



ΤΜΗΜΑ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΖΥΜΩΣΕΩΝ

Άσκηση 10^η

ΤΙΤΛΟΣ: Παραγωγή αφρωδών οίνων με ακινητοποιημένους ζυμομύκητες

ΣΚΟΠΟΣ:

Η θεματική ενότητα αυτή αποσκοπεί να καταστήσει το σπουδαστή ικανό να παράγει αφρώδες οίνους με ακινητοποιημένους ζυμομύκητες.

ΣΤΟΧΟΙ:

Με την ολοκλήρωση της θεματικής ενότητας ο σπουδαστής θα είναι σε θέση να :

1. εφαρμόσει τη μεθοδολογία ακινητοποίησης για την παραγωγή αφρωδών οίνων
2. ελέγχει και να αξιολογεί τις ποιοτικές παραμέτρους

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΘΕΜΑΤΙΚΗΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ενυδάτωση ζυμών

Οι ζύμες που χρησιμοποιούμε περιέχουν $2 \cdot 10^{10}$ ζώντα κύτταρα ανά 1g (ο συνολικός πληθυσμός είναι $2,5 \cdot 10^{10}$ κύτταρα ανά g). Η ενυδάτωση και η ανάμιξη για κάθε μέθοδο γίνεται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε ο πληθυσμός των κυττάρων που βρίσκεται στο διάλυμα που θα σχηματίσει το gel να ανέρχεται σε $2 \cdot 10^8$ κύτταρα ανά 1ml φορέα ακινητοποίησης. Για τον σχηματισμό του gel χρησιμοποιείται βελόνα (πλαστική) της οποίας μετράται ο όγκος κάθε σταγόνας που σχηματίζει. Βρίσκουμε ότι οι 100 σταγόνες διαλύματος αλγινικού νατρίου 1,92%(w/v) έχουν όγκο 1,35ml. θεωρούμε ότι και τα διαλύματα του αλγινικού νατρίου 2,5%(w/v), πολύ-αιθυλενο-γλυκόλης 20% , καραγενάνης 2%(w/v) και xanthan gum 0,3% έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Χρησιμοποιούμε δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους τοποθετούμε 10ml θρεπτικό υπόστρωμα με 25, 50 και 100g/l γλυκόζη. Σε κάθε σωλήνα τοποθετούνται 10 σφαιρίδια άρα:

100 σφαιρίδια 1,35ml

10 σφαιρίδια 0,135ml

Επομένως τα 100ml $2 \cdot 10^{10}$ κύτταρα
0,135ml X;

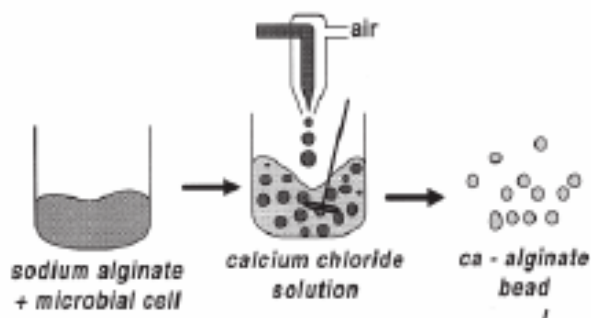
$X = 2 \cdot 10^7$ κύτταρα ζυμών / 10ml υποστρώματος

Χρειαζόμαστε επομένως για κάθε μέθοδο να προσθέσουμε $2 \cdot 10^7$ κύτταρα ζυμών / 10ml υποστρώματος

Μονή ακινητοποίηση

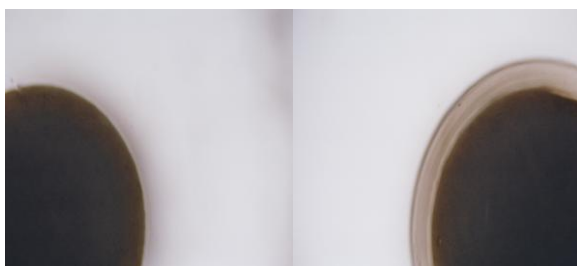
Σε διάλυμα αλγινικού νατρίου 2,5%(w/v) αναμιγνύονται ενυδατωμένες ζύμες. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται με προσθήκη 1g ζυμών σε 10ml νερού

βρύσης. Μετά γίνεται ανάμιξη 10ml νερού με 90ml αλγινικού νατρίου. Οι ζύμες που χρησιμοποιούμε περιέχουν $2 \cdot 10^{10}$ ζώντα κύτταρα ανά 1g. Επομένως ο πληθυσμός των κυττάρων που βρίσκεται στο αλγινικό ανέρχεται σε $2 \cdot 10^8$. Στην συνέχεια με την βοήθεια της σύριγγας προστίθενται σταγόνες σε διάλυμα CaCl_2 2%(w/v) το οποίο βρίσκεται υπό ανάδευση. Τα σχηματισθέντα σφαιρίδια αφήνονται κατά προσέγγιση στο διάλυμα αυτό για περίπου 15 λεπτά και μετά μεταφέρονται σε διάλυμα CaCl_2 0,2%(w/v).

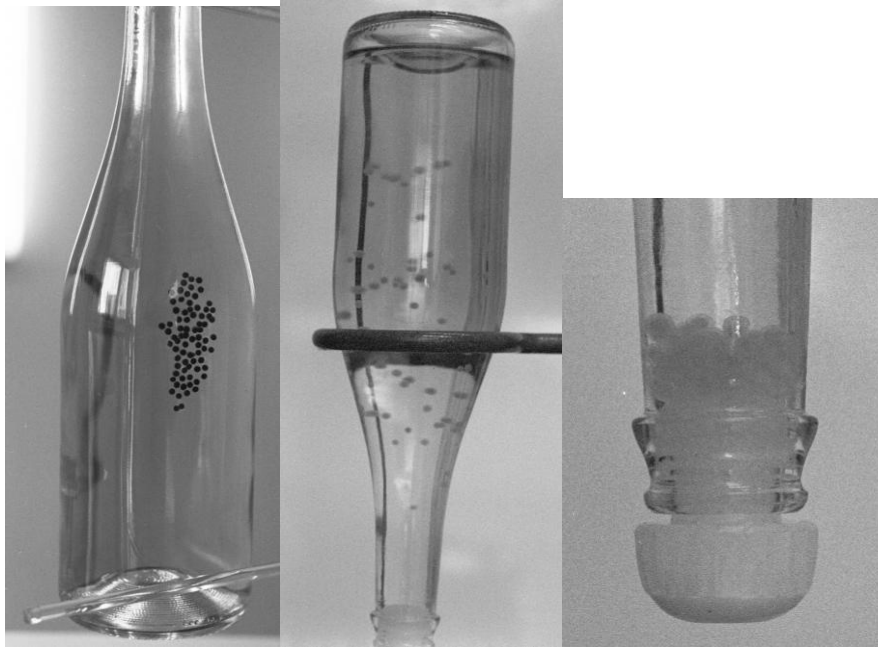


Ζύμωση

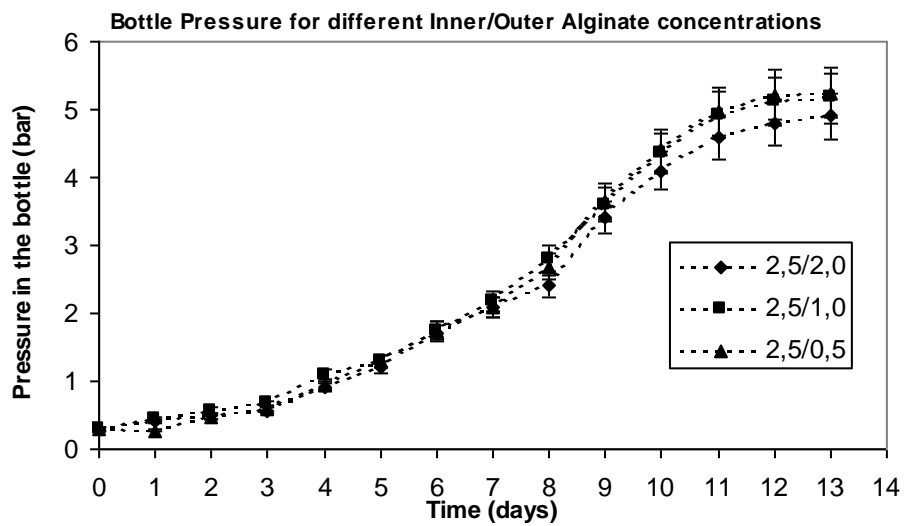
Προετοιμάζονται γυάλινες φιάλες (αποστειρωμένες) στις οποίες προστίθενται οίνος αποστειρωτικά φιλτραρισμένος με αλκοολικό τίτλο 11%vol, χωρίς θειώδη ανυδρίτη και με συγκέντρωση σακχάρων 24 g/L. Σε κάθε φιάλη προστίθενται διαφορετική ποσότητα σφαιριδίων. Οι φιάλες ταπώνονται με πώματα τύπου κορώννας και αφήνονται προς ζύμωση σε θερμοκρασία 20 °C. Η πορεία της ζύμωσης παρακολουθείτε με τη μέτρηση της πίεσης του διοξειδίου του άνθρακα μέσα στη φιάλη με ειδική συσκευή (μανόμετρο). Μετά το τέλος της ζύμωσης γίνονται αναλύσεις αναγόντων σακχάρων, αλκοολικού τίτλου, pH, πληθυσμού ζυμών (λόγω διάρρηξης) και βιωσιμότητας.



Σφαιρίδια μονής και διπλής ακινητοποίησης



Σφαιρίδια σε φιάλη αφρώδους οίνου

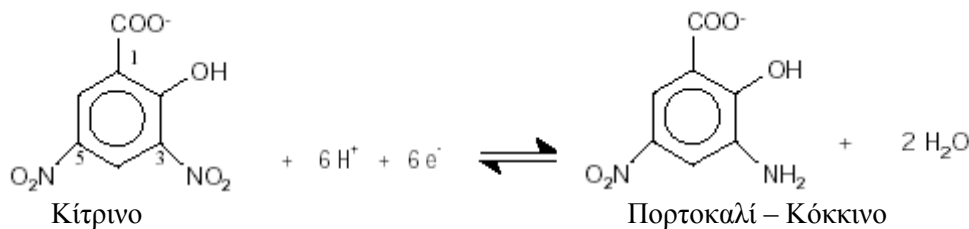


Μεταβολή της πίεσης κατά τη διάρκεια 2^{ης} ζύμωση στη φιάλη με ακινητοποιημένους ζυμομύκητες

Μέθοδος Ανάλυσης D.N.S. για Ανάγοντα Σάκχαρα

Αρχή

Κατά τη θέρμανση των αναγώντων σακχάρων σε αλκαλικό περιβάλλον, παρουσία του διαλύματος **D.N.S. (δίνιτρο 3,5 σαλκυλικό οξύ)**, έχουμε αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από κίτρινο σε πορτοκαλί. Η αλλαγή είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των σακχάρων, πορτοκαλί (λίγα σάκχαρα) προς σκούρο καφέ (πολλά σάκχαρα). Η αλλαγή του χρώματος που θα προκληθεί στο δείγμα μας συγκρίνεται με τις αλλαγές σε μία γκάμα πρότυπων διαλυμάτων σακχάρων (π.χ. γλυκόζης) από 0 g/L έως 2 g/L. Γενικά τα πρότυπα θα πρέπει να παρασκευάζονται με το ίδιο σάκχαρο που θέλουμε να μετρήσουμε. Η μέθοδος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περίπλοκα μείγματα αναγώντων σακχάρων.



Κίτρινο

Πορτοκαλί – Κόκκινο

Ανάγοντα σάκχαρα

Οξειδωμένο προϊόν + n e⁻

Για να απομακρύνουμε από το δείγμα προς ανάλυση διάφορες ουσίες που μπορεί να επηρεάσουν τη μέτρηση (π.χ. πρωτεΐνες), επεξεργαζόμαστε το δείγμα ως εξής:

Αναμειγνύουμε σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα:

4 mL δείγματος

0,5 mL διαλύματος ZnSO₄ à 5%

0,5 mL διαλύματος Ba(OH)₂ à 0,3 N

Ανακατεύουμε καλά και αφήνουμε για 10 λεπτά και φυγοκεντρούμε.

Το υπερκείμενο υγρό αποτελεί πλέον το δείγμα μας. Δεν θα πρέπει να ξεχνάμε ότι λόγω της επεξεργασίας αυτής αραιώσαμε το δείγμα μας σε αναλογία 4/5, έτσι θα πρέπει να πολλαπλασιάσουμε τη συγκέντρωση που θα βρούμε στο τέλος με 5/4 (δηλ. *1,25).

Προετοιμασία αντιδραστήριων:

- 2,5 g (δίνιτρο 3,5 σαλκυλικό οξύ) D.N.S.
- 75 g τρυγικό καλλιονάτριο
- 4 g NaOH (στερεό)

Συμπληρώνουμε με 250 mL απεσταγμένο νερό και αναδεύουμε μέχρι να διαλυθούν όλα τα στερεά. Το αντιδραστήριο αυτό έχει χρώμα πορτοκαλί και μπορεί να διατηρηθεί έως και 15 μέρες στους 4°C μακριά από το φως, σε μια καθαρή, σκοτεινή φιάλη (ή τυλιγμένη με αλουμινόχαρτο). Το δίνιτρο 3,5 σαλκυλικό οξύ (D.N.S.) είναι επικίνδυνο αντιδραστήριο και δεν θα πρέπει να ερχόμαστε σε επαφή μαζί του.

Παρασκευάζουμε μία γκάμα πρότυπων διαλυμάτων αναγώντων σακχάρων με συγκεντρώσεις: 0 g/L-0,5 g/L-1 g/L-1,5 g/L-2 g/L, στην περίπτωση μας από διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος των 2 g/L γλυκόζης για να μετρήσουμε τα σάκχαρα σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν μόνο γλυκόζη (50% γλυκόζη και 50% φρουκτόζη για την ανάλυση οίνου).

Για να κάνουμε τη μέτρηση μας αναμειγνύουμε σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα χωρητικότητας 20 mL:

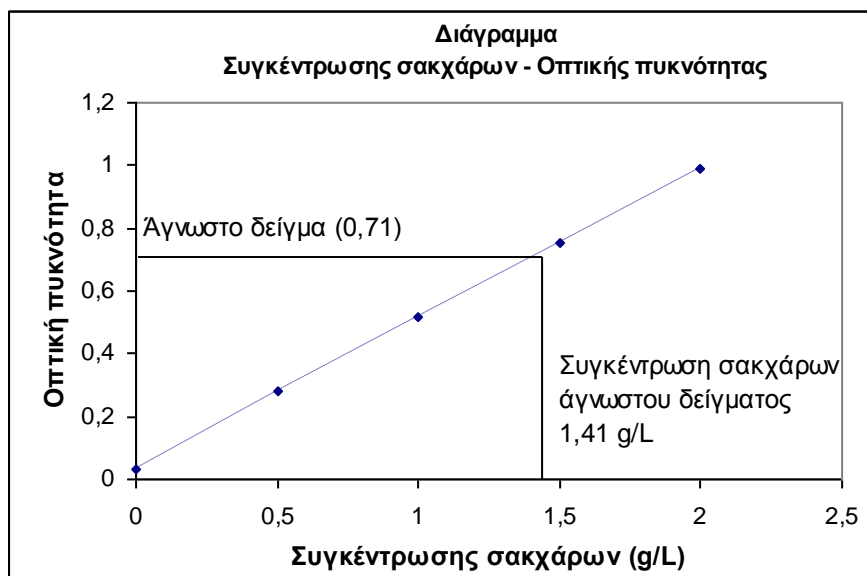
- 1 ml δείγματος σακχάρων επεξεργασμένο για την απομάκρυνση πρωτεϊνών και κατάλληλα αραιωμένο για να έχει συγκέντρωση σακχάρων κάτω από 2 g/L.

- 1 ml διαλύματος D.N.S (ή 2 ml).

(Αυτό γίνεται για όλα τα δείγματα προς ανάλυση και για τα πρότυπα)

Ανακατεύουμε καλά και τοποθετούμε όλους μαζί τους δοκιμαστικούς σωλήνες κλειστούς (π.χ. με παραφίλμ) για να μην εξατμιστεί το δείγμα σε ένα υδατόλουτρο που βράζει στους 100°C για 5 λεπτά ακριβώς. Έπειτα ψύχουμε τους σωλήνες και προσθέτουμε στον καθένα ακριβώς 10 mL απεσταγμένου νερού. Ανακατεύουμε καλά και μετράμε την οπτική πυκνότητα στα 540 nm, αφού πρώτα μηδενίσουμε το όργανο με νερό.

Από τις τιμές της γκάμας των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζουμε ένα διάγραμμα της οπτικής πυκνότητας προς τη συγκέντρωση σακχάρων.



Από το διάγραμμα βρίσκουμε τη συγκέντρωση των σακχάρων που αντιστοιχεί στα άγνωστα δείγματα αφού πολλαπλασιάσουμε με τις κατάλληλες αραιώσεις:

$$\text{Συγκέντρωση σακχάρων (g/L) δείγματος} = \text{Οπτική πυκνότητα} * \text{Αραιώσεις}$$

Το πειραματικό λάθος της μέτρησης είναι περίπου 5,3 %.

Τα ανάγοντα σάκχαρα στο κρασί είναι κυρίως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Η κατανάλωση τους εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και τις συνθήκες ζύμωσης, αλλά για τις περισσότερες ζύμες παρατηρείται μια πιο γρήγορη κατανάλωση της γλυκόζης. Εξαιρέση αποτελούν τα φρουκτοφιλικά στελέχη ζυμομυκήτων.

Γενικά θεωρούμε ότι η αλκοολική ζύμωση για έναν οίνο έχει τελειώσει όταν μένουν λιγότερο από 2 g/L αναγώντων σακχάρων. Αν θέλουμε να αναλύσουμε οίνους τα πρότυπα θα πρέπει να περιέχουν στα ίδια ποσοστά τα ίδια σάκχαρα που υπάρχουν και στον οίνο. Κατά παραδοχή χρησιμοποιούμε πρότυπα διαλύματα με 50% γλυκόζη και 50% φρουκτόζη.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ – ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

1. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και ποια τα μειονεκτήματα της χρήσης ακινητοποιημένων ζυμών για την παραγωγή οίνου ? (σε βιομηχανική κλίμακα)

Πλεονεκτήματα

Ευκολία χρήσης

Καλύτερος έλεγχος της ζύμωσης (μεγαλύτερες ταχύτητες και αποδόσεις ζύμωσης)

Προστασία των μικροοργανισμών από αντίξοους παράγοντες

Δυνατότητα Επαναχρησιμοποίηση

Εύκολη απομάκρυνση των μικροοργανισμών - απολάσπωση

Μειονεκτήματα

Ειδικευμένο προσωπικό

Κόστος αγοράς

2. Ποιες είναι οι χρήσεις των ακινητοποιημένων μικροοργανισμών στην οινολογία ?

Χρήση *Saccharomyces cerevisiae* για την επανεκκίνηση της ζύμωσης αν έχει σταματήσει

Δεύτερη ζύμωση των αφρωδών οίνων

Χρήση *Schizosaccharomyces pombe* για την μείωση της οξύτητας

Χρήση Γαλακτικών βακτηρίων για την μείωση της οξύτητας (μηλικογαλακτική ζύμωση)

Παραγωγή ξυδιού με οξικά βακτήρια

3. Τι είναι παθητική και τι ενεργητική ακινητοποίηση αναφέρατε παραδείγματα φορέων ακινητοποίησης για κάθε τύπο ?

Παθητική ακινητοποίηση είναι εκείνη που επιτρέπει την προσκόλληση του μικροοργανισμού χωρίς επεξεργασία του υποστρώματος ή του μικροοργανισμού, ή του θρεπτικού μέσου.

Γίνεται σε επιφάνειες αδρανών υλικών όπως: γυαλί, νάυλον, πλαστικά, ενεργός άνθρακας, περλίτης.

Ενεργητική ακινητοποίηση γίνεται κατόπιν επεξεργασίας του υποστρώματος ή του οργανισμού. Η μέθοδος αναγκάζει τον μικροοργανισμό να ακινητοποιηθεί σε υλικά όπως: αλγινικό άλας, καραγεννάνες, άγαρ, κλπ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Νεραντζής Η. Σημειώσεις εργαστηρίου Γενικής Μικροβιολογίας. 1997. ΤΕΙ Αθήνας, ΣΤΕΤΡΟΔ, Τμήμα Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών.
2. Νεραντζής Ηλίας (2002) « Μικροβιακή Τεχνολογία » Σημειώσεις ΤΕΙ Αθήνας
3. Veliky, I. 1994. Introduction. In I. Veliky and R. McLean (ed.), Immobilized Biosystems theory and practical applications. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
4. Fleet G.H. The microorganismes of winemaking - Isolation, enumeration and identification. In Wine Microbiology and Biotechnology. Ed. by G.H. Fleet. 1992, 1-26, Harwood Academic Pub., Switzerland.
5. BAILLEY J.E., OLLIS D.F. Biochemical engineering fundamentals. 1986, 2nd edition, McGraw-Hill, Singapore.
6. MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 1959, 31, 426-428.
7. TATARIDIS P., P., NTAGAS, I.VOULGARIS, E.T. NERANTZIS. (2005). Production of sparkling wine with immobilized yeast fermentation. Electronic journal of Science & Technology, vol. 1, p. 1-21.