

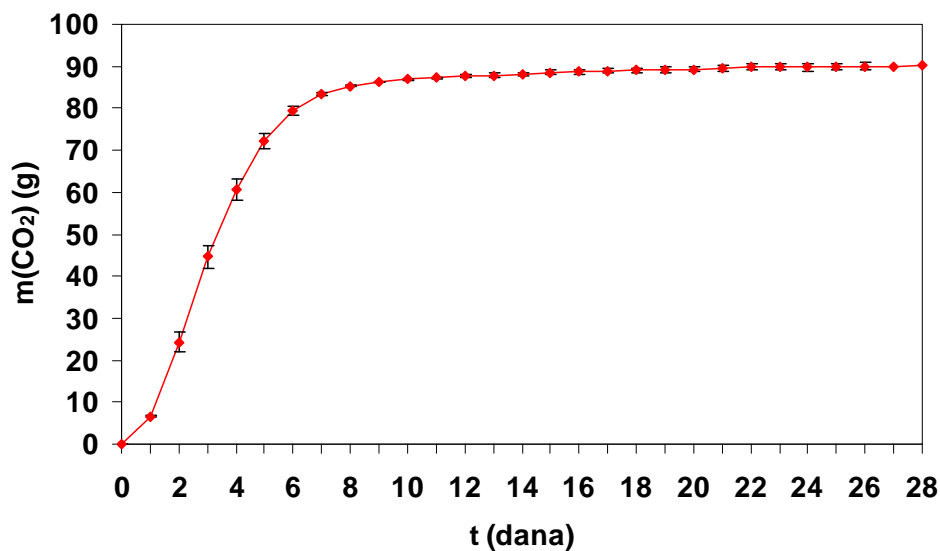
PRAĆENJE FERMENTACIJSKE SPOSOBNOSTI VINSKIH KVASACA U SINTETSKOJ PODLOZI

PRINCIP:

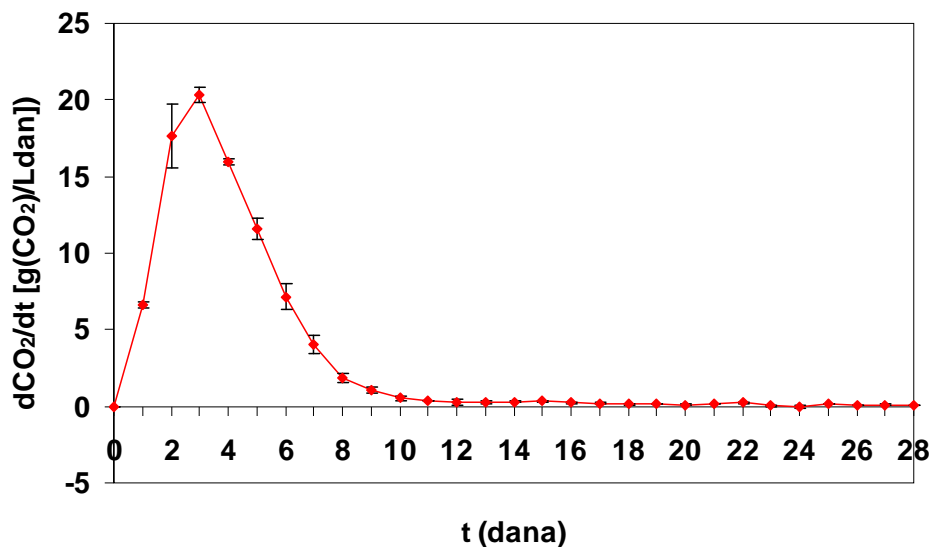
Fermentacijska aktivnost kvasaca u sintetskoj podlozi bit će praćena pomoću promjene mase tikvica s vrelnjačama, do postizanja konstantne mase. Fermentacija će biti provedena uz različite procesne parametre kako bi se uočili njihovi utjecaji, tako da će se usporediti utjecaj odabranog inokuluma i veličine inokuluma, utjecaj SO_2 , koncentracije šećera i dušika u podlozi te utjecaj temperature na fermentaciju. Analize podloge mogu se provesti na početku i na kraju fermentacije (koncentracija šećera i etanola, pH, ukupne kiseline, hlapljive kiseline, SO_2 , ...)

Do promjene mase tikvica s inokuliranom podlogom dolazi zbog oslobađanja CO_2 nastalog alkoholnom fermentacijom, te zbog isparavanja vode. Da bi se napravila korekcija za isparenu vodu koristi se kontrolna tikvica s vodom i vrelnjačom (slijepa proba).

Rezultati praćenja tijekom fermentacije prikazuju se grafički, a rezultati kemijskih analiza početne i fermentirane podloge prikazuju se u tablicama. Primjeri grafičkog prikaza rezultata (fermentacijska aktivnost kvasca u podlozi i promjena specifične brzine fermentacije) prikazani su na slikama 1 i 2.



Slika 1. Fermentacijska aktivnost kvasca (točke označavaju srednje vrijednosti za tri tikvice, a vertikalne crte prikazuju standardne devijacije).



Slika 7. Promjena specifične brzine fermentacije (točke označavaju srednje vrijednosti za tri tikvice, a vertikalne crte prikazuju standardne devijacije).

PODLOGA:

Zbog niske cijene i dostupnosti tijekom cijele godine koristit ćemo sintetsku podlogu VP4 sljedećeg sastava u g/L:

Kvašćev ekstrakt	2
Pepton	20
KH ₂ PO ₄	1
Glukoza monohidrat	200 (odgovara 181,82 g glukoze)
Limunska kiselina monohidrat	9
Natrijev citrat dihidrat	4,26
(pH vrijednost 3,6)	

U podlogama s različitim koncentracijama glukoze koristimo različite koncentracije glukoza-monohidrata (150, 175, 200 i 220 g/L) (pokus C). Da bi se istražio utjecaj dušika na fermentaciju, koristit će se podloge s različitim koncentracijama kvašćevog ekstrakta i peptona (pokus F).

Radi istraživanja utjecaja temperature i računanja korigirane mase CO₂ koristit će se kontrolne tikvice (slijepe probe) s 330 mL vode inubirane pri različitim temperaturama fermentacije.

PLAN POKUSA:

A) Utjecaj veličine inokuluma na fermentaciju – tikvice **A1, A2, A3** (odvagati kvasac, dodati ga u 330 mL sintetske podloge, bez prethodnog sumporenja) + kontrola KS

A1: 0,33 g kvasca

A2: 0,22 g kvasca

A3: 0,11 g kvasca

B) Utjecaj sumporenja na fermentaciju – tikvice **B1, B2, B3** (dodati odvagano količinu vinobrana, dodati 0,33 g kvasca u 330 mL sumporene sintetske podloge) - kontrola KS (sobna temperatura)
- usporediti s tikvicom **A1** (ista količina inokuluma, bez sumpora)

B1: 100 mg/L vinobrana

B2: 200 mg/L vinobrana

B3: 400 mg/L vinobrana

C) Utjecaj koncentracije šećera na fermentaciju – tikvice **C1, C2, C3** (0,33 g kvasca + sintetska podloga s različitim koncentracijama šećera, bez sumpora) - kontrola KS (sobna temperatura)
- usporediti s tikvicom **A1** (ista količina inokuluma, bez sumpora, 200 g/L glukoza monohidrata tj. 181,82 g/L glukoze)

C1: 150 g/L glukoza monohidrata (136,37 g/L glukoze)

C2: 175 g/L glukoza monohidrata (159,10 g/L glukoze)

C3: 220 g/L glukoza monohidrata (200,01 g/L glukoze)

D) Utjecaj temperature na fermentaciju – tikvice **A1, D1, D2, D3, D4** (0,33 g kvasca + 330 mL sintetske podloge s 200 g/L glukoza monohidrata, bez sumpora) - inkubirano na različitim temperaturama. Usporediti s tikvicom **A1** (sobna temperatura) - kontrola KS (sobna temperatura)

D1: 28 °C (termostat) – kontrola K28

D2: 37 °C (termostat) – kontrola K37

D3: 4 °C (hladnjak) – kontrola K4

E) Utjecaj odabranog soja inokuluma na fermentaciju – tikvice **A1, E1, E2, E3, E4** (0,33 g kvasca + 330 mL sintetske podloge s 200 g/L glukoza monohidrata, bez sumpora) - (kontrola KS - sobna temperatura)

- usporediti s tikvicom A1 (soj M)

E1: soj R

E2: soj U

E3: STARI - soj predugo čuvan ili čuvan u neodgovarajućim uvjetima.

F) Utjecaj koncentracije dušika na fermentaciju – tikvice A1, F1, F2, F3, F4

(0,33 g kvasca + 330 mL sintetske podloge s 200 g/L glukoza monohidrata i s različitim koncentracijama dušika, bez sumpora) - (kontrola KS - sobna temperatura)

- usporediti s tikvicom A1 koja sadrži 2 g/L kvašćevog ekstrakta i 20 g/L peptona (inokuliran soj M)

F1: bez kvašćevog ekstrakta i peptona

F2: 0,5 g/L kvašćevog ekstrakta i 5 g/L peptona

F3: 1 g/L kvašćevog ekstrakta i 10 g/L peptona

F4: 1,5 g/L kvašćevog ekstrakta i 15 g/L peptona

Svaka grupa studenata bit će podijeljena u podgrupe (A,B,C,D,E,F) od kojih svaka provodi jedan dio pokusa, računa odgovarajuće podatke, izrađuje grafički prikaz rezultata (fermentacijska aktivnost kvasca u podlozi i promjena specifične brzine fermentacije) te komentira dobivene rezultate. Potom svi studenti zajednički donose zaključke na temelju svih podataka prikazanih grafovima.

POSTAVLJANJE POKUSA:

1. Po potrebi dodati vinobran (pokus B) i pritom paziti da ne zaostane na grlu i stijenkama tikvice, dobro ga otopitite ponovo začepiti vatenim čeopm.
2. Za svaku Erlenmeyerovu tikvicu odvagati odgovarajuću masu komercijalnog suhog kvasca.
3. Potom u svaku tikvicu koja sadrži 330 mL podloge dodati kvasac (i pritom paziti da ne zaostane na grlu tikvice) te začepiti vrelnjačama napunjenim vodom (dobro namjestiti vrelnjače i na spoju omotati parafilmom).
4. Za svaku radnu temperaturu pripremamo slijepu probu (po jednu kontrolnu tikvicu s 330 mL vode, koja je također začepljena vrelnjačom), koja se važe se zajedno s ostalim tikvicama. Koristimo sljedeće oznake za pojedine temperature: 4 °C (kontrola K4), sobna temperatura (20 °C, kontrola K20) 28 °C (kontrola K28) i 37 °C (kontrola K37).
5. Izvagati inokulirane tikvice s vrelnjačama i odgovarajuće kontrolne tikvice (slijepe probe) i zabilježiti njihove početne mase. Vrijeme proteklo od početka fermentacije i odvage zapisujte u odgovarajuću tablicu (zapisane vrijednosti koriste se za proračun).
6. Nakon vaganja, fermentacijske tikvice zatvorene vrelnjačama i slijepe probe inkubirajte pri odgovarajućoj temperaturi i svakodnevno zapisujte odvage svih tikvica. Također vizualno uočite promjene koje se događaju unutar tikvica i upišite u rubriku napomene (mjehurići

unutar fermentacijske podloge, „vjenčić“ na površini, pjena na cijeloj površini, mjehurići u vreljnjači).

7. Fermentacijsku aktivnost kvasaca pratimo preko promjene mase tikvica, do postizanja konstantne mase. Važite tijekom fermentacije u odgovarajućim vremenskim intervalima (po mogućnosti 24 sata).
8. Za svaku fermentacijsku tikvicu računa se korigirana masa CO₂ (prema formuli 1), tako da se od gubitka mase pojedine fermentacijske tikvice oduzme masa isparene vode iz kontrolne tikvice.
9. Također se računaju i specifične brzine fermentacije (prema formuli 2)
10. Nakon završetka fermentacije (kada se masa oslobođenog CO₂ ne mijenja tijekom 4 dana) sadržaj tikvica centrifugirajte 10 minuta pri 6000 okretaja u minuti kako bi odvojili supernatant od kvasca.
11. Supernatant analizirajte u skladu s metodama koje se primjenjuju za analizu vina (koncentracija šećera i etanola, pH, ukupne kiseline, hlapljive kiseline, SO₂, ...) i rezultate prikažite u tablici 1.
12. Izračunajte stupanj prevrelosti na temelju koncentracije šećera na početku i na kraju fermentacije.

$$\text{Stupanj prevrelosti} = \frac{c_1 - c_2}{c_1} \cdot 100\% \quad [\%]$$

c_1 – koncentracija reducirajućih šećera na početku fermentacije [g/L]

c_2 – koncentracija reducirajućih šećera na kraju fermentacije [g/L]

13. Promotrite mikroskopski izgled kvasca i odredite udjele živih i mrtvih stanica bojenjem metilenskim modrilom.

Tablica 1. Kemijski sastav fermentirane podloge.

	Analitičke vrijednosti	Srednja vrijednost	σ
γ (šećera) [g/L]			
γ (ukupnih kiselina) [g/L]			
γ (hlapljivih kiselina) [g/L]			
ϕ (etanola) [% vol.]			
Stupanj prevrenja [%]			
pH			

RAČUNANJE MASE CO₂ OSLOBOĐENOG U POKUSIMA FERMENTACIJE

Masu proizvedenog CO₂ (m), oslobođenog iz tikvice, izračunajte oduzimanjem promjene mase tikvice s vodom, koja je služila kao slijepa proba, od promjene mase tikvica u kojima je provedena fermentacija.

$$m = m_1 - m_2 \quad (1)$$

m = masa proizvedenog CO₂ u fermentacijskoj tikvici [g]

m₁ = gubitak mase tikvice (razlika mase tikvice između dva mjerenja) [g]

m₂ = razlika mase kontrolne tikvice s vodom između dva mjerenja [g]

Brzina nastajanja CO₂ određena je tako da je masa CO₂ oslobođenog u određenom vremenskom intervalu podijeljena s trajanjem tog intervala i volumenom podloge:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{\Delta m}{V \cdot \Delta t} \quad (2)$$

dCO₂/dt = brzina nastajanja CO₂ [g/Lh]

Δm = masa CO₂ oslobođenog u vremenskom intervalu Δt [g]

Δt = vremenski interval između dva mjerenja [h]

V = volumen podloge [L]

PRIKAZ REZULTATA:

Na temelju odvaga tikvica i izračunatih razlika masa napravite grafički prikaz rezultata:

- fermentacijske krivulje (na apscisi je prikazano vrijeme, a na ordinati masa CO₂ oslobođenog od početka fermentacije i izraženog u gramima)
- krivulje specifičnih brzina fermentacije (na apscisi je vrijeme, a na ordinati se prikazuje dCO₂/dt, izraženo kao g CO₂/Lh)

Rezultate kemijskih analiza početne i fermentirane podloge prikažite u tablicama.