

Različite tehnike proizvodnje medovine uz pomoć kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418

Akalović, 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:159:700912>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Petra Akalović

**RAZLIČITE TEHNIKE PROIZVODNJE
MEDOVINE UZ POMOĆ KVASCA
Saccharomyces cerevisiae ZIM 3418**

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

Ovim putem zahvaljujem se svom dvostrukom mentoru izv. prof. dr. sc. Mladenu Pavlečiću na prihvaćanju prijedloga teme ovog diplomskog rada te na svojoj pruženoj pomoći i izdvojenom vremenu za realizaciju ovog rada.

Zahvaljujem se svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, posebice izv. prof. dr. sc. Antoniji Trontel, izv. prof. dr. sc. Mariju Novaku i dr. sc. Nenadu Marđetku prvenstveno na stvaranju izuzetno ugodne i vesele radne atmosfere, a također i na svakom udijeljenom savjetu i pomoći, a laboratorijskom tehničaru Igoru Livadi zahvaljujem za svu pomoć oko provedbe eksperimentalnog dijela ovog rada.

Veliko hvala voditelju studija prof. dr. sc. Božidaru Šanteku na pristupačnosti i srdačnosti tijekom cijelog studiranja, na svom prenesenom znanju te na motiviranju i poticanju zanimanja za područje biotehnologije i bioprocenog inženjerstva. Njegov primjer me u konačnici i potaknuo da se odlučim upravo za ovaj diplomski studij.

Zahvala ide i mojoj PBF četvorci za svo provedeno zajedničko vrijeme kako na faksu, tako i izvan njega, za svako zajedničko učenje i pomoć te za svaku riječ ohrabrenja.

Zahvaljujem se i mojoj Petri 2, što se odvažila upustiti u paralelnu avanturu izrade svog diplomskog rada zajedno sa mnom. Hvala joj za sve cjelodnevne 12-satne boravke u laboratoriju i svu pomoć ne samo tijekom izrade diplomskog, nego i tijekom ove dvije godine diplomskog studija.

Hvala mojim drugim prijateljima i obitelji, posebice mami, za pruženu podršku, savjet, utjehu, bezbrojne minute provedene na telefonu i za sve kupljene kutije maramica.

Hvala mojoj cimi za sve što smo proživjele zajedno u ovih šest godina cimerstva, od svih vrsta suza i smjeha, preko gomile pojedenih kokica do svih minuta jadikovanja provedenih na pragu sobe.

Malo neobična, ali ne manje vrijedna zahvala ide i mojim kućnim ljubimcima, Tiki, Mimi i Pippinu, za pruženu emocionalnu pomoć i što su mi svim teškim trenucima izmamljivali osmijeh na lice.

Moram zahvaliti i kolegama iz Zagrebačke pivovare (F,D) što su mi uljepšali ovih završnih 6 mjeseci studentskog života.

Na kraju, hvala dragom Bogu što mi je podario mojeg Krešu da bude uz mene od prvog do zadnjeg dana studiranja, a njemu hvala za sve što je preživio i pretrpio zajedno sa mnom.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

RAZLIČITE TEHNIKE PROIZVODNJE MEDOVINE UZ POMOĆ KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*
ZIM 3418

Petra Akalović, univ. bacc. ing. biotechn. 0119047582

Sažetak: Medovina je alkoholno piće nastalo dugotrajnom fermentacijom medne sladovine, dobivene razrjeđivanjem meda s vodom, najčešće pomoću selekcioniranih vinskih kvasaca. Budući da med ne sadrži dovoljno hranjivih tvari potrebnih za kvašćevu aktivnost, preporuča se dodatak nutrijenata u sladovinu za poboljšanje i ubrzanje fermentacije. U preliminarnom dijelu ovog rada, provedenog u tikvicama, proučavana je mogućnost proizvodnje medovine od lipinog meda pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 iz sladovine s različitom početnom koncentracijom kvašćevog ekstrakta kao izvora dušika (0 g/L, 0,5 g/L i 2 g/L) s ciljem proučavanja njegovog utjecaja na dinamiku fermentacije. Ostvareni prinosi etanola u eksperimentima u tikvicama redom su iznosili 21,07 g/L, 33,76 g/L i 43,95 g/L što ukazuje na pozitivan utjecaj veće količine dodanog kvašćevog ekstrakta na koncentraciju proizvedenog alkohola. Nakon određivanja optimalne koncentracije kvašćevog ekstrakta, provedene su dvije fermentacije u bioreaktoru s miješalom koristeći dva različita postupka proizvodnje; šaržni i polukontinuirani, s ciljem usporedbe pokazatelja uspješnosti između ta dva postupka. U ovom slučaju zabilježeni su slični prinosi etanola tijekom oba postupka proizvodnje, a iznosili su 44,23 g/L za šaržni postupak i 47,86 g/L za polukontinuirani postupak. Koeficijent konverzije fermentabilnih šećera u etanol za šaržni postupak iznosio je 0,3709 g/g, a za polukontinuirani postupak 0,3579 g/g te je ostvarena produktivnost od 0,6884 g/Lh tijekom šaržnog i 0,6789 g/Lh tijekom polukontinuiranog postupka proizvodnje. Na temelju rezultata ovog diplomskog rada može se zaključiti kako dodatak odgovarajuće koncentracije kvašćevog ekstrakta u sladovinu od lipinog meda bitno utječe na konačni prinos etanola te da se za proizvodnju medovine mogu koristiti i šaržni i polukontinuirani postupak.

Ključne riječi: medovina, *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418, kvašćev ekstrakt, bioreaktor s miješalom

Rad sadrži: 45 stranica, 6 slika, 8 tablica, 50 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 (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Mladen Pavlečić (mentor)
3. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (član)
4. prof. dr. sc. Damir Stanzer (zamjenski član)

Datum obrane: 20. rujna 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 Brewing and Malting Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

DIFFERENT TECHNIQUES OF MEAD PRODUCTION WITH YEAST *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418

Petra Akalović, univ. bacc. ing. biotechn. 0119047582

Abstract: Mead is an alcoholic drink created by long-term fermentation of honey wort, obtained by diluting honey with water, usually using selected wine yeasts. Since honey does not contain enough nutrients necessary for yeast activity, it is recommended to add nutrients to the wort to improve and accelerate fermentation. In the preliminary part of this thesis, carried out in flasks, the possibility of producing linden honey mead using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 from wort with different initial concentrations of yeast extract as a nitrogen source (0 g/L, 0.5 g/L and 2 g) was studied with the aim of studying its influence on fermentation dynamics. The achieved yields of ethanol in these experiments were 21,07 g/L, 33,76 g/L and 43,95 g/L, respectively, which indicates a positive influence of a larger amount of added yeast extract on the concentration of produced alcohol. After determination of optimal concentration of yeast extract, two fermentations were carried out in a stirred tank bioreactor by using two different production techniques namely batch and semi-continuous, with the aim of comparing bioprocess efficiency parameters between them. Similar results were achieved by using both techniques, where ethanol yield of 44,23 g/L for the batch and 47,86 g/L for the semi-continuous process was obtained. The conversion coefficient of fermentable sugars into ethanol for the batch process was 0,3709 g/g, and for the semi-continuous process 0,3579 g/g while the productivity in case of batch process was 0,6884 g/Lh, and that of the semi-continuous process was 0,6789 g/Lh respectively. Based on the results of this thesis, it can be concluded that the addition of a suitable concentration of yeast extract to linden honey mead significantly affects the final yield of ethanol and that both production techniques can be used for mead production in stirred tank bioreactor.

Keywords: mead, *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418, yeast extract, stirred tank bioreactor

Thesis contains: 45 pages, 6 figures, 8 tables, 50 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, Associate professor (president)
2. Mladen Pavlečić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Jasna Mrvčić, PhD, Full professor (member)
4. Damir Stanzer, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 20th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. SIROVINE U PROIZVODNJI MEDOVINE.....	2
2.2. MEDNA SLADOVINA.....	4
2.3. MEDOVINA.....	7
2.3.1. Definicija i povijest medovine	7
2.3.2. Proizvodnja medovine.....	9
2.3.3. Proizvodni mikroorganizam	11
2.4. ŠARŽNI I POLUKONTINUIRANI POSTUPAK PROIZVODNJE	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Radni mikroorganizam	16
3.1.2. Kemikalije i sirovine.....	16
3.1.3. Sastav hranjivih podloga za čuvanje i održavanje radne kulture mikroorganizma i proizvodnju medovine	17
3.1.4. Oprema.....	18
3.1.4.1. <i>Bioreaktor s miješalom</i>	18
3.1.4.2. <i>Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)</i>	18
3.1.4.3. <i>Ostala oprema</i>	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Priprema čvrste i tekuće hranjive podloge za čuvanje i održavanje radne kulture mikroorganizma	20
3.2.2. Priprema podloge za proizvodnju medovine u tikvicama i bioreaktoru s miješalom.....	20
3.2.3. Održavanje i priprema inokuluma.....	21
3.2.4. Ispitivanje utjecaja različite početne količine dodanog kvašćevog ekstrakta na proizvodnju medovine u tikvicama.....	22

3.2.5. Proizvodnja medovine šaržnim i polukontinuiranim postupkom u bioreaktoru s miješalom.....	22
3.2.6. Analitičke metode.....	23
3.2.6.1. <i>Određivanje optičke gustoće</i>	23
3.2.6.2. <i>Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti</i>	23
3.2.7. Pokazatelji uspješnosti procesa	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. UTJECAJ KONCENTRACIJE KVAŠČEVOG EKSTRAKTA NA DINAMIKU ALKOHOLNE FERMENTACIJE MEDNE SLADOVINE	26
4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH TEHNIKA PROIZVODNJE MEDOVINE – ŠARŽNOG I POLUKONTINUIRANOG PROCESA NA POKAZATELJE USPJEŠNOSTI BIOPROCESA	31
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	39
7. PRILOZI	45
7.1. BAŽDARNI PRAVCI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA UPLC ANALIZOM	45

1. UVOD

Medovina, poznata i kao vino od meda, jedno je od prvih fermentiranih pića nastalo prije nekoliko tisuća godina (Queiroz i sur., 2024). Iako medovina nije popularna poput drugih alkoholnih pića zbog slabije dostupnosti i veće cijene glavne sirovine, odnosno meda, u zadnje vrijeme opet je postala popularna proizvodnja u manjim medicarskim obrtima te u kućnoj proizvodnji u nekim državama poput Amerike, Poljske i Češke (Pereira i sur., 2017; Starowicz i Granvogl, 2020).

Na uspješnu proizvodnju i karakteristike konačnog proizvoda utječu brojni parametri, a u svrhu optimizacije procesa fermentacije provode se istraživanja odabira meda pogodnog sastava, selekcije najboljeg kvasca, formuliranja sladovine i njenog obogaćivanja s hranjivim dodacima, optimiraju se parametri i uvjeti fermentacije te se razvijaju nove metode proizvodnje (Queiroz i sur., 2024). Tijek fermentacije, aktivnost kvasca i sastav gotove medovine, značajno ovise o sastavu meda te o uvjetima fermentacije. Med ne sadrži dovoljnu količinu minerala, faktora rasta te dušika što utječe na fermentacijsku aktivnost kvasca, trajanje same fermentacije i formiranje sporednih poželjnih, ali i nepoželjnih produkata (Pereira i sur., 2017). Do sada je provedeno nekoliko istraživanja utjecaja dodatka kvašćevog ekstrakta i amonijevog difosfata kao izvora dušika na tijek fermentacije i udio etanola u konačnom proizvodu te je uočeno postizanje boljih pokazatelja uspješnosti procesa i veći konačni udio etanola u odnosu na fermentacije u kojima nije dodavan izvor dušika (Pereira i sur., 2017; Starowicz i Granvogl, 2020). Iako se medovina i dalje proizvodi tradicionalnim putem u kućnoj proizvodnji, postoje istraživanja vezana uz razvoj industrijskih procesa s ciljem optimiziranja proizvodnje i smanjenja proizvodnih troškova (Queiroz i sur., 2024).

U preliminarnom dijelu ovog eksperimentalnog rada, ispitan je utjecaj dodatka dvije različite koncentracije kvašćevog ekstrakta (0 g/L, 0,5 g/L i 2 g/L) na tijek fermentacije, aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 i konačni udio etanola u medovini proizvedenoj iz sladovine od lipinog meda razrijeđenog s vodom u omjeru 1 : 8 (med : voda). Na temelju rezultata preliminarnog istraživanja, odabrana je optimalna koncentracija kvašćevog ekstrakta te je provedeno ispitivanje proizvodnje medovine u bioreaktoru s miješalom šaržnim i polukontinuiranim postupkom. Izuzimanim uzorcima određivana je optička gustoća spektrofotometrom u svrhu praćenja porasta biomase kvasca, a koncentracije supstrata i produkata u uzorcima određene su pomoću visoko učinkovite tekućinske kromatografije (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SIROVINE U PROIZVODNJI MEDOVINE

Glavne sirovine za proizvodnju medovine su med i voda. Med je visoko koncentrirana viskozna otopina šećera koju proizvode pčele sakupljanjem peludi i nektara biljaka (Bodor i sur., 2020). Sastav meda je vrlo varijabilan i ovisi o botaničkom i geografskom podrijetlu cvijeta odnosno biljaka i izvoru nektara te o sezonskim, godišnjim i klimatskim uvjetima područja. Također, na konačni sastav i senzorsku kvalitetu meda mogu utjecati i ljudski faktori rukovanja sa medom te uvjeti skladištenja (Bertoncelj i sur., 2007). Med se pretežno sastoji od ugljikohidrata, vode i drugih komponenata prisutnih u manjim količinama poput minerala, vitamina, proteina, lipida, enzima, organskih kiselina, aminokiselina, polifenola i flavonoida te drugih fitokemikalija (Finola i sur., 2007). Ugljikohidrati čine 95-99 % suhe tvari meda a najzastupljeniji su fruktoza, glukoza i saharoza, pri čemu njihovi udjeli utječu na slatkoću i teksturu meda (Bogdanov i sur., 2008). Voda je druga najvažnija komponenta meda a njen udio kreće se u rasponu od 15 do 20 %. Njen udio utječe na viskoznost meda te na stabilnost i sprječavanje fermentacije i kristalizacije meda tijekom pohrane (Olaitan i sur., 2007). Minerali u medu potječu iz tla i biljaka te su zastupljeni u vrlo malim koncentracijama u svjetlijem medu poput lipinog te u nešto većim koncentracijama u tamnijem medu poput kestenovog. Kalij čini oko 1/3 ukupnih minerala, a slijede ga drugi minerali poput kalcija, natrija, magnezija, fosfora i željeza (Bogdanov i sur., 2008). Od organskih kiselina u medu se mogu naći glukonska, pirogroždana, jabučna, limunska, jantarna i fumarna kiselina (Bogdanov i sur., 2008). Povećana koncentracija kiselina, odnosno snižena pH vrijednost meda, može biti indikator pojave neželjene fermentacije zbog prisutnosti osmotolerantnih divljih kvasaca prilagođenih na visoke koncentracije šećera (Finola i sur., 2007). Med sadrži mali udio vitamina, a najzastupljeniji je vitamin C prisutan u gotovo svim vrstama (Ciulu i sur., 2011). S druge strane, najzastupljeniji dušikovi spojevi su aminokiseline, peptidi, protein i derivati nukleinskih kiselina te su prisutni u vrlo malim koncentracijama. Aminokiselinski sastav jako ovisi o geografskom podrijetlu, a prolin je jedna od zastupljenijih aminokiselina (Alvarez.Suarez i sur., 2010). Od enzima se često pronalaze invertaza, diastaza, glukoza oksidaza i katalaza (Bogdanov i sur., 2008). Med sadrži i razne fenolne komponente poput flavonoida, fenolnih kiselina i derivata kiselina (Pereira i sur., 2017). Također, med može sadržavati i preko 300 hlapivih komponenata uključujući alkohole, aldehide, ketone, estere, hlapive kiseline, derivate benzena, furane i terpene (Castro-Vázquez i sur., 2009), a pojedini specifični spojevi karakteristični su za određene vrste monofloralnih medova.

Mikroorganizmi su također prisutni u medu, a potječu iz okoliša, tla, dijelova biljaka, peluda, gastrointestinalnog sustava pčela ili je njihova prisutnost posljedica kontaminacije od strane ljudi, životinja i opreme (Olatain i sur., 2007). Od mikroorganizama mogu se pronaći plijesni iz rodova *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Mucor*, zatim gram-pozitivne bakterijske vrste iz rodova *Bacillus*, *Streptococcus* i *Clostridium* te gram-negativne bakterijske vrste iz rodova *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* te *Eschericia coli*. Zbog nepovoljnih uvjeta u medu kao što su visoka koncentracija šećera, niska pH vrijednost i mali udio vode, plijesni i bakterije se pretežno ne razmnožavaju, ali mogu preživjeti, osobito sporulirajući rodovi bakterija koji mogu proizvesti toksine nakon unosa meda u probavni sustav potrošača (Káčaniová i sur., 2009). Naravno, u medu se mogu naći i divlji kvasci iz rodova *Saccharomyces*, *Debaryomyces* i *Hansenula*. Većina kvasca izolirana iz meda su osmotolerantni te preživljavaju uvjete visokih koncentracija šećera, visokog osmotskog tlaka i niskih pH vrijednosti (Al-Waili i sur., 2012), a mogu i biti uzročnici nepoželjne fermentacije meda.

Najčešća upotreba u prošlosti, a i danas je upotreba meda kao prirodnog zaslađivača. Nadalje, med je jedan od proizvoda koji se najviše upotrebljavao u prošlosti kao dio tradicionalne medicine zbog terapijskog potencijala u liječenju dišnih i probavnih bolesti, sposobnosti liječenja rana i raznih upala (Mulu i sur., 2004). Poznato je također da med, pa tako i proizvodi na bazi meda, poput medovine, imaju antioksidativno, antibakterijsko i protuupalno djelovanje zahvaljujući fenolima i flavonoidima (Almasaudi, 2021). Med, odnosno medovina se može koristiti i za proizvodnju mednog octa te medenog senfa (Pereira i sur., 2017).

Voda koja se koristi za pripremu slakovine te općenito u proizvodnji alkoholnih pića, mora zadovoljavati određene kriterije kvalitete poput bistroće, malih koncentracija klora, kontroliranog pH te odsutnosti bilo kakvih mikroorganizama (Simão i sur., 2023).

2.2. MEDNA SLADOVINA

Priprema medne sladovine sastoji se od razrjeđivanja meda sa vodom u omjeru koji ovisi o tome kakva medovina se želi dobiti na kraju procesa (Pereira i sur., 2017). Budući da med, a pogotovo razrijeđen sa vodom, ne sadrži dovoljne koncentracije nutrijenata za rast i aktivnost kvasca, mednoj sladovini potrebno je dodavati hranjive tvari i faktore rasta kako bi se osigurali optimalni uvjeti za fermentaciju. Tako npr. najčešće se kao izvor dušika dodaju soli poput diamonijevog fosfata te kvašćev i sladni ekstrakt ili pepton. Dodatak smjese aditiva i nutrijenata doprinosi smanjenju osjetljivosti kvasca na stresne uvjete okoline, skraćanju vremena trajanja fermentacije, povećanju prinosa etanola i poboljšanju karakteristika konačnog proizvoda (Pereira i sur., 2017). Također, moguće je koristiti komade voća, pulpe, voćne sokove, pelud i prirodne ekstrakte koji osim optimiziranja potrebe za nutrijentima, mogu poboljšati i okus konačnog proizvoda. Međutim njihov sastav je varijabilan isto kao i sastav meda pa nije pouzdano da će se svakom primjenom osigurati dovoljno nutrijenata za kvasac te da će nastali proizvod biti zadovoljavajućih, ujednačenih karakteristika (Gupta i Sharma, 2009), a mogu predstavljati i dodatni izvor kontaminacije. Za osiguravanje optimalnih uvjeta za proizvodni mikroorganizam, preporuča se dodatak komercijalnih smjesa nutrijenata dostupnih na tržištu koje uglavnom sadrže potrebne vitamine i minerale te najvažnije, izvore dušika. Smjese nutrijenata obično sadrže sastojke poput biotina, tiamina, magnezijevog klorida, piridoksina, kalcijevog pantotenata, limunske kiseline, kalijevog citrata, a od izvora dušika mogu se naći diamonijev fosfat, kvašćev ekstrakt, sladni ekstrakt i pepton (Rivaldi i sur., 2009, Iglesias i sur., 2014). Izvori dušika, odnosno sam dušik, najvažniji je nutrijent za učinkovitu proizvodnju medovine i njegov nedostatak u sladovini smatra se glavnim uzrokom zastoja ili usporene fermentacije (Mendes-Ferreira i sur., 2011). Dušik, uz fosfor, utječe direktno na rast kvasca, kvašćevu brzinu provođenja fermentacije te posljedično i na duljinu trajanja fermentacije (Pereira i sur., 2017). Manjak dušika i fosfora dovodi do produljenja fermentacije pri čemu može doći do autolize kvasca te izloženosti sladovine bakterijskoj kontaminaciji (Morales i sur., 2013). Koncentracija dušika utječe i na proizvodnju sporednih produkata fermentacije, poput H_2S , masnih kiselina, viših alkohola i estera, koji pozitivno ili negativno utječu na senzorska svojstva konačnog proizvoda (Mendes-Ferreira i sur., 2011).

Zbog negativnog utjecaja niskog pH na rast kvasca i nastanak komponenata arome, obavezan je dodatak kiselina i puferirajućih tvari u sladovinu za održavanje pH vrijednosti tijekom fermentacije u rasponu od 3,7 do 4,0 pH jedinica (Ramalhosa i sur., 2011). Korekcija pH vrijednosti sladovine provodi se i u svrhu povećanja puferskog kapaciteta te postizanja

ravnoteže između kiselosti i slatkoće konačnog proizvoda, dodatkom vinske, jabučne ili limunske kiseline (Pereira i sur., 2017; Simão i sur., 2023). Količina proizvedenih organskih kiselina i osjetljivost kvasca na pH vrijednost, ovise o soju upotrijebljenog kvasca i o dostupnosti nutrijenata. Proizvodnja i akumulacija organskih kiselina, kao što su octena kiselina i sukcinat, od strane kvasca tijekom fermentacije, ima značajan utjecaj na njenu dinamiku. Uz već prirodno nisku pH vrijednost meda, posljedično i medne sladovine, nastankom organskih kiselina i otapanjem nastalog CO₂ u fermentirajućoj sladovini dolazi do dodatnog smanjenja pH vrijednosti na vrijednost ispod 3,0 pH jedinice, što usporava bioproces (Sroka i Tuszyński, 2007). S druge strane niža pH vrijednost podloge je korisna jer inhibira rast nepoželjnih mikroorganizama, međutim isto tako može doći i do inhibicije rasta kvasca ako se pH vrijednost spusti na manje od 2,5 pH jedinica (Sroka i Tuszyński, 2007). Nadalje, smanjenje pH rezultira slabijom disocijacijom srednjelančanih masnih kiselina, odnosno njihovim povećanim udjelom u sladovini i u staničnoj membrani kvasca. Posljedica je smanjenje tolerancije kvasca na etanol, odnosno povećanje osjetljivosti membrane na alkohol te inhibicija rasta stanica (Ramalhosa i sur., 2011). Kao odgovor na stresne uvjete visokog osmotskog tlaka zbog visoke koncentracije šećera, kvasac sintetizira i glicerol koji djeluje kao anti-stresni faktor. Proizvodnja glicerola ovisi i o koncentraciji kratkolančanih organskih kiselina, ponajprije octene i mravlje kiseline te sukcinata (Hohman i sur., 2002). Također, dostupnost organskih kiselina značajno utječe na konverziju srednjelančanih masnih kiselina u njihove odgovarajuće etil estere koji imaju snažan doprinos aromi konačnog proizvoda (Mendes-Ferreira i sur., 2010). Budući da Hernández i sur. (2015) u svom istraživanju navode kako je od organskih kiselina sukcinat zabilježen u najvećim koncentracijama u svim uzorcima gotove medovine, kontroliranje koncentracije sukcinata mogao bi biti jedan od ključnih faktora za proizvodnju medovine.

Kako bi se spriječio rast nepoželjnih mikroorganizama, sladovina se može i sumporiti, poput mošta za proizvodnju vina, dodatkom kalijevog metabisulfita ili sumporovog dioksida (Simão i sur., 2023). Osim sumporenja, razvoj mikroorganizama se može spriječiti i pasterizacijom ili kuhanjem sladovine (Pereira i sur., 2017). Tradicionalni postupak pripreme sladovine podrazumijeva polagano kuhanje uz uklanjanje pjene s površine sladovine no danas je sve više zastupljen postupak pasterizacije zbog manjeg utroška energije (Czabaj i sur., 2017) koja može utjecati na konačan ishod bioprocasa. Zagrijavanjem dolazi do inaktivacije enzima iz meda, razgradnje vitamina te se lakše uklanja pelud i proteini koji uzrokuju zamućenje pa je na taj način olakšan proces bistrenja medovine. Zagrijavanjem se također sterilizira sladovina prije inokulacije kvasca, poboljšava se i stabilizira proces

fermentacije (Czabaj i sur., 2017), a konačni proizvod dulje zadržava senzorsku kvalitetu (Starowicz i Granvogl, 2020). Međutim, zagrijavanje dovodi i do pojave Maillardovih reakcija koje rezultiraju posmeđivanjem i nastankom nekih nepoželjnih spojeva uzročnika neugodne arome konačnog proizvoda poput furfurala i hidroksimetilfurfurala (HMF) koji su u višim koncentracijama ujedno i toksični za kvasac (Czabaj i sur., 2017), ali mogu nastati i spojevi koji doprinose aromi medovine (Starowicz i Granvogl, 2020). Ukbapi (2006) navodi kako je udio etanola u konačnom proizvodu za termički obrađenu sladovinu iznosio oko 15 % v/v dok je za termički neobrađenu iznosio oko 13 % v/v. Izostankom termičke obrade, medovina zadržava bioaktivna svojstva porijeklom iz meda, međutim fermentacija je dugotrajnija i zahtjevnija, postoji opasnost od razvoja nepoželjnih mikroorganizama, a proces bistrenja je otežan (Czabaj i sur., 2017).

Temperatura na kojoj se provodi fermentacija također je od ključne važnosti za pravilno odvijanje i nastanak kvalitetnog proizvoda. Temperaturni raspon za provođenje fermentacije kreće se između 22 i 25 °C (Simão i sur., 2023) dok je pri temperaturama višim od 25 °C te uz visoke koncentracije šećera i nutrijenata u podlozi, uočen pozitivan utjecaj na brzinu i kemijske i enzimске reakcije metabolizma kvasca te na potrošnju šećera, osobito fruktoze. Međutim, provođenjem fermentacije i čuvanjem gotovog proizvoda na visokim temperaturama, može nastati i HMF koji negativno utječe na aromu proizvoda (Czabaj i sur., 2017). S druge strane, provođenjem fermentacije pri nižim temperaturama postiže se ujednačenija dinamike bioprocesa, ali i efikasnija proizvodnja aromatskih spojeva (Šmorgovicová i sur., 2012). Temperatura utječe i na aktivnost kvasca pa je tako za *S. cerevisiae* optimalna temperatura fermentacije između 20 i 30 °C, dok temperature ispod 15 °C i iznad 30 °C smanjuju aktivnost kvasca i brzinu fermentacije (Gomes i sur., 2013).

2.3. MEDOVINA

2.3.1. Definicija i povijest medovine

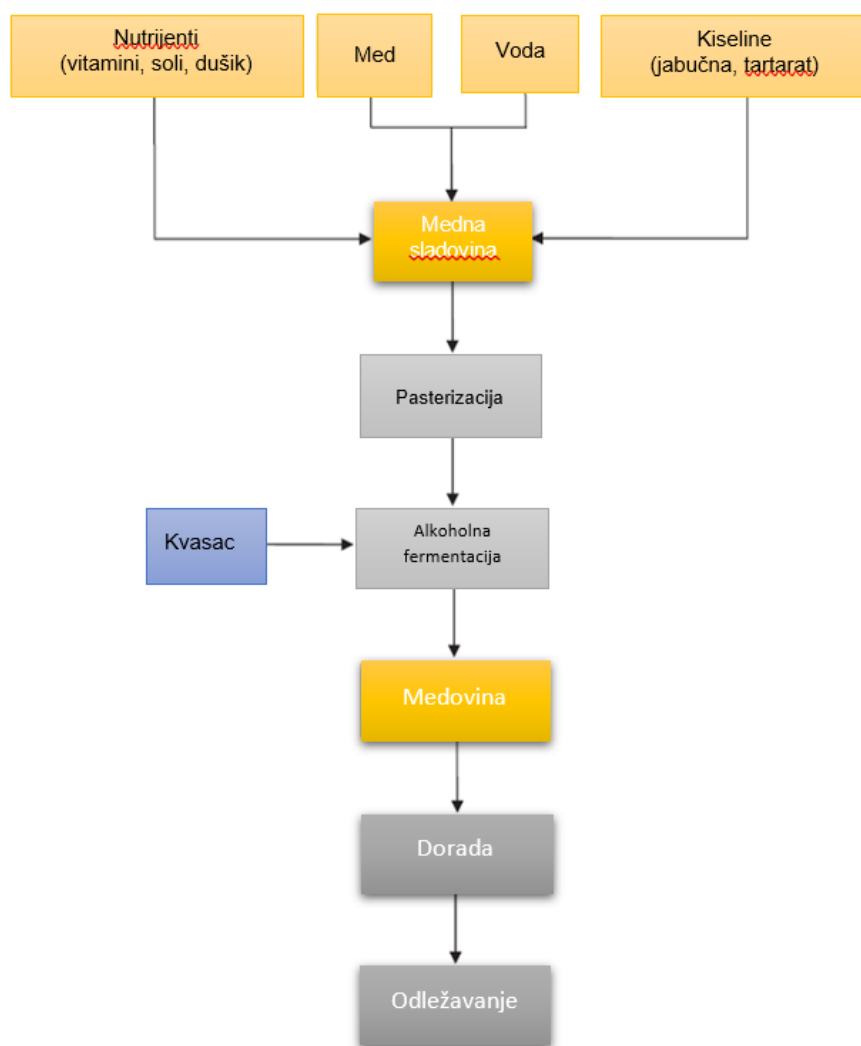
Medovina je tradicionalno alkoholno piće sa volumnim udjelom alkohola, odnosno etanola, od 4 do 14 % v/v, a nastaje fermentacijom sladovine dobivene miješanjem meda i vode s ili bez dodatka soli i drugih izvora nutrijenata (Queiroz i sur., 2024). Medovina je poznata kao jedno od najstarijih konzumiranih fermentiranih alkoholnih pića, starije od vina te je vjerojatno bila prekursor za proizvodnju piva (Pereira i sur., 2017). Pretpostavlja se da je prva medovina nastala tako što je kiša padala u otvoreni vrč sa medom nakon čega su divlji kvasci, prirodno prisutni u medu, proveli fermentaciju (Kime i sur., 1998). Medovina se proizvodi od drevnih vremena, a zabilježeni su dokazi o proizvodnji u Kini prije oko 9000 godina (Queiroz i sur., 2024) te u Poljskoj i Latviji. Ona je bila važna za rituale Kelta, Anglosaksonaca i Vikinga te se smatrala pićem plemića i bogova koje može pružiti znanje i besmrtnost (Gupta i Sharma, 2009). Također, vjeruje se da pojam "medeni mjesec" (engl. *honeymoon*) potječe od tradicije u kojoj su mladenci pili medovinu kroz mjesec dana nakon vjenčanja uz vjerovanje da će za devet mjeseci dobiti potomstvo. Međutim, selekcijom i pripitomljavanjem divlje vinove loze, medovina i pivo počinju gubiti na vrijednosti jer vino preuzima ulogu najviše cijenjenog alkoholnog pića. Ipak, u posljednje vrijeme medovina opet postaje zanimljiva te se proizvodi u zemljama istočne Europe poput Poljske, zatim u Engleskoj, Njemačkoj, Americi te u afričkim zemljama kao što su Etiopija i zemlje južne Afrike (Pereira i sur., 2017).

Postoji nekoliko klasifikacija medovine. Ovisno o omjeru meda i vode (1:0,5; 1:1, 1:2, 1:3, 1:4) za pripremu sladovine, može se dobiti slaba ili vodena medovina, popularno zvana *hydromel* te slatka medovina, na engleskom jeziku poznata kao *sack mead*. Također, ovisno o udjelu zaostalih reducirajućih šećera, medovina kao i vino može biti klasificirana kao suha, poluslatka i slatka (Morales i sur., 2013). Ako se tijekom ili nakon fermentacije u medovinu dodaju različite vrste voća, povrća, aromatičnih trava i začina, dobit će se tradicionalna medovina, a u slučaju proizvodnje takozvane obične ili jednostavne medovine (engl. *show mead*), dodatak malih količina nutrijenata i aditiva je dozvoljen, ali korištenje drugih dodataka poput voća i začina nije dopušteno. Za proizvodnju i tradicionalne i jednostavne medovine, može se koristiti med dobiven od jedne specifične vrste cvijeta, tj. monofloralni med, ili med dobiven od kombinacije cvjetova (McConnell i Schramm, 1995). Prema Udruženju američkih proizvođača medovine, postoji nekoliko vrsta medovine ovisno o lokalnim tradicijama i specifičnim receptima, a to su *pymment* (nastaje miješanjem vina i medovine nakon

fermentacije), *cyser* ili jabučno-medni cider (nastaje miješanjem soka od jabuke ili cidera sa medom), *melomel* (medovina uz dodatak jednog ili više voća), *metheglin* (medovina uz dodatak začina i/ili aromatičnih trava) te *rhodomel* (dodatak ružinih latica). Zanimljiv proizvod je još i *braggot*, vrsta piva nastala od smjese meda i slada, a destilacijom medovine može se dobiti i rakija od meda. Još jedna podjela medovine, koja je zastupljena u Poljskoj, temelji se na primjeni ili izostavljanju koraka kuhanja sladovine pa tako postoji *sycony* kod koje se sladovina kuha te *niesycony* kod koje je taj korak izostavljen (Starowicz i Granvogl, 2020).

2.3.2. Proizvodnja medovine

Iako je medovina tradicionalno alkoholno piće koje se proizvodi od davnih vremena, proizvodnja je i dalje pretežno tradicionalna i ne postoji značajnija industrijska proizvodnja (Pereira i sur., 2017). Koraci u proizvodnji medovine, koji obuhvaćaju pripremu sladovine, inokulaciju s kvascem, alkoholnu fermentaciju te doradu proizvoda, prikazani su na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz proizvodnje medovine (prema Pereira i sur., 2017)

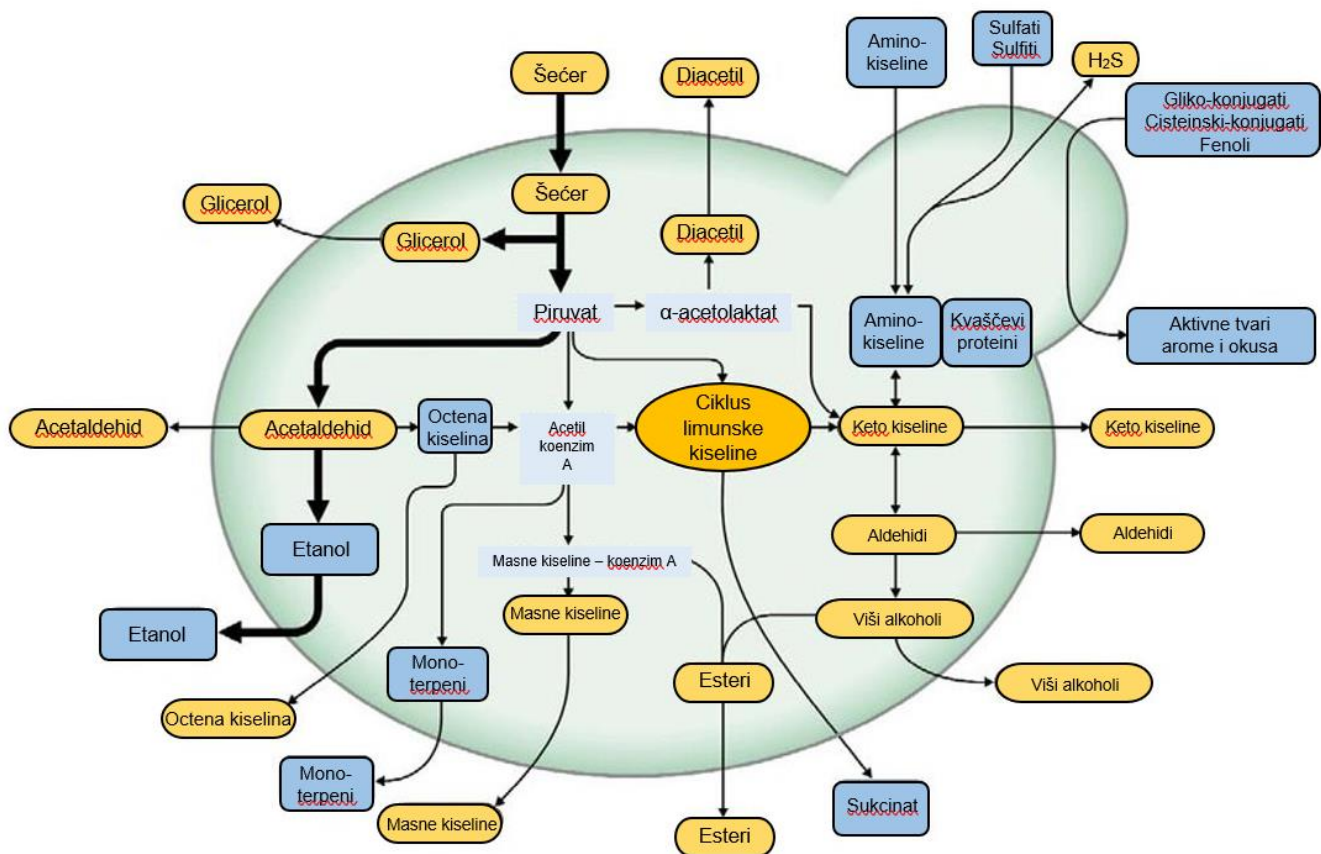
Alkoholna fermentacija je biokemijski proces u kojem kvasac konvertira šećere iz medne sladovine u etanol i ugljikov dioksid (CO₂) kao glavne produkte te u glicerol kao glavni nusprodukt, a najčešće korištena vrsta kvasca za fermentaciju je *Saccharomyces cerevisiae* (Mărgăoan i sur., 2020). Problemi koji se mogu javiti tijekom fermentacije su nepredviđeni zastoj i usporavanje fermentacije što rezultira nepostizanjem željene koncentracije etanola te nastankom različitih nepoželjnih spojeva, nusproizvoda metabolizma kvasca, koji narušavaju kvalitetu i okus konačnog proizvoda. Glavni problem u proizvodnji medovine je sporost procesa fermentacije koja može trajati od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci zbog visoke početne koncentracije šećera u medu odnosno mednoj sladovini. (Pereira i sur., 2017). Vrijeme trajanja fermentacije ovisi o raznim faktorima kao što su vrsta meda, vrsta upotrijebljenog kvasca i veličina inokuluma, fizikalno kemijske karakteristike sladovine poput pH vrijednosti, koncentracije šećera i nutrijenata, prvenstveno izvora dušika te uvjeti fermentacije, odnosno temperatura i način provođenja fermentacije (Pereira i sur., 2017; Queiroz i sur., 2024). Budući da je teško optimizirati sastav meda zbog utjecaja različitih faktora na njegov sastav, provode se istraživanja optimiziranja ostalih čimbenika koji utječu na vrijeme fermentacije s ciljem skraćivanja trajanja fermentacije.

Završetak fermentacije postignut je nakon što više nema promjene gustoće medovine, do koje dolazi zbog smanjenja koncentracije šećera i smanjenja viskoznosti medne sladovine, ili se postiže namjernim prekidanjem fermentacije u trenutku kada je postignuta željena alkoholna jakost ili kada se želi dobiti slatka medovina sa manjim postotkom alkohola, a većim udjelom zaostalih nefermentiranih šećera (Simão i sur., 2023). Nakon fermentacije slijede postupci bistrenja medovine najprije dekantiranjem tekućeg dijela iznad istaloženih stanica kvasca te zatim centrifugiranjem ili dodatkom sredstava za bistrenje poput bentonita, želatine ili kazeina pomoću kojih se iz medovine uklanjaju suspendirane čvrste čestice (Pereira i sur., 2017), a izbistrena medovina se zatim puni u staklene boce i pohranjuje na odležavanje. Odležavanje u bocama se mora odvijati u mraku i na niskim temperaturama, poželjno u frižideru pri 4 °C (Starowicz i Granvogl, 2020) kako bi se zadržala kemijska i senzorska svojstva proizvoda, ali i kako bi se osiguralo formiranje specifičnih spojeva arome koji nastaju upravo tijekom ovog procesa. Odležavanje može trajati od nekoliko mjeseci pa i do nekoliko godina te se može provesti i u posebnim drvenim bačvama ili uz dodatak komadića određenih vrsta drveća, što rezultira razvojem dodatnih specifičnih spojeva arome (Simão i sur., 2023).

2.3.3. Proizvodni mikroorganizam

Kvasci imaju bitnu ulogu u proizvodnji alkoholnih pića i značajno utječu na njihova senzorska svojstva. Njihovim djelovanjem nastaju brojni spojevi koji pridonose karakterističnoj aromi i okusu fermentiranih pića, a proizvodnja, vrsta i koncentracija tih spojeva, poželjnih i nepoželjnih, nastalih tijekom fermentacije, ovise o vrsti ili soju kvasca, stoga je važno znati njihove točne karakteristike i potencijal proizvodnje aromatskih spojeva (Lambrechts i Pretorius, 2000). Kvasci koji se koriste u proizvodnji medovine su uglavnom oni koji se koriste i za proizvodnju vina, piva i pjenušaca zbog specifičnih karakteristika koje posjeduju, a koje su važne za proizvodnju medovine, poput snažnog provođenja fermentacije, visoke tolerancije na etanol i visoke koncentracije šećera, tolerancije na temperaturne razlike, sposobnosti kompeticije sa prirodnom mikroflorom meda, sposobnosti taloženja na kraju fermentacije te naravno proizvodnje poželjnih spojeva arome (Pretorius, 2000). Zbog velike dostupnosti, dobre tolerancije na etanol i visoke koncentracije šećera te dobro poznatog metabolizma, kao glavni radni mikroorganizam u proizvodnji medovine koristi se komercijalno dostupni kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, a uz njega se ponekad koristi i vinski kvasac *Saccharomyces bayanus*. Danas se provode i istraživanja upotrebe ne-*Saccharomyces* kvasaca poput onih iz rodova *Torulaspora* i *Kluyveromyces* te korištenje kombinirane kulture *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasaca s ciljem postizanja boljeg profila aromatskih spojeva medovine (Lopes i sur., 2020).

Ovisno o dostupnosti kisika i koncentraciji šećera u okolini, kvasac posjeduje dva načina odvijanja metabolizma ugljikohidrata za dobivanje energije u obliku ATP-a: oksidativni i fermentativni. Oba puta započinju razgradnjom glukoze reakcijama glikolize, a kao rezultat nastaju 2 molekule piruvata i 2 ATP-a po molekuli glukoze. Piruvat se zatim može razgraditi ili oksidativnim ili fermentativnim putem. U aerobnim uvjetima, u prisutnosti kisika, odvija se oksidativni metabolizam i piruvat se prevodi u acetil koenzim-A koji se putem ciklusa limunske kiseline i kroz proces oksidativne fosforilacije, oksidira do CO₂ uz nastajanje energije u obliku ATP-a i GTP-a koju stanica koristi za sintezu staničnih sastojaka i metaboliziranje supstrata (Pfeiffer i Morley, 2014). S druge strane u anaerobnim uvjetima, u odsutnosti kisika, odvija se fermentativni metabolizam tijekom kojeg se piruvat preko acetaldehida prevodi u etanol, a jedina energija u obliku ATP-a je ona dobivena glikolizom.



Slika 2. Shematski prikaz glavnih metaboličkih puteva kvasca *S. cerevisiae* tijekom alkoholne fermentacije medovine (prema Pretorius, 2000)

Međutim, neki kvasci, poput *S. cerevisiae*, proizvode etanol čak i u aerobnim uvjetima u prisutnosti visokih koncentracija šećera tako da se istovremeno odvijaju i oksidativni i fermentativni metabolizam, a takva pojava naziva se *Crabtree* efekt. U ovom slučaju dolazi do istovremene oksidacije molekula piruvata do CO_2 te do prevođenja molekula piruvata u etanol. Etanol se akumulira u okolišu stanice do određene vrijednosti nakon čega koncentracija etanola postaje inhibirajuća za rast kvasca ili dok se ne potroše ugljikohidrati iz okoline nakon čega stanica može koristiti proizvedeni etanol za proizvodnju CO_2 i ATP-a iz acetil koenzima-A, iako se ovim putem dobiva puno manje energije nego uobičajenim oksidativnim metabolizmom (Pfeiffer i Morley, 2014).

Osim etanola, kvasac proizvodi i manje količine glicerola, viših alkohola, diacetila, acetoina, sukcinata, estera, masnih kiselina, octene kiseline, mliječne kiseline i acetaldehida koji imaju značajan utjecaj prvenstveno na aromatski profil i okus konačnog proizvoda

(Mărgăoan i sur., 2020), ali i na fizikalno kemijske karakteristike sladovine koje se onda odražavaju na sam metabolizam kvasca te na tijek i trajanje fermentacije.

Pokazalo se kako se trajanje fermentacije može smanjiti i povećanjem suspendiranih stanica kvasca u inokulumu, iako posljedica može biti smanjena proizvodnja poželjnih komponenata arome. Povećana koncentracija stanica minimizira efekt inhibicije stanica produktom te povećava rezistenciju stanica na stresne uvjete (Pereira i sur., 2013). Napredniji način povećanja broja stanica kvasca te ujedno i potencijalni novi način proizvodnje medovine je upotreba imobiliziranih stanica. Upotreba imobiliziranih stanica u fermentacijama i proizvodnji alkoholnih pića dobiva sve veću pozornost znanstvenika zbog brojnih prednosti u odnosu na upotrebu slobodnih stanica. Imobilizirane stanice moguće je reciklirati odnosno koristiti u više ciklusa fermentacija za redom što predstavlja uštedu vremena zbog izostanka faze pripreme inokuluma i regeneracije već korištenih stanica što rezultira boljom prilagodbom stanica na idući ciklus, boljom produktivnošću i većim prinosima proizvoda (Queiroz i sur., 2024). Upotrebom imobiliziranih stanica u šaržnim procesima, olakšano je izdvajanje biomase i bistrenje proizvoda. Primjenom u polukontinuiranim i kontinuiranim procesima sprječava se ispiranje stanica iz sustava, a proces pranja fermentora, cjevovoda i opreme je olakšan jer ne dolazi do prijanjanja stanica i stvaranja taloga na površinama (Queiroz i sur., 2024). Međutim, problem imobiliziranih stanica je ograničen prijenos mase, supstrata i produkata te prijenos kisika u pore matriksa u kojem su stanice imobilizirane, a također može doći i do pucanja strukture matriksa (Queirzo i sur., 2024). Nadalje, potrebno je utvrditi nakon koliko ciklusa reciklacije imobilizirane stanice gube svoju vijabilnost. Osim imobiliziranih stanica, mogu se reciklirati i slobodne suspendirane stanice uz regeneraciju. Reciklacija slobodnih stanica omogućuje praćenje i proučavanje promjena u metabolizmu, vijabilnosti i osjetljivosti na stresne uvjete sa svakim ciklusom fermentacije (Pereira i sur., 2013).

2.4. ŠARŽNI I POLUKONTINUIRANI POSTUPAK PROIZVODNJE

U biotehnologiji postoji nekoliko načina vođenja bioprocesa, a to su šaržni, šaržni s pritokom, polukontinuirani i kontinuirani način. Šaržni postupak odvija se u bioreaktoru na način da se sve potrebne sirovine i radni mikroorganizam uvedu u sustav na početku procesa, bez naknadnog dodavanja svježe podloge i nutrijenata te bez izdvajanja određenog dijela prevrele podloge tijekom odvijanja procesa. Trajanje procesa ograničava granični supstrat, koji je najčešće izvor dušika i/ili ugljika, jer se proces odvija u stalnom volumenu. (Cinar i sur., 2003). Tijekom šaržnog vođenja procesa, ali i vođenja procesa drugim načinima, u sustav se mogu uvoditi zrak, za aerobne procese, sredstva za regulaciju pH vrijednosti podloge (kiselina ili lužina) i sredstva za regulaciju razine pjene (protupjenila), a iz bioreaktora izlaze otpadni plinovi i hlapivi sastojci. Tijekom procesa, mikrobne stanice troše hranjive sastojke iz podloge te se njihova koncentracija smanjuje, dok se udio produkata metabolizma u podlozi s vremenom povećava, a stanice prolaze kroz sve faze rasta od *lag* faze do stacionarne faze ili faze umiranja. Mikrobni proces završava kada stanice potroše sve hranjive sastojke ili kada se proizvodi mikrobnog metabolizma nakupe u količini koja djeluje inhibirajuće na proizvodni mikroorganizam (Marić i Šantek, 2009). Nakon završenog procesa, cjelokupni sadržaj bioreaktora se ispušta i transportira u odjeljenje za izdvajanje proizvoda. Uzimajući u obzir samo vrijeme trajanja mikrobnog procesa, šaržnim načinom vođenja procesa ostvaruje se najveća produktivnost procesa. Međutim, uzme li se u obzir trajanje svih operacija koje prethode procesu (punjenje, sterilizacija i hlađenje bioreaktora) i koje slijede nakon procesa (pražnjenje i pranje bioreaktora), produktivnost procesa puno je manja jer ukupno gledano cijeli proces traje duže (Dimian i sur., 2014). Šaržni procesi pogodni su za proizvodnju manjih šarži odnosno serija često skupih proizvoda poput specifičnih kemikalija, lijekova, polimera, proteina i enzima, kozmetike te dodataka prehrani poput vitamina (Dimiani i sur., 2014).

Polukontinuirani način vođenja procesa se bazira na takozvanoj izmjeni volumena podloge u bioreaktoru. U određenim vremenskim intervalima, istovremeno se iz bioreaktora ispušta najčešće 1/3 korisnog volumena bioreaktora te se bioreaktor nadopunjava s 1/3 svježe hranjive podloge. Na ovaj način sprječava se inhibicija stanica visokom koncentracijom supstrata na početku bioprocesa, ali i visokom koncentracijom produkta koji se nakuplja u podlozi. Dodavanje svježe hranjive podloge na ovaj način izaziva razrjeđenje sadržaja bioreaktora pa se koncentracija stanica, supstrata i produkta smanjuje neposredno nakon dodatka podloge (Marić i Šantek, 2009). I u ovom slučaju, prevrela podloga izdvojena iz bioreaktora odvodi se na daljnju obradu. Budući da se stanice u trenutku dodatka svježe

podloge nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, brzina konverzije supstrata u produkt nastavlja se nesmanjenom brzinom, bez *lag* faze, što pridonosi povećanju produktivnosti procesa. Ako se izdvajanje prevrele i dodavanje svježe podloge odvija u kratkim vremenskim intervalima, polukontinuirani postupak se približava kontinuiranom (Marić i Šantek, 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

U svim eksperimentima prilikom izrade ovog diplomskog rada korišten je soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* oznake ZIM 3418 iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada. Radna kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je čuvana na odgovarajućoj čvrstoj podlozi u Petrijevoj zdjelici u hladnjaku na 4 °C.

3.1.2. Kemikalije i sirovine

Kemikalije i sirovine korištene za provedbu eksperimentalnog dijela navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija i sirovina

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
Agar	tehnički	Biolife, Italija
Cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
Etanol	96 %	GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
D(+) – Glukoza monohidrat	Za mikrobiološku upotrebu	Carl Roth GmbH, Njemačka
Kvašćev ekstrakt	Za laboratorijsku upotrebu	ThermoFischer Scientific, UK
Lipin med		Lokalni proizvođač, Vukovar
Natrijev hidroksid	> 99 %	Merck KgaA, Njemačka
Sladni ekstrakt	Za laboratorijsku upotrebu	Biolife, Italija
Sumporna kiselina	96 %	Merck KgaA, Njemačka
Tripton	Za upotrebu u biotehnologiji	Merck KgaA, Njemačka

3.1.3. Sastav hranjivih podloga za čuvanje i održavanje radne kulture mikroorganizma i proizvodnju medovine

Tijekom ovog istraživanja korištene su kemijski definirane hranjive podloge za čuvanje i održavanje radne kulture te za uzgoj inokuluma (tablica 2). Podloga za čuvanje bila je identična po sastavu podlozi za održavanje kulture osim što je u nju dodan i agar u koncentraciji od 15 g/L. Za ispitivanje utjecaja različite početne koncentracije dodanog kvašćevog ekstrakta na tijek proizvodnje medovine tijekom preliminarnog istraživanja u tikvicama, te za proizvodnju medovine u bioreктору, korištena je podloga na bazi lipinog meda i vode uz dodatak glukoze i kvašćevog ekstrakta čiji sastav je prikazan u tablici 3.

Podloge za proizvodnju medovine tijekom preliminarnog istraživanja u tikvicama, razlikovale su se prema koncentraciji dodanog kvašćevog ekstrakta (0, 0,5 i 2 g/L) s ciljem ispitivanja utjecaja njegove različite koncentracije na fermentacijsku aktivnost kvasca.

Podloge za proizvodnju medovine u bioreктору šaržnim i polukontinuiranim postupkom bile su jednakog sastava kao podloge za preliminarno istraživanje uz dodatak optimalne koncentracije kvašćevog ekstrakta (2 g/L).

Tablica 2. Kemijski sastav tekuće kemijski definirane hranjive podloge za održavanje radne kulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 i uzgoj inokuluma

Kemikalija	Masena koncentracija γ [g/L]
Glukoza	20
Sladni ekstrakt	20
Trypton	6

Tablica 3. Kemijski sastav podloge za proizvodnju medovine pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418

Kemikalija	Masena koncentracija γ [g/L]		
Glukoza	40		
Kvašćev ekstrakt	0	0,5	2
Lipin med	110		

3.1.4. Oprema

3.1.4.1. Bioreaktor s miješalom

Za proizvodnju medovine šaržnim i polukontinuiranim postupkom korišten je bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka). Bioreaktor je izgrađen od nehrđajućeg čelika s ukupnim volumenom od 42 L. Bioreaktor ima miješalo s tri turbine, a svaka turbina ima 6 ravnih lopatica. Snaga elektromotora za pokretanje miješala iznosi 0,9 kW. Bioreaktor je opremljen kontrolnom jedinicom sa sustavom za mjerenje i regulaciju temperature, pH vrijednosti podloge, protoka zraka, brzine rotacije miješala, razine pjene, parcijalnog tlaka kisika u podlozi, izlaznih plinova (O_2 i CO_2) i turbidimetrom. Na poklopcu bioreaktora nalaze se ulazni i izlazni membranski filteri za zrak te ulazi za inokulaciju i dodavanje različitih otopina (npr. za korekciju pH) pomoću ugrađenih peristaltičkih pumpi. Sterilizacija bioreaktora provodi se vodenom parom preko plašta.

3.1.4.2. Uređaj za visoko učinkovitu tekućinsku kromatografiju (UPLC)

Uređaj za visoko učinkovitu tekućinsku kromatografiju, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), korišten je za analizu dobivenih uzoraka tijekom provođenja eksperimenata, a sastoji se od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Viasampler), pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H^+ , Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim predkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μ L, a protok mobilne faze (0,0025 M H_2SO_4) 0,6 mL/min.

3.1.4.3. Ostala oprema

U tablici 4 prikazani su ostali uređaji korišteni za provođenje eksperimentalnog dijela rada zajedno s pripadajućim proizvođačem i točno navedenom upotrebom.

Tablica 4. Popis korištenih uređaja

Uređaj	Proizvođač	Namjena
Centrifuga thermoscientific SL 8R	Thermo Fischer Scientific, SAD	Centrifugiranje uzoraka nakon izuzimanja iz tikvica i bioreaktora
Centrifuga CF-10 visoke djelotvornosti	witeg Labortechnik GmbH, Njemačka	Centrifugiranje za pripremu uzoraka za UPLC
Tehnička vaga ET-1211	Tehtnica Slovenija	Vaganje sirovina i kemikalija
Analitička vaga ALC210.4	Acculab, SAD	Vaganje kemikalija
Tresilica Certomat RM	B. Braun Biotechn International, Sartorius group, Njemačka	Održavanje radne kulture, uzgoj inokuluma, preliminarni eksperiment u tikvicama
Magnetna miješalica VMS-C4-2	VWR, Avantor, Njemačka	Homogeniziranje podloge sa medom za proizvodnju medovine
Ph-metar HI1925	Hanna Instruments, SAD	Korekcija pH podloga u tikvicama
Zamrzivač	Gorenje, Slovenija	Pohrana uzoraka
Spektrofotometar Cary 100, UV-VIS	Agilent, Technologies, SAD	Određivanje optičke gustoće uzoraka
Termostat ST-50	Instrumentaria, Hrvatska	Inkubacija radne kulture u Petrijevim zdjelicama
Autoklav	Sutjeska, Jugoslavija	Sterilizacija podloga i opreme
Vorteks miješalica, LLG – unitexter 1	LLG – Labware, Njemačka	Homogeniziranje uzoraka

3.2. METODE

3.2.1. Priprema čvrste i tekuće hranjive podloge za čuvanje i održavanje radne kulture mikroorganizma

Čvrsta hranjiva podloga za čuvanje radne kulture pripremljena je prema sastavu definiranom u tablici 2. uz dodatak agara u koncentraciji 15 g/L.

Tekuća hranjiva podloga za održavanje radne kulture i uzgoj inokuluma sadržavala je sve komponente prikazane u tablici 2.

Nakon odvaga i otapanja sastojaka u demineraliziranoj vodi, provedeno je podešavanje pH vrijednosti podloga, pomoću razrijeđene sumporne (4,8 %-tne) kiseline pripremljene miješanjem 1 mL 96 %-tne sumporne kiseline s 19 mL demineralizirane vode, na način da pH vrijednost podloge bude u rasponu od 4,5 do 5,5 pH jedinica. Tikvice su zatim začepljene vatenim čepovima koji su dodatno omotani papirom te su stavljene na sterilizaciju u autoklavu tijekom 20 minuta pri 121 °C. Čvrsta hranjiva podloga je nakon sterilizacije izlivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da se ohladi.

3.2.2. Priprema podloge za proizvodnju medovine u tikvicama i bioreaktoru s miješalom

Podloga za proizvodnju medovine u preliminarnom eksperimentu u tikvicama pripremljena je u tri tikvice, prema sastavu definiranom u tablici 3, koje su se međusobno razlikovale prema koncentraciji kvašćevog ekstrakta (0 g/L, 0,5 g/L i 2 g/L). Tikvice su pripremljene na način da je 0,1 i 0,4 g kvašćevog ekstrakta otopljeno u 200 mL demineralizirane vode. U sve tri tikvice otopljeno je i 8 g glukoze u 200 mL demineralizirane vode. Tikvice su zatim začepljene vatenim čepovima omotanim papirom te su sterilizirane u autoklavu tijekom 20 minuta pri 121 °C. Nakon sterilizacije tikvice su ostavljene da se ohlade te je zatim u svaku dodan lipin med, neposredno prije provođenja eksperimenta. U tikvice sa medom stavljen je magnet te je sadržaj homogeniziran na magnetnoj miješalici.

Podloga za proizvodnju medovine u bioreaktoru pripremljena je iz nekoliko dijelova i za šaržni i za polukontinuirani postupak. Prvi dio podloge za oba postupka proizvodnje, volumena 6 L, pripremljen je u bioreaktoru otapanjem 12 g kvašćevog ekstrakta u 6 L demineralizirane vode. Dobivena podloga sterilizirana je *in situ* zajedno sa bioreaktorom

tijekom 20 minuta pri 121 °C i tlaku od 1 bara. Nakon sterilizacije podloga je ohlađena na temperaturu fermentacije od 28 °C. Drugi dio podloge volumena 1,4 L kod šaržnog postupka, pripremljen je u Erlenmeyerovoj tikvici na način da kada se sadržaj tikvice prepumpa u bioreaktor, podloga dobivena u bioreaktoru odgovara sastavu podloge definiranom u tablici 3. uz koncentraciju kvašćevog ekstrakta od 2 g/L i koncentraciju glukoze od 40 g/L. Drugi dio podloge kod polukontinuiranog postupka pripremljen je u tri tikvice te je volumen podloge u jednoj tikvici iznosio 1,4 L, a volumen u druge dvije tikvice namijenjene za dvije izmjene volumena, 2,4 L. Podloge u tikvicama za polukontinuirani postupak bile su takvog sastava, da kada se sadržaj sve tri tikvice prepumpa u bioreaktor, podloga u bioreaktoru odgovara sastavu definiranom u tablici 3 uz koncentraciju kvašćevog ekstrakta od 2 g/L i koncentraciju glukoze od 40 g/L. Tikvice su zatim začepljene vatenim čepovima omotanim papirom te su sterilizirane u autoklavu tijekom 20 minuta pri 121 °C. Nakon sterilizacije tikvice su ostavljene da se ohlade te je zatim u svaku dodan lipin med, neposredno prije provođenja eksperimenta. U tikvice sa medom stavljen je magnet te je sadržaj homogeniziran na magnetnoj miješalici.

3.2.3. Održavanje i priprema inokuluma

Kultura kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 s čvrste podloge na kojoj se čuvala do trenutka upotrebe, precijepljena je na nove čvrste hranjive podloge pripremljene na način opisan u poglavlju 3.2.1. Nacijepljene čvrste podloge ostavljene su u termostatu tijekom 24 h pri 28 °C. Narasla kultura potom je ezom prenesena u epruvetu s 9 mL sterilne demineralizirane vode. Resuspendirane stanice iz epruveti zatim su prebačene u tikvicu od 50 mL koja je sadržavala 30 mL tekuće hranjive podloge pripremljene na način opisan u poglavlju 3.2.1. Tikvica je ostavljena na tresilici tijekom 24 h pri 28 °C uz broj okretaja od 150 o/min. Radna kultura održavana je na način da je 30 mL podloge za održavanje radne kulture opisana u poglavlju 3.2.1. inokulirano s 2 mL prethodno uzgojene kulture kvasca iz drugih tikvica. Inokulacija novih tikvica za održavanje rađena je svaka 3-4 dana. Sve tikvice također su se cijelo vrijeme čuvale na tresilici pri 28 °C uz broj okretaja 150 o/min.

Uzgoj inokuluma za proizvodnju medovine u tikvicama proveden je tako da je ukupan sadržaj jedne od tikvica za održavanje radne kulture, volumena 30 mL, prebačen u novu Erlenmeyerovu tikvicu koja je sadržavala 100 mL tekuće hranjive podloge pripremljene na način opisan u poglavlju 3.2.1. Uzgoj inokuluma za proizvodnju medovine u bioreaktoru s miješalom proveden je tako da je ukupan sadržaji 3 tikvice za održavanje radne kulture, volumena 30 mL, korišten za inokulaciju 3 nove Erlenmeyer tikvice sa po 200 mL tekuće

hranjive podloge opisane u poglavlju 3.2.1. Nakon inokulacije tikvice su ponovno ostavljene na tresilici tijekom 24 h pri 28 °C uz broj okretaja tresilice od 150 o/min.

3.2.4. Ispitivanje utjecaja različite početne količine dodanog kvašćevog ekstrakta na proizvodnju medovine u tikvicama

U tri tikvice koje su sadržavale 200 mL podloge, pripremljene na način opisan u poglavlju 3.2.2., otopljeno je 22 g lipinog meda miješanjem na magnetnoj miješalici, pri čemu je prije inokulacije izuzet uzorak slijepe probe. Nakon inokulacije s 20 mL prethodno uzgojenog inokuluma (10 % v/v) tikvice su stavljene na tresilicu (150 o/min) pri 28 °C. Tijekom prvih 10 sati uzgoja, uzorci od 5 mL izuzimani su iz sve tri tikvice u pravilnim vremenskim intervalima svakih sat vremena. Ostatak vremena uzorci su izuzimani svaka 4 sata. Svim uzorcima je odmah određena vrijednost optičke gustoće pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 600 nm. Uzorci su potom centrifugirani te su supernatanti dekantirani i stavljeni u zamrzivač na čuvanje. Ovi uzorci služili su za određivanje promjena koncentracija svih supstrata i produkata koji su nastali tijekom ovog dijela eksperimentalnog istraživanja pomoću visoko učinkovite tekućinske kromatografije. Na temelju rezultata preliminarnog istraživanja, određena je početna količina kvašćevog ekstrakta za daljnje istraživanje, a u smislu osiguravanja dovoljne količine izvora dušika za nesmetano odvijanje postupka proizvodnja medovine.

3.2.5. Proizvodnja medovine šaržnim i polukontinuiranim postupkom u bioreaktoru s miješalom

Nakon što je određena optimalna koncentracija kvašćevog ekstrakta za proizvodnju medovine, ispitana je mogućnosti proizvodnje medovine u bioreaktoru s miješalom šaržnim i polukontinuiranim postupkom. Ukupni početni volumen podloge u bioreaktoru za šaržnu proizvodnju iznosio je 8 L. Bioreaktor je zajedno sa 6 L podloge steriliziran tijekom 20 minuta pri 121 °C i tlaku od 1 bara, a ostali volumen podloge od 1,4 L, nakon njegove zasebne sterilizacije u autoklavu i nakon dodatka lipinog meda, aseptično je prebačen pomoću lijevka u bioreaktor te je nakon kraćeg vremena iz homogenizirane podloge izuzet uzorak slijepe probe. Podloga u bioreaktoru je potom inokulirana prepumpavanjem 0,6 L inokuluma (7,5 % v/v), pomoću peristaltičke pumpe, uzgojenog na način opisan u poglavlju 3.2.3. Šaržni postupak ukupno je trajao oko 64 sata. Tijekom trajanja fermentacije uzorci su izuzimani u pravilnim vremenskim intervalima, prvih 6 sati uzgoja svakih sat vremena, a nakon toga svaka 4 sata uz prekonoćne prekide od 12 sati. Nakon izuzimanja, uzorci su analizirani na isti način

kao i kod eksperimenata u tikvicama, na način opisan u poglavlju 3.2.4. Kod polukontinuiranog uzgoja početni volumen podloge u bioreaktoru također je iznosio 8 L uz volumen nacijepljenog inokuluma od 0,6 L (7,5 % v/v). Priprema podloga je opisana u poglavlju 3.2.2., a početak bioprocasa identičan je kao i kod šaržnog postupka, a ukupno vrijeme trajanja fermentacije bilo je oko 70 sati. Nakon otprilike 24 h, provedena je prva izmjena 1/3 volumena podloge u bioreaktoru ispuštanjem 2,4 L iskorištene podloge i nadomještanjem istog volumena svježom podlogom. Ovaj postupak je ponovljen i nakon otprilike 48 h tako da su tijekom ovog dijela istraživanja ukupno provedene dvije izmjene hranjive podloge. Tijekom oba uzgoja, tijekom prva tri sata, podloga u bioreaktoru je aerirana sterilnim zrakom pri protoku od 5 L/min. Broj okretaja miješala bio je inicijalno podešen na 400 o/min, dok je ostatak vremena broj okretaja miješala smanjen (100 o/min) kako bi se spriječio negativan utjecaj površinske aeracije na tijek odvijanja proizvodnje medovine. Oba uzgoja vođena su na temperaturi od 28 °C. Bioreaktorski sustav opremljen je automatiziranim sustavom za regulaciju pH podloge koja je održavana na vrijednosti od 5 pH jedinica uz pomoć prethodno pripremljenih otopina 2 M NaOH i 2 M H₂SO₄

3.2.6. Analitičke metode

3.2.6.1. *Određivanje optičke gustoće*

Tijekom preliminarnog eksperimenta u tikvicama te šaržne i polukontinuirane proizvodnje u bioreaktoru, svi izuzimani uzorci homogenizirani su na vrtložnoj miješalici te je dio prebačen u kvarcnu kivetu koja se zatim stavlja u spektrofotometar gdje se uzorcima mjeri optička gustoća pri 600 nm.

3.2.6.2. *Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti*

Nakon odmrzavanja supernatant svakog pojedinog uzorka je homogeniziran te je 750 µL supernatanta pomješano sa 750 µL 10%-tne otopine ZnSO₄ u Eppendorf kiveti ukupnog volumena 2 mL. Sadržaj kivete potom je homogeniziran na vrtložnoj miješalici, te ostavljen u mirovanju tijekom 10 minuta da bi se osiguralo taloženje svih prisutnih proteina i nečistoća u uzorku. Nakon tog vremena provedeno je dodatno centrifugiranje uzoraka u trajanju od 5 minuta pri brzini 10 000 o/min nakon čega su pripremljena željena razrjeđenja uzoraka na način prikazan u tablici 5. Uzorci izuzeti iz tikvica ukupno su bili razrijeđeni 80, 50 ili 20 puta. Uzorci iz šaržnog postupka ukupno su bili razrijeđeni 75 i 25 puta, a uzorci iz polukontinuirane

proizvodnje 50 i 25 puta. Volumen supernatanta u tablici 5 odnosi se na uzorak nakon centrifugiranja.

Tablica 5. Priprema razrjeđenja uzoraka za UPLC analizu

Vrijednost razrjeđenja	V supernatanta (μL)	V demineralizirane vode (μL)
20	200	1800
25	120	1380
50	60	1440
75	40	1460
80	50	1950

Svi uzorci pripremljeni na prethodno opisan način zatim su profiltrirani kroz filter veličine pora 0,2 μm direktno u staklene vijale koje su korištene za UPLC analizu. Protok mobilne faze kroz kolonu Rezex ROA-Organic Acid H+ Phenomenex tijekom analize uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti je iznosio 0,6 mL/min. Temperatura u koloni iznosila je 30 °C, a volumen injektiranog uzorka 10 μL. Za obradu rezultata dobivenih kromatografskom analizom je korišten računalni program „OpenLAB CDS“. Svaki sastojak u uzorku je detektiran usporedbom retencijskih vremena uzorka i standarda, a iz jednadžbe pravca baždarnih dijagrama je izračunata koncentracija pojedinog sastojka.

3.2.7. Pokazatelji uspješnosti procesa

Kao pokazatelji uspješnosti procesa proizvodnje medovine, tijekom ovog istraživanja, određeni su ukupna potrošnja supstrata, prinos produkata, koeficijent konverzije supstrata u produkt te produktivnost procesa.

$$\Delta S = S_0 - S \text{ [g/L]} \quad [1]$$

$$Y_P = P - P_0 \text{ [g/L]} \quad [2]$$

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

$$Pr = \frac{Y_{EtOH}}{t_u} \text{ [g/Lh]} \quad [4]$$

gdje je:

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

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

ΔS - ukupna potrošnja supstrata [g/L],

Y_P - ukupni prinos produkta [g/L],

$Y_{P/S}$ - koeficijent konverzije supstrata u produkt [g/g],

Pr – produktivnost [g/Lh],

t_u – ukupno vrijeme trajanja procesa [h]

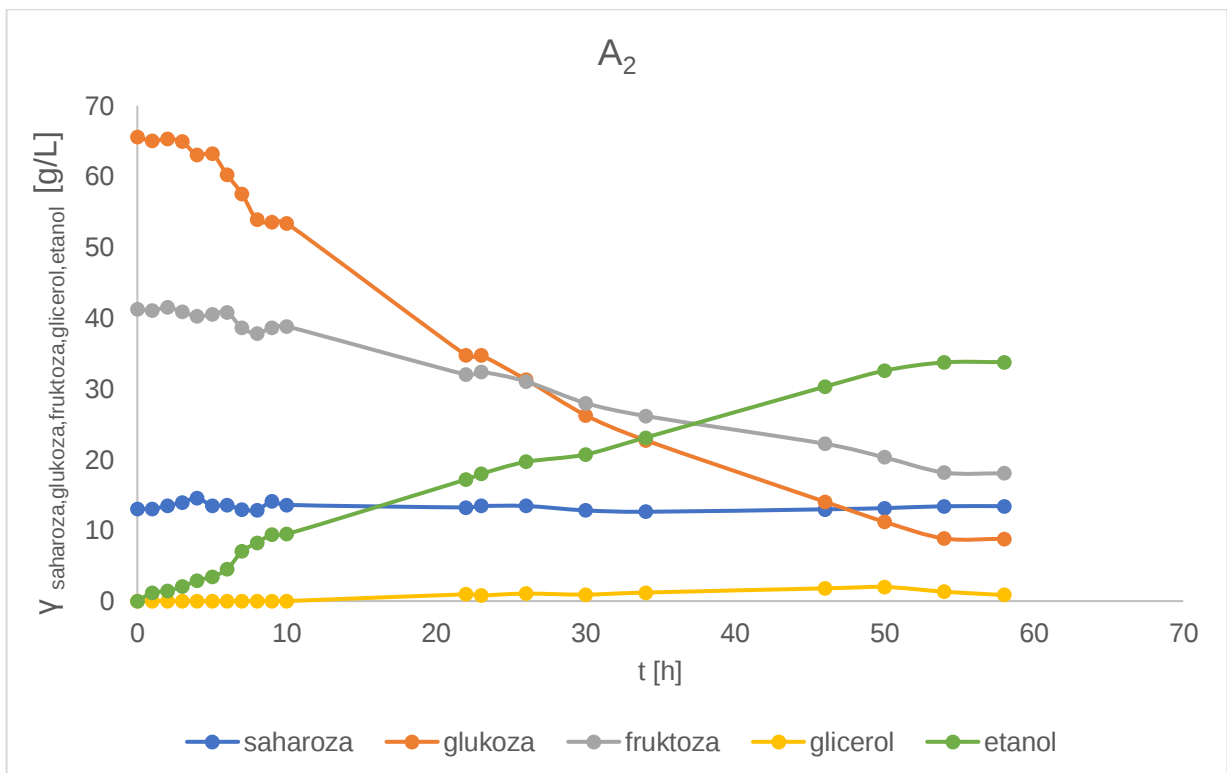
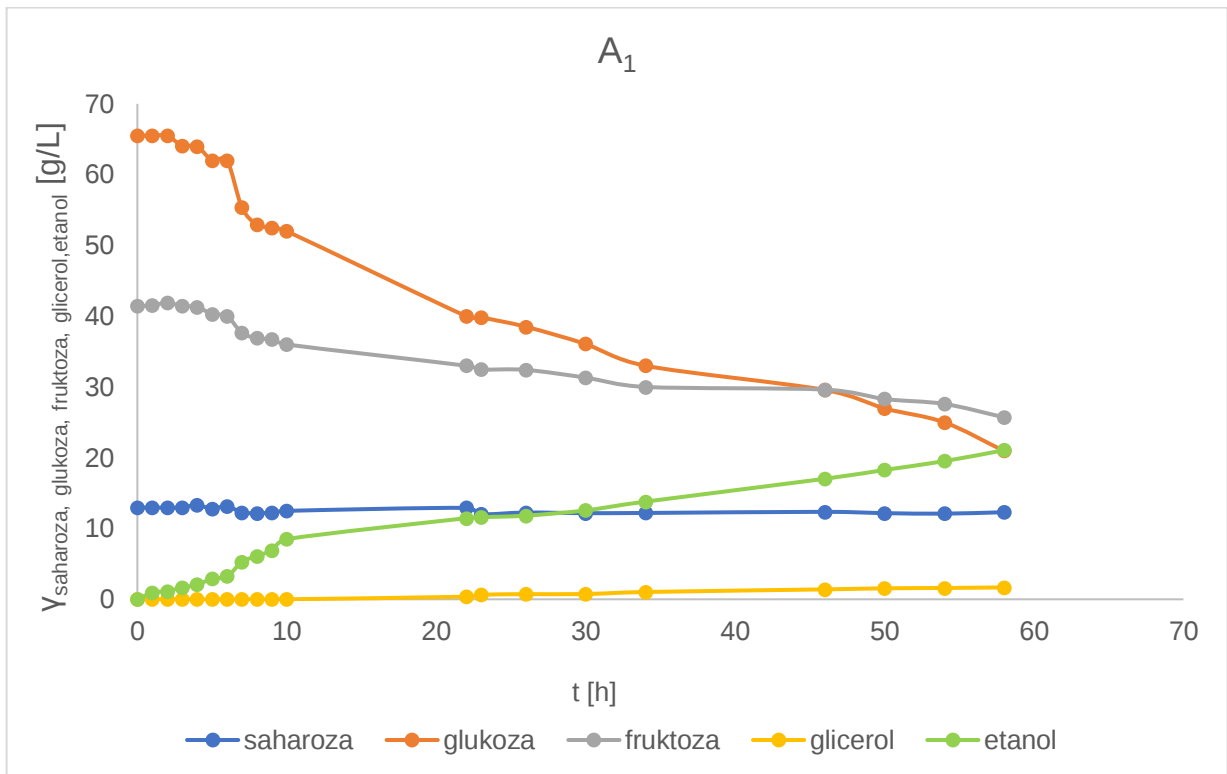
4. REZULTATI I RASPRAVA

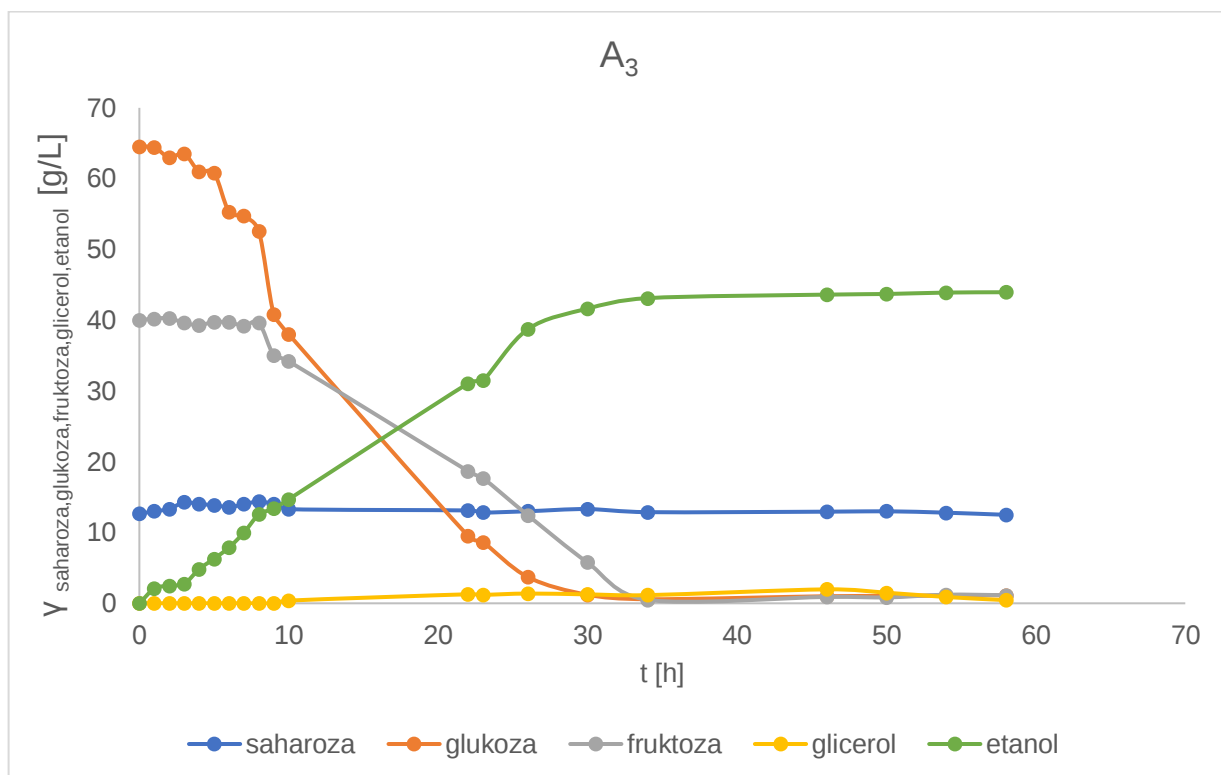
U ovom poglavlju prikazani su rezultati preliminarnog istraživanja proizvodnje medovine iz medne sladovine od lipinog meda pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 3418 u tikvicama na tresilici uz dodatak glukoze i različite početne koncentracije kvašćevog ekstrakta s ciljem ispitivanja njegovog utjecaja na dinamiku fermentacije, potrošnju šećera i proizvodnju etanola. Također, prikazani su i rezultati proizvodnje medovine u bioreaktoru s miješalom šaržnim i polukontinuiranim postupkom s ciljem usporedbe dva načina proizvodnje medovine i njihovog utjecaja na pokazatelje uspješnosti bioprocesa.

4.1. UTJECAJ KONCENTRACIJE KVAŠĆEVOG EKSTRAKTA NA DINAMIKU ALKOHOLNE FERMENTACIJE MEDNE SLADOVINE

Proizvodnja medovine iz medne sladovine od lipinog meda uz pomoć kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 provedena je u mikroaerofilnim uvjetima u Erlenmeyerovim tikvicama u termostatiranoj sobi na tresilici pri temperaturi od 26 °C i broju okretaja tresilice od 150 o/min. Ispitan je utjecaj dodatka kvašćevog ekstrakta u koncentraciji 0,5 g/L i 2 g/L na dinamiku fermentacije, potrošnju šećera i proizvodnju etanola. Tijekom uzgoja praćena je promjena optičke gustoće (OD) pri 600 nm kao indirektni pokazatelj rasta kvašćeve biomase u podlozi. Također, tijekom uzgoja praćena je promjena koncentracije svih šećera i nastalih produkata korištenjem UPLC.

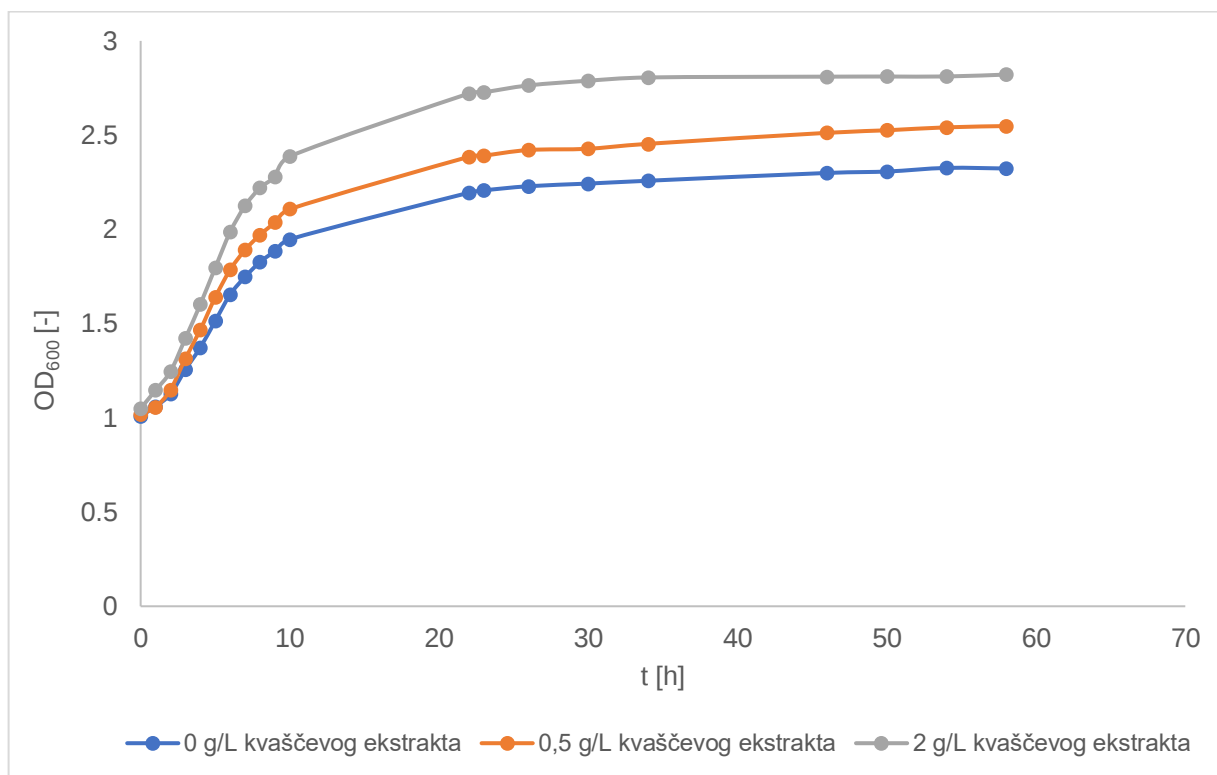
Rezultati utjecaja koncentracije kvašćevog ekstrakta na proizvodnju medovine iz sladovine od lipinog meda pomoću kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 u tikvicama prikazani su na slici 3. Na slici A1 prikazani su rezultati dobiveni u mednoj sladovini bez dodatka kvašćevog ekstrakta dok su na slikama A2 i A3 prikazani rezultati postignuti uz dodatak 0,5 g/L (A2) i 2 g/L (A3) kvašćevog ekstrakta.





Slika 3. Promjena koncentracije supstrata i produkata u vremenu tijekom proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog meda uz pomoć kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 u tikvicama: Medna sladovina bez dodatka kvašćevog ekstrakta (A1); Medna sladovina uz dodatak 0,5 g/L (A2) i 2 g/L (A3) kvašćevog ekstrakta

Iz prikazanih grafova vidljivo je da već s dodatkom male količine kvašćevog ekstrakta dolazi do promjene dinamike odvijanja bioprocesa. Također, na temelju prikaza promjene optičke gustoće (slika 4), vidljivo je da je u sva tri eksperimenta početna količina dodane biomase bila približno ista. Međutim na slici 4 moguće je primijetiti kako je najbrži rast stanica, odnosno izražena promjena vrijednosti optičke gustoće postignuta do dvadesetog sata uzgoja u sva tri slučaja, nakon čega se njezina vrijednost nije značajnije mijenjala. Također vidljiva je pozitivna korelacija između količine dodanog kvašćevog ekstrakta i maksimalne vrijednosti optičke gustoće na kraju fermentacije što ide u prilog činjenici da je dodatkom kvašćevog ekstrakta osigurana dovoljna količina faktora rasta i nutrijenata koji podupiru njegovu aktivnost, a ovakav rezultat je i u skladu sa brojnim istraživanjima, poput onog kojeg su proveli Mendes-Ferreira i sur. (2010) te Pereira i sur. (2015), koja potvrđuju činjenicu da je za rast kvašćeve biomase u mednoj sladovini neophodan dodatak nutrijenata.



Slika 4. Promjena OD_{600} vrijednosti u vremenu tijekom proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog meda uz pomoć kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 u tikvicama s različitim početnom količinom dodanog kvašćevog ekstrakta

Što se tiče dinamike potrošnje supstrata, na slici 3 može se vidjeti da je jedina relevantna promjena koncentracija supstrata vidljiva u slučaju potrošnje glukoze i fruktoze. Promjena koncentracije saharoze nije uočena tijekom ovog dijela istraživanja. Ovaj soj kvasca može paralelno trošiti i glukozu i fruktozu, što znači da nema izraženu represiju izvorom ugljika, pri čemu je brzina potrošnje u pozitivnoj korelaciji s količinom dodanog kvašćevog ekstrakta. Ovaj rezultat je također u skladu s već spomenutim istraživanjem Pereira i sur. (2015) u kojem se navodi kako se dodatkom izvora dušika povećava brzina fermentacije i potrošnje šećera te se skraćuje ukupno vrijeme bioprocesa. U slučaju kada kvašćev ekstrakt nije dodan u podlogu zabilježena je značajnija količina supstrata zaostalog u podlozi dok je u slučaju kada je u podlogu dodan kvašćev ekstrakt u količini od 0,5 te 2 g/L, supstrat gotovo u potpunosti potrošen nakon 55 odnosno 32 sata ($\Delta S = 102,76$ g/L).

Nadalje, uočava se i pozitivan utjecaj dodane početne količine izvora dušika na količinu proizvedenog etanola kao glavnog produkta fermentacije. Rezultati ovog dijela istraživanja u skladu su s ishodima eksperimenata drugih istraživanja (Li i sur., 2017) gdje je također uočen pozitivan utjecaj izvora dušika na dinamiku fermentacije i količinu proizvedenog etanola. Najviša koncentracija etanola zabilježena je u trećem eksperimentu te

je tu uočena i najviša brzina proizvodnje etanola. Koncentracija etanola u podlozi od 40 g/L zabilježena je već nakon 35 sati fermentacije te se ova vrijednost nije mijenjala do kraja uzgoja.

Što se tiče glicerola, on ima ulogu osmoprotektanta u slučaju kada stanice proizvode značajniju količinu alkohola. Također, poznata je i činjenica da u anaerobnim uvjetima stanice kvasca proizvodnjom glicerola osiguravaju adekvatnu reoksidaciju NADH koja je posljedica proizvodnje raznih spojeva tijekom fermentacije. Dodatkom izvora dušika koji u svom sastavu sadrži aminokiseline, kao što je kvašćev ekstrakt, značajno se smanjuje količina nakupljenog NADH u stanici što za posljedicu ima puno manje nakupljanje glicerola u podlozi. Također, zabilježeno je i kraće vrijeme trajanja fermentacije i veća količina proizvedenog etanola (Yue i sur., 2012) što je i slučaj u zadnjem eksperimentu gdje je ostvaren najveći prinos etanola i najmanji prinos glicerola (0,4416 g/L).

Tablica 6. Pokazatelji uspješnosti procesa proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog meda uz pomoć kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 u tikvicama kod tri različite početne koncentracije kvašćevog ekstrakta: Medna sladovina bez dodatka kvašćevog ekstrakta (A1); Medna sladovina uz dodatak 0,5 g/L (A2) i 2 g/L (A3) kvašćevog ekstrakta

	ΔS fermentabilni šećeri [g/L]	Y_{etanol} [g/L]	φ_{etanol} (% v/v)	Y_{glicerol} [g/L]	$Y_{\text{etanol/fermentabilni šećeri}}$ [g/g]	Pr [g/Lh]
A ₁	60,36	21,07	2,67	1,68	0,3491	0,3632
A ₂	79,93	33,76	4,28	0,8567	0,4224	0,5821
A ₃	102,76	43,95	5,57	0,4416	0,4277	0,7578

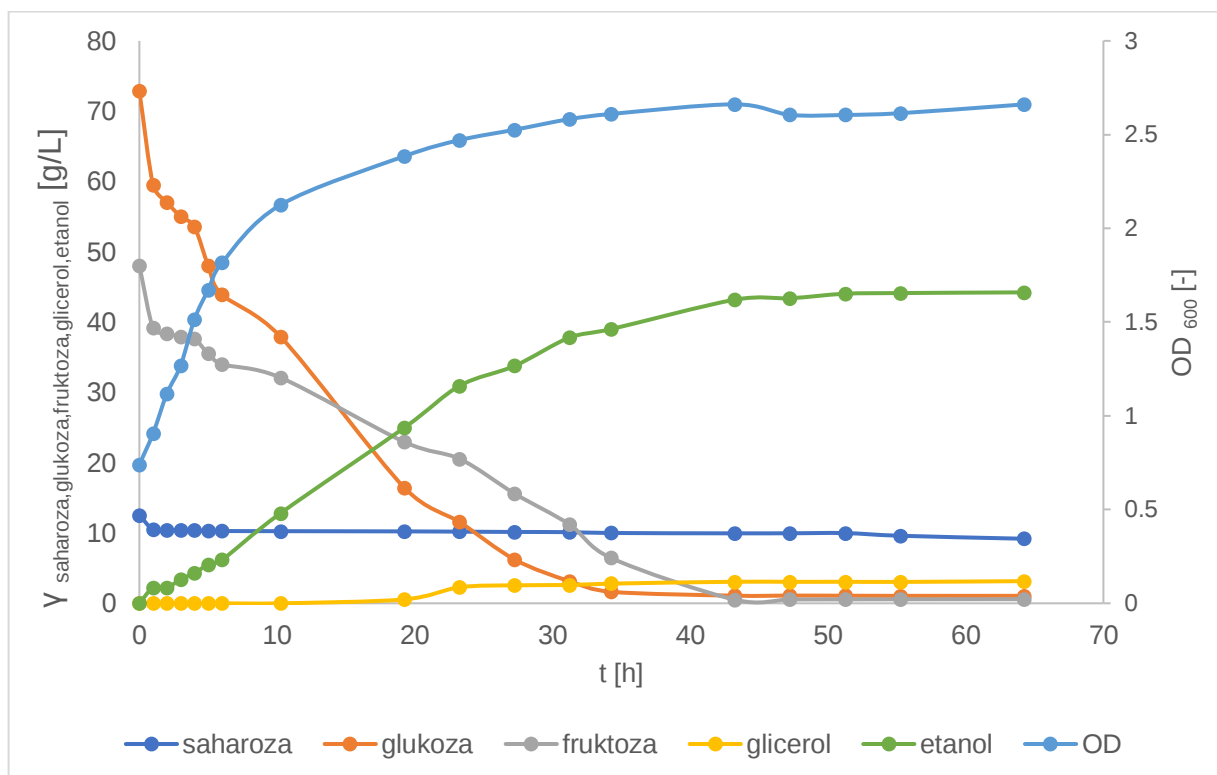
U konačnici u tikvici s najvećom količinom dodanog kvašćevog ekstrakta dobiven je prinos etanola od 43,95 g/L odnosno 5,57 % v/v. Prinos etanola u tikvici s 0,5 g/L kvašćevog ekstrakta nakon 58 sati iznosio je 33,76 g/L odnosno 4,28 % v/v, a u eksperimentu bez dodatka izvora dušika, prinos etanola nakon 58 sati iznosio je 21,07 g/L odnosno 2,67 % v/v. Također, u ovom preliminarnom dijelu istraživanja uočen je pozitivan utjecaj količine dodanog izvora dušika na koeficijent konverzije supstrata u etanol kao i na produktivnost bioprocesa (tablica 6.)

4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH TEHNIKA PROIZVODNJE MEDOVINE – ŠARŽNOG I POLUKONTINUIRANOG PROCESA NA POKAZATELJE USPJEŠNOSTI BIOPROCESA

Na temelju rezultata provedenog preliminarnog istraživanja proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog meda uz pomoć kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 u tikvicama s različitim početnim koncentracijama kvašćevog ekstrakta (0 g/L, 0,5 g/L i 2 g/L), odlučeno je da će se proizvodnja medovine u bioreaktoru provesti iz sladovine od lipinog meda uz dodatak 2 g/L kvašćevog ekstrakta. Eksperimenti u bioreaktoru s miješalom provedeni su korištenjem šaržne i polukontinuirane tehnike proizvodnje, sa svrhom usporedbe utjecaja odabrane tehnike na dinamiku fermentacije, potrošnju šećera i konačni prinos etanola. Oba načina proizvodnje provedena su u bioreaktoru s miješalom na način opisan u poglavlju 3.2.5. u kontroliranim uvjetima temperature (28 °C) i pH (5,00 pH jedinica) te početnu aeraciju u trajanju od 3 sata (protok zraka 5 L/min, broj okretaja miješala 400 o/min). Nakon tri sata dotok zraka u podlogu je prekinut te je brzina okretaja miješala podešena na brzinu od 100 o/min zbog sprječavanja mogućnosti površinske aeracije. U početnom dijelu eksperimenata uzroci su izuzimani svakih sat vremena, a nakon toga u intervalima od 4 sata uz stanke tijekom noći. Svi izuzeti uzorci analizirani su na isti način kao i uzorci iz preliminarnog istraživanja.

Rezultati proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog meda s 2 g/L kvašćevog ekstrakta pomoću kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 šaržnim postupkom u bioreaktoru s miješalom prikazani su na slici 5.

Rezultati proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog meda s 2 g/L kvašćevog ekstrakta pomoću kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 polukontinuiranim postupkom u bioreaktoru s miješalom prikazani su na slici 6.



Slika 5. Promjena koncentracije supstrata, produkata i OD₆₀₀ vrijednosti u vremenu tijekom proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog meda uz dodatak 2 g/L kvašćevog ekstrakta uz pomoć kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 šaržnim postupkom u bioreaktoru s miješalom

Rezultati proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog meda šaržnim postupkom u bioreaktoru s miješalom najslikličiji su rezultatima ostvarenim u uvjetima kakvi su bili u preliminarnom dijelu istraživanja u tikvicama gdje je početna količina dodanog kvašćevog ekstrakta iznosila 2 g/L. Rezultati dobiveni u bioreaktoru s miješalom prikazani su na slici 5. Ono što je potrebno naglasiti jest činjenica da je ova kultura kvasca pokazala vrlo brzu adaptaciju na hranjivu podlogu u bioreaktoru unatoč visokoj inicijalnoj koncentraciji šećera jer *lag* faza na krivulji rasta OD₆₀₀ nije vidljiva. Ovo se može objasniti činjenicom da je kultura kvasca tijekom cijelog vremena korištenja dobro kondicionirana u sličnoj podlozi kao za uzgoje uz precjepljivanje radne kulture svaka 2-3 dana. Nadalje, skraćanju *lag* faze zasigurno je doprinijela i početna aeracija podloge zbog kisika koji je dodatno osigurao značajnu i brzu proizvodnju biomase. Izražen porast optičke gustoće uočava se do 10. sata, a nakon otprilike 43 sata uzgoja, stanice ulaze u stacionarnu fazu.

Što se tiče potrošnje supstrata i u ovom eksperimentu zabilježena je paralelna potrošnja glukoze i fruktoze gotovo od početka same fermentacije što znači slabije izraženu kataboličku represiju glukozom. Glukoza i fruktoza gotovo su u potpunosti utrošeni do 43. sata uzgoja kada stanice ulaze u stacionarnu fazu. Tijekom ovog eksperimenta ukupno je

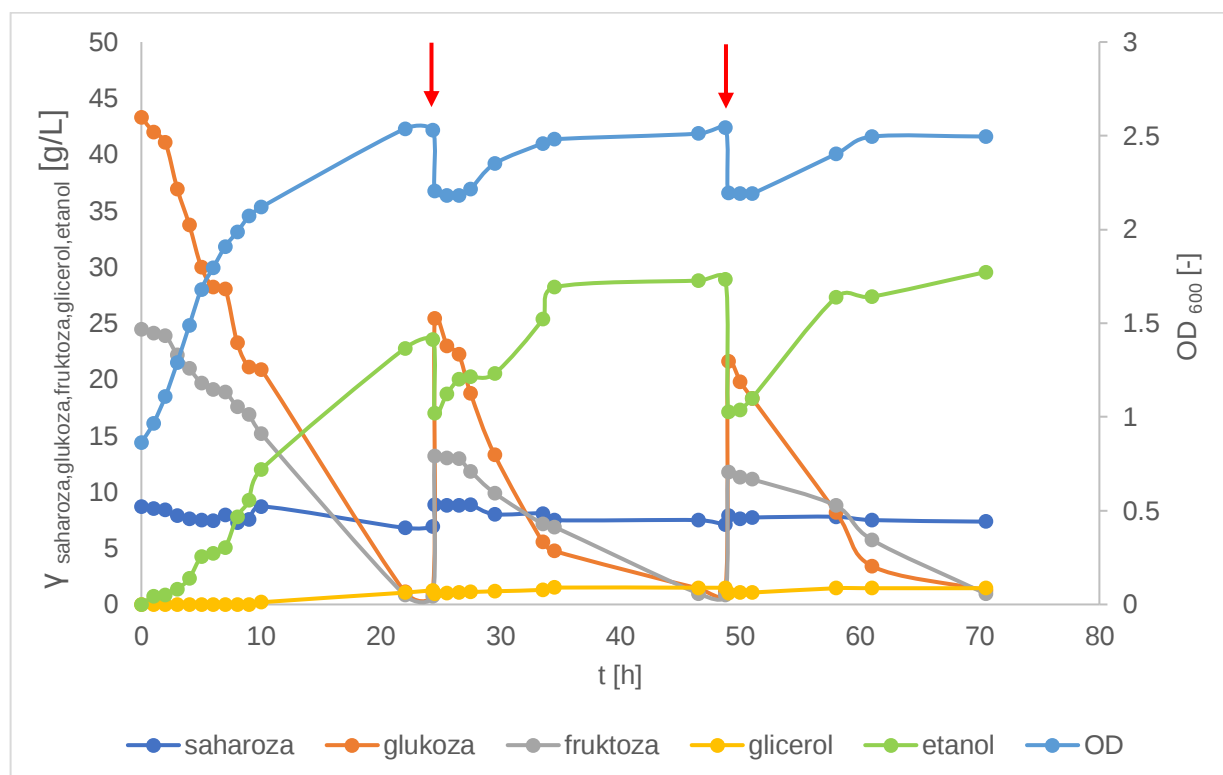
utrošeno 119,24 g/L fermentabilnih šećera. Promjena koncentracije saharoze i u ovom slučaju nije zabilježena. Na početku bioprocasa, najvjerojatnije, invertazna aktivnost nije prisutna zbog kataboličke represije glukozom dok je prema kraju fermentacije njena daljnja neaktivnost posljedica deaktivacije zbog prisutne visoke koncentracije etanola u podlozi što je u skladu sa sličnim istraživanjima (Zech i Görisch, 1995).

Šaržnim postupkom proizvodnje postignuta je slična konačna koncentracija etanola (oko 42 g/L) kao i u preliminarnom eksperimentu s početnom koncentracijom kvašćevog ekstrakta od 2 g/L. Sinteza glavnog produkta fermentacije uočena je već od samog početka, čak i u uvjetima početne aeracije podloge, što potvrđuje činjenicu da je *S. cerevisiae Crabtree* pozitivan kvasac odnosno da može proizvoditi etanol i u aerobnim uvjetima kod visokih koncentracija šećera. Budući da fermentacija medovine traje dugo, od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci zbog visoke koncentracije šećera (Iglesias i sur., 2014), a zbog vremenskog ograničenja provođenja istraživanja i ograničene količine meda, medna sladovina je bila razrijeđena u omjeru 1:8 (med : voda) što je više nego što se u literaturi preporuča (od 1:1 do 1:3 (Pereira i sur., 2007)) te je u podlogu za svaku proizvodnju dodana čista glukoza u koncentraciji od 40 g/L koja je zasigurno poboljšala i olakšala provođenje fermentacije jer kvasac najprije koristi lakše dostupne monosaharide iz podloge (glukozu i fruktozu). U slučaju korištenja šaržne tehnike proizvodnje ostvaren je prinos etanola od 44,23 g/L odnosno 5,61 % v/v uz koeficijent konverzije supstrata u produkt od 0,3709 g/g i produktivnost procesa od 0,6884 g/Lh.

Što se tiče glicerola kao glavnog nusprodukta fermentacije i ovdje je u konačnici zabilježena njegova niska koncentracija. Ovakav rezultat u skladu je sa istraživanjem (Yue i sur., 2012) koje pokazuje smanjenje proizvodnje glicerola tokom alkoholne fermentacije kada je u podlogu dodan izvor dušika kao što je kvašćev ekstrakt. Dodatak izvora aminokiselina u podlogu smanjuje nakupljanje NADH koenzima u stanici što za posljedicu ima smanjenu potrebu za njegovom reoksidacijom kroz sintezu glicerola. Tijekom šaržnog načina proizvodnje medovine ostvaren je najveći prinos glicerola ($Y_{\text{glicerol}} = 3,153 \text{ g/L}$) uzimajući u obzir i rezultate preliminarnog istraživanja. Naime, osim vrste izvora dušika, na proizvodnju glicerola značajan utjecaj ima pH vrijednost podloge i dostupnost kisika odnosno jesu li prisutni aerobni ili anaerobni uvjeti (Xie i sur., 2001). Optimalni pH za proizvodnju glicerola iznosi oko 7 i više od 7 pH jedinica (Wang i sur., 2001). Budući da pH vrijednost u preliminarnom istraživanju nije bila kontrolirana, prirodno je da je došlo do njezinog smanjenja tijekom odvijanja procesa pa su i manji prinosi glicerola očekivani. S druge strane, pH

vrijednost tijekom proizvodnje u bioreaktoru bila je kontrolirana i održavana na 5 pH jedinica što je vrlo vjerojatno pogodovalo većoj proizvodnji glicerola. Također, u odnosu na tikvice, na početku proizvodnje u bioreaktoru provedena je umjerena aeracija podloge što je u određenoj mjeri potaknulo proizvodnju glicerola i njegovo intracelularno nakupljanje i kasnije difundiranje ili transport iz stanica.

Rezultati ostvareni tijekom polukontinuiranog postupka proizvodnje medovine u bioreaktoru s miješalom prikazani su na slici 6 i ne razlikuju se značajno od rezultata ostvarenih tijekom šaržnog postupka proizvodnje.



Slika 6. Promjena koncentracije supstrata, produkata i OD₆₀₀ vrijednosti u vremenu tijekom proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog meda uz dodatak 2 g/L kvašćevog ekstrakta uz pomoć kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 polukontinuiranim postupkom u bioreaktoru s miješalom

Karakteristika polukontinuiranog načina proizvodnje je da započinje na isti način kao šaržni proces no sa manjom početnom koncentracijom šećera s obzirom da je ukupna količina dodanog supstrata raspodijeljena na manje količine kako bi se izbjegla inhibicija radnog mikroorganizma supstratom te posljedično poboljšali pokazatelji uspješnosti procesa. Kada su glukoza i fruktoza bile gotovo u potpunosti potrošene, provedena je prva izmjena 1/3 korisnog volumena bioreaktora (nakon 24 h od početka procesa), na način da je 2,4 L

iskorištene podloge ispušteno iz bioreaktora te je u bioreaktor dodan isti volumen svježe podloge. Isti postupak ponovljen je i nakon 48 h bioprocesa. Nakon što su šećeri dodani sa svježom podlogom u drugoj izmjeni volumena bili gotovo potrošeni, proces je zaustavljen te je ukupno vrijeme trajanja bilo oko 70 sati.

Kao i kod šaržnog načina proizvodnje, na početku proizvodnje zabilježena je vrlo kratka *lag* faza. Nadalje, karakteristika polukontinuiranog načina vođenja procesa je direktni nastavak eksponencijalne faze rasta stanica i nakon izmjene volumena te sprječavanje moguće inhibicije stanica visokom koncentracijom supstrata na početku svakog stupnja, ali i inhibicije nakupljenim produktom na kraju svakog stupnja. Međutim, nakon svake izmjene korisnog volumena slijedila je kratka prilagodba stanica na rast i proizvodnju etanola što se vidi na dijelovima krivulja za OD i etanol u periodima od 24 do 27 sata te od 49 do 51 sata. Razlog tome mogla bi biti prilično visoka koncentracija etanola u podlozi nakon svake izmjene, bez obzira na dodanu svježu podlogu i razrjeđenje sadržaja bioreaktora.

Na slici 6 jasno je vidljiva puno brža dinamika potrošnje fermentabilnih šećera kako na početku procesa, tako i u svakom stupnju, odnosno nakon svake izmjene korisnog volumena, upravo zbog njihove manje početne koncentracije (za 1. stupanj 67,77 g/L, za 2. stupanj 38,64 g/L, za 3. stupanj 33,36 g/L) i manjeg osmotskog pritiska za stanice. Tijekom ovog načina proizvodnje također nije došlo do značajne promjene koncentracije saharoze.

Što se tiče dinamike proizvodnje etanola, uočeno je da je u drugom stupnju, količina proizvedenog etanola iznosila 28,19 g/L što je više nego na kraju šaržnog dijela (23,55 g/L) što bi značilo da je prva izmjena volumena pogodovala povećanoj proizvodnji etanola u drugom stupnju i da je to jasna potvrda negativnog utjecaja visoke početne koncentracije supstrata na njegovu proizvodnju. Na kraju trećeg stupnja zabilježena je slična dinamika proizvodnje (29,55 g/L) kao i nakon prve izmjene.

S obzirom na to da se glicerol akumulira unutar stanice u uvjetima osmotskog stresa odnosno visoke koncentracije šećera u okolini te tijekom eksponencijalne faze rasta, a difundira ili se transportira iz stanice kada se koncentracija šećera smanji (Xie i sur., 2001), porast koncentracije glicerola u okolnom mediju nakon 10. sata je očekivan zbog prisutne male koncentracije šećera u okolini u odnosu na početak procesa. Međutim, kao i u svim dosadašnjim rezultatima iz ovog diplomskog rada, nisu zabilježene visoke koncentracije ovog nusprodukta u podlozi što je u skladu i s drugim istraživanjima (Yue i sur., 2012).

U konačnici, korištenjem polukontinuiranog postupka proizvodnje medovine, ukupno je utrošeno 133 g supstarta, pri čemu je ostvaren prinos etanola od 47,86 g/L i produktivnost bioprocesa od 0,6789 g/Lh. Ukupni pokazatelji i usporedba uspješnosti bioprocesa prikazani su u tablici 7. Na temelju prikazanih rezultata (tablica 7) vidljivo je da su postignuti vrlo slični pokazatelji uspješnosti u oba uzgoja, s tim da je u polukontinuiranom postupku utrošeno nešto više supstrata u usporedbi sa šaržnim. Također, proizvedeno je i više etanola i manje glicerola no s obzirom na nešto sporiju brzinu proizvodnje, odnosno potrošnje supstrata nakon izmjena podloge, a najvjerojatnije kao posljedica inhibicije višom inicijalnom koncentracijom etanola, produktivnost je u slučaju polukontinuiranog postupka proizvodnje bila nešto niža u odnosu na šaržni. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da se oba postupka mogu koristiti u biotehnološkoj proizvodnji medovine.

Tablica 7. Pokazatelji uspješnosti procesa proizvodnje medovine iz sladovine od lipinog Meda uz dodatak 2 g/L kvašćevog ekstrakta uz pomoć kvasca *S. cerevisiae* ZIM 3418 u bioreaktoru s miješalom šaržnim i polukontinuiranim postupkom

	ΔS fermentabilni šećeri [g/L]	Y_{etanol} [g/L]	ϕ_{etanol} (% v/v)	Y_{glicerol} [g/L]	$Y_{\text{etanol/fermentabilni šećeri}}$ [g/g]	Pr [g/Lh]
Šaržni način	119,24	44,23	5,61	3,153	0,3709	0,6884
Polukontinuirani način	133,74	47,86	5,78	2,180	0,3579	0,6789

U tablici 8 izražen je udio pojedinih šećera u gramima na 100 g lipinog meda korištenog u ovom istraživanju, bez uzimanja u obzir dodatka čiste glukoze jer je njezina koncentracija za svaki postupak proizvodnje bila ista i iznosila je 40 g/L.

Tablica 8. Koncentracija i udio prirodno prisutnih šećera u medu (saharoze, fruktoze, glukoze) i zbroj fruktoze i glukoze [g] na 100 g lipinog meda dodanog po svakoj proizvodnji te vrijednost omjera fruktoze i glukoze (svi rezultati u tablici prikazani su bez dodatka čiste glukoze)

	Šaržni način proizvodnje	Polukontinuirani način proizvodnje
Saharoza [g/L]	12,53	25,39
Fruktoza [g/L]	48,02	49,42
Glukoza [g/L]	32,86	50,36
Saharoza [g/100 g meda]	11,39	23,08
Fruktoza [g/100 g meda]	43,65	44,93
Glukoza [g/100 g meda]	29,87	45,78
Fruktoza + Glukoza [g/100 g meda]	73,52	90,71
Fruktoza / Glukoza [g/g]	1,46	0,98

Uzme li se u obzir ukupna početna koncentracija svih šećera prirodno prisutnih u medu, dodanih sa ukupnom količinom upotrijebljenog meda (bez dodane čiste glukoze) na početku šaržnog i polukontinuiranog postupka proizvodnje u bioreaktoru s miješalom, uočiti će se da ona nije ista za pojedini postupak proizvodnje. Ukupna početna koncentracija navedenih šećera iznosila je 93,41 g/L u šaržnom postupku i 125,17 g/L u polukontinuiranom postupku. Nadalje, udio pojedinog šećera na 100 g dodanog meda također nije isti za pojedini postupak proizvodnje. Naime, med, odnosno glukoza u medu, ima tendenciju kristalizacije, dok se fruktoza i saharoza pretežno nalaze u tekućem dijelu meda. Ako omjer fruktoze i glukoze ima vrijednost veću od 1, med ima manju tendenciju kristalizacije i manji udio glukoze, a ukoliko je vrijednost manja od 1, udio glukoze i tendencija kristalizacije su naravno puno veći (Nguyen i sur., 2023). Rukovanje s medom je prilično zahtjevno zbog njegove viskoznosti i nehomogenosti pogotovo ukoliko je došlo do kristalizacije pa je tako uočljivo da je u slučaju šaržnog postupka proizvodnje, dodano manje glukoze na 100 g meda u odnosu na polukontinuirani način proizvodnje, pa je i omjer fruktoze i glukoze puno veći od 1, dakle bilo je dodano manje kristaliziranog, a više tekućeg dijela meda. S druge strane za polukontinuiranu proizvodnju omjer fruktoze i glukoze je približno jednak 1 što je logično jer je njihov udio na 100 g meda gotovo jednak te je omjer dodanog kristaliziranog i tekućeg dijela bio više uravnotežen. Osim toga i koncentracija saharoze je u polukontinuiranom načinu bila veća što dodatno potkrepljuje činjenicu ravnomjernijeg dodatka tekućeg dijela meda u odnosu na šaržni postupak proizvodnje.

5. ZAKLJUČCI

1. U preliminarnom dijelu istraživanja istraživao je utjecaj dodatka kvašćevog ekstrakta na dinamiku odvijanja bioprocesa u tikvicama. Najveći prinos etanola iznosio je 43,95 g/L (5,57 % v/v) i ostvaren je u tikvici s najvećom koncentracijom kvašćevog ekstrakta dok je u eksperimentu sa koncentracijom kvašćevog ekstrakta od 0,5 g/L iznosio 33,76 g/L (4,28 %), a u tikvici bez dodanog ekstrakta 21,07 g/L (2,67 % v/v).
2. Što se tiče ostalih pokazatelja uspješnosti, kod najveće količine dodanog kvašćevog ekstrakta ostvarena je i najveća produktivnost s obzirom na glavni produkt u podlozi (0,7578 g/Lh), dok je u ostala dva eksperimenta produktivnosti iznosile 0,5821 g/Lh te 0,3632 g/Lh. Također, najbolji koeficijent konverzije postignuti je u eksperimentu gdje je početna koncentracija kvašćevog ekstrakta bila najviša ($Y_{\text{EtOH/S}} = 0,4277 \text{ g/g}$).
3. Na temelju rezultata ostvarenih tijekom preliminarnog istraživanja, za eksperimente u bioreaktoru s miješalom korištena je podloga uz dodatak 2 g/L kvašćevog ekstrakta. Ukupno gledano ostvareni pokazatelji uspješnosti procesa su gotovo isti za oba postupka proizvodnje. Prinos etanola tijekom šaržnog postupka iznosio je 44,23 g/L (5,61 % v/v), uz ostvarenu produktivnost od 0,6884 g/Lh. Tijekom polukontinuiranog načina proizvodnje ostvaren je prinos etanola od 47,86 g/L (5,78 % v/v) dok je produktivnost iznosila 0,6789 g/Lh. Koeficijenti konverzije iznosili su 0,3709 g/g za šaržni i 0,3579 g/g za polukontinuirani postupak.
4. Na temelju rezultata dobivenih tijekom ovog istraživanja, može se zaključiti da se oba postupka mogu koristiti u proizvodnji medovine. Zbog utjecaja velikog broja faktora na samu dinamiku fermentacije, ali i kvalitetu konačnog proizvoda, potrebno je provesti dodatna istraživanja za optimizaciju proizvodnje medovine.

6. LITERATURA

Almasaudi S (2021) The antibacterial activities of honey. *Saudi J Biol Sci*, **28**, 2188-2196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.017>. PMID:33911935.

Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M (2010) Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Med J Nutrition Metab*, **3**, 15-23. <http://dx.doi.org/10.1007/s12349-009-0051-6>

Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi A, Ansari MJ (2012) Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *The Sci World J*, 1-9. <https://doi.org/10.1100/2012/930849>

American Mead Makers Association (AMMA) <https://mead-makers.org/>. Pristupljeno 26. srpnja 2024.

Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T (2007) Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem*, **105**, 822–828. <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.060>

Bodor Z, Kovacs Z, Rashed MS, Kókai Z, Dalmadi I, Benedek C (2020) Sensory and Physicochemical Evaluation of Acacia and Linden Honey Adulterated with Sugar Syrup. *Sensors*, **20**, 4845. <https://doi.org/10.3390/s20174845>

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P (2008) Honey for Nutrition and Health: A Review. *J Am Coll Nutr*, **27**, 677–689. <http://dx.doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>

Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, González-Viñas MA, Pérez-Coello MS (2009) Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chem*, **112**, 1022-1030. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.036>

Cinar A, Parulekar SJ, Undey C, Birol G (2003) Batch Fermentation: Modeling: Monitoring, and Control. CRC Press, Boca Raton <https://doi.org/10.1201/9780203911358>

Ciulu M, Solinas S, Floris I, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Spano N, Sanna G (2011) RP-HPLC

determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, **83**, 924-929. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.059>

Czabaj S, Kawa-Rygielska J, Kucharska A, Kliks J (2017) Effects of mead worts heat treatment on the mead fermentation process and antioxidant activity. *Molecules*, **22**, 803. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules22050803>

Dimian AC, Bildea CS, Kiss AA (2014) Batch processes. *Comput Aided Chem Eng*, 35, 449-488. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62700-1.00011-5>

Finola MS, Lasagno MC, Marioli JM (2007) Microbiological and chemical characterization of honeys from Central Argentina. *Food Chem*, **100**, 1649-1653. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.046>

Gomes T, Barradas C, Dias T, Verdial J, Morais JS, Ramalhosa E, Estevinho LM (2013) Optimization of mead production using response surface methodology. *Food Chem Toxicol*, **59**, 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.034>

GUPTA JK, SHARMA R (2009) Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. *Agri Food Sci*, **8**, 345–355. <https://www.semanticscholar.org/paper/Production-technology-and-quality-characteristics-a-Gupta-Sharma/aa41e6d5b306abe2b6229e0cb4f085e9603f2e64>

Hernández CY, Serratoa JC, Quicazan MC (2015) Evaluation of physicochemical and sensory aspects of mead, produced by different nitrogen sources and commercial yeast. *Chem Eng Trans*, **43**, 1-6. <https://doi.org/10.3303/CET1543001>

Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 300–372. <https://doi.org/10.1128%2FMMBR.66.2.300-372.2002>

Iglesias A, Pascoal A, Choupina AB, Carvalho CA, Feás X, Estevinho LM (2014) Developments in the Fermentation Process and Quality Improvement Strategies for Mead Production. *Molecules*, **19**, 12577-12590. <https://doi.org/10.3390/molecules190812577>

Kačániová M, Melich M, Kňazovická V, Haščík P, Sudzinová J, Pavličová S, Čuboň J (2009) The indicator microorganisms value in relation to primary contamination of hone. *J Anim Sci Biotechnol*, **42**, 159-166.

Kime RW, Morse RA, Steinkraus KH (1998) Mead: history, current technology and prospects. *Am Bee J*, **138**, 121-123.

Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma-a review. *S Afr J Enol Vitic*, **21**, 97–129. <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>

Li Z, Wang D, Shi YC (2017) Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. *J Taiwan Inst Chem E*, **70**, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.10.055>

Lopes ACA, Costa R, Andrade RP, Lima LMZ, Santiago WD, das Graças Cardoso M, Duarte WF (2020) Impact of *Saccharomyces cerevisiae* single inoculum and mixed inoculum with *Meyerozyma caribbica* on the quality of mead. *Eur Food Res Technol*, [https://doi.org/10.1007/s00217-020-03563-3](https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1007/s00217-020-03563-3)

Marić V, Šantek B (2009) Biokemijsko inženjerstvo, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str. 44-62.

Mărgăoan R, Cornea-Cipcigan M, Topal E, Kösoğlu M (2020) Impact of Fermentation Processes on the Bioactive Profile and Health-Promoting Properties of Bee Bread, Mead and Honey Vinegar. *Processes*. **8**, 1081. <https://doi.org/10.3390/pr8091081>

Martínez-Moreno R, Morales P, Gonzales R, Mas A, Beltran G (2012) Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrógeno source. *Yeast Res*, **12**, 477–485. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00802.x>

McConnell DS, Schramm KD (1995) Mead success: ingredients, processes and techniques, Zymurgy Spring, **4**, 33-39.

Mendes-Ferreira A, Cosme F, Barbosa C, Falco V, Inês A, Mendes-Faia A (2010) Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *Int J Food Microbiol*, **144**, 193-198. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.016>

Mendes-Ferreira A, Barbosa C, Lage P, Mendes-Faia A (2011) The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality, *Cienc Tec Vitivinic*, **26**, 17-32. https://www.researchgate.net/publication/285948336_The_impact_of_nitrogen_on_yeast_fermentation_and_wine_quality

Morales EM, Alcarde VE, Angelis DF (2013) Mead features fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (lalvin k1-1116). *Afr J Biotechnol*, **12**, 199-204. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB12.2147>

Mulu A, Tessema B, Derby F (2004) In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *Ethiop J Health Dev*, **18**, 107-112. <https://doi.org/10.4314/ejhd.v18i2.9945>

Nguyen TQN, Hanková M, Kružík V, Grégrová A, Škorpilová T, Štarha P i sur. (2023) Determination of volatile compound profiles and physico-chemical analysis of linden and acacia Czech honey. *J Apicult Res*, **62**, 374-382. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2146346>

Olaitan PB, Adeleke OE, Ola OI (2007) Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr Health Sci*, **7**, 159-165. <https://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159>

Pereira AP, Oliveira JM, Mendes-Ferreira A, Estevinho LM, Mendes-Faia A (2017) Mead and Other Fermented Beverages. U: Pandey A, Negi S, Soccol CR (ured.) *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, Nizozemska, 407–434. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00014-5>

Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia A (2013) High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. *Food Microbiol*, **33**, 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.006>

Pfeiffer T, Morley A (2014) An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front Mol Biosci*, **1**. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>

Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, **16**, 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8%3C675::aid-yea585%3E3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8%3C675::aid-yea585%3E3.0.co;2-b)

Queiroz EL, de Almeida TB, Kettery Carneiro e Silva A, Soares Annunciation A, Almeida de Souza SM, Acosta Martinez E (2024) Optimization of the fermentation process for mead production: a review. *Cuad Edu Desarr*, **16**, 3103-3133. <https://www.researchgate.net/publication/377934751>

Ramalhosa E, Gomes T, Pereira AP, Dias T, Estevinho LM (2011) Mead Production: Tradition Versus Modernity. *Adv Food Nutr Res*, **63**, 101–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384927-4.00004-X>

Rivaldi JD, Silva MM, Coelho TC, Oliveira CT (2009) Characterization and sensory profile of mead produced by *Saccharomyces cerevisiae* IZ 888. *Braz J Food Technol*, **7**, 58-63. https://www.academia.edu/1165657/Characterization_and_sensorial_profile_of_mead_produced_by_Saccharomyces_cerevisiae_IZ_88

Simão L, da Silva Monteiro Wanderley BR, Pontes Tavares Vieira M, da Silva Haas IC, Dias de Mello Castanho Amboni R, Beddin Fritzen-Freire C (2023) How Do Different Ingredients and Additives Affect the Production Steps and the Bioactive Potential of Mead. *Food Technol Biotechnol*, **61**, 179-190. <https://doi.org/10.17113/ftb.61.02.23.7622>

Shafiq K, Ali S, Ul-Haq I (2003) Time course study for yeast invertase production by submerged fermentation. *Int J Biol Stud*, **3**, 984-988. <https://doi.org/10.3923/jbs.2003.984.988>

Sroka P, Tuszynski T (2007) Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chem*, **104**, 1250–1257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.046>

Starowicz M, Granvogl M (2020) Trends in food science & technology an overview of mead production and the physicochemical, toxicological, and sensory characteristics of mead with a

special emphasis on flavor. *Trends Food Sci Tech*, **106**, 402-416
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.006>

Šmogrovicová D, Nádaský P, Tandlich R, Wilhelmi BS, Cambray G (2012) Analytical and aroma profiles of slovak and south african meads. *Czech J Food Sci*, **30**, 241–246,
<https://doi.org/10.17221/113/2011-CJFS>

Ukpabi UJ (2006) Quality evaluation of meads produced with cassava (*Manihot esculenta*) floral honey under farm conditions in Nigeria. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **6**, 37-41.
https://www.researchgate.net/publication/237042709_Quality_evaluation_of_meads_produced_with_cassava_Manihot_esculenta_floral_honey_under_farm_conditions_in_Nigeria

Wang ZX, Zhugea J, Fanga H, Priorb BA (2001) Glycerol production by microbial fermentation:
A review. *Biotechnol Adv*, **19**, 201-223. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(01\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(01)00060-x)

Xie D, Liu D, Liu T (2001) Modeling of glycerol production by fermentation in different reactor states. *Process Biochem*, **36(12)**, 1225–1232. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00164-9)

Yue G, Yu J, Zhang X, Tan T (2012) The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. *Biomass Bioenerg*, **39**, 48–52.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.041>

Zech M, Görisch H (1995) Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: Reversible inactivation by components of industrial molasses media. *Enzyme Microb Tech*, **17**, 41–46.
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00047-U](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00047-U)

7. PRILOZI

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

Prilog 1. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva visoko učinkovitom tekućinskom kromatografijom

Spoj	Retencijsko vrijeme, t_R (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Saharoza	4,819	$A = 123790 \gamma_{\text{saharoza}} - 145,45$	0,9998
Glukoza	5,200	$A = 140381,12 \gamma_{\text{glukoza}} - 157,58$	1,000
Fruktoza	6,065	$A = 141560 \gamma_{\text{fruktoza}} - 1278,7$	0,9997
Glicerol	7,692	$A = 115438 \gamma_{\text{glicerol}} + 2603,5$	0,9999
Etanol	9,374	$A = 484161 \gamma_{\text{etanol}} + 737,97$	0,9999

A = površina

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Petra Akalović 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