

# Različite tehnike proizvodnje medovine pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ph.r. bayanus

---

**Tuksar, 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:159:799393>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2024.

Petra Tuksar

**RAZLIČITE TEHNIKE PROIZVODNJE  
MEDOVINE POMOĆU KVASCA**  
*Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus*

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.

*Najljepša hvala mentoru izv. prof. dr. sc. Mladenu Pavlečiću na svoj pruženoj pomoći, prenesenom znanju, savjetima i susretljivosti tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Također, puno hvala izv.prof.dr.sc. Antoniji Trontel, izv. prof. dr. sc. Mariju Novaku i dr. sc. Nenadu Marđetku na svim savjetima i pomoći te na poticajnoj i veseloj radnoj atmosferi tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Ovim putem zahvaljujem i voditelju diplomskog studija prof. dr. sc. Božidaru Šanteku na velikodušnom i nesebičnom pristupu tijekom cijelog studiranja, na svakom udijeljenom savjetu i svom prenesenom znanju.*

*Želim izraziti svoju zahvalnost i mojoj Petri 1 za sve zajednički provedene cjelodnevne, 12-satne boravke u laboratoriju tijekom izrade ovog diplomskog rada, kao i za svu pruženu pomoć kroz protekle dvije godine diplomskog studija.*

*Zahvaljujem svim svojim kolegama koje sam upoznala na PBF-u, a koji su sada postali moji prijatelji za cijeli život. Hvala vam na svim druženjima i trenucima koje smo proveli zajedno, kako na fakultetu, tako i izvan njega, na svakom zajedničkom online učenju, smijehu, podršci i ohrabrenju.*

*Najiskrenije zahvaljujem svojoj obitelji koja je bila moja najveća podrška tijekom cijelog akademskog obrazovanja. Hvala vam na svakoj riječi ohrabrenja, svim savjetima, podršci i vjeri u mene. Hvala što ste uvijek bili tu pružajući mi snagu i motivaciju da ustrajem i ostvarim svoje ciljeve.*

*Na kraju, zahvaljujem dragom Bogu što mi je podario mudrost, znanje i razum koji mi omogućuju da primjenjujem vještine stečene na ovom fakultetu u svrhu novih otkrića u prehrambenoj i biotehnološkoj industriji za dobrobit svih ljudi.*

# 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 POMOĆU KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*  
*ph.r. bayanus*

Petra Tuksar, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058217024

**Sažetak:** Medovina je tradicionalno alkoholno piće dobiveno fermentacijom razrijeđene otopine meda pomoću odabrane vrste kvasca. Budući da je med siromašan na nutrijentima koji su potrebni za aktivnost stanica kvasca, uobičajen je dodatak suplemenata s dušikovim spojevima u mednu sladovinu kako bi se skratilo vrijeme trajanja fermentacije i ostvarili bolji pokazatelji uspješnosti bioprocena. U preliminarnom istraživanju provedenom u tikvicama ispitan je utjecaj dodatka različitih koncentracija kvašćevog ekstrakta (0 g/L, 0,5 g/L i 2 g/L) kao izvora dušika na dinamiku fermentacije sladovine od bagremovog meda uz pomoć kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus*. Ostvareni prinosi etanola u tikvicama redom su iznosili 8,04 g/L, 15,64 g/L i 50,74 g/L čime je dokazan pozitivan utjecaj dodatka kvašćevog ekstrakta na koncentraciju proizvedenog etanola. Na temelju rezultata preliminarnog eksperimenta, odabrana je koncentracija kvašćevog ekstrakta od 2 g/L pri kojoj je provedena fermentacija u bioreaktoru s miješalom primjenom dvije različite tehnike proizvodnje (šaržni postupak i šaržni postupak s pritokom supstrata) s ciljem usporedbe pokazatelja uspješnosti ta dva postupka. U ovom dijelu istraživanja ostvareni su slični prinosi etanola, 43,28 g/L kod šaržnog postupka te 41,42 g/L kod šaržnog postupka s pritokom supstrata. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt kod šaržnog postupka iznosio je 0,38 g/g, uz produktivnost od 0,65 g/Lh, dok je kod šaržnog postupka s pritokom supstrata postignut koeficijent konverzije od 0,33 g/g, uz produktivnost od 0,42 g/Lh. Iz rezultata dobivenih tijekom izrade ovog diplomskog rada može se zaključiti da dodatak odgovarajuće koncentracije kvašćevog ekstrakta u sladovinu od bagremovog meda znatno utječe na konačni prinos etanola te da se medovina može proizvoditi primjenom obje tehnike proizvodnje.

**Ključne riječi:** medovina, *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus*, kvašćev ekstrakt, bioreaktor s miješalom, alkoholna fermentacija

**Rad sadrži:** 44 stranica, 6 slika, 9 tablica, 54 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. Antonija Trontel (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:** 25. listopada 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 ph.r. bayanus*

Petra Tuksar, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058217024

**Abstract:** Mead is a traditional alcoholic drink obtained by fermenting a diluted solution of honey, using a selected strain of yeast. Since honey is poor in nutrients necessary for yeast activity, it is common to add supplements with nitrogen compounds into the honey wort to accelerate fermentation and achieve better bioprocess efficiency parameters. In the preliminary part of this thesis, carried out in flasks, the effect of adding different initial concentrations of yeast extract (0 g/L, 0,5 g/L, and 2 g/L) as a nitrogen source on the fermentation dynamics of acacia honey wort using the yeast *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* was studied. The achieved yields of ethanol in these experiments were 8,04 g/L, 15,64 g/L and 50,74 g/L, respectively, which indicates a positive effect of adding yeast extract on the concentration of produced ethanol. Based on the results of the preliminary experiment, a concentration of yeast extract of 2 g/L was selected for fermentation carried out in a stirred tank bioreactor by using two different production techniques (batch process and fed-batch process) with the aim of comparing the bioprocess efficiency parameters between them. Similar results were achieved by using both techniques, where ethanol yield of 43,28 g/L for the batch and 41,42 g/L for the fed-batch process was obtained. The conversion coefficient of substrate to product for the batch process was 0,38 g/g, with a productivity of 0,65 g/Lh, while in the fed-batch process achieved conversion coefficient was 0,33 g/g, with a productivity of 0,42 g/Lh. From the results obtained during preparation of this thesis, it can be concluded that the addition of a suitable concentration of yeast extract to acacia 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 ph.r. bayanus*, yeast extract, stirred tank bioreactor, alcoholic fermentation

**Thesis contains:** 44 pages, 6 figures, 9 tables, 54 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. Antonija Trontel, 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:** October 25<sup>th</sup>, 2024

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>2.1. KARAKTERISTIKE MEDA KAO GLAVNE SIROVINE</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>2.2. MEDOVINA</b> .....  | <b>4</b>  |
| 2.2.1. Definicija i povijest medovine .....   | 4         |
| 2.2.2. Proizvodnja medovine .....   | 5         |
| <b>2.3. MIKROORGANIZMI KOJI SE KORISTE ZA PROIZVODNJU MEDOVINE</b> .....  | <b>9</b>  |
| 2.3.1. Kvasci .....   | 9         |
| 2.3.2. Metabolizam i transport ugljikohidrata kod kvasca .....  | 10        |
| <b>2.4. BIOTEHNOLOŠKI POSTUPCI VOĐENJA PROCESA</b> .....  | <b>13</b> |
| 2.4.1. Šaržni postupak .....  | 13        |
| 2.4.2. Šaržni postupak s pritokom supstrata .....   | 13        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>3.1. MATERIJALI</b> .....  | <b>14</b> |
| 3.1.1. Radni mikroorganizam .....   | 14        |
| 3.1.2. Kemikalije i sirovine .....  | 14        |
| 3.1.3. Sastav hranjivih podloga za čuvanje i održavanje radne kulture mikroorganizma i proizvodnju medovine .....                 | 15        |
| 3.1.4. Oprema .....   | 16        |
| 3.1.4.1. <i>Bioreaktor s miješalom</i> .....  | 16        |
| 3.1.4.2. <i>Uređaj za visoko učinkovitu tekućinsku kromatografiju (engl. Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)</i> ..... | 16        |
| 3.1.4.3. <i>Ostala oprema</i> .....   | 17        |
| <b>3.2. METODE</b> .....  | <b>18</b> |
| 3.2.1. Priprema čvrste i tekuće hranjive podloge za čuvanje i održavanje radne kulture mikroorganizma .....                       | 18        |
| 3.2.2. Priprema i održavanje inokuluma .....  | 18        |



|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.3. Priprema podloge za proizvodnju medovine u tikvicama .....  | 19        |
| 3.2.4. Priprema podloge za proizvodnju medovine u bioreaktoru s miješalom.....   | 19        |
| 3.2.5. Ispitivanje utjecaja različite početne koncentracije kvašćevog ekstrakta na proizvodnju medovine u tikvicama..... | 20        |
| 3.2.6. Proizvodnja medovine šaržnim postupkom i šaržnim postupkom s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom.....    | 20        |
| 3.2.7. Analitičke metode.....  | 22        |
| 3.2.7.1. <i>Određivanje optičke gustoće</i> .....  | 22        |
| 3.2.7.2. <i>Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti</i>                             | 22        |
| 3.2.8. Pokazatelji uspješnosti procesa .....   | 23        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>4.1. UTJECAJ POČETNE KONCENTRACIJE KVAŠĆEVOG EKSTRAKTA NA DINAMIKU ALKOHOLNE FERMENTACIJE MEDNE SLADOVINE .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>4.2. REZULTATI PROIZVODNJE MEDOVINE ŠARŽNIM I ŠARŽNIM POSTUPKOM S PRITOKOM SUPSTRATA .....</b>                        | <b>30</b> |
| <b>5. ZAKLJUČCI.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>7. PRILOZI.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>7.1. BAŽDARNI PRAVCI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA UPLC ANALIZOM .....</b>                       | <b>44</b> |

# 1. UVOD

Medovina je tradicionalno alkoholno piće dobiveno fermentacijom medne sladovine. Danas postoji nekoliko vrsta medovine koje se razlikuju prema omjeru meda i vode, dodatku voća i začina ili prema metodi pripreme medne sladovine. Njena proizvodnja značajno je porasla tijekom posljednjih godina, pri čemu se sve veća pažnja posvećuje optimizaciji cijelog procesa (Starowicz i Granvogel, 2020).

Visoka koncentracija šećera, niska pH vrijednost te manjak minerala u medu produžuju proces proizvodnje medovine, što uzrokuje nastanak nepoželjnih okusa i aroma ovog pića, stoga je potrebno optimizirati uvjete procesa fermentacije. Iz tog razloga provedena su brojna istraživanja u svrhu odabira različitih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, načinu korištenja stanica, utjecaja temperature i dodatka hranjivih tvari poput dušikovih spojeva ili organskih kiselina i slično (Araújo i sur., 2020). Ono što je bitno za naglasiti jest činjenica da je u nekim od tih istraživanja također dokazan pozitivan utjecaj dodatka izvora dušika na trajanje procesa fermentacije i pokazatelje uspješnosti bioprocasa kao i veći prinos etanola u konačnom proizvodu (Starowicz i Granvogel, 2020; Pereira i sur., 2017).

Tijekom izrade ovog diplomskog rada najprije je provedeno preliminarno istraživanje s ciljem ispitivanja utjecaja triju različitih početnih koncentracija kvašćevog ekstrakta (0 g/L, 0,5 g/L i 2 g/L) na dinamiku fermentacije, aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* te na konačni prinos etanola u medovini proizvedenoj iz sladovine od bagremovog meda razrijeđenog s vodom u omjeru 1:8 (med : voda). Na osnovu preliminarnih rezultata odabrana je optimalna početna koncentracija kvašćevog ekstrakta za ispitivanje proizvodnje medovine u bioreaktoru s miješalom s ciljem usporedbe šaržnog postupka proizvodnje i šaržnog postupka s pritokom supstrata. Izuzimanim je uzorcima pomoću spektrofotometra određivana optička gustoća u svrhu indirektnog praćenja promjene broja stanica kvasca, dok su promjene koncentracija svih supstrata i produkata određene primjenom visoko učinkovite tekućinske kromatografije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KARAKTERISTIKE MEDA KAO GLAVNE SIROVINE

Prema Pravilniku o medu (2015), med se definira kao prirodno slatki proizvod koji medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode iz nektara medonosnih biljaka, sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka koje pčele skupljaju pri čemu mu dodaju vlastite specifične tvari a potom ga spremaju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća da dozrije. Glavne komponente meda su ugljikohidrati, među kojima su dominantni glukoza i fruktoza, zatim voda, čiji je udio ovisan o okolišnim čimbenicima (vrijeme, vlažnost unutar košnice i sl.), dok su minerali, proteini, lipidi, organske kiseline, aminokiseline, fenoli, flavonoidi i vitamini zastupljeni u manjem udjelu. Međutim, na kemijski sastav meda i njegove senzorske karakteristike znatan utjecaj imaju klimatski uvjeti, botaničko i geografsko podrijetlo, stupanj sazrijevanja, vrsta pčela te uvjeti prerade, naknadne obrade i skladištenja meda (Simão i sur., 2023; Ramalhosa i sur., 2011). Upravo zbog toga, med se smatra dobrim ekološkim indikatorom jer svaka okolišna promjena u tlu, zraku ili vodi nastala u području prikupljanja meda može utjecati na njegov konačni sastav (Czipa i sur., 2019).

Bagremov med jedna je od najpoznatijih vrsta meda, a proizvode ga medonosne pčele iz nektara cvijeta bagrema (*Robina pseudoacacia*). Prepoznatljiv je po blagom, slatkom i cvjetnom okusu pa se često koristi kao sladilo u raznim napitcima pri čemu ne uzrokuje promjenu okusa pića. Zbog svoje nutritivne vrijednosti te prisutnosti antioksidansa i drugih bioaktivnih molekula smatra se potencijalnim proizvodom za prevenciju i liječenje raka, dok neurolozi proučavaju njegovo terapijsko djelovanje kod liječenja Alzheimerove bolesti (Ma i sur., 2019; Muhammad, 2016).

Kvalitetu i autentičnost bagremovog meda moguće je utvrditi prema njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima koja određuju biološku aktivnost meda i ujedno daju potpune informacije o njegovu sastavu (Ma i sur., 2019; Ramalhosa i sur., 2011). Uz to, provodi se i analiza mikrobioloških i senzorskih karakteristika meda. Glavni kriteriji za ispitivanje kakvoće meda su udio i omjer reducirajućih šećera (fruktoze i glukoze), udio vode, električna vodljivost, sadržaj pepela, pH vrijednost meda, prisutnost vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i hidroksimetilfurfurala (HMF) (Mohamed i sur., 2018).

Ugljikohidrati su najzastupljeniji sastojak bagremovog meda, a prema Mohamed i sur. (2018) prisutni su u udjelu od 78,44 % od čega većinski dio obuhvaćaju reducirajući šećeri fruktoza i glukoza sa udjelima od 39,9 %; odnosno 30,7 %. Ostatak čini saharoza, čiji udio u bagremovom medu, kako navodi Codex Alimentarius Commission (2022), ne bi smio biti veći od 10 %. Također, moguća je prisutnost drugih disaharida poput maltoze (Ma i sur., 2019). Udio fruktoze i glukoze u medu, odnosno njihov omjer, ima značajan utjecaj na kristalizaciju i njegov okus. Slijedom navedenog, što je njihov omjer veći, kristalizacija meda će biti sporija jer je glukoza manje topljiva od fruktoze te će med biti slađi. Suprotno tome, manji omjer fruktoze i glukoze rezultirat će bržom kristalizacijom. No, bitno je napomenuti da disaharidi kao netopivi šećeri meda također imaju utjecaj na kristalizaciju pa tako veći udio saharoze i maltoze može inicirati kristaliziranje meda (Mohamed i sur., 2018). Prema Muhammad (2016), bagremov med zbog visoke koncentracije fruktoze sporo kristalizira te ostaje u tekućem stanju kroz duži vremenski period.

Dušikovi spojevi u bagremovom medu prisutni su u relativno niskom udjelu (0,00-1,61 %), ovisno o geografskom i botaničkom području na kojem je med proizveden. Među njima najpoznatiji su izobutironitril, benzil nitril kao i brojne aminokiseline (Mădaş i sur., 2019). Nadalje, prisutnost raznih enzima u medu omogućava odvijanje biokemijskih reakcija koje imaju znatan utjecaj na njegovu kvalitetu i biološku aktivnost. Reakcije razgradnje oligo- i disaharida na glukozu i fruktozu katalizirane su enzimima dijastazom i invertazom, dok glukoza oksidaza katalizira reakciju oksidacije glukoze u glukonsku kiselinu i  $H_2O_2$  (Alaerjani i sur., 2022). Nastali produkti te reakcije povećavaju slobodnu kiselost meda i imaju negativan učinak na rast bakterija, no u slučaju visoke koncentracije enzima katalaze, dolazi do reakcija razgradnje  $H_2O_2$  na vodu i kisik (Alaerjani i sur., 2022; Ma i sur., 2019). Kao što je i prethodno navedeno, udio vode jedan je od važnijih parametara koji utječe na kvalitetu meda jer previsok sadržaj vode smanjuje njegovu otpornost na mikrobnu kvarenje i skraćuje mu rok trajanja tijekom skladištenja, stoga Codex Alimentarius Commission (2022) navodi kako voda ne bi smjela biti prisutna u udjelu većem od 20 % (Czipa i sur., 2019; Mohamed i sur., 2018).

Visoka slobodna kiselost i niska pH vrijednost (3,5-5,5) ukazuju na dobru svježinu i kvalitetu bagremovog meda, a prisustvo brojnih organskih kiselina poput mravlje, maslačne i limunske ima inhibirajući utjecaj na rast bakterija. Nadalje, za visoku električnu vodljivost meda zaslužan je visok udio pepela koji ujedno osigurava bogatstvo minerala u medu. Koncentracija HMF-a u svježem medu je vrlo niska, no raste u slučaju zagrijavanja meda i tijekom dugotrajnog

skladištenja pri čemu med poprima tamniju boju i gubi na svježini (Ma i sur., 2019; Mohamed i sur., 2018).

Također, u medu se mogu naći i prirodno prisutni mikroorganizmi koji dolaze iz okoline, tla biljaka i peludi, kao i oni koji obično nastanjuju probavni trakt pčela pa se u medu mogu naći gram-pozitivne bakterije (*Bacillus*, *Bacteridium*, *Streptococcus* i *Clostridium* vrste), kao i gram-negativne bakterije poput *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* i *Pseudomonas* (Pereira i sur., 2017). Osim bakterija, najčešće izolirani kvasci iz meda pripadaju rodovima *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, i *Zygosaccharomyces*, no njihovo je prisustvo po gramu meda minimalno (Sottit i sur., 2019). Svi navedeni mikroorganizmi ubrajaju se u primarnu kontaminaciju meda, međutim med se može kontaminirati iz sekundarnih izvora, primjerice tijekom ljudskog rukovanja (kožne infekcije i fekalne kontaminacije), korištenjem nečiste opreme te preko nesterilnog zraka (tijekom pakiranja). Dok je primarne izvore kontaminacije vrlo teško kontrolirati, sekundarni izvori mogu se držati pod kontrolom kroz odgovarajuću higijenu i primjenu dobre proizvodne prakse (Pereira i sur., 2017).

## 2.2. MEDOVINA

### 2.2.1. Definicija i povijest medovine

Medovina je tradicionalno alkoholno piće dobiveno fermentacijom razrijeđene otopine meda s udjelom etanola od 4 do 18 %. Udio etanola ovisan je o početnom omjeru meda i vode te fermentacijskoj sposobnosti primijenjenog kvasca (Queiroz i sur., 2024; Schwarz i sur., 2020a). Iako je riječ o jednostavnom procesu fermentacije, kroz stoljeća je različitim načinima proizvedeno nekoliko vrsta ovog pića, stoga danas osim tradicionalne medovine razlikujemo *melomel* (medovina s dodatkom voća ili voćnih sokova), *metheglin* (medovina koja sadrži začine ili biljke), *pymment* (medovina uz dodatak grožđa), *braggot* (medovina uz dodatak slada) te brojne druge (Benetole i sur., 2021; Iglesias i sur., 2014).

Fermentirana pića dobivena alkoholnim vrenjem razrijeđene otopine meda spadaju među najstarija alkoholna pića na svijetu. Prema arheološkim otkrićima i nalazima, konzumacija medovine zabilježena je u Kini gdje su pronađeni ostaci vina od meda u keramici 7000 godina prije Krista, nakon čega se njena proizvodnja proširila na Egipat, Grčku, Rimsko Carstvo i srednjovjekovnu Europu (Benetole i sur., 2021). Nadalje, prema nekim istraživanjima,

medovina se smatra izvornim pićem afričkih zemalja koje se tek kasnije počelo proizvoditi u mediteranskim zemljama i Europi. U kulturi Kelta, Anglosaksonaca i Vikinga medovina je bila piće plemića i bogova koje im je pružalo znanje i besmrtnost, a vjerovali su i da može povećati snagu, muževnost i plodnost (Iglesias i sur., 2014).

Iako je bila široko rasprostranjena, razvojem civilizacije i dostupnosti poljoprivrednih resursa medovina je s vremenom zamijenjena drugim fermentiranim alkoholnim pićima poput vina i piva. U zemljama Europe gdje se vinova loza nije uzgajala, konzumacija medovine je bila vrlo česta sve dok se vino nije krenulo uvoziti po nižim cijenama iz drugih zemalja (Pereira i sur., 2017). Danas je medovina popularno piće u Poljskoj, Engleskoj, Njemačkoj i Baltičkim zemljama, a sve se više konzumira i u Afričkim zemljama poput Etiopije i Južne Afrike. U usporedbi s vinom i pivom, proizvodnja medovine na svjetskoj razini je relativno mala, no predstavlja velik značaj u zanatskoj i tradicionalnoj proizvodnji gdje se smatra glavnom alternativom za korištenje rezidualnog meda osiguravajući tradicionalno alkoholno piće na ekonomičan način (Schwarz i sur., 2020a).

#### 2.2.2. Proizvodnja medovine

Proizvodnja medovine uključuje alkoholnu fermentaciju meda razrijeđenog vodom, pri čemu omjer meda i vode može biti 1:0,5; 1:1, 1:2 ili 1:3, a o odabranom omjeru ovisit će i sastav konačnog proizvoda. Iako medovina, zbog ograničene dostupnosti i visoke cijene, nije toliko popularna kao ostala alkoholna pića, u posljednjih nekoliko godina njena proizvodnja bilježi značajni porast (Starowicz i Granvogel, 2020). Proizvodnja medovine obuhvaća faze pripreme i korekcije sirovina i medne sladovine, odabira i inokulacije kvasca, fermentacije, bistrenja, dozrijevanja (odležavanja) i pakiranja kao što je prikazano na slici 1 (Queiroz i sur., 2024).

Priprema medne sladovine u osnovi se sastoji od međusobnog miješanja meda i vode u određenom omjeru, s time da se umjesto dijela vode može dodati voćni sok ili pulpa te prirodni ekstrakt peludi kao dodatak za fermentaciju, ovisno koja se vrsta medovine proizvodi. S obzirom na to da med ne sadrži dovoljan udio minerala, izvora dušika i faktora rasta, u ovom se koraku mogu dodati i suplementi poput smjese hranjivih tvari, kvašćevog ekstrakta, peptona,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , glukoze, vitamina, minerala i raznih organskih kiselina s ciljem povećanja brzine rasta i razmnožavanja kvasca kao i njegove fermentacijske aktivnosti te radi bržeg odvijanja procesa fermentacije (Simão i sur., 2023; Schwarz i sur., 2020a; Iglesias i sur., 2014). Voda koja se koristi za proizvodnju medovine mora biti odgovarajuće kvalitete i ispunjavati određene zahtjeve kao što su odsutnost turbiditeta i visoke razine klora, adekvatna

pH vrijednost te pridržavanje propisanih mikrobioloških standarda (Simão i sur., 2023). Kako bi se postigao uravnoteženi sastav između slatkih i kiselih sastojaka medne sladovine, moguće je korigirati kiselost dodatkom limunske, jabučne ili vinske kiseline. Osim toga, smjesa vinske i jabučne kiseline može se koristiti i za povećanje njenog puferskog kapaciteta. Nadalje, jedna od najčešće korištenih metoda za inhibiciju mogućeg rasta neželjenih mikroorganizama u mednoj sladovini jest pasterizacija. Njena kontaminacija također se može spriječiti sumporenjem (dodatkom kalijevog metabisulfita ili sumporovog dioksida) ili kuhanjem sladovine (Pereira i sur., 2017). Međutim, zagrijavanjem medne sladovine dolazi do Maillardovih reakcija koje uzrokuju dehidraciju šećera (karamelizaciju) i sintezu nepoželjnih spojeva poput HMF-a, koji, osim što doprinosi neugodnoj aromi konačnog proizvoda, inhibira aktivnost kvasca (Czabaj i sur., 2017). No, treba napomenuti kako zagrijavanje medne sladovine može rezultirati i nastankom poželjnih spojeva arome (Starowicz i Granvogel, 2020).

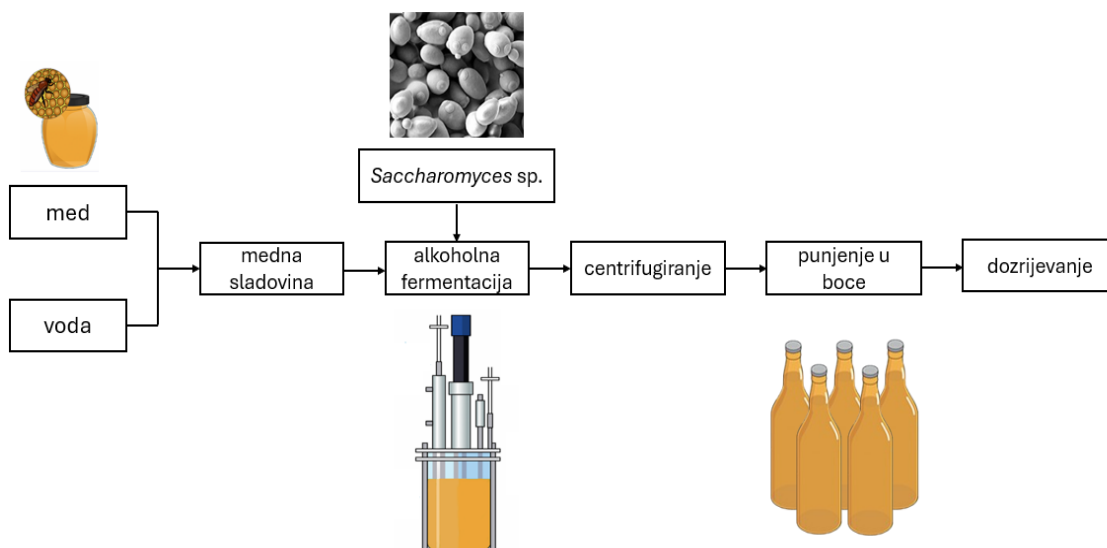
Odabir mikroorganizama koji provode fermentaciju također ima značajnu ulogu u proizvodnji medovine jer su oni ključni za učinkovitu pretvorbu šećera u etanol. Kvasci su jednostanični mikroorganizmi koji u anaerobnim uvjetima mogu provoditi proces alkoholnog vrenja. Senzorske karakteristike alkoholnog pića izravno su povezane s vrstom kvasca koji se koristi stoga, iako je etanol glavni proizvod, produkti nastali sekundarnim metabolizmom daju fermentiranom piću specifičan miris i okus. Kvasci koji se koriste u proizvodnji medovine najčešće pripadaju sojevima namijenjenim fermentaciji vina, piva i pjenušaca, a njihov odabir ovisi o željenim specifičnim karakteristikama svakog proizvoda kao što su snažna fermentacija, visoka tolerancija na etanol i temperaturne varijacije, sposobnost taloženja, proizvodnja arome i dr. Zbog svoje učinkovitosti tijekom fermentacije medovine, najčešće se koriste kvasci iz roda *Saccharomyces*, među kojima se ističe primjena *S. cerevisiae* i *S. bayanus* (Queiroz i sur., 2024; Simão i sur., 2023; Schwarz i sur., 2020a).

Alkoholna fermentacija i odležavanje medovine vremenski su dva najzahtjevnija koraka u proizvodnji medovine te često traju nekoliko mjeseci, čak i do godinu dana, a udio etanola u konačnom proizvodu strogo je povezan s udjelom ugljikohidrata u korištenom medu (Starowicz i Granvogel, 2020). Fermentacija medovine najčešće se provodi pri temperaturama između 18 i 30 °C te pH vrijednosti medne sladovine u rasponu između 3,5-5,5. Na učinkovitost fermentacije utječu brojni čimbenici među kojima se ističu odabrani soja kvasca, optimalna pH vrijednosti sladovine i temperatura fermentacije, intenzitet miješanja podloge te prisutnost esencijalnih nutrijenata (Queiroz i sur., 2024; Iglesias i sur., 2014). Uz to što je pH vrijednost meda prirodno niska, čime je inhibirana moguća neželjena mikrobna aktivnost, tijekom fermentacije pH podloge može pasti zbog nastanka octene i sukcinjske kiseline, koje nastaju kao nusprodukti

metabolizma stanica kvasca, do vrijednosti koja ograničava učinkovitu metaboličku aktivnost kvasca. Osim toga, smanjenje pH vrijednosti dovodi do slabije disocijacije srednjelančanih masnih kiselina, odnosno do povećanja njihovog udjela u mednoj sladovini i u staničnoj membrani kvasca što uzrokuje povećanu osjetljivost membrane i smanjenu toleranciju kvasca na etanol čime se inhibira rast stanica. Iz toga je razloga važno regulirati pH vrijednost, primjerice dodatkom pufera koji će pH tijekom fermentacije održavati u rasponu 3,7-4,0. Najčešće korišteni puferi za fermentaciju medovine su kalcijev karbonat, kalijev karbonat, kalijev bikarbonat te vinska kiselina (Ramalhosa i sur., 2011). Nadalje, prema Iglesias i sur. (2014) temperature podloge iznad 25 °C, uz visoku koncentraciju fermentabilnih šećera i drugih hranjivih tvari, utječu na povećanje brzine potrošnje šećera. Nasuprot tome, temperature niže od 25 °C i nedostatak nutrijenata povezani su s visokom koncentracijom rezidualnih šećera što može potaknuti neželjenu naknadnu fermentaciju. Međutim, u istraživanju autora Šmogrovičova i sur. (2012) utvrđeno je da niže temperature fermentacije pogoduju odvijanju stabilnije fermentacije i boljoj transformaciji aromatičnih sastojaka u konačni proizvod. No, kod *S.cerevisiae*, učinkovita fermentacija postiže se u temperaturnom intervalu od 20 °C do 30 °C, dok se pri temperaturama ispod 15 °C znatno smanjuje učinkovitost fermentacije, čime se posljedično produljuje vrijeme trajanja fermentacije. Važno je napomenuti da se brzina odvijanja fermentacije isto tako smanjuje kada je temperatura iznad 30 °C (Iglesias i sur., 2014). Kako je prethodno navedeno, učinkovitost fermentacije ovisna je i o soju kvasca, pa tako pojedini kvasci ne mogu proizvesti više od 4 % v/v etanola, no prema Queiroz i sur. (2024) *S. bayanus* može fermentirati i do 15 % v/v etanola. U trenutku kada gustoća medovine postane konstantna, što ukazuje na potrebu za filtracijom kako bi se uklonile suspendirane čestice na dnu fermentora, završava proces fermentacije. Međutim, bioproces se može zaustaviti i ranije kako bi se dobila medovina s većom koncentracijom šećera i nižim udjelom etanola (Simão i sur., 2023).

Po završetku fermentacije, slijedi bistrenje (centrifugiranjem ili dodavanjem sredstava za bistrenje, poput bentonita) te se medovina puni u boce koje se čuvaju na hladnijem i tamnijem mjestu bez svjetlosti i promjena u temperaturi kako bi se očuvale njene senzorske karakteristike. U postupku zrenja medovine (odležavanja), dolazi do razvijanja aromatskih spojeva, a sam proces može trajati od nekoliko mjeseci i godina (Simão i sur., 2023).





**Slika 1.** Shematski prikaz koraka u procesu proizvodnje medovine (prema García i sur., 2024; Pereira i sur., 2017)

Međutim, tijekom fermentacije medovine mogu se javiti i razni problemi kao što su nemogućnost postizanja željenog udjela alkohola i neujednačenost konačnog proizvoda (Queiroz i sur., 2024; Iglesias i sur., 2014). Također, kao rezultat visoke koncentracije prisutnog šećera, niske pH vrijednosti podloge te niske koncentracije minerala prisutnih u medu, može doći do produljenja vremena trajanja fermentacije što utječe na nastanak nepoželjnih aroma i okusa čime se narušava kvaliteta pića (Araújo i sur., 2020). Stoga, kako bi se spriječili svi navedeni negativni ishodi, provedena su brojna istraživanja s ciljem optimizacije procesa kojima je utvrđen pozitivan utjecaj na ishod proizvodnje medovine iz medne slakovine (Simão i sur., 2023; Pereira i sur., 2015). Također, kao jedna od mogućnosti optimizacije procesa proizvodnje medovine spominje se primjena imobiliziranih stanica koje je moguće koristiti tijekom više uzastopnih ciklusa fermentacije. Navedenom metodom skraćuje se vrijeme trajanja cijelog postupka proizvodnje, iz razloga što se izostavlja korak pripreme inokuluma, kao i regeneracija prethodno korištenih stanica. Na ovaj način, stanice se lakše i brže prilagođavaju za idući ciklus fermentacije te se ostvaruje veći prinos etanola i posljedično, veća produktivnost bioprocasa (Queirzo i sur., 2024). Ipak, nedostatak korištenja ove metode jest ograničen transport supstrata i produkta, kao i kisika u pore matriksa do imobiliziranih stanica, a osim toga cijeli je postupak ovisan o stabilnosti matriksa i njegovoj čvrstoći (Queirzo i sur., 2024; Schwarz i sur., 2020a).

## 2.3. MIKROORGANIZMI KOJI SE KORISTE ZA PROIZVODNJU MEDOVINE

### 2.3.1. Kvasci

Kvasci su eukariotski, nefotosintetski i jednostanični mikroorganizmi ovalnog ili cilindričnog oblika koji pripadaju askomicetnim ili bazidiomicetnim gljivama, a razmnožavaju se vegetativno pupanjem ili cijepanjem te tvore spolne forme koje nisu zatvorene u plodištu. Rod *Saccharomyces* predstavnik je askosporogenih kvasaca, a njegova najvažnija fiziološka osobina jest sposobnost anaerobne ili semianaerobne fermentacije jednog ili više šećera što rezultira nastankom etanola i ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>) (Knapić, 2021; Kowallik, 2015). Kvasci *Saccharomyces* vrste smatraju se vodećim mikroorganizmima u svijetu, posebno u kontekstu prehrambene industrije, biofarmaceutike i proizvodnje mnogih industrijskih proizvoda, poput pekarskih proizvoda, alkoholnih pića i biogoriva. Napredak u primijenjenoj mikrobiologiji kvasca doveo je do značajnih prekretnica u biotehnološkoj industriji, kao što je djelomična zamjena uporabe fosilnih goriva te optimizacija procesa proizvodnje hrane i sigurnosti hrane (Vincent i sur., 2021; Eliodório i sur., 2019).

Njihova tolerancija na podnošenje različitih ekstremnih uvjeta okoline, prisutnih u industrijskim pogonima, te visoka fermentacijska aktivnost, rezultirala je selekcijom nekoliko stotina sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji se danas koriste u raznim bioprocesima (Grba i sur., 2010). Naime, primjena odabranih sojeva kvasca *S. cerevisiae* za provedbu alkoholne fermentacije uobičajena je industrijska praksa koja osigurava kontrolu reproducibilnosti i odgovarajuću kvalitetu konačnog proizvoda. Međutim, poznato je da je metabolizam kvasca jedan od ključnih čimbenika koji utječe na konačnu aromu fermentiranih pića, točnije na udio hlapivih spojeva, dok je za odgovarajuću aktivnost metabolizma kvasca neophodno prisustvo dušikovih spojeva u podlozi. Shodno tome, predložena je primjena ne-*Saccharomyces* kvasaca u mješovitim ili čistim kulturama s ciljem postizanja finije arome vina ili medovine, a nedavna su istraživanja pokazala da je medovina proizvedena s ne-*Saccharomyces* kvascima (*Kluyveromyces thermotolerans* ili *Torulasporea delbrueckii*), izoliranim iz medonosnih pčela, bolje ocjenjena s obzirom na kvalitetu okusa i opći dojam u odnosu na kulture kvasca *S. cerevisiae* (Sottit i sur., 2019).

*Saccharomyces bayanus*, s druge strane, također je jedan od najpoznatijih i češće korištenih kvasaca u alkoholnim fermentacijama s aktivnim fruktoznim transportom, vrlo lakom

reaktivacijom te sposobnošću stvaranja pjene pri čemu dobro podnosi visoke koncentracije etanola i sumporovog dioksida u podlozi. Pored toga, jedna od glavnih karakteristika kvasca *S. bayanus* jest kriotolerancija, odnosno mogućnost provedbe fermentacije pri niskim temperaturama, što ga razlikuje od kvasca *S. cerevisiae*. Njegovom primjenom tijekom alkoholnog vrenja može nastati manje octene kiseline i etanola, ali više glicerola i sukcininske kiseline. Osim toga, *S. bayanus* proizvodi i jabučnu kiselinu, no ne razgrađuje ju, kao i hlapljive fermentacijske spojeve poput feniletanola i njegovog acetata. Prema Eglinton i sur. (2000) navedena svojstva ovog kvasca mogla bi se primijeniti za ispravljanje nedostataka u nekim vinima, kao što su niska kiselost ili niska koncentracija glicerola. Sintetizirani spojevi posljedično uzrokuju značajne organoleptičke varijacije, ovisno o prisutnoj vrsti (Knapić, 2021; Peřez-Través i sur., 2014; Le Jeune i sur., 2007).

### 2.3.2. Metabolizam i transport ugljikohidrata kod kvasaca

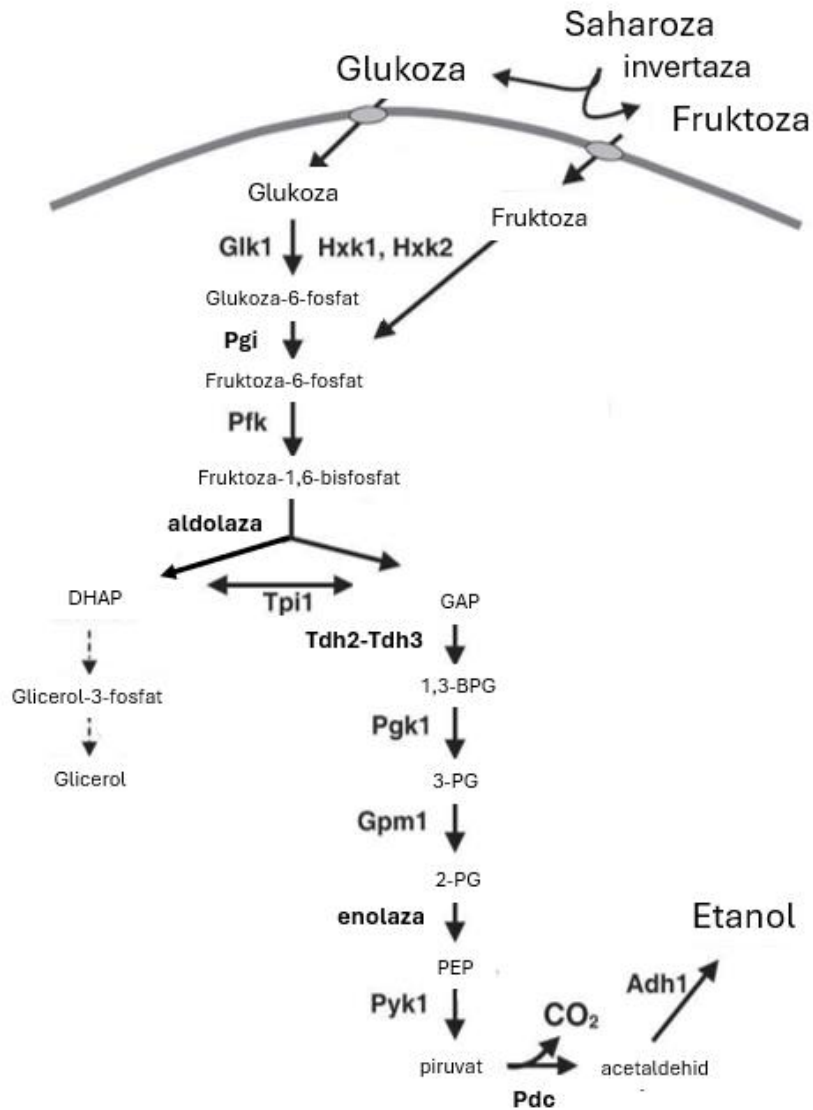
Kako bi započeo proces razgradnje ugljikohidrata, kvasac najprije treba transportirati šećere iz okoline u intracelularni prostor. Transport glukoze i fruktoze odvija se olakšanom difuzijom pomoću istog transmembranskog transportera bez utroška energije. Nadalje, u slučaju prisustva maltoze, ona se u stanicu unosi proton *simport* mehanizmom pomoću specifičnog transmembranskog prijenosnika, nakon čega se u stanici hidrolizira na dvije molekule glukoze pomoću enzima maltaze ( $\alpha$ -glukozidaze). Nasuprot tome, metabolizam saharoze započinje djelovanjem invertaze, enzima koji se nalazi u slobodnom i topljivom obliku u periplazmatskom prostoru stanice, koja cijepa saharozu na glukozu i fruktozu izvan stanice i koje se zatim transportiraju u stanicu kako je ranije opisano (Bisson i sur., 2016; Stewart, 2016).

Stanice kvasca mogu rasti i trošiti ugljikohidrate u uvjetima sa ili bez prisustva kisika u podlozi. U aerobnim uvjetima, ugljikohidrati se potpuno oksidiraju do  $\text{CO}_2$  i vode pri čemu nastaje i značajna količina kvašćeve biomase. Nasuprot tome, u anaerobnim uvjetima, odnosno tijekom alkoholne fermentacije kvasci metaboliziraju šećere putem glikolize do piruvata koji se potom oksidira i dekarboksilira u etanol i u ovakvim je procesima prirast biomase vrlo nizak (García-Ríos i Guillamón, 2019; Pfeiffer i Morley, 2014).

Biokemijski put alkoholne fermentacije vrlo je kompleksan i uključuje mnogo enzimskih reakcija tijekom kojih, osim glavnih produkata (etanola i  $\text{CO}_2$ ), dolazi do nastanka velikog broja različitih hlapljivih i nehlapljivih spojeva. Nakon transporta u stanicu, glukoza ili bilo koja druga

heksoza prolaze kroz glavni metabolički put razgradnje, glikolizu, gdje se glukoza najprije fosforilira u glukoza-6-fosfat, nakon čega se postupno razgrađuje preko međuprodukata (fruktoza-1,6-bisfosfata, gliceraldehid-3-fosfata i fosfoenol-piruvata) do piruvata. Nastali se piruvat u reakciji piruvat-dekarboksilaze dekarboksilira u acetaldehid koji se potom reducira s koenzimom NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) djelovanjem alkohol-dehidrogenaze u etanol (Herjavec, 2019). Dok respiracija rezultira visokim prinosom visokoenergetskog spoja adenozin-3-fosfata, odnosno ATP-a (kod *Saccharomyces cerevisiae* otprilike 18 ATP-a po glukozi), tijekom fermentacije u anaerobnim uvjetima nastaje ga znatno manje (2 ATP-a po glukozi). Naime, neke vrste kvasaca, poput *S. cerevisiae*, pri visokim koncentracijama šećera proizvode etanol i u aerobnim uvjetima, stoga se smatraju Crabtree-pozitivnim kvascima, dok se kvasci koji nemaju tu mogućnost svrstavaju u Crabtree-negativne kvasce (Pfeiffer i Morley, 2014).

U biotehnološkoj proizvodnji alkoholnih pića iskorištenja sirovina na šećernim supstratima iznose 90-95 % od teoretskih vrijednosti iz razloga što uz etanol nastaju i drugi nusprodukti među kojima je glavni glicerol, a zapaženi su i acetaldehid, esteri, viši alkoholi, octena kiselina i dr. Također, dio šećera troši se na sintezu kvaščeve biomase (Grba i sur., 2010). Za uspješno odvijanje glikolize, neophodno je prisustvo  $\text{NAD}^+$  kao akceptora elektrona koji se regenerira oksidacijom NADH u posljednjem koraku alkoholne fermentacije. Ako je kapacitet za reoksidaciju u ovom koraku ograničen,  $\text{NAD}^+$  se može regenerirati disanjem ili konverzijom dihidroksiaceton fosfata u glicerol, što predstavlja glavni izvor glicerola u vinu. Osim toga, proizvodnja glicerola može biti potaknuta osmotskim stresom tijekom početnih faza fermentacije (Rodicio i Heinisch, 2009). Alkoholna fermentacija smatra se prirodno zaštićenim procesom jer etanol kao glavni produkt ima inhibirajuće djelovanje na većinu bakterijskih vrsta, dok se nakupljanjem  $\text{CO}_2$  dodatno istiskuje otopljeni kisik pa dolazi do uspostave anaerobnih uvjeta (Grba i sur., 2010).



**Slika 2.** Biokemijski put alkoholne fermentacije u stanicama kvasca (*prema* Rodicio i Heinisch, 2009)

(Glk1-glukokinaza, Hxk1-heksokinaza 1, Hxk2-heksokinaza 2, Pgi-fosfoglukoza izomeraza, Pfk-fosfofruktokinaza, Tpi1-triozafosfat izomeraza, DHAP-dihidroksiacion fosfat, GAP-gliceraldehid-3-fosfat, Tdh2-Tdh3- GAP dehidrogenaza, Pgc1-fosfoglicerat kinaza, Gpm1- fosfoglicerat mutaza, Pyk1- piruvat kinaza, Pdc- piruvat dekarboksilaza, Adh1- alkohol dehidrogenaza)

## 2.4. BIOTEHNOLOŠKI POSTUPCI VOĐENJA PROCESA

U ovom poglavlju navedeni su neki od načina vođenja bioprocesa u kontroliranim uvjetima u bioreaktorima s miješalom.

### 2.4.1. Šaržni postupak

Šaržni (punidbeni) postupak najjednostavniji je način vođenja nestacionarnog mikrobnog procesa koji je ograničen u vremenu i prostoru. U ovoj vrsti postupka, prije inokulacije, u bioreaktor je potrebno dodati hranjivu podlogu, koja se zajedno sa cijelim sustavom sterilizira. Budući da se proces odvija pri konstantnom volumenu i bez dodataka hranjivih tvari u bioreaktor nakon naciepljivanja, trajanje procesa ograničeno je limitirajućim supstratom. Za vrijeme trajanja postupka, mikroorganizmi troše hranjive tvari i stvaraju produkte, stoga se koncentracija hranjivih sastojaka u hranjivoj podlozi s vremenom smanjuje, a produkata povećava. Po završetku procesa, sadržaj bioreaktora se prazni te mogu slijediti razni postupci izdvajanja i pročišćavanja ciljanog produkta (engl. *downstream processing*) (Marić i Šantek, 2009).

### 2.4.2. Šaržni postupak s pritokom supstrata

Za razliku od šaržnog postupka, šaržni postupak s pritokom supstrata karakterizira promjenjivi volumen hranjive podloge u bioreaktoru koji se s protekom vremena povećava zbog dodatka hranjive podloge u određenim vremenskim intervalima. Naime, kako bi se izbjegla inhibicija proizvodnog mikroorganizma visokom početnom koncentracijom supstrata, proces započinje pri njegovoj relativno niskoj koncentraciji ( $S$ ) u podlozi, a kada se ona smanji na vrijednost jednaku  $S \cong 10K_s$  ( $K_s$  - konstanta zasićenja hranjive podloge graničnim supstratom; odgovara koncentraciji graničnog supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine odvijanja reakcije), započinje prihranjivanje bioreaktora svježom podlogom koje se ponavlja u vremenskim razmacima koji su u skladu sa specifičnom brzinom nastajanja produkta. U usporedbi sa šaržnim načinom vođenja procesa, ovim se postupkom produžuje njegovo trajanje koje bi trebalo rezultirati povećanjem produktivnosti, prinosa proizvoda i iskorištenju supstrata. (Bolmanis i sur., 2023; 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 ph.r. bayanus* proizvođača AEB (engl. *Agency of Enology of Brescia*) Group, Italija pod imenom FERMOL Complet Killer Fru. Kvasac je čuvan u originalno zatvorenoj ambalaži (pakiranje od 500 g), sklonjenoj od izvora svjetlosti, a pakiranje je dobro zapakirano i čuvano u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C.

##### 3.1.2. Kemikalije i sirovine

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

**Tablica 1.** Popis korištenih kemikalija i sirovina

| <b>Kemikalija</b>         | <b>Stupanj čistoće</b>     | <b>Proizvođač</b>            |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 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 |
| Bagremov med              |                            | Lokalni proizvođač, Kutina   |
| Natrijev hidroksid        | > 99 %                     | Merck KgaA, Njemačka         |
| Sladni ekstrakt           | Za laboratorijsku upotrebu | Biolife, Italija             |
| Sumporna kiselina         | 96 %                       | Merck KgaA, Njemačka         |
| Tripton                   | Za laboratorijsku upotrebu | Merck KgaA, Njemačka         |

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

Tijekom ovog istraživanja, za čuvanje i održavanje radne kulture mikroorganizma te za uzgoj inokuluma korištene su kemijski definirane hranjive podloge pri čemu je sastav tekuće hranjive podloge za održavanje radne kulture i uzgoj inokuluma identičan sastavu čvrste hranjive podloge za čuvanje radne kulture kojemu se još dodaje agar (tablica 2). Tijekom preliminarnog istraživanja u tikvicama gdje je ispitan utjecaj različite početne koncentracije dodanog kvašćevog ekstrakta na tijek proizvodnje medovine te kod proizvodnje medovine u bioreaktoru, korištene su podloge na bazi bagremovog meda i vode uz dodatak glukoze i kvašćevog ekstrakta kao dodatnog izvora dušika čiji je sastav naveden u tablici 3.

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

Sastav podloge za proizvodnju medovine šaržnim postupkom u bioreaktoru te šaržnim postupkom s pritokom supstrata bio je identičan sastavu podloge u preliminarnom istraživanju uz početnu koncentraciju kvašćevog ekstrakta od 2 g/L.

**Tablica 2.** Kemijski sastav čvrste i tekuće kemijski definirane hranjive podloge za čuvanje, odnosno održavanje radne kulture i uzgoj inokuluma kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus*

| Čvrsta podloga  |                                     | Tekuća podloga  |                                     |
|-----------------|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Kemikalija      | Masena koncentracija $\gamma$ [g/L] | Kemikalija      | Masena koncentracija $\gamma$ [g/L] |
| Glukoza         | 20                                  | Glukoza         | 20                                  |
| Sladni ekstrakt | 20                                  | Sladni ekstrakt | 20                                  |
| Tripton         | 6                                   | Tripton         | 6                                   |
| Agar            | 15                                  | Agar            | -                                   |



**Tablica 3.** Kemijski sastav podloge za proizvodnju medovine pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus*

| Kemikalija       | Masena koncentracija $\gamma$ [g/L] |     |   |
|------------------|-------------------------------------|-----|---|
| Glukoza          | 40                                  |     |   |
| Kvašćev ekstrakt | 0                                   | 0,5 | 2 |
| Bagremov med     | 110                                 |     |   |

#### 3.1.4. Oprema

##### 3.1.4.1. Bioreaktor s miješalom

Proizvodnja medovine pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* provedena je šaržnim postupkom i šaržnim postupkom s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Njemačka). Bioreaktor je izgrađen od nehrđajućeg čelika s ukupnim volumenom od 30 L. Bioreaktor ima miješalo s tri turbine, a svaka turbina ima 6 ravnih lopatica. Snaga elektromotora za pokretanje miješala iznosi 0,9 kW. Bioreaktor sadrži kontrolnu jedinicu sa sustavom za mjerenje i regulaciju temperature, pH vrijednosti podloge, brzine okretaja miješala, protoka zraka, razine pjene, parcijalnog tlaka kisika u podlozi i izlaznih plinova ( $O_2$  i  $CO_2$ ) i turbidimetar. Na vrhu bioreaktora smješteni su membranski filteri za ulazni i izlazni zrak, kao i ulazi za inokulaciju i razne otopine (za regulaciju pH, razine pjene i sl.) koje se u bioreaktor dodaju pomoću ugrađenih peristaltičkih pumpi. Sterilizacija bioreaktora provodi se vodenom parom preko plašta.

##### 3.1.4.2. Uređaj za visoko učinkovitu tekućinsku kromatografiju (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC*)

Za analizu uzoraka dobivenih tijekom proizvodnje medovine korišten je uređaj za visoko učinkovitu tekućinsku kromatografiju, UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD) koji se sastoji od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Viasampler), pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija  $150 \times 7,8$  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 uz protok od 0,6 mL/min, dok je volumen analiziranog uzorka iznosio 10  $\mu$ L.

### 3.1.4.3. Ostala oprema

U tablici 4 navedeni su uređaji korišteni tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

**Tablica 4.** Popis korištenih uređaja

| <b>Uređaj</b>                          | <b>Proizvođač</b>  | <b>Namjena</b>  |
|--|--|---|
| Tehnička vaga ET-1211                  | Tehtnica Slovenija   | Vaganje sirovina i kemikalija   |
| Analitička vaga ALC210.4               | Acculab, SAD   | Vaganje kemikalija  |
| 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                                     |
| Tresilica Certomat RM                  | B. Braun Biotechn International, Sartorius group, Njemačka | Održavanje radne kulture, uzgoj inokuluma, preliminarni ekspreiment 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 vrijednosti 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 i tekuća hranjiva podloga za čuvanje, odnosno održavanje radne kulture i uzgoj inokuluma sadržavale su sve navedene komponente iz tablice 2.

Nakon odvaga i otapanja sastojaka u demineraliziranoj vodi provedena je korekcija pH vrijednosti podloga dodatkom razrijeđene sumporne (4,8 %-tne) kiseline koja je pripremljena miješanjem 1 mL 96 %-tne sumporne kiseline sa 19 mL demineralizirane vode, tako da pH vrijednost podloge bude u intervalu od 4,5 do 5,5. Tikvice su potom začepljene vatenim čepovima koji su dodatno omotani papirom i sterilizirane u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta. Po završetku sterilizacije, čvrsta hranjiva podloga prelivena je u Petrijeve zdjelice i ostavljena da se ohladi.

### 3.2.2. Priprema i održavanje inokuluma

Kako bi se pripremio inokulum čiste kulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus*, pakiranje čiste kulture otvoreno je u prisutnosti plamenika. Zatim se pomoću špatule, koja je prethodno dezinficirana 96 %-tnim etanolom, prenio mali dio suhog kvasca iz pakiranja u epruvetu sa 9 mL sterilne demineralizirane vode u svrhu rehidracije stanica kvasca. Nakon 30 minuta, rehidratirane stanice kvasca najprije su nacijepljene na čvrste hranjive podloge, pripremljene kako je opisano u poglavlju 3.2.1., s ciljem dugotrajnijeg očuvanja kulture. Podloge su zatim ostavljene u termostatu tijekom 24 h pri 28 °C kako bi stanice narasle, a potom su prebačene u hladnjak na temperaturu od 4 °C. Ostatak rehidratiranih stanica iz epruvete prebačen je u tikvicu od 50 mL u kojoj se nalazilo 30 mL tekuće hranjive podloge pripremljene na način opisan u poglavlju 3.2.1. Inokulirana tikvica ostavljena je na tresilici kroz 24 h pri 28 °C i broju okretaja tresilice od 150 o/min. Radna kultura održavana je na način da je svaka 3-4 dana 30 mL tekuće hranjive podloge za održavanje radne kulture, opisane u poglavlju 3.2.1., inokulirano s 2 mL prethodno uzgojene kulture kvasca iz drugih tikvica. Inokulirane su tikvice sve vrijeme čuvane na tresilici pri 28 °C uz broj okretaja 150 o/min.

Kako bi se uzgojio inokulum za proizvodnju medovine u tikvicama, ukupan sadržaj jedne tikvice za održavanje radne kulture od 30 mL prebačen je u novu Erlenmeyerovu tikvicu sa 100

mL tekuće hranjive podloge pripremljene na način opisan u poglavlju 3.2.1. Za uzgoj inokuluma za proizvodnju medovine u bioreaktoru s miješalom bile su potrebne ukupno 3 male tikvice sa po 30 mL suspenzije čiji je sadržaj prebačen u 3 velike Erlenmeyerove tikvice od kojih je svaka sadržavala po 200 mL tekuće hranjive podloge sastava definiranog u poglavlju 3.2.1. Inokulirane tikvice čuvane su na tresilici tijekom 24 h pri 28 °C uz broj okretaja od 150 o/min.

### 3.2.3. Priprema podloge za proizvodnju medovine u tikvicama

Podloga za proizvodnju medovine u preliminarnom istraživanju u tikvicama pripremljena u tri Erlenmeyerove tikvice, prema sastavu navedenom u tablici 3. Budući da su se tikvice međusobno razlikovale s obzirom na koncentraciju kvašćevog ekstrakta (0 g/L, 0,5 g/L i 2 g/L), kako bi se ostvario željeni sastav podloge, u tikvicama je otopljeno 0,1 g, odnosno 0,4 g kvašćevog ekstrakta u 200 mL demineralizirane vode. Začepljene tikvice s vatenim čepom koji je dodatno omotan papirom podvrgnute su sterilizaciji u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta. Nakon što su tikvice ohlađene na sobnu temperaturu, u svaku je tikvicu, prije početka preliminarnog istraživanja, u sterilnim uvjetima dodan bagremov med. Također, u tikvice s medom stavljen je i magnet te je sadržaj tikvice homogeniziran na magnetnoj miješalici.

### 3.2.4. Priprema podloge za proizvodnju medovine u bioreaktoru s miješalom

Podloge za proizvodnju medovine šaržnim postupkom te šaržnim postupkom s pritokom supstrata pripremljene su u nekoliko dijelova. Dio podloge za početni šaržni dio pripremljen je u bioreaktoru s miješalom na način da je u 5 L demineralizirane vode otopljen samo kvašćev ekstrakt tako da njegova početna koncentracija u podlozi iznosi 2 g/L. Podloga je zatim sterilizirana zajedno s bioreaktorom kroz 20 minuta pri 121 °C i tlaku od 1 bara. Nakon završetka sterilizacije, uslijedilo je hlađenje na temperaturu fermentacije (28 °C). Drugi dio podloge volumena 2,4 L kod šaržnog postupka, pripremljen je u Erlenmeyerovoj tikvici na način da kada se sadržaj tikvice prepumpa u bioreaktor, dobivena podloga u bioreaktoru (ukupnog volumena 8 L) odgovara sastavu navedenom u tablici 3. Tikvica je začepljena vatenim čepom koji je omotan papirom i sterilizirana u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta. Nakon što je podloga ohlađena na sobnu temperaturu, u tikvici je u sterilnim uvjetima otopljeno 880 g bagremovog meda nakon čega je sadržaj tikvice homogeniziran na magnetnoj miješalici. Međutim, kod šaržnog postupka s pritokom supstrata drugi dio podloge pripremljen je u tri Erlenmeyerove tikvice pri čemu je volumen podloge u jednoj tikvici iznosio 1,2 L, a u druge dvije, namijenjene za prihranjivanje bioreaktora, 600 mL. Sastav tih podloga pripremljen je tako da kada se sadržaj

svih triju tikvica prepumpa u bioreaktor, podloga u bioreaktoru (ukupnog konačnog volumena 8 L) odgovara sastavu definiranom u tablici 3 i definiranoj početnoj koncentraciji kvašćevog ekstrakta. Tikvice su zatim začepljene vatenim čepom koji je omotan papirom i sterilizirane u autoklavu 20 minuta pri 121 °C. Nakon što su ohlađene na sobnu temperaturu, u tikvici s volumenom podloge od 1,2 L otopljeno je 440 g bagremovog meda, dok je u tikvicama za prihranjivanje bioreaktora s volumenom podloge od 600 mL otopljeno 220 g bagremovog meda u sterilnim uvjetima te je sadržaj homogeniziran na magnetnoj miješalici.

### 3.2.5. Ispitivanje utjecaja različite početne koncentracije kvašćevog ekstrakta na proizvodnju medovine u tikvicama

Tijekom preliminarnog istraživanja korištene su tri Erlenmeyerove tikvice sa po 200 mL podloge čiji je postupak pripreme prethodno opisan u poglavlju 3.2.3. Nakon otapanja 22 g bagremovog meda i homogenizacije sadržaja podloge na magnetnoj miješalici, uzet je uzorak slijepe probe te su tikvice inokulirane s 20 mL prethodno uzgojenog inokuluma (10 % v/v). Nakon inokulacije ponovno je uzet uzorak, a tikvice su odložene na tresilicu pri temperaturi od 28 °C i broju okretaja tresilice od 150 o/min. Iz tikvica su izuzimani uzorci od 5 mL, tijekom prvih 10 sati uzgoja, u pravilnim vremenskim razmacima od sat vremena, a nakon toga, uzorci su izuzimani svaka 4 sata. Uzorci su najprije dobro homogenizirani na vrtložnoj miješalici, a zatim im je određena vrijednost optičke gustoće pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 600 nm. Nakon toga provedeno je centrifugiranje uzoraka tijekom 15 minuta pri broju okretaja od 4500 o/min u svrhu dobivanja supernatanta koji su nakon dekantiranja odloženi u zamrzivač. Dobiveni uzorci, odnosno supernatanti služili su za određivanje promjena koncentracija svih supstrata i produkata tijekom proizvodnje medovine u ovom istraživanju. Svi uzorci supernatanta analizirani su visoko učinkovitom tekućinskom kromatografijom. Na temelju ovog dijela istraživanja, određena je koncentracija kvašćevog ekstrakta koja je korištena u daljnjim eksperimentima.

### 3.2.6. Proizvodnja medovine šaržnim postupkom i šaržnim postupkom s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom

Nakon određivanja optimalne koncentracije kvašćevog ekstrakta za proizvodnju medovine, ispitana je mogućnost proizvodnje medovine šaržnim postupkom te šaržnim postupkom s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom. Ukupni početni volumen podloge u bioreaktoru za proizvodnju šaržnim postupkom iznosio je 8 L. Bioreaktor je zajedno sa 5 L podloge

steriliziran tijekom 20 minuta pri 121 °C i tlaku od 1 bara, dok je preostala podloga volumena 2,4 L, nakon sterilizacije u autoklavu i dodatka bagremovog meda, prebačena u bioreaktor pomoću peristaltičke pumpe. Nakon što je podloga u bioreaktoru homogenizirana, izuzet je uzorak slijepe probe te je provedena inokulacija bioreaktora prepumpavanjem 0,6 L inokuluma (7,5 % v/v) pomoću peristaltičke pumpe, uzgojenog na način opisan u poglavlju 3.2.2. Tijekom trajanja fermentacije uzorci su izuzimani u pravilnim vremenski intervalima, prvih 8 sati svakih sat vremena, a nakon toga svaka 4 sata uz prekonoćne prekide od 12 sati. Uzorci su analizirani jednako kao i kod eksperimenata sa tikvicama (poglavlje 3.2.5). Kod proizvodnje medovine šaržnim postupkom s pritokom supstrata, bioreaktor je također steriliziran s 5 L podloge nakon čega je ostatak podloge s otopljenim medom (volumena 1,2 L) prepumpan u bioreaktor na identičan način kao i kod šaržnog postupka proizvodnje. Isto tako, nakon što je izuzet uzorak slijepe probe, provedena je inokulacija bioreaktora s volumenom inokuluma od 0,6 L (7,5 % v/v). Početak ovog uzgoja identičan je kao i kod šaržnog postupka, no kako bi se izbjegla početna inhibicija rasta stanica visokom početnom koncentracijom supstrata, inicijalno je fermentacija započela sa manjim volumenom podloge i manje izvora ugljika koji je na kraju bioprocesa maseno odgovarao masi dodanog supstrata kao i kod šaržnog postupka. Tijekom ovog postupka proizvodnje medovine provedene su dvije prihrane bioreaktora dodatkom 600 mL podloge, čiji je postupak pripreme opisan u poglavlju 3.2.4., pri čemu je prva prihrana dodana nakon 24 h, a druga nakon 48 h. Tijekom oba bioprocesa, kroz prva tri sata, podloge u bioreaktoru aerirane su sterilnim zrakom pri protoku od 5 L/min. Broj okretaja miješala bio je inicijalno namješten na 400 o/min, dok je ostatak vremena broj okretaja miješala smanjen (100 o/min) s ciljem sprječavanja negativnog utjecaja površinske aeracije na tijek odvijanja proizvodnje medovine. Nadalje, obje fermentacije provedene su na temperaturi od 28 °C, a bioreaktorski je sustav opremljen 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 3.2.7. Analitičke metode

#### 3.2.7.1. *Određivanje optičke gustoće*

Tijekom preliminarnog eksperimenta u tikvicama te šaržnog postupka i šaržnog postupka s pritokom supstrata, svi su izuzeti uzorci homogenizirani na vrtložnoj miješalici, nakon čega je dio prebačen u kvarcnu kivetu koja je potom stavljena u spektrofotometar gdje se uzorcima određuje optička gustoća pri 600 nm.

#### 3.2.7.2. *Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti*

Nakon odmrzavanja, supernatanti su homogenizirani te je 750 µL supernatanta svakog uzorka pomiješano sa 750 µL 10 %-tne otopine ZnSO<sub>4</sub> u Eppendorf kiveti ukupnog volumena 2 mL. Uz pomoć vrtložne miješalice homogeniziran je sastav kivete, nakon čega je ona ostavljena u mirovanju tijekom 10 minuta kako bi se istaložili svi prisutni proteini i moguće nečistoće u uzorku. Potom su uzorci centrifugirani tijekom 5 minuta i broju okretaja od 10 000 o/min, a zatim su pripremljena željena razrjeđenja uzoraka na način prikazan u tablici 5. Uzorci izuzeti iz tikvica bili su ukupno razrijeđeni 80, 50 ili 20 puta. Nadalje, uzorci iz šaržnog postupka proizvodnje ukupno su bili razrijeđeni 75 i 25 puta, dok su uzorci izuzeti iz šaržnog postupka proizvodnje s pritokom supstrata bili razrijeđeni 50 i 25 puta. Volumen supernatanta u tablici 5 odnosi se na uzorak nakon centrifugiranja.

**Tablica 5.** Priprema 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 pripremljeni uzorci na prethodno opisani način potom su filtrirani kroz filter s veličinom pora od 0,2 µm, izravno u staklene vijale koje su korištene za UPLC analizu. Tijekom visoko učinkovite tekućinske kromatografije, protok mobilne faze kroz kolonu Rezex ROA-Organic

Acid H+ Phenomenex za vrijeme analize uzoraka iznosio je 0,6 mL/min. Temperatura u koloni bila je postavljena na 30 °C, dok je volumen injektiranog uzorka iznosio 10 µL. Rezultati dobiveni kromatografskom analizom obrađeni su u računalnom programu „OpenLAB CDS“. Svaka komponenta u uzorku detektirana je usporedbom retencijskih vremena uzoraka i standarda, a koncentracija pojedinih sastojaka izračunata je pomoću jednadžbi pravaca baždarnih dijagrama.

### 3.2.8. Pokazatelji uspješnosti procesa

U ovom istraživanju, kao pokazatelji uspješnosti procesa proizvodnje medovine određena je 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],

$\Delta S$  - 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]

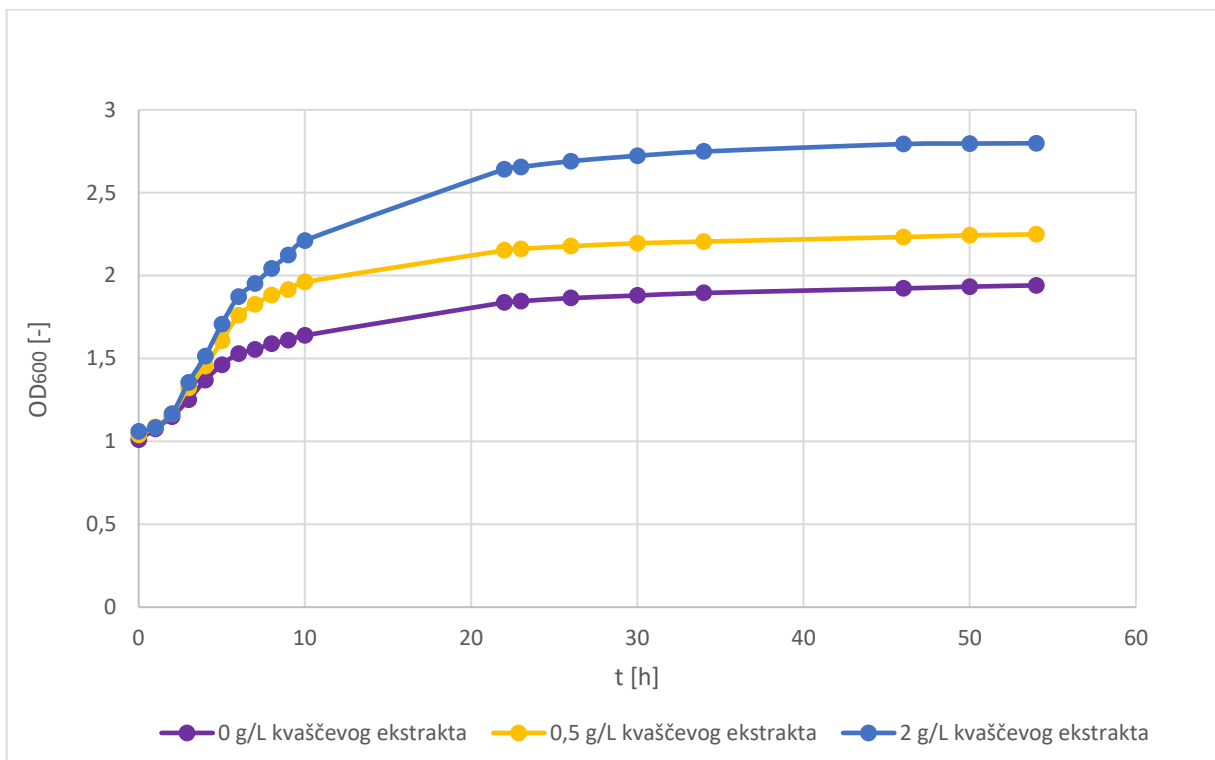


## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu izrade ovog diplomskog rada provedene su dvije vrste istraživanja proizvodnje medovine iz medne sladovine (od bagremovog meda) korištenjem kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* pri različitim početnim koncentracijama kvašćevog ekstrakta te korištenjem različitih tehnika proizvodnje. Preliminarno istraživanje provedeno je u tikvicama na tresilici pri različitim početnim koncentracijama kvašćevog ekstrakta kako bi se ispitaio njegov utjecaj na dinamiku fermentacije, potrošnju šećera i proizvodnju etanola. Na osnovu dobivenih rezultata u preliminarnom eksperimentu, prikazanih u poglavlju 4.1., odabrana je optimalna početna koncentracija kvašćevog ekstrakta pri kojoj je provedena proizvodnja medovine u bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom te šaržnim postupkom s pritokom supstrata. Cilj ovog dijela istraživanja bila je usporedba dviju različitih tehnika proizvodnje i njihovog utjecaja na pokazatelje uspješnosti bioprocasa. Rezultati opisanog istraživanja u bioreaktoru s miješalom prikazani su u poglavlju 4.2.

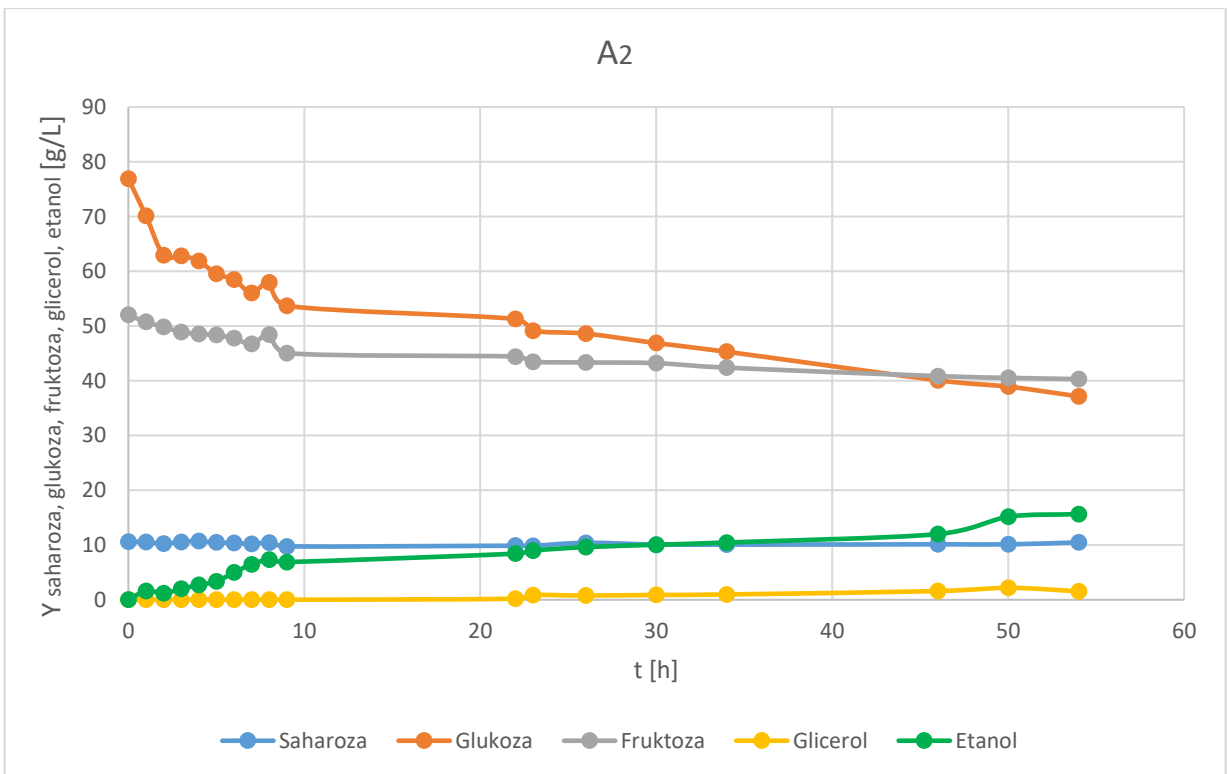
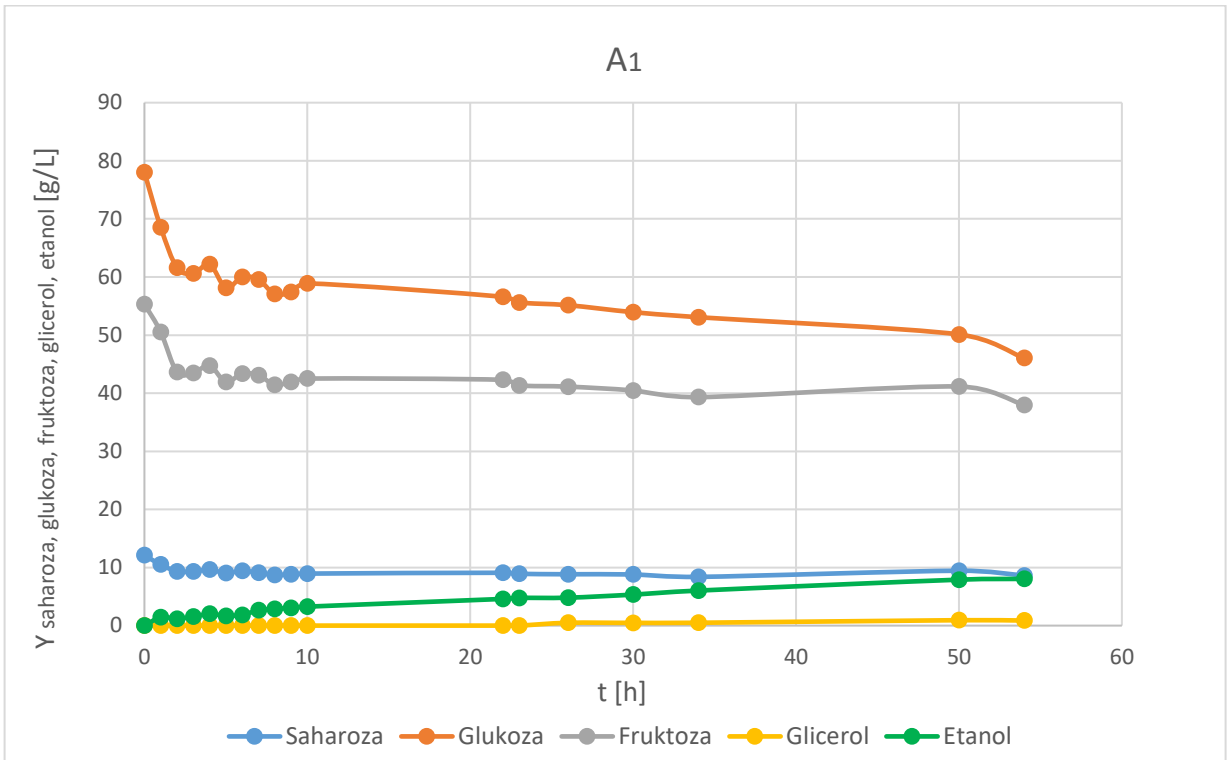
### 4.1. UTJECAJ POČETNE KONCENTRACIJE KVAŠĆEVOG EKSTRAKTA NA DINAMIKU ALKOHOLNE FERMENTACIJE MEDNE SLADOVINE

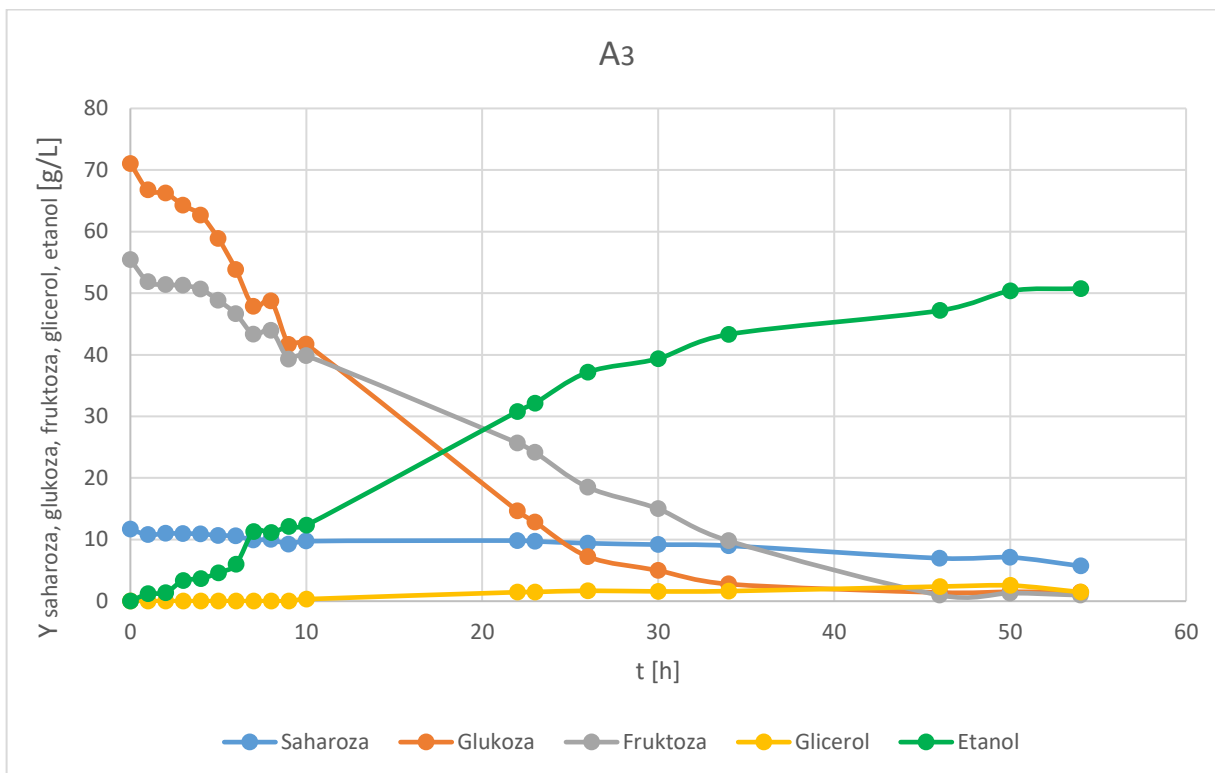
Proizvodnja medovine iz medne sladovine pripremljene od bagremovog meda provedena je pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* u mikroaerofilnim uvjetima u Erlenmeyerovim tikvicama na tresilici u termostatiranoj sobi pri temperaturi od 28 °C i broju okretaja tresilice od 150 o/min. U ovom eksperimentu ispitan je utjecaj tri različite početne koncentracije kvašćevog ekstrakta (0 g/L, 0,5 g/L i 2 g/L) na dinamiku fermentacije, potrošnju šećera i proizvodnju etanola. Tijekom procesa proizvodnje medovine praćena je promjena optičke gustoće (OD) pri 600 nm kao indirektni pokazatelj rasta kvašćeve biomase u podlozi te promjena koncentracija svih supstrata i produkata primjenom visoko učinkovite tekućinske kromatografije (UPLC).



**Slika 3.** Promjena  $OD_{600}$  vrijednosti u vremenu tijekom proizvodnje medovine iz sladovine od bagremovog meda pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* u tikvicama s različitim početnom koncentracijom kvašćevog ekstrakta

Na slici 3 prikazana je promjena  $OD_{600}$  vrijednosti u vremenu tijekom preliminarnog eksperimenta proizvodnje medovine uz različitu početnu koncentraciju kvašćevog ekstrakta. U svakoj je tikvici zabilježena vrlo slična početna vrijednost optičke gustoće, no prema slici 3 može se zaključiti da je najbrži rast stanica ostvaren u tikvici s koncentracijom kvašćevog ekstrakta od 2 g/L što potvrđuje najveći nagib te krivulje tijekom eksponencijalne faze rasta. Nadalje, u sva tri slučaja, porast vrijednosti optičke gustoće zabilježen je do 22. sata fermentacije, te se nakon toga njena vrijednost nije značajnije mijenjala do kraja eksperimenata. Iz slike 3 vidljiva je pozitivna korelacija između koncentracije kvašćevog ekstrakta koji je dodan u podlogu i maksimalne vrijednosti optičke gustoće ostvarene po završetku fermentacije čime se potvrđuje činjenica da se dodatkom kvašćevog ekstrakta osigurava dovoljan udio faktora rasta i nutrijenata potrebnih za rast kvašćeve biomase što se podudara s istraživanjem autora Thomas i Ingledew (1990). Također, dobiveni rezultati u skladu su i s novijim istraživanjima autora Schwarz i sur. (2020b) te Araújo i sur. (2020) u kojima je dokazano da je za rast stanica kvasca u mednoj sladovini neophodan dodatak suplemenata s dušikovim spojevima.





**Slika 4.** Promjena koncentracije supstrata i produkata u vremenu tijekom proizvodnje medovine iz sladovine od bagremovog meda pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* u tikvicama: Medna sladovina bez dodatka kvašćevog ekstrakta ( $A_1$ ); Medna sladovina uz dodatak 0,5 g/L kvašćevog ekstrakta ( $A_2$ ) i 2 g/L kvašćevog ekstrakta ( $A_3$ )

Rezultati dobiveni tijekom preliminarnog eksperimenta proizvodnje medovine u tikvicama uz različitu početnu koncentraciju kvašćevog ekstrakta prikazani su na slici 4. Iz dijagrama koji prikazuju promjenu koncentracije supstrata i produkata u vremenu može se uočiti da dodatak kvašćevog ekstrakta u koncentraciji od 0,5 g/L kao i kod eksperimenta gdje nije dodan kvašćev ekstrakt u podlogu, ne dolazi do značajnije promjene u dinamici odvijanja bioprocesa, štoviše rezultati ostvareni u ove dvije tikvice su vrlo slični.

Analizirajući dinamiku potrošnje supstrata, prema slici 4 može se zaključiti da je značajna promjena koncentracije supstrata vidljiva samo kod potrošnje glukoze i fruktoze, dok je promjena koncentracije saharoze u ovom dijelu istraživanja uočena samo u tikvici kod koncentracije kvašćevog ekstrakta od 2 g/L. Aktivnost invertaze zabilježena je tek nakon 34. sata kada je potrošena glukoza kao preferirani supstrat. I u ovom slučaju zabilježeno je istovremeno trošenje glukoze i fruktoze, što ukazuje na odsutnost kataboličke represije glukozom prema fruktozi. U tikvici bez kvašćevog ekstrakta, kao i uz dodatak ekstrakta od 0,5 g/L zapažena je relativno visoka koncentracija zaostalih šećera u podlozi, i to više od 50% početne koncentracije u usporedbi sa eksperimentom kada kvašćev ekstrakt nije dodan u

mednu sladovinu. U tikvici gdje je početna koncentracija kvašćevog ekstrakta bila najveća, glukoza je u potpunosti utrošena nakon 34 sata, a fruktoza nakon 46 sati. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjima autora Araújo i sur. (2022) te Mendes-Ferreira i sur. (2010) u kojima se navodi kako dodatak izvora duška kao suplementa povećava brzinu fermentacije i potrošnje šećera čime se skraćuje ukupno vrijeme trajanja bioprocesa.

Na slici 4 također je vidljiv pozitivan utjecaj povećanja početne količine kvašćevog ekstrakta na količinu proizvedenog etanola kao glavnog produkta fermentacije. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima autora Schwarz i sur. (2020b) i Araújo i sur. (2020) koji su dokazali da se dodatkom izvora dušika u podlogu postižu više koncentracije etanola u konačnom proizvodu, u odnosu na proizvodnju kada izvor dušika nije dodan u podlogu. Najviša koncentracija etanola od 50,74 g/L ostvarena je u tikvici s koncentracijom kvašćevog ekstrakta od 2 g/L nakon 54 sata proizvodnje.

Glicerol se smatra glavnim nusproduktom alkoholne fermentacije i djeluje kao osmoprotektant štiteći stanice od osmotskog stresa, a njegovo nakupljanje u podlozi varira ovisno o dostupnom dušiku i soju kvasca. Tijekom preliminarnog dijela istraživanja u tikvicama, ostvarene su niske koncentracije glicerola što je u skladu s istraživanjem autora Yue i sur. (2012). Naime, poznato je da u anaerobnim uvjetima stanice kvasca reoksidiraju NADH u NAD<sup>+</sup> proizvodnjom glicerola, no dodatkom izvora dušika koji u svom sastavu sadrži aminokiseline, kao što je kvašćev ekstrakt, znatno se smanjuje nakupljanje reduciranog koenzima NADH u stanici što posljedično rezultira nižom koncentracijom glicerola u podlozi. Nadalje, autori Schwarz i sur. (2020b) navode da prisutnost dušikovitih spojeva značajno utječe na omjer konačnih koncentracija etanola i glicerola, na način da su niži omjeri ostvareni u eksperimentima s niskim udjelom dušikovitih spojeva u podlozi te je također uočeno zaostajanje neprevrelih šećera na kraju bioprocesa. Omjeri koncentracija etanola i glicerola ostvareni tijekom ovog dijela istraživanja podudaraju se s prethodno navedenom tezom (tablica 6).

**Tablica 6.** Odnos koncentracija kvašćevog ekstrakta i ostvarenih omjera konačnih koncentracija etanola i glicerola

| Koncentracija kvašćevog ekstrakta [g/L] | Omjer etanol/glicerol [g/L / g/L] |
|---|-----------------------------------|
| 0                                       | 9,24                              |
| 0,5                                     | 10,03                             |
| 2                                       | 34,52                             |

Zaključno, u tikvici gdje je inicijalna koncentracija kvašćevog ekstrakta bila najviša ostvaren je i najveći prinos etanola od 50,74 g/L, odnosno 6,43 % v/v. U tikvici s 0,5 g/L proizvedeno je 15,64 g/L etanola ili 1,98 % v/v, dok je u tikvici bez dodatka kvašćevog ekstrakta ostvaren najniži prinos etanola od 8,04 g/L (1,02 % v/v). Također, u tikvici s koncentracijom kvašćevog ekstrakta od 2 g/L ostvaren je najveći koeficijent konverzije supstrata u produkt (0,41 g/g) kao i najveća produktivnost (0,94 g/Lh) što je prikazano u tablici 7. Na temelju rezultata eksperimenata u tikvicama može se zaključiti kako dodatak kvašćevog ekstrakta ima pozitivan utjecaj na dinamiku proizvodnje medovine kao i na pokazatelje uspješnosti.

**Tablica 7.** Pokazatelji uspješnosti procesa proizvodnje medovine iz sladovine od bagremovog meda pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* u tikvicama kod različitih početnih koncentracija kvašćevog ekstrakta

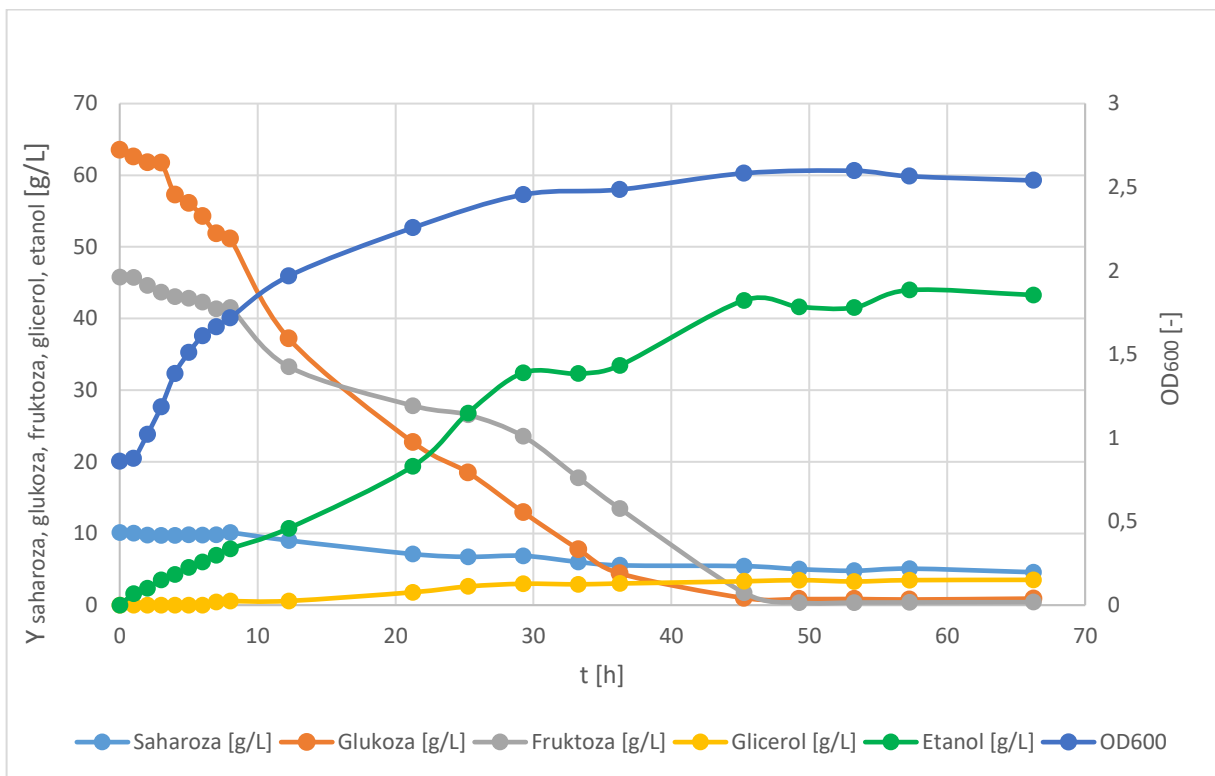
| Koncentracija kvašćevog ekstrakta [g/L] | $\Delta S$ fermentabilni šećeri [g/L] | $Y_{\text{etanol}}$ [g/L] | $\varphi_{\text{etanol}}$ (% v/v) | $Y_{\text{glicerol}}$ [g/L] | $Y_{\text{etanol/fermentabilni šećeri}}$ [g/g] | Pr [g/Lh] |
|---|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--|-----------|
| 0                                       | 49,34                                 | 8,04                      | 1,02                              | 0,87                        | 0,16   | 0,15      |
| 0,5                                     | 51,47                                 | 15,64                     | 1,98                              | 1,56                        | 0,30   | 0,29      |
| 2                                       | 130,00                                | 50,74                     | 6,43                              | 1,47                        | 0,39   | 0,94      |

## 4.2. REZULTATI PROIZVODNJE MEDOVINE ŠARŽNIM I ŠARŽNIM POSTUPKOM S PRITOKOM SUPSTRATA

Na osnovu rezultata dobivenih preliminarnim istraživanjem proizvodnje medovine iz sladovine od bagremovog meda pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* u tikvicama pri 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 iz sladovine od bagremovog meda provesti uz koncentraciju kvašćevog ekstrakta od 2 g/L. Proizvodnja medovine u bioreaktoru s miješalom provedena je šaržnim postupkom te šaržnim postupkom s pritokom supstrata s ciljem usporedbe utjecaja odabrane tehnike na dinamiku fermentacije, potrošnju šećera i konačan prinos etanola. Oba eksperimenta provedena su u bioreaktoru s miješalom na način opisan u poglavlju 3.2.5. u kontroliranim uvjetima temperature (28 °C) i pH vrijednost podloge (5,00 pH jedinica) te uz 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 zaustavljen, a brzina okretaja miješala je smanjena na brzinu od 100 o/min kako ne bi došlo do površinske aeracije. Najprije su uzorci izuzimani svakih sat vremena, a potom u razmacima od 4 sata s pauzama tijekom noći. Svi izuzeti uzorci analizirani su jednako kao i oni iz preliminarnog istraživanja.

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

Rezultati proizvodnje medovine iz sladovine od bagremovog meda s 2 g/L kvašćevog ekstrakta pomoću kvasca *S. cerevisiae ph.r. bayanus* šaržnim postupkom s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom prikazani su na slici 6.



**Slika 5.** Promjena koncentracije supstrata, produkata i OD<sub>600</sub> vrijednosti u vremenu tijekom proizvodnje medovine iz sladovine od bagremovog meda uz dodatak kvašćevog ekstrakta (2 g/L) pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* šaržnim postupkom u bioreaktoru s miješalom

Analizom dobivenih rezultata proizvodnje medovine šaržnim postupkom u bioreaktoru s miješalom prikazanih na slici 5, može se uočiti sličnost s rezultatima preliminarnog istraživanja u tikvicama uz početnu koncentraciju kvašćevog ekstrakta od 2 g/L. S obzirom na relativno kratko trajanje *lag* faze, uz visoku početnu koncentraciju šećera i prisutnost kisika u podlozi (aeracija), proizvodni mikroorganizam ima sposobnost proizvoditi etanol (Crabtree-pozitivan kvasac). S obzirom na to da je kultura kvasca uzgojena i održavana u uvjetima sličnima onim u bioreaktoru radni mikroorganizam imao je vrlo kratku prilagodbu na uvjete u bioreaktoru, a aeracija podloge dodatno je utjecala na brži prirast biomase što je vidljivo iz krivulje promjene vrijednosti optičke gustoće u ovisnosti o vremenu. Značajnija promjena ovih vrijednosti zabilježena je do nekih 40 sati uzgoja te se na nakon tog vremena OD<sub>600</sub> vrijednost nije značajnije mijenjala.

Što se tiče krivulja potrošnje glavnih supstrata u podlozi, na slici 5 vidljivo je da je dinamika potrošnje glukoze i fruktoze slična onoj iz preliminarnog eksperimenta u tikvici pri koncentraciji kvašćevog ekstrakta od 2 g/L. Već od samog početka fermentacije opaža se simultano trošenje



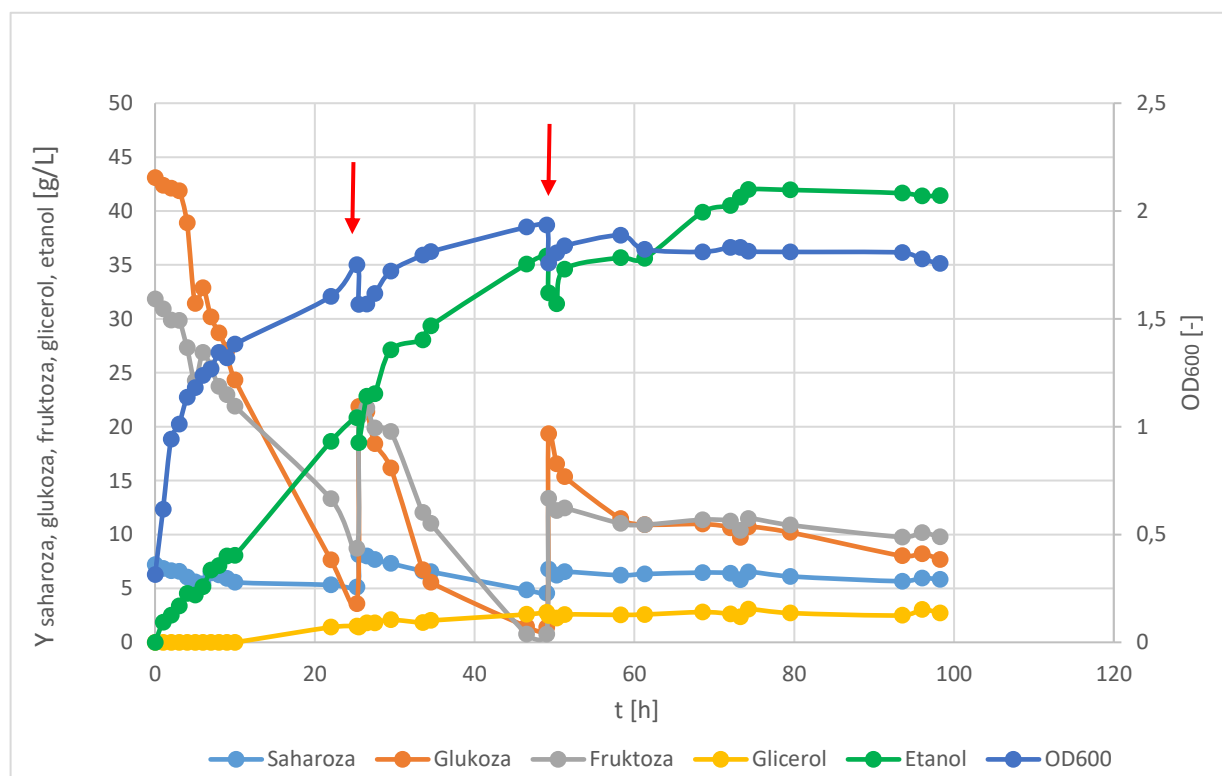
glukoze i fruktoze što ukazuje na činjenicu da prisutnost glukoze nema negativan utjecaj na brzinu potrošnje fruktoze. Od početka do kraja eksperimenta ukupno je utrošeno 108,10 g/L fermentabilnih šećera, pri čemu su glukoza i fruktoza gotovo u potpunosti potrošene nakon otprilike 45 sati, što je u skladu s vremenom ulaska stanica u stacionarnu fazu. Također, zabilježena je i blaga promjena koncentracije saharoze što ukazuje na prisutnost invertazne aktivnosti. Do 10-og sata nije zabilježena promjena u njejoj koncentraciji, no od 11. do 36. sata uzgoja, kada se koncentracija glukoze i fruktoze gotovo prepолоvila u odnosu na početne vrijednosti, došlo je simultanog trošenja sva tri supstrata. S obzirom na to da saharoza nije preferabilni izbor ugljika u odnosu na glukozu i fruktozu te zbog nepovoljnih uvjeta prema kraju bioprocasa, najvjerojatnije nije došlo do značajnije aktivnosti invertaze, primarno zbog negativnog utjecaja visokih koncentracija etanola u podlozi kao što je to zabilježeno i u nekim drugim istraživanjima (Zech i Görisch, 1995).

Što se tiče promjena u koncentracijama etanola i glicerola, iz slike 5 vidljivo je da je proizvodnja etanola u korelaciji sa prisutnosti glukoze i fruktoze u podlozi. Maksimalna koncentracija alkohola u podlozi ostvarena je kada su glukoza i fruktoza u potpunosti potrošene. Porast koncentracije etanola zabilježen je od samog početka eksperimenta što potvrđuje činjenicu da se radi o Crabtree-pozitivnom kvascu. Naime, prema Starowicz i Granvogl (2020) poznato je da se tradicionalni postupak proizvodnje medovine provodi u omjeru meda i vode koji najčešće iznosi 1:0,5; 1:1, 1:2, ili 1:3 i traje od nekoliko mjeseci pa čak i godinu dana zbog visoke koncentracije šećera, no tijekom ovog istraživanja medna sladovina bila je razrijeđena u omjeru 1:8 (med : voda) zbog vremenskog ograničenja provođenja istraživanja i dostupnog meda, stoga je u podlogu dodana čista glukoza (40 g/L) koja je zasigurno doprinijela većoj učinkovitosti i produktivnosti fermentacije iz razloga što kvasac najprije troši lakše dostupne monosaharide iz podloge, a potom disaharide koje je potrebno hidrolizirati. Proizvodnja medovine šaržnim postupkom trajala je otprilike 66 sati pri čemu je proizvedeno 44,23 g/L etanola uz koeficijent konverzije supstrata u produkt od 0,38 g/g i produktivnost procesa od 0,65 g/Lh.

I u ovom slučaju ostvaren je nizak prinos glicerola kao glavnog nusprodukta fermentacije, što je u skladu s istraživanjem koje su proveli autori Yue i sur. (2012) gdje je dokazano da dodatak izvora dušika u obliku kvašćevog ekstrakta povećava brzinu alkoholne fermentacije i utječe na smanjenje koncentracije glicerola u odnosu na druge izvore dušika. Dodatkom aminokiselina u podlogu (iz kvašćevog ekstrakta) smanjuje se nakupljanje NADH koenzima u stanici što posljedično dovodi do smanjene potrebe za njegovom reoksidacijom kroz sintezu glicerola. Osim toga, na proizvodnju glicerola mogu utjecati i drugi čimbenici poput pH

vrijednosti, temperature, vrste supstrata, trajanja postupka aeracije, dodatka sumporovog dioksida, kao i vrsta korištenog kvasca i slično (Remize i sur. 2000). U usporedbi s rezultatima preliminarnog istraživanja, kod šaržnog postupka proizvodnje ostvaren je veći prinos glicerola ( $Y_{\text{glicerol}} = 3,31 \text{ g/L}$ ), stoga je postignut i niži omjer etanola i glicerola (13,08) što je u skladu s rezultatima istraživanja autora Yalcin i Ozbas, (2008).

Rezultati proizvodnje medovine dobiveni šaržnim postupkom s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom prikazani su na slici 6.



**Slika 6.** Promjena koncentracije supstrata, produkata i  $OD_{600}$  vrijednosti u vremenu tijekom proizvodnje medovine iz sladovine od bagremovog meda uz dodatak kvašćevog ekstrakta (2 g/L) uz pomoć kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* šaržnim postupkom s pritokom supstrata u bioreaktoru s miješalom

Tijekom šaržnog postupka s pritokom supstrata ukupna količina supstrata dodanog tijekom fermentacije bila je identična količini supstrata koja je dodana na početku fermentacije gdje je korišten šaržni postupak, s time da je u ovom slučaju masa dodanog supstrata raspoređena u nekoliko obroka, kako bi se izbjegla inicijalna inhibicija njegovom visokom koncentracijom. Na

ovaj način, osim izbjegavanja potencijalne inhibicije moguće je i ostvariti bolje pokazatelje uspješnosti procesa (Ribeiro i sur., 2020). S obzirom na neke od navedenih prednosti ove tehnike proizvodnje na slici 6 može se uočiti nešto bolja dinamika potrošnje glukoze i fruktoze koje su u ovom slučaju skoro u potpunosti utrošene već nakon 24 h. U tom trenutku izvršena je prva prihrana sa svježom hranjivom podlogom (600 mL) što je za posljedicu imalo promjenu koncentracije supstrata u podlozi kao i blagi pad  $OD_{600}$  vrijednosti uzorka (razrjeđenje podloge). Isti je postupak ponovljen je i nakon 48 h od početka procesa, a fermentacija je zaustavljena nakon što više nije zabilježena promjena koncentracije supstrata u podlozi (98. sat). Ono što je uočeno nakon druge prihrane jest znatnije usporavanje potrošnje supstrata tako da su na kraju u podlozi zaostala sva tri izvora ugljika. Na ovakav ishod mogla je utjecati dugotrajnija izloženost stanica kvasca visokim koncentracijama etanola koji negativno utječe na staničnu membranu na način da povećava njenu propusnost uzrokujući ili manju aktivnost stanica ili autolizu (Nabais i sur., 1988). Također, visok udio etanola tijekom fermentacije utječe na fluidnost plazmatske membrane, što se očituje gubitkom ionske ravnoteže i promjenama u razinama i sastavu membranskih fosfolipida i ergosterola u staničnoj membrani (Vamvakas i Kapos, 2020; Saini i sur., 2018).

U usporedbi sa šaržnim postupkom, faza prilagodbe bila je još i nešto kraća ako se promatra promjena  $OD_{600}$  vrijednosti (slika 6). Viša inicijalna koncentracija supstrata u podlozi, između ostalog, također može pridonijeti većem osmotskom stresu stanica što za posljedicu može imati dulje trajanje lag faze (Hamill i sur., 2020). Prema slici 6, može se zaključiti da stanice ulaze u stacionarnu fazu rasta nakon otprilike 60 sati uzgoja, dok je nakon 96. sata zabilježen pad  $OD_{600}$  vrijednosti iz čega se može pretpostaviti da je započela faza odumiranja stanica.

U konačnici, u šaržnom dijelu bioprocasa ukupno je utrošeno oko 64 g/L šećera, a nakon prve prihrane svježom podlogom 44,21 g/L. Međutim, nakon druge prihrane bioreaktora, na slici 6 uočava se znatno manja brzina potrošnje supstrata, stoga je u ovom stupnju potrošeno je samo 16,19 g/L šećera, dok se nakon 60. sata koncentracija supstrata zanemarivo smanjivala. Uzrok tome također bi mogao biti etanol koji pri visokim koncentracijama kod stanica kvasca dovodi do smanjenog unosa hranjivih tvari (Saini i sur., 2018). Dinamika promjene koncentracije saharoze slična je onoj kao i kod šaržnog postupka s time da, najvjerojatnije, izloženost visokim koncentracijama etanola, također je imao negativan utjecaj na invertaznu aktivnost.

Dinamika proizvodnje etanola, s druge strane, tijekom šaržnog postupka s prihranjivanjem puno je bolja, čime je potvrđen negativan utjecaj previsoke početne koncentracije supstrata na njegovu proizvodnju. Smanjenja početna količina fermentabilnih šećera utječe i na brzinu

prirasta biomase, pogotovo u početku kada je hranjiva podloga aerirana, što je za posljedicu imalo povoljan utjecaj na ishod eksperimenta. Konačni prinos etanola u medovini proizvedenoj šaržnim postupkom s pritokom supstrata iznosio je 41,42 g/L, odnosno 5,25 % v/v. Ostvareni prinos niži je u odnosu na šaržni postupak (43,28 g/L, tj. 5,46 % v/v) te je uglavnom uzrokovan slabijom kvašćevom aktivnošću prvenstveno zbog negativnog djelovanja visokih koncentracija etanola na stanice.

Koncentracija, odnosno prinos glicerola bio je u skladu s očekivanjima i rezultatima ostvarenim u tokom izrade ovog diplomskog rada. Korelacija između dodatka kvašćevog ekstrakta u podlogu i količine proizvedenog glicerola u skladu je sa spomenutim istraživanjem autora Yue i sur. (2012).

U tablici 8 sumarno su prikazani ukupni pokazatelji uspješnosti procesa proizvodnje medovine šaržnim postupkom, kao i šaržnim postupkom s pritokom supstrata uz dodatak 2 g/L kvašćevog ekstrakta pomoću kvasca *S. cerevisiae ph.r. bayanus* u bioreaktoru s miješalom. Na temelju ostvarenih rezultata mogu se vidjeti sličnosti kod ova dva pristupa proizvodnje medovine. Ukupno gledano, tokom šaržnog postupka s pritokom supstrata utrošeno je više šećera u odnosu na klasični šaržni postupak, no na kraju je kod šaržnog postupka postignuta nešto viša koncentracija etanola (43,28 g/L) u odnosu na šaržni postupak s pritokom (41,42 g/L). Također, kod šaržnog postupka s pritokom supstrata zabilježen je i niži koeficijent konverzije supstrata u produkt kao i niži prinos glicerola, a niža produktivnost procesa posljedica je nešto dužeg vremena trajanja fermentacije.

**Tablica 8.** Pokazatelji uspješnosti procesa proizvodnje medovine iz sladovine od bagremovog meda uz dodatak 2 g/L kvašćevog ekstrakta pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae ph.r. bayanus* u bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom i šaržnim postupkom s pritokom supstrata

| Tehnika proizvodnje                         | $\Delta S$<br>fermentabilni<br>šećeri<br>[g/L] | $Y_{\text{etanol}}$<br>[g/L] | $\varphi_{\text{etanol}}$<br>(% v/v) | $Y_{\text{glicerol}}$<br>[g/L] | $Y_{\text{etanol/fermentabilni}}^{\text{šećeri}}$<br>[g/g] | Pr<br>[g/Lh] |
|---|--|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--|--------------|
| <b>Šaržni postupak</b>                      | 113,53   | 43,28                        | 5,49                                 | 3,31                           | 0,38   | 0,65         |
| <b>Šaržni postupak s pritokom supstrata</b> | 125,11   | 41,42                        | 5,25                                 | 2,73                           | 0,33   | 0,42         |

Konačno, u tablici 9 navedeni su udjeli pojedinih šećera u gramima na 100 g bagremovog meda korištenog u ovom istraživanju, ne uzimajući u obzir dodatak čiste glukoze jer je njezina koncentracija kod oba postupka proizvodnje bila ista (40 g/L). Kod šaržnog procesa proizvodnje medovine ukupna početna koncentracija supstrata iznosila je 119,45 g/L, dok je kod šaržnog postupka s pritokom supstrata bila znatno niža (82,10 g/L) iz razloga što je ostatak šećera dodan kroz dvije prihrane. Također, iz tablice 9 može se uočiti da se i udio pojedinih šećera u podlozi razlikuje tijekom ova dva postupka proizvodnje. Naime, zbog određenih fizikalnih svojstva meda (velika viskoznost i nehomogenost), rukovanje s medom je prilično zahtjevno, stoga su vrlo moguće pogreške prilikom vaganja meda i kvantitativnog prebacivanja u tikvicu za otapanje. Visok udio fruktoze te nizak udio saharoze upućuju da korišteni bagremov med u ovom istraživanju nije bio kristaliziran. Također, ova se činjenica može potvrditi omjerom fruktoze i glukoze koji je tijekom oba postupka proizvodnje bio znatno veći od 1 čime se dokazuje da je med bio u nekristaliziranom stanju (Mohamed i sur., 2018; Muhammad, 2016).

**Tablica 9.** Udio šećera fruktoze, glukoze, saharoze [g] na 100 g bagremovog meda dodanog po svakoj proizvodnji te vrijednost omjera fruktoze i glukoze (svi rezultati u tablici prikazani su bez dodatka čiste glukoze)

|                         | <b>Šaržni postupak</b> | <b>Šaržni postupak s pritokom supstrata</b> |
|-------------------------|------------------------|---|
| Fruktoza [g/100 g meda] | 41,63                  | 51,61                                       |
| Glukoza [g/100 g meda]  | 21,40                  | 35,75                                       |
| Saharoza [g/100 g meda] | 9,20                   | 11,58                                       |
| Fruktoza/Glukoza [g/g]  | 1,94                   | 1,44  |

## 5. ZAKLJUČCI

1. Tijekom preliminarnog istraživanja ispitan je utjecaj dodatka kvašćevog ekstrakta kao suplementa na dinamiku odvijanja fermentacije u tikvicama. U eksperimentu s najvećom koncentracijom kvašćevog ekstrakta (2 g/L) ostvaren je najveći prinos etanola koji je iznosio 50,74 g/L, odnosno 6,43 % v/v, u tikvici s 0,5 g/L kvašćevog ekstrakta 15,64 g/L (1,98 % v/v), a u tikvici bez dodatka kvašćevog ekstrakta 8,04 g/L, tj. 1,02 % v/v. Također, najveća produktivnost ostvarena je kod najveće početne koncentracije dodanog kvašćevog ekstrakta (0,94 g/Lh).
2. Na temelju rezultata ostvarenih u preliminarnom istraživanju, za proizvodnju medovine u bioreaktoru s miješalom korištena je podloga s dodatkom 2 g/L kvašćevog ekstrakta. Pokazatelji uspješnosti proizvodnje, prinos i koeficijent konverzije bili su slični u ova eksperimenta; 43,28 g/L (5,49 % v/v) kod šaržnog, u odnosu na 41,42 g/L (5,25 % v/v) kod šaržnog postupka s pritokom supstrata, dok je produktivnost proizvodnje etanola iznosila 0,65 g/Lh za šaržni, odnosno 0,42 g/Lh za postupak s pritokom supstrata.
3. U konačnici postignuti su vrlo slični pokazatelji uspješnosti osim niže produktivnosti u slučaju šaržnog postupka s pritokom supstrata što je najvjerojatnije posljedica prekomjerne izloženosti stanica kvasca visokim koncentracijama etanola u kasnijoj fazi proizvodnje medovine. S obzirom na to da velik broj čimbenika ima utjecaj na dinamiku fermentacije, potrošnju šećera i konačni udio etanola, nužno je provesti dodatna istraživanja s ciljem daljnje optimizacije procesa proizvodnje medovine.

## 6. LITERATURA

Alaerjani WMA, Abu-Melha S, Alshareef RMH, Al-Farhan BS, Ghramh HA, Al-Shehri BMA i sur. (2022) Biochemical reactions and their biological contributions in honey. *Molecules* **27**. <https://doi.org/10.3390/molecules27154719>

Araújo GS, Gutiérrez MP, Sampaio KF, de Souza SMA, Rodrigues R de CLB, i Martínez EA (2020) Mead production by *Saccharomyces cerevisiae* safbrew t-58 and *Saccharomyces bayanus* (Premier Blanc and Premier Cuvée): Effect of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Extract Concentration. *Appl Biochem and Biotechnol.* **191**, 212–225. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03267-0>

Araújo GS, Ribeiro GO, de Souza SMA, da Silva GP, de Carvalho GBM, Bispo JAC i sur. (2022) Rice (*Oryza sativa*) bran and soybean (*Glycine max*) meal: Unconventional supplements in the mead production. *Food Technol. Biotechnol.* **60**, 89–98. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.01.22.7183>

Benetole BM, Gomes WPC, Generoso EP, de Campos SV, Harder LNC, Arthur V, i sur. (2021) Mead of natural fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **11**, 1–6. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.3628>

Bisson LF, Fan Q, Walker GA (2016) Sugar and glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. U: Ramos J, Sychrová H, Kschischo M (ured.) *Advances in experimental medicine and biology*. Springer New York LLC, str 125–168. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_6)

Bolmanis E, Dubencovs K, Suleiko A, Vanags J (2023) Model Predictive control—A stand out among competitors for fed-batch fermentation improvement. *Fermentation* **9**, 206. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030206>

Codex Alimentarius Commission (2001). Revised Codex Standard for Honey, Codex STAN 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2 (2001) Amend. 1 (2019), Amend. 2 (2022).

Czabaj S, Kawa-Rygielska J, Kucharska AZ, Kliks J (2017) Effects of mead wort heat treatment on the mead fermentation process and antioxidant activity. *Molecules* **22**. <https://doi.org/10.3390/molecules22050803>

Czipa N, Phillips CJC, Kovács B (2019) Composition of acacia honeys following processing, storage and adulteration. *J Food Sci Technol* **56**, 1245–1255. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03587-y>

Eglinton JM, McWilliam SJ, Fogarty MW, Francis IL, Kwiatkowski MJ, Høj PB, i sur. (2000) The effect of *Saccharomyces bayanus*-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. *Aust J Grape Wine Res* **6**, 190–196. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00178.x>

Eliodório KP, Cunha GC de G e., Müller C, Lucaroni AC, Giudici R, Walker GM, i sur. (2019) Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. *Adv. Appl. Microbiol.* **109**, 61–119. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.10.002>

García G, Moreno JF, Bernal T, Posso F, Delgado-Noboa J (2024) Kinetic modeling of mead production. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **82**, 170–178. <https://doi.org/10.1080/03610470.2023.2228190>

García-Ríos E, Guillamón JM (2019) Mechanisms of yeast adaptation to wine fermentations. U: Sá-Correia I (ured.) *Yeasts in biotechnology and human health*. Springer Cham, str. 37–59. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-13035-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-13035-0_2)

Grba S, Stehlik-Tomas V, Stanzer D, Mrvčić J, Marić V, Orlić S, i sur. (2010) Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji. *Plejada*, Zagreb, str. 23-34.

Hamill PG, Stevenson A, McMullan PE, Williams JP, Lewis AD, Stevenson KE i sur. (2020) Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Sci. rep.* **10**, 5948. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>

Herjavec S (2019) *Vinarsto*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 225-230.

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>

Yalcin SK, Ozbas ZY (2008) Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from turkey. *Brazilian Journal of Microbiology* **39**, 325–332. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200024>

Knapić S (2021) Utjecaj odabranih sojeva kvasaca na rast toksikotvornih plijesni (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.



Le Jeune C, Lollier M, Demuyter C, Erny C, Legras JL, Aigle M i sur. (2007) Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Res* **7**, 540–549. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00207.x>

Ribeiro MVDS, Olivo JE, Eller MR (2020) Fed-batch and staggered nutrient addition: An improved method for mead production. *Industrial Biotechnology* **16**, 133-138. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0038>

Rodicio R, Heinisch JJ (2009) Sugar metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. U: König H, Uden G, Fröhlich J (ured.) *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer, Berlin/Heidelberg, str. 113-34. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_6)

Kowallik V (2015) *The natural ecology of Saccharomyces* (Doctoral dissertation), Max-Planck research group experimental evolution, Max Planck Institute for evolutionary biology, Max Planck society, Plön.

Ma T, Zhao H, Liu C, Zhu M, Gao H, Cheng N, i sur. (2019) Discrimination of natural mature acacia honey based on multi-physicochemical parameters combined with chemometric analysis. *Molecules* **24**, 2674. <https://doi.org/10.3390/molecules24142674>

Mădaş NM, Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Bonta V, Bobiş O, Fauconnier ML i sur. (2019) Volatile profile and physico-chemical analysis of acacia honey for geographical origin and nutritional value determination. *Foods* **8**, 445. <https://doi.org/10.3390/foods8100445>

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

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>

Mohamed AS, Abdah MA, Ramasamy K, Hasan MH, Hamimi IA, Zolkapli E i sur. (2018) Physicochemical analysis and sugar profiling of Acacia honey. *Malaysian Journal of Microscopy* **14**, 157-164.

Muhammad A (2016) Potential biological activity of acacia honey. *Front. Biosci.* **8**, 351–357. <https://doi.org/10.2741/771>

- Nabais RC, Sá-Correia I, Viegas CA, Novais JM (1988) Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2439-2446. <https://doi.org/10.1128/aem.54.10.2439-2446.1988>
- Pereira AP, Dias T, Andrade J, Ramalhosa E, Estevinho LM (2009) Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 2057–2063. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.028>
- Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia A (2015) Mead production: Effect of nitrogen supplementation on growth, fermentation profile and aroma formation by yeasts in mead fermentation. *J. Inst. Brew.* **121**, 122–128. <https://doi.org/10.1002/jib.184>
- Pereira AP, Oliveira JM, Mendes-Ferreira A, Estevinho LM, Mendes-Faia A (2017) Mead and other fermented beverages. U: Pandey A, Du G, Sanromán MÁ, Soccol CR, Dussap CG (ured.) Current developments in biotechnology and bioengineering: Food and beverages industry. Elsevier Inc., 407–434. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00014-5>
- Pérez-Través L, Lopes CA, Querol A, Barrio E (2014) On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: Hybridization and potential hybrid speciation. *PLoS One* **9**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093729>
- Pfeiffer T, Morley A (2014) An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front. Mol. Biosci.* **1**, 17. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>
- Pravilnik (2015) Pravilnik o medu. Narodne novine 53, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015\\_05\\_53\\_1029.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_53_1029.html) Pristupljeno 14. srpnja 2024.
- Queiroz EL, De Almeida TB, E Silva AKC, Anunciação AS, De Souza SMA, Martínez EA (2024) Optimization of the fermentation process for mead production: a review. *Cuadernos de Educación y Desarrollo* **16**, 3103–3133. <https://doi.org/10.55905/cuadv16n1-162>
- Ramalhosa E, Gomes T, Pereira AP, Dias T, Estevinho LM (2011) Mead production: Tradition versus modernity. U: Toldrá F (ured.) Advances in food and nutrition research, Academic Press Inc., str. 101–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384927-4.00004-X>
- Remize F, Sablayrolles JM, Dequin S (2000) Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 371-378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00964.x>

- Saini P, Beniwal A, Kokkiligadda A, Vij S (2018) Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. *Process Biochem.* **72**,1–12. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.001> [Get rights and content](#)
- Schwarz LV, Marcon AR, Delamare APL, Agostini F, Moura S, Echeverrigaray S (2020a) Selection of low nitrogen demand yeast strains and their impact on the physicochemical and volatile composition of mead. *J Food Sci Technol* **57**, 2840–2851. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04316-6>
- Schwarz LV, Marcon AR, Delamare APL, Echeverrigaray S (2020b) Influence of nitrogen, minerals and vitamins supplementation on honey wine production using response surface methodology. *J Apic Res* **60**, 57–66. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1793277>
- Simão L, Wanderley BR da SM, Vieira MPT, Haas IC da S, Amboni RD de MC, Fritzen-Freire CB (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>
- Sottit C, Salor-Torregrosa JM, Moreno-Garcia J, Peinado J, Mauricio JC, Moreno J, i sur. (2019) Using *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. *Eur. Food Res. Technol.* **245**, 2705–2714. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03384-z>
- Primeena N, Gunasekaran S, Murugesan R (2014) Optimization of fermentation conditions for producing Indian rock bee (*Apis dorsata*) mead using response surface methodology. *J. Appl. Nat. Sci.* **6**, 366-370. <https://doi.org/10.31018/jans.v6i2.429>
- 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. Technol.* **106**, 402–416. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.006>
- Stewart GG (2016) *Saccharomyces* species in the production of beer. *Beverages* **2**, 34. <https://doi.org/10.3390/beverages2040034>
- 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>

Thomas KC, Ingledew WM (1990) Fuel alcohol production: Effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2046-2050. <https://doi.org/10.1128/aem.56.7.2046-2050.1990>

Vamvakas SS, Kapalos J (2020) Factors affecting yeast ethanol tolerance and fermentation efficiency. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 114. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02881-8>

Vincent VL, Vinod V, Purbajyoti DZ, Dwivedi RR, Lallawmsangi P, William C i sur. (2021) *Saccharomyces* and their potential applications in food and food processing industries. U: Abdel-Azeem AM, Yadav AN, Yadav N, Usmani Z (ured.) Industrially important fungi for sustainable development. fungal biology. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5_12)

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 Bioenergy* **39**, 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.041>

Zech M, Ggrisch H (1995) Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: Reversible inactivation by components of industrial molasses media. *Enzyme Microb. Technol.* **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                       | $R^2(-)$ |
|-----------------|----------------------------------|--|----------|
| <u>Saharoza</u> | 4,819                            | $A = 123790 \gamma_{\text{saharoza}} - 145,45$   | 0,9998   |
| <u>Glukoza</u>  | 5,200                            | $A = 140381,12 \gamma_{\text{glukoza}} - 157,58$ | 1,000    |
| <u>Fruktoza</u> | 6,065                            | $A = 141560 \gamma_{\text{fruktoza}} - 1278,7$   | 0,9997   |
| <u>Glicerol</u> | 7,692                            | $A = 115438 \gamma_{\text{glicerol}} + 2603,5$   | 0,9999   |
| <u>Etanol</u>   | 9,374                            | $A = 484161 \gamma_{\text{etanol}} + 737,97$     | 0,9999   |

A = površina

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Petra Tuksar 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.

Petra Tuksar

---

Vlastoručni potpis