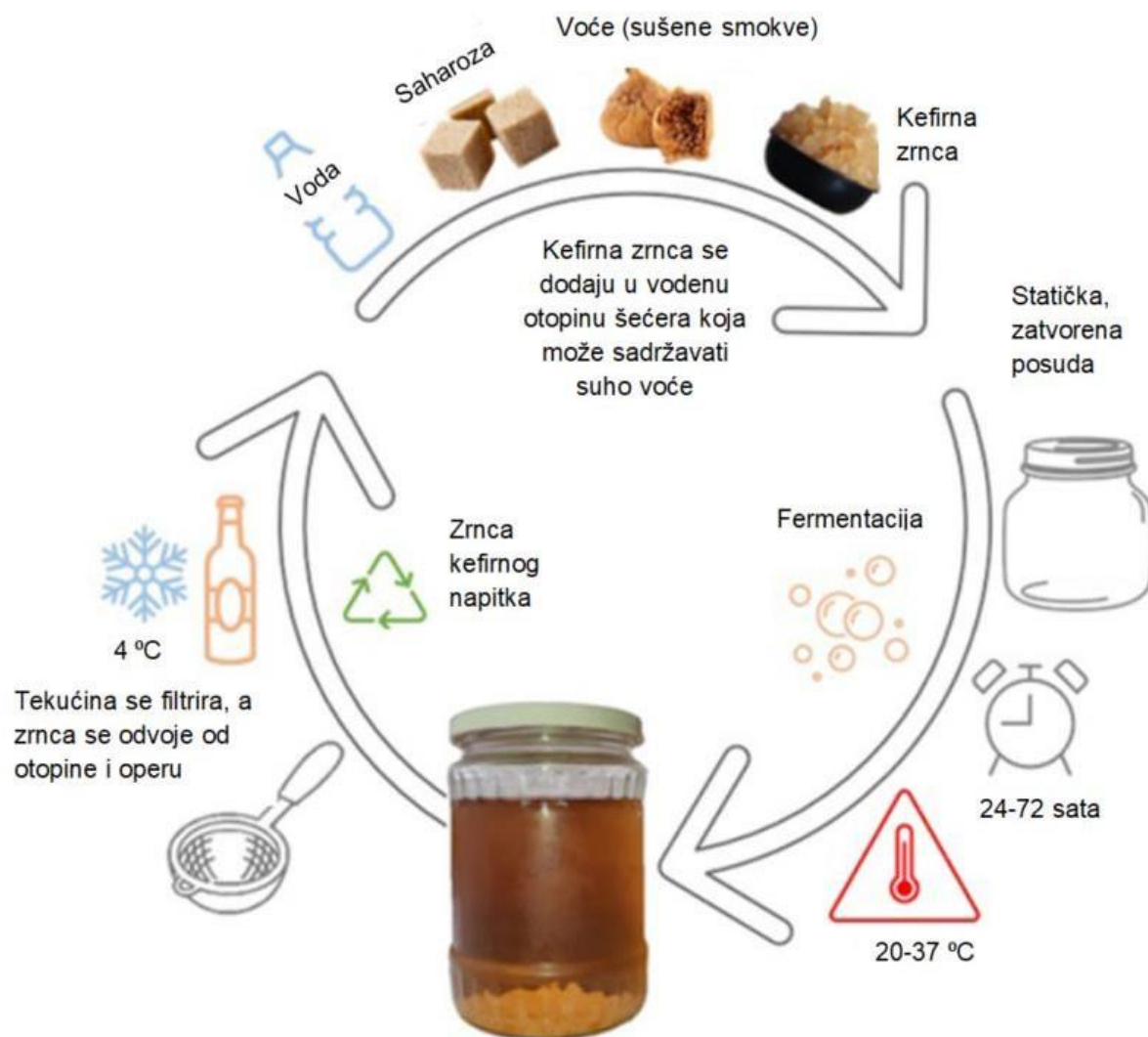
2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEFIRNI NAPITAK

Kefirni napitak je gazirani napitak proizveden dodatkom kefirnih zrnaca u vodenu otopinu šećera uz ili bez dodatka suhog voća. Nakon 2 do 4 dana fermentacije na sobnoj temperaturi pripremljen je alkoholni, gazirani napitak kiselog te voćnog okusa, ukoliko se u hranjivu podlogu dodalo sušeno voće (Kurtoić, 2020). Smokve, datulje, grožđice, limun i đumbir mogu se dodati u podlogu da bi se osigurali faktori rasta za prisutne mikroorganizme, a ujedno doprinose i ugodnom okusu kefirnog napitka (Nejedly, 2021).

U usporedbi s mliječnim kefirom, inače poznatijim od kefirnog napitka, koji osigurava značajne količine proteina, kao i probiotika te prebiotika, kefirni napitak može biti zanimljiva alternativa za izvor probiotika i prebiotika koju mogu konzumirati osobe alergične na mliječne proizvode (Pavlečić i sur., 2024).

Kefirni napitak trenutno se najčešće proizvodi u kućanstvima, kako je prikazano na slici 1. Međutim, postoji nekoliko manjih postrojenja koja proizvode kefirni napitak. Fermentacija je proces koji je teško kontrolirati pa može postati nestabilna, što čini proizvodnju kefirnog napitka relativno kompleksnim postupkom jer nemogućnost kontroliranja fermentacije dovodi do promjene u sastavu finalnog proizvoda. Osim toga, može doći i do problema s aktivnošću prisutnih mikroorganizama, što utječe na ponovno korištenje zrnaca, ali i uzrokuje teškoće prilikom prijenosa proizvodnje u veće mjerilo (Piškor, 2020).



Slika 1. Tradicionalna proizvodnja kefirnog napitka (prema Cufaoglu i Erdinc, 2023)

2.2. KEFIRNA ZRNCA

Inokulum za proizvodnju kefirnog napitka su tzv. kefirna zrnca. Građena su od polisaharidnog matriksa (većinom dekstrana i manje količine levana) u koji su ugrađeni mikroorganizmi, odgovorni za fermentaciju kefirnog napitka, tvoreći složenu strukturu (Moretti i sur., 2022). Kada se zrnca kefirnog napitka dodaju u hranjivu podlogu, dio mikroorganizama se odvoji od zrnaca, ali većina ostaje vezana (Laureys i sur., 2019). U mikroorganizme koji se nalaze u sastavu kefirnih zrnaca ubrajaju se bakterije mliječne kiseline, bakterije octene kiseline, bifidobakterije te kvasci (Moretti i sur., 2022). Zrnca imaju promjer od 5 do 20 mm, želatinaste su strukture i nepravilnog oblika koji podsjeća na cvjetaču, kao što je vidljivo na slici 2. Mogu biti bijele do sivkaste boje, no na boju može utjecati boja voća primijenjenog u napitku. Ova se zrnca nakon procesa fermentacije mogu isprati te ponovo iskoristiti za sljedeću pripremu kefirnog napitka (Tireki, 2022), a poznata su i pod nazivom Tibicos koji potječe iz Meksika (Romero-Luna i sur., 2020).



Slika 2. Zrnca kefirnog napitka (*prema* Guzel-Seydim i sur., 2021)

2.3. USPOREDBA KEFIRNOG NAPITKA I MLIJEČNOG KEFIRA

Mliječni kefir i kefirni napitak tradicionalno se proizvode od različitih jedinstvenih želatinoznih zrnaca koje sadrže probiotike, a poznata su kao zrnca mliječnog kefira i zrnca kefirnog napitka (Guzel-Seydim i sur., 2021). Zrnca kefirnog napitka sadrže dekstran, polimer glukoze, uglavnom sastavljen od linearnih bočnih lanaca povezanih α -D-1,6 i α -1,3 glikozidnim vezama. To je glavna razlika u odnosu na mliječni kefir čija se zrnca sastoje od složenijeg heteropolisaharida zvanog kefiran (Coma i sur., 2019). Ostale razlike između kefirnog napitka i mliječnog kefira prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Usporedba kefirnog napitka s mliječnim kefirom (prema Lynch i sur., 2021)

KEFIRNI NAPITAK	MLIJEČNI KEFIR
Proizveden korištenjem zrnaca kefirnog napitka	Proizveden korištenjem zrnaca mliječnog kefira
Glavni supstrat je otopina saharoze u koju se dodaje suho ili svježije voće	Glavni supstrat je mlijeko goveda, npr. kravlje ili kozje mlijeko
Može fermentirati širi spektar supstrata	Raznolikost u pogledu različitih supstrata koji se mogu fermentirati je manja
Zrnca su prozirna, želatinasta i manje otporna	Zrnca su bijele ili krem boje i otpornija su
Matriks zrnaca je prvenstveno građen od α -glukana	Matriks zrnaca je prvenstveno građen od kefirana
Zastupljenije su bakterije octene kiseline	Bakterije octene kiseline su manje zastupljene
Kvasci iz roda <i>Saccharomyces</i> su dominantni	Kvasci iz roda <i>Saccharomyces</i> su minorna komponenta
Bakterije iz roda <i>Lactococcus</i> su manje prisutne	Bakterije iz roda <i>Lactococcus</i> su zastupljenije
Rijetko se pojavljuju kvasci iz roda <i>Candida</i>	Češće se pojavljuju kvasci iz roda <i>Candida</i>
Prikladno za potrošače koji su vegani ili ne podnose laktozu	Neprikladno za potrošače koji su vegani i ne podnose laktozu

2.4. MIKROORGANIZMI PRISUTNI U ZRNCIMA KEFIRNOG NAPITKA

Kefirna zrnca predstavljaju jedinstveni živi ekosustav u prirodi, stvoren simbiotskim odnosom između bakterija i kvasaca (Nejedly, 2021). Mikroorganizmi koji su odgovorni za nastanak produkta u kefirnom napitku većinom su imobilizirani u kefirnim zrnima (Patel i sur., 2022). Najzastupljenije među njima su bakterije mliječne kiseline, kvasci, bakterije octene kiseline i bifidobakterije. Fiorda i sur. (2017) navode da se mikrobní sustav zrnaca kefirnog napitka sastoji većinom od sljedećih rodova: 70 % *Lactobacillus*, 10 % *Leuconostoc*, 10 % *Acetobacter*, 5 % *Bifidobacterium* i 5 % drugih vrsta i rodova, a neki od tih rodovi i vrsta izoliranih iz kefirnih zrnaca prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Mikroorganizmi izolirani iz zrnaca kefirnog napitka (prema Fiorda i sur., 2017)

Rod	Vrsta
BAKTERIJE	
<i>Acetobacter</i>	<i>A. fabarium</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. diolivorans</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. hordeii</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefiri</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. nagelli</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. parafarraginis</i> , <i>L. perolens</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. satsumensis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i> , <i>L. mesenteroides</i> .
<i>Lactococcus</i>	
<i>Pediococcus</i>	
<i>Streptococcus</i>	
Ostalo	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> , <i>Oenococcus kitaharae</i> , <i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>
KVASCI	
<i>Candida</i>	
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Pichia</i>	<i>P. membranifaciens</i> , <i>P. kudriavzevii</i>
<i>Lanchancea</i>	<i>L. fermentati</i> , <i>L. meyericii</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i> .
<i>Kazachstania</i>	<i>K. aerobia</i> , <i>K. unispora</i>

2.4.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su mikroorganizmi koji fermentiraju ugljikohidrate i proizvode mliječnu kiselinu te su trenutno široko primijenje u industriji fermentirane hrane (Wang i sur., 2021). Ove bakterije pripadaju Gram-pozitivnim bakterijama koje koriste ugljikohidrate kao jedini ili glavni izvor ugljika (George i sur., 2018). Podijeljene su na homofermentativne i heterofermentativne bakterije ovisno o produktima njihove fermentacije. Homofermentativne bakterije metaboliziraju ugljikohidrate do laktata, a heterofermentativne uz laktat mogu proizvoditi i etanol, manitol, octenu kiselinu te ostale produkte fermentacije. Bakterije mliječne kiseline obično su okruglog ili štapićastog oblika i imaju toleranciju na niske pH vrijednosti podloge. Ovu skupinu čini više od 60 rodova bakterija, a oni koji se najčešće koriste u industriji fermentirane hrane su: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lacticaseibacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Weissella*, od kojih su u kefirnom zrnima najzastupljeniji *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (Nejedly, 2021; Mokoena, 2017). Najčešće identificirane vrste prisutne u zrnima kefirnog napitka su *Lactobacillus hilgardii* i *Lactobacillus nagelli*, a nakon njih slijede i *Lacticaseibacillus casei* te *Lacticaseibacillus paracasei*. Dosadašnja istraživanja dokazala su da su vrste iz roda *Lactobacillus* dominantne u usporedbi s ostalim mikroorganizmima prisutnim u polisaharidnom matriksu zrnaca. Prisutnost bakterije *Lactobacillus hilgardii* važna je za formiranje matriksa zrnaca, odnosno za sintezu egzopolisaharida od kojeg su građena. Međutim, točan mehanizam kojim se formiraju zrnca kefirnog napitka ni danas nije poznat (Yerlikaya i sur., 2022; Eckel i Vogel, 2020; Fels i sur., 2018).

2.4.2. Bakterije octene kiseline

Osim bakterija mliječne kiseline, u kefirnim zrnima različitog zemljopisnog porijekla otkrivene su i različite vrste bakterija octene kiseline (Lynch i sur., 2021). Bakterije octene kiseline su skupina Gram-negativnih bakterija koje su aerobi, a pripadaju obitelji *Acetobacteraceae*. Mogu se pronaći u širokom spektru različitih izvora, poput cvijeća, voća, crijeva nekih insekata i različitih tradicionalnih fermentiranih namirnica, uključujući ocat i kefir (Yang i sur., 2022). Ta su aerobna okruženja bogata ugljikohidratima, šećernim alkoholima i etanolom, što im omogućuje da brzo i nepotpuno oksidiraju te supstrate u organske kiseline za proizvodnju energije kroz specifični respiratorni lanac. Posljedično, dolazi do zakiseljavanja podloge, čime se sprječava

rast ostalih mikroorganizama pa je u tom slučaju proces prirodno zaštićen (De Roos i De Vuyst, 2018). Ove bakterije dobile su ime po svojoj sposobnosti da proizvode octenu kiselinu oksidacijom etanola (Yang i sur., 2022). Bakterije octene kiseline, pronađene u kefirnim zrnima, su bakterije iz rodova *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* i *Gluconobacter*. One iz roda *Acetobacter* najbolje su prilagođene ekosustavu kefirnih zrnaca, a najčešće prisutne vrste su *A. lovaniensis* i *A. fabarum* (Lynch i sur., 2021; De Roos i De Vuyst, 2018)

2.4.3. Bifidobakterije

Tijekom istraživanja provedenih na zrnima kefirnog napitka, utvrđeno je da su, osim bakterija mliječne i octene kiseline te kvasaca, i bifidobakterije sastavni dio tih zrnca (Eckel i Vogel, 2020). Bifidobakterije (*Bifidobacterium*) su gram-pozitivne, anaerobne, nepokretne i nesporigene štapičaste bakterije. Znatno su manje zastupljene u zrnima kefirnog napitka od bakterija mliječne kiseline, a vrste bifidobakterija izolirane iz kefirnih zrnaca su *Bifidobacterium aquikefiri* i *Bifidobacterium tibiigranuli* (Nejedly, 2021). Ove bakterije su također i fermentativne bakterije te posjeduju niz enzima koji im omogućavaju iskorištenje velikog broja monosaharida, disaharida i kompleksnih ugljikohidrata kao izvora ugljika, a razlikuju se od bakterija mliječne kiseline po tome što se kod njih metabolizam heksoza odvija kroz jedinstveni fruktoza-fosfatni put koji se zove „bifidus shunt“ (Brar i sur., 2014). To je poseban metabolički put razgradnje ugljikohidrata u kojem enzim fosfoketolaza katalizira reakciju cijepanja fruktoza-6-fosfata na acetil-fosfat i eritroza-4-fosfat. Ovaj metabolički put započinje ulaskom dvije molekule glukoze koje se izomeriziraju i fosforiliraju u dvije molekule fruktoza-6-fosfata. Nakon toga, jedna od njih se cijepa na acetil-fosfat i eritrozu-4-fosfat. Acetilfosfat se defosforilira u acetat, a za to vrijeme, nastala eritroza-4-fosfat ulazi u novu reakciju pregradnje s drugom molekulom fruktoza-6-fosfata. Na taj način dobivene su dvije molekule ksiluloza-5-fosfata koje se cijepaju na molekulu gliceraldehid-3-fosfata i acetil-fosfata, a nakon toga dolazi do njihove defosforilacije i nastanka laktata i acetata (Kralj, 2023). Bifidobakterije fermentiraju glukozu u mliječnu i octenu kiselinu u molarnom omjeru 2:3 bez nastanka ugljikovog dioksida. Varijacije u uvjetima rasta, kao što su kvaliteta i količina izvora ugljika mogu rezultirati proizvodnjom različitih količina proizvoda fermentacije (Brar i sur., 2014).

2.4.4. Kvasci

Kvasci su eukariotski mikroorganizmi koji žive u raznim ekološkim nišama, uglavnom u vodi, tlu, zraku te na površinama biljaka i voća (Maicas, 2020). Obično su definirani kao jednostanične gljive i široko su primijenjeni u mnogim područjima, kao što je pivarstvo, pekarstvo, proizvodnja vina, destilacija i ostali procesi koji uključuju fermentaciju (Boekhout i sur., 2021). U svom prirodnom okruženju, kvasci mogu metabolizirati izvore ugljika i provoditi fermentaciju s obzirom da tamo imaju sve neophodne nutrijente i supstrate (Maicas, 2020). Mogu rasti u širokom spektru pH vrijednosti, a preferiraju „kiseli okoliš” (pH 4,5 – 7) te većinom mogu rasti i pri vrlo niskom pH, oko 2,5 (Guerzoni i sur., 2013), što je poželjna osobina kvasaca u kefirnim zrnima s obzirom da u kefirnom napitku prevladavaju niske pH vrijednosti jer bakterije mliječne kiseline i bakterije octene kiseline proizvode mliječnu, odnosno octenu kiselinu koje snižavaju pH kefirnog napitka. Iz kefirnih zrnaca izolirani su brojni rodovi kvasaca s različitim svojstvima, među kojima su rodovi *Saccharomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* i *Guehomyces* (Yerlikaya i sur., 2022). Od navedenih, najpoznatiji je *Saccharomyces cerevisiae* koji ima sposobnost metaboliziranja šećera do etanola i CO₂ u anaerobnim uvjetima. Također, bitno je naglasiti i prisutnost kvasca *Zygorulaspota florentina*. To je osmotolerantni mikroorganizam koji ima sposobnost rasta u otopini s visokom koncentracijom šećera, što je poželjno za proizvodnju kefirnog napitka jer se on ponekad proizvodi na podlozi s koncentracijom šećera do 90 g L⁻¹ (Stadie i sur., 2013).

2.5. MEĐUSOBNI UTJECAJ MIKROORGANIZAMA PRIRODNO PRISUTNIH U ZRNCIMA KEFIRNOG NAPITKA

Jedinstveni okus kefirnog napitka ovisi o raznolikosti i simbiotskoj aktivnosti mikroorganizama u zrnima. Većinski, mikrobiota kefirnih zrnaca obuhvaća vrste bakterija mliječne kiseline poput *Lactobacillus hilgardi*, *Lactobacillus nagelii* i *Lacticaseibacillus paracasei* koji većinom proizvode mliječnu kiselinu i etanol te vrstu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji uglavnom proizvodi etanol i estere. Iako nisu dio glavne mikrobiote kefirnih zrnaca, bakterije octene kiseline često se pronalaze tijekom fermentacije kefirnog napitka. Rastu bakterija octene kiseline posebno pogoduju aerobni uvjeti, najčešće kako se bioproces približava kraju, što dovodi do povećane koncentracije octene kiseline, a to može imati negativan utjecaj na senzoričku finalnog proizvoda (De Roos i De Vuyst, 2018).

Od simbiotskih odnosa unutar kefirnih zrnaca dokazan je mutualizam. Otkriven je između bakterije *Lactobacillus hordei* koja profitira od kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na način da joj kvasac povećava dostupnost aminokiselina, dok bakterija ublažava kiselost podloge, u kojoj se kvasac nalazi, proizvodima metabolizma arginina kojeg kvasac osigurava (Bechtner i sur., 2019). Također, nedavna istraživanja pokazala su da različiti sojevi *L. hordei* proizvode izvanstanične polisaharide iz saharoze, koji su sposobni potaknuti kvasce na stvaranje agregata, što nije primijećeno za druge bakterije mliječne kiseline (Xu i sur., 2018). Simbiotski odnos uočen je i između bakterija octene kiseline i kvasca. Stanice kvasca cijepaju saharozu na glukozu i fruktozu te proizvode etanol. Bakterije octene kiseline metaboliziraju fruktozu u octenu kiselinu. Zatim dobivena octena kiselina stimulira kvasac na proizvodnju etanola, koji pomaže bakterijama octene kiseline da rastu i proizvode octenu kiselinu. Također, nastali etanol i octena kiselina imaju antimikrobno djelovanje na patogene bakterije, čime se osigurava zaštita od moguće kontaminacije (Stipić, 2024).

2.6. UPOTREBA SUŠENOG VOĆA U PROIZVODNJI KEFIRNOG NAPITKA

Na prirast zrnaca kefirnog napitka značajno utječe dostupnost nutrijenata u podlozi, stoga su provedena različita istraživanja o dostupnosti hranjivih tvari, odnosno o sposobnosti korištenja voća i voćnih sokova u proizvodnji kefirnog napitka (Laureys i sur., 2019). Konzumni šećer se najčešće upotrebljava kao izvor ugljika, dok se svježe ili sušeno voće dodaje kao izvor dušika. Ono se najčešće dodaje na početku bioprocesa kao dodatan izvor spojeva koji stimuliraju rast prisutnih mikroorganizama. Međutim, dokazano je da se i ekstrakti voća, također mogu koristiti u proizvodnji ove vrste fermentiranog napitka. Ekstrakti se mogu jednostavno pripremiti kao i pasterizirati (Pavlečić i sur., 2024; Lynch i sur., 2021). Budući da je (sušeno) voće obično jedini izvor niza važnih hranjivih tvari tijekom fermentacije kefirnog napitka, količina i vrsta voća koje se koristi za fermentaciju mogu utjecati na raznolikost mikrobnih vrsta, potrošnju supstrata i sintezu različitih produkata pri čemu su sušene smokve najčešći izbor sušenog voća (Laureys i sur., 2018). Točan razlog toga nije potpuno poznat, ali u usporedbi s dodatkom drugog voća, poput suhih šljiva, groždica ili datulja, dodatak smokve uvelike utječe na brzinu fermentacije te ima značajan utjecaj na koncentraciju mliječne i octene kiseline u finalnom proizvodu. Također, uz dodatak suhih smokvi, primijećen je i veći prirast mase kefirnih zrnaca (Lynch i sur., 2021). Jedno od mogućih objašnjenja mogla bi biti činjenica da smokve, u uspoređi s drugim voćem imaju puno veći udio kalcija, kao što je vidljivo iz tablice 3. Kalcij, osim što potiče rast mikroorganizama, također može imati i pufersko djelovanje u otopini, pri čemu ioni kalcija sprječavaju da kefirni napitak postane previše kiseo i na taj način smanjuju kiselinski stres za radne mikroorganizme (Pavlečić i sur., 2024)

Tablica 3. Prikaz udjela kalcija (Ca) u pojedinom voću (*prema* Pavlečić i sur., 2024)

SUŠENO VOĆE	Udio kalcija [mg Ca / 100 g voća]
Smokva	162
Papaja	54
Marelica	55
Datulja	39
Groždica	50
SVJEŽE VOĆE	Udio kalcija [mg Ca / 100 g voća]
Smokva	35
Šljiva	19

2.7. BIOREAKTOR S ČVRSTIM SLOJEM

Bioreaktor s čvrstim slojem konstruiran je kao cilindar ili cijev ispunjena potpornim materijalom na koji se imobiliziraju stanice (Riitonen i sur., 2013). Kod ove vrste bioreaktora, dolazi do stvaranja biofilma na površini i u porama imobilizacijskog sredstva pa stanice ne cirkuliraju slobodno u hranjivoj podlozi kroz takav sustav. Podloga se može uvoditi s donje ili gornje strane bioreaktora te postoji opcija da se u ovako konstruiranom sustavu vrši, takozvana reciklacija biomase, ako je potrebno, koja tada omogućuje regeneraciju biofilma biomase u slučaju njenog ispiranja ili odumiranja (Galović, 2023). U ovom je diplomskom radu, sprječavanje fluidizacije zrnaca kefirnog napitka osigurano sporijim protocima hranjive podloge dok su se sama zrnca kefirnog napitka ponašala kao imobilizacijsko sredstvo za sve mikroorganizme prirodno prisutne u njima. Generalo, ovaj tip bioreaktora ima vrlo široku primijenu u industriji, a najčešće se koristi upravo u slučajevima kada se radi s imobiliziranim enzimima ili mikrobnim stanicama (Atmakidis i Kenig, 2014; Riitonen i sur., 2013). Jedna od karakteristika koja predstavlja veliku prednost u odnosu na ostale bioreaktorske sustave je niska cijena konstrukcije i održavanja. Uz to, u ovakvim je sustavima moguće ostvariti veći kontakt između supstrata i katalizatora ili mikrobnih stanica, što uzrokuje proizvodnju veće količine produkata, odnosno ima pozitivan utjecaj na pokazatelje uspješnosti i stopu konverzije. No, s druge strane, jedan od glavnih nedostataka je otežana kontrola temperature pa posljedično i pojava temperaturnog gradijenta kroz visinu čvrstog sloja kao i potencijalno stvaranje zona lošije izmiješanosti, odnosno homogenosti, kod nižih protoka hranjive podloge kroz ovu vrstu sustava (Catalano i sur., 2023).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Hranjiva podloga

Kao hranjiva podloga za provođenje svih eksperimenata, tijekom izrade ovog diplomskog rada, korištena je profiltrirana otopina ekstrakta sušenih smokvi, bez dodatka konzumnog šećera. U preliminarnom uzgoju, upotrebljavane su tri različite podloge dobivene s tri različita vremena trajanja ekstrakcije: 30 min, 45 min te 60 min pri čemu su sve ekstrakcije rađene na temperaturi od 65 °C, koja se pokazala kao optimalna temperatura ekstrakcije u dosadašnjim istraživanjima (Lopez i sur., 2009). U ovom diplomskom radu, kao optimalno vrijeme ekstrakcije, s obzirom na količinu ekstrahiranih šećera, pokazalo se najdulje vrijeme trajanja ekstrakcije (60 min). Na temelju toga, za sve uzgoje u bioreaktoru s čvrstim slojem, kod različitih brzina protoka podloge, korištena je podloga ekstrahirana tijekom 60 minuta pri temperaturi od 65 °C.

3.1.2. Radni mikroorganizmi

Za izradu ovog diplomskog rada, korištena je kultura kefirnih zrnaca koja se sastoji od združene kulture raznih vrsta mikroorganizama prirodno prisutnih u njima. Zrnca su održavana u Erlenmeyerovoj tikvici u vodenoj otopini saharoze masene koncentracije 30 g L⁻¹ uz dodatak sušenih smokvi, pri temperaturi od 25 °C u termostatu, u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Sveučilištu u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu.

3.1.3. Kemikalije

Kemikalije korištene za pripremu hranjivih podloga i otopina potrebnih za izradu ovog diplomskog rada prikazane su u tablici 4. koja slijedi.

Tablica 4. Kemikalije potrebne za pripremu hranjivih podloga i otopina

Kemikalije	Proizvođač	Čistoća
Sumporna kiselina (H ₂ SO ₄)	Merk, Njemačka	Za UPLC, 96 %
Cinkov sulfat heptahidrat (ZnSO ₄ · 7 H ₂ O)	Gram-Mol, Hrvatska	p.a.
Saharoza	Liofilchem, Italija	99+%
Sušene smokve	Bio&bio, Hrvatska	

3.1.4. Aparatura i pribor

3.1.4.1. Bioreaktor s čvrstim slojem

Bioreaktor s čvrstim slojem konstruiran je kao vertikalna staklena kolona ukupnog volumena 0,75 L. Postavljen je na metalni stalak te na njega pričvršćen mufama i hvataljkama. Visina bioreaktora iznosi 0,6 m, a unutarnji promjer mu je 0,04 m. Protok podloge kroz samu kolonu osiguran je pumpanjem hranjive podloge pomoću peristaltičke pumpe kroz plastično crijevo koje je spojeno na ulaz i izlaz same kolone. Na dnu kolone nalazi se perforirano dno koje sprječava ulazak zrnaca u plastično crijevo zaduženo za cirkulaciju hranjive podloge kroz bioreaktor. Temperatura tijekom uzgoja bila je održavana na 25 °C. Održavanje konstantne temperature omogućeno je korištenjem, također, plastičnog crijeva, omotanog oko staklene kolone, kroz koje je, pomoću peristaltičke pumpe, pumpana termostatorirana voda iz vodene kupelji.

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

UPLC, odnosno uređaj za provođenje tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti, modela UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, sastoji se od analitičke kolone dimenzija 150 · 7,8 mm (Rezex ROA – Organic Acid H⁺, Phenomenex), odgovarajućih predkolona ove kolone, pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID), sustava za uzorkovanje (G7129B 1290 Vialsampler), pećnice i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Volumen uzorka koji se analizira iznosio je 10 µL. Za mobilnu fazu, korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline (H₂SO₄), čiji je protok kroz kolonu iznosio 0,6 mL min⁻¹, a temperatura kolone bila je postavljena na 30 °C.

3.1.4.3. Ostala aparatura i pribor

Potreban pribor i aparatura za provedbu ovog istraživanja prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Popis pribora i aparature korištenih pri izradi ovog diplomskog rada

Pribor i aparatura	Zemlja porijekla
Analitička vaga Acculab ALC210.4	Njemačka
Centrifuga Becham Model J-21B	Njemačka
Grijalica s funkcijom miješanja MM-510 Tehnica	Slovenija
Pumpa MCP Ismatec	Švicarska
Pumpa Chemap AG	Švicarska
Sušionik Instrumetaria ST-50	Hrvatska
Termostat ST-50 Instrumentaria	Hrvatska
Vodena kupelj Sutjeska	Srbija
Zamrzivač i hladnjak Bosch	Njemačka

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema hranjive podloge

U preliminarnom dijelu ovog eksperimenta korištene su podloge dobivene na način da je provedena ekstrakcija suhih smokvi s različitim vremenima ekstrakcije pri temperaturi od 65 °C. 150 g suhih smokvi ekstrahirano je 30 min, 45 min te 60 min u 1,5 L vode na 65 °C u Erlenmeyerovoj tikvici uz konstantno miješanje. Nakon ekstrakcije, dobiveni ekstrakt je profiltriran te ohlađen na temperaturu uzgoja. Za proizvodnju kefirnog napitka u bioreaktoru, upotrijebljen je ekstrakt dobiven ekstrakcijom suhih smokvi 60 minuta na 65 °C. Podloga za bioreaktor dobivena je na način da je provedena ekstrakcija 75 g suhih smokvi u 750 mL vode pri prethodno navedenoj temperaturi, nakon čega je ekstrakt profiltriran te ohlađen na temperaturu uzgoja.

3.2.2. Preliminarna proizvodnja kefirnog napitka u staklenkama

Nakon što je podloga pripremljena kako je opisano u poglavlju 3.2.1., ukupni volumen ekstrakta dobiven kod svakog pojedinog vremena trajanja ekstrakcije (1,5 L) ravnomjerno je podijeljen u 10 staklenki. U svaku staklenku dodano je po 150 mL otopine smokvinog ekstrakta, a isto je učinjeno za sva tri paralelna eksperimenta. Svaka staklenka sa 150 ml podloge, dodatno je inokulirana s 15 g kefirnih zrnaca (10 % m/V). Proizvodnja kefirnog napitka na ekstraktu suhih smokvi odvijala se pri temperaturi od 25 °C u termostatu do kraja uzgoja, odnosno do potpune potrošnje supstrata. Tijekom cijelog vremena trajanja fermentacije praćena je promjena koncentracije svih supstrata i produkata u tekućem dijelu podloge pomoću UPLC analize te su na temelju dobivenih rezultata izračunati pokazatelji uspješnosti procesa. Osim toga, praćena je i promjena udjela suhe tvari biomase na početku, nakon pet dana uzgoja i na kraju procesa. Također, svakom izuzetom uzorku izmjerena je pH vrijednost.

3.2.3. Proizvodnja kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem kod različitih protoka hranjive podloge

Tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru, ispitan je utjecaj protoka hranjive podloge (profiltrirane otopine ekstrakta smokve) na proizvodnju kefirnog napitka kod 3 različita protoka podloge kroz staklenu kolonu: $7,2 \text{ mL min}^{-1}$, 28 mL min^{-1} te 112 mL min^{-1} . Podloga korištena u ovom dijelu istraživanja opisana je u poglavlju 3.2.1. U sva tri eksperimenta korišteno je 750 mL tako pripremljene podloge koja je prepumpana u kolonu preko sterilne Erlenmeyerove tikvice (volumena 1 L) u koju je prije samog prepumpavanja podloge stavljeno 75 g kefirnih zrnaca (10 % m/V). S obzirom da su svi eksperimenti rađeni kod vrlo niskih protoka, nije bilo potrebe za fiksacijom nasutog sloja zrnaca radi sprječavanja fluidizacije. U sva tri eksperimenta provedena u bioreaktoru s čvrstim slojem temperatura je održavana konstantnom na $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ na način da je oko bioreaktora namotano plastično crijevo kroz koje je cirkulirala termostatorirana voda iz vodene kupelji temperature $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ uz pomoć peristaltičke pumpe. Također, tijekom cijelog vremena trajanja eksperimenta vršeno je uzorkovanje tekućeg dijela hranjive podloge jedan do dva puta dnevno tijekom 20 dana za istraživanje kod protoka $7,2 \text{ mL min}^{-1}$, odnosno 11 dana za protok 28 mL min^{-1} te 10 dana u slučaju kada je protok podloge bio najveći, tj. 112 mL min^{-1} . Eksperimenti su trajali dok u podlozi nije bio utrošen sav supstrat. Promijenjena koncentracija supstrata i produkata, tijekom procesa, praćene su pomoću UPLC analitike, a na temelju dobivenih rezultata izračunati su procesni parametri, odnosno pokazatelji uspješnosti. Dodatno, svakom izuzetom uzorku izmjerena je pH vrijednost podloge. Po završetku bioprocesa, biomasa je iz bioreaktora prenesena u prethodno osušenu i izvaganu petrijevu zdjelicu te stavljena u sušionik na sušenje, pri temperaturi od $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, do ustaljenja mase.

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Priprema uzorka za UPLC analizu

Svi uzorci analizirani su korištenjem UPLC analitike kako bi se utvrdilo koliko je supstrata potrošeno, odnosno koliko je produkata nastalo. Uzorci za analizu pripremljeni su na način da je 750 μL uzorka podloge prebačeno u Eppendorf kivetu od 2 mL te mu je dodano 750 μL otopine cinkova sulfata heptahidrata ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) koncentracije 100 g L^{-1} . Sama otopina cinkova sulfata pripremljena je otapanjem 5 g ZnSO_4 u 50 mL destilirane vode. Tako pripremljen uzorak u Eppendorf kiveti homogeniziran je pomoću vortexa te ostavljen 10 minuta na sobnoj temperaturi da bi sol pospješila taloženje proteina. Uzorak je nakon toga centrifugiran 10 minuta pri brzini od 1000 okretaja po minuti u centrifugi da bi se odvojili istaloženi proteini i nečistoće iz uzorka. Nakon centrifugiranja, u novu Eppendorf kivetu, otpipetirano je 200 μL odcentrifugiranog supernatanta kojem je, sada u drugom koraku, dodano 1400 μL destilirane vode da bi se uzorak razrijedio 16 puta. Otopina je ponovo homogenizirana te je iz tako dobivene otopine, u posljednjem koraku pripreme, izuzeto 400 μL 16 puta razrijeđene otopine u novu kivetu od 2 mL u koju je prethodno dodano 400 μL destilirane vode. Na taj su način dobiveni uzorci koji su u konačnici bili razrijeđeni 32 puta. Na kraju, uzorci su profiltrirani u staklene vijale pomoću filtera veličine pora 0,2 μm te su podvrgnuti UPLC analizi.

3.3.2. Određivanje suhe tvari zrnaca kefirnog napitka

Suha tvar kefirnih zrnaca određivana je tijekom preliminarnog uzgoja u staklenkama i tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru. Tijekom preliminarnog uzgoja, suha tvar određivana je na početku, nakon petog dana i na kraju fermentacije. Nakon pet dana uzgoja, otopina ekstrakta smokve, u kojoj su se nalazila zrnca tijekom proizvodnje, nakon uzorkovanja, dekantirana je, a čvrsti dio, odnosno sva zrnca, iz staklenki, su prenesena na prethodno osušenu i izvaganu petrijevu zdjelicu. Identičan postupak je ponovljen i zadnjeg dana uzorkovanja (19. dan). Uzorci na petrijevim zdjelicama stavljeni su u sušionik na 80 °C kako bi se zrnca u potpunosti osušila. Petrijeve zdjelice vagane su svakih nekoliko dana kako bi se provjerilo je li došlo do ustaljenja mase uzorka. Isti postupak ponovljen je i nakon sva tri uzgoja u bioreaktoru. Razlika je jedino u tome, što je, kod uzgoja u bioreaktoru, suha tvar bila određivana na početku i na kraju bioprocasa. Masa suhe tvari izračunata je tako da se od mase petrijeve

zdjelice nakon sušenja koja je sadržavala kefirna zrnca oduzela masa osušene petrijeve zdjelice prije sušenja, odnosno bez kefirnih zrnaca, a udio suhe tvari u kefirnim zrnima izračunat je na način da je masa suhe tvari podijeljena s početnom masom vlažnih zrnaca. U slučaju preliminarnog uzgoja početna masa vlažnih zrnaca iznosila je 15 g, a kod proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru, ta je masa bila 75 g.

Jednadžbe korištene za izračun mase suhe tvari kefirnih zrnaca i udio suhe tvari u kefirnim zrnima:

$$m_{stv} = m_{p,ns} - m_{pp} \text{ [g]} \quad [1]$$

$$Y_{stv} = (m_{stv}/m_{in}) \cdot 100 \% \text{ [%]} \quad [2]$$

$$Y_{pr} = Y_{stv} - Y_{stvin} \quad [3]$$

m_{stv} - masa suhe tvari [g]

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

m_{pp} - masa prazne osušene petrijeve zdjelice [g]

m_{in} - masa suhe tvari biomase na početku procesa [g]

Y_{stv} - udio suhe tvari u kefirnim zrnima [%]

Y_{stvin} - udio suhe tvari u kefirnim zrnima na početku procesa [%]

Y_{pr} - prirast udjela suhe tvari u kefirnim zrnima [%]

3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI

3.4.1. Potrošnja supstrata (ΔS)

Potrošnja supstrata izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\Delta S = S_0 - S \quad [4]$$

S_0 - početna koncentracija supstrata [g]

S - konačna koncentracija supstrata [g]

3.4.2. Prinos produkta (Y_p)

Prinos produkta izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$Y_p = P - P_0 \text{ [g L}^{-1}\text{]} \quad [5]$$

P_0 - početna koncentracija produkta [g L⁻¹]

P - konačna koncentracija produkta [g L⁻¹]

3.4.3. Produktivnost (Pr)

Produktivnost procesa izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$Pr = Y_p/t_p \quad [6]$$

Y_p - prinos produkta [g]

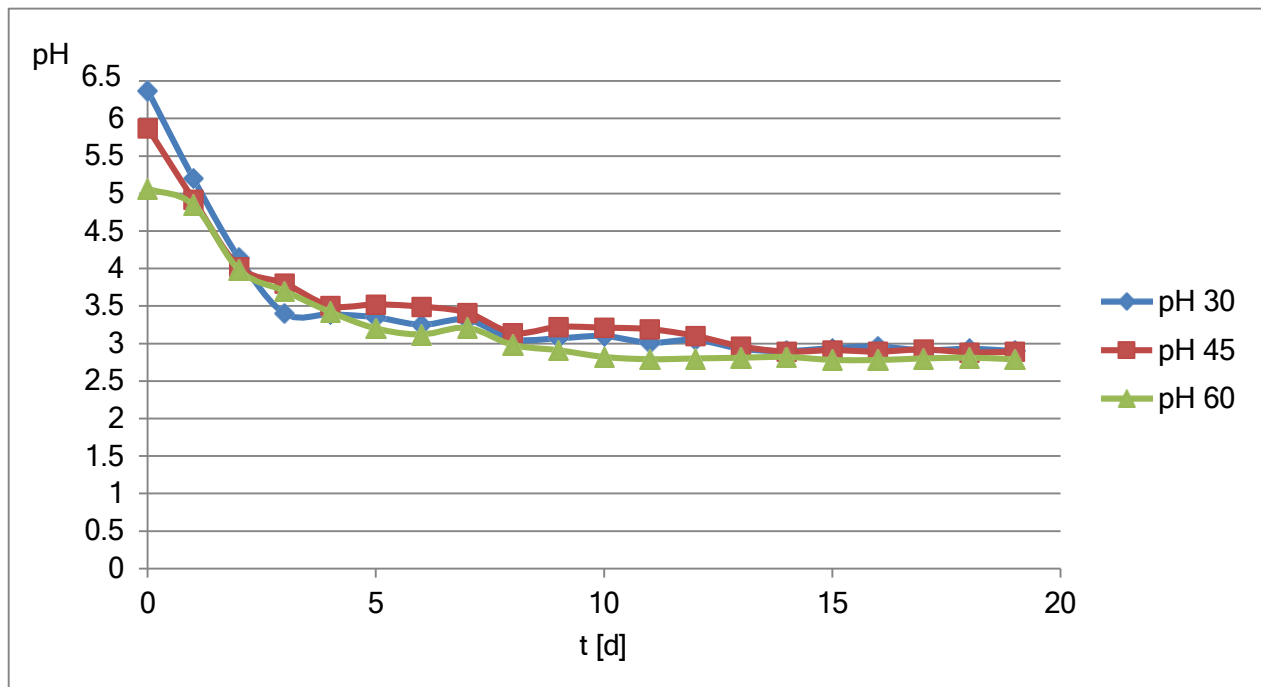
t_p - vrijeme trajanja proizvodnje [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju bit će prikazani te prodiskutirani svi rezultati dobiveni tijekom izrade ovog diplomskog rada. Eksperimentalno istraživanje provedeno je u dva stupnja. U prvom dijelu provedeno je ispitivanje različitih vremena trajanja ekstrakcije suhih smokvi na sastav otopine koja se koristila za proizvodnju kefirnog napitka u staklenkama. Na temelju rezultata ovog dijela istraživanja, utvrđeno je da je najveća početna koncentracija izvora ugljika u tekućoj hranjivoj podlozi, za proizvodnju kefirnog napitka, dobivena kod najduljeg vremena trajanja ekstrakcije (60 min) pri temperaturi od 65 °C. Ova podloga korištena je u drugom dijelu istraživanja, gdje je proučavan utjecaj različitih brzina protoka hranjive podloge (7,2 mL min⁻¹, 28 mL min⁻¹ i 112 mL min⁻¹), u bioreaktoru s čvrstim slojem, na tijek proizvodnje kefirnog napitka. Na kraju ovog dijela istraživanja, utvrđeno je da protok podloge ima značajan utjecaj na dinamiku proizvodnje kefirnog napitka pri korištenju ove vrste bioreaktorskog sustava.

4.1. UTJECAJ RAZLIČITOG VREMENA EKSTRAKCIJE SUHIH SMOKVI NA SASTAV PODLOGE ZA PROIZVODNJU KEFIRNOG NAPITKA U STAKLENKAMA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati dobiveni tijekom preliminarnog dijela istraživanja proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama u otopini ekstrakta suhih smokvi. U jedan set staklenki (10 komada) dodana je podloga dobivena ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 30 minuta, u drugi set staklenki (10 komada) dodana je podloga ekstrahirana 45 minuta, a u treći set (10 komada) podloga dobivena ekstrakcijom tijekom 60 minuta. Ekstrakcija, u sva tri slučaja, provedena je dodatkom 150 g sušenih smokvi u 1,5 L vode pri temperaturi od 65 °C. Ukupno je pripremljeno 30 staklenki koje su ukupno sadržavale 4,5 L otopine ekstrakta suhih smokvi koje su inokulirane s 10 % (m/V) zrnaca kefirnog napitka (15 g zrnaca po staklenki). Proizvodnja kefirnog napitka u otopini ekstrakta suhih smokvi odvijala se u termostatu na temperaturi od 25 °C za koju se i u prijašnjim istraživanjima uspostavilo da je optimalna temperatura za proizvodnju kefirnog napitka (Piškor, 2020). Uzorkovanje je provođeno svaki dan, a prilikom izuzimanja, svakom uzorku izmjerena je i pH vrijednost. Ovaj dio eksperimentalnog istraživanja ukupno je trajao 19 dana.

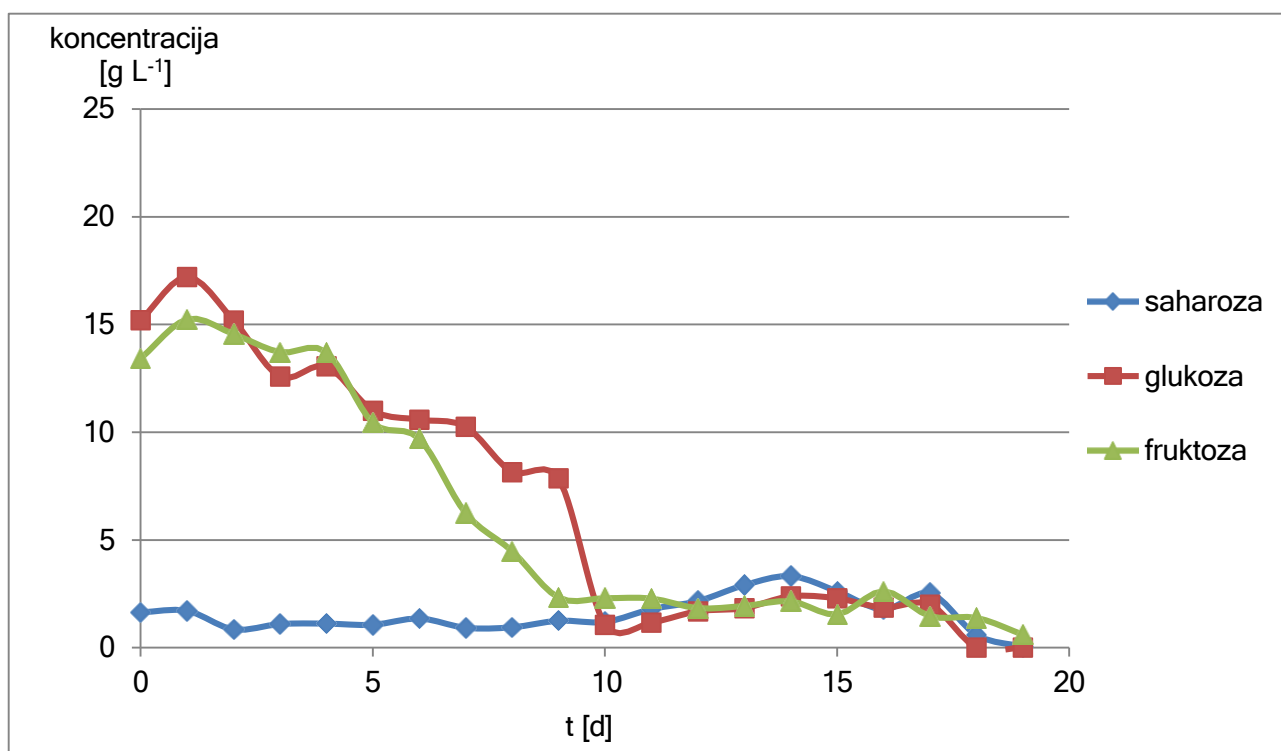


Slika 3. Prikaz promjene pH vrijednosti tijekom preliminarnе proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama pri vremenima ekstrakcije od 30, 45 i 60 minuta

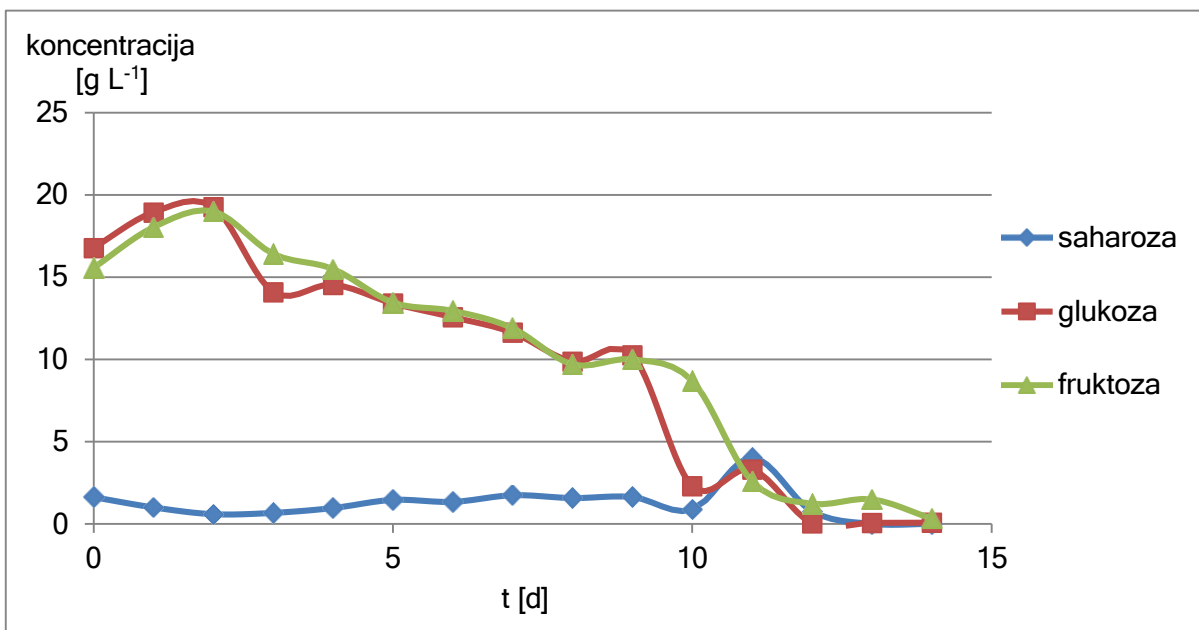
Na slici 3 vidljivo je da je početna pH vrijednost ekstrakta, odnosno pH vrijednost izmjerena 0. dan uzgoja, najviša nakon 30 minuta ekstrakcije, a najniža nakon 60 minuta ekstrakcije suhih smokvi. Za vrijeme ekstrakcije od 30 minuta, početna pH vrijednost iznosila je 6,37, za vrijeme ekstrakcije od 45 minuta iznosila je 5,87, a za vrijeme ekstrakcije od 60 minuta, iznosila je 5,06. Iz navedenih podataka vidi se da je porast pH vrijednosti obrnuto proporcionalan povećanju vremena ekstrakcije. Generalno, pH vrijednost otopine šećera iznosi između 5 i 7, a točne vrijednosti ovise o različitim faktorima, poput vrste otopljenog šećera, koncentracije otopljenog šećera, čistoće vode i temperature. Iako šećer sam po sebi nije kiseo, tijekom otapanja, reagira s komponentama u tragovima u vodi proizvodeći blago kiselu otopinu. Otopina saharoze obično ima pH vrijednost od 6,5 do 7, dok je otopina glukoze nešto kiseliја, odnosno njezina pH vrijednost iznosi od 5 do 6,5 (Andrews i sur., 2002). Rezultati dobiveni ovim eksperimentima, u kojima je dokazano da se povećanjem koncentracije glukoze i fruktoze u otopini smanjuje pH vrijednost, u skladu su s literaturnim navodima. Tijekom fermentacije, pH podloge, u svim eksperimentima, smanjuje se jer se povećava koncentracija produkata kao što su mliječna i octena kiselina koje dodatno smanjuju pH vrijednost, a dinamika promjene tijekom svih 19 dana fermentacije vrlo je slična. Najočitija promjena pH vrijednosti vidljiva je tijekom prva tri dana što

je najvjerojatnije posljedica povećane aktivnosti prisutnih mikroorganizama. Konačne izmjerene vrijedosti podloga redom su iznosile 2,90 pH jedinica za podlogu ekstrahiranu 30 min, 2,89 pH jedinica za podlogu ekstrahiranu 45 min te 2,79 pH jedinica za podlogu ekstrahiranu 60 min.

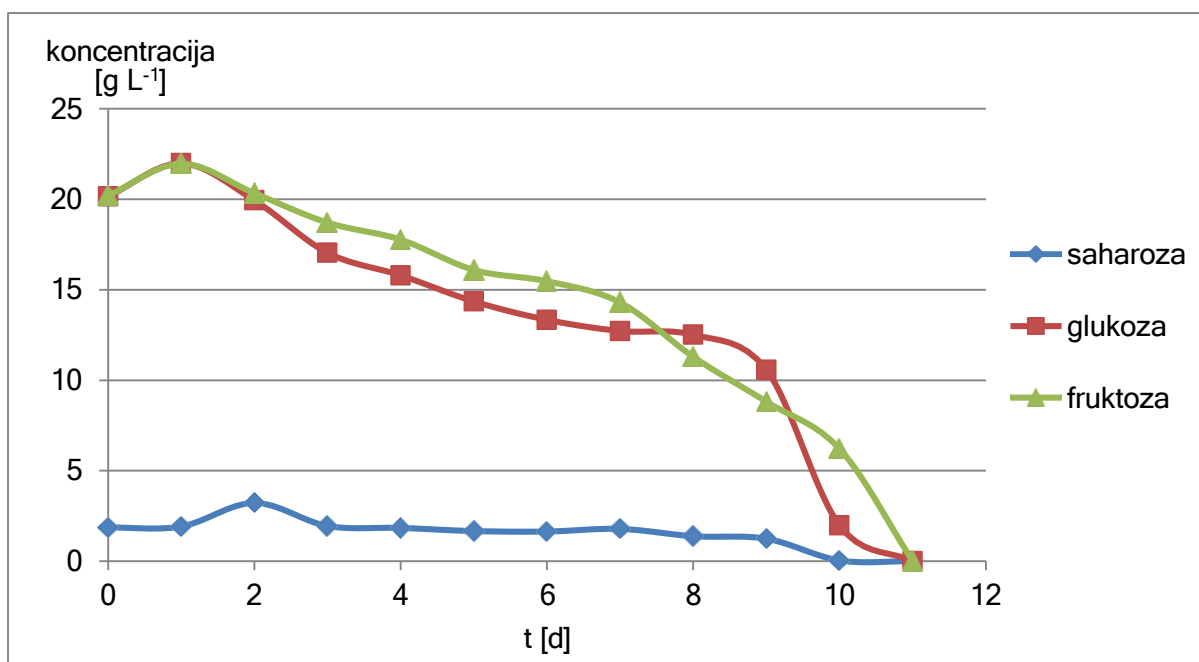
Promjena koncentracije supstrata i produkata u ekstraktu sušenih smokvi tijekom fermentacije praćena je korištenjem UPLC analitike, a dobiveni rezultati prikazani su na slikama koje slijede. Potrošnja supstrata prikazana je na slikama 4 – 6, a promjene koncentracija produkata na slikama 7 – 9.



Slika 4. Prikaz promjene koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze tijekom preliminarne proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 30 minuta na temperaturi od 65 °C

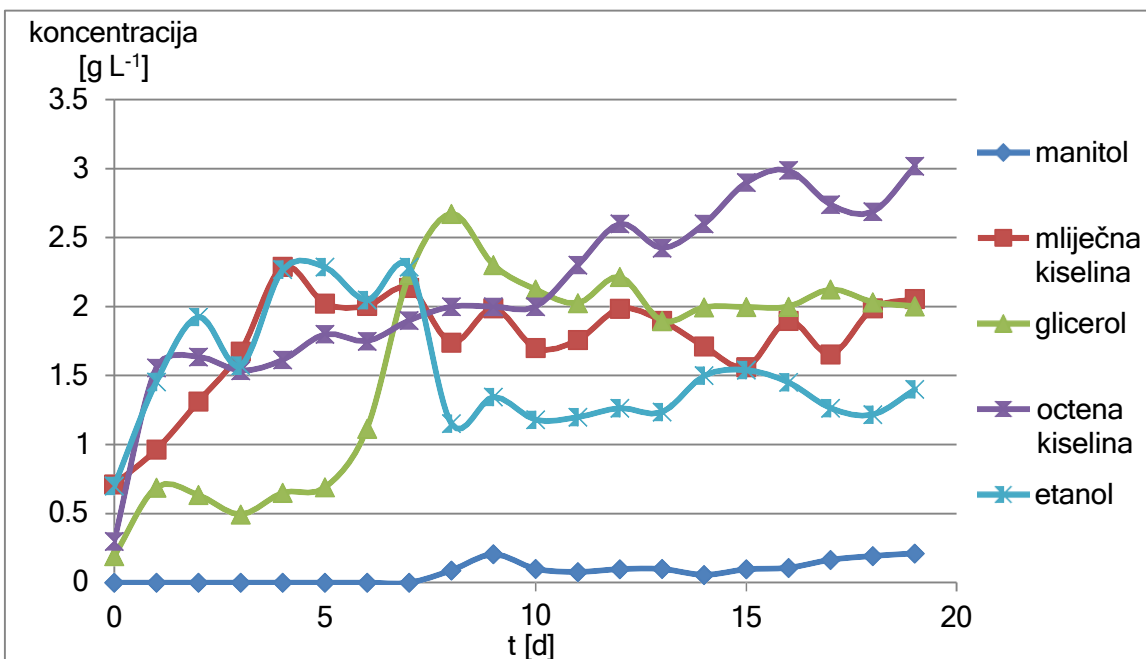


Slika 5. Prikaz promjene koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze tijekom preliminarne proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 45 minuta na temperaturi od 65 °C

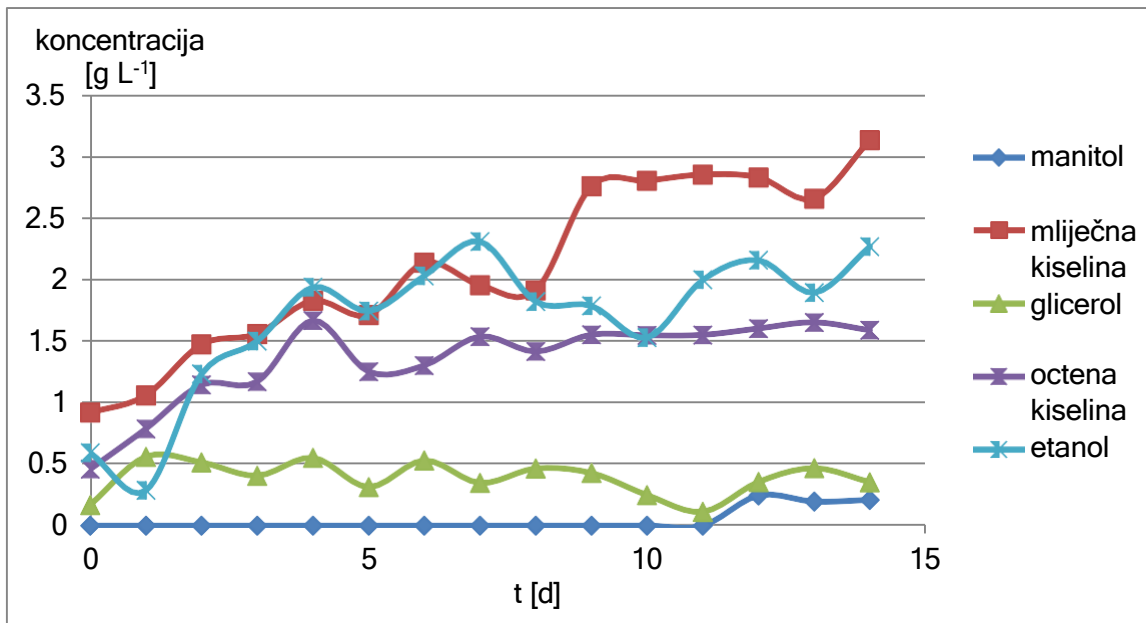


Slika 6. Prikaz promjene koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze tijekom preliminarne proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 60 minuta na temperaturi od 65 °C

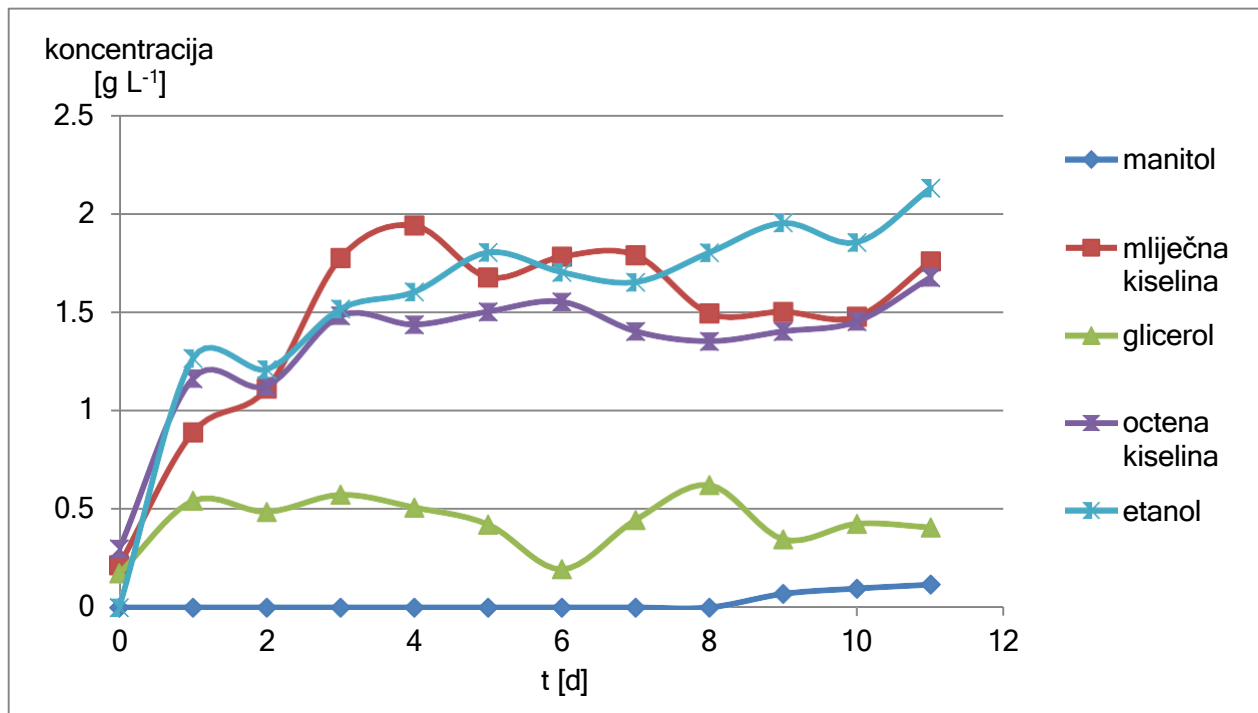
U sva tri eksperimenta, nakon provedene ekstrakcije, zabilježene su značajno više koncentracije glukoze i fruktoze u odnosu na saharozu. Također, na početku uzgoja vidljivo je da je najviše supstrata ekstrahirano kod uzgoja u hranjivoj podlozi dobivenoj najdužom ekstrakcijom smokvi, a početna koncentracija supstrata je najniža kod uzgoja u podlozi dobivenoj najkraćom ekstrakcijom sušenih smokvi, što je u skladu s teorijom ekstrakcije. Produljenjem vremena ekstrakcije, povećava se količina ekstrahiranog šećera (Lopez i sur., 2009). Postupak proizvodnje kefirnog napitka vođen je dok sav supstrat, u potpunosti, nije bio potrošen iz podloge, što je dokazano pomoću UPLC analitike. Kod najkraćeg vremena ekstrakcije, bioproces je trajao najduže, odnosno 19 dana, kod vremena ekstrakcije od 45 minuta, uzgoj u staklenkama trajao je 14 dana, a za uzgoj proveden u otopini ekstrakta dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 60 minuta, vrijeme fermentacije bilo je najkraće, odnosno uzgoj je trajao 11 dana, iz čega se može zaključiti da je dužim vremenom ekstrakcije iz smokvi ekstrahirano više faktora rasta i metabolizam-stimulirajućih komponenti potrebnih mikroorganizmima iz kefirnih zrnaca. Koncentracija saharoze ne mijenja se puno tijekom fermentacije za sva 3 slučaja, što pokazuje da je njena potrošnja katabolički reprimirana prisutnošću glukoze u podlozi, tj. dok su u podlozi bile prisutne glukoza i fruktoza, saharoza se nije trošila, za razliku od prijašnjih istraživanja (Pavlečić i sur., 2024) koja su provedena u otopini saharoze uz dodatak cijelih sušenih smokvi u podlogu, gdje je uočena nagla promjena koncentracije saharoze jer je u tim slučajevima ona bila inicijalno jedini izvor ugljika. Dio saharoze je hidroliziran, uglavnom prema kraju eksperimenta, kada su glukoza i fruktoza bile već gotovo potrošene. Također, u ovom je eksperimentu primijećena nešto sporija dinamika odvijanja procesa nego u proizvodnji kefirnog napitka kada je proizvodnja kefirnog napitka provedena korištenjem otopine saharoze u koju se dodaju cijele smokve (Kralj, 2023). U ovom diplomskom radu, najbrža dinamika potrošnje supstrata opažena je kod proizvodnje kefirnog napitka kod najniže koncentracije ekstrahiranih šećera (ekstrakcija tijekom 30 min), dok je kod druga dva eksperimenta zabilježena nešto sporija potrošnja što je vidljivo iz nagiba krivulje.



Slika 7. Prikaz promjene koncentracija manitola, mliječne kiseline, glicerola, octene kiseline i etanola tijekom preliminarne proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 30 minuta na temperaturi od 65 °C



Slika 8. Prikaz promjene koncentracija manitola, mliječne kiseline, glicerola, octene kiseline i etanola tijekom preliminarne proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 45 minuta na temperaturi od 65 °C



Slika 9. Prikaz promjene koncentracija manitola, mliječne kiseline, glicerola, octene kiseline i etanola tijekom preliminarne proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 60 minuta na temperaturi od 65 °C

Tijekom fermentacije ekstrakta sušenih smokvi koju provode zrnca kefirnog napitka zabilježen je nastanak sljedećih produkata: manitola, mliječne kiseline, glicerola, octene kiseline i etanola. Rezultati ostvareni tijekom ovog dijela izrade diplomskog rada slični su rezultatima prijašnjih istraživanja ostarenim u sličnim uvjetima (Pavlečić i sur., 2024). Manitol se, u sva 3 eksperimenta, pojavljuje u malim količinama u odnosu na ostale proizvode, a njegova koncentracija raste tek pred kraj procesa u uzgojima provedenim u otopini ekstrakta dobivenog ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 45 i 60 minuta. S druge strane, nastale su veće količine mliječne kiseline pa se može zaključiti da je u podlozi, za ta 2 eksperimenta, prisutno više homofermentativnih bakterija mliječne kiseline, u odnosu na heterofermentativne jer homofermentativne bakterije proizvode manje manitola, što je u skladu s literaturom (Kohler i sur., 2021). S druge strane, uočeno je da je koncentracija octene kiseline prilično visoka kod seta staklenki u kojem se proizvodnja provodila u otopini ekstrakta suhih smokvi ekstrahiranih 30 minuta (ekstrahirano manje nutrijenata). Nakon 8 dana uzgoja, dolazi do znatnog pada u koncentraciji etanola, što je vjerojatno posljedica oksidacije u octenu kiselinu djelovanjem

bakterija octene kiseline koje su prirodno prisutne u zrnima kefirnog napitka. U druga dva slučaja nije došlo do ove pojave, već se koncentracija etanola i octene kiseline postupno povećava tijekom uzgoja, a na kraju uzgoja etanol je prisutan u većoj koncentraciji od octene kiseline, iz čega se može zaključiti da su pri duljim vremenima ekstrakcije, postignuti bolji uvjeti za rast kvasaca koji fermentacijom proizvode etanol. Završna koncentracija glicerola je relativno visoka (2,00 g L⁻¹), u slučaju kada se za hranjivu podlogu koristila otopina ekstrakta sušenih smokvi ekstrahiranih tijekom 30 minuta, u odnosu na druga dva eksperimenata u preliminarnom dijelu ovog diplomskog rada, ali i u odnosu na istraživanja proizvodnje kefirnog napitka u otopini saharoze, uz dodatak cijelih sušenih smokvi, gdje je konačna koncentracija glicerola iznosila oko 0,5 g L⁻¹ (Kralj, 2023). Proizvodnja glicerola rezultat je odgovora kvasaca na uvjete osmotskog stresa, odnosno kada se oni nalaze u podlozi s nefermentabilnim izvorima ugljika poput etanola, glicerola i acetata, kao i u slučaju kada se radi o anaerobnom uzgoju gdje je izvor dušika limitiran. Kvasci transportiraju glicerol iz stanica u podlogu, mehanizmom protonskog simporta (Oliveira i sur., 2003). U druga dva slučaja u ovom diplomskom radu, koncentracija glicerola, na kraju procesa, osjetno je manja (<0,5 g L⁻¹).

Tablica 6. Prikaz promjena udjela suhe tvari tijekom proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama u otopinama ekstrakta suhe smokve različitog vremena ekstrakcije

Vrijeme ekstrakcije [min]	Udio suhe tvari biomase [%]			Prirast suhe tvari biomase [%]
	Na početku proizvodnje	Nakon 5 dana proizvodnje	Na kraju proizvodnje	
30	13,60	13,27	14,70	1,10
45	13,60	13,12	16,82	3,22
60	13,60	11,93	15,39	1,79

Što se tiče promjene udjela suhe tvari, iz podataka u tablici 6 može se uočiti da njezin udio tijekom proizvodnje prvo malo pada, a zatim prema kraju procesa raste, što znači da su ekstrakcijom suhih smokvi osigurani povoljni uvjeti za rast mikroorganizama. Poznato je da se u kefirnim zrnima nalazi bakterija *L. hilgardii*, odgovorna za sintezu dekstrana od kojega su zrnca građena, pa bi se, s obzirom na prirast biomase zrnaca, moglo zaključiti da su postignuti povoljni uvjeti za rast navedene bakterije. Najveći prirast suhe tvari zabilježen je u slučaju proizvodnje kefirnog napitka na ekstraktu dobivenom ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 45 minuta, a najmanji rast za ekstrakciju tijekom 30 minuta.

Tablica 7. Prikaz izračunatih pokazatelja uspješnosti za proizvodnju kefirnog napitka u staklenkama u otopinama ekstrakta suhe smokve različitog vremena ekstrakcije

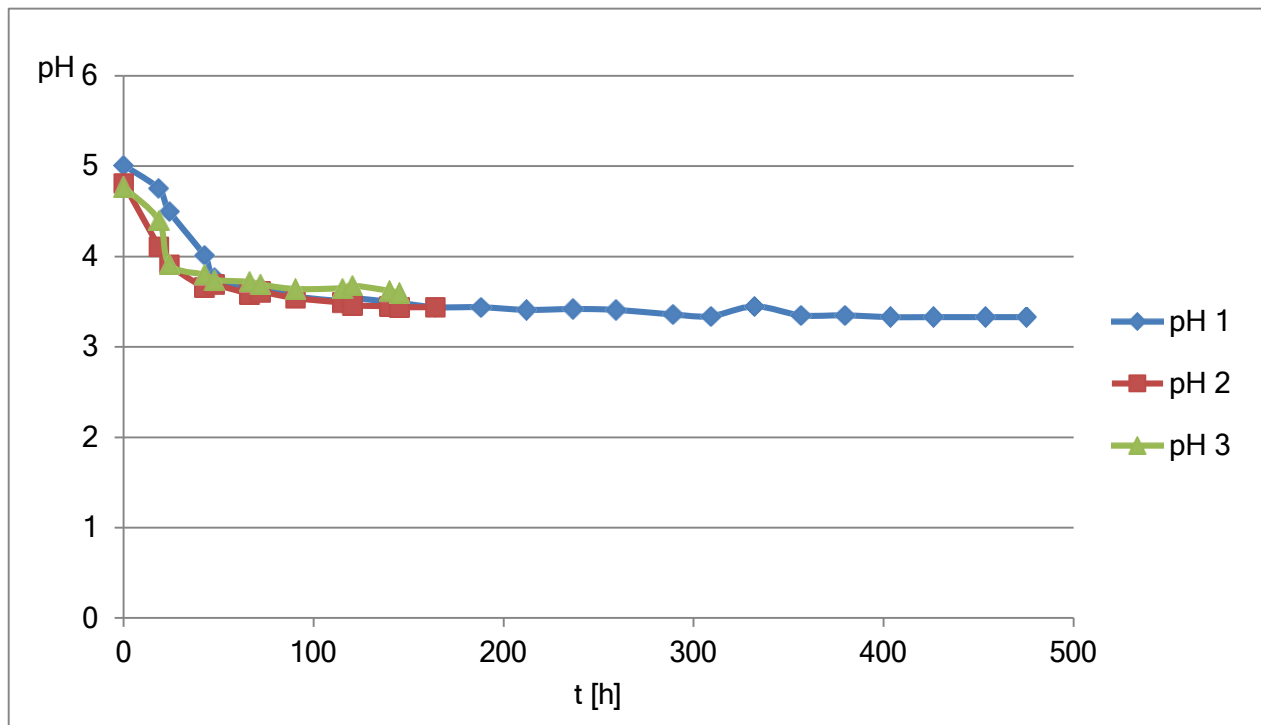
Pokazatelji	Vrijeme ekstrakcije		
	30 min	45 min	60 min
uspješnosti			
$\Delta S_{\text{glukoza}}$	15,2011	16,7151	20,1624
$\Delta S_{\text{fruktoza}}$	12,8187	15,2479	20,2105
$\Delta S_{\text{saharoza}}$	1,6025	1,6262	1,8682
$Y_{\text{manitol}} [\text{g}]$	0,2125	0,2092	0,1158
$Y_{\text{mliječna kiselina}} [\text{g}]$	1,3428	2,2128	1,5408
$Y_{\text{glicerol}} [\text{g}]$	1,8089	0,1849	0,2332
$Y_{\text{octena kislina}} [\text{g}]$	2,7171	1,1274	1,3777
$Y_{\text{etanol}} [\text{g}]$	0,7452	1,6749	2,1276
$Pr_{\text{manitol}} [\text{g/g dan}]$	0,0112	0,0149	0,0105
$Pr_{\text{mliječna kiselina}} [\text{g/g dan}]$	0,0707	0,1581	0,1401
$Pr_{\text{glicerol}} [\text{g/g dan}]$	0,0952	0,0132	0,0212
$Pr_{\text{octena kiselina}} [\text{g/g dan}]$	0,1430	0,0805	0,1252
$Pr_{\text{etanol}} [\text{g/g dan}]$	0,0392	0,1196	0,1934

Pokazatelji uspješnosti, odnosno izračunati procesni parametri, preliminarne proizvodnje kefirnog napitka u staklenkama prikazani su u tablici 7. Početne koncentracije supstrata u podlozi (glukoza, fruktoza, saharoza) bile su najviše za eksperiment u kojem je korištena otopina ekstrakta suhih smokvi koje su se najduže ekstrahirale, što je u skladu s literaturnim navodima (Lopez i sur., 2009). Uočena je gotovo potpuna potrošnja supstrata u sva tri eksperimenta, bez obzira koliko dugo je provedena ekstrakcija suhih smokvi. Iz tablice je vidljivo da je kod eksperimenta s najkraćim vremenom ekstrakcije (30 minuta) proizvedeno nešto više manitola ($0,2125 \text{ g L}^{-1}$), glicerola ($1,8089 \text{ g L}^{-1}$) i octene kiseline ($2,7171 \text{ g L}^{-1}$) u usporedbi s druga dva paralelna eksperimenta, dok je etanola i mliječne kiseline proizvedeno najmanje između ova tri uzgoja u staklenkama. Kod kraćeg vremena ekstrakcije, iz smokvi je ekstrahirano manje nutrijenata što pogoduje aktivnosti heterofermentativnih bakterija (poput vrsta iz roda *Leuconostoc*) koje proizvode manitol i octenu kiselinu koja je zato prisutna već na početku eksperimenta (Lynch i sur., 2021). Upravo je kod takvih fermentacija, s manje nutrijenata, zabilježen veći omjer proizvedene octene kiseline u odnosu na proizvedenu mliječnu kiselinu i etanol. Produljenjem trajanja ekstrakcije, osim količine ekstrahiranog šećera povećava se i količina ekstrahiranih nutrijentata što je utjecalo na bolji rast kvasaca, koji proizvode etanol, kao i na homofermentativne bakterije. Ova teza potvrđena je rezultatima dobivenim u ovom dijelu

diplomskog rada jer su kod uzgoja na podlozi pripremljenoj dužom ekstrakcijom (45 i 60 minuta) primijećeni veći prinosi etanola i mliječne kiseline. Tako je najveći prinos etanola ($2,1276 \text{ g L}^{-1}$) primijećen kod proizvodnje kefirnog napitka u podlozi dobivenoj ekstrakcijom tijekom 60 minuta, a najveći prinos mliječne kiseline ($2,2128 \text{ g L}^{-1}$) kod uzgoja u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 45 minuta. Generalno, može se zaključiti da je, povećanjem vremena trajanja ekstrakcije, iz smokvi ekstrahirano više šećera i nutrijenata te se povećava koncentracija mliječne kiseline i etanola u krajnjem proizvodu jer visoka koncentracije nutrijenata u podlozi pogoduje rastu kvasaca te, u manjoj mjeri, bakterija mliječne kiseline, posebice vrsta *S. cerevisiae* i *L. nagelli*. Suprotno tome, smanjuje se količina nastale octene kiseline, što je u skladu s literaturnim navodima (Laureys i sur., 2018). Uspoređujući produktivnosti, može se zaključiti da je, za etanol, ona najveća kod uzgoja u podlozi dobivenoj ekstrakcijom smokvi tijekom 60 minuta, za mliječnu kiselinu, najveća je kod ekstrakcije od 45 minuta, iako nije puno manja ni kod uzgoja s najdužim vremenom ekstrakcije, a za manitol, glicerol i octenu kiselinu, produktivnost je najveća kod eksperimenta za ekstrakciju od 30 minuta. Budući da je najviše supstrata i nutrijenata ekstrahirano iz smokvi tijekom ekstrakcije u trajanju od 60 minuta, upravo je tako pripremljena podloga upotrebljavana u daljnjim eksperimentima. Uzgoj kod navedene podloge, također se i najbrže odvijao. Dobiveni rezultati, u skladu su s istraživanjem koje su proveli Pavlečić i sur., (2024) gdje je dokazano da se dodatkom veće mase suhih smokvi u otopinu saharoze, postižu veći prinosi etanola i mliječne kiseline, a manji prinosi octene kiseline, glicerola i manitola, što se u ovom istraživanju događa produljenjem vremena ekstrakcije suhih smokvi.

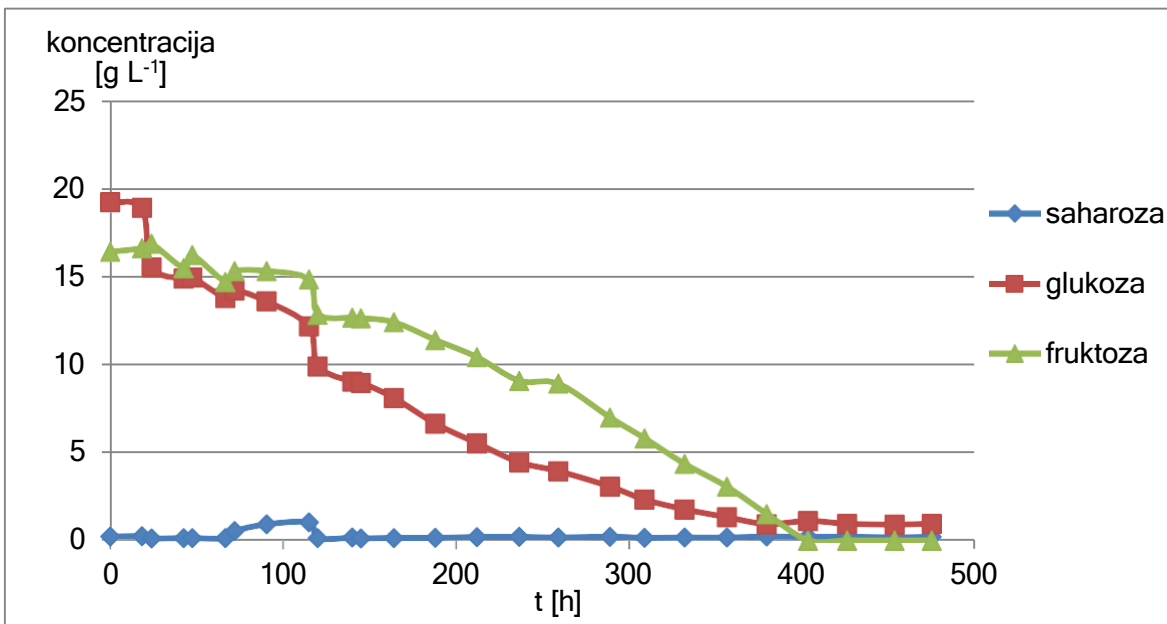
4.2. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA U BIOREAKTORU

Proizvodnja kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem prevedena je u 3 eksperimenta uz tri različita protoka podloge kroz bioreaktor ($7,2 \text{ mL min}^{-1}$, 28 mL min^{-1} i 112 mL min^{-1}) kako bi se ispitaio utjecaj protoka hranjive podloge, odnosno otopine smokvinog ekstrakta, na proizvodnju kefirnog napitka. Odabrani su niži protoci podloge da ne bi došlo do fluidizacije čvrstog sloja. U svakom eksperimentu ukupno je korišteno 750 mL otopine ekstrakta suhe smokve koji je inokuliran s 10 % (m/V) inokuluma, odnosno 75 g kefirnih zrnaca. Korišten je ekstrakt suhih smokvi dobiven ekstrakcijom 75 g sušenih smokvi u 750 mL vode tijekom 60 minuta pri temperaturi od $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Kao i u preliminarnom istraživanju, tijekom odvijanja bioprocasa praćen je pomoću UPLC analize kojom je praćena promjena koncentracije supstrata i produkata u svim izuzetim uzorcima. Uzorkovanje je vršeno 1 do 2 puta dnevno, te je svakom uzorku izmjerena pH vrijednost. Uzgoji u bioreaktoru trajali su 20 dana za uzgoj kod protoka od $7,2 \text{ mL min}^{-1}$, 11 dana kod uzgoja uz protok od 28 mL min^{-1} te 10 dana kod proizvodnje uz protok hranjive podloge koji je iznosio 112 mL min^{-1} . Eksperimenti su se odvijali na temperaturi od $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ koja je održavana cirkulacijom termostatirane vode kroz crijevo omotano oko staklene kolone u kojoj se provodio eksperiment. Također, u ovom dijelu istraživanja određivana je promjena udjela suhe tvari kefirnih zrnaca, kao i u preliminarnom dijelu, međutim ovdje je to mjerenje odrađeno samo na početku i na kraju proizvodnje.

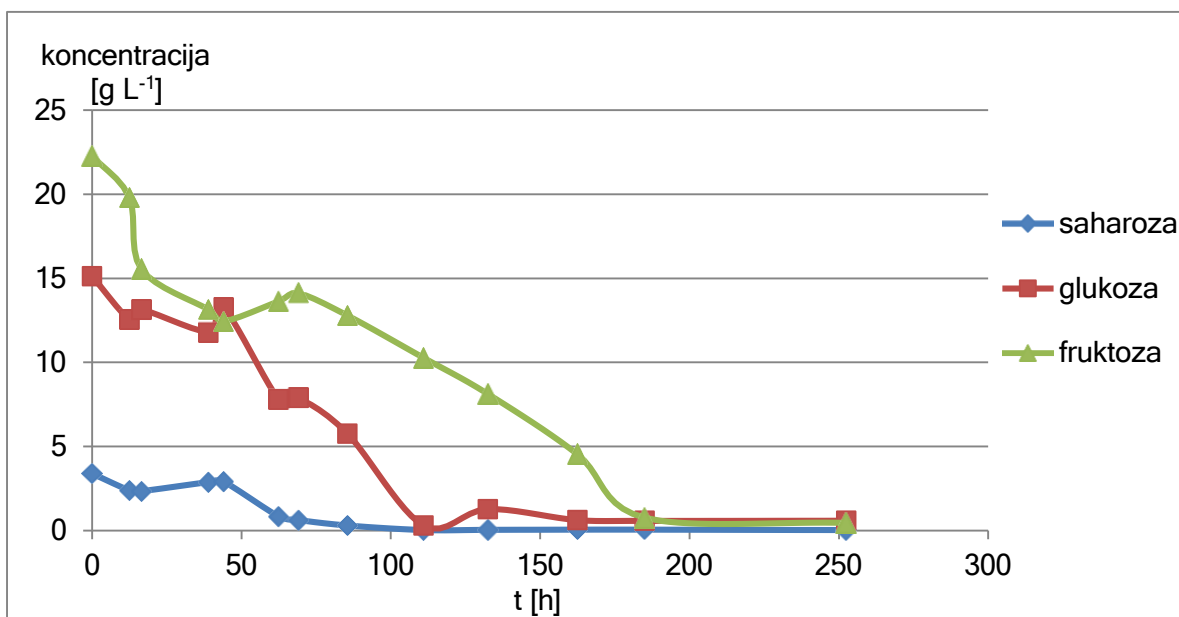


Slika 10. Prikaz promjene pH vrijednosti tijekom proizvodnj kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem pri brzini protoka podloge od $7,2 \text{ mL min}^{-1}$ (pH 1), 28 mL min^{-1} (pH 2) i 112 mL min^{-1} (pH 3)

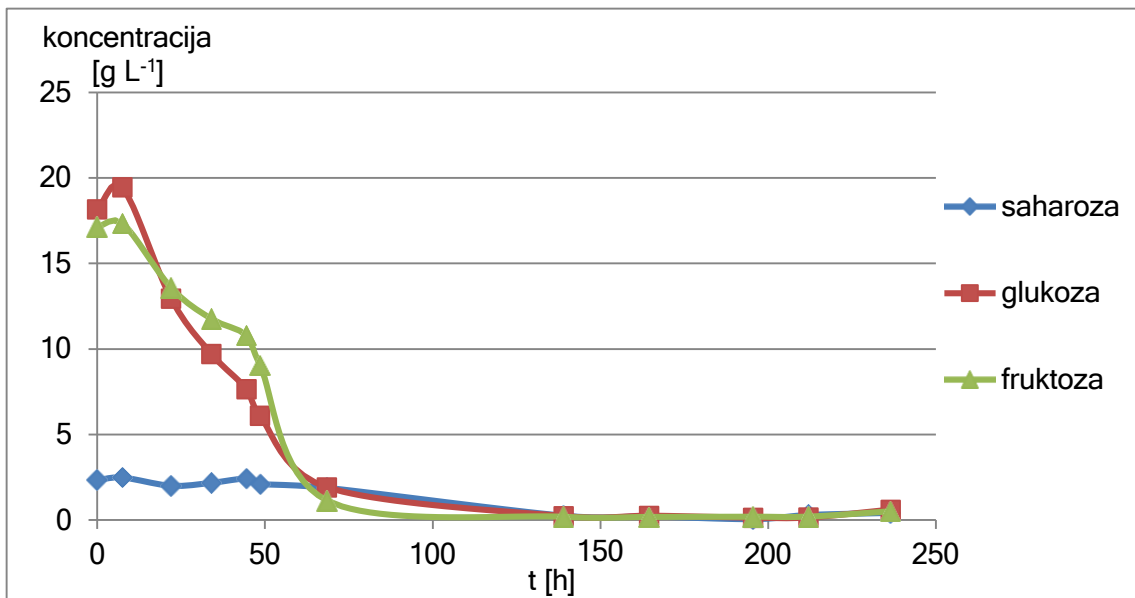
Na slici 10, koja prikazuju promjene pH vrijednosti tijekom tri uzgoja u bioreaktoru s čvrstim slojem kod različitih brzina protoka podloge, vidljivo je da je pH vrijednost najbrže padala tijekom prva tri dana uzgoja u sva tri eksperimenta te da je početna pH vrijednost podloga gotovo identična. Najveća promjena pH vrijednosti, promatrajući početnu i konačnu vrijednost, vidljiva je kod najniže brzine protoka hranjive podloge kroz kolonu, što je najvjerojatnije posljedica slabije homogenosti u takvom sustavu te su postignuti uvjeti slični proizvodnji kefirnog napitka kod niske koncentracije nutrijenata u podlozi. Generalno, dolazi do nakupljanja većih količina kiselina u odnosu na ostale produkte što za rezultat daje niže vrijednosti pH podloga.



Slika 11. Prikaz promjene koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem, u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 60 minuta na temperaturi od 65 °C, uz brzinu protoka podloge od 7,2 mL min⁻¹



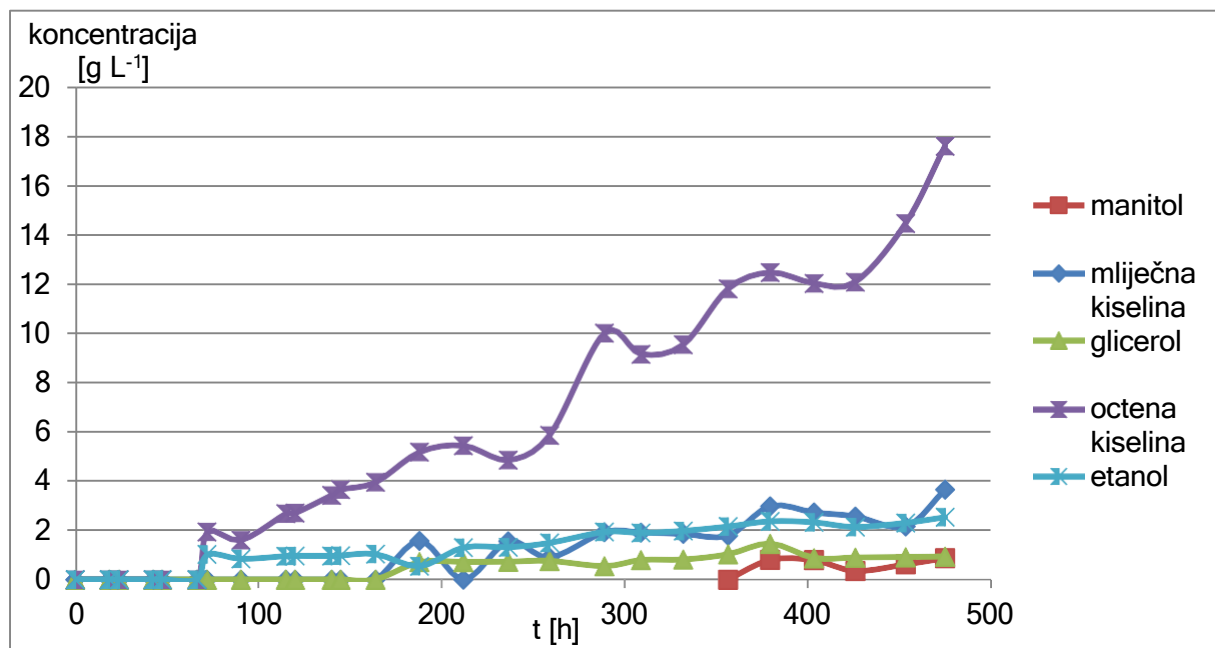
Slika 12. Prikaz promjene koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem, u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 60 minuta na temperaturi od 65 °C, uz brzinu protoka podloge od 28 mL min⁻¹



Slika 13. Prikaz promjene koncentracija glukoze, fruktoze i saharoze tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem, u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 60 minuta na temperaturi od 65 °C, uz brzinu protoka podloge od 112 mL min⁻¹

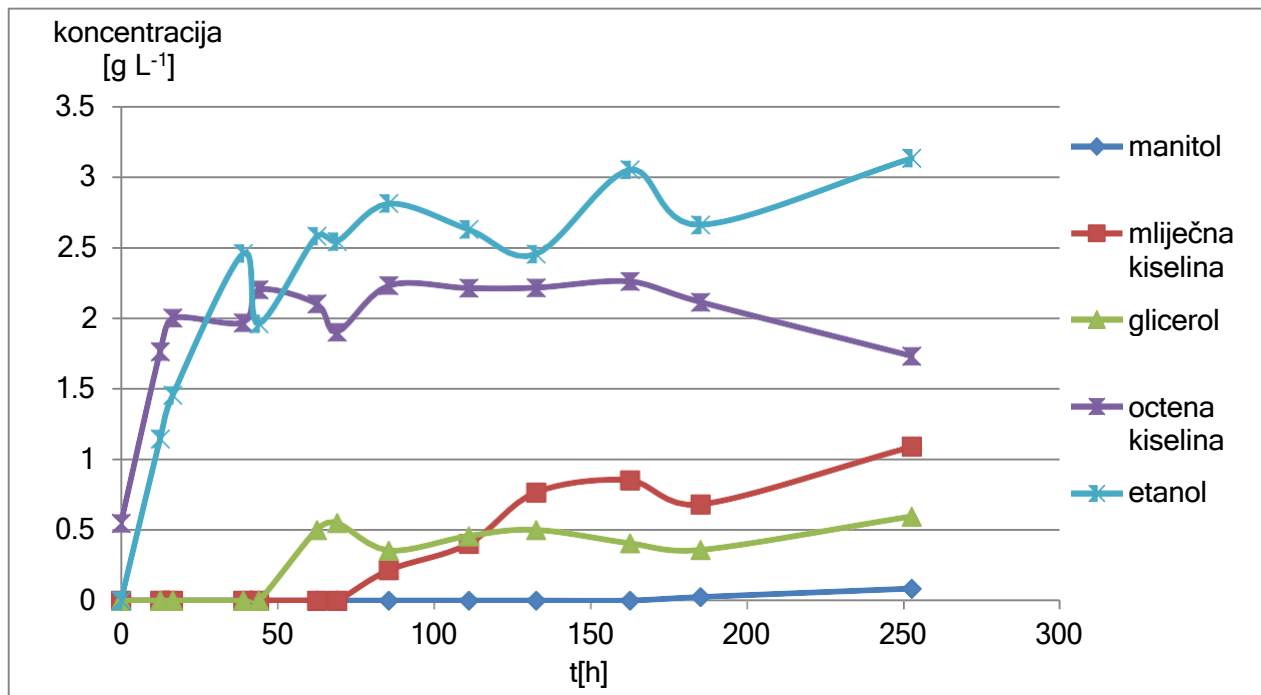
Uspoređujući slike 11 – 13 koje prikazuju promjene koncentracija supstrata tijekom uzgoja u bioreaktoru, vidljivo je da je uzgoj pri protoku hranjive podloge od 7,2 mL min⁻¹ trajao najduže, više od 400 sati, dok su se druga dva procesa odvijala znatno brže. Uzgoj kod brzine protoka podloge kroz kolonu od 28 mL min⁻¹ trajao je oko 180 sati, a uzgoj s protokom podloge od 112 mL min⁻¹ malo više od 60 sati. Uzorkovanje je vršeno ispod bioreaktora kroz crijevo zaduženo za cirkulaciju hranjive podloge kroz bioreaktor, a prvi uzorak uzet je neposredno nakon postavljanja sustava. Na slikama se, također, može uočiti da je i u ovim eksperimentima početna koncentracija glukoze i fruktoze, kao i kod preliminarnе proizvodnje kefirnog napitka, puno veća od koncentracije saharoze. Nadalje, i u ovim uzgojima vidljivo je da se prvo iz podloge troše jednostavniji izvori ugljika (glukoza, fruktoza) te da je, kada je zabilježena njihova prisutnost u podlozi, saharoza hidrolizirana tek kada su one u potpunosti utrošene, što ukazuje na kataboličku represiju izvorom ugljika. Kod proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru, pri brzini protoka podloge od 7,2 mL min⁻¹, dinamika potrošnje supstrata sporija je od one u preliminarnom dijelu istraživanja za set staklenki u kojima je korištena otopina ekstrakta suhih smokvi ekstrahiranih tijekom 60 minuta. S obzirom da je u ovom eksperimentu korišten najmanji protok, u usporedbi s ostala dva eksperimenta, potrošnja supstrata bila je najduža i proizvodnja kefirnog napitka je najdulje trajala. Bez obzira na činjenicu da je, kod uzgoja s najmanjom brzinom protoka podloge, ostvaren najdulji kontakt podloge sa zrcima, supstrati su se trošili

najsporije jer manji protoci hranjive podloge znače laminarno strujanje tekućine kroz čvrsti sloj, kao i stvaranje gradijenta koncentracije kroz sloj kefirnih zrnaca. U takvim uvjetima svi mikroorganizmi, koji se nalaze u kefirnim zrnacima, najvjerojatnije nisu imali dostupne dovoljne količine supstrata i faktora rasta, što je za posljedicu imalo sporu fermentaciju, odnosno fermentaciju koja po svojoj dinamici odgovara fermentaciji u podlozi s malo nutrijenata (Pavlečić i sur., 2024; Lynch i sur., 2021). Također, na početku eksperimenta provedenog kod brzine protoka od $7,2 \text{ mL min}^{-1}$ vidljive su oscilacije u koncentracijama glukoze i fruktoze. Ovakvi rezultati ukazuju na to da je, zbog niskog protoka i s obzirom na laminarni tok podloge, odnosno otežen prijenos mase kroz čvrsti sloj, bilo teško osigurati homogenost sustava kako je moguće npr. kod bioreaktora s miješalom, što je za posljedicu imalo formiranje lokalnih koncentracija supstrata, koje mogu objasniti dobiveni izgled dijagrama (slika 11). Slične rezultate dobila je i Galović (2023) u svojem istraživanju pri radu s bioreaktorom s čvrstim slojem. Bolja dinamika potrošnje supstrata, kao i značajno kraće vrijeme u kojem je supstrat utrošen, uočena je kod druga dva eksperimenta s povećanim protocima (28 mL min^{-1} , 112 mL min^{-1}), što je vidljivo iz nagiba krivulje (slike 12 i 13).



Slika 14. Prikaz promjene koncentracija manitola, mliječne kiseline, glicerola, octene kiseline i etanola tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktorom s čvrstim slojem, u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 60 minuta na temperaturi od $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$, uz brzinu protoka podloge od $7,2 \text{ mL min}^{-1}$

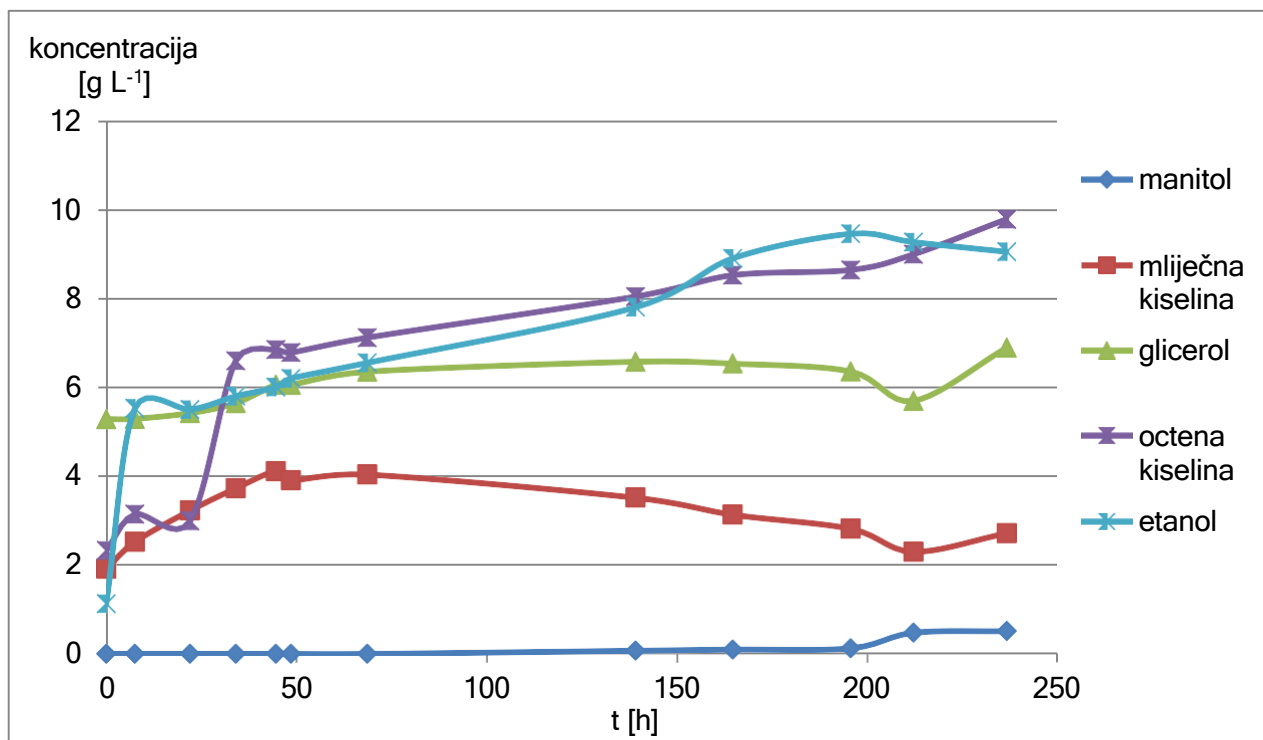
Što se tiče koncentracija proizvoda, nastalih tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreктору s čvrstim slojem, pri protoku hranjive podloge od $7,2 \text{ mL min}^{-1}$, prva stvar koja se ističe na slici 14 je činjenica da je octena kiselina nastala u puno većoj koncentraciji od ostalih proizvoda. Sporiji protok podloge rezultira slabijom dostupnošću supstrata i hranjivih tvari svim mikroorganizama koji se nalaze u kefirnim zrnima, što je za posljedicu imalo simulaciju uvjeta kada se proizvodnja kefirnog napitka provodi u podlozi s niskim koncentracijama nutrijenata. To za posljedicu ima duže vrijeme trajanja fermentacije, što je i ovdje slučaj. Nadalje, povećanje koncentracije kiselina, posebno octene čija je koncentracija u odnosu na proizvedenu mliječnu kiselinu, kao i na proizvedeni etanol, nešto viša, nego u fermentacijama kada u podlozi ima dovoljno nutrijenata. U ovom eksperimentu su, osim navedenih produkata prikazanih na slici 14, zabilježene i nešto niže koncentracije manitola i glicerola. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su stvoreni povoljni uvjeti za rast mikroorganizama koji u značajnijoj mjeri proizvode octenu kiselinu. Navedeno možemo potkrijepiti i činjenicom da se koncentracija etanola ne mijenja značajno kroz ovaj proces. Etanol, u kefirnom napitku, nastaje procesom fermentacije koju provode kvasci, najviše *Saccharomyces cerevisiae*, te heterofermentativne bakterije mliječne kiseline. Bakterije octene kiseline odgovorne su za oksidaciju etanola do octene kiseline što dovodi do rasta njezine koncentracije u podlozi, pogotovo prema kraju bioprocesa, te stagniranja koncentracije etanola. Povećanje koncentracije octene kiseline na početku procesa, najvjerojatnije je posljedica aktivnosti heterofermentativnih bakterija kojima odgovaraju uvjeti podloge siromašne nutrijentima. Također, moguće je da je u inicijalnom dijelu fermentacije došlo po povećane aktivnosti kvasca *Dekkera bruxellensis* za koji je dokazano da može rasti u hranjivim podlogama vrlo niske pH vrijednosti (pH 2) te da posjeduje sposobnost proizvodnje octene kiseline (Jelačić, 2021). Laureys i sur. (2018) uočili su da je, u tom slučaju povećane aktivnosti kvasca *D. bruxellensis*, trajanje proizvodnje kefirnog napitka značajno produljeno te da je količina proizvedene octene kiseline puno veća u odnosu na količinu proizvedene mliječne kiseline i etanola, što se poklapa s rezultatima dobivenim u ovom eksperimentu. Osim već navedenih radnih mikroorganizama, ulogu u ovakvom konačnom sastavu kefirnog napitka, mogle su imati i bifidobakterije, točnije, vrsta *Bifidobacterium aquikefiri* za koju je poznato da uz mliječnu kiselinu može proizvoditi i veće količine octene kiseline. Ono što je specifično za ovu vrstu, činjenica je da je molarni odnos proizvedene octene kiseline u odnosu na mliječnu kiselinu 4,8:1 (Kralj, 2023). Navedene tvrdnje mogu se usporediti s rezultatima dobivenim u ovom diplomskom radu gdje je postignuta koncentracija octene kiseline od $17,60 \text{ g L}^{-1}$ i koncentracija mliječne kiseline od $3,65 \text{ g L}^{-1}$, što stavljeno u omjer odgovara literaturnim navodima.



Slika 15. Prikaz promjene koncentracija manitola, mliječne kiseline, glicerola, octene kiseline i etanola tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem, u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 60 minuta na temperaturi od 65 °C, uz brzinu protoka podloge od 28 mL min⁻¹

Na slici 15, prikazani su rezultati promjena koncentracija svih produkata koji su nastali u eksperimentu gdje je brzina protoka podloge kroz kolonu iznosila 28 mL min⁻¹. U ovom slučaju, s obzirom da je najvjerojatnije došlo do bolje izmještanosti sustava te da su postignuti bolji uvjeti i prijenos mase kroz čvrsti sloj kefirnih zrnaca, dobiveni prikaz promijene koncentracija nastalih produkata sličniji je fermentaciji odnosno, proizvodnji kefirnog napitka, kada u podlozi ima dovoljno faktora rasta i metabolizam-stimulirajućih komponenti. To se, osim u skraćivanju vremena fermentacije, očituje i u koncentracijama produkata i njihovim omjerima koji su postignuti na kraju bioprocasa. U usporedbi s rezultatima kod najnižeg protoka proizvedeno je više etanola i mliječne, a manje octene kiseline što je u skladu s literaturom i zaključcima dosadašnjih istraživanja (Kralj, 2023). Mliječna kiselina pojava ljuje se u hranjivoj podlozi nakon 85 sati uzgoja, a na kraju bioprocasa u podlozi je ostvarena je 1/3 količine mliječne kiseline dobivene u prijašnjem uzgoju u bioreaktru. Dinamika promjene koncentracije octene kiseline sličnija je onoj iz preliminarnog uzgoja. Na početku uzgoja njena koncentracija iznosila je 0,55 g L⁻¹, što bi moglo značiti da su bakterije octene kiseline, prirodno prisutne u kefirnim zrcima, pridonijele ukupnoj koncentraciji octene kiseline u podlozi. Na kraju procesa, koncentracija

octene kiseline bila je $1,73 \text{ g L}^{-1}$, dakle značajno manje no u prethodnom uzgoju. S druge strane, konačna koncentracija etanola bila je nešto viša u ovom uzgoju ($3,13 \text{ g L}^{-1}$), nego u prethodnom, što je moguće objasniti tvrdnjom da su, zbog boljeg prijenosa mase kroz sustav, postignuti bolji uvjeti za rast kvasaca koji fermentacijom izvora ugljika proizvode etanola. Također, etanol je detektiran u hranjivoj podlozi na samom početku uzgoja, što potkrepljuje tvrdnju da su osigurani svi potrebni nutrijenti za rast kvasaca. Također, i u ovom eksperimentu zabilježene su manje koncentracije manitola koji je nastao prema kraju fermentacije, točnije nakon 150 sati uzgoja.



Slika 16. Prikaz promjene koncentracija manitola, mliječne kiseline, glicerola, octene kiseline i etanola tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem, u podlozi dobivenoj ekstrakcijom suhih smokvi tijekom 60 minuta na temperaturi od $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$, uz brzinu protoka podloge od 112 mL min^{-1}

U trećem, posljednjem eksperimentu, vidljivo je da najveći protok kroz nasuti, tj. čvrsti sloj kefirnih zrnaca ima najveći, i to pozitivan utjecaj na količinu proizvedenih produkata (slika 16). Ovo opažanje je najvjerojatnije posljedica najboljih uvjeta za proizvodnju kefirnog napitka u ovom dijelu istraživanja, što je vrlo vjerojatno posljedica najboljeg prijenosa mase kroz čvrsti sloj, dovoljne homogenosti podloge i najmanjeg gradijenta koncentracija supstrata i produkata kroz

sloj kefirnih zrnaca. Ovdje su sve koncentracije nastalih produkata, također u skladu s literaturom te su postignuti najbolji prinosi za sve produkte, kao i u istraživanju koje je provela Kralj (2023) gdje se, poboljšanjem prijenosa mase kroz sustav, također skraćuje vrijeme trajanja procesa i dobivaju veći prinosi. Jedino odstupanje zabilježeno je u slučaju promjene koncentracije octene kiseline koja odudara od očekivanih vrijednosti. Jedno od objašnjenja mogla bi biti eventualna pogreška kod integracije kromatograma preko kojih se koncentracija određivala. Također, moguće je da su u nekom trenu postignuti uvjeti za povećanu aktivnost bakterija octene kiseline što bi moglo objasniti dobivene rezultate. U odnosu na prethodna dva uzgoja, postignute su najviše konačne koncentracije glicerola ($6,89 \text{ g L}^{-1}$) i etanola ($9,05 \text{ g L}^{-1}$). Finalna koncentracija octene kiseline iznosila je $9,78 \text{ g L}^{-1}$, a najviša zabilježena koncentracija mliječne kiseline iznosila je $4,11 \text{ g L}^{-1}$. Manitol se i u ovom procesu pojavljuje u vrlo malim količinama (konačna koncentracija iznosila je $0,5 \text{ g L}^{-1}$). Odsutnost manitola, ili njegova prisutnost u vrlo malim količinama, u svim provedenim eksperimentima u ovom diplomskom radu, mogla bi se objasniti aktivnošću bakterija octene kiseline s obzirom da se octena kiselina pojavljuje u visokim koncentracijama, a poznato je da bakterije octene kiseline, za osiguravanje energije, mogu oksidirati različite izvore ugljika pa tako i manitol (Mamlouk i Gullo, 2013).

Tablica 8. Prikaz promjena udjela suhe tvari tijekom proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem kod različitih protoka

Protok [mL min^{-1}]	Udio suhe tvari na početku uzgoja [%]	Udio suhe tvari na kraju uzgoja [%]	Prirast udjela suhe tvari biomase [%]
7,2	13,60	16,27	2,67
28	13,60	15,22	1,62
112	13,60	18,15	4,55

Udio suhe tvari na kraju eksperimenata provedenih u bioreaktoru s čvrstim slojem pri različitim protocima hranjive podloge pokazuje da su najbolji uvjeti za rast kulture radnih mikroorganizama postignuti u uzgoju s protokom od 112 mL min^{-1} (opažen je porast udjela suhe tvari za 4,55 %), dok su u druga dva eksperimenta postignuti nešto manji prirasti biomase. Tako je u procesu kod protoka od 28 mL min^{-1} zabilježen porast udjela suhe tvari od 1,62 %, a u proizvodnji kefirnog napitka kod brzine protoka od $7,2 \text{ mL min}^{-1}$ postignut je porast udjela suhe tvari za 2,67 %. Protok od 112 mL min^{-1} osigurao je najbolju distribuciju mase u sustavu pa posljedično i najbolji prinos biomase. Temeljem rezultata prikazanih u tablici 8, može se zaključiti da je ekstrakt suhe smokve vrlo dobra podloga za proizvodnju kefirnog napitka jer osigurava sve

nutrijente potrebne za rast kulture mikroorganizama, te da je protok podloge jedan od vrlo bitnih čimbenika koji utječu na finalan sastav kefirnog napitka, kao i na dinamiku odvijanja bioprocesa.

Tablica 9. Prikaz izračunatih pokazatelja uspješnosti za uzgoje u bioreaktoru s čvrstim slojem pri različitim protocima hranjive podloge

Pokazatelji	Brzina protoka		
	7,2 mL min ⁻¹	28 mL min ⁻¹	112 mL min ⁻¹
$\Delta S_{\text{glukoza}}$	18,2648	14,5447	17,5702
$\Delta S_{\text{fruktoza}}$	16,3994	21,8300	16,6500
$\Delta S_{\text{saharoza}}$	0,0480	3,3599	1,9177
$Y_{\text{manitol}} [\text{g}]$	0,8624	0,0846	0,5129
$Y_{\text{mliječna kiselina}} [\text{g}]$	3,6509	1,0886	0,8012
$Y_{\text{glicerol}} [\text{g}]$	0,9308	0,5953	1,6072
$Y_{\text{octena kiselina}} [\text{g}]$	17,5999	1,7298	7,4545
$Y_{\text{etanol}} [\text{g}]$	2,5271	3,1295	7,9255
$Pr_{\text{manitol}} [\text{g/g dan}]$	0,0431	0,0077	0,0513
$Pr_{\text{mliječna kiselina}} [\text{g/g dan}]$	0,1825	0,0990	0,0801
$Pr_{\text{glicerol}} [\text{g/g dan}]$	0,0465	0,0541	0,1607
$Pr_{\text{octena kiselina}} [\text{g/g dan}]$	0,8800	0,1573	0,7455
$Pr_{\text{etanol}} [\text{g/g dan}]$	0,1053	0,2845	0,7926

U tablici 9 prikazani su procesni parametri izračunati za sva 3 procesa proizvodnje kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem provedena tijekom ovog diplomskog rada. Kada upoređujemo prinose proizvoda i produktivnost procesa izračunatih iz rezultata dobivenih na kraju ova tri bioprocesa, može se uočiti da je najbolja produktivnost u proizvodnji manitola (0,051 g L⁻¹), glicerola (0,16 g L⁻¹) i etanola (0,79 g L⁻¹) postignuta u eksperimentu proizvodnje kefirnog napitka kod protoka otopine ekstrakta od 112 mL min⁻¹, dok je najbolja produktivnost i najveći prinos mliječne (3,65 g L⁻¹) i octene kiseline (17,60 g L⁻¹) postignut u eksperimentu pri brzini protoka hranjive podloge od 7,2 mL min⁻¹, iako produktivnost procesa kod protoka od 112 mL min⁻¹ nije puno manja. Najmanji prinos octene kiseline, glicerola i manitola ostvareni su uzgojem s protokom podloge od 28 mL min⁻¹. S obzirom na promijenenu koncentraciju tijekom uzgoja u bioreaktoru, proces kod protoka od 7,2 mL min⁻¹ ponaša se kao uzgoj pri malim koncentracijama

nutrijenata, što je vidljivo iz visoke završne koncentracije octene kiseline i niske koncentracije etanola. Sumarno gledano, najbolji rezultati ostvareni su tijekom uzgoja uz protok od 112 mL min^{-1} , što se ponovo može pripisati optimalnoj raspodjeli mase unutar sustava, postignutom zadanim protokom. Dobiveni rezultati u skladu su s literaturom, odnosno istraživanjem koje su proveli Pavlečić i sur. (2024), gdje su provedeni eksperimenti proizvodnje kefirnog napitka u otopini saharoze, uz dodatak cijelih suhih smokvi, u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru pri različitim brzinama rotacije bioreaktora. Dokazano je da se, povećanjem brzine rotacije bioreaktora, odnosno poboljšanjem prijenosa mase kroz sustav, dobivaju veći prinosi produkata i skraćuje vrijeme trajanja uzgoja, što se može usporediti s povećanjem protoka podloge kroz sustav u ovom istraživanju jer se u oba slučaja postiže bolja homogenost podloge. Ako se uz to istakne i činjenica da je upravo taj eksperiment, s najvećom brzinom protoka, najkraće trajao, može se zaključiti da su uvjeti osigurani u tom uzgoju najbolji odabir za proizvodnju kefirnog napitka u bioreaktoru s čvrstim slojem, između provedenih eksperimenata.

5. ZAKLJUČCI

1. Temeljem preliminarnog dijela istraživanja utjecaja duljine trajanja ekstrakcije sušenih smokvi na sastav podloge za proizvodnju kefirnog napitka, pokazalo se da se otopina ekstrakta suhih smokvi može koristiti u proizvodnji kefirnog napitka te da povećanje duljine trajanja ekstrakcije ima pozitivan utjecaj na povećanje udjela fermentabilnih šećera u podlozi, a najbolji rezultati, početnih koncentracija fermentabilnih šećera, ostvareni su kod vremena ekstrakcije u trajanju od 60 minuta ($Y_{\text{etanol}} = 2,13 \text{ g L}^{-1}$). Također, osim povećanja količine ekstrahiranih šećera, s produljenjem ekstrakcije dolazi i do povećanja koncentracije ostalih nutrijenta koji imaju značajan utjecaj na dinamiku odvijanja bioprocesa.
2. Na temelju rezultata dobivenih u preliminarnom istraživanju ovog diplomskog rada, za daljnje eksperimente provedene u bioreктору s čvrstim slojem, korištena je podloga dobivena najduljim vremenom ekstrakcije suhih smokvi. Proizvodnja kefirnog napitka provedena je kod tri različite brzine protoka ($7,2 \text{ mL min}^{-1}$, 28 mL min^{-1} , 112 mL min^{-1}) gdje se pokazalo da povećanje brzine protoka podloge ima pozitivan utjecaj na trajanje ukupnog vremena fermentacije, kao i na konačni sastav kefirnog napitka.
3. Iako je korištena otopina ekstrakta suhih smokvi koja je imala najbolji sastav, pri najmanjoj brzini protoka podloge ($7,2 \text{ mL min}^{-1}$) uočeno je postizanje uvjeta koji su karakteristični za fermentacije koje se provode u podlogama siromašnim nutrijentima, što za posljedicu ima vrlo velik prinos octene kiseline ($17,60 \text{ g L}^{-1}$). Povećanjem protoka, poboljšao je prijenos mase kroz čvrsti sloj kefirnih zrnaca, što doprinosi boljoj dinamici odvijanja bioprocesa, kao i boljem sastavu finalnog proizvoda. Tako su kod najvećeg protoka podloge (112 mL min^{-1}) postignuti najveći prinosi etanola ($7,93 \text{ g L}^{-1}$) i glicerola ($1,61 \text{ g L}^{-1}$) te je fermentacija u tom slučaju najkraće trajala (60 sati).
4. Na temelju rezultata ostvarenih tijekom izrade ovog diplomskog rada, pokazalo se da se otopina ekstrakta suhih smokvi, kao i bioreaktor s čvrstim slojem, mogu koristiti u biotehnološkoj proizvodnji kefirnog napitka. U svrhu optimiranja postupka proizvodnje kefirnog napitka, u ovoj vrsti bioreaktora, potrebno je provesti daljnja istraživanja.

6. LITERATURA

Andrews LS, Godshall MA, Moore S (2002) Sucrose Degradation Under Model Processing Conditions. *Jf Food Sci* **67(5)**, 1621-1624. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08694.x

Atmakidis T, Kenig EY (2014) Numerical investigations of packed bed reactors with irregular particle arrangements. U: 24th European Symposium on Computer Aided Process Engineering, Budimpešta, str. 217-222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63456-6.50037-5>

Bechtner J, Xu D, Behr J, Ludwig C, Vogel RF (2019) Proteomic Analysis of *Lactobacillus nagelii* in the Presence of *Saccharomyces cerevisiae* Isolated From Water Kefir and Comparison With *Lactobacillus hordei*. *Front Microbiol* **10**, 325. doi: 10.3389/fmicb.2019.00325

Boekhout T, Amend AS, El Baidouri F, Gabaldón T, Geml J, Mittelbach M i sur. (2021) Trends in yeast diversity discover. *Fungal Diversity* **114**, 491-537. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>

Brar SK, Dhillon GS, Soccol, CR (2014) Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals, Springer, Quebec, Kanada.

Catalano S, Wozniak S, Kaplan K (2023) Packed bed reactor. *Michigan Engineering*. <https://encyclopedia.che.engin.umich.edu/packed-bed-reactors/>. Pristupljeno 30.11.2024.

Coma ME, Peltzer MA, Delgado JF, Salvay AG (2019) Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *Eur Polym J* **120**, 109234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>

Cufaoglu G, Erdinc AN (2023) An alternative source of probiotics: Water kefir. *Food Frontiers* **4(1)**, 21-31. <https://doi.org/10.1002/fft2.200>

De Roos J, De Vuyst L (2018) Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnol* **49**, 115-119. doi:10.1016/j.copbio.2017.08.007

Eckel, VPL, Vogel RF (2020). Genomic and physiological insights into the lifestyle of *Bifidobacterium* species from water kefir. *Arch Microbiol* **202(7)**, 1627-1637. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01870-7>

Fels L, Jakob F, Vogel RF, Wefers D (2018) Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydr Polym* **189**, 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>

Fiorda FA, Vinicius de Melo Pereira G, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK, Binder Pagnoncelli MG, Porto de Souza Vandenberghe L i sur. (2017) Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiol* **66**, 86-95. doi: 10.1016/j.fm.2017.04.004

Galović A (2023) Proizvodnja 2,3-butandiola u bioreaktoru s čvrstim slojem u uvjetima povećane inicijalne koncentracije octene kiseline (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

George F, Daniel C, Thomas M, Singer E, Guilbaud A, Tessier F i sur. (2018) Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. *Front Microbiol* **9**, 2899. doi: 10.3389/fmicb.2018.02899

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.

Guzel-Seydim, Gokirmakli C, Greene AK (2021) A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends Food Technol* **113**, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>

Jelačić N (2021) Optimiranje uvjeta proizvodnje kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kohler S, Schmach M, Troubounis AHL, Ludzuweit M, Rettberg N, Senz M (2021) Tradition as a Stepping Stone for a Microbial Defined Water Kefir Fermentation Process: Insights in Cell Growth, Bioflavoring, and Sensory Perception. *Front Microbiol* **12**, 732019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.732019>

Kralj M (2023) Proizvodnja kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru uz dodatak suhih smokvi (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

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. doi:10.3389/fmicb.2019.02876

López N, Puértolas E, Condón S, Raso J, Álvarez I (2009) Enhancement of the solid-liquid extraction of sucrose from sugar beet (*Beta vulgaris*) by pulsed electric fields. *Food Sci Technol* **42(10)**, 1674-1680. doi:10.1016/j.lwt.2009.05.015

Lynch KM, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK (2021) An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *Int J Food Microbiol* **345**, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>

Maicas (2020) The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms* **8**, 1142. doi:10.3390/microorganisms8081142

Mamlouk D i Gullo M (2013) Acetic Acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. *Indian J Microbiol* **53(4)**, 377-384. doi: 10.1007/s12088-013-0414-z

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. doi: 10.1111/1574-6968.12248

Mokoena M (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules* **22**, 1255. doi: 10.3390/molecules22081255

Moretti AF, Candela Moure M, Quinoy F, Esposito F, Simonelli N, Medrano M i sur. (2022) Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods* **5**, 100123. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>

Nejedly P (2021) Utjecaj pH vrijednosti podloge na proizvodnju kefirnog napitka u biorektoru s miješalom (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Oliveira R, Lages F, Silva-Graça M, Lucas C (2003) Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: Artefacts and re-definitions. *Biochim Biophys* **1613**, 57. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00138-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00138-X)

Patel SH, Tan JP, Borner RA, Zhang SJ, Priour S, Lima A, Ngom-Bru C, Cotter PD, Duboux S (2022) A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes. *Innov Food Sci Emerg Technol* **80**, 103084. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103084>

Pavlečić M, Novak M, Trontel A, Mardetko N, Petravić Tominac V, Dobrinčić A i sur. (2024) The Production of Water Kefir Drink with the Addition of Dried Figs in the Horizontal Rotating Tubular Bioreactor. *Foods* **13**, 2834. <https://doi.org/10.3390/foods13172834>

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

Riitonen T, Eta V, Hyvärinen S, Jönsson LJ, Mikkola JP (2013) Engineering aspects of bioethanol synthesis. *Adv Chem Eng* **42**, 1-73. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-386505-2.00001-8>

Romero-Luna HE, Peredo-Lovillo A, Hernández-Mendoza A, Hernández-Sánchez H, Cauich-Sánchez PI, Ribas-Aparicio RM, Dávila-Ortiz G (2020) Probiotic Potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 Isolated from Water Kefir Grains (Tibicos). *Curr Microbiol* **77(10)**, 2584-2592. doi:10.1007/s00284-020-02016-0

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. doi: 10.1016/j.fm.2013.03.009

Stipić T (2024) Formulacija mikroinkapsuliranih i liofiliziranih proizvoda izvedenih iz kombuche s karakterizacijom njihovog antimikrobnog i antioksidacijskog potencijala (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Tireki (2022) Physicochemical and sensory parameters of vegan water kefir beverages fermented with different fruits. *Eur J Res Dev* **2(4)**, 1-12. <https://doi.org/10.56038/ejrnd.v2i4.119>

Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J i sur. (2021) Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol* **9**. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

Xu D, Fels L, Wefers D, Behr J, Jakob F, Vogel RF (2018) *Lactobacillus hordei* dextrans induce *Saccharomyces cerevisiae* aggregation and network formation on hydrophilic surfaces. *Int J Biol Macromol* **115**, 236-242. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.068

Yang H, Chen T, Wang M, Zhou J, Liebl W, Barja F, Chen F (2022) Molecular biology: Fantastic toolkits to improve knowledge and application of acetic acid bacteria. *Biotechn Adv* **58**, 107911. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107911>

Yerlikaya O, Akan E, Kinik O (2022) The metagenomic composition of water kefir microbiota. *Int J Gastronom Food Sci* **30**, 100621. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100621>

PRILOZI


Prilog 1. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva UPLC analizom

Kemijski spoj	Retencijsko vrijeme t_R [min]	Jednadžba baždarnog pravca	R ² [-]
Glukoza	5,08	$y = 140381,12y_{glukoza} - 157,58$	1,0000
Fruktoza	5,65	$y = 141560y_{fruktoza} - 1278,7$	0,9997
Saharoza	4,52	$y = 123790y_{saharoza} - 145,45$	0,9998
Manitol	6,078	$y = 140550y_{manitol} + 123,3$	1,0000
Mliječna kiselina	6,927	$y = 68594y_{mliječna\ kiselina} - 1912,5$	0,9998
Glicerol	7,292	$y = 115438y_{glicerol} + 2603,5$	0,9999
Octena kiselina	7,683	$y = 115438y_{octena\ kiselina} + 697,25$	0,9800
Etanol	10,074	$y = 484161y_{etanol} + 737,97$	0,9999

y – površina

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Vlastoručni potpis