

Proizvodnja kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru uz dodatak suhih smokvi

Kralj, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:051200>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2023

Monika Kralj

**PROIZVODNJA KEFIRNOG
NAPITKA U HORIZONTALNOM
ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM
BIOREAKTORU UZ DODATAK
SUHIH SMOKVI**

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

Zahvaljujem svojem mentoru doc. dr. sc. Mladenu Pavlečiću na stručnom vodstvu, uloženom radu i trudu te srdačnošću prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.

Posebnu zahvalu želim uputiti svojoj majci i prijateljima na pruženoj potpori i razumijevanju tijekom 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 HORIZONTALNOM ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU UZ DODATAK SUHIH SMOKVI

*Monika Kralj, univ. bacc. ing. biotechn.
0058204157*

Sažetak: Kefirni napitak je proizvod dobiven fermentacijom šećerne podloge koju provodi združena kultura mikroorganizama. Karakterizira ga probiotičko, protuupalno, antioksidativno i antibakterijsko djelovanje. U preliminarnom dijelu ovog diplomskog rada ispitan je utjecaj količine dodanih suhih smokvi na dinamiku proizvodnje i sastav kefirnog napitka. Na temelju preliminarnih rezultata u drugom dijelu istraživanja ispitana je mogućnost proizvodnje kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB-u) s dodanom količinom suhih smokvi od 0,2 % m/V. Eksperimenti u HRCB-u su provedeni korištenjem konstantne i intervalne rotacije bioreaktora te je ukupno provedeno šest različitih eksperimenata. Intervalna rotacija bioreaktora pokazala se kao bolji izbor u proizvodnji kefirnog napitka s obzirom na više prinose glavnih produkata fermentacije, a nešto bolji rezultati su ostvareni u slučaju kada su postavke bioreaktora iznosile 6/54 (6 minuta rotacija, 54 minute mirovanje unutar jednog sata).

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

Rad sadrži: 49 stranica, 29 slika, 5 tablica, 50 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Mladen Pavlečić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 4.svibnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

PRODUCTION OF KEFIR BEVERAGE IN HORIZONTAL ROTATING TUBULAR BIOREACTOR WITH THE ADDITION OF DRIED FIGS

*Monika Kralj, univ. bacc. ing. biotechn.
0058204157*

Abstract: Kefir drink is a product obtained by fermentation of a sugar base by a combined culture of microorganisms. It is characterised by its probiotic, anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial effects. In the preliminary part of this diploma work, the influence of the amount of added dried figs on the dynamics of production and the composition of the kefir drink was investigated. Based on these results, in the second part of this work, the possibility of producing a kefir drink in a horizontal rotating tubular bioreactor (HRTB) with an added amount of dried figs of 0,2 % m/V was investigated. The experiments in the HRTB were carried out with constant and interval rotation of the bioreactor, and a total of six different experiments were performed. The interval rotation of the bioreactor proved to be the better choice for the production of the kefir drink, as the yield of the main fermentation products was higher. Slightly better results were obtained when the bioreactor settings were 6/54 (6 minutes rotation, 54 minutes pause within one hour).

Keywords: kefir drink, figs, HRTB, interval rotation, constant rotation

Thesis contains: 49 pages, 29 figures, 5 tables, 50 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Mladen Pavlečić, PhD, Assistant professor

Reviewers:

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

Thesis defended: May 4th, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KEFIRNI NAPITAK I KEFIRNA ZRNCA.....	2
2.2. MIKROBNI SASTAV ILI MIKROBIOTA KEFIRNIH ZRNACA.....	3
2.2.1. Bakterije octene kiseline	4
2.2.2. Bifidobakterije.....	5
2.2.3. Bakterije mliječne kiseline	6
2.2.4. Kvasci.....	9
2.3. EGZOPOLISAHARIDNI MATRIKS	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Radna kultura.....	11
3.1.2. Kemikalije.....	11
3.1.3. Hranjive podloge.....	11
3.1.4. Aparatura i pribor.....	12
3.2. METODE.....	13
3.2.1. Priprema hranjivih podloga.....	13
3.2.2. Određivanje optimalne količine dodanih smokava za proizvodnju kefirnog napitka u staklenkama.....	13
3.2.3. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u.....	14
3.3. ANALITIČKE METODE	15
3.3.1. UPLC analiza.....	15
3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari biomase kefirnog napitka.....	15
3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI.....	16
3.4.1. Potrošnja supstrata (ΔS).....	16
3.4.2. Prinos produkata (Y_P)	16
3.4.3. Koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)	17
3.4.4. Produktivnost (Pr).....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA U STAKLENKAMA UZ DODATAK RAZLIČITE KOLIČINE SUHIH SMOKVI.....	18
4.2.1. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak suhih smokvi pri konstantnoj rotaciji HRCB-a	26
4.2.1.1. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak smokvi u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 3 okr/min	26
4.2.1.2. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak smokvi u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 5 okr/min	29

4.2.1.3. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak smokvi u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 7 okr/min	31
4.2.2. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije uz dodatak suhih smokvi.....	35
4.2.2.1. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 3 minute pri brzini rotacije od 3 okr/min uz dodatak suhih smokvi.....	35
4.2.2.2. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 6 minuta pri brzini rotacije od 3 okr/min uz dodatak suhih smokvi.....	37
4.2.2.3. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 9 minuta pri brzini rotacije od 3 okr/min uz dodatak suhih smokvi.....	39
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	44

PRILOZI

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

1. UVOD

Uloga zdrave prehrane u današnje vrijeme dobiva sve veći značaj. Shodno tome, potrošači postaju sve zahtjevniji što dovodi do porasta potražnje za probiotičkom hranom, posebice tradicionalnih fermentiranih pića kao što su mliječni kefir i vodeni kefir (Fiorda i sur., 2017). Kefirni napitak je jedan od proizvoda kojeg karakterizira probiotičko, protuupalno, antioksidativno i antibakterijsko djelovanje (Lynch i sur., 2019). Dobiva se fermentacijom vodene otopine šećera uz dodatak dehidriranog voća poput suhih smokava ili grožđica uz pomoć združene kulture mikroorganizama kvasaca, bakterija octene i mliječne kiseline ugrađenih u vodotopivu elastičnu glukogalaktansku mrežu tj. kefiran (Guzel-Seydim i sur., 2021a; Gulitz i sur., 2011).

Zrnca vodenog kefira se mogu naći i pod imenom "aquefir" ili "šećerni kefir", a poznatiji naziv širom svijeta je "Tibicos" ili "Tibi zrnca" (Romero-Luna i sur., 2020; Waldherr i sur., 2010). Fermentirani pjenušavi napitak kefirnih zrnaca prepoznatljiv je po kiselom i voćnom okusu te niskom udjelu etanola. Prednost u odnosu na mliječni kefir, čiji je fermentirani napitak ograničen za konzumaciju u veganskoj prehrani, jest činjenica da vodeni kefir ne sadrži laktozu pa ga mogu konzumirati i osobe koje ne podnose laktozu ili su alergične na mliječne proizvode (Guzel-Seydim i sur., 2021a; Mauricio, 2012).

Zahvaljujući svom pozitivnom učinku na zdravlje, uz ostale benefite, kefirni napitak predstavlja veliki potencijal za širu upotrebu. Unatoč dosadašnjim otkrićima o prednostima kefirnog napitka i dalje je potrebno provesti mnoga istraživanja u smislu optimizacije procesa industrijske proizvodnje kako bi proizvodnja bila isplativija. Cilj ovog rada upravo je istražiti jednu od mogućnosti proizvodnje u većem mjerilu. U sklopu ovog diplomskog rada provedeno je istraživanje proizvodnje kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB-u) uz dodatak suhih smokvi korištenjem različitih brzina te različitog tipa rotacije bioreaktora.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEFIRNI NAPITAK I KEFIRNA ZRNCA

Vodeni kefiri pripadaju skupini tradicionalnih fermentiranih napitaka uglavnom kućne radinosti. Karakterizira ga voćni, kiselkast te blago gaziran okus, visok udio mliječne kiseline i nizak udio etanola. Dobiva se fermentacijom vodene otopine šećera saharoze uz pomoć združene kulture mikroorganizama prisutnih u kefirnim zrnima pri čemu se nerijetko u vodenu otopinu može dodati sušeno voće kao dodatan izvor nutrijenata za proizvodne mikroorganizme (Fiorda i sur., 2017; Laureys i De Vuyst, 2014). Vrsta dodanog suhog voća uvelike utječe na potrošnju supstrata, proizvodnju produkata te na raznolikost mikrobnih vrsta tijekom fermentacije (Laureys i sur., 2018). Što se tiče samih zrnaca vodenog kefira ona se sastoje najvećim dijelom od polisaharida (dekstrana i levana) te brojnih mikroorganizama od kojih su najzastupljeniji bakterije i kvasci (Coma i sur., 2019).

Za proizvodnju kefirnog napitka također se koriste i nešto poznatija zrnca mliječnog kefira. Fermentaciju također provode bakterije i kvasci, a struktura zrnaca je heteropolisaharidna s približno jednakom količinom glukoze i galaktoze (Shahabi-Ghahfarrokhi i sur., 2015). Za rast zahtijevaju hranjivu podlogu od mlijeka različitog životinjskog podrijetla ili medij na bazi sirutke, a postoje i slučajevi uzgoja na biljnom mlijeku. Nakon provedene fermentacije zrnca se mogu nanovo koristiti. Biomasa zrnaca povećava se za 3-3,5 % nakon svakog procesa fermentacije ovisno o uvjetima fermentacije (Guzel-Seydim i sur., 2021b; Guzel-Seydim i sur., 2011). Morfološka razlika između mliječnog i vodenog kefira prikazana je na slici 1.



Slika 1. Usporedba izgleda zrnaca mliječnog kefira i zrnaca vodenog kefira (Guzel-Seydim i sur., 2021a)

2.2. MIKROBNI SASTAV ILI MIKROBIOTA KEFIRNIH ZRNACA

Zrnca vodenog kefira čini dekstranska struktura koju tvore podjedinice glukoze povezane α -(1,3) i α -(1,6) glikozidnim vezama (Moinas i sur., 1980). Određeno je da su bakterije prisutne unutar zrnaca u rasponu od 10^6 - 10^8 CFU/g, a kvasci u rasponu od 10^6 - 10^7 CFU/g (Gulitz i sur., 2011). U najzastupljenije bakterijske vrste se ubrajaju bakterije iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* te *Acetobacter* (Pidoux i sur., 1990), dok su od kvasaca uočeni rodovi *Saccharomyces*, *Hansensiaspora*, *Klockera*, *Candida* (Fiorda i sur., 2017).

Mikroorganizmi odgovorni za stvaranje dekstranske strukture su *Lacticaseibacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus hordei* te *Lactobacillus hilgardii* (Davidovic i sur., 2015). Različiti mikroorganizmi odgovorni su za proizvodnju različitih produkata tijekom fermentacije, a ključnu ulogu imaju bakterije mliječne kiseline (BMK) poput *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus nagelii* i *Lacticaseibacillus paracasei* kao i kvasci vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Saharozu, kao glavni supstrat, mikroorganizmi konvertiraju do produkata poput mliječne kiseline, etanola, egzopolisaharidnog matriksa, octene kiseline, ugljikovog dioksida, glicerola, manitola i raznih aromatskih spojeva (Laureys i De Vuyst, 2017)

2.2.1. Bakterije octene kiseline

Bakterije octene kiseline su važni mikroorganizmi za proizvodnju fermentirane hrane i pića poput octa, kombuche i kefirnog napitka (Lynch i sur., 2019). Nesporogene su bakterije štapićastog ili okruglog oblika i pripadaju Gram-negativnoj skupini bakterija. U prirodi se nalaze na staništima bogatim fermentabilnim šećerom (Raspor i Goranovic, 2008). Obligatni su aerobi te dobro podnose uvjete niske pH vrijednosti. Oksidacijom šećera, šećernog alkohola i etanola proizvode octenu kiselinu kao glavni produkt metabolizma (De Roos i De Vuyst, 2018).

Unutar skupine, dijele se u dva roda *Acetobacter* i *Gluconobacter*. Bakterije iz roda *Acetobacter* preferiraju staništa bogata etanolom dok vrste iz roda *Gluconobacter* preferiraju staništa s bogatim izvorom ugljikohidrata (Raspor i Goranovic, 2008). Vrste roda *Acetobacter* proizvode etanol kojeg potom oksidiraju u octenu kiselinu. Prisutnost etanola unutar podloge dovodi do represije citratnog ciklusa što posljedično uzrokuje nepotpunu oksidaciju octene kiseline. Dok u slučaju potpune potrošnje etanola iz podloge bakterije roda *Acetobacter* octenu kiselinu oksidiraju do ugljikovog dioksida i vode. Za razliku od njih, bakterije roda *Gluconobacter* ne posjeduju enzime citratnog ciklusa koji omogućuju potpunu razgradnju octene kiseline. One energiju dobivaju nepotpunom oksidacijom ugljikohidrata ili alkohola prilikom kojih dolazi i do sinteze različitih kiselina poput glukonske kiseline iz glukoze (Stadie i sur., 2013).

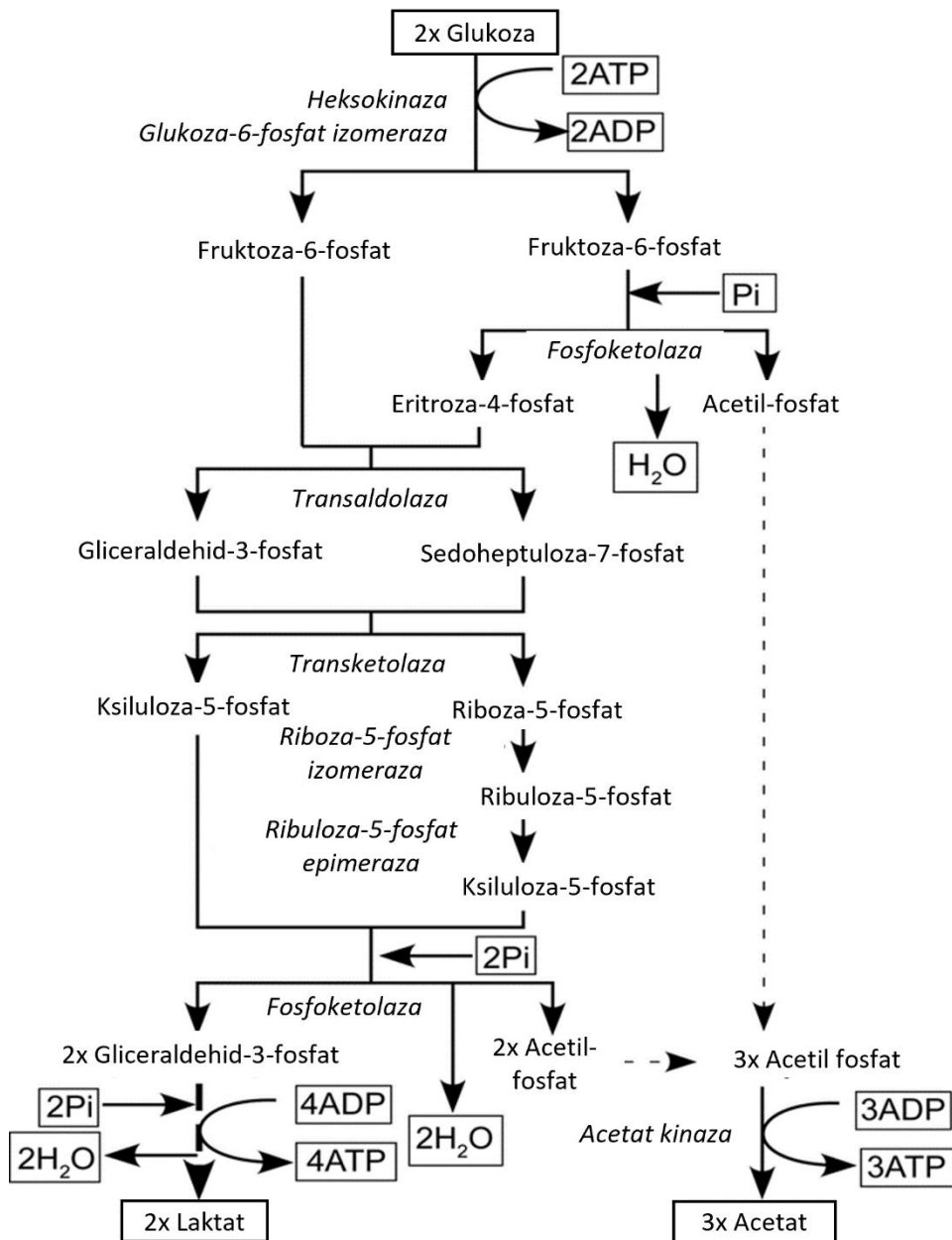
Bakterije octene kiseline nisu dominantne u sastavu zrnaca kefirnog napitka, no njihova se aktivnost često javlja na kraju fermentacije kada iz nastalog etanola proizvode octenu kiselinu. Neke od vrsta pronađenih u zrcima su *Acetobacter fabarum* i *Acetobacter orientalis* pri čemu njihov udio iznosi svega 3-10 % ukupne populacije mikroorganizama (Gulitz i sur., 2011; Magalhães i sur., 2010). Novo otkrivena vrsta bakterija octene kiseline je *Acetobacter sicerae* koja se dobila izolacijom iz vodenog kefira (Li i sur., 2014).

2.2.2. Bifidobakterije

Bifidobakterije su obligatni anaerobi, štapičaste su i nepokretne bakterije koje ne stvaraju spore te pripadaju Gram-pozitivnoj skupini bakterija. Kako im je mliječna kiselina glavni produkt metabolizma ponajprije su se klasificirale kao bakterije mliječne kiseline, no zbog filogenetskih i metaboličkih razlika smještene su unutar zasebne skupine (Sgorbati i sur., 1995).

Kod *Bifidobacteria* se susreće poseban metabolički put razgradnje ugljikohidrata tzv. Bifidus shunt (slika 2) gdje je uz pomoć enzima fosfoketolaze omogućeno cijepanje fruktoza-6-fosfata na acetil-fosfat i eritroza-4-fosfat (Biavati i Mattarelli, 2006). Metabolički započinje ulaskom dvije molekule glukoze koje se izomeriziraju i fosforiliraju u dvije molekule fruktoza-6-fosfat, nakon kojih se jedna od njih cijepa na acetil-fosfat i eritrozu-4-fosfat. Dok se acetil-fosfat defosforilira u acetat, nastala eritroza-4-fosfat ulazi u novu reakciju pregradnje s drugom molekulom fruktoza-6-fosfata. Tako nastaju dvije molekule ksiluloza-5-fosfata koje se cijepaju na gliceraldehid-3-fosfat i acetil-fosfat te se iste defosforiliraju do laktata i acetata. Krajnji rezultat su tri molekule acetata i dvije molekule laktata (Pokusaeva i sur., 2011).

Zrnca vodenog kefira postotno sadrže manje bifidobakterija u odnosu na bakterije mliječne kiseline. Najčešće zastupljene vrste iz ovog roda su *Bifidobacterium aquikefiri* i *Bifidobacterium tibiigranuli*, pri čemu njihova uloga nije još uvijek jasno definirana. Mogući produkti metabolizma uz već navedene su octena kiselina, mliječna i formijatna kiselina te organske kiseline (Eckel, 2020; Xu i sur., 2019).



Slika 2. Glavni metabolički put razgradnje kod bakterija roda *Bifidobacterium*, Bifid shunt (Suzuki i sur., 2010)

2.2.3. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) većinom su štapićastog ili sferičnog oblika, pripadaju vrsti Gram-pozitivnih bakterija koje koriste ugljikohidrate kao jedini ili glavni izvor ugljika (George i sur., 2018). Najčešće prisutne vrste u zncima kefirnog napitka su one iz rodova *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (Gulitz i sur., 2013). Tijekom proizvodnje kefirnog napitka

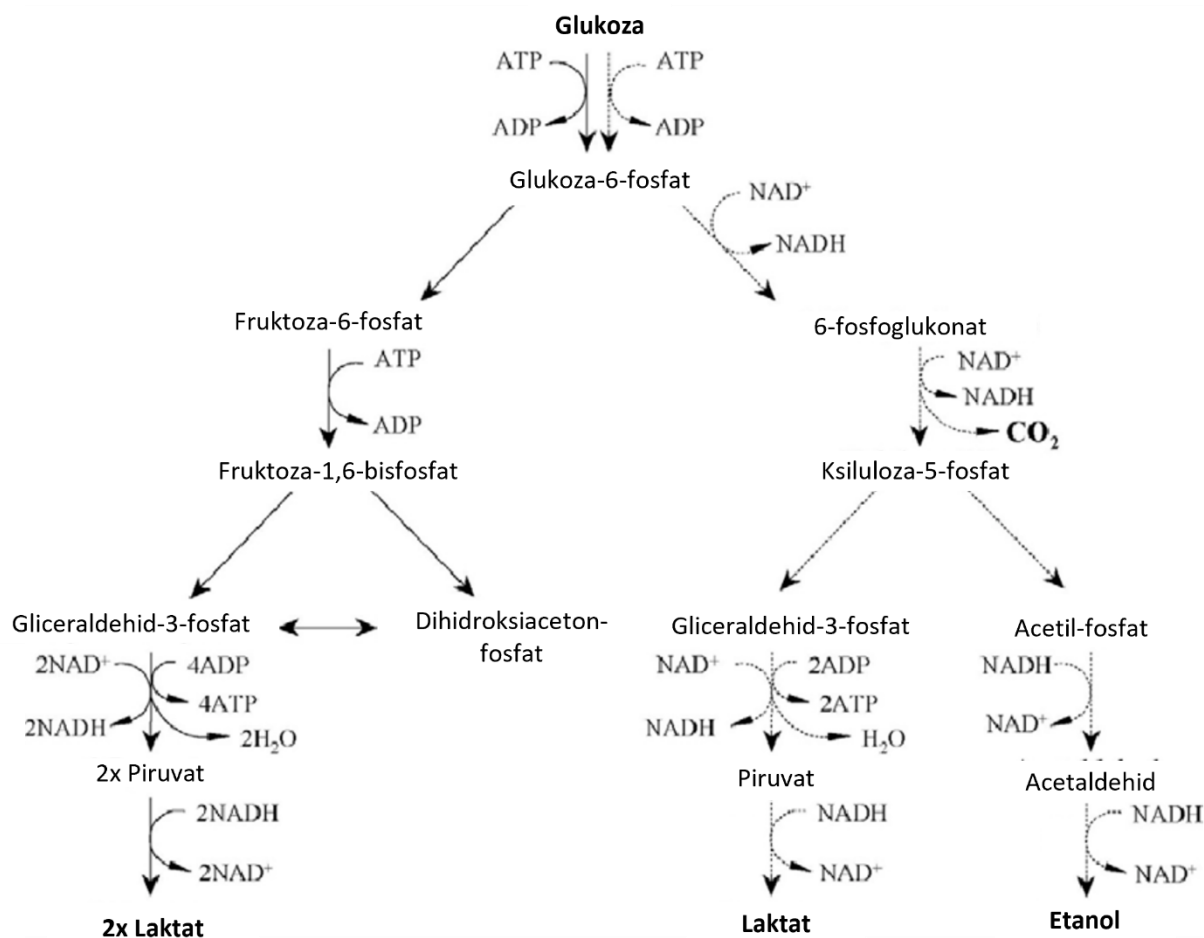
ovi mikroorganizmi proizvode mliječnu kiselinu koja utječe na sniženje pH vrijednosti same podloge te tako inhibiraju potencijalne patogene i ostale nepoželjne mikroorganizme.

Ove vrste bakterija mogu provoditi dvije vrste fermentacija, koje se razlikuju ovisno o krajnjim produktima. Razlikuje se homofermentativna fermentacija gdje je glavni produkt metabolizma mliječna kiselina i heterofermentativna fermentacija gdje osim mliječne kiseline kao konačan produkt mogu nastati octena kiselina, etanol i CO₂ (Stadie i sur., 2013; Kandler, 1983). Od laktobacila, *Lb. hordei*, *Lb. hilgardii*, *Lb. nagelii* i *Lb. satsumensis* su tipične vrste koje se pronalaze u vodenom kefiru. Tablica 1 prikazuje popis BMK ovisno o vrsti fermentacije.

Lactobacillus hordei, prepoznat je kao vrsta odgovorna za formiranje zrnaca, proizvode želatinozne polisaharide (Laureys i De Vuyst, 2014; Gulitz i sur., 2011).

Tablica 1. Homofermentativne i heterofermentativne vrste BMK prisutne u zrcima vodenog kefira (Eckel, 2020; Stadie i sur., 2013)

Homofermentativne BMK	Heterofermentativne BMK
<i>Lactobacillus hordei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	
<i>Lentilactobacillus kefirii</i>	
<i>Levilactobacillus brevis</i>	
<i>Lactobacillus ghanensis</i>	
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	



Slika 3. Prikaz metabolizma glukoze kod homofermentativnih i heterofermentativnih BMK (Wee i sur., 2006)

Na slici 3 prikazani su metabolički putevi razgradnje glukoze, odnosno homolaktična i heterolaktična fermentacija. Homofermentativne BMK razgrađuju glukožu glikolizom do piruvata koji se reducira do krajnjeg produkta laktata uz pomoć enzima laktat dehidrogenaze uz oksidaciju NADH u NAD⁺. Iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule mliječne kiseline i dvije molekule ATP-a ako ne dolazi do limitacije izvorom ugljika.

Heterofermentativne BMK metaboliziraju glukožu oksidativnim ogrankom pentoza fosfatnog puta do ksiluloza-5-fosfata koji se potom cijepa uz pomoć enzima fosfoketolaze na glicerinaldehyd-3-fosfat i acetil-fosfat. Glicerinaldehyd-3-fosfat se nastavlja prevoditi do piruvata reakcijama glikolize koji se reducira do laktata dok se acetil-fosfat prevodi u acetil-CoA koji reducira do etanola uz regeneraciju reduciranih koenzima NADH oksidacijom NAD⁺. Ako se metaboliziraju pentoze ne dolazi do redukcije koenzima već se acetil-fosfat prevodi u acetat uz pomoću acetat kinaze (Stadie i sur., 2013).

2.2.4. Kvasci

Kvasci su eukariotski jednostanični mikroorganizmi koji se razmnožavaju pupanjem te ih se svrstava u carstvo gljiva. Većinom su mezofilni organizmi, a optimalna temperatura rasta je oko 28 °C (Kurtzman i sur., 2011). Optimalne pH vrijednosti pogodne za rast kreću se u rasponu vrijednosti od 4,5 - 7,0 no postoji i velik broj vrsti otpornih i na niže pH vrijednosti oko 2,5 (Guerzoni i sur., 2013).

Najzastupljeniji kvasac u zrnima vodenog kefir je *Saccharomyces cerevisiae*. Pripada u Crabtree pozitivne kvasce pa shodno tome imaju sposobnost stvaranja etanola u aerobnim uvjetima ako su koncentracije glukoze u podlozi visoke. Visoke koncentracije glukoze djeluju inhibitorno na enzime ciklusa limunske kiseline i respiratornog lanca uslijed čega dolazi do nakupljanja piruvata koji se reducira u etanol (Stadie i sur., 2013).

Kvasci glukozu prevode glikolizom do piruvata te dolazi do redukcije NAD^+ u NADH . Prilikom anaerobnih uvjeta nastali NADH se reoksidira alkoholnom fermentacijom, a piruvat nastao glikolizom prevodi se u acetaldehid koji se prevodi u etanol. U aerobnim uvjetima nastali piruvat najprije se transportira u mitohondrij te se potom prevodi u acetil-CoA i oksidira u citratnom ciklusu. Reducirani koenzimi NADH i FADH_2 , nastali glikolizom i citratnim ciklusom reoksidiraju se u respiratornom lancu, a oslobođena energija koristi za sintezu energije u obliku molekula ATP-a. Citratni ciklus je ujedno i katabolički put jer služi za dobivanje energije kao i anabolički put zbog nastanka intermedijera potrebnih za sintezu aminokiselina i nukleotida tj. za sintezu tvari arome (Feldmann, 2005).

U vodenom kefiru pronalazimo i kvasac *Zygorulaspora florentina* koji pripada skupini osmotolerantnih kvasaca što znači da uspijevaju rasti na podlogama s visokim koncentracijama šećera (90 g/L) i niskim koncentracijama aminokiselina. Poželjan je u proizvodnji kefirnog napitka upravo zbog mogućnosti prevladavanja navedenih obilježja podloge tijekom fermentacije (Stadie i sur., 2013).

2.3. EGZOPOLISAHARIDNI MATRIKS

Egzopolisaharidi (EPS) su izvanstanični polimeri koje proizvode različite životinjske i biljno patogene bakterije, Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te arheje i cijanobakterije. U prehrambenoj industriji predstavljaju veliki interes. EPS bakterija mliječne kiseline važan su dio sastava za proizvode poput jogurta ili sira. Djeluju na teksturu, a koriste se i kao sredstava za zgušnjavanje (Holst i Müller-Loennies, 2007). Nadalje, blagotvorno djeluju i na ljudski organizam kao prebitoci s antikancerogenim, antiupalnim djelovanjem, reguliraju imunitet te snižavaju razinu kolesterola (Vuyst i sur., 2007).

Bakterije mliječne kiseline proizvode različite α -glukane i fruktane iz saharoze (Zannini i sur., 2016; Torino i sur., 2015). Ovi EPS nastaju reakcijom sinteze koju kataliziraju enzimi dekstranasaharaze i fruktanasaharaze. Djeluju tako što cijepaju veze između glukoze i fruktoze u molekuli saharoze tako da jednu molekulu otpuštaju dok drugu prenose na molekulu akceptor odnosno na rastući polisaharidni lanac (Leemhuis i sur., 2013).

Utvrđeno je kako su dominantni EPS u vodenom kefiru dekstrani i levani u nešto u manjoj količini (Fels i sur., 2018). Molekulska masa dekstrana kreće se u rasponu od 10^7 - 10^8 Da, najčešće su razgranati na O-3 i O-2 poziciji te se povezuju α -(1-6)-vezama i α -(1,3)/ α -(1,4) (Tan i sur., 2022; Sutherland, 2007). Utvrđeno je kako postoje razlike u količini istih strukturnih elemenata, između dekstrana unutar kefirnih zrnaca i onih u kefirnom napitku, što bi mogao biti rezultat djelovanja različitih mikroorganizama (Fels i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radna kultura

Za potrebe ovog istraživanja korištena su zrnca kefirnog napitka iz privatnog uzgoja koja su potom održavana u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kefirna zrnca sastavljena su od različitih kultura mikroorganizama, među kojima prednjače bakterije mliječne kiseline, te kvasci iz roda *Saccharomyces*.

3.1.2. Kemikalije

Tablica 2 prikazuje popis korištenih kemikalija korištenih za ovo istraživanje, postotne vrijednosti čistoća te naziv i podrijetlo proizvođača.

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

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

3.1.3. Hranjive podloge

Hranjiva podloga korištena za održavanje kulture kefirnog napitka vodena je otopina saharoze koncentracije 100 g/L pripremljena u Erlenmeyerovoj tikvici od 500 mL i čuvana na temperaturi 25 °C.

Za preliminarne uzgoje u staklenkama korišten je konzumni šećer otopljen u vodovodnoj vodi koncentracije 60 g/L uz dodatak 10, 20, 30 g smokava na temperaturi 25 °C. Staklenke su bile

volumena 250 mL, a volumen hranjive podloge u njima iznosio je 150 mL.

Za proizvodnju kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB-u) korišteno je 1 L hranjive podloge tj. vodene otopine saharoze koncentracije 30 g/L uz dodatak 200 g smokava. Navedene vodene otopine saharoze za potrebe održavanja kao i za sve druge uzgoje nisu bile sterilizirane.

3.1.4. Aparatura i pribor

3.1.4.1. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB) napravljen je od nehrđajućeg čelika ukupnog volumena 30 L. Konstrukcija bioreaktora izvedena je kao horizontalno cilindrična posuda postavljena na ležajeve koji omogućuju rotaciju bioreaktora. Duljina bioreaktora je 0,60 m, a unutarnji promjer iznosi 0,25 m. Valja napomenuti da se u unutrašnjosti bioreaktora, duž pune duljine bioreaktora, nalaze dvije nasuprotne lopatice dimenzija 0,04 m visine koje osiguravaju efikasnije miješanje.

3.1.4.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

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

3.1.4.3. Ostala aparatura

- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- analitička vaga Acculab ALC210.4 (Njemačka)
- hladnjak i zamrzivač (Bosch, Njemačka)
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- centrifuga Bechman Model J-21B (Njemačka)

- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Hranjiva podloga korištena za umnažanje i održavanje kefirnih zrnaca pripremljena je u Erlenmayer tikvici ukupnog volumena 3 L otapanjem 60 g konzumnog šećera tj. saharoze u 2 L vodovodne vode tako da je koncentracija šećera iznosila 30 g/L.

Za preliminarna istraživanja u staklenkama korištene su podloge u kojima je inicijalna koncentracija saharoze iznosila 60 g/L. Također, u ovu vrstu podloge dodane su i različite količine suhih smokava kako bi se mogao odrediti optimalan sastav podloge za proizvodnju kefirnog napitka. Hranjiva podloga pripremljena je u velikoj tikvici ukupnog volumena 5 L tako da se u 4,5 L vodovodne vode doda 270 g konzumnog šećera odnosno saharoze. Tako pripremljena otopina potom se raspoređuje u 30 staklenih posuda ukupnog volumena 250 mL tako da je inicijalni volumen tekućeg dijela podloge iznosio 150 mL. U konačnici pripremljena su tri seta tikvica (po 10 tikvica u jednom setu) pri čemu je u svakom setu inicijalno dodano 10, 20 ili 30 g smokava.

Nakon određivanja optimalne količine dodanih smokava u eksperimentima sa staklenkama, drugi dio istraživanja proveden je u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB). U ovom dijelu diplomskog rada korištena je podloga koncentracije šećera 30 g/L, a pripremljena je tako da je u 1 L vodovodne vode topljeno 30 g saharoze te dodano 200 g suhih smokava.

3.2.2. Određivanje optimalne količine dodanih smokava za proizvodnju kefirnog napitka u staklenkama

U preliminarnom dijelu ovog istraživanja proučavana je proizvodnja kefirnog napitka s tri različite inicijalne količine dodanih suhih smokava. Hranjiva podloga otopljene saharoze iznosila je 60 g/L što se u prijašnjim istraživanjima pokazalo upravo kao koncentracija pri kojoj još ne dolazi do inhibicije rasta prisutnih mikroorganizama (Kurtoić, 2020). U sve staklenke koje su sadržavale 150 mL podloge prethodno navedene koncentracije saharoze, dodano je 15

g kefirnih zrnaca te 10, 20 ili 30 grama suhих smokava. Ukupno je pripremljeno je 30 staklenki koje su potom prenesene u termostat i gdje su temperirane na temperaturi od 25 °C koja se u prijašnjim istraživanjima pokazala kao optimalna temperatura za proizvodnju kefirnog napitka (Piškor, 2020). Ukupno vrijeme trajanja fermentacije iznosilo je 30 dana pri čemu je uzorkovanje provedeno svaka 3-4 dana. Tijekom cijelog vremena trajanje bioprocasa praćena je promjena koncentracije supstrata i nastalih produkata. Također, tijekom cijelog vremena istraživanja praćena je i promjena pH vrijednosti podloge.

3.2.3. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u

U ovom dijelu istraživanja ispitivan je utjecaj brzine i vrste rotacije na tijek proizvodnje kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору (HRCB). 1 L otopine saharoze koncentracije 30 g/L inokulirana je sa 100 grama kefirnih zrnaca (10 % m/V) na temelju rezultata prijašnjih istraživanja (Jelačić, 2021). Također, na početku fermentacije u svakom eksperimentu u HRCB-u dodano je 200 g suhих smokova (20 % m/V) na temelju zaključaka preliminarnog istraživanja u staklenkama. U prvom dijelu ovog dijela istraživanja ispitivan je utjecaj brzine rotacije bioreaktora na dinamiku odvijanja bioprocasa pri čemu su provedeni eksperimenti gdje se bioreaktor okretao konstantno brzinama od 3, 5 i 7 okr/min. Nakon toga, provedena su još dodatna tri eksperimenta s intervalnom rotacijom što je uključivalo djelomičnu rotaciju i djelomično mirovanje unutar jednog sata samog bioreaktora. Vremena trajanja rotacije iznosila su slijedom 3, 6 i 9 minuta pri čemu su faze mirovanja iznosile 57, 54 i 51 minutu. Brzina rotacije za vrijeme trajanja dinamičke faze odabrana je na temelju rezultata s konstantnom rotacijom i ona je iznosila 3 okr/min. Tijek odvijanja same proizvodnje kefirnog napitka provodio se tako da su tijekom svih eksperimenta svakih dan do dva izuzimani uzorci tekućeg dijela hranjive podloge koju su potom analizirani korištenjem UPLC analitike. Također, praćena je i promjena pH vrijednosti podloge za cijelo vrijeme trajanja fermentacije. Svi eksperimenti su provedeni pri sobnoj temperaturi, a biorektorski sustav nije imao mogućnost regulacije temperature.

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. UPLC analiza

Za potrebe ovog diplomskog rada su se tijekom svih eksperimenata izuzimali tekući uzorci hranjive podloge u kojima su određivane koncentracije supstrata te fermentacijom nastalih produkata. Uzorci su najprije centrifugirani kako bi se uklonili proteini te ostale neželjene komponente poput dijelova suhih smokava.

Po 500 μL tekućeg dijela podloge otpipetirano je u dvije Eppendorf kivete te dodatno zajedno s 500 μL otopine cinkova sulfata heptahidrata koncentracije 100 g/L. Nakon toga uslijedila je homogenizacija korištenjem vibro mješača tijekom 15 sekundi nakon čega su uzorci ostavljeni u mirovanju 10 minuta kako bi se istaložili proteini. Potom je uslijedilo centrifugiranje uzoraka u trajanju od 10 minuta pri 13500 okr/min kako bi se supernatant odvojio od čvrstog dijela podloge. Nakon centrifugiranja, po 750 μL supernatanta iz svake kivete preneseno je u novu kivetu te je supernatant dodatno razrijeđen dva puta dodavanjem istog volumena demineralizirane vode. Tako pripremljeni razrijeđeni uzorci nakon ponovnog homogeniziranja na vibro mješaču profiltrirani su kroz filter s porama veličine 0,2 μm i kao takvi korišteni za UPLC analizu.

3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari biomase kefirnog napitka

Određivanje inicijalne suhe tvari kefirnih zrnaca određeno je na način da je uzeto 20 g vlažnih kefirnih zrnaca koja su zatim prebačena u prethodno osušenu i izvaganu Petrijevu zdjelicu. Sušenje se provodi u sušioniku na temperaturi od 80 °C dok se masa osušenih zrnaca i zdjelice više nije mijenjala.

Što se tiče određivanja udjela suhe tvari na kraju preliminarnih istraživanja u staklenkama, ona je određena tako da je sadržaj finalne staklenke u svakom setu (10. staklenka) prebačen u prethodno izvagane Eppendorf kivete od 50 mL te potom centrifugiran pri 8500 okr/min tijekom 10 minuta. Bitno je za napomenuti da su prije samog centrifugiranja iz kefirnog napitka uklonjeni svi dijelovi smokava koje su bile dodane na početku bioprocasa. Nakon centrifugiranja supernatant je bačen, a kivete s talogom stavljene su u sušionik gdje su sušene do konstantne mase pri temperaturi od 80 °C. Razlikom u masi osušene i prazne kivete određena je masa suhe tvari. Određivanje suhe tvari provedeno je na početku, u sredini (17.

dan) te na kraju bioprocesa.

Zbog problematike koja se pojavila u dijelu istraživanja proizvodnje kefirnog napitka u HRCB-u nije bilo moguće odrediti masu suhe tvari na kraju istraživanja. Zbog rotacije samog bioreaktora dolazilo je do denaturacije samih kefirnih zrnaca, čak i kod najnižih brzina okretaja bioreaktora, te do denaturacije smokava što je uvelike doprinijelo greškama kod njenog određivanja. Masa suhe tvari određena je pomoću sljedeće formule:

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

m_x - masa suhe tvari [g]

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

m_1 - masa prazne Petrijeve zdjelice [g]

3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA USPJEŠNOSTI

Pokazatelji uspješnosti bioprocesa koji su određivani u sklopu ovog diplomskog rada su bili potrošnja supstrata, prinos produkata, koeficijenti konverzije supstrata u produkt te produktivnost (Marić i Šantek, 2009).

3.4.1. Potrošnja supstrata (ΔS)

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

S_0 - početna koncentracija supstrata [g]

S – konačna koncentracija supstrata [g]

3.4.2. Prinos produkata (Y_P)

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

P_0 - početna koncentracija produkta [g]

P - konačna koncentracija produkta [g]

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

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

[4]

Y_P – prinos produkta [g]

ΔS – potrošnja supstrata [g]

3.4.4. Produktivnost (Pr)

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

Y_P – prinos produkta [g]

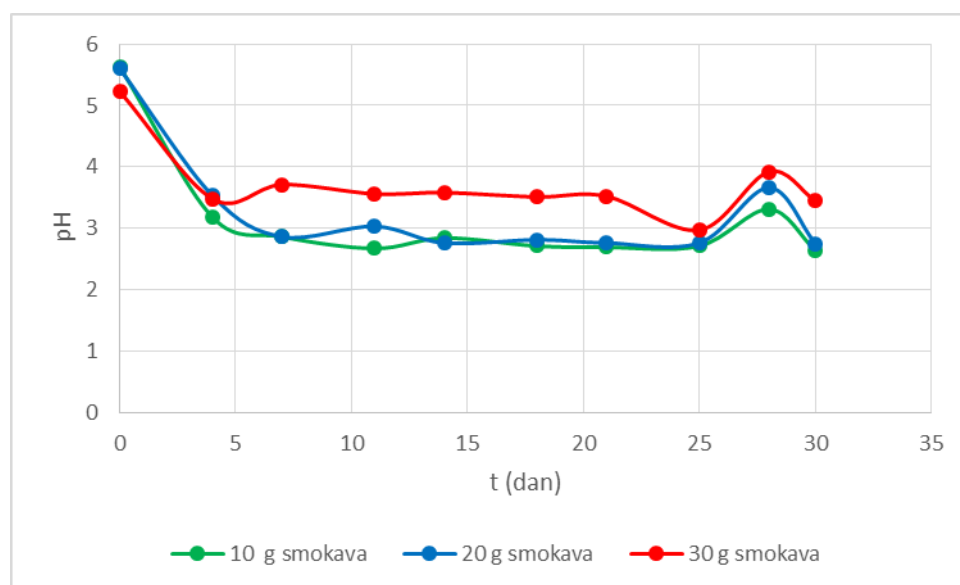
t_u – ukupno trajanje uzgoja [dan]

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PROIZVODNJA KEFIRNOG NAPITKA U STAKLENKAMA UZ DODATAK RAZLIČITE KOLIČINE SUHIH SMOKVI

U ovom poglavlju bit će prikazani rezultati dobiveni tijekom preliminarnog dijela istraživanja u sklopu ovog diplomskog rada.

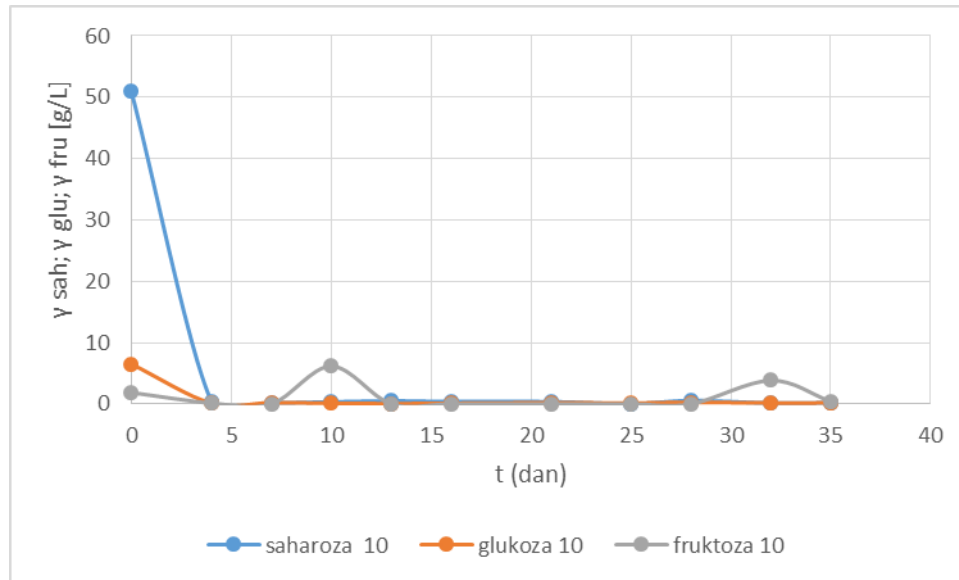
Rezultati dobiveni u ovom dijelu eksperimenta odnose se određivanje optimalne količine dodanih smokava za proizvodnju kefirnog napitka. Tri seta staklenki (10 staklenki u setu) sadržavale su iste početne koncentracije saharoze te različite inicijalne mase dodanih suhih smokava (10, 20 i 30 g). Fermentacija se provodila na temperaturi od 25 °C gdje se uzorkovanje tekućeg dijela podloge vršilo svaka 3-4 dana, svaki put iz nove staklenke, a tijekom cijelog vremena trajanja eksperimenta praćena je i promjena pH vrijednosti podloge.



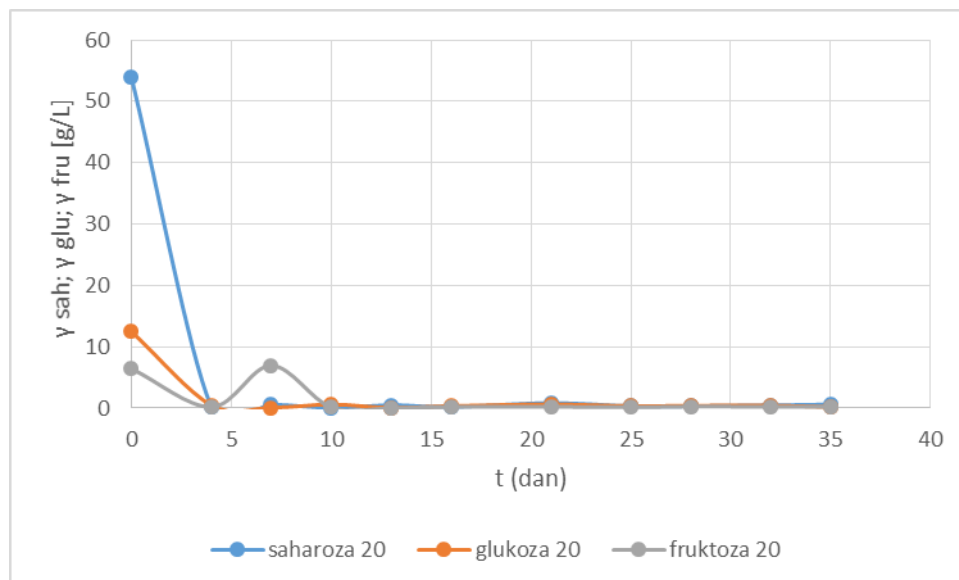
Slika 4. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu u eksperimentu sa staklenkama s različitom dodanom masom smokava

Na slici 4 prikazani su rezultati promjene pH vrijednosti tijekom cijelog vremena trajanja eksperimenata. Na slici je vidljivo da je ta promjena u sva tri seta tikvica gotovo identična s tim da je u slučaju kada je u staklenke dodano 30 grama suhih smokava pH podloge od 5. pa do 30. dana bio je nešto viši u odnosu na kefirne napitke gdje je inicijalno dodano manje smokava. 27. dan vidljiv je blagi porast pH vrijednosti u sva tri eksperimenta, što je

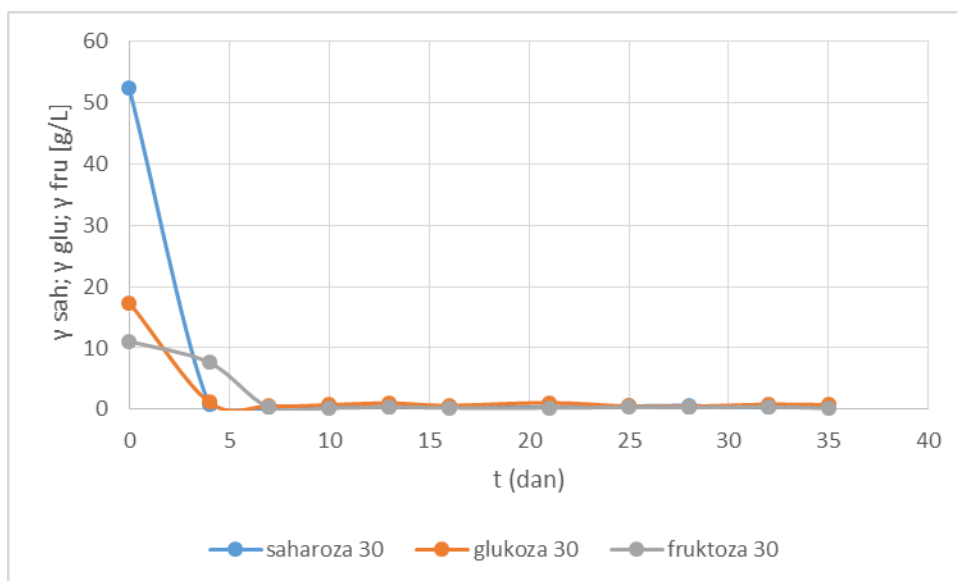
najvjerojatnije rezultat eksperimentalne pogreške. Promjena vrijednosti pH kod sva tri uzgoja događa se relativno brzo, kroz 3-4 dana, nakon čega pH vrijednost ostaje manje više nepromijenjena. Izmerene pH vrijednosti redom za eksperimente sa 10, 20 i 30 g dodanih smokava 4. dana iznosile su 3,18; 3,53 te 3,48 jedinice.



Slika 5. Promjena koncentracije supstrata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta u staklenkama s 10 g dodanih smokava

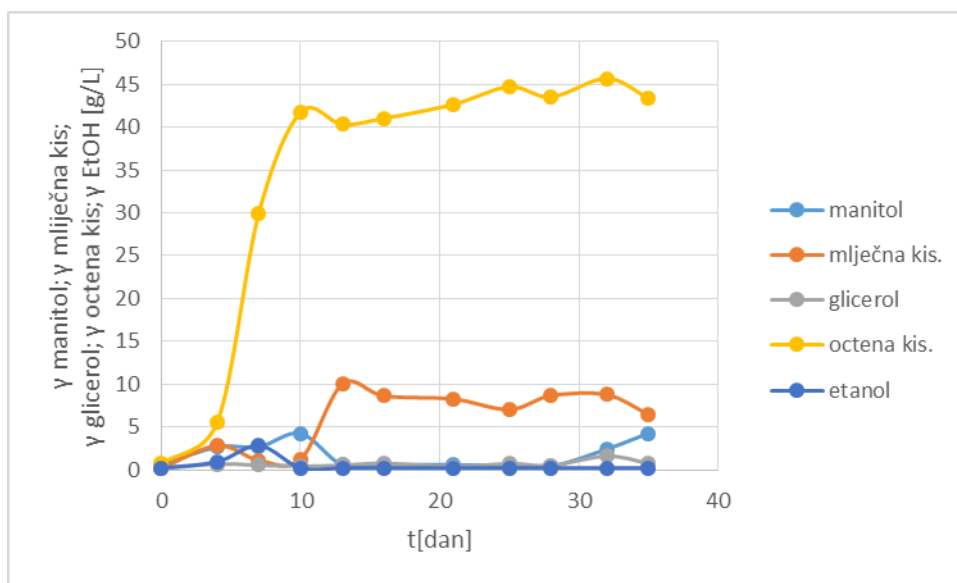


Slika 6. Promjena koncentracije supstrata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta u staklenkama s 20 g dodanih smokava

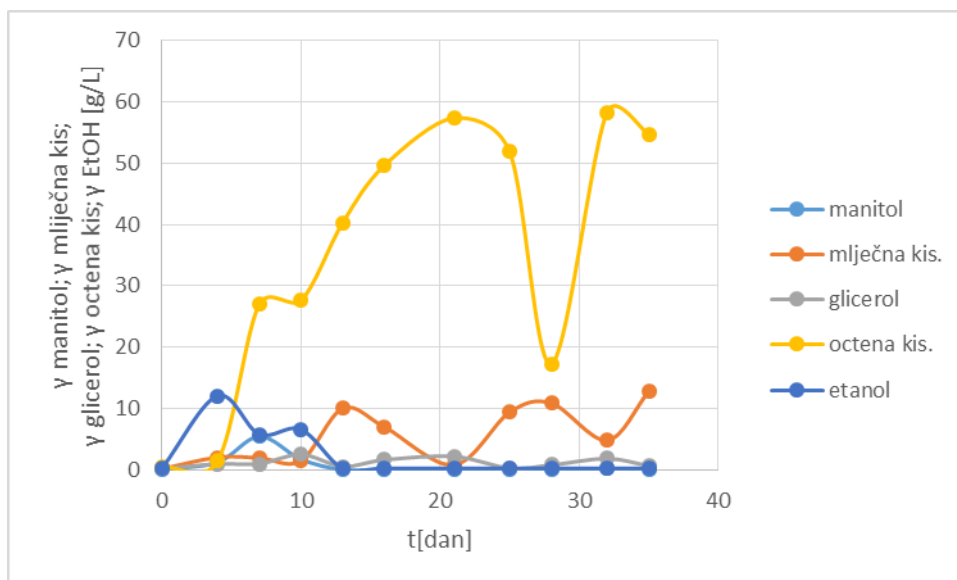


Slika 7. Promjena koncentracije supstrata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta u staklenkama s 30 g dodanih smokava

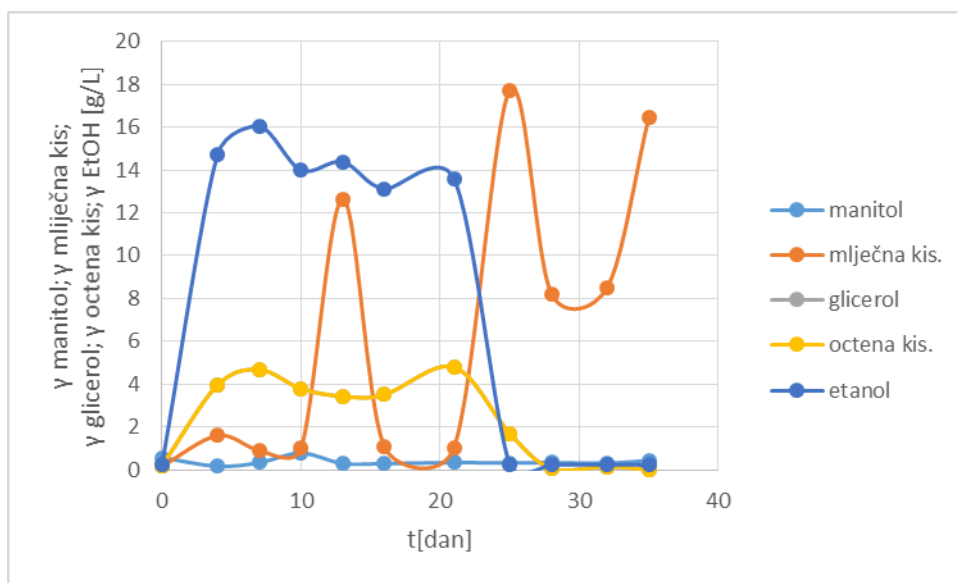
Kod potrošnje supstrata, odnosno saharoze, također je uočena nagla potrošnja kod sva tri eksperimenta što je prikazano na slikama 5, 6 i 7. Kao što je vidljivo na grafovima, dio saharoze je hidroliziran na glukozu i fruktozu koje su također brzo potrošene na temelju čega se može zaključiti da dodane smokve kao dodan izvor nutrijenata imaju povoljan utjecaj na dinamiku odvijanja bioprocasa odnosno mikrobnu aktivnost. Inače, ovakve brze fermentacije posljedica su povoljnih uvjeta i dovoljne količine hranjivih tvari za prisutne mikroorganizme, za razliku od slučaja kada nije dodano suho voće na početku fermentacije, čime se znatno produljuje vrijeme trajanja fermentacije te smanjuje prinos i udio poželjnih produkata u kefirnom napitku (Laureys i sur., 2018).



Slika 8. Promjena koncentracije produkata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta u staklenkama s 10 g dodanih smokava



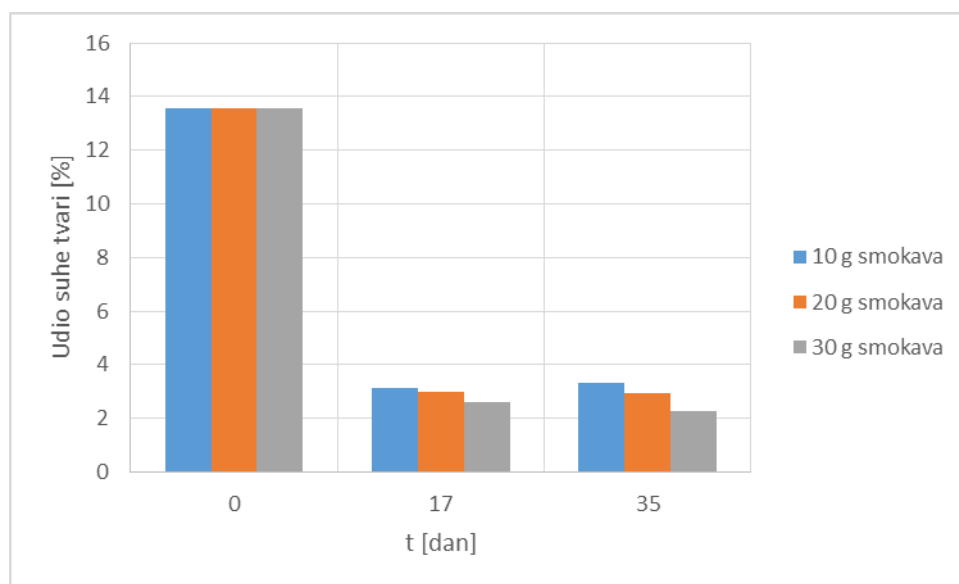
Slika 9. Promjena koncentracije produkata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta u staklenkama s 20 g dodanih smokava



Slika 10. Promjena koncentracije produkata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta u staklenkama s 30 g dodanih smokava

Nadalje, promjene koncentracija produkata fermentacije prikazane su na slikama 8, 9 i 10. U sva tri seta eksperimenata uočena je proizvodnja sljedećih produkata, etanola, glicerola, mliječne i octene kiseline te manitola. Ono što se vidljivo iz prikazanih rezultata jest da je u slučaju kada je na početku bioprocesa dodano 10 odnosno 20 g suhih smokava ostvarena značajno veća koncentracija octene kiseline u podlozi, a njezina proizvodnja je inače karakteristična za kraj proizvodnje kefirnog napitka, a manje za početak fermentacije. Koncentracija octene kiseline izmjerena 7. dana kod 10 g dodanih smokava iznosila je 29,9 g/L te se prema kraju bioprocesa popela do maksimalnih 45,6 g/L, a slična dinamika izmjerena je i kod 20 g dodanih smokava s maksimalno izmjerenom koncentracijom od 58,2 g/L. Nadalje mliječna kiselina se značajnije počela proizvoditi 13. dana bioprocesa, a prosječna izmjerena vrijednosti iznosila je 8,6 g/L za eksperimente sa 10 i 20 g smokava. Naime, octena kiselina je najčešće posljedica aktivnosti bakterija octene kiseline koje su inače prisutne u kefirnim zrnima, i uglavnom oksidiraju etanol koji nastane djelovanjem prirodno prisutnih kvasaca. Međutim, na slikama 8 i 9 koncentracija octene kiseline već nakon 4. dana značajno raste što može upućivati da postoje i drugi mikroorganizmi koji ju također mogu proizvoditi značajnije količine ovog produkta. Kefirna zrnca inače su prirodno imobilizacijsko sredstvo na kojem se nalaze brojne vrste mikroorganizama čija aktivnost i brojnost utječe na karakteristike kefirnog napitka. Tek relativno nedavno je otkrivena prisutnost bifidobakterija u zrnima kefirnog

napitka (Verce i sur., 2019). Radi se o vrsti *Bifidobacterium aquikefiri* za koju se zna da uz mliječnu može proizvoditi i značajne količine octene kiseline pomoću tzv. *Bifidus shunt-a*. Također, njen rast je zabilježen u rasponu pH vrijednosti 4-8 pH jedinica pri čemu može rasti čak i u mikroaerofilnim uvjetima, a temperaturni raspon kod koje je zabilježen rast iznosi 4 – 37 °C. Molarni omjer proizvedene octene kiseline u odnosu na mliječnu kod ove vrste iznosi 4, 8:1 (Laureys i sur., 2016) čime bi se mogli objasniti visoke koncentracije octene i relativno niske koncentracije mliječne i to upravo kada su optimalni uvjeti za njenu aktivnost. Što se tiče brze potrošnje supstrata odnosno potrošnje saharoze, pretpostavlja se da ova bifidobakterija posjeduje permeazu koja joj omogućuje transport saharoze u stanicu te njenu hidrolizu pomoću gena koji kodiraju za enzim hidrolazu (Eckel, 2020) čime bi se mogla objasniti potrošnja saharoze u slučaju manje aktivnosti kvasaca koji ju inače hidroliziraju.



Slika 11. Promjena udjela suhe tvari u ovisnosti o vremenu kod eksperimenata u staklenkama s različitom dodanom masom smokava

Kod promjene udjela suhe tvari (slika 11) vidljivo je da je došlo do značajnijeg pada udjela uspoređujući početno stanje i kraj eksperimenata gdje je najveći pad zabilježen kod eksperimenata s 30 g dodanih smokava u iznosu od 11,28%. U usporedbi sredine i samog kraja eksperimenata nije došlo do značajnijih promjena. Uočen je blagi porast biomase na kraju eksperimenata kod staklenki s dodanih 10 g smokava u iznosu od 0,2%. Vidljivo je kako je u sva tri eksperimenata došlo do po približno podjednagog pada udjela s naglaskom na nešto

manje gubitke kod staklenki s 10 i 20 g dodanih smokava. Na raspad polisaharidnog matriksa najvjerojatnije je utjecala niska pH vrijednosti podloge te stresni uvjeti okoline u kojima je moglo doći do iskorištavanja polisaharidnog matriksa kao dodatnog izvora ugljika od strane mikroorganizama.

U tablici 3 prikazani su pokazatelji uspješnosti odnosno rezultati dobiveni u preliminarnom dijelu istraživanja. Uočena je gotovo cjelokupna potrošnja supstrata bez obzira na količinu dodanih smokava, a sukladno tome i prinos produkata odgovaraju potrošnji. U eksperimentu s 20 g dodanih smokava najveći je prinos mliječne (12,6 g) i octene kiseline (54,2 g), dok je kod uzgoja s 30 g smokava najveći prinos etanola (7,2 g). Glicerol i manitol su najviše prisutni u eksperimentu s 10 g smokava te su dobiveni prinosi od 0,62 g za glicerol i 3,6 g za manitol. Nadalje, vrijednosti konverzije supstrata u produkt najviše su za octenu kiselinu, a najniže za etanol što vrijedi za sva tri uzgoja. Kod eksperimenta s 20 g dodanih smokava najvišu vrijednost ima octena kiselina s iznosom 0,9 g/g, a kod 30 g smokava najvišu vrijednost ima etanol 0,1 g/g. Uspoređujući izračunate podatke za produktivnost, može se zaključiti da je kod eksperimenta s 30 g dodanih smokava produktivnost najveća za mliječnu kiselinu, etanol i manitol dok je kod 20 g najveće izračunata produktivnost za octenu kiselinu te kod 10 g najveća za glicerol. Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti kako se eksperiment s 20 g smokava čini najboljim izborom prema zadanim parametrima jer je postigao najbolje rezultate u većini parametara. U usporedbi s eksperimentom s 10 g smokava, uzgoj s 20 g ima veću produktivnost za gotove sve produkte, a u usporedbi s 30 g ima znatno bolju konverziju supstrata u produkt za mliječnu kiselinu i octenu kiselinu, dok ostali produkti pokazuju slične rezultate. Zaključno, uzgoj s 20 g smokava izgleda kao optimalan izbor za postizanje najboljih rezultata.

Tablica 3. Prikaz pokazatelja uspješnosti za uzgoje kod eksperimenata u staklenkama s različito dodanom masom smokava

<i>Parametar / masa dodanih smokava</i>	10 g	20 g	30 g
ΔS [g]	59,78822	59,39045	59,39629
$Y_{C_3H_6O_3}$ [g]	6,252443	12,60371	16,25538
Y_{CH_3COOH} [g]	42,624	54,2045	30,2139
Y_{EtOH} [g]	0,005465	0,005326	7,237512
$Y_{C_3H_8O_3}$ [g]	0,626269	0,435641	0,182693
$Y_{C_6H_{14}O_6}$ [g]	3,657932	0,095736	0,132374
$Y_{C_3H_6O_3/S}$ [g/g]	0,104577	0,210806	0,271883
$Y_{CH_3COOH/S}$ [g/g]	0,712916	0,906608	0,505349
$Y_{EtOH/S}$ [g/g]	9,14E-05	8,91E-05	0,121052
$Y_{C_3H_8O_3/S}$ [g]	0,010475	0,007286	0,003056
$Y_{C_6H_{14}O_6/S}$ [g/g]	0,061181	0,001601	0,002214
<i>Pr</i> ($C_3H_6O_3$) [g/g dan]	0,178641	0,360106	0,464439
<i>Pr</i> (CH_3COOH) [g/g dan]	1,217829	1,5487	0,863254
<i>Pr</i> (<i>EtOH</i>) [g/g dan]	0,000156	0,000152	0,206786
<i>Pr</i> ($C_3H_8O_3$) [g/g dan]	0,017893	0,012447	0,00522
<i>Pr</i> ($C_6H_{14}O_6$) [g/g dan]	0,104512	0,002735	0,003782

4.2. PROIZVODNJA KEFINOG NAPITKA U HORIZONTALNOM ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU

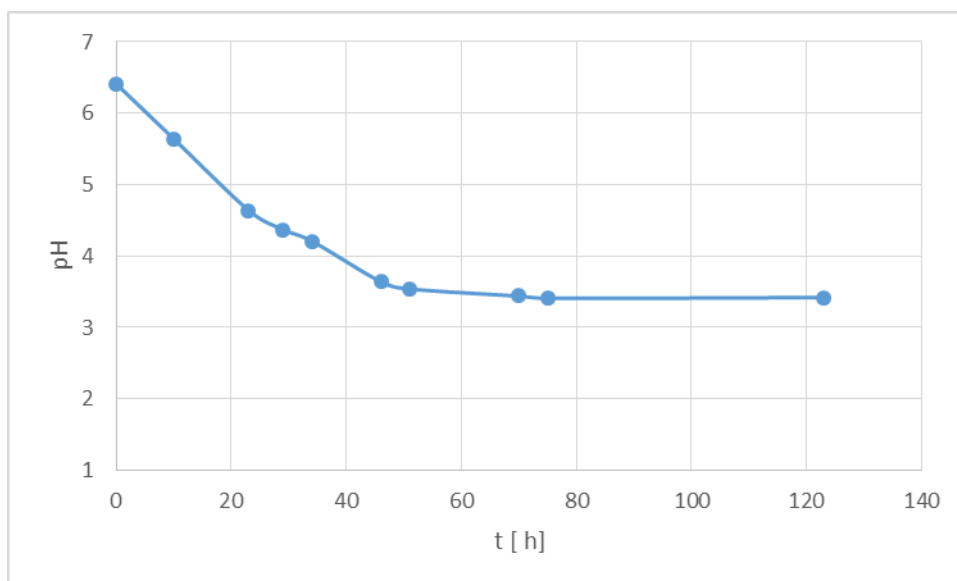
U ovom poglavlju biti će prikazani rezultati istraživanja proizvodnje kefirnog napitka u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru.

4.2.1. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak suhih smokvi pri konstantnoj rotaciji HRCB-a

U ovom dijelu diplomskog rada prikazani su rezultati dobiveni prilikom istraživanja proizvodnje kefirnog napitka uz dodatak smokvi u HRCB-u pri konstantnoj rotaciji. U sklopu ovog dijela istraživanja provedena su tri eksperimenta korištenjem tri različite brzine okretaja (3, 5 i 7 okr/min). U eksperimentu je korišteno 100 g kefirnih zrnaca odnosno 10 % (m/V) inokuluma, koja su dodana u 1 L hranjive podloge odnosno vodenu otopinu saharoze koncentracije 30 g/L, a dodana masa suhih smokava, određena je na temelju preliminarnih istraživanja provedenim u staklenkama te je ona iznosila je 200 g (20 % m/V). Tijek proizvodnje kefirnog napitka praćen je izuzimanjem tekućeg dijela podloge 1-2 puta dnevno sve do završetka bioprocasa. Kao i u prethodnim eksperimentima izuzimani uzorci analizirani su korištenjem UPLC analitike. Uz to, tijekom cijelog vremena trajanja fermentacije praćena je promjena pH vrijednosti podloge. Sve fermentacije su provedene pri sobnoj temperaturi.

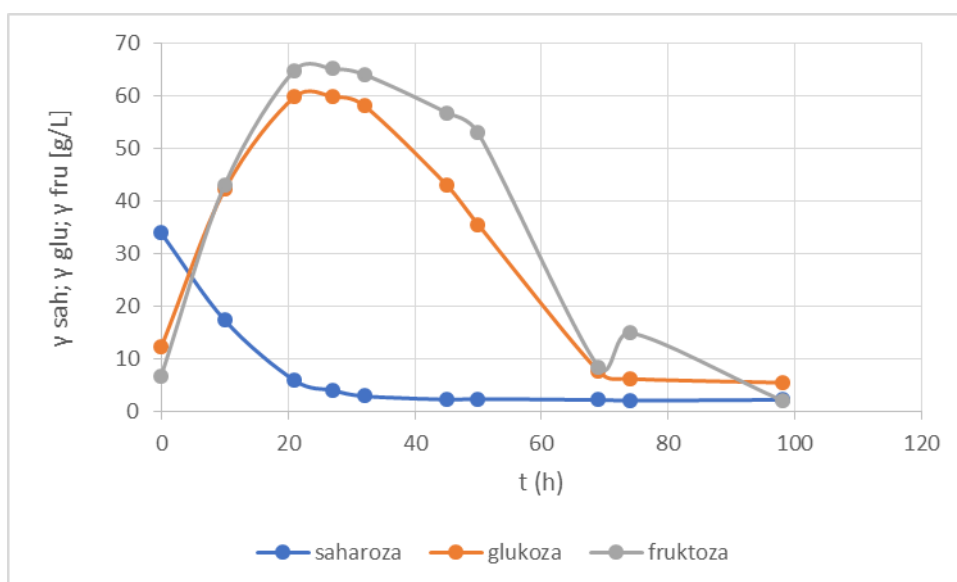
4.2.1.1. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak smokvi u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 3 okr/min

Promjena pH vrijednosti kod uzgoja s konstantnom vrtnjom od 3 okr/min prikazana je na slici 12. Vidljivo je da se vrijednost smanjila na vrijednost od 3,5 pH jedinica već nakon drugog dana uzgoja i to s početne vrijednosti pH od 6,41.



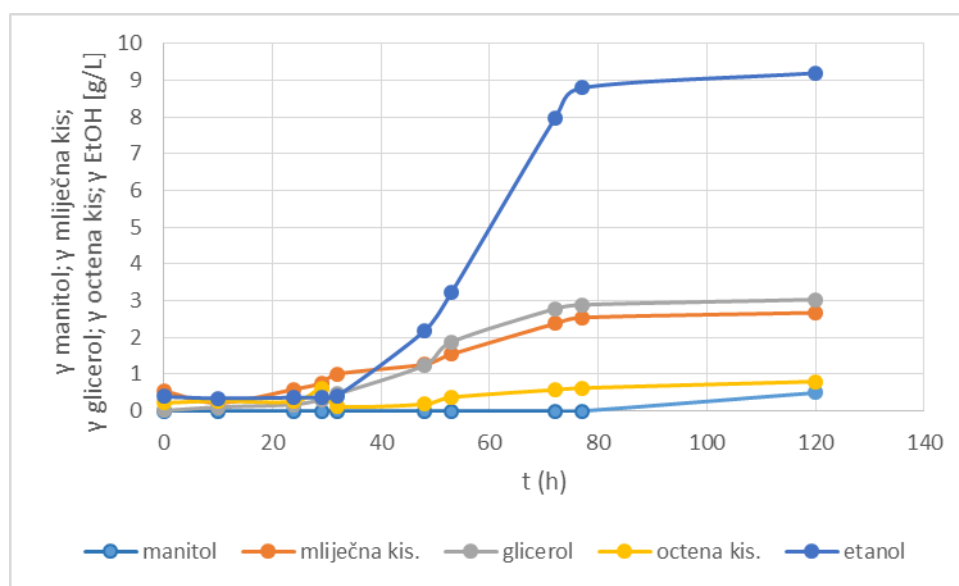
Slika 12. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta s konstantnom rotacijom HRCB-a pri brzini od 3 okr/min

Nakon toga, pH vrijednost podloge nije se značajnije mijenjala sve do kraja eksperimenta na temelju čega se može zaključiti da je pri toj pH vrijednosti podloge mikroba aktivnost svedena na minimum. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima (Laureys i De Vuyst, 2014; Reiß, 1990). U usporedbi promjenu pH vrijednosti u ovom slučaju s promjenama ostvarenim u preliminarnom dijelu, se može vidjeti da je fermentacija u HRCB-u dodatno ubrzana zbog činjenice konstantnog miješanja i osigurane homogenizacije podloge te boljeg prijenosa mase u takvom sustavu.



Slika 13. Promjena koncentracije supstrata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta s konstantnom rotacijom HRCB-a pri brzini od 3 okr/min

Do trošenja saharoze došlo je već na početku samog uzgoja (slika 13) što upućuje na aktivnost kvasaca koji imaju mogućnost hidrolize saharoze. Također, postoji mogućnost da su unutar prvih 24 h bili aktivni mikroorganizmi koji također mogu trošiti saharozu (bifidobakterije) međutim to je malo vjerojatno s obzirom na profil produkata zabilježenih u ovom dijelu istraživanja. Također, još jedan od mogućih razloga brze fermentacije je prisutnost smokava koje su izvor dodatnih nutrijenata koji pogoduju stvaranju optimalnijih uvjeta za rast i proizvodnju *S. cerevisiae*. Saharozu prisutna u podlozi služi kao izvor ugljika, dok je sušeno voće općenito izvor dušika. Poznato je kako su ugljik i dušik ključni za metabolizam i rast sveprisutnih mikroorganizama unutar zrnaca kefir (Gulitz i sur. 2011). Nadalje, moguće je kako smokve pozitivno djeluju na tijek fermentacije upravo zbog svog visokog udjela kalcija i puferskog kapaciteta koji pozitivno utječu na rast zrna i snižavanje pH. Može se pretpostaviti da je upravo prisutnost smokava rezultat brze fermentacije (Laureyes i sur. 2017; Laureyes i sur. 2019.).



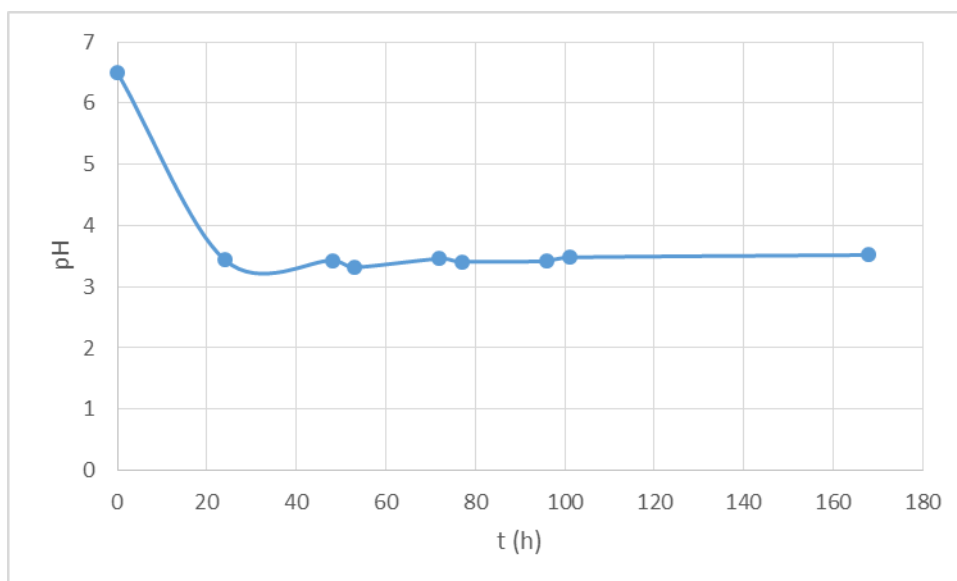
Slika 14. Promjena koncentracije produkata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta s konstantnom rotacijom HRCB-a pri brzini od 3 okr/min

Ono što se može vidjeti iz promjena koncentracija produkata (slika 14) i potrošnje supstrata (slika 13), jest da proizvodnja etanola, kao glavnog produkta u ovom slučaju, ali i ostalih, ne započinje odmah nego tek nakon 24 sata čemu bi mogao biti razlog niža aktivnost prisutnih kvasaca koji imaju hidrolitičku sposobnost, i koji diktiraju dostupnost fermentabilnih šećera za ostale prisutne mikroorganizme. S druge strane, visoke inicijalne koncentracije glukoze i fruktoze vrlo vjerojatno su imale negativan utjecaj na brzinu rasta i potrošnje samog supstrata,

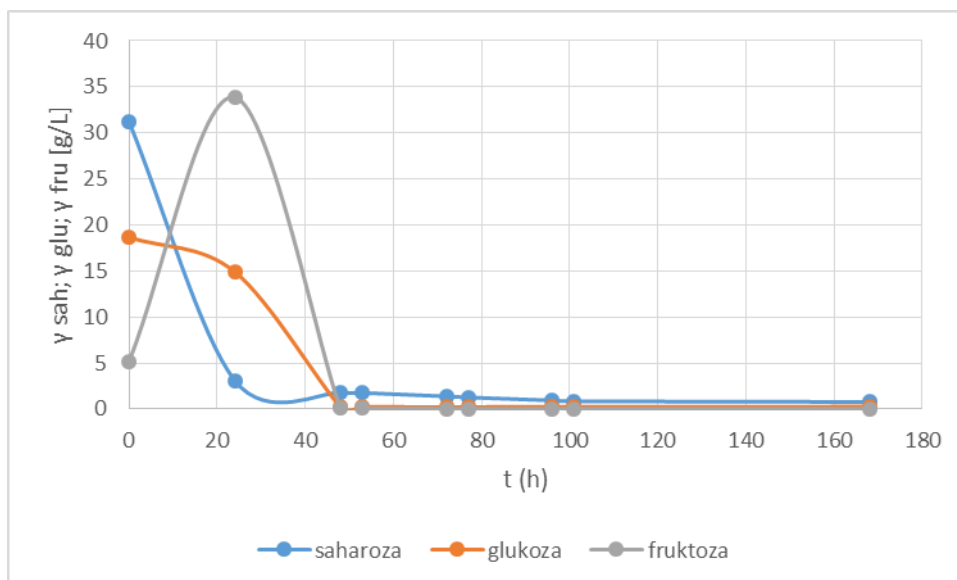
tako da se formiranje produkata počelo primjećivati nakon 30. sata uzgoja. Koncentracije mliječne kiseline, octene kiseline i etanola kao glavnih produkata fermentacije prikazane su na slici 14. Najveća koncentracija mliječne kiseline izmjerena je zadnjeg dana uzgoja s iznosom od 3,2 g/L. Bitno je spomenuti kako mliječna kiselina nastaje kada su vrijednosti pH pale na vrijednost oko 4 pH jedinice što je ujedno i pogodan uvjet za bakteriju mliječno-kiselog vrenja *Lb. hilgardii* koja je najvjerojatnije zaslužna za nastanak iste. Koncentracije etanola značajnije su počele rasti nakon drugog dana uzgoja te je izmjerena najveća koncentracija od 10,7 g/L. Najveća izmjerena koncentracija octene kiseline iznosila je 0,8 g/L koja je zabilježena zadnjeg dana uzgoja. U usporedbi sa rezultatima eksperimenta provedenog pri istim uvjetima uzgoja kefirnog napitka unutar HRCB-a, no bez dodataka smokve (Jelačić, 2021) vidljive su značajne razlike u dinamici potrošnje supstrata i nastanku produkata. Što ide u prilog tezi da prisutnost smokava djeluje pozitivno na tijek odvijanja bioprocasa. Kao što je navedeno i prethodno radi se o brzjoj fermentaciji, a po sastavu produkata odnosno kefirnog napitka, može se zaključiti da je ovakva nutrijentima bogat medij idealna podloga za rast kvasaca. Osim toga, profilu produkata i njihovoj koncentraciji u većoj mjeri su doprinijeli i ostali mikroorganizmi kojima također odgovara ovaj sastav podloge.

4.2.1.2. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak smokvi u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 5 okr/min

Slika 15 prikazuje promjenu pH vrijednosti tijekom konstantne vrtnje pri 5 okr/min. U usporedbi s promjenom pH vrijednosti pri 3 okr/min vidljivo je kako u ovome eksperimentu dolazi do još bržeg pada same vrijednosti, odnosno ono se događa već u drugome danu tj. 24 h nakon uspostave uzgoja te je iznosila 3,44 pH jedinice. Nakon toga ova vrijednost nije se značajnije mijenjala.



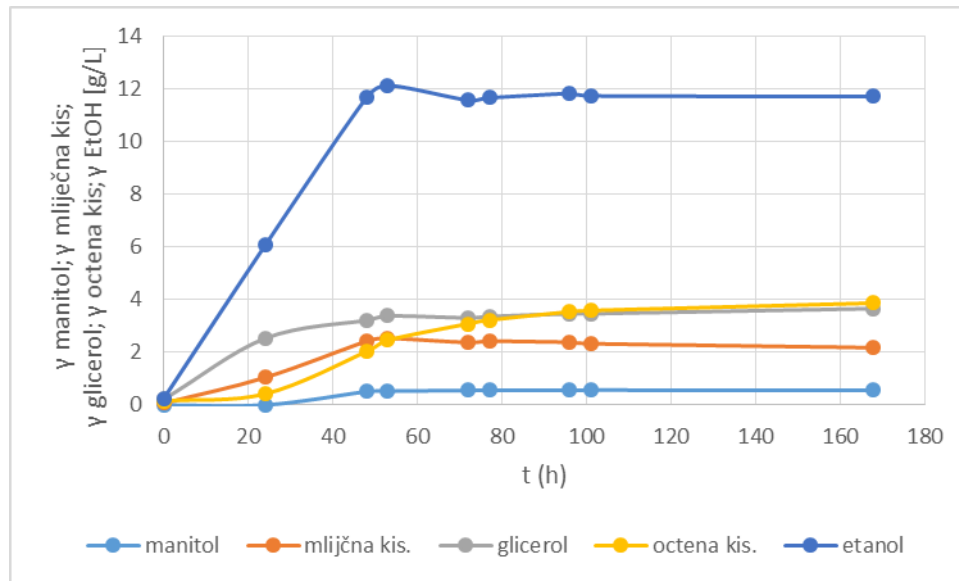
Slika 15. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta s konstantnom rotacijom HRCB-a pri brzini od 5 okr/min



Slika 16. Promjena koncentracije supstrata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta s konstantnom rotacijom HRCB-a pri brzini od 5 okr/min

Graf krivulje promjene koncentracije tj. potrošnje šećera (slika 16) u odnosu na prethodni eksperiment slične je dinamike međutim saharoza se brže uklanja iz podloge dok je zabilježeno i puno brže trošenje supstrata ukupno gledano (slika 16). Gotovo sav supstrat je potrošen nakon 50 sati kada su i koncentracije produkata poprimile manje više konstantnu vrijednost. Povećanje brzine rotacije imalo je pozitivan učinak na dinamiku odvijanja bioprocasa zbog boljeg prijenosa mase i bolje homogenizacije podloge, međutim u ovom

eksperimentu je uočena najviša inicijalna koncentracija glukoze (18,8 g/L) u odnosu na ostala dva eksperimenta pa je moguće da je fermentacija brže krenula i da je bilo dosta početnog izvora ugljika za sve prisutne mikroorganizme. Povećana koncentracija glukoze mogla bi biti posljedica inokulacije bioreaktora sa svježom kulturom kefirnih zrnaca koji su prebačeni iz tikvice za propagaciju inokuluma zbog toga što su ta zrnca bila samo ocijeđena, ali ne i isprana prije inokulacije podloge u HRCB.

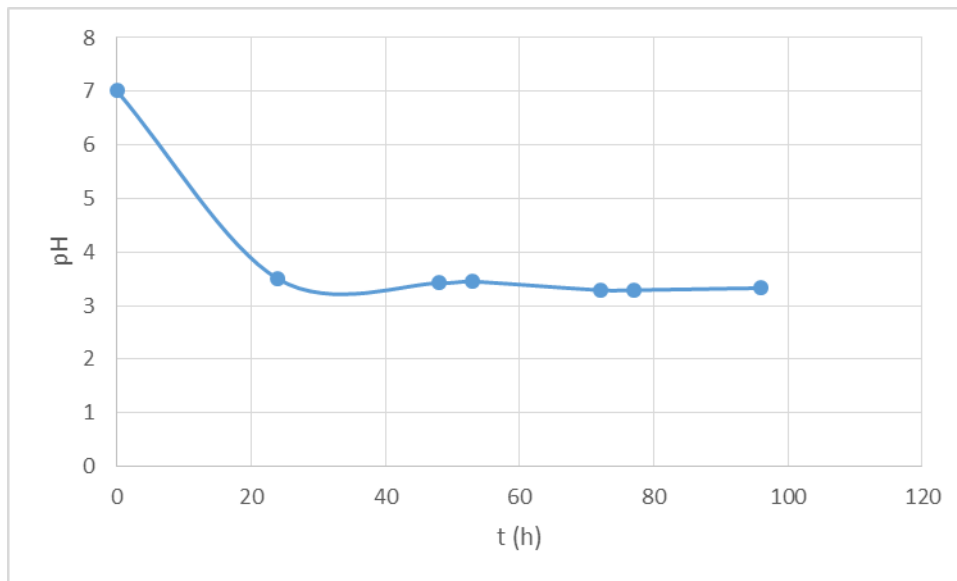


Slika 17. Promjena koncentracije produkata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta s konstantnom rotacijom HRCB-a pri brzini od 5 okr/min

I ovdje su zabilježeni svi produkti (slika 17) kao i u prethodnom eksperimentu što ukazuje na sličan sastav kefirnih zrnaca te povoljne uvjete za dominantne kvasce (*S. cerevisiae*) i homolaktične bakterije, prije svega *Lb. nagelii*. U ovom eksperimentu izmjerena je koncentracija etanola u koncentraciji od 11,8 g/L što je ujedno i najveća dobivena vrijednost unutar ovog dijela istraživanja, dok su koncentracije ostalih prisutnih produkata ostale na koncentracijama ispod 4 g/L.

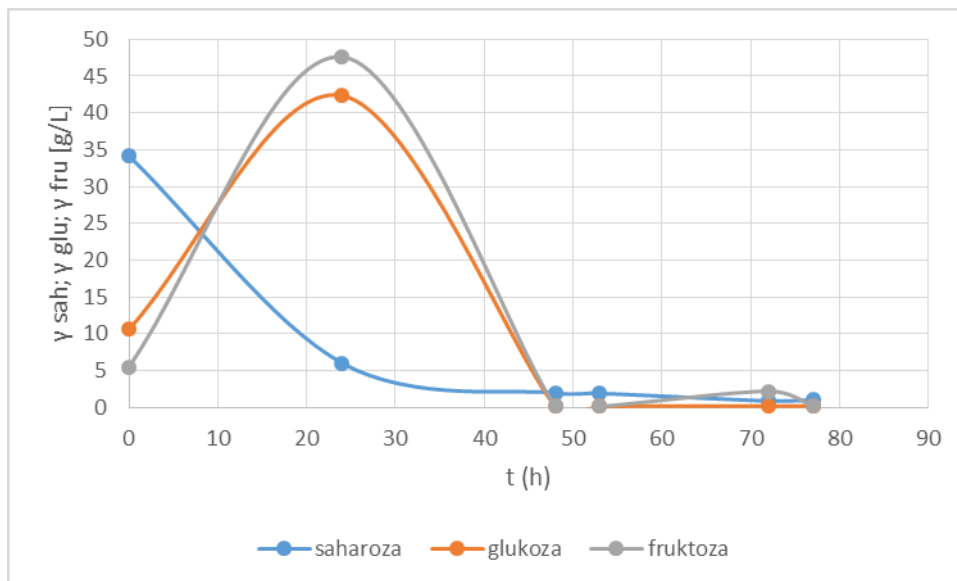
4.2.1.3. Proizvodnja kefirnog napitka uz dodatak smokvi u HRCB-u pri konstantnoj brzini rotacije od 7 okr/min

I u ovom slučaju promjena pH vrijednosti pokazuje sličnosti s uzgojem provedenim kod brzine okretaja od 5 okr/min.



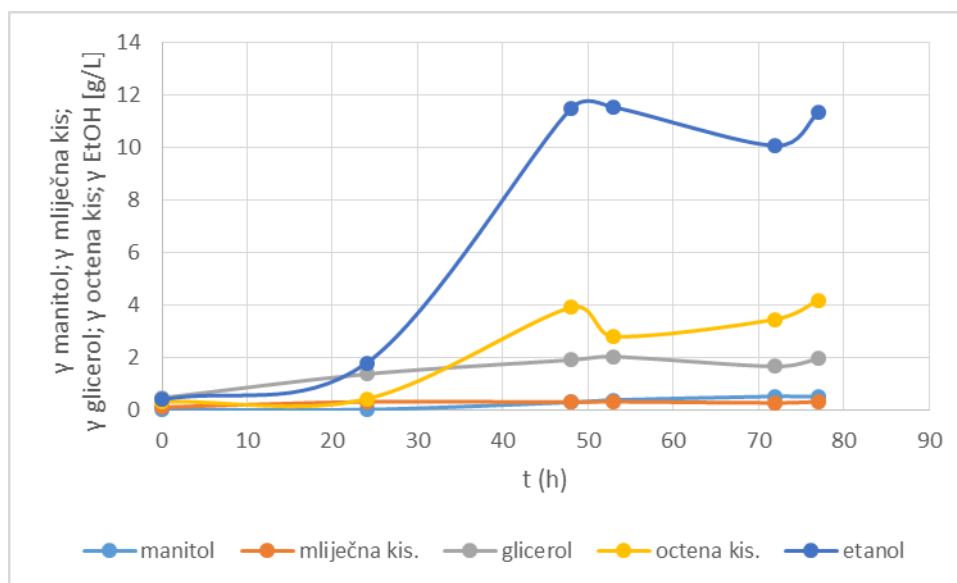
Slika 18. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta s konstantnom rotacijom HRCB-a pri brzini od 7 okr/min

Promjena pH vrijednosti prikazana je na slici 18. Izmjerena pH vrijednost iznosi 3,50 jedinica nakon 24 h što je slično prethodnim rezultatima ostvarenim u HRCB-u.



Slika 19. Promjena koncentracije supstrata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta s konstantnom rotacijom HRCB-a pri brzini od 7 okr/min

Promjena koncentracije supstrata slična je kao i u prethodnim eksperimentima, međutim kao i u prvom eksperimentu u ovom setu, niže koncentracije glukoze (10,6 g/L) nisu povoljno utjecale na mikrobnju aktivnost.



Slika 20. Promjena koncentracije produkata u ovisnosti o vremenu kod eksperimenta s konstantnom rotacijom HRCB-a pri brzini od 7 okr/min

Kao i u prvom eksperimentu u HRCB-u i ovdje je uočeno povećanje aktivnosti prisutnih mikroorganizama tek nakon 24 sata fermentacije. Razlog tome može biti ovisnost prisutnih mikroorganizama o hidrolitičkoj aktivnosti enzima invertaze koja je limitirajući faktor u ovom slučaju s obzirom na činjenicu da većina mikroorganizama iz kefirnih zrnaca nema mogućnost korištenja saharoze kao izvor ugljika. Također, anaerobni uvjeti nisu pridonijeli povećanju udjela stanica kvasaca u podlozi te je zbog toga inicijalni dio bioprocesa bio relativno spor. Nakon 24 sata dolazi do brze potrošnje glukoze i fruktoze koje su se nakupile u podlozi te do formiranja produkata kao i u prethodnim eksperimentima. Jedina bitnija promjenu u odnosu na prethodne eksperimente vidljiva je na slici 20 na kojoj su prikazane najmanje koncentracije mliječne kiseline dobivene u HRCB-u kod konstantne brzine rotacije, a izmjerena vrijednost iznosila je 0,2 g/L koja se do kraja uzgoja nije mijenjala. Također u ovom istraživanju dobivena je najviša koncentracija octene kiseline te je iznosila 4,1 g/L. Blagi pad etanola kojeg prati blagi porast koncentracije octene kiseline uočen je pred kraj bioprocesa što bi moglo upućivati na povećanu aktivnost octenih bakterija prirodno prisutnih u kefirnim zrcima i što se poklapa s literaturom (Gulitz i sur., 2011).

U tablici 4 prikazani su sumarno pokazatelji uspješnosti bioprocesa proizvodnje kefirnog napitka dobiveni u eksperimentima pri konstantnoj rotaciji HRCB-a kod različitih brzina okretaja. Kod eksperimenta pri brzini rotacije od 5 okr/min izračunati su najveći prinosi produkta za gotovo sve produkte. Prinos etanola iznosi 11,4 g što je i najveći prinos etanola

uspoređujući navedena tri uzgoja. Nadalje, uspoređujući izračunate podatke koeficijenta konverzije također možemo zaključiti kako bioproces na 5 okr/min ima najbolje postignute vrijednosti što se može vidjeti i po dobivenoj produktivnosti. Eksperiment kod 3 okr/min za mliječnu kiselinu ima najveći prinos u iznosu od 2,7 g kao i koeficijent konverzije 0,08 g/g te produktivnost od 0,54 g/g dan. Također, vrijednosti za manitol su nabolje kod 3 okr/min. Što se tiče uzgoja na 7 okr/min najbolji rezultat je u proizvodnji etanola, gdje je izmjerena najveća produktivnost. Zaključno, kako između dobivenih procesnih parametara ne postoji prevelika razlika za daljnji tijek provođenja eksperimenta koristit će se brzina rotacije bioreaktora s 3 okr/min kako bi se spriječila denaturacija kefirnih zrnaca kao i dodanih smokvi.

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

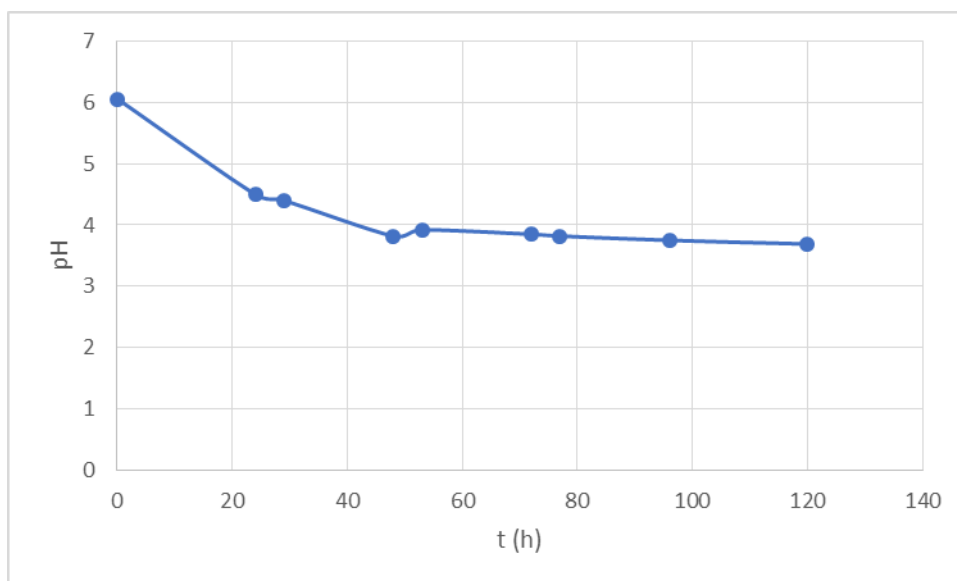
Parametar / brzina vrtnje	3 okr/min	5 okr/min	7 okr/min
ΔS [g]	33,8158	30,4138	33,1102
$Y_{C_3H_6O_3}$ [g]	2,7151	2,1118	0,2097
Y_{CH_3COOH} [g]	0,5259	3,7242	3,8527
Y_{EtOH} [g]	10,3645	11,4717	10,9239
$Y_{C_3H_8O_3}$ [g]	3,0884	3,4472	1,4873
$Y_{C_6H_{14}O_6}$ [g]	0,4981	0,5607	0,4835
$Y_{C_3H_6O_3/s}$ [g/g]	0,0816	0,06943	0,0063
$Y_{CH_3COOH/s}$ [g/g]	0,0158	0,12245	0,1164
$Y_{EtOH/s}$ [g/g]	0,3117	0,3772	0,3299
$Y_{C_3H_8O_3/s}$ [g]	0,0929	0,1133	0,0449
$Y_{C_6H_{14}O_6/s}$ [g/g]	0,0150	0,0184	0,0146
$Pr (C_3H_6O_3)$ [g/g dan]	0,5430	0,3017	0,0524
$Pr (CH_3COOH)$ [g/g dan]	0,1052	0,5321	0,9632
$Pr (EtOH)$ [g/g dan]	2,0729	1,6388	2,7309
$Pr (C_3H_8O_3)$ [g/g dan]	0,6178	0,4925	0,3718
$Pr (C_6H_{14}O_6)$ [g/g dan]	0,0997	0,0801	0,1209

4.2.2. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije uz dodatak suhih smokvi

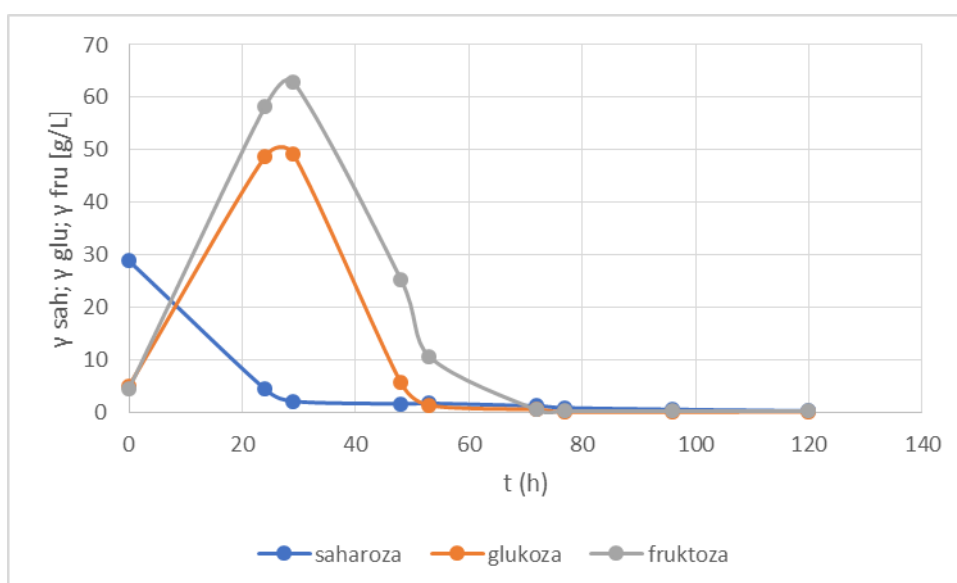
U ovom dijelu rada prikazani su rezultati proizvodnje kefirnog napitka u HRCB-u uz dodane suhe smokve i korištenjem intervalne rotacije bioreaktora. Intervalnu rotaciju karakterizira rotacija bioreaktora unutar jednog sata određeni vremenski period dok preostalo vrijeme sustav miruje. U ovom dijelu istraživanja provedena su tri eksperimenta u kojima se mijenjalo vrijeme trajanja rotacije pri čemu su vremena rotiranja unutar jednog sata iznosila 3, 6 i 9 minuta, a pripadajuća vremena mirovanja iznosila su 57, 54 i 51 minuta. Na temelju rezultata eksperimenata provedenih pri konstantnoj rotaciji bioreaktora odlučeno je da će se u daljnjem istraživanju koristiti brzina rotacije bioreaktora od 3 okr/min s obzirom na činjenicu da su u prethodna tri eksperimenta ostvareni gotovo slični rezultati što se tiče profila koncentracija nastalih produkata. Također, htio se smanjiti negativan utjecaj brzine rotacije na denaturaciju kefirnih zrnaca i dodanih smokvi. Kao i u prethodnom eksperimentu korištena je vodena otopina saharoze koncentracije 30 g/L kao hranjiva podloga volumena od 1 L uz 10 % (m/V) inokuluma i 200 g dodanih suhih smokava. Uzgoji su se provodili na sobnoj temperaturi. U vremenu trajanja fermentacije izuzimali su se uzorci 1-2 puta dnevno kako bi se pratila promjena koncentracije supstrata i nastalih produkata UPLC analizom te se pratila i promjena vrijednosti pH podloge.

4.2.2.1. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 3 minute pri brzini rotacije od 3 okr/min uz dodatak suhih smokvi

Tijekom intervalne rotacije promjena pH vrijednosti podloge nešto je sporija u usporedbi s promjenom u eksperimentu s konstantnom rotacijom pri 3 okr/min. U konačnici njena vrijednost pala je na vrijednost malo niže od 4 pH jedinice što je malo viša vrijednost u usporedbi s navedenim eksperimentom s konstantnom rotacijom. Navedene promjene pH vrijednosti prikazane su na slici 21.



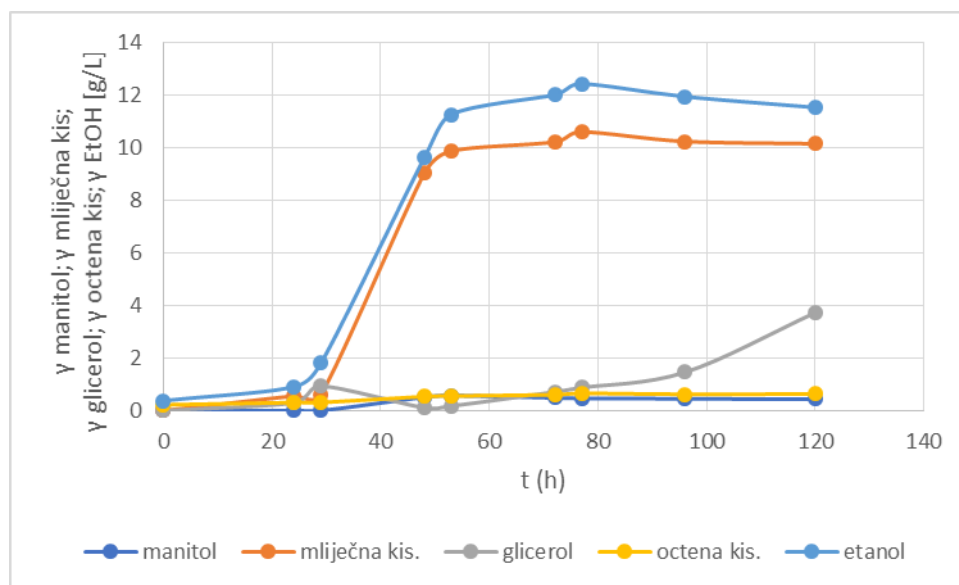
Slika 21. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije HRCB-a u trajanju od 3 min/h



Slika 22. Promjena koncentracije supstrata u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije HRCB-a u trajanju od 3 min/h

Nadalje, slične su promjene zabilježene i kod potrošnja supstrata (slika 22) s tim da je kod intervalne rotacije već nakon 40-og sata potrošen sav izvor ugljika iz podloge. Ono što se može primijetiti u svim eksperimentima u HRCB-u da dolazi do oslobađanja šećera iz smokvi, a taj je efekt dodatno izražen kod eksperimenata s intervalnom rotacijom pri čemu brzina rotacije

nije imala neki značajniji utjecaj. Što je vidljivo u izmjeranim koncentracije glukoze s iznosom od 49,1 g/L i fruktoze s koncentracijom 62,9 g/L.

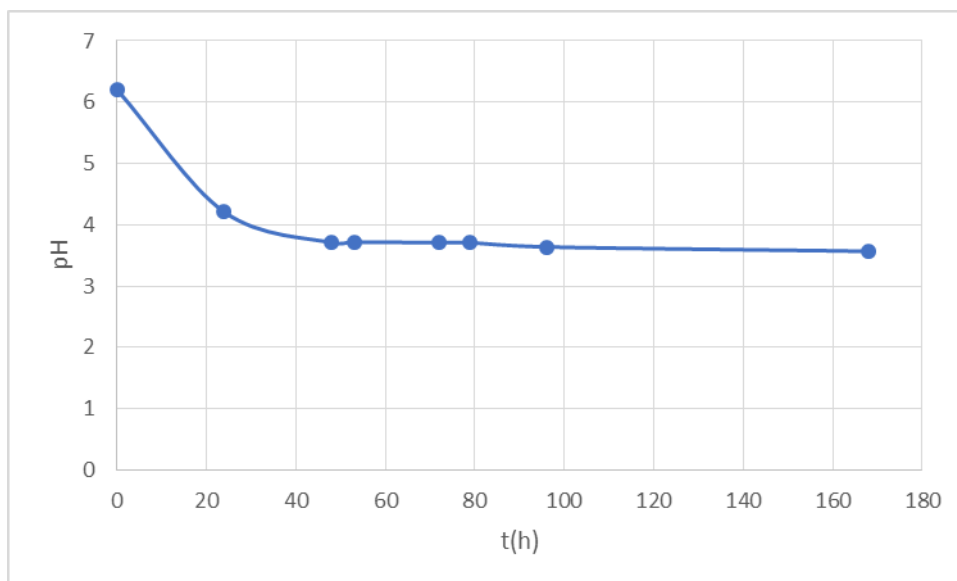


Slika 23. Promjena koncentracije produkata u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije HRCB-a u trajanju od 3 min/h

Na slici 23 prikazane su promjene koncentracije produkata. Ono što je zanimljivo jest činjenica da iako je unutar prva 24 sata postojala aktivnost prisutnih mikroorganizama koji mogu hidrolizirati saharozu (kvasci) nije uočena značajnija sinteza produkata. Tek s padom pH vrijednosti podloge (4,5) najvjerojatnije su stvoreni povoljniji uvjeti za njihovu aktivnost što je vidljivo na promjeni koncentracije etanola. Također, s obzirom na to da je u podlozi bilo dosta hranjivih tvari za sve prisutne mikroorganizme, prisutne bakterije mliječno-kiselog vrenja također su proizvele značajnije količine mliječne kiseline. najveće izmjerena koncentracija iznosila je 10,5 g/L. Octena kiselina proizvedena je u značajnije manjim koncentracijama s prosječnim iznosom od 0,6 g/L što je u skladu s literaturnim navodima vezano uz ovakvu vrstu podloge.

4.2.2.2. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 6 minuta pri brzini rotacije od 3 okr/min uz dodatak suhih smokvi

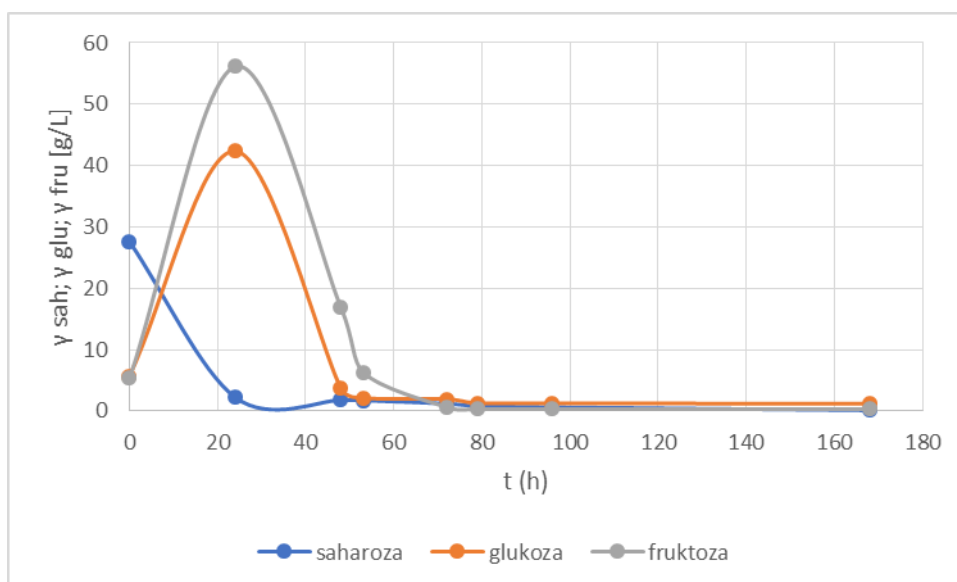
U ovome dijelu eksperimenta brzina rotacije ostala je nepromijenjena odnosno 3 okr/min kao i u prethodnom eksperimentu. Razlika u odnosu na prethodni eksperiment je u vremenu rotacije, koje se povisilo za 3 minute odnosno iznosi 6 minuta vrtnje unutar jednog sata (54 minute miruje).



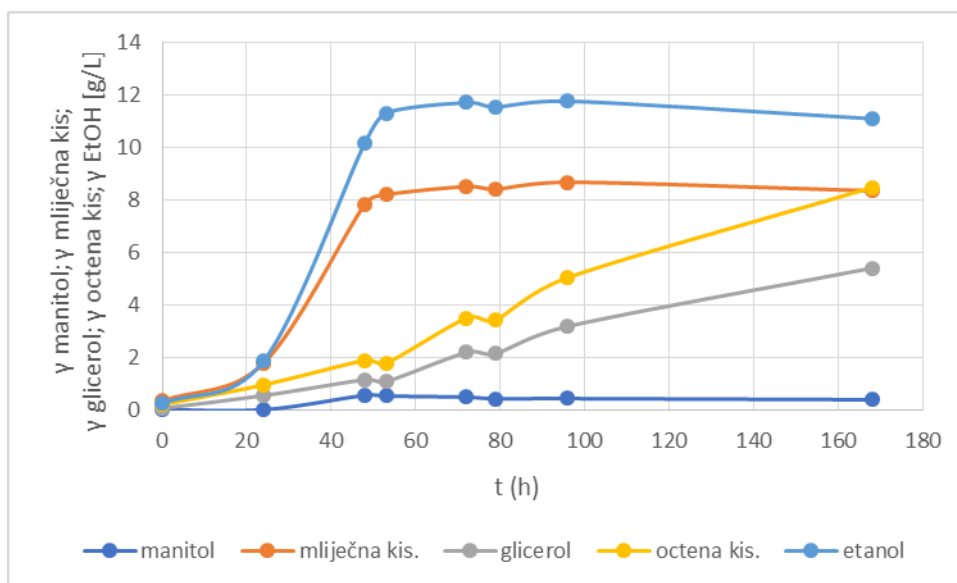
Slika 24. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije HRCB-a u trajanju od 6 min/h

Na slici 24 prikazana je promjena pH vrijednosti podloge intervalne rotacije u trajanju od 6 minuta. Dinamika promjene pH vrijednosti ne odskaje značajno od već opisanih grafova.

Iako je pH nešto brže pao u usporedbi s prethodnim eksperimentom s intervalnom rotacijom, profil koncentracija i nastalih produkata bio je vrlo sličan. Vrijednost je pala s početnih 6,21 na 3,71 gdje je stagnirala te na kraju došla do 3,57 pH jedinice.



Slika 25. Promjena koncentracije supstrata u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije HRCB-a u trajanju od 6 min/h



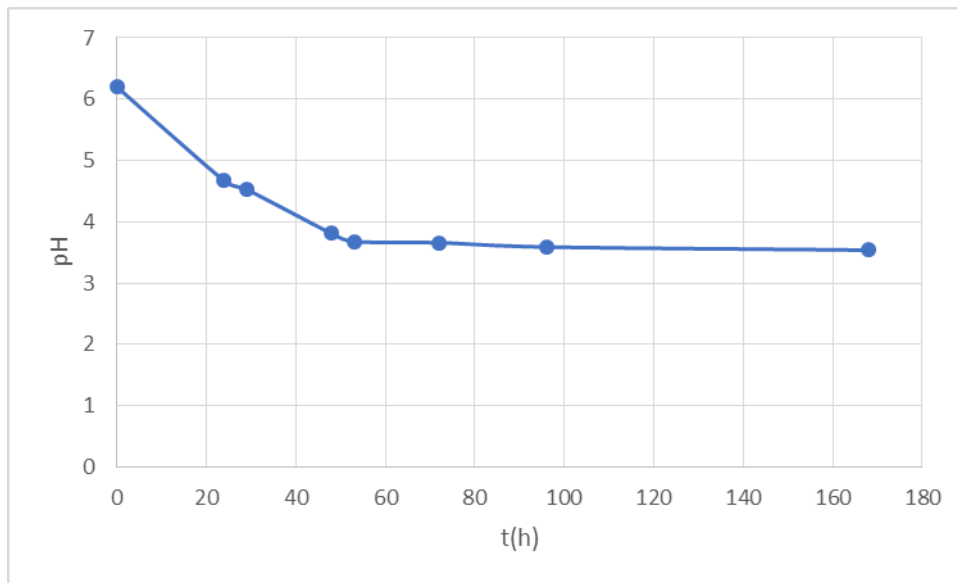
Slika 26. Promjena koncentracije produkata u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije HRCB-a u trajanju od 6 min/h

Značajnija proizvodnja etanola, glicerola, octene i mliječne kiseline započinje nakon 24 sata, a koncentracije produkata nakon 50 sati uzgoja postigle su svoj maksimum osim octene kiseline i glicerola (slika 26). Maksimalna zabilježena koncentracija etanola iznosila je 11,7 g/L, glicerola 5,3 g/L te mliječne kiseline 8,6 g/L. S obzirom na to da je vršeno uzorkovanje tekućeg dijela hranjive podloge 1-2 puta dnevno, sustav je bio izložen zraku što je za posljedicu u jednom trenu imalo povećanu aktivnost bakterija octene kiseline prema kraju postupka proizvodnje kefirnog napitka. Vidljiv je gotovo linearan porast koncentracije octene kiseline te je zadnjega dana uzgoja izmjerena koncentracija iznosila 8,2 g/L što je ujedno i najveće izmjerena koncentracija octene kiseline za uzgoje provedene u bioreaktoru. I u ovom slučaju zabilježene su niske koncentracije manitola u podlozi s maksimalno izmjerenom koncentracijom od 0,5 g/L. Također kod promjena koncentracije, potrošnje saharoze te dinamike nastajanja i trošenja glukoze i fruktoze, nema značajnijih promjena u odnosu na već opisane uzgoje (slika 25). U odnosu na prethodan uzgoj vidljivo je kako se koncentracija octene kiseline povećala za 8 puta s najviše izmjerenom vrijednosti od 8,4 g/L na kraju bioprocesa (slika 26).

4.2.2.3. Proizvodnja kefirnog napitka u HRCB-u korištenjem intervalne rotacije u trajanju od 9 minuta pri brzini rotacije od 3 okr/min uz dodatak suhih smokvi

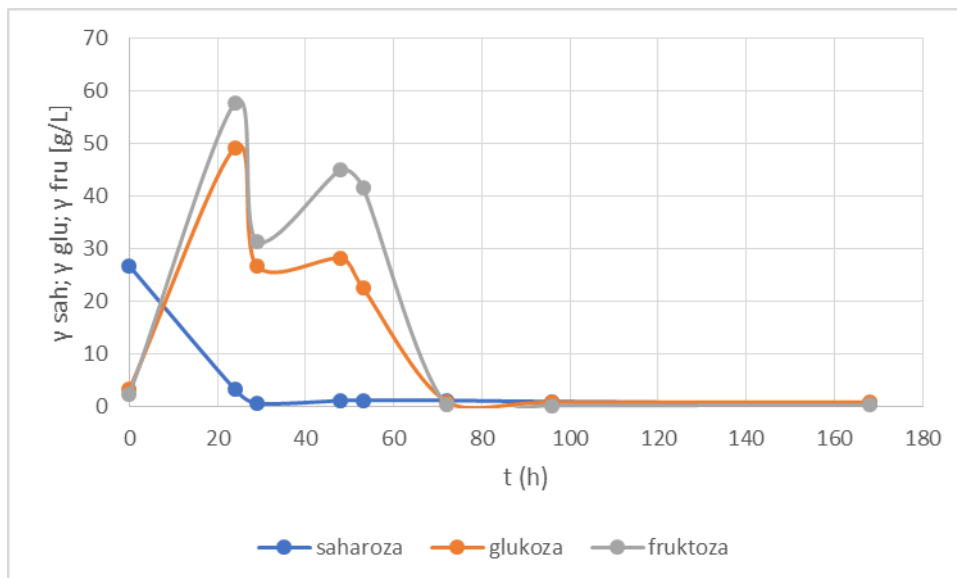
I kod ovog posljednjeg istraživanja, brzina okretanja bioreaktora u fazi rotacije iznosila

je 3 okr/min. Rotacija je trajala 9 minuta unutar jednog sata.



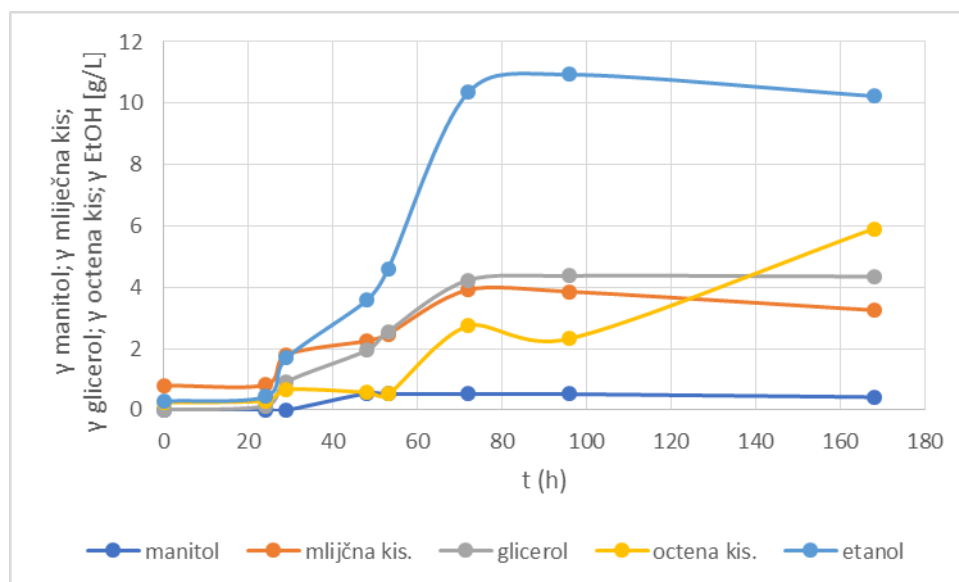
Slika 27. Promjena pH vrijednosti podloge u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije HRCB-a u trajanju od 9 min/h

Promjena pH vrijednosti prikazana je na slici 27 te je njena promjena vrlo slična prvom eksperimentu s intervalnom rotacijom. Vrijednost se smanjivala do drugog dana kada je iznosila 3,68 pH jedinice. Do kraja uzgoja nije došlo do promjene te je na kraju iznosila 3,59 pH jedinca.



Slika 28. Promjena koncentracije supstrata u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije HRCB-a u trajanju od 9 min/h

Također, promjena koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze (slika 28) bila je vrlo slična prvom eksperimentu u ovom setu (slika 22), s tim da je skoro sav supstrat potrošen tek nakon 72 sata. I ovdje su zabilježene nešto veće koncentracije glukoze (46,2 g/L) i fruktoze (57,7 g/L) od teoretski moguće što dovodi do zaključka da se dio izvora ugljika morao osloboditi, zajedno za ostalim nutrijentima, iz suhih smokvi.



Slika 29. Promjena koncentracije produkata u ovisnosti o vremenu kod intervalne rotacije HRCB-a u trajanju od 9 min/h

Koncentracija etanola nešto je niža u usporedbi s prijašnjim rezultatom, a maksimalna izmjerena vrijednost iznosi 10,9 g/L. Također isti pad je vidljiv i kod ostalih produkata gdje je maksimalna koncentracija mliječne kiseline iznosila 3,9 g/L, glicerola 4,3 g/L, octene kiseline 5,9 g/L te manitola 0,5 g/L (slika 29). Uspoređujući rezultate sva tri eksperimenta s intervalnom rotacijom može se zaključiti da je, iako je sustav bio glavninu vremena u mirovanju, međutim zbog povremenog otvaranja sustava zbog uzorkovanja i boljeg prijenosa kisika iz plinske u tekuću fazu kod duljeg vremena rotacije, maksimalna koncentracija etanola u podlozi dobivena je upravo u ovom zadnjem istraživanju. Također, može se vidjeti i trend povećanja proizvedene octene kiseline u podlozi s povećanjem trajanja vremena rotacije HRCB-a odnosno skraćivanjem vremena mirovanja sustava. Isto tako, primijećeno je da se, iako je podloga bogata nutrijentima, prisutnost kisika u sustavu doprinosi značajnijem produljenju vremena trajanja odnosno postizanja maksimalnih koncentracija željenih produkata u kefirnom napitku. Sumarno, rezultati dobiveni korištenjem intervalne rotacije HRCB-a prikazani su u tablici 5.

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

Parametar / trajanje vrtnje po satu	3 min/h	6 min/h	9 min/h
ΔS [g]	28,5433	27,50526	26,2412
$Y_{C_3H_6O_3}$ [g]	10,1466	0,3834	2,4565
Y_{CH_3COOH} [g]	0,4135	8,2691	5,6674
Y_{EtOH} [g]	11,1533	10,8532	9,9456
$Y_{C_3H_8O_3}$ [g]	3,7262	5,3398	4,3513
$Y_{C_6H_{14}O_6}$ [g]	0,4309	0,3834	0,4208
$Y_{C_3H_6O_3/S}$ [g/g]	0,3555	0,2910	0,0936
$Y_{CH_3COOH/S}$ [g/g]	0,4135	0,3006	0,2159
$Y_{EtOH/S}$ [g/g]	0,3908	0,3945	0,3790
$Y_{C_3H_8O_3/S}$ [g]	0,1305	0,1941	0,1658
$Y_{C_6H_{14}O_6/S}$ [g/g]	0,0151	0,0139	0,0160
$Pr(C_3H_6O_3)$ [g/g dan]	2,0293	1,1437	0,3509
$Pr(CH_3COOH)$ [g/g dan]	0,0827	1,1813	1,4207
$Pr(EtOH)$ [g/g dan]	2,2306	1,5505	0,8096
$Pr(C_3H_8O_3)$ [g/g dan]	0,7452	0,7628	0,6216
$Pr(C_6H_{14}O_6)$ [g/g dan]	0,0862	0,0547	0,0601

Vidljivo je kako su dobiveni veći prinosi svih produkata u odnosu na parametre dobivene tijekom konstantne rotacije (tablica 4). Ostvareni su bolji prinosi glavnih produkata etanola i mliječne kiseline. Kod uzgoja s vrtnjom od 3 min/h ostvaren je najbolji prinos etanola (11,1 g) kao i mliječne kiseline (10,1 g), a i koeficijent konverzije najveći je za mliječnu kiselinu (0,3 g/g). Dok se kod drugoga uzgoja s vrtnjom od 6 min/h najbolji prinos odnosi na octenu kiselinu (8,2 g), a koeficijent konverzije na etanol s vrijednošću 0,39 g/g što nije značajno veće nego kod uzgoja s 3 min/h. Vrijednosti procesnih parametara kod uzgoja s 9 min/h vrtnje su nešto manji u odnosu na spoemnuta dva no vidljivo je kako je produktivnost octene kiseline najefikasnija. U usporedbi ova tri bioprocesa može se zaključiti kako se najbolji rezultati ostvaruju kod eksperimenta pri vrtnji od 3 min/h upravo zbog prinosa glavnih produkata etanola i mliječne kiseline.

5. ZAKLJUČCI

1. Proizvodnja kefirnog napitka moguća je u malom mjerilu (staklenkama) pri čemu značajan utjecaj na sastav kefirnog napitka ima količina dodanih suhih smokvi.
2. Količina suhih smokava od 10 i 20 grama dodanih u 150 mL otopine saharoze (0,2 m/V) imala je posljedicu veće količine proizvedene octene kiseline (sa maksimalnim iznosom 45,8 g/L kod 10 g i 58,2 g/L kod 20 g dodanih smokvi) na kraju postupka što je najvjerojatnije posljedica nedostatka hranjivih tvari, ali isto tako moguća posljedica povećane aktivnosti odnosno prevladavanja bifidobakterija.
3. Na temelju preliminarnih istraživanja u staklenkama količina dodanih smokava od 0,2 % (m/V) uzeta je za daljnja istraživanja u HRCB-u pri čemu su korištene različite operacijske karakteristike ovakvog sustava (konstantna i intervalna rotacija). Eksperimente s konstantnom rotacijom (3, 5 i 7 okr/min) karakterizira kratko vrijeme trajanja fermentacije te više koncentracije proizvedenog etanola (9,1; 11,8; 11,5 g/L) i mliječne kiseline (3,2; 2,5; 0,2 g/L) u odnosu na octenu kiselinu (0,1; 3,5; 4,1 g/L). Veći broj okretaja bioreaktora, zbog boljeg miješanja i prijenosa mase, skraćuje vrijeme potrebno za utrošak ukupnog supstrata te dobivanje maksimalne koncentracije produkata.
4. Intervalna rotacija bioreaktora pokazala se kao najbolji izbor u proizvodnji kefirnog napitka. Kod ove vrste rotacije ostvareni su značajnije bolji prinosi svih produkata, u prvom redu etanola (12,4; 11,6; 10,9 g/L) i mliječne kiseline (10,5; 8,6; 3,9 g/L) međutim s obzirom na to da su bakterije mliječno-kiselog vrenja odgovorne za njenu proizvodnju mikroaerofili, najviše koncentracije u svim eksperimentima u HRCB-u ostvarene su kod najkraćeg vremena trajanja rotacije sustava što je najvjerojatnije rezultat manje mogućnosti otapanja kisika koji je mogao ući zrakom prilikom uzorkovanja. Također, rjeđe uzorkovanje, posebice prema kraju bioprocasa, značajnije je utjecalo na koncentraciju octene kiseline u finalnom proizvodu.

6. LITERATURA

Biavati B, Mattarelli P (2006) The Family Bifidobacteriaceae, *The Prokaryotes*, 322–382. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_17

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, *European Polym. Jnl.* **109234**. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>

Davidović SZ, Miljković MG, Antonović DG, Rajilić-Stojanović MD, Dimitrijević-Branković SI (2015) Water Kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria, *Hem Ind* **69**,595-604. <https://doi.org/10.2298/HEMIND140925083DDe>

Roos J, De Vuyst L (2018) Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages, *Current opinion in biotech.* **49**, 115–119.

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

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

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

Fiorda FA, de Melo Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK, Pagnoncelli MGB, de Souza Vandenberghe LP, Soccol CR (2017) Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation, *Food microbio.*, **66**, 86–95.

George F i sur. (2018) Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective, *Frontiers in Microbio.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>.

Guerzoni ME, Serrazanetti DI, Vernocchi P, Gianotti A (2013) Physiology and Biochemistry of Sourdough Yeasts, Handbook on Sourdough Biotechnology, Springer, 155–181. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0_6.

Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmann MA, Vogel RF (2011) The microbial diversity of water kefir. *Int J Food Microbiol* **151**, 284-288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>

Gulitz A, Stadie J, Ehrmann MA, Ludwig W, Vogel RF (2013) Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *J Appl Microbiol* **114**, 1-10. <https://doi.org/10.1111/jam.12124>

Guzel-Seydim ZB, Gökırmaklı Ç, Greene AK (2021a) A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological, and functional properties, *Trends in Food Science & Technology*, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>

Guzel-Seydim ZB, Seydim AC, Greene AK (2021b) Effect of brewing method on quality parameters and antioxidant capacity of black tea, *Func Food Science*, 1. <https://doi.org/10.31989/ffs.v1i8.807>

Holst O, Müller-Loennies S (2007) Microbial Polysaccharide Structures, 123–179. <https://doi.org/10.1016/b978-044451967-2/00004-0>

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

Kandler O (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 209–224. <https://doi.org/10.1007/bf00399499>

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

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

Laurey 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, *Frontiers in microbiology*, **10**, 2876.

Laureys D, De Vuyst L (2014) Microbial species diversity, community dynamics and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl Environ Microbiol* **80**, 2564-2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>

Laureys D, De Vuyst L (2017) The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *J Appl Microbiol* **122**, 719-732. <https://doi.org/10.1111/jam.13370>

Laureys D, Cnockaert M, De Vuyst L, Vandamme P (2016) *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir, *Int J of Sys and Evo Microbiol*, **66**, 1281-1286.

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>

Leemhuis H, Leemhuis H, Pijning T, Dobruchowska JM, van Leeuwen SS, Kralj S i sur. (2013) Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications, *Journal of biotechnology*, **163**, 250–272.

Li L, Wieme A, Spitaels F, Balzarini T, Nunes OC, Manaia CM i sur. (2014) *Acetobacter sicerae* sp. nov., isolated from cider and kefir, and identification of species of the genus *Acetobacter* by *dnaK*, *groEL* and *rpoB* sequence analysis, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **64**, 2407–2415.

Lynch K M, Zannini E, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK (2019). Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **18**, 587.-625. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12440>

Magalhães KT, Pereira GV, Dias DR, Schwan RF (2010) Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir, *World Jour of Microbiology and Biotechnology*, 1241–1250. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0294-x>

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

Mauricio J (2012) Kefir D'Aqua and Its Probiotic Properties, *Probiotic in Animals* [Preprint]. <https://doi.org/10.5772/50053>

Moinas M, Horisberger M, Bauer H (1980) The structural organization of the Tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Arch Microbiol* **128**, 157-161. <https://doi.org/10.1007/BF00406153>

Pidoux M, Marshall VM, Zanoni P, Brooker B (1990) Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation, *The Jour of app bacteriology*, **69**, 311–320.

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

Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2011) Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria, *Genes & Nutrition*, 285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>

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

Reiss J (1990) Metabolic activity of Tibi grains, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 462–465. <https://doi.org/10.1007/bf01193095>

Romero-Luna HE i sur. (2020) Probiotic Potential of Lactobacillus paracasei CT12 Isolated from Water Kefir Grains (Tibicos), *Current microbio*, **77**, 2584–2592.

Sgorbati B, Biavati B, Palenzona D (1995) The genus Bifidobacterium, *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 279–306. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_8

Shahabi-Ghahfarrokhi I, Khodaiyan F, Mousavi M, Yousefi H (2015) Effect of γ -irradiation on the physical and mechanical properties of kefiran biopolymer film, *Inter jour of biologi macromolecules*, **74**, 343–350.

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 microbiology*, **35**, 92–98.

Sutherland IW (2007) Bacterial Exopolysaccharides, *Comprehensive Glycoscience*, 521–558. <https://doi.org/10.1016/b978-044451967-2/00133-1>

Suzuki R, Katayama T, Kim BJ, Wakagi T, Shoun H, Ashida H i sur. (2010) Crystal structures of phosphoketolase: thiamine diphosphate-dependent dehydration mechanism, *The Jnl of Bio Chem*, **285**, 34279–34287.

Tan LL , Ngiam JJ, Sim ESZ, Conway PL, Loo SCJ (2022) Liquorilactobacillus satsumensis from water kefir yields α -glucan polysaccharides with prebiotic and synbiotic qualities, *Carbohydrate polymers*, **290**, 119515.

Torino MI, de Valdez GF, Mozzi F (2015) Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages, *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00834>

Verce M, De Vuyst L, Weckx S (2019) Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel Species, *Frontiers in microbiology*, **10**, 479.

Vuyst LD, De Vuyst L, De Vin F (2007) Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria, *Comprehensive Glycoscience*, 477–519. <https://doi.org/10.1016/b978-044451967-2/00129-x>

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

Wee YJ, Kim JN, Ryu HW (2006) Biotechnological production of lactic acid and its recent applications, *Food Technology and Biotechnology*, **44**, 163–172.

Xu D, Bechtner J, Behr J, Eisenbach L, Geißler AJ, Vogel RF (2019) Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. *Int J Food Microbiol* **290**, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.004>

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

PRILOZI

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

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

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

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MONIKA KRALJ 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