

I. GIMNAZIJA V CELJU

VPLIV TEMPERATURE NA POTEK FERMENTACIJE

Autorja:

*Jure Črepinšek, 2. d
Manja Mlakar, 3. e*

Mentorica:

*Majca Plewnik Žnidarec,
prof. kemije*

*Mestna občina Celje, Mladi za Celje
Celje, 2009*

KAZALO

	stran
ZAHVALE	7
1 POVZETEK	8
2 UVOD	9
2.1 Zgodovina uporabe fermentacije v živilski industriji	9
2.2 Splošno o fermentaciji	9
2.3 Glive kvasovke.....	10
2.3.1 Rastne krivulje gliv kvasovk	12
2.4 Vino.....	12
2.5 Namen dela	13
2.6 Hipoteze	13
3 EKSPERIMENTALNO DELO	14
3.1 Materiali	14
3.2 Kemikalije	14
3.3 Inventar	15
3.4 Merilni instrumenti	15
3.5 Metode dela.....	16
3.5.1 Delo z literaturo	16
3.5.2 Vpliv koncentracije sladkorja in kvasa na potek fermentacije	16
3.5.3 Merjenje sproščenega CO ₂	17
3.5.4 Vpliv temperature okolice na potek fermentacije	18
3.5.5 Priprava in umerjanje vodnih kopeli	18
3.5.6 Stiskanje grozdja	19
3.5.7 Nastavitev poskusov fermentacij pri nastavljeni temperaturi na vodnih kopelih	20
3.5.7.1 Priprava zamaškov	20
3.5.7.2 Priprava nasičene raztopine baritovice	21
3.5.7.3 Popravljanje gladine bučk	21
3.5.7.4 Dodajanje selekcioniranih kvasovk	21
3.5.7.5 Priprava bučk s sladkornimi raztopinami	22
3.5.8 Merjenje sladkorne stopnje z refraktometrom	23
3.5.9 Določevanje specifične teže vina s piknometrom.....	24
3.5.10 Določevanje kislin v vinu s titracijo	24
3.5.11 Kromatografija.....	25
3.5.11.1 Plinska kromatografija (GC)	26
3.5.12 Polnjenje pridelanega vina.....	28
3.5.13 Oblikovanje in izdelava etikete.....	28
3.5.14 Analiza rezultatov	28
3.6 Meritve.....	29
3.6.1 Vpliv koncentracije sladkorja in kvasa na potek fermentacije	29
3.6.2 Merjenje sproščenega CO ₂	30

3.6.3 Vpliv temperature okolice na potek fermentacije	31
3.6.4 Poskusi nadzorovanih fermentacij mošta in sladkorni34 raztopin na vodnih kopelih.....	34
3.6.5 Merjenje sladkorne stopnje z refraktometrom	37
3.6.6 Določevanje specifične teže vina s piknometrom.....	39
3.6.7 Določevanje kislin v vinu s titracijo	39
3.6.8 Plinska kromatografija	40
4 REZULTATI.....	42
4.1 Vpliv koncentracije sladkorja in kvasa na potek fermentacije	42
4.2 Prostornina sproščenega CO ₂ pri fermentaciji.....	42
4.3 Vpliv temperature okolice na potek fermentacije	43
4.4 Poskusi nadzorovanih fermentacij mošta in sladkornih raztopin na vodnih kopelih	44
4.5 Specifične teže vin in vsebnost titracijskih kislin	45
4.6 Sestava fermentiranih vzorcev – vin	46
5 ZAKLJUČEK.....	47
6 LITERATURA IN VIRI	49
PRILOGE	50
PRILOGA I: Korelacijska tabela med gostoto mošta, relativno gostoto, sladkorno stopnjo mošta.....	50
PRILOGA II: Kromatogrami sestavin v vzorcih i identifikacija	51
PRILOGA III: Kromatogrami vzorcev	52

SEZNAM SLIKOVNEGA GRADIVA

	stran
Slika 1: Alkoholno vrenje pri vzhajanju testa	9
Slika 2: Grozdje ledene trgateve	14
Slika 3: Bučke	15
Slika 4: Piknometer	15
Slika 5: Precizna tehtnica	15
Slika 6: Plinski kromatogograf.....	16
Slika 7: Glukozna raztopina in refraktometer	17
Slika 8: Merjenje volumna sproščenega CO ₂ med fermentacijo	17
Slika 9: Merjenje temperature med fermentacijo.....	17
Slika 10: Vodna kopel	19
Slika 11: Laški rizling	19
Slika 12: Stiskalnica	19
Slika 13: Stisnjen grozdni sok.....	19
Slika 14: Priprava zamaškov za bučke.....	21
Slika 15: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Slika 16: Graduacijska črta	24
Slika 17: Kromatogram vzorca s komponentami A, B, C, D	26
Slika 18: Zgradba plinskega kromatografa	27
Slika 19: Injektor in kolona pri plinskem kromatografu.....	27
Slika 20: Potovanje mobilne faze.....	28

SEZNAM PREGLEDNIC

	stran
Preglednica 1: Uporabljene kemikalije.....	14
Preglednica 2: Vpliv temperature in sestave sladkornih raztopin na potek fermentacije	18
Preglednica 3: Vpliv različnih sladkorjev enakih koncentracij z dodanim kvasom na hitrost fermentacije	29
Preglednica 4: Merjenje temperature fermentacije glukoze raztopine s senzorjem preko Vernierjevega vmesnika.....	30
Preglednica 5: Vpliv različnih koncentracij sladkorja in kvasa na hitrost fermentacije (20-22 °C).....	31
Preglednica 6: Vpliv različnih koncentracij sladkorja in kvasa na hitrost fermentacije (8-10 °C).....	32
Preglednica 7: Vpliv uporabe enakih koncentracij kvasa in sladkorjev (glukoze in saharoze) na potek fermentacije.....	33
Preglednica 8: Merjenje temperature med fermentacijo na vodnih kopelih (7. januar)	34
Preglednica 9: Merjenje temperature med fermentacijo na vodnih kopelih (8. januar)	34
Preglednica 10: Merjenje temperature med fermentacijo na vodnih kopelih (9. januar)	35
Preglednica 11: Merjenje temperature med fermentacijo na vodnih kopelih (12. januar)	35
Preglednica 12: Merjenje temperature med fermentacijo na vodnih kopelih (13. januar)	36
Preglednica 13: Potreben čas za zaključek fermentacije grozdnega soka na vodnih kopelih in pH vrednosti produktov	36
Preglednica 14: Merjenje temperature med fermentacijo v vzorcih glukoze raztopin v vodnih kopelih.....	37
Preglednica 15: Trajanje fermentacije vzorcev grozdnega soka v odvisnosti od temperature okolice	39
Preglednica 16: Specifične teže pridobljenih vin 6. marec	39
Preglednica 17: Specifične teže pridobljenih vin 20. marca	39
Preglednica 18: Porabe NaOH pri določevanju vsebnosti titracijskih kislin v vinu; 6. februar	39
Preglednica 19: Porabe NaOH pri določevanju vsebnosti titracijskih kislin v vinu; 20. marec	39
Preglednica 20: Sestava pridobljenega vina v laboratoriju (dodajanje	

kvasovk, 33°C)	40
Preglednica 21: Sestava vina iz vinske kleti (dodajanje kvasovk, 8-10 °C)	41
Preglednica 22: Sestava surogata (sladkor, kvas, voda; 22 °C).....	41
Preglednica 23: Specifične teže in titracijske kisline vin 6. marec	45
Preglednica 24: Specifične teže in titracijske kisline vin 20. marec	45

SEZNAM UPORABLJENIH MATEMATIČNIH OBRAZCEV

	stran
Obrazec (1): Izračun masne koncentracije	16
Obrazec (2): Izračun specifične teže vina	24
Obrazec (3): Izračun titracijskih kislin v vinu	25
Obrazec (4): Izračun retencijskega časa.....	28

ZAHVALE

Rada bi se zahvalila mentorici prof. Mojci Plevnik Žnidarec, ki nama je bila v veliko pomoč ne samo pri izvajanju eksperimentalnega dela, povezanega z raziskovalno nalogo, ampak tudi pri usklajevanju raziskovalnih dejavnosti z vsakodnevnimi šolskimi obveznostmi. Brez njene velikodušne pomoči te raziskovalne naloge danes ne bi bilo pred vami.

V šolskem laboratoriju nama je bila ves čas v veliko pomoč s svojimi praktičnimi nasveti ga. Darja Farčnik. Prav tako nama je pomagala pri iskanju ustreznega laboratorijskega inventarja in sestavljanju aparatur.

Zahvalila bi se tudi prof. Marčičevi za vsa navodila, kako narediti dobro raziskovalno nalogo.

Posebna zahvala ing. Beati Turnšek s Šolskega centra Celje za izposojlo vodnih kopeli, v katerih smo izvajali eksperimentalni del raziskovalne naloge.

Prav tako se zahvaljujema g. Radu Brglezu za grozdje, dr. Marjanu Donku in podjetju Etol d.o.o. za koordinacijo in opravljene kvantitativne analize naših produktov fermentacije.

1 POVZETEK

Fermentacija je biokemijski, eksotermen proces, ki ga aktivno uporabljajo v živilski tehnologiji, v proizvodnji mlečnih izdelkov in alkoholnih pijač. Z našo raziskovalno nalogo smo želeli ugotoviti, kako na potek fermentacije vplivajo dejavniki, kot so vrsta sladkorja in kvasa, koncentracija sladkorja in kvasa ter temperatura okolice, v kateri teče proces. Vsi dejavniki namreč odločilno vplivajo na hitrost fermentacije in sestavo končnega produkta. Nalogo smo razdelili v dve fazi. V prvi fazi smo iskali odgovore na zastavljena vprašanja, v proučevanju fermentacij sladkornih raztopin. V drugi fazi smo izvedli eksperimente z moštom, ki smo ga stisnili v šolskem laboratoriju. Izbrali smo grozdje sorte laški rizling, ki je bilo vzgojeno za potrebe ledene trgateve, v vinorodnem okolišu Slovenske Konjice. V tej fazi nas je zanimalo ali lahko izpeljemo fermentacijo pripravljenih vzorcev mošta na temperaturno vodenih kopelih in kako temperatura vodene fermentacije vpliva na njeno hitrost. Med raziskovalnim delom smo prišli do številnih praktičnih ugotovitev, ki se navezujejo na teoretično pridobljena znanja iz predmetnih področij biologije, fizike in kemije. Njegovo kakovost smo preverjali s številnimi kemijskimi analizami. V procesu raziskovanja smo tako pridelali kakovostno vino. Določili smo tudi vsebnost njegovih sestavin, z metodo plinske kromatografije v kombinaciji z masno spektroskopijo (GC-MS), s pomočjo podjetja Etol d.o.o.

2 UVOD

2.1 Zgodovina uporabe fermentacije v živilski industriji

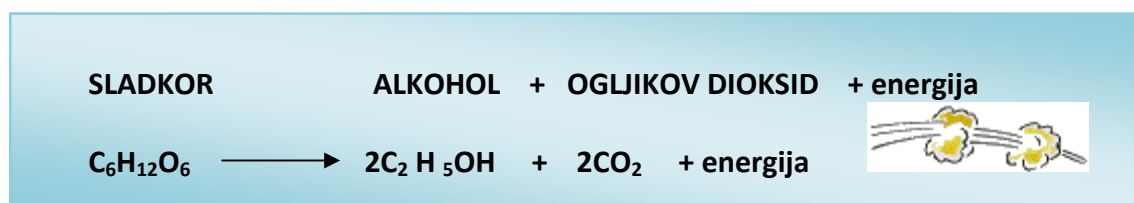
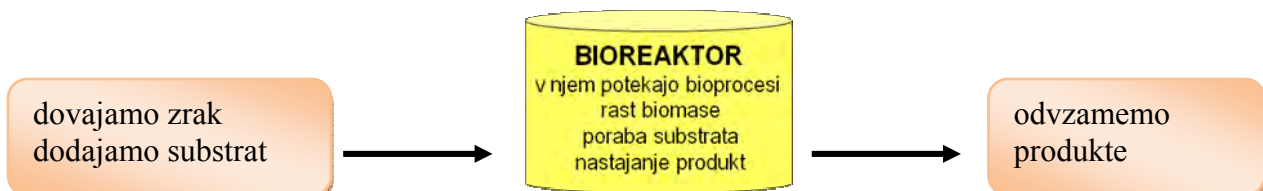
Fermentacija je poznana že vsaj 9000 let, vendar jo kljub navidezni preprostosti nenehno izpopolnjujejo. Prvi, ki so dokazano izdelovali alkoholne pijače, so bili stari Babilonci, ki so fermentacijo poznali že okoli leta 7000 pred Kristusom. Znali so izdelovati pivo, ki se je nato razširilo v Egipt, kjer je poleg kruha in čebule sestavljaj vsakodnevni jedilnik povprečnega kmeta.

Prvi, ki je dokazal, da fermentacijo izvajajo živi organizmi, mikroskopsko majhne glive kvasovke, je bil Louis Pasteur v 19. stoletju.

Danes k razvoju proizvodnje alkoholnih pijač vse več prispevajo molekularna genetika, biokemija in kemijski inženiring.

2.2 Splošno o fermentaciji

Fermentacija je biokemijska reakcija katalize, pri kateri je končni prejemnik vodikovih elektronov in protonov organska snov. Pri fermentaciji sodelujejo glive kvasovke, mikroskopsko majhne enocelične glive. Glavna produkta alkoholnega vrenja sta etanol in ogljikov dioksid. Med samo reakcijo naraste temperatura, torej je reakcija eksotermna. V grozdju sta večinoma prisotni dve vrsti sladkorjev, glukoza in fruktoza. Obe sta heksozi, kar pomeni, da ena njuna molekula vsebuje 6 ogljikovih atomov. Alkoholno vrenje pri večini gliv kvasovk poteka le v anaerobnem okolju, torej brez prisotnosti kisika. V primeru prisotnosti kisika se reakcije nadaljujejo z oetnokislinskim vrenjem, pri katerem iz etanola nastaneta etanojska kislina in voda. Glive kvasovke ne morejo razgraditi vsega sladkorja v raztopini. Ko koncentracija alkohola doseže neko kritično mejo, npr. 9-15 % oziroma pri nekaterih tudi do 18 %, se vrenje ustavi, saj glive kvasovke odmrejo, ker niso odporne (rezistentne) na tako visoke koncentracije etanola.

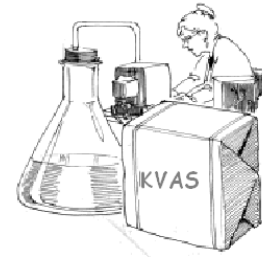


Slika 1: Alkoholno vrenje pri vzhajanju testa

Etanol se v največji meri uporablja kot sredstvo za podaljšanje obstojnosti hrane. Ker je v večjih koncentracijah močno škodljiv bakterijam, lahko uničimo bakterijsko floro v živilih, ne da bi jih bilo potrebno segrevati ali jim dodajati kemične snovi. To metodo že uporabljajo ponekod v pekovski in slaščičarski industriji. Pred toplotno obdelavo izdelek poškropijo z etanolom, ki uniči bakterije v njem, v samem procesu toplotne obdelave pa se razporedi po celem izdelku, zaradi dokaj nizkega vrelišča pa izpari, zato končani izdelki ne vsebujejo povečanih količin alkohola.

V tej raziskovalni nalogi smo bolj natančno proučevali vpliv temperature na potek fermentacije. Na potek fermentacije vplivajo namreč številni dejavniki. Ti pa so:

- ✓ temperatura,
- ✓ prisotnost kisika (anaerobni ali aerobni pogoji),
- ✓ dnevna in druga svetloba,
- ✓ sestava mikroflore mošta,
- ✓ sestava mošta,
- ✓ vsebnost CO₂ in
- ✓ tlak v posodi.



Temperatura fermentacije je eden najpomembnejših dejavnikov, ki odločilno vpliva na trajanje procesa. Po ocenah strokovnjakov se fermentacija začneja pri višjih temperaturah, je intenzivnejša in se tudi prej zaključi kot pri nižjih temperaturah. Optimalna temperatura fermentacije je med 17-29 °C. Temperature nad 35 °C običajno vodijo do prekinitve procesa, posledica pa je precejšnja količina nepovrtega sladkorja in nizka vsebnost alkohola. Mi smo poskušali ugotoviti, pri kateri temperaturi poteka proces najhitreje in kako temperatura vpliva na sestavo končnega produkta. S svojimi dognanji bi lahko pomagali našim vinogradnikom h konkurenčnosti na tržišču kakovostnih vin.

Prisotnost kisika (aeracija) pospeši fermentacijo, sicer se lahko zgodi, da sladkor ne povre v celoti. Vina z dodanim kisikom se hitreje zbistrijo, saj naj bi vsebovala manj dušikovih spojin.

Izjemnega pomena je sestava mikroflore v moštu, saj so na grozdnih jagodah naseljeni številni mikroorganizmi, med katerimi so glive kvasovke. Med njimi lahko pride do sinergijskega delovanja, druga drugo pri aktivnostih spodbudijo ali pa se zavirajo.

Zadnji pomemben dejavnik je kemijska sestava mošta, na katero vplivajo vsebnost sladkorjev, kislin (jabolčna, citronska, vinska, jantarjeva...), fenolne spojine in alkoholi. Najboljša fermentacija poteče, če ima mošt vsebnost sladkorjev med 150-250 g/l.

2.3 Glive kvasovke

Kvasovke so mikroskopsko majhna bitja, večinoma enocelične prave glive, ki se razmnožujejo z brstenjem. Povzročijo alkoholno vrenje – fermentacijo. Iz grozdnega sladkorja namreč proizvajajo alkohol pod anaerobnimi pogoji. Imajo zelo dobre fermentativne sposobnosti, kar je razlog, da jih je človek začel uporabljati pri proizvodnji alkoholnih pijač. V proizvodnji vina se uporabljajo le tiste iz rodu *Saccharomyces*, ker med glivami kvasovkami najhitreje izvajajo fermentacijo.

Za ljudi so pomembne predvsem v proizvodnji piva, vina, pekovskega kvasa, destilatov in drugih živilskih izdelkov. V znanosti jih uporabljajo za izdelavo gojišč za druge mikroorganizme.

Lastnosti kvasovk za komercialno izvajanje fermentacije:

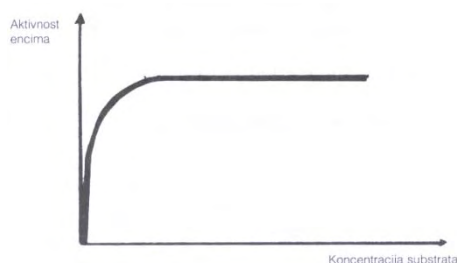
- ✓ hiter začetek alkoholnega vrenja;
- ✓ alkoholno vrenje mora biti enakomerno, brez zastojev in ne preburno;
- ✓ nastajati mora čim manj hlapnih kislin in čim manj pene;

- ✓ ne smejo proizvajati elementarnega žvepla, žveplovodika ali preveč žveplovega oksida;
- ✓ osmotolerantnost (toleranca na višje koncentracije raztopljenih sladkorjev);
- ✓ toleranca na manjše in srednje velike koncentracije etanola.

Fermentacijo vedno začnejo kvasovke s šibko vrelnostjo, ki so prisotne na površini grozdnih jagod. Po približno petih dneh vretja prevladajo močno vrelnostne kvasovke, saj koncentracije etanola takrat dosežejo 3-4 %, kar šibko vrelnostne kvasovke ovira pri nadaljnjem razmnoževanju in delovanju. Za njimi nastopijo močno vrelnostne kvasovke, iz rodu *Saccharomyces* – selekcionirane kvasovke, ki jih dodajamo ob začetku fermentacije. Le-te predelajo sladkor v etanol, dokler njegova koncentracija ne doseže vrednosti 12 %, v nekaterih skrajnih primerih tudi 16-18 %.

Selekcionirane kvasovke dajo vinu posebno aromo in značilno kemično sestavo. Za različne sorte vina se uporabljajo različne mešanice selekcioniranih gliv kvasovk. Kvasovke so pravzaprav biokatalizatorji, saj katalizirajo specifično kemijsko reakcijo. Na njihovo aktivno delovanje vplivajo številni dejavniki (količina substrata, temperatura in pH).

a) Količina substrata (snovi, na katero delujejo encimi)



Graf 1: Aktivnost encima v odvisnosti od koncentracije substrata

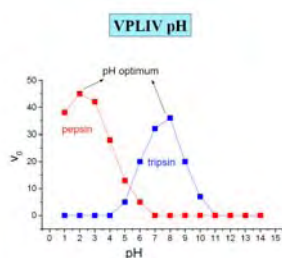
b) Temperatura

Vsak encim ima temperaturni minimum, maksimum in optimum. Aktivnost encimov narašča z naraščanjem temperature, vendar le do določene točke, tj. temperaturnega maksimuma encima. Ker je del encima beljakovina, lahko ta zaradi previsoke temperature denaturira, zato encim izgubi svojo katalitično sposobnost in aktivnost.

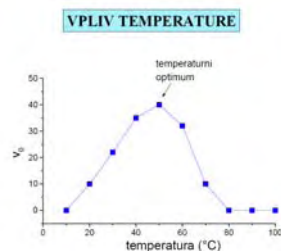
c) Kislost okolja – pH stopnja

Za encime je značilno specifično delovanje, kar pomeni, da lahko katalizirajo samo eno vrsto kemijske reakcije. Vsak encim lahko deluje le v ustreznem pH območju, pri katerem je njegova aktivnost največja.

Aktivnost encimov je močno odvisna od koncentracije oksonijevih ionov. Glede na to lahko določimo pH-vrednost za območja, v katerih delujejo. Kadar se pomaknemo iz optimalnega pH območja določenega encima, se njegova aktivnost zmanjša.



Graf 2: Vpliv pH na delovanje encima

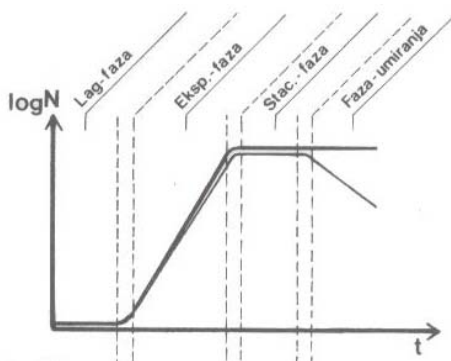


Graf 3: Vpliv temperature na delovanje encima

2.3.1 Faze rastne krivulje gliv kvasovk

Mikroorganizmi se namnožijo do trenutka, ko se pogoji za rast izčrpajo in prične koncentracija biomase padati. Spremljanje koncentracije oz. števila celic ali biomase v gojišču daje značilno krivuljo, ki jo imenujemo rastna krivulja (graf 4):

- lag faza ali faza prilagajanja,
- faza pospešene rasti,
- logaritemska ali eksponentna faza rasti,
- faza pojemajoče rasti,
- stacionarna faza,
- faza odmiranja kulture.



Graf 4: Rastna krivulja gliv kvasovk

2.4 Vino

Vino je pridelek, pridobljen s popolnim ali delnim alkoholnim vrenjem svežega grozdja, drozge ali grozdnega mošta plemenite vinske trte. V pridelavo vina spadajo trgatev, predelava grozdja v vino, nega vina in priprava za promet. Pri tem moramo ravnati z grozdem, moštom, drozgo in vinom tako, da se razvijejo in ohranijo naravne, v grozdu vsebovane značilne sestavine in da se ustvari za promet sposobno in obstojno vino.

Po kakovosti vina razvrstimo v:

- ✓ mirna vina,
- ✓ peneča vina,
- ✓ biser vina in
- ✓ gazirana vina.

Mirna vina se delijo še v dva razreda in sicer:

1. razred namiznih vin (namizna in deželna vina) in
2. razred kakovostnih vin z zaščitnim geografskim poreklom:
 - ✓ vrhunsko vino,
 - ✓ vrhunsko vino pozna trgatev,
 - ✓ vrhunsko vino izbor,
 - ✓ vrhunsko vino jagodni izbor,



- ✓ vrhunsko vino suhi jagodni izbor,
- ✓ vrhunsko ledeno vino in
- ✓ vrhunsko arhivsko vino.

Po času trgatve in načinu pridelave in nege pa razvrstimo vina v mlada in barrique vina (zorijo v 225 litrskih hrastovih sodih); (Bajt, 2001, str.123-124).

2.5 Namen dela

Fermentacija je kemijska reakcija. Za kemijske reakcije velja določena kinetika. Na hitrost kemijskih reakcij vplivata dva pomembna dejavnika, temperatura in koncentracija. Pri višji temperaturi poteče reakcija hitreje, kar pojasnimo s teorijo trkov delcev. Delci se pri višji temperaturi gibajo živahneje in je zato večja verjetnost, da pride do trka med njimi. Podobno velja za koncentracijo. Večja kot je koncentracija, večje je število delcev v določeni prostornini in večja je verjetnost, da trčijo drug ob drugega. Več kot je trkov, večja je verjetnost, da bodo le-ti uspešni, posledično pa bo reakcija hitreje potekla. Za vsako reakcijo je potrebna določena aktivacijska energija. Njena vrednost se bistveno zniža, če so prisotni katalizatorji.

Mi smo se odločili, da v našem raziskovalnem delu podrobneje raziščemo vpliv temperature na potek fermentacije. Pri načrtovanju raziskovalne naloge smo si zastavili naslednja raziskovalna vprašanja.

- 🔧 Kako vpliva temperatura na hitrost fermentacije?
- 🔧 Ali lahko fermentacijo kontrolirano vodimo na temperaturno nastavljenih vodnih kopelih?
- 🔧 Kako vpliva prisotnost selekcioniranih kvasovk na hitrost fermentacije mošta?
- 🔧 Kako določiti prostornino sproščenega CO₂ v procesu fermentacije?
- 🔧 Kako vpliva temperatura fermentacije na končno sestavo produkta?

Glede na zastavljena vprašanja smo postavili naslednje hipoteze.

2.6 Hipoteze

- 🍇 Predvidevamo, da bo hitrost fermentacije večja pri višji temperaturi, prav tako se bo tudi hitreje zaključila kot pri nižji temperaturi.
- 🍇 Predvidevamo, da fermentacijo lahko kontrolirano izpeljemo na točno določeni temperaturi z uporabo vodnih kopeli.
- 🍇 Predvidevamo, da selekcionirane kvasovke pospešijo proces fermentacije v moštu.
- 🍇 Predvidevamo, da se pri fermentaciji sprostijo velike količine ogljikovega dioksida.
- 🍇 Pričakujemo, da bo temperatura fermentacije vplivala na končno sestavo produkta.

Pri našem eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje metode dela:

- 📖 delo z literaturo,
- 🧪 priprava raztopin,
- 🌡️ merjenje temperature s termometri in s pomočjo Vernierjevega vmesnika in računalniškega programa LoggerPro,
- 📊 merjenje sproščenega ogljikovega dioksida z balonom in s senzorjem preko Vernierjevega vmesnika,
- 🍇 stiskanje grozdja,

- 👉 merjenje sladkorne stopnje grozdja, mošta in vina z refraktometrom,
- 👉 priprava in nastavitve vodnih kopeli,
- 👉 nastavitev fermentacij glukozi raztopin s pekovskim kvasom in z raztopinami kristalnega sladkorja s pekovskim kvasom,
- 👉 nastavitev fermentacij mošta s selekcioniranimi kvasovkami in brez njih,
- 👉 dvigovanje sladkorne stopnje mošta,
- 👉 določanje specifične teže »pridelanega« vina,
- 👉 določanje kislin v vinu z nevtralizacijsko titracijo,
- 👉 analiza vina s GC-MS metodo,
- 👉 polnjenje vina,
- 👉 oblikovanje in izdelava etikete ter
- 👉 analiza in vrednotenje dobljenih rezultatov.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 Materiali



Slika 2: Grozdje ledene trgateve

Organski:

- 👉 kvasovke (SIHA – Aktiv 7 – Rizling tip),
- 👉 grozdje (Laški rizling),
- 👉 suhi in sveži pekovski kvas,
- 👉 beli kristalni sladkor.

3.2 Kemikalije

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije

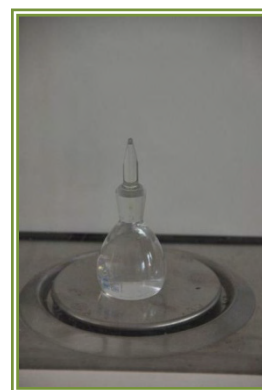
Reagent	Kemijska formula	Proizvajalec
👉 Bariumhydroxid	Ba(OH) ₂	Fluka
👉 Natriumhydroxid NaOH	NaOH	Merck
👉 Phenolphthalein	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	Riedel-de Haën
👉 D-(+)- Glucose anhydrous	C ₆ H ₁₂ O ₆	Fluka
👉 destilirana voda	H ₂ O	(I. gimnazija v Celju)

3.3 Inventar

- ✓ bučke z okroglim dnom (250 ml),
- ✓ bučke z okroglim dnom (100 ml),
- ✓ gumijasti zamaški,
- ✓ plutovinski zamaški,
- ✓ pribor za vrtanje lukenj v zamaške,
- ✓ steklene cevke,
- ✓ gumijaste cevke,
- ✓ balon z vrvico,
- ✓ termovke,
- ✓ piknometar,
- ✓ erlenmajerice,
- ✓ merilni valji (250 ml),
- ✓ bireta (50 ml),
- ✓ stojalo,
- ✓ prižema,
- ✓ mufa,
- ✓ polnilna pipeta (10 ml),
- ✓ gumijasta sesalka,
- ✓ čaše (250 ml),
- ✓ steklene palčke,
- ✓ liji,
- ✓ tehtič,
- ✓ žlička,
- ✓ stiskalnica (5 l),
- ✓ pH – Fix 0-14 PT Macherey-Nagel.



Slika3: Bučke



Slika 4: Piknometar

3.4 Merilni instrumenti

- ✓ tehtnica KERN ($\pm 0,01$ g),
- ✓ avtomatska analizna tehtnica OHAUS ($\pm 0,1$ mg),
- ✓ refraktometer (Portable refractometer, RHB-32K ATC),
- ✓ alkoholmeter - vinomer,
- ✓ alkoholni termometri,
- ✓ vodne kopeli (2 SBI-vodni kopeli, Termoproc-kopel),
- ✓ Vernierjevi senzorji za merjenje temperature,
- ✓ Vernierjev senzor za merjenje CO₂,
- ✓ Vernierjevi vmesniki,
- ✓ program Logger Pro,
- ✓ računalnik,
- ✓ pH-meter Eutech instruments (pH 510),
- ✓ plinski kromatograf.



Slika 5: Precizna tehtnica



Slika 6: Plinski kromatograf

3.5 Metode dela

3.5.1 Delo z literaturo

Pregledala sva razpoložljivo literaturo o fermentaciji. Predvsem so naju zanimali pogoji in dejavniki, ki vplivajo na potek fermentacije. Ob pregledovanju in prebiranju gradiv in člankov v knjižnici in na spletu, sva dobila nekatere zanimive ideje, ki sva jih uporabila pri najinem raziskovanju.

3.5.2 Vpliv koncentracije sladkorja in kvasa na potek fermentacije

Z eksperimentalnim delom smo začeli 12. decembra 2008. Reakcija, ki poteče med sladkorjem in kvasom je eksotermna, kar pomeni, da se energija sprošča. Poskuse smo zaradi tega izvajali v toplotno izoliranih steklenicah - termovkah, da bi se izognili toplotnim izgubam in tako dosegli čim bolj natančne rezultate. Termovko smo zaprli s plutovinastim zamaškom, da smo onemogočili uhajanje toplote. V vsak zamašek smo naredili dve luknjici. Prva je bila namenjena vstavitvi termometra, druga pa je omogočala izhajanje sproščenega CO₂. Upoštevati smo morali minimalne izgube toplote, povezane z izhajanjem CO₂.

Odločili smo se, da pripravimo sladkorne raztopine z masno koncentracijo 180 g/l, zaradi vsaj toliko predvidene sladkorne stopnje v grozdju. Želeli smo namreč spoznati osnovne principe alkoholnega vrenja in se pripraviti za nadaljnje raziskovalno delo z grozdnim sokom.

Na osnovi znane masne koncentracije sladkorja in znanega volumna toplotno izolirane posode smo lahko izračunali, koliko glukoze ali pa kristalnega sladkorja, moramo odtehtati.

$$\gamma = \frac{m}{V} \quad \dots(1)$$

γ - masna koncentracija (g/l)

m – masa topljenca (g)

V – prostornina (l)

Nikjer v literaturi nismo zasledili podatka, o potrebni koncentraciji kvasa, za uspešen potek fermentacije. Odločili smo se, da poskus naredimo z različnimi masami dodanega pekovskega kvasa. Vsak poskus smo nastavili v dveh paralelkah, v dveh termovkah. V eno smo sladkorni raztopini dodali pekovski kvas, v drugo pa ne. Zanimalo nas je ali je kakšna razlika v hitrosti fermentacije, če kot sladkor uporabim glukozo ali beli kristalni sladkor – saharozo.

V eno termovko smo odtehtali izračunano maso (45 g) glukoze, dodali 250 ml vode in na koncu 2 grama pekovskega kvasa. Vzporedno smo naredili še kontrolo v drugi termovki, torej glukozno raztopino enake koncentracije, vendar brez kvasa. V obeh termovkah smo merili temperaturo. Enak poskus smo ponovili še z belim kristalnim sladkorjem – saharozo, enkrat s kvasom in enkrat brez.



Slika 7: Glukozna raztopina in refraktometer

3.5.3 Merjenje sproščenega CO₂

Iz 45 gramov sladkorja teoretično nastane 23 g alkohola in 22 g ogljikovega dioksida. Dejansko je obojega nekaj manj, saj pri vrenju nastanejo tudi druge snovi. Nastali CO₂ lahko določimo gravimetrično z uvajanjem v Ba(OH)₂. V tej reakciji nastane težkotpna snov BaCO₃, oborino prefiltriramo in iz razlik v masi izračunamo maso ogljikovega dioksida. Metoda je precej nenatančna, saj se lahko veže del CO₂ tudi iz zraka. Razmišljali smo, kako bi meritev speljali s senzorjem za merjenje CO₂ preko Vernierjevega vmesnika, vendar smo vedeli, da bo koncentracija CO₂ prevelika, da bi jo senzor zaznal. Občutljivost merilnega instrumenta je namreč do 5000 p.p.m. Vseeno smo poskusili in potrdili domnevo, da je koncentracija nastalega CO₂ v procesu fermentacije previsoka za uporabo tega merilnega instrumenta.

Vse skupaj smo poenostavili. Odločili smo se, da na cevko, ki vodi iz termovke, namestimo balon. Balon smo skupaj z vrvico stehali pred namestitvijo na cevko in takoj po doseženem temperaturnem maksimumu v termovki. Temperaturni maksimum smo določili s predhodnim poskusom. Ponovno smo beležili temperaturo in spremembe v volumnu balona.



Sliki 8, 9 : Merjenje volumna CO₂ in temperature med fermentacijo

3.5.4 Vpliv temperature okolice na potek fermentacije

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti kako temperatura prostora in sladkorne raztopine vplivata na hitrost fermentacije. Vse sladkorne raztopine, ki smo jih uporabili za poskus, smo temperaturno uravnali na temperaturo prostora. Za izvedbo smo tokrat uporabili tri termovke. Spreminjali smo razmerja uporabljenega sladkorja in kvasa. Pri tem eksperimentu smo uporabili suhi pekovski kvas, literatura namreč navaja, da se kvasovke enakomerno porazdelijo in je njihova masa realna, medtem ko pri svežem kvasu količina kvasovk na prostorninsko enoto kvasa variira.





Temperature fermentacij smo merili s senzorjem, ki smo ga priključili na Vernierjev vmesnik, tega pa povezali preko USB povezave na računalnik. S pomočjo programa LoggerPro smo beležili temperature, eno meritev na minuto. Meritve smo izvajali osemindeset ur. S pomočjo programa se je vzporedno z meritvami izrisoval graf, ki prikazuje odvisnost temperature fermentacije od časa. Vse tri temperature smo merili istočasno, da smo lahko na koncu enostavneje izvajali primerjave.

Preglednica 2: Vpliv temperature in sestave sladkornih raztopin na potek fermentacije

termovka (številka)	masa rjavega sladkorja (g)	volumen dodane vode (ml)	temperatura raztopine (°C)	masa suhega kvasa (g)	temperatura prostora (°C)
vzorec 1	14,0	100	9	3,5	8-10
vzorec 2	14,0	100	9	7,0	8-10
vzorec 3	18,0	100	9	7,0	8-10
vzorec 1	14,0	100	9	3,5	20-22
vzorec 2	14,0	100	9	7,0	20-22
vzorec 3	18,0	100	9	7,0	20-22

3.5.5 Priprava in umerjanje vodnih kopeli

S pregledom literature ter z razgovori z vinarji smo ugotovili, da fermentacija uspešno poteka v temperaturnem območju med 8-35 °C. Na osnovi teh podatkov smo se odločili, da bomo spremljali potek fermentacije pri naslednjih temperaturah:

-  10 °C,
-  17 °C,
-  25 °C in
-  33 °C.

Vse vodne kopeli smo napolnili z destilirano vodo in nastavili temperaturne termostate na želene temperature. Umerjanje vseh kopeli smo preverili z alkoholnimi termometri tako, da smo jih namestili na stojala ob vodnih kopelih in jih potopili vanje. S tem smo preverili natančnost posamezno nastavljenih temperatur. S preverjanjem smo potrdili pravilnost delovanja termostatov, razen pri kopeli, ki bi morala delovati hladilno. Odločili smo se, da bomo ves čas eksperimentalnega dela z vodnimi kopelmi, zaradi natančnosti, preverjali temperaturo še z dodatnimi alkoholnimi termometri, ki smo jih namestili za kontrolo v kopeli.

Prva vodna kopel, ki bi naj zagotavljala konstantnih 10 °C, bi morala celoten sistem hladiti. Po polnitvi kopeli z destilirano vodo in nastavitvi termostata na 10 °C se vzdrževana

temperatura ni spustila pod 18 °C, zato smo poskus s to vodno kopeljo zaradi tehničnih težav opustili.

Druga vodna kopel je bila nastavljena na temperaturo 17 °C, vendar termostat ni bil pravilno umerjen, saj je naš termometer za preverjanje natančnosti pokazal tri stopinje več. Tretja vodna kopel je bila še čisto nova. V program za nastavitev smo vnesli zahtevano temperaturo 25 °C. Temperatura nastavitev se je ujemala s preverjano in je bila ves čas poskusov izredno natančna.

Zadnjo, četrto vodno kopel, smo termostatirali na 33 °C. Na začetku je bila umeritev zelo težavna, saj je temperatura nihala od 33-37 °C, vendar smo jo uspeli umeriti na 33 °C. Ob ugotovitvi, da je možno v tej kopeli tudi nihanje temperature, smo se odločili, da bomo opravili eno meritev pri nihajoči temperaturi. S tem želimo preveriti, kako spreminjanje fizikalnih parametrov dejansko vpliva na potek fermentacije.



Slika 10: Vodna kopel

3.5.6 Stiskanje grozdja

Za naše eksperimentalno delo smo si priskrbeli grozdje ledene trgatve, ki je bilo natrgano 15. decembra. Grozdje je bilo pridelano v vinogradu na področju Slovenskih Konjic. Za našo raziskovalno nalogo smo uporabili belo zvrst, sorto laški rizling. Iz grozdja smo morali stisniti grozdni sok, ki smo ga uporabili za preučevanje fermentacije.

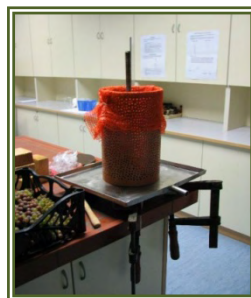
Grozdje je že bilo prekrito s plemenito plesnijo, saj je bilo hranjeno zaradi potreb ledene trgatve. Predvidevali smo, da bo sladkorna stopnja soka zaradi precej višja, kot pri navadni jesenski trgatvi.

S pomočjo refraktometra smo izmerili sladkorno stopnjo grozdnih jagod. Meritev smo večkrat ponovili in vselej dobili enak rezultat, 21.6.

16. decembra smo v šolskem laboratoriju stisnili grozdni sok iz 5,8 kilogramov grozdja.



Slika 11: Laški rizling



Slika 12: Stiskalnica



Slika 13: Stisnjen grozdni sok

Stiskalnica, s katero smo pridelali mošt, je bila narejena doma. Podstavek stiskalnice je bil z nerjaveče kovine in je imel ob strani izdelan tulec za iztekanje mošta. Vpeli smo ga na stabilno, ne drsečo podlago z vijačnimi sponami. V sredini podstavka je imela stiskalnica osrednji vijak na katerega je bila navita lesena plošča. Premer le-te se je ujema s cevastim plastičnim ohišjem, z navrtanimi luknjicami. V notranjost ohišja smo namestili mrežasto vrečo. Vanjo smo naložili grozdje, ki smo ga stisnili. Na končno količino grozdja smo namestili še eno leseno ploščo preko osrednjega vijaka. Na vse smo dodali še matico z dvema ročicama in pričeli s stiskanjem. Za povečanje učinkovitosti stiskanja smo uporabili lesene kocke, ki smo jih dodali na zgornjo leseno ploščo pod matico. Mrežasto vrečo smo uporabili zato, da smo lahko lažje odstranili preostanek stisnjene grozdja, istočasno pa smo preprečili uhajanje pečk in delov grozdnega olupa v stisnjeni mošt. Pridobljeni mošt smo lovili v trilitrsko čašo. Po končanem stiskanju je bil volumen stisnjene soka 3,2 litra.

Mošt smo zaradi božično novoletnih počitnic za štiriindvajset dni zamrznili. V zamrzovalniku je bila temperatura $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. S tem smo deaktivirali kvasovke in preprečili začetek fermentacije pred nastavljanjem nadaljnjih eksperimentov. Pred zamrzovanjem smo z refraktometrom določili količino sladkorja.

3.5.7 Nastavitev poskusov fermentacij pri nastavljeni temperaturi na vodnih kopelih

Zamrznjeni mošt smo 6. januarja odtalili. Vonj in okus sta ostala nespremenjena, prav tako ni bilo zaznati kiselkastega ali alkoholnega vonja, zato smo predvidevali, da sta procesa zamrzovanja in odložitve fermentacije mošta uspela.

Ponovno smo izmerili sladkorno stopnjo mošta z refraktometrom in ugotovili, da se je sladkorna stopnja po zamrzovanju znižala na 13,7. Glede na to, da fermentacija še ni potekla, smo predvidevali, da so se sladkorji zaradi vpliva zamrzovanja razgradili, čeprav se nam je vse skupaj zdelo nemogoče. Sprejeli smo sklep, da odlijemo vrhni grozdni sok (1800 ml), za potrebe poskusa in ponovno izmerimo sladkorno stopnjo. Meritev je potrdila prvo, vrednost je bila zopet 13,7. Takšna sladkorna stopnja je za uspešno fermentacijo zelo nizka in odločili smo se, da jo popravimo. Lotili smo se preračunavanja in upoštevali navodilo, da moramo dodati 1,25 kg sladkorja na 100 l mošta, če želimo sladkorno stopnjo dvigniti za 1.

Načrtovali smo izvedbo sedmih poskusov z moštom, ki smo mu morali dvigniti sladkorno stopnjo z dodajanjem sladkorja na prvotno vrednost in dva poskusa z moštom brez dodanega sladkorja, torej pri sladkorni stopnji po odtajanju.

Za sedem poskusov smo potrebovali 7 x 200 ml mošta, kar je 1400 ml mošta. Da bi dvignili sladkorno stopnjo za pet stopenj, smo morali dodati na osnovi izračuna 87,5 g sladkorja, ki smo ga raztopili v 0,75 ml vode in primešali k moštu. Tako smo dosegli prvotno sladkorno stopnjo 21,6, kar smo preverili in potrdili s ponovno meritvijo na refraktometru. Polovici bučk smo dodali selekcionirane kvasovke, in sicer 0,2 grama na 200 ml mošta.

Končno je bilo pripravljeno vse za nastavitev poskusov fermentacij, na vodnih kopelih zelenih temperatur (17, 25 in $33\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Vzporedno smo s preostanka mošta, kateremu nismo dvigovali sladkorne stopnje, nastavili še dva poskusa. Ta dva nismo postavili v vodne kopeli, ampak smo ju pustili fermentirati kar v laboratoriju pri sobni temperaturi. En poskus smo nastavili z dodatkom selekcioniranih kvasovk, drugega pa brez dodatka le-teh.

3.5.7.1 Priprava zamaškov

Za izvajanje eksperimentalnega dela fermentacije z grozdnim sokom, smo potrebovali bučke z okroglim dnom ($V=250\text{ ml}$), ki smo jih morali zapreti, da med procesom onemogočimo dostop

zraka in prehitre izgube toplote. Za delo smo uporabili gumijaste zamaške ustreznega premera. V vsak zamašek smo naredili dve luknjici. Eno za vstavitve termometra ali senzorja za merjenje temperature preko Vernierjevega vmesnika, drugo luknjico za cevko, ki je omogočala izhajanje CO₂, ki nastaja kot produkt fermentacije.

Za vrtanje plastičnih in plutovinastih zamaškov smo uporabili set votlih kovinskih valjev. Te valje smo razžarili in jih krepko, vrteče potiskali v zamašek, da je nastala potrebna luknja. Postopek žarjenja in vrtanja smo ponavljali toliko časa, da smo preluknjali vse potrebne zamaške.



Slika 14: Priprava zamaškov za bučke

3.5.7.2 Priprava nasičene raztopine baritovice

Pri gravimetrični analizi sestavino vzorca, ki jo želimo določiti, izločimo v obliki kemično čiste spojine in tehtamo, potem ko jo ločimo od ostalih primesi. Glede na način dela spada ta metoda med tiste, ki so osnovane na obarjalnih reakcijah (pri teh metodah element ali njegovo spojino, ki jo določamo, izločimo v obliki težkotpne oborine).

Baritovica je po kemijski sestavi barijev hidroksid Ba(OH)₂. Uporabljamo ga kot dokazni reagent za CO₂, saj v reakciji z njo nastaja produkt, barijev karbonat BaCO₃, bela oborina. Pripravili smo nasičeno raztopino barijevega hidroksida in jo prefiltrirali. Tako pripravljeno baritovico smo prelili v erlenmajerice s prostornino 250 ml in vanje napeljali cevke iz fermentacijskih bučk. Zelo hitro smo ugotovili, da je vezava CO₂ veliko prehitra (zelo hitro se je vezal tudi CO₂ iz zraka).

3.5.7.3 Popravljanje gladine bučk

Med načrtovanjem poskusov nismo predvideli višino gladine mošta v bučkah, zato smo naleteli na težavo. Termometer namreč ni segal do vzorca in meritve v tem primeru ne bi bile natančne, zato smo morali višino gladine povišati. To smo storili tako, da smo dodali navadno kamenje, ki smo ga pred dodajanjem dobro očistili in počasi vnesli v bučko, da le-ta ni počila. Tako smo pridobili ustrezno gladino. Upoštevali smo možne vplive kamnov na potek fermentacije, vendar tega nismo posebej preverjali.

3.5.7.4 Dodajanje selekcioniranih kvasovk

Fermentacijo grozdnega soka v vodnih kopelih smo izvajali v dveh paralelkah. V eni je bil grozdni sok brez prisotnosti kvasovk, v drugi pa grozdni sok, kateremu smo dodali selekcionirane kvasovke. Selekcionirane kvasovke so katalizatorji, saj pospešujejo fermentacijo. Zaradi tega nas je zanimalo ali se bo, v bučkah z dodanimi kvasovkami, fermentacija dejansko prej začela in seveda prej zaključila.

Izbrali smo kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ki je visoko aktivna in dehidrirana. Namenjena je proizvodnji belih vin iz sort renski rizling, rizvanec, muškatne sorte, traminec ter sauvignon. Primerna je tudi za proizvodnjo vin iz mošta z visoko vsebnostjo sladkorja, kot so pozne trgatve in izbori. Po navodilih proizvajalca potrebujemo za 200 l mošta 20 g kvasovk. Za našo količino vzorca smo preračunali potrebno maso kvasovk. Za 100 ml potrebujemo 0,1 g kvasovk.



Slika 15: *Saccharomyces cerevisiae*

3.5.7.5 Priprava bučk s sladkornimi raztopinami

Zopet smo pripravili sladkorne raztopine ustreznih koncentracij, jih zaprli po enakem postopku kot tiste z grozdnim sokom. Umerili smo jih na želeno temperaturo fermentacije. Medtem smo odtehtali suhi kvas in raztopili v vodi, ki je imela temperaturo posamezne vodne kopeli. Ko so bili vsi vzorci »temperaturno« ustrežni, smo dodali še raztopine kvasa. Zgodilo bi se lahko, da bi zaradi pregrevanja oz. ohlajanja vzorcev v bučkah, dobili začetno krivuljo fermentacije prestrmo ali prenizko.

Pri pripravi bučk s sladkornimi raztopinami smo bili posebej previdni. Ker smo imeli težnjo po doseganju čim bolj natančnega rezultata, smo morali preprečiti prevelike izgube. Predvidevali smo, da bi največje izgube nastale zaradi uhajanja toplote skozi dolg bučkin vrat, zato smo vsako bučko posebej na debelo ovili z aluminijasto folijo in začeli z merjenjem temperature. Tako pripravljene bučke sladkornih raztopin in grozdnega soka smo vstavili v temperaturno nastavljene vodne kopeli.

Grozdje, ki smo ga dobili, je nekaj posebnega, saj ima izredno visoko sladkorno stopnjo. Ravno zaradi tega smo želeli preveriti potek fermentacije pri enostavnejših, čistih glukoznih raztopinah, ki smo jim dodali suh pekovski kvas. Te poskuse bi lahko uporabili, zaradi točno določenih dejavnikov, za posploševanje naših rezultatov.

Kopel pri 25 °C:

bučka 1: napolnjena z 45 g glukoze, raztopljene v 250 ml vode in dodanimi 7 g suhega kvasa,
bučka 2: napolnjena z 45 g glukoze, raztopljene v 250 ml vode in dodanimi 14 g suhega kvasa.

Kopel pri 33 °C

bučka 1: napolnjena z 45 g glukoze, raztopljene v 250 ml vode in dodanimi 7 g suhega kvasa,
bučka 2: napolnjena z 45 g glukoze, raztopljene v 250 ml vode in dodanimi 14 g suhega kvasa.

Kopel pri 17 °C

bučka 1: napolnjena z 45 g glukoze, raztopljene v 250 ml vode in dodanimi 7 g suhega kvasa,
bučka 2: napolnjena z 45 g glukoze, raztopljene v 250 ml vode in dodanimi 14 g suhega kvasa.

Vse glukoze raztopine smo termostatirali na zelene temperature vodnih kopelih, še pred dodajanjem kvasa. Vodne kopeli smo prenesli v drugo učilnico, kjer smo lahko izvajali merjenje temperature vseh vzorcev hkrati, zaradi večjega števila računalnikov.

Pri načrtovanju teh šestih poskusov smo imeli težave s prehitrim kipenjem in burnim penjenjem testnih raztopin, zaradi česar smo morali iz vsake bučke odliti 100 ml raztopine. To pa bi lahko vplivalo na morebitno netočnost rezultatov.

Naslednji dan so bila vrenja teh raztopin že zaključena. Po pregledu rezultatov smo se odločili za ponovitev teh treh poskusov, le da smo tokrat zmanjšali mase glede na prostornino bučk. Vratove vseh bučk smo ovili z aluminijevo folijo, da bi preprečili izgube.

 Kopel pri 25 °C:

bučka 3: napolnjena z 21,6 g glukoze, raztopljene v 100 ml vode in dodanimi 3,5g suhega kvasa;

 kopel pri 33 °C

bučka 3: napolnjena z 21,6 g glukoze, raztopljene v 100 ml vode in dodanimi 3,5g suhega kvasa;

 kopel pri 17 °C

bučka 3: napolnjena z 21,6 g glukoze, raztopljene v 100 ml vode in dodanimi 3,5g suhega kvasa.

3.5.8 Merjenje sladkorne stopnje z refraktometrom

Refraktometer je standardna in sorazmerna naprava za določanje sladkorne stopnje v profesionalnem vinarstvu¹. Refraktometer je optična naprava, ki s pomočjo loma svetlobe skozi na lečo dodan grozdni sok, prikaže količino sladkorja v njem. V uporabi je več tipov refraktometrov. Pri našem delu smo uporabili ročni refraktometer, pri katerem se rezultat merjenja dobi tako, da se poišče graduacijska črtica, ki sovпада s črto, ki ločuje svetlo območje od temnega.²

V tekočini raztopljene snovi vplivajo na lom svetlobe, ki potuje skozi tanko plast tekočine. Refraktometer sestoji iz merilne plazme, pokrova plazme, vhoda za svetlobo, skale, povečevalne leče in okularja. Višja je koncentracija sladkorja v moštu, bolje se svetloba lomi in lepše je izostrena meja med svetlim in temnim poljem na skali. Refraktometer je umerjen na določeno temperaturo (20 °C).

Vsem sladkornim raztopinam in pridobljenemu grozdnemu soku, smo izmerili vsebnost sladkorja. Najprej smo odprli pokrovček in kanili 2-3 kapljice vzorca na prizmo. Pokrovček smo zaprli in pazili, da se niso pojavili zračni mehurčki. Pogledali smo skozi okular proti svetlobi in opazili dve poji, zgoraj modro in spodaj belo. Meja med njima je graduacijska črta. Pri meritvi vidimo skozi okular tri skale za merjenje sladkorja (Brix-ovo, °OE in °KMW). Pred meritvami smo preverili natančnost graduacijske črtice v refraktometru, z destilirano vodo, ki ima temperaturo 20 °C. Črtica poteka skozi nič kar pomeni, da je umerjanje naprave uspešno.

¹ Standard refraktometrov predvideva tudi Uradni list Republike Slovenije: <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200240&stevilka=1910>

² Citirano iz Uradnega lista Republike Slovenije, 4. člen



Slika 16: Graduacijska črta

3.5.9 Določevanje specifične teže vina s piknometrom

Specifična teža je število, ki daje informacijo o skupnem ekstraktu. Ekstrakt predstavljajo snovi, ki so raztopljene v vinu. Če so te snovi težje od vode v glavnem vsebujejo sladkorje, glicerol, kisline, dušikove spojine, mineralne snovi in fenole (Bajt, 2001, str.140).

Specifično težo lahko določimo s pomočjo piknometra. Na analizni tehtnici stehamo prazen, suh piknometrom, ga napolnimo z destilirano vodo temperature 20 °C. Piknometrom z vodo stehamo. Destilirano vodo odlijemo in nato v piknometrom nalijemo vzorec vina temperature 20 °C in stehamo. Na osnovi vseh treh meritev izračunamo specifično težo vzorca.

$$d^{20/20} = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_3 - m_1)} \quad \dots(2)$$

m_1 – masa praznega piknometra




m_2 – masa piknometra, napolnjenega z destilirano vodo temperature 20 °C

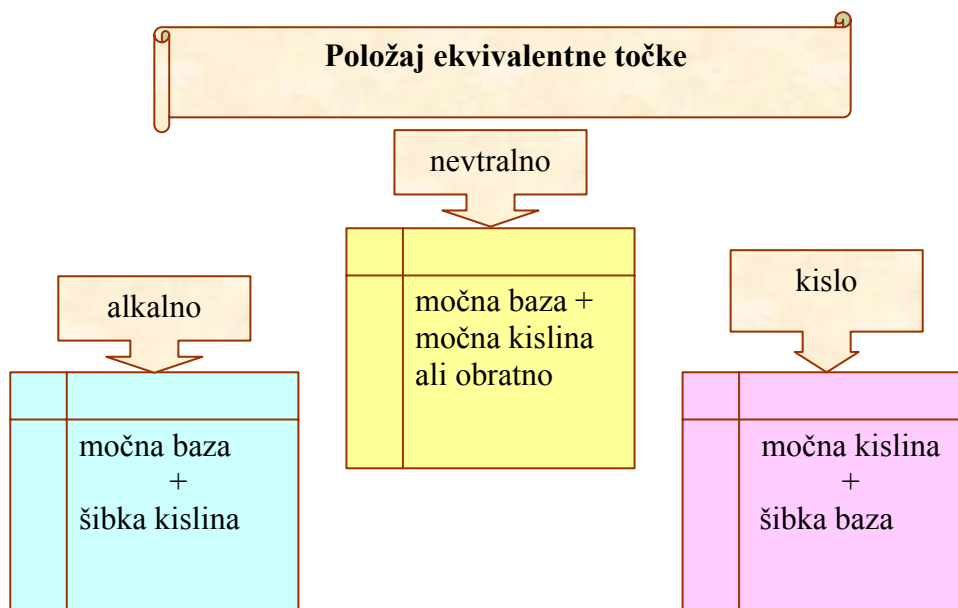
m_3 – masa piknometra, napolnjenega z vzorcem vina temperature 20 °C

3.5.10 Določevanje kislin v vinu s titracijo

Vsebnost titracijskih kislin v vinu določamo z nevtralizacijsko titracijo. Titracija je volumetrična metoda, pri kateri na osnovi porabljene prostornine standardne raztopine, določimo koncentracijo neznanemu vzorcu. Ime nevtralizacijska je dobila po reakciji, ki poteče med analitom in titrantom. Titracija se vselej zaključi v ekvivalentni točki, ko dodani indikator spremeni barvo.

Volumetrične metode, ki temeljijo na reakcijah nevtralizacije, so v analizni kemiji zelo pogoste. Pri teh titracijah določamo množino kisle ali bazične spojine tako, da vzorčne raztopine titriramo s standardno raztopino kisline ali baze. Končno točko titracije določimo z uporabo indikatorjev, lahko pa tudi s pomočjo elektrokemijskih ali drugih postopkov. Za pravilno določitev je nujna pravilna izbira indikatorja. Ekvivalentna točka titracije je odvisna od:

-  vrste vzorca,
-  lastnosti vzorca in
-  koncentracije vzorca.



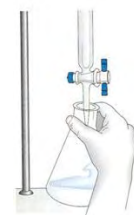
Indikatorji so običajno šibke organske kisline ali baze, ki spremenijo svojo barvo v določenem območju pH-vrednosti.

Kislost v vinskem moštu izhaja iz naravno vsebovanih, prostih ali vezanih organskih kislin, kot so citronska, vinska, jabolčna, mlečna, očetna... Izražena je s količino baze natrijevega ali kalijevega hidroksida, ki je potrebna za nevtralizacijo vseh kislin v moštu. Skupne ali titracijske kisline izražamo v g/l, izražene kot vinska kislina. Vina, ki se dajejo v promet, morajo izpolnjevati ustrezno vsebnost titracijskih kislin, ki znaša 4,5 – 14 g/l (Bajt, 2001, str.142).

Pri analizi v erlenmajerico odpipetiramo 10 ml vzorca vina, dodamo 3 kapljice fenolftaleina in titriramo s standardno raztopino NaOH, koncentracije 0,1 mol/l do prve obstojne rožnate barve.

$$\text{titracijske kisline (g/l)} = \frac{A \cdot E(\text{kislina})}{V(\text{vzorca})} \quad \dots(3)$$

A – poraba 0,1 M NaOH (ml),
 V – volumen vzorca (ml),
 E – ekvivalent vinske kisline = 75



3.5.11 Kromatografija

Kromatografijo uvrščamo med separacijske tehnike in združuje vrsto analiznih metod za ločevanje in določevanje sestavin kompleksnih zmesi.

Pojem kromatografije je uvedel ruski botanik M. Tswett (1903), ko je na kolono s kalcijevim karbonatom nanese rastlinske pigmente iz listov in jih z izpiranjem s petrolejem separiral v karotene in ksantofile.

Kromatografija je postopek za ločevanje raztopine, ki vsebuje več topljencev, ki so navzoči v izredno majhnih količinah. Raztopino nanese na primeren absorpcijski medij, preko katerega nato pustimo prehajati drugo topilo. Vsak topljenec iz prvotne raztopine se na zanj značilen način porazdeli med raztopino na absorpcijskem mediju (stacionarna faza) in drugim

topilom (mobilna faza). Kot že rečeno, se sestavine zmesi v kromatografskem procesu porazdelijo med dve fazi:

- stacionarno (je v koloni ali pa je nanesena v tanki plasti na stekleni oz. aluminijasti plošči) in
- mobilno fazo (se usmerjeno giblje skozi kromatografski sistem in potuje ob stacionarni fazi).

Različne sestavine zmesi, ki jih uvedemo v kromatografski sistem, potujejo skozenj z različno hitrostjo. Razlike v hitrosti potovanja so osnova ločevanja. Mobilna faza je glede na agregatno stanje tekočina ali plin. Na tej osnovi razlikujemo med:

- tekočinsko kromatografijo (LC – liquid chromatography) in
- plinsko kromatografijo (GC – gas chromatography).

3.5.11.1 Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija je analitska metoda za ločitev zmesi hlapnih substanc, ki so hlapne brez reakcije ali pa so v plinastem agregatnem stanju. Ta analitska metoda je zahtevnejša kot druge kromatografije.

Plinski kromatograf (GC)

Mobilna faza (nosilni plin): inerten plin

Stacionarna faza (efluent): trdna snov ali tekočina (silikagel, zeoliti, aktiviran aluminijev oksid)

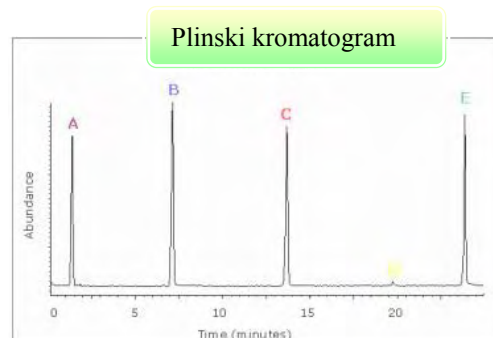
Plinski kromatograf sestavljajo:

- jeklenka z nosilnim plinom,
- regulator pretoka,
- injektor za vnos vzorca,
- kolona,
- detektor ter
- integrator.

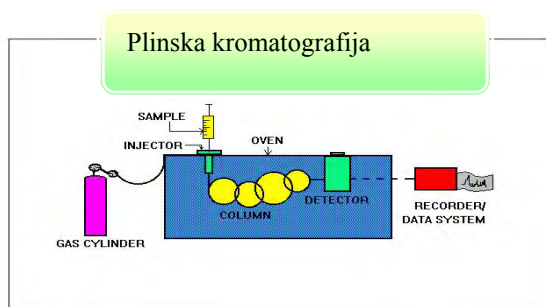
Uporablja se za ločitev in določitev plinov oz. sestavin tekočih vzorcev, ki imajo dovolj nizko vrelišče (pod 250 °C).

V plinski kromatografiji uporabljamo dve vrsti kolon:

- ✓ **Polnjene**, katerih notranji premer znaša od 2-8 mm in
- ✓ **kapilarne** z notranjim premerom manj kot 1mm (volumen vzorca zmanjšamo z uporabo spliterja, da zmanjšamo preobremenjenost kolone).



Slika 17: Kromatogram vzorca s komponentami A, B, C, D



Slika 18: Zgradba plinskega kromatografa



Slika 19: Injektor in kolona pri plinskem kromatografu

Zmes substanc iz vzorca vstopa v kolono napolnjeno z adsorbentom - nosilcem stacionarne faze. Skozi kolono vodimo nosilni plin (mobilna faza), ki prenese zmes substanc skozi kolono in se ne veže na kolono - stacionarno fazo. V koloni pride do ločitve v čiste komponente, ki jih na izhodu iz naprave zazna detektor.

Vzorec se injecira v injecirno odprtino, kjer vzorec izpari in se s pomočjo plina prenese v kolono. Vzorec izpari v obliko mešanice nosilnega plina, izhlapljene raztopine in izhlapljenega topila. Za optimalno učinkovitost kolone, vzorec ne sme biti prevelik. Najbolj običajna injecirna metoda je tista, pri kateri uporabimo mikro injekcijo za injeciranje vzorca preko gumijastega septuma v hitro izparilno mesto na začetnem delu kolone. Temperatura vzorčevalnega mesta je okoli 50 °C višja od vrelišča zadnje izparjene komponente vzorca. Velikost vzorca je od 1/10 ml do 20 µL.

Nosilni inertni plin kot mobilna faza ima to nalogo, da nosi vzorec skozi kolono v detektor. Pravilna izbira nosilnega plina je zelo pomembna, predvsem zaradi naslednjih razlogov:

- nečistoče lahko povzročijo napake v zaznavanju snovi, ki jo analiziramo
- izbira nosilnega plina je odvisna od tipa detektorja, ki ga uporabljamo.

Kot nosilne pline lahko uporabljamo pline, ki se ne vežejo na adsorbent oziroma kolono t.j. stacionarno fazo. Zelo pogosto uporabljamo helij in vodik, lahko tudi argon in dušik. Nosilni plini so shranjeni v jeklenkah in ne vsebujejo skoraj nič nečistoč.

Sistem nosilnega plina lahko vsebuje tudi molekularna sita (rešetke), s pomočjo katerih iz vzorca odstranimo vodo in druge nečistoče.

Kolona je jedro instrumenta za plinsko kromatografijo, v katerem se loči plinska zmes. Je približno 30 m dolga cev, z notranje strani prevlečena s posebnim polimernim premazom. Kemijske mešanice se tukaj ločijo glede na njihovo hlapljivost (izparljivost) in se s pomočjo plina prenesejo skozi kolono. Kemijske snovi z visoko hlapljivostjo potujejo skozi kolono z večjo hitrostjo.

Stacionarno fazo izberemo glede na naravo snovi, ki jo želimo analizirati – za polarne snovi vzamemo polarno stacionarno fazo, za nepolarne pa nepolarno.

Temperatura kolone med kromatografijo znaša od 40 do 300 °C. Kolona se segreva v pečici z namenom, da se molekule premaknejo skozi kolono.

Pri kromatografiji dobimo kot rezultat **kromatogram**. To je grafični zapis, ki kaže odvisnost odziva detektorja od časa. Na kromatogramu se lahko pojavi več kromatografskih vrhov, ki ustrezajo posameznim komponentam zmesi. Zaželeno je, da so posamezni kromatografski vrhovi med seboj povsem ločeni in da se vse sestavine ločijo v čim krajšem času. Za doseg tega cilja je treba pogoje kromatografske ločitve za vsak tip vzorca oz. zmesi posebej optimizirati. Sestavine zmesi prepoznamo po primerjavi retencijskih časov posameznih vrhov na kromatogramu z retencijskimi časi standardov. Za kvantitativno določitev posameznih

komponent moramo opraviti kalibracijo ali umerjanje kromatografa s standardi z različno koncentracijo določene sestavine (Eaton, 1989, str.152-154).

Retencijski čas je čas, ki se porabi za ločevanje sestavin (Boh, 2000, str. 56).

$$R_f = \frac{\text{dolžina poti snovi}}{\text{dolžina poti topila}} \quad \dots(4)$$



R_f – retencijski faktor

Slika 20: Potovanje mobilne faze

Predvidevali smo, da se fermentacija zaključi takrat, ko ne vidimo več izhajati mehurčkov. Produkte fermentacij, »pridobljeno mlado vino«, smo prefiltrirali, opravili analize določevanja specifične teže in titracijskih kislin. Vzorce smo zaprli v stekleničke, jih označili in shranili v hladilnik.

6. februarja smo odnesli tri vzorce v podjetje ETOL d.o.o., kjer so nam s pomočjo GC-MS metode opravili analizo sestavin končnih produktov fermentacij. V analizo smo dali naslednje vzorce:

- 🍇 sladkorna raztopina s kvasom (surogat),
- 🍇 vzorec vina, pridobljenega s fermentacijo pri temperaturi 33 °C z dodanimi kvasovkami in
- 🍇 vzorec vina, pridobljenega s fermentacijo v domači kleti pri temperaturi 8-10 °C.

Zaradi etanola kot močno prevladujoče komponente, bi bilo določanje ostalih sestavin težko. Zaradi tega so se v Etolu odločili za kombinirano uporabo plinske kromatografije z masno spektroskopijo, ki na osnovi molskih mas identificira neznane snovi.

3.5.12 Polnjenje vina pridelanega vina

Odločili smo se, da bomo v primeru uspešne fermentacije, pridelano vino simbolično polnili v 0,2 l steklenice.

3.5.13 Oblikovanje in izdelava etikete

Za pridelano in ustekleničeno vino smo računalniško oblikovali in izdelali etiketo.

3.5.14 Analiza rezultatov

Na osnovi opravljenih poskusov, meritev in kemijskih analiz smo prišli do zanimivih in uporabnih ugotovitev. Na osnovi tega lahko večino zastavljenih hipotez potrdimo, eno pa ovržemo.



3.6 Meritve

3.6.1 Vpliv koncentracij sladkorja in kvasa na potek fermentacije

Za začetek proučevanja fermentacije smo si pripravili raztopino glukoze z masno koncentracijo 180 g/l. Odločili smo se, da tej raztopini dodamo 2 g pekovskega kvasa in opazujemo kaj se bo začelo dogajati s temperaturo. Temperatura kontrolne glukozne raztopine se ni v 24 urah nič spremenila, enako je bilo z raztopino, ki smo ji dodali kvas.

Preglednica 3: Vpliv različnih sladkorjev enakih koncentracij z dodanim kvasom na hitrost fermentacije

čas (h)	temperatura (°C) kontrola glukoza+voda (45 g + 250 ml)	temperatura (°C) poskus 1 glukoza+kvas+voda (45 g + 15 g + 250 ml)	temperatura (°C) poskus 2 saharoza+kvas+voda (45 g + 15 g + 250 ml)
14.15	25	25	25
14.45	25	26	26
15.15	25	27,5	27
15.45	25	28	27,5
16.15	25	28,5	28
16.40	25	29	29
17.20	25	30,5	30
18.15	25	31,5	31
18.45	25	32	32
19.15	25	33	32,5
19.40	25	33,5	33
20.15	25	34,5	34
21.05	25	35,5	35
22.00	25	36,5	36
23.08	25	37,5	37
23.25	25	38	37
24.04	25	38	37,5
01.15	25	37,5	37
02.15	25	37,5	37
7.15	25	35	35

Iz preglednice 3 je lepo razvidno, da smo nastavili 3 poskuse. Kontrola je služila za primerjavo s poskusoma 1 in 2, ki pri katerih smo uporabili dva različna sladkorja za ugotavljanje hitrosti fermentacije. Glukoza je monosaharid, saharoza pa ologosaharid.

Preglednica 4: Merjenje temperature fermentacije glukozne raztopine s senzorjem preko Vernierjevega vmesnika

čas merjenja [h]	temperatura (°C) (masna koncentracija glukoze 140 g/l) (14 g glukoze + 7 g kvasa + 100 ml vode)
0	21,8
1	23,8
2	25,9
3	28,6
4	31,7
5	33,8
6	33,3
7	31,9
8	30,3
9	29,0
10	27,8
11	26,1
12	25,8
13	25,5
14	25,1
15	24,8
16	24,5
17	24,2
18	24,1
19	23,9

Temperaturni maksimum je dosežen po 5 urah, alkoholna fermentacija se zaključi po 19 urah, ko se temperatura ne spreminja več.

3.6.2 Merjenje sproščenega CO₂

Merjenje volumna sproščenega CO₂

(m₁) masa balona z vrvico pred poskusom: 3,3014 g

(m₂) masa balona z vrvico po fermentaciji: 52,1678 g

(m₃) masa sproščenega CO₂: 48,8664 g

Pri merjenju CO₂ z Vernierjevim vmesnikom nismo prišli do rezultatov, saj je senzor občutljiv na zelo nizke koncentracije CO₂, pri fermentaciji pa se sproščajo zelo velike količine tega plina. V navodilih smo zasledili, da je senzor namenjen merjenju količin CO₂, ki nastajajo pri dihanju mokarjev. Kljub pripravi zelo razredčenih raztopin, nam ta del poskusa ni uspel.

3.6.3 Vpliv temperature okolice na potek fermentacije

Preglednica 5: Vpliv različnih koncentracij sladkorja in kvasa na hitrost fermentacije (20-22 °C)

čas (h)	temperatura (°C) vzorec 1 (sladkor + voda + kvas) 14 g + 100 ml + 7 g	temperatura (°C) vzorec 2 (sladkor + voda + kvas) 14 g + 100 ml + 3,5 g	temperatura (°C) vzorec 3 (sladkor + voda + kvas) 18 g + 100 ml + 7 g
0	22,4	22,0	21,1
1	24,7	24,0	23,8
2	27,2	25,3	26,0
3	29,6	26,4	28,3
4	31,6	27,9	30,4
5	32,4	28,8	31,9
6	31,0	29,6	32,3
7	29,2	30,0	31,8
8	27,5	30,1	29,8
9	26,1	29,6	27,8
10	24,9	28,5	25,9
11	23,8	27,4	24,4
12	23,1	26,6	23,4
13	22,7	26,1	22,8
14	22,5	25,6	22,5
15	22,4	25,3	22,2
16	22,3	24,9	22,0
17	22,1	24,6	21,8
18	22,0	24,3	21,6
19	21,8	24,0	21,4
20	21,7	23,8	21,2
21	21,6	23,6	21,1
22	21,6	23,5	21,1
23	21,7	23,4	21,1
24	21,5	23,2	21,0

V tem poskusu smo spreminjali uporabljene koncentracije saharoze in kvasa in merili trajanje fermentacije. Iskali smo tudi temperaturni maksimum, najvišjo temperaturo fermentacije.

Preglednica 6: Vpliv različnih koncentracij sladkorja in kvasa na hitrost fermentacije (8-10 °C)

čas (h)	temperatura (°C) vzorec 1 (sladkor + voda + kvas) 14 g + 100 ml + 3,5 g	temperatura (°C) vzorec 2 (sladkor + voda + kvas) 14 g + 100 ml + 7 g	temperatura (°C) vzorec 3 (sladkor + voda + kvas) 18 g + 100 ml + 7 g
0	10,5	11,6	10,4
1	11,8	12,4	12,3
2	12,1	12,9	12,7
3	12,3	13,3	13,2
4	12,5	13,8	13,5
5	12,6	14,4	13,8
6	12,8	14,9	14,2
7	12,9	15,5	14,6
8	13,0	16,1	15,0
9	13,1	17,0	15,4
10	13,2	17,8	15,8
11	13,3	18,6	16,3
12	13,5	19,6	16,8
13	13,6	20,7	17,2
14	13,7	21,7	17,7
15	13,8	22,4	18,1
16	14,0	22,7	18,6
17	14,0	22,5	19,0
18	14,2	22,1	19,3
19	14,3	21,6	19,5
20	14,4	20,9	19,6
21	14,5	20,3	19,7
22	14,6	19,8	19,6
23	14,8	19,3	19,5
24	14,8	18,8	19,4

V tem poskusu nas je zanimalo kako na potek fermentacije vpliva temperatura okolice, torej prostora v katerem poskus izvajamo. Merili smo čas začetka reakcije in čas v katerem doseže fermentacija temperaturni maksimum. Pri poskusu smo spreminjali koncentracije sladkorja in kvasa.

Preglednica 7: Vpliv uporabe enakih koncentracij suhega kvasa in različnih sladkorjev na potek fermentacije pri 18 °C

čas (h)	temperatura (°C) vzorec 1 (glukoza + voda + kvas) 20,6 g + 100 ml + 3,5 g	temperatura (°C) vzorec 2 (saharoza + voda + kvas) 20,6 g + 100 ml + 3,5 g
1	18,5	18,9
2	19,3	19,3
3	19,5	19,5
4	19,9	19,9
5	20,3	20,2
6	20,6	20,6
7	20,9	20,8
8	21,2	21,2
9	21,4	21,4
10	21,7	21,6
11	21,9	21,8
12	22,1	21,9
13	22,0	21,9
14	21,9	21,8
15	21,7	21,5
16	21,5	21,4
17	21,4	21,2
18	21,2	21,0
19	21,0	20,9
20	21,0	20,9
21	21,1	21,0
22	21,2	21,1
23	21,2	21,3
24	21,3	21,4
25	21,4	21,5
26	21,6	21,6
27	21,6	21,7
28	21,8	21,8
29	21,9	21,9
30	22,0	22,0
31	22,0	22,0
32	22,1	22,1
33	22,1	22,2
34	22,2	22,2
35	22,2	22,2
36	22,1	22,1
37	21,9	21,9
38	21,7	21,6
39	21,4	21,3
40	21,2	21,1
41	21,0	20,9
42	20,7	20,7
43	20,7	20,7
44	20,7	20,7
45	20,7	20,7
46	20,8	20,7

Pri poskusu smo uporabili enake masne koncentracije sladkorjev in kvasa. Primerjali smo hitrost fermentacije med glukozo in saharozo.

3.6.4 Poskusi nastavljenih fermentacij mošta in sladkornih raztopin na vodnih kopelih

Preglednica 8: Merjenje temperature med fermentacijo mošta v vodnih kopelih (7. januar)

MOŠT	K, 33 °C	BK, 33 °C	K, 25 °C	BK, 25 °C	K, 17 °C	BK, 17 °C
čas						
8.00	28	30	23	25	16,5	16.5
8.45	26	28	23.5	23.5	16	18
9.35	32	33	23	24	16	18
10.25	30	32	23	23.5	17	18.5
11.15	33	35	25	24	18	18
12.15	35	37	25	25	17	18.5
13.05	33	35	25	25	17	18

Preglednica 9: Merjenje temperature med fermentacijo mošta v vodnih kopelih (8. januar)

MOŠT	K, 33 °C	BK, 33 °C	K, 25 °C	BK, 25 °C	K, 17 °C	BK, 17 °C
čas	33.5	36	18	18	17	17.5
8.00	34	36	18	18	17	17.5
8.45	32	34	19	19	17	18
9.35	32	32.5	25	25	18.5	17
10.25	34	36	25	25	18	17
11.15	30	31	25	25	18	17
12.15	32.5	34	25	25	18	17
13.05	33	33	24	25	18	17

LEGENDA PREGLEDNIC 7,8:

K, T (°C) – dodane selekcionirane kvasovke; temperatura vodne kopeli

BK, T (°C) – brez dodanih selekcioniranih kvasovk; temperatura vodne kopeli

Preglednica 10: Merjenje temperature med fermentacijo mošta v vodnih kopelih (9. januar)

MOŠT čas	K, 33 °C	BK, 33 °C	K, 25 °C	BK, 25 °C	K, 17 °C	BK, 17 °C
8.00	33,5	36	23	24	17	17,5
8.45	34	36	22	24	17	17,5
9.35	32	34	24	24,5	17	18
10.25	32	32,5	25	25	18,5	17
11.15	34	36	25	25	18	17
12.15	30	31	25	25	18	17
13.05	32,5	34	25	25	18	17
13.55	33	33	24	25	18	17

Preglednica 11: Merjenje temperature med fermentacijo mošta v vodnih kopelih (12. januar)

MOŠT čas	K, 33 °C	BK, 33 °C	K, 25 °C	BK, 25 °C	K, 17 °C	BK, 17 °C
8.00	32,5	35,5	25	24	17	17
8.45	34,5	36,5	25	24	17	17
9.35	33,5	33,5	24,5	24	17	17
10.25	32,5	32,5	24,5	24,5	17,5	17
11.15	33	33,5	24,5	24,5	18	17
12.15	31	30	24,5	25	18	17,5
13.05	33,5	36	25	25	18	17,5
13.55	33	33,5	25	25	18	17,5

LEGENDA PREGLEDNIC 9,10:

K, T (°C) – dodane selekcionirane kvasovke; temperatura vodne kopeli

BK, T (°C) – brez dodanih selekcioniranih kvasovk; temperatura vodne kopeli

Preglednica 12: Merjenje temperature med fermentacijo mošta v vodnih kopelih (13. januar)

MOŠT	K, 33 °C	BK, 33 °C	K, 25 °C	BK, 25 °C	K, 17 °C	BK, 17 °C
čas						
8.00	28	30	23	23.5	16,5	16.5
8.45	26	28	23.5	23.5	16	18
9.35	32	33	23	23	16	20
10.25	30	32	22.5	22.5	17	18.5
11.15	33	35	22	22	18	18
12.15	35	37	22	22	17	18.5
13.05	33	35	21	21	17	18

LEGENDA PREGLEDNICE 11:

K, T (°C) – dodane selekcionirane kvasovke; temperatura vodne kopeli
 BK , T (°C) – brez dodanih selekcioniranih kvasovk; temperatura vodne kopeli

Pri nastavljenih poskusih fermentacije, na vodnih kopelih želenih temperatur, smo prišli do zanimive ugotovitve, da termostat preneha delovati takoj, ko se vzorec v bučki zaradi reakcije segreje. V bistvu merimo ves čas temperature kopeli. Nastavljene temperature so različne, zato je različen tudi čas, v katerem se fermentacija zaključi. To je bilo zelo lepo vidno skozi steklene bučke. V času alkoholnega vrenja so bili izredno lepo vidni mehurčki. Bolj kot se je fermentacija bližala h koncu, večji je bil delež temnejše rjave usedline. To lahko pojasnimo z naraščajočo koncentracijo etanola, ki povzroči odmiranje kvasovk. Pri opazovanju poskusov smo videli, da se fermentacija mošta zaključi hitreje v primeru dodajanja selekcioniranih kvasovk. Bistrost dobljenih produktov z dodajanjem selekcioniranih kvasovk je večja.

Preglednica 13: Trajanje fermentacije grozdnega soka v odvisnosti od temperature vodnih kopeli in pH







temperatura vodene fermentacije (°C)	čas trajanja (dan) dodane kvasovke sladkorna stopnja 20,6	čas trajanja (dan) brez dodanih kvasovk sladkorna stopnja 20,6	pH
17	46	54	3
25	24	28	3
33	17	20	3

Preglednica 14: Trajanje fermentacije vzorcev grozdnega soka v odvisnosti od temperature okolice

št. vzorca grozdnega soka	čas trajanja fermentacije (dan)	dodajanje kvasovk	sladkorna stopnja	temperatura v šol. laboratoriju (°C)
1	35	✓	15,7	20
2	38	-	15,7	20
3	43	✓	21,6	20
4	44	-	21,6	20
5	53	-	29,6	23

Našega poskusa pri temperaturi 10 °C nismo mogli speljati zaradi tehnične napake vodne kopeli. Odločili smo se, da prosimo vinogradnika, ki nam je prispeval grozdje za eksperimentalni del, še za vzorec mladega vina po končani fermentaciji. Lastnik je moštu dodal enake selekcionirane kvasovke kot mi pri našem poskusu. V njegovi kleti je bila temperatura 8-10 °C. Po raziskavah je ta temperatura optimalna za proizvodnjo vrhunskih kakovostnih vin. Vzorec smo res dobili, saj smo želeli s kemijsko analizo ugotoviti sestavo posameznih komponent. Rezultate analiz smo uporabili za primerjavo med vzorci, ki smo jih kot produkt fermentacije pridelali v šolskem laboratoriju.

3.6.5 Merjenje sladkorne stopnje z refraktometrom

-  Grozdje: 21,6 % Sacch.
-  Grozdni sok : 21,6 % Sacch.
-  Sladkorna stopnja grozdnega soka po zamrzovanju in odtajanju (zgornji del steklenice): 15,7.
-  Sladkorna stopnja grozdnega soka po zamrzovanju in odtajanju (na dnu steklenice): 29,6.
-  Sladkorna stopnja odtaljenega groznega soka po dodajanju sladkorja: 21,6.
-  Glukozne raztopine z masno koncentracijo 180 g/l: 15,2.

Na osnovi izmerjenih sladkornih stopenj, s pomočjo korelacijske tabele (Priloga I), lahko ocenimo vsebnost etanola po končani fermentaciji.

Preglednica 15: Merjenje temperature med fermentacijo v vzorcih glukočnih raztopin v vodnih kopelih

čas merjenja [h]	vzorec 1	vzorec 2	vzorec 3	vzorec 4
	$T_{\text{kopeli}} = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{kopeli}} = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{kopeli}} = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{kopeli}} = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$
0	24,5	24,1	31,1	31,1
1	24,8	25,1	36,6	36,7
2	24,8	25,1	33,3	33,0
3	24,8	25,1	35,2	35,4
4	24,8	25,1	37,7	37,9
5	24,8	25,1	34,1	34,2
6	24,8	25,1	36,6	36,8
7	24,8	25,1	33,1	33,2
8	24,8	25,1	35,6	35,8
9	24,9	25,1	37,9	36,3
10	24,9	25,1	34,6	34,8
11	24,9	25,2	36,5	36,7
12	24,9	25,1	32,9	33,0
13	24,8	25,1	34,3	34,6
14	24,8	25,1	36,4	36,8
15	24,8	25,0	36,0	34,4
16	24,8	25,0	34,1	34,5
17	24,7	24,9	35,4	35,9
18	24,7	24,9	36,7	37,1
19	24,6	24,9	33,2	33,4
20	24,6	24,9	34,8	35,1
21	24,6	24,9	36,4	36,8
22	24,6	24,9	32,6	32,8
23	24,6	24,9	34,2	34,6
24	24,6	24,9	36,0	36,5
25	24,6	24,9	32,6	32,9
26	24,6	24,9	34,4	43,7
27	24,6	24,8	36,3	36,8
28	24,6	24,9	32,9	33,2
29	24,6	24,9	34,8	35,1
30	24,6	24,9	36,7	37,2
31	24,6	24,9	33,3	33,4
32	24,6	24,9	35,3	35,6
33	24,6	24,9	36,9	37,3
34	24,6	24,9	33,8	33,9
35	24,6	24,9	35,6	35,9
36	24,6	24,9	36,6	37,0
37	24,6	24,9	33,0	33,1
38	24,6	24,9	34,4	34,6
39	24,6	24,9	35,6	36,0
40	24,6	24,9	36,7	37,4
41	24,6	24,9	32,7	32,9
42	24,6	24,9	33,9	34,1
43	24,6	24,9	35,1	35,3
44	24,6	24,9	36,1	36,5

3.6.6 Določevanje specifične teže vina s piknometrom

Preglednica 16: Specifične teže pridobljenih vin v šolskem laboratoriju 06. 03. 2009

vzorec	m ₁ (g)	m ₂ (g)	m ₃ (g)
25 °C BK (v sobi)	20,6588	45,8344	45,7756
25 °C vk – K	20,1425	45,5923	45,4512
17 °C vk – K	20,4825	45,7021	45,5038
33 °C vk – K	20,4288	45,6087	45,5875

Legenda: K – kvasovke, BK- brez kvasovk, vk– vodna kopel

m₁ = masa praznega piknometra (g)

m₂ = masa piknometra z destilirano vodo 20 °C(g)

m₃ = masa piknometra z vzorcem 20 °C (g)

Preglednica 17: Specifične teže pridobljenih vin v šolskem laboratoriju 20. 03. 2008

vzorec	m ₁	m ₂	m ₃
25 °C BK (v sobi)	20,4640	45,4587	45,6469
17 °C vk – K	20,1284	45,1534	46,7322
17 °C vk – BK	20,6939	45,5930	45,6485
33 °C vk – BK	31,6594	82,8773	82,9715
25 °C vk – BK	31,2390	82,8857	82,6500
25 °C vk – K	20,3326	45,3120	45,4365

Legenda: K – kvasovke, BK- brez kvasovk, vk– vodna kopel

3.6.7 Določevanje kislin v vinu s titracijo

Preglednica 18: Porabe NaOH pri določevanju titracijskih kislin v vinu 06. 03. 2009







vzorec	V ₁ NaOH (ml)	V ₂ NaOH (ml)	V ₃ NaOH (ml)	V _{pop.} NaOH (ml)
25 °C BK (v sobi)	14,1	14,1	14,0	14,1
25 °C vk – K	9,1	9,1	9,1	9,1
17 °C vk – K	0,8	0,8	0,8	0,8
33 °C vk – K	1,1	1,2	1,1	1,1

Preglednica 19: Porabe NaOH pri določevanju titracijskih kislin v vinu 20. 03. 2009

vzorec	V ₁ NaOH (ml)	V ₂ NaOH (ml)	V ₃ NaOH (ml)	V _{pop.} NaOH (ml)
25 °C BK (v sobi)	10,6	10,6	10,5	10,6
17 °C vk – K	3,0	3,0	2,9	3,0
17 °C vk – BK	1,2	1,2	1,2	1,2
33 °C vk – BK	1,6	1,6	1,5	1,6
25 °C vk – BK	1,1	1,0	1,0	1,0
25 °C vk – K	12,5	12,4	12,5	12,5

Legenda: K – kvasovke, BK- brez kvasovk, vk– vodna kopel

3.6.8 Plinska kromatografija GC-MS

-  injiciranje: posredno z SPME vlaknom
-  kolona: VF-5MS 30 m; 0,25 mm ID;
-  T kolone: 40 °C (2 min) 4 °C/min do 150 °C (10 min) 10C/min do 220 °C
-  pretok skozi kolono: 1.5 ml He/min
-  T injektorja: 230 °C
-  detektor MS: scan mode m/z 40-300; 70 eV.

Preglednica 20: Sestava pridobljenega vina v laboratoriju (dodajanje kvasovk; 33 °C)

KOMPONENTA	SCAN	RT (min)	AREA	% AREA
ETIL ACETATE	127	2.057	372124	10,56
IZOBUTANOL	135	2.199	179151	5,08
ACETAL	221	3.559	16137	0,46
3-METIL BUTIL ALKOHOL	237	3.816	1114537	31,61
2-METIL BUTIL ALKOHOL	242	3.898	440680	12,50
ETIL BUTIRAT	360	5.774	12663	0,36
1-HEKSANOL	531	8.511	13131	0,37
IZOAMIL ACETAT	540	8.651	218026	6,18
BENZALDEHID	744	11.901	48672	1,38
ETIL HEXANOAT	824	13.178	66260	1,88
LIMONEN	887	14.184	23031	0,65
FENETIL ALKOHOL	1078	17.238	247938	7,03
IZOOKTANOL	1100	17.590	27283	0,77
1-OKTANOL	1110	17.756	18990	0,54
DIETIL BUTANEDIOAT	1200	19.190	13101	0,37
ETIL OKTANOAT	1227	19.615	208020	5,90
BLEEDING SPME VLAKNA	1408	22.513	119523	3,39
	1534	24.533	26735	0,76
ETIL DECENOAT	1567	25.051	14963	0,42
ETIL DEKANOAT	1580	25.262	150743	4,28
BLEEDING SPME VLAKNA	1627	26.017	49744	1,41
NOPYL ACETATE	1692	27.045	119362	3,39
ETIL DODEKANOAT	1965	31.385	24563	0,70
SKUPAJ			3525377	100,00

Preglednica 21: Sestava vina iz vinske kleti (dodajanje kvasovk; 8-10 °C)

KOMPONENTA	scan	RT	area	% area
ETIL ACETATE	127	2.055	1844317	25,13
IZOBUTANOL	136	2.199	60513	0,82
ACETAL	221	3.558	42162	0,57
3-METIL BUTIL ALKOHOL	237	3.815	806277	10,99
2-METIL BUTIL ALKOHOL	242	3.899	403399	5,50
ETIL IZOVALERAT	270	4.339	12683	0,17
BUTANDIOL	339	5.443	106870	1,46
ETIL BUTIRAT	360	5.777	49519	0,67
IZOAMIL ACETAT	540	8.652	110277	1,50
ETIL HEXANOAT	824	13.178	276632	3,77
LIMONEN	887	14.184	19060	0,26
2-NONANON	1021	16.326	10683	0,15
FENETIL ALKOHOL	1078	17.236	239261	3,26
DIETIL BUTANEDIOAT	1198	19.146	547089	7,46
ETIL OKTANOAT	1227	19.613	1475770	20,11
BLEEDING SPME VLAKNA	1409	22.506	87852	1,20
ETIL DECENOAT	1568	25.051	137141	1,87
ETIL DEKANOAT	1581	25.261	860354	11,72
DIMETIL NAFTALEN	1669	26.651	40519	0,55
BLEEDING SPME VLAKNA	1693	27.043	93840	1,28
	1730	27.624	52753	0,72
ETIL DODEKANOAT	1965	31.385	24715	0,34
BLEEDING SPME VLAKNA	2054	32.803	15362	0,21
	2056	32.830	21153	0,29
SKUPAJ			7338201	100,00

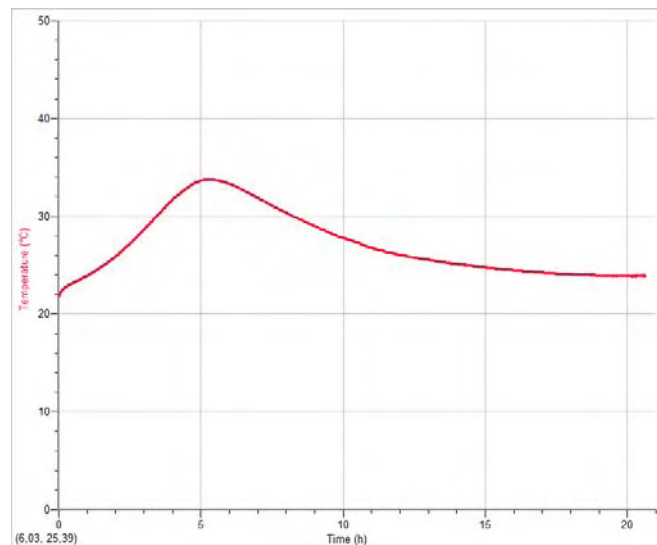
Preglednica 22: Sestava surogata (sladkor, kvas, voda; 22 °C)

KOMPONENTA	SCAN	RT(min)	AREA	% AREA
ETIL ACETATE	127	2.062	146437	2,66
IZOBUTANOL	136	2.202	162547	2,95
ACETAL	237	3.816	2049742	37,24
3-METIL BUTIL ALKOHOL	242	3.898	879986	15,99
2-METIL BUTIL ALKOHOL	540	8.654	74101	1,35
ETIL HEXANOAT	824	13.180	48383	0,88
LIMONEN	887	14.184	17032	0,31
FENETIL ALKOHOL	1078	17.229	442268	8,03
ETIL OKTANOAT	1227	19.615	634723	11,53
BLEEDING SPME VLAKNA	1408	22.513	87260	1,59
ETIL DEKANOAT	1580	25.262	717012	13,03
IZOAMIL OKTANOAT	1666	26.629	39971	0,73
BLEEDING SPME VLAKNA	1692	27.045	117875	2,14
ETIL DODEKANOAT	1964	31.387	87470	1,59
SKUPAJ			5504807	100,00

Vsebnost etanola v "vinu", ki je nastalo s fermentacijo sladkorne raztopine ob prisotnosti pekovskega kvasa smo poimenovali surogat. Analiza, ki je bila opravljena s plinsko kromatografijo je pokazala vsenost etanola 7,1 % .

4 REZULTATI

4.1 Vpliv koncentracij sladkorja in kvasa na potek fermentacije



Graf 5: Odvisnost temperature fermentacije glukozne raztopine od časa

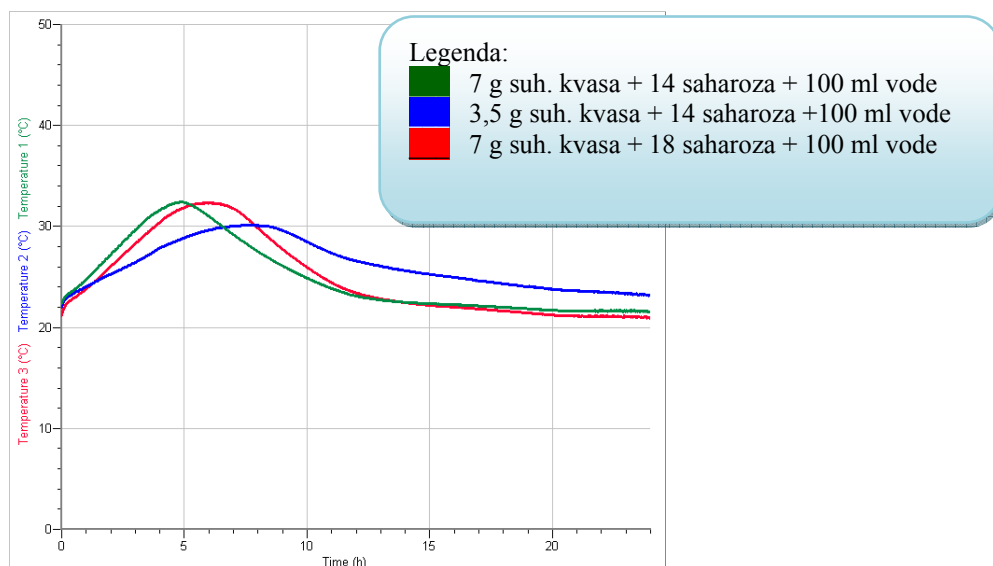
Graf 5 prikazuje, da se fermentacija intenzivno odvija prvih pet ur, ko doseže temperatura najvišjo vrednost. Fermentacija se zaključi v 23 urah. Ko odpremo termovko zaznamo vonj po alkoholu in kvasu.

Pri enaki masni koncentraciji glukoze poteče fermentacija prej, v primeru večje mase dodanega kvasa. 7 g kvasa povzroči fermentacijo v glukozni raztopini koncentracije 140 g/l tri ure prej kot, če dodamo polovično maso kvasa (3,5). Če uporabimo enake mase kvasa, spreminjamo pa masne koncentracije glukoze, dosežemo temperaturni maksimum prej v primeru nižje masne koncentracije sladkorja, ob upoštevanju konstantne temperature okolice.

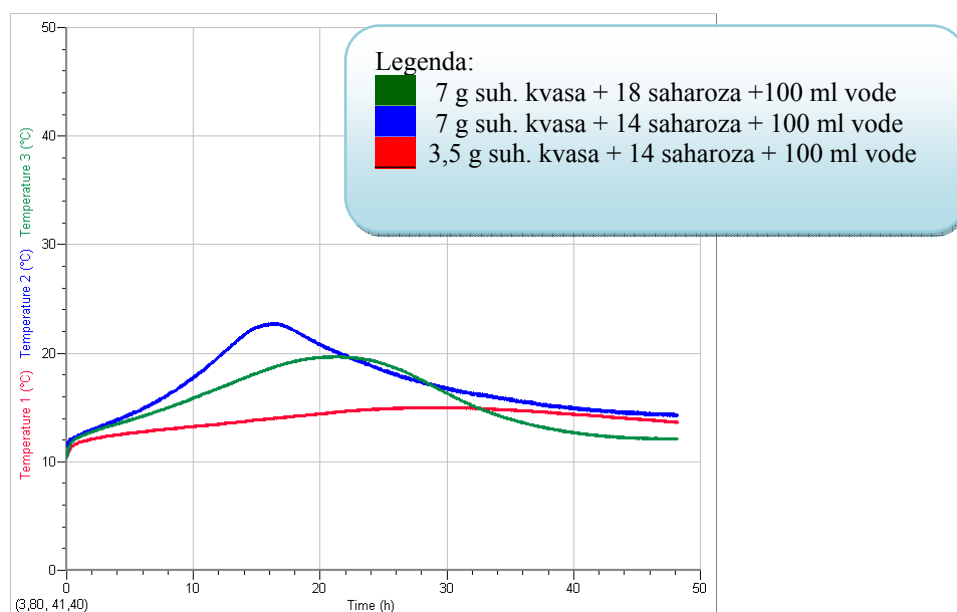
4.2 Prostornina sproščenega CO₂ pri fermentaciji

Masa sproščenega CO₂ pri fermentaciji sladkorne raztopine z masno koncentracijo 180 g/l znaša 48,8664 g. Prostornino smo določili na osnovi merjenja mase balona pred fermentacijo in takoj po doseganju temperaturnega maksimuma. Veljajo namreč zakonitosti plinov. Z naraščanjem temperature v termovki narašča tudi tlak, vse do temperaturnega maksimuma. Takoj, ko začne temperatura v termovki padati, pada tudi tlak v njej. Zaradi tega se ustvari podtlak in balon se začne krčiti. Meritev smo večkrat ponovili, da smo se balon naučili pravočasno, čim tesneje zavezati. Menimo, da ta način ni zanesljiv, dobljeni rezultati pa so vprašljivi.

4.2 Vpliv temperature okolice na potek fermentacije

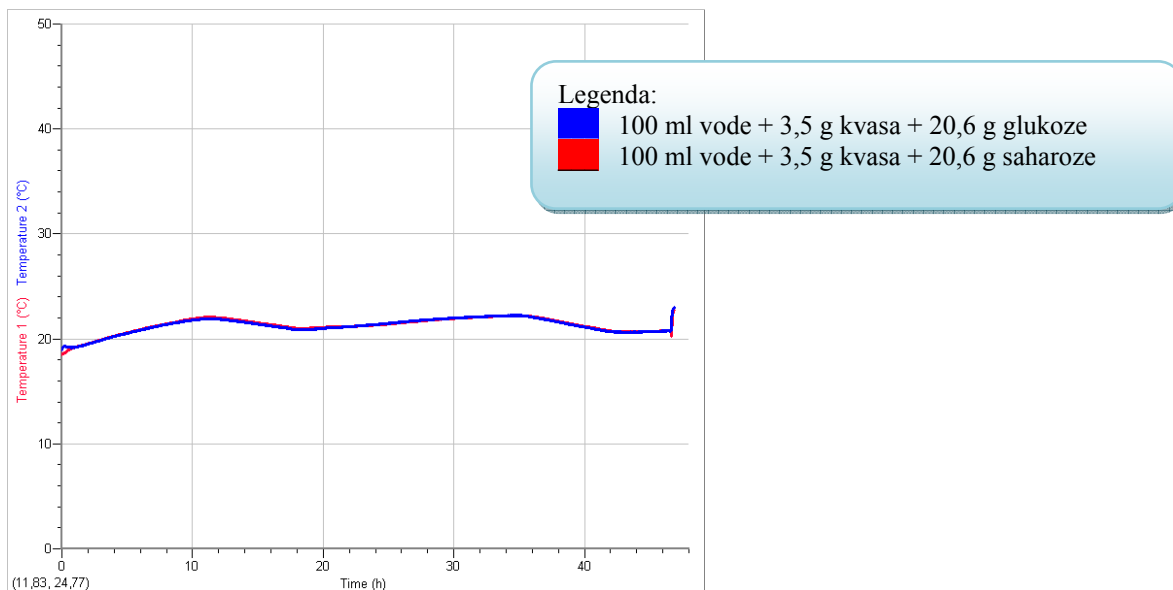


Graf 6: Odvisnost temperatur fermentacij različnih koncentracij sladkorja in kvasa od časa pri temperaturi okolice (20-22 °C)



Graf 7: Odvisnost temperatur fermentacij različnih koncentracij sladkorja in kvasa od časa pri temperaturi okolice (8-10 °C)

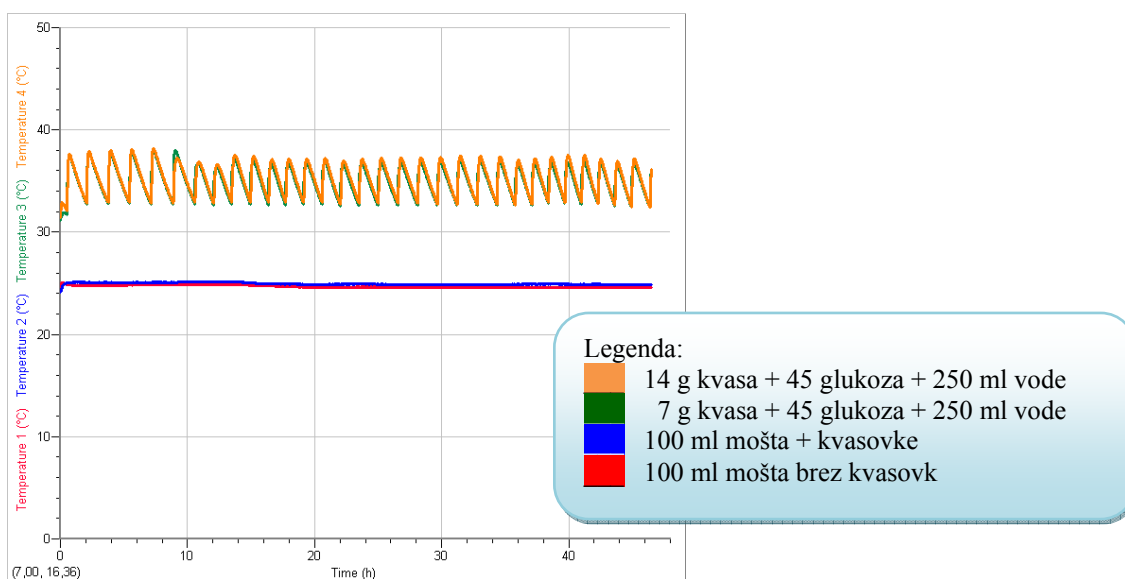
Če je temperatura prostora v katerem nastavimo fermentacijo nižja, npr. 8-10 °C, bo fermentacija potekala dlje časa, da dosežemo temperaturni vrh (16-23 ur). Pri temperaturi 20-22 °C pa je temperaturni vrh dosežen v času 5-8 ur.



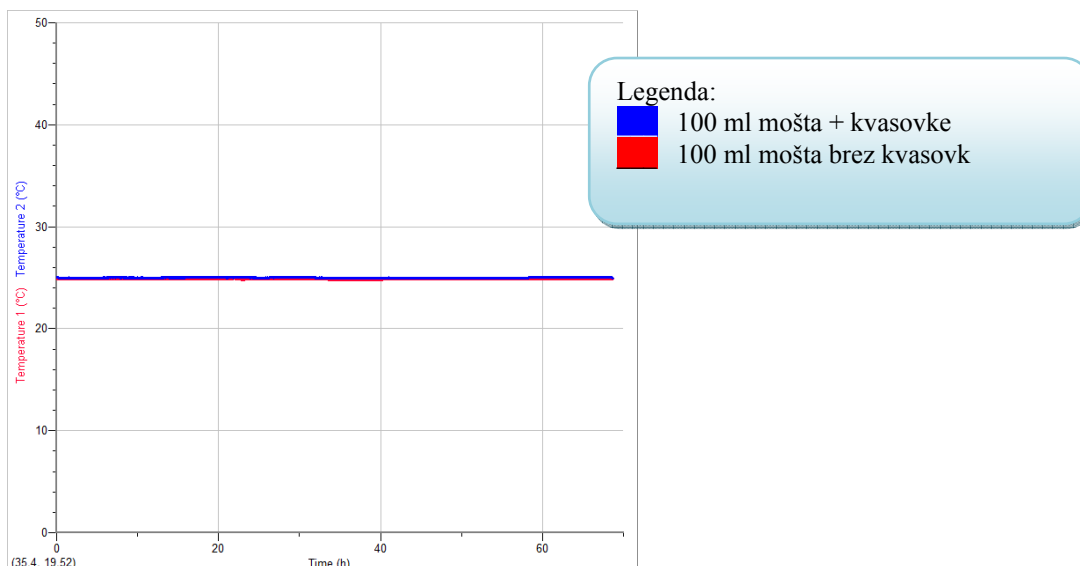
Graf 8: Odvisnost temperatur fermentacij od časa za raztopine različnih sladkorjev enakih koncentracij

Iz grafa 8 je lepo razvidno, da vrsta izbranega sladkorja ne vpliva na hitrost fermentacije. Pri enakih koncentracijah sladkornih raztopin glukoze in saharoze sta časa za porabljeni temperaturni ekstrem enaka.

4.3 Poskusi nadzorovanih fermentacij mošta in sladkornih raztopin na vodnih kopelih



Graf 9: Odvisnost temperature fermentacije od časa za različne vzorce na vodnih kopelih



Graf 10: Odvisnost temperature fermentacije od časa za vzorca mošta na vodni kopeli (25°C)

Vrednosti temperatur nihajo z nihanjem temperatur kopeli. Rezultati nam ne kažejo dejanskih temperaturnih nihanj v procesu fermentacije. Uporaba vodnih kopeli je za merjenje odvisnosti temperature od časa za posamezne vzorce popolnoma nesmiselna.

4.5 Specifične teže vin in vsebnost titracijskih kislin

Preglednica 23: Specifične teže in titracijske kisline vin 6. februar

vzorec 06. 03. 2009	specifična teža vzorcev	titracijske kisline (g/l)
25 °C BK (v sobi)	0,9977	10,6
25 °C vk – K	0,9945	6,8
17 °C vk – K	0,9921	0,8
33 °C vk – K	0,9992	0,6

Legenda: K – kvasovke, BK- brez kvasovk, vk– vodna kopel

Preglednica 24: Specifične teže in titracijske kisline vin 20. marec

vzorec 20. 03. 2009	specifična teža vzorcev	titracijske kisline (g/l)
25 °C BK (v sobi)	1,0148	7,6
17 °C vk – K	1,0631	2,3
17 °C vk – BK	1,0022	0,9
33 °C vk – BK	1,0018	1,2
25 °C vk – BK	0,9954	0,6
25 °C vk – K	1,0050	17,6




Legenda: K – kvasovke, BK- brez kvasovk, vk– vodna kopel

Rezultati izračunanih specifičnih tež v preglednici 23 potrjujejo, da je fermentacija zaključena, saj so vse vrednosti pod 1,0000.

Analize specifičnih tež vzorcev, ki smo jih po zaključeni fermentaciji pustili odprte pri sobni temperaturi, so zbrane v preglednici 24. Vrednosti kažejo na to, da je prišlo do očetno-kislinske fermentacije, nastajajo glicerol, kisline in druge snovi, ki so težje od vode.

4.6 Rezultati GC-MS

Vsebnosti etanola:

-  v sladkorni raztopini s kvasom (surogat) **7,1%** etanola,
-  v vzorcu vina, pridobljenega s fermentacijo pri temperaturi 33 °C ob dodatku kvasovk **11,2 %** in
-  v vzorcu vina, pridobljenega s fermentacijo v domači kleti, pri temperaturi 8-10 °C **11,5 %**.

Surogat močno odstopa v vsebnosti etanola, zato površine vrhov niso primerljive z drugima dvema. Vsebnost etanola se med vzorcema vin ne razlikuje bistveno glede na različne pogoje fermentacije (temperature). Razen etanola, so vse komponente prisotne v nizkih koncentracijah, zato je bilo uporabljeno SPME (solide phase micro extraction) vlakno. Etanol je v kromatogramih označen le s puščico, saj je bil detektor v tem času ugasnjen zaradi previsoke koncentracije etanola.

5 ZAKLJUČEK

Alkoholno vrenje je ena izmed vrst fermentacije. V tem biokemijskem procesu kvasovke pretvorijo sladkor v etanol, ogljikov dioksid in številne stranske snovi. Temperatura fermentacije je prav gotovo eden najpomembnejših dejavnikov, ki odloča o trajanju procesa, o njegovem začetku in zaključku, o sestavi in kakovosti končnega produkta. V naši raziskovalni nalogi smo želeli vse navedene kriterije podrobneje preučiti, zato smo si pri raziskovanju zastavili pet hipotez.

V prvi hipotezi smo predvidevali, da bo hitrost fermentacije večja pri višji temperaturi in se bo zato tudi prej zaključila. Domneva se je izkazala za pravilno, saj smo z dvema vzporednima poskusoma, pri dveh različnih temperaturah naše predvidevanje potrdili. Prvo hipotezo lahko torej v celoti potrdimo. Fermentacija doseže pri 20-22 °C temperaturni maksimum v petih urah, pri temperaturi 8-10 °C pa v 23 urah. Ugotovili smo še, da na potek fermentacije ne vpliva samo temperatura, ampak tudi koncentracija sladkorja in masa dodanega kvasa. Pri večji masni koncentraciji sladkorja, fermentacija poteče počasneje. Fermentacija poteče počasneje tudi v primeru, da dodamo manj kvasa.

Do enakega zaključka smo prišli tudi s poskusi z grozdnim sokom – moštom. Pri višji temperaturi se fermentacija zaključi hitreje. Pri 17 °C se fermentacija zaključi po 46 dneh, pri 25 °C po 24 dneh in pri 33 °C po 17 dneh.

V drugi hipotezi smo predvidevali, da fermentacijo lahko kontrolirano vodimo na temperaturno nastavljenih vodnih kopelih. Naše predvidevanje se je izkazalo za nepravilno. Z nastavitvijo vodnih kopeli na določeno temperaturo in uravnavanje le-te s termostati, ne moremo določiti temperaturnega maksimuma. Termometri dejansko merijo le temperature vodnih kopeli. Fermentacija je eksotermen proces, kar pomeni, da se sprošča toplota. Krivoljjo, ki nastane kot rezultat fermentacije, bi lahko razdelili v tri dele. V začetnem delu zaradi sproščanja toplote temperatura narašča, sledi temperaturni maksimum in nato njen padec, zaradi povečane koncentracije alkohola. Vsega tega v tem poskusu nismo mogli dokazati. To hipotezo moramo torej ovreči. Zadovoljiti smo se morali z dobrim opazovanjem pripravljenih bučk z moštom v vodnih kopelih. Začetek fermentacije smo prepoznali z nastajanjem mehurčkov, konec pa s prenehanjem izhajanja mehurčkov.

V tretji hipotezi smo pričakovali, da bodo dodane selekcionirane kvasovke moštu, pri različnih temperaturah pospešile fermentacijo. Tretjo hipotezo lahko v celoti potrdimo. Z grozdem namreč lahko v vino prenesemo široko paleto kvasovk, žlahtnih in neželenih. Z dodajanjem selekcioniranih kvasovk se izognemo razvoju neželenih in tako pospešimo hitrost fermentacije. Tako je fermentacija mošta pri 17 °C z dodanimi selekcioniranimi kvasovkami potekla osem dni prej, pri 25 °C

štiri dni in pri 33 °C tri dni prej, kot pri fermentacijah mošta brez dodanih selekcioniranih kvasovk.

V četrti hipotezi smo predvidevali, da se med fermentacijo sproščajo velike količine ogljikovega dioksida. Da v procesu fermentacije ta plin res nastaja, opazimo z izhajanjem mehurčkov. Maso CO₂ smo poskusili določiti, s pomočjo balona (tehtanje mase pred fermentacijo in po doseženem temperaturnem maksimumu) in s senzorjem za CO₂ preko Vernierjevega vmesnika. S senzorjem ni šlo, ker je bila koncentracija nastalega CO₂ prevelika. Hipotezo lahko v celoti potrdimo, saj se je prostornina balona z napolnjenim CO₂ med fermentacijo res zelo povečala. Rezultat, ki smo ga pridobili z merjenjem mas balona, pa je z vidika natančnosti metode zelo vprašljiva. Zaradi plinskih zakonitosti smo morali balon takoj po temperaturnem maksimumu, zelo dobro zavezati in hitro stehtati. Med meritvijo so se lahko večkrat ponovile sistematične napake, osebne napake in napake postopka.

V peti hipotezi smo pričakovali, da temperatura fermentacije vpliva na končno sestavo produkta. Tudi to hipotezo lahko v celoti potrdimo. Vsebnosti titracijskih kislin v vinu, pridelanem v procesu fermentacije, so pri različnih temperaturah povsem različne. Vsebnosti alkohola se med vzorcema vin, pridelanima s temperaturo fermentacije 8-10 °C (11,5 %) in 33 °C (11,2 %), bistveno ne razlikujeta. Močno pa se razlikujeta v vsebnosti nekaterih drugih alkoholov in aromatičnih snovi, ki vplivajo na senzorične lastnosti in razporeditev vin v ustrezni kakovostni razred.

Raziskovalno delo je potekalo po skrbno zastavljenih ciljih in je bilo izredno zanimivo. Naredili smo zelo obsežno raziskavo, ki bi pravzaprav lahko bila razdeljena v več raziskovalnih del. Raziskovanje pa nas je tako navdušilo in motiviralo, da smo želeli dobiti čim več odgovorov, saj smo za potrditev ene same hipoteze morali predhodno preveriti in preizkusiti nekatere pomembne kriterije in dejavnike.

Refraktometer smo npr. morali uporabiti zato, da smo določili masno koncentracijo sladkorja v grozdju in moštu. V prvi hipotezi smo ugotovili, da je le-ta izrednega pomena za hitrost fermentacije, vpliva pa tudi na končno vsebnost alkohola.

Z meritvami specifičnih tež vin, smo želeli ugotoviti ali je fermentacija res zaključena. Specifična teža vina, s povsem povretim sladkorjem, mora imeti vrednost pod 1,0000.

Z analizo titracijskih kislin smo želeli ugotoviti kakšna je stabilnost vina. Ta del je lahko izziv za nadaljnja raziskovanja, podobno kot iskanje uspešne metode za določevanje sproščenih količin CO₂. CO₂ uvrščamo med toplogredne pline in je zato tudi z vidika okoljevarstva problematičen, saj smo zasledili podatek, da se pri fermentaciji 1000 litrov mošta sprosti 44 000 litrov CO₂.

6 LITERATURA IN VIRI

1. BAJC, S. 1993: Diplomaska naloga – Vsebnost višjih alkoholov v sadnih žganjih. BF, Oddelek za živilstvo, Ljubljana.
2. BIZAJ, E. 2006: Diplomaska naloga – Vpliv sestave grozdnega soka na potek alkoholne fermentacije. BF, Oddelek za živilstvo, Ljubljana.
3. Boh, B., Cvirn, T., Ferk, V. 2000: Barvila in naravna barvila. TZS, Ljubljana.
4. Eaton, D. 1989: Laboratory investigations in organic chemistry. McGraw-Hill, USA.
5. HILL, G., J. HOLMAN, J. LAZONBY, J. RAFFAN, D. WADDINGTON. 2003: Kemija 2000. DZS, Ljubljana.
6. HOLMAN, J. 1998: Svet snovi. Založba obzorja, Maribor.
7. KODELE, M. 1999: Prehrana. DZS, Ljubljana.
8. RYAN, L. 2000: Kemija – preproste razlage kemijskih pojavov. TZS, Ljubljana.
9. SUWA – STANOJEVIČ, M. 2003: Tehnologija sadja, vrtnin in pijač. ZRSS, Ljubljana.
10. STUŠEK, P. 2002: Biologija učbenik za splošne gimnazije – Celica. DZS, Ljubljana.
11. [Uradni list RS, št. 43/2004](#) : Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu*

- ✓ http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol_fermentation, 22.3.09
- ✓ [http://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation_\(biochemistry\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation_(biochemistry)), 22.3.09
- ✓ [http://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation_\(wine\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation_(wine)), 22.3.09
- ✓ <http://sl.wikipedia.org/wiki/Kvasovke>, 22.3.09
- ✓ <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200443&stevilka=1930>
- ✓ http://web.bf.uni-lj.si/zt/bioteh/seminar_all/zivil/1999_00/Alkohol.pdf, 22.3.09
- ✓ http://web.bf.uni-lj.si/bi/biologija-mikroorganizmov/Studenti/Gradivo/Datoteke/seminar_vino.pdf, 22.3.09
- ✓ <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200240&stevilka=1910>
- ✓ <http://www.diwinetaste.com/html/dwt200701/images/SaccharomycesCerevisiae.jpg>
- ✓ http://www.bf.uni-lj.si/zt/bioteh/seminar_all/zivil/1999_00/Alkohol.pdf
- ✓ http://web.bf.uni-lj.si/bi/biologija-mikroorganizmov/Studenti/Gradivo/Datoteke/seminar_vino.pdf

PRILOGE

Priloga I: korelacijska tabela med gostoto mošta, relativno gostoto in sladkorno stopnjo

Gostota mošta (g/cm ³)	Relativna gostota	° Oe	% saharoze (m/m)	Sladkor (g/l)	Alkohol (vol. %)
1.0681	1.0700	70.0	16.9	157.0	9.33
1.0685	1.0704	70.4	17.0	158.1	9.39
1.0690	1.0709	70.9	17.1	159.3	9.47
1.0694	1.0713	71.3	17.2	160.4	9.53
1.0699	1.0718	71.8	17.3	161.5	9.59
1.0703	1.0722	72.2	17.4	162.6	9.66
1.0707	1.0726	72.6	17.5	163.7	9.73
1.0711	1.0730	73.0	17.6	164.8	9.79
1.0716	1.0735	73.5	17.7	165.9	9.86
1.0720	1.0739	73.9	17.8	167.0	9.92
1.0724	1.0743	74.3	17.9	168.1	9.99
1.0729	1.0748	74.8	18.0	169.3	10.06
1.0733	1.0752	75.2	18.1	170.4	10.12
1.0738	1.0757	75.7	18.2	171.5	10.19
1.0742	1.0761	76.1	18.3	172.6	10.26
1.0746	1.0765	76.5	18.4	173.7	10.32
1.0751	1.0770	77.0	18.5	174.9	10.39
1.0755	1.0774	77.4	18.6	176.0	10.46
1.0760	1.0779	77.9	18.7	177.2	10.53
1.0764	1.0783	78.3	18.8	178.3	10.59
1.0768	1.0787	78.7	18.9	179.4	10.66
1.0773	1.0792	79.2	19.0	180.5	10.72
1.0777	1.0796	79.6	19.1	181.7	10.80
1.0782	1.0801	80.1	19.2	182.8	10.86
1.0786	1.0805	80.5	19.3	183.9	10.93
1.0791	1.0810	81.0	19.4	185.1	11.00
1.0795	1.0814	81.4	19.5	186.3	11.07
1.0800	1.0819	81.9	19.6	187.4	11.13
1.0804	1.0823	82.3	19.7	188.6	11.21
1.0809	1.0828	82.8	19.8	189.7	11.27
1.0813	1.0832	83.2	19.9	190.8	11.34
1.0817	1.0836	83.6	20.0	191.9	11.40
1.0822	1.0841	84.1	20.1	193.1	11.47
1.0826	1.0845	84.5	20.2	194.2	11.54
1.0831	1.0850	85.0	20.3	195.3	11.60
1.0835	1.0855	85.5	20.4	196.5	11.68
1.0840	1.0860	86.0	20.5	197.7	11.75
1.0844	1.0864	86.4	20.6	198.8	11.81
1.0849	1.0869	86.9	20.7	200.0	11.88
1.0853	1.0873	87.3	20.8	201.1	11.95
1.0857	1.0877	87.7	20.9	202.2	12.01
1.0862	1.0882	88.2	21.0	203.3	12.06
1.0866	1.0886	88.6	21.1	204.5	12.13
1.0871	1.0891	89.1	21.2	205.7	12.22
1.0875	1.0895	89.5	21.3	206.8	12.29
1.0880	1.0900	90.0	21.4	207.9	12.35
1.0884	1.0904	90.4	21.5	209.1	12.42
1.0889	1.0909	90.9	21.6	210.3	12.50
1.0893	1.0913	91.3	21.7	211.4	12.56

Priloga II: Kromatogram sestavin v vzorcih vin - identifikacija

Print Date: 08 Feb 2008 15:01:10

Chromatogram Plots

Plot 1: d:\varian\msd\data\winno - sams R10 all
 Plot 2: d:\varian\msd\data\winno ferment\ran0001.sams R10 all
 Plot 3: d:\varian\msd\data\winno surrogat.sams R10 all

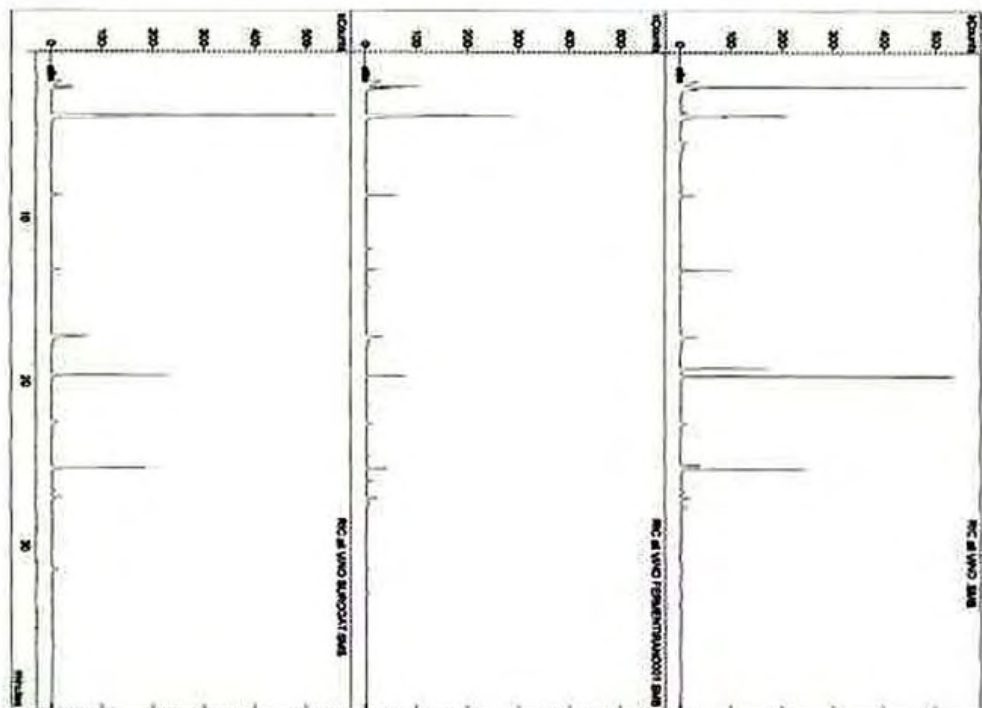


Priloga III: Kromatogrami vzorcev

Metoda: B19_2007_02.D

Chromatogram Plots

- Plot 1: c:\chemres\data\1907\1907001.sms R1C.rtf
- Plot 2: c:\chemres\data\1907\1907001.sms R1C.rtf
- Plot 3: c:\chemres\data\1907\1907001.sms R1C.rtf



Metoda: B19_2007_02.D

Overlaid Chromatogram Plots

- Plot 1: c:\chemres\data\1907\1907001.sms R1C.rtf
- Plot 2: c:\chemres\data\1907\1907001.sms R1C.rtf

