

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristjan KRAŠEVEC

**KINETIKA METABOLIZMA MAGNETIZIRANIH  
KVASOVK *Saccharomyces bayanus* IN MOŽNOST  
UPORABE V TEHNOLOGIJI PENEČIH VIN**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristjan KRAŠEVEC

**KINETIKA METABOLIZMA MAGNETIZIRANIH KVASOVK *Saccharomyces bayanus* IN MOŽNOST UPORABE V TEHNOLOGIJI PENEČIH VIN**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**KINETICS OF METABOLISM MAGNETIZED YEAST *Saccharomyces bayanus* AND POSSIBLE APPLICATIONS IN TECHNOLOGY SPARKLING WINES**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje biotehnologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu »Jozef Stefan« in Fakulteto za Kemijo in kemijsko tehnologijo.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bil 20. 6. 2012 za mentorja predlagan prof. dr. Marin Berovič, za somentorja magistrskega dela prof. dr. Darko Makovec, za recenzentko pa prof. dr. Tatjana Košmerl.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Marin Berovič  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo

Član: prof. dr. Darko Makovec  
Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

Članica: prof. dr. Tatjana Košmerl  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisni izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Kristjan Kraševac

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2

DK UDK 602.3:582.282.23:663.2:620.3 (043.2)=163.6

KG vino/kvasovke/peneča vina/nanotehnologija/magnetni nanodelci/*Saccharomyces bayanus*/tehnologija penečih vin

AV KRAŠEVEC, Kristjan

SA BEROVIČ, Marin (mentor)/ MAKOVEC Darko (somentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije

LI 2014

IN KINETIKA METABOLIZMA MAGNETIZIRANIH KVASOVK *Saccharomyces bayanus* IN MOŽNOST UPORABE V TEHNOLOGIJI PENEČIH VIN

TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)

OP XII, 65 str., 3 pregl., 41 sl., 38 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Uporaba nanotehnologije v industriji vedno bolj narašča in kaže velik potencial v prihodnosti. Uporaba le-te je mogoča tudi na področju vinarstva. Izdelali smo postopek priprave magnetiziranih kvasovk za uporabo v primarni in nato v sekundarni fermentaciji vina. Magnetne nanodelce železovega oksida maghemita, ki so izkazovali pozitiven električni naboj, smo absorbirali na kvasovke, ki so izkazovale negativni električni naboj. V primarni in sekundarni fermentaciji smo preverili kinetiko metabolizma magnetiziranih kvasovk *Saccharomyces bayanus*. Ob tem smo ugotovili, da prihaja do kvalitativnih sprememb v produkciji etanola in glicerola, ter porabi sladkorjev tekom alkoholne fermentacije. Nastajanje EtOH in glicerola je počasnejše in manjše, poraba glukoze in fruktoze pa zmanjšana. Razlike so tudi v nastajanju organskih kislin, predvsem mlečne, ki je zastopana v manjših koncentracijah, tako v primarni, kot v sekundarni alkoholni fermentaciji. Ugotovili smo, da imajo v primarni alkoholni fermentaciji magnetni nanodelci vpliv na dihanje, v sekundarni alkoholni fermentaciji pa nimajo vpliva na nastajanje tlaka v steklenici. Analiza kovin je pokazala višjo vsebnost železa v vzorcih, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci. Najvišja vsebnost železa je bila v vzorcu, kjer je bilo masno razmerje kvasovke in magnetni nanodelci 1:3. S SEM in TEM analizo smo potrdili ugotovitev, da se magnetni nanodelci železovega oksida adsorbirajo na površino kvasovk, vendar pa je kemijska analiza pokazala, da se tekom sekundarne fermentacije raztaplja, zato ti nanodelci niso primerni za uporabo v tehnologiji penečih vin.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 602.3:582.282.23:663.2:620.3 (043.2)=163.6

CX wine/yeast/sparkling wine/nanotechnology/magnetic nanoparticles / *Saccharomyces bayanus* / technology sparkling wines

AU KRAŠEVEC, Kristjan

AA BEROVIČ, Marin (supervisor)/ MAKOVEC, Darko (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master study in Biotechnology

PY 2014

TI KINETICS OF METABOLISM MAGNETIZED YEAST *Saccharomyces bayanus* AND POSSIBLE APPLICATIONS IN TECHNOLOGY SPARKLING WINES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XII, 65p., 3 tab., 41 fig., 38 ref.

LA sl

AL sl/en

AI Application of nanotechnology in industry is increasing and shows great potential in the future. Using the latter is also possible in the wine sector. We developed a method of preparing magnetized yeast for use in the primary and then in the secondary fermentation of wine. Magnetic nanoparticles of iron oxide maghemite, which showed a positive electric charge, were absorbed in yeast, which showed a negative electric charge. In the primary and secondary fermentation kinetics of metabolism was tested magnetized yeast *Saccharomyces bayanus*. At the same time, we found that there is a qualitative change in the production of ethanol and glycerol, and use of sugars during the alcoholic fermentation. Production of ethanol and glycerol is slower and less consumption of production of glucose and fructose is reduced. There are also differences in the formation of organic acids, in particular milk, which is present in small concentrations, both in the primary as in the secondary alcoholic fermentation. We have found that the primary alcoholic fermentation magnetic nanoparticles effect on respiration in a secondary alcoholic fermentation, but have no effect on the formation of pressure in the bottle. Analysis of the metals showed a higher content of iron in the samples, which were added to the yeast with magnetic nanoparticles. The maximum content of iron was in the sample, where the ratio by weight of the yeast and the magnetic nanoparticles 1:3. The SEM and TEM analysis, we confirmed the finding that magnetic iron oxide nanoparticles adsorbed on the surface of yeast cells, but chemical analysis showed that during the secondary fermentation dissolve, so these nanoparticles are not suitable for use in the technology of sparkling wines.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE.....	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	4
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>5</b>
2.1 KEMIJSKA SESTAVA VINA .....	5
<b>2.1.1 Voda.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2 Alkohol.....</b>	<b>5</b>
2.1.2.1 Etanol .....	5
2.1.2.2 Metanol .....	5
2.1.2.3 Višji alkoholi.....	5
<b>2.1.3 Organske kisline .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.4 Dušikove spojine .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.5 Minerali .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.6 Fenolne spojine .....</b>	<b>6</b>
2.1.6.1 Flavonoidi .....	6
2.1.6.2 Neflavonoidi .....	7
<b>2.1.7 Ogljikovi hidrati .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.8 Aromatične snovi .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.9 Lipidi.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.10 Vitamini .....</b>	<b>8</b>
2.2 ALKOHOLNA FERMENTACIJA GROZDNEGA MOŠTA.....	8
<b>2.2.1 Vinske kvasovke .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2 Morfologija in citologija kvasovk .....</b>	<b>8</b>
2.2.1.1 Celična stena .....	8
2.2.1.2 Celična vsebina .....	8
2.2.1.2.1 Membrana .....	8
2.2.1.2.2 Mitohondriji .....	9

2.2.1.2.3 Jedro .....	9
2.2.1.2.4 Ostale citoplazmske strukture .....	9
<b>2.2.2 Rast in delitev celice .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.3 Starterske kulture vinskih kvasovk .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.4 Dodatek hrane za kvasovke .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.5 Fizikalno-kemijske razmere med alkoholno fermentacijo .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.6 Stresni dejavniki za kvasovke med alkoholno fermentacijo .....</b>	<b>10</b>
2.2.7.1 Pomanjanje hranil .....	11
2.2.7.2 Toksičnost etanola .....	11
2.2.7.3 Toksini .....	11
2.2.7.4 Temperatura .....	11
<b>2.3 PENEČA VINA .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3.1 Zgodovina .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3.2 Proizvodnja penečih vin .....</b>	<b>12</b>
2.3.2.1 Klasični postopek- v zaprti steklenici .....	12
2.3.2.2 Charmat postopek-v visokotlačnem jeklenem tanku .....	13
2.3.2.3 Transfervni postopek .....	13
2.3.2.4 Kontinuirni postopek- v visokotlačnem jeklenem tanku .....	13
<b>2.3.3 Fizikalno-kemični procesi v penečem vinu.....</b>	<b>14</b>
2.3.3.1 Tlak ( $\text{CO}_2$ ).....	14
2.3.3.2 Iskrenje in penjenje .....	14
<b>2.3.4 Proizvodnja penečega vina po klasičnem postopku .....</b>	<b>14</b>
2.3.4.1 Kvasovke.....	14
2.3.4.2 Primarno alkoholno vrenje.....	15
2.3.4.3 Sekundarno alkoholno vrenje .....	15
2.3.4.4 Avtoliza kvasovk .....	15
2.3.4.5 Degoržiranje in zamašitev steklenice .....	16
<b>2.3.5 Shranjevanje in serviranje penečih vin .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 NANOTEHNOLOGIJA .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4.1 Nanodelci .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.2 Magnetni nanodelci .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.3 Vezava magnetnih nanodelcev na kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 MATERIALI .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.1 Mikroorganizem .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2 Substrat .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.3 Magnetni nanodelci .....</b>	<b>18</b>

<b>3.1.4 Kemikalije .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.5 Oprema.....</b>	<b>19</b>
3.2 NAČRT DELA .....	21
3.3 METODE DELA .....	23
3.4 IZVEDBA PRVEGA SKLOPA .....	23
<b>3.4.1 Namagnetenje kvasovk s prebitim dodatkom magnetnih nanodelcev .....</b>	<b>23</b>
3.4.1.1 Priprava suspenzij.....	23
3.4.1.2 Namagnetenje kvasovk.....	23
<b>3.4.2 Namagnetenje kvasovk z magnetno separacijo kvasovk .....</b>	<b>24</b>
3.4.2.1 Priprava suspenzij.....	24
3.4.2.2 Namagnetenje kvasovk.....	24
<b>3.4.3 Analiza sedimenta .....</b>	<b>25</b>
3.4.3.1 TEM analiza .....	25
3.4.3.2 SEM analiza.....	25
3.5 IZVEDBA DRUGEGA SKLOPA .....	26
<b>3.5.1 Izvedba prvega poskusa.....</b>	<b>26</b>
3.5.1.1 Priprava vcepka .....	26
3.5.1.2 Anaerobna fermentacija.....	27
<b>3.5.2 Izvedba drugega poskusa .....</b>	<b>28</b>
3.5.2.1 Vcepek .....	28
3.5.2.2 Anaerobna fermentacija drugega poskusa .....	28
<b>3.5.3 Analitske metode .....</b>	<b>29</b>
3.5.3.1 Spremljanje nastajanja CO <sub>2</sub> .....	29
3.5.3.2 Določanje koncentracije suhe mase.....	29
3.5.3.3 HPLC analiza.....	29
3.5.3.4 Nacepljanje vzorca na agar plošče.....	31
3.6 POIZKUS PRIPRAVE PENINE .....	32
<b>3.6.1 Priprava vcepkov .....</b>	<b>32</b>
3.6.1.1 Rehidracija kvasovk.....	32
3.6.1.2 Priprava suspenzije kvasovk .....	32
3.6.1.3 Priprava suspenzije MD-APS .....	32
<b>3.6.2 Namagnetenje kvasovk .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6.3 Potek stekleničenja vina.....</b>	<b>33</b>
3.6.3.1 Prenos vcepkov v vino.....	33
<b>3.6.4 Magnetna separacija .....</b>	<b>33</b>
<b>3.6.5 Analiza vsebine steklenice po določenem času .....</b>	<b>34</b>
3.6.5.1 Merjenje tlaka v steklenicah za penino.....	34
3.6.5.2 Določanje koncentracije suhe biomase.....	34

3.6.5.3 HPLC analiza.....	34
3.6.5.4 Analiza kovinskih ionov .....	34
<b>3.6.6 Analiza sedimenta .....</b>	<b>35</b>
3.6.6.1 TEM analiza penine .....	35
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>36</b>
4.1 NAMAGNETENJE KVASOVK.....	36
<b>4.1.1 Namagnetenje kvasovk s prebitnim dodatkom magnetnih nanodelcev .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.2 Namagnetenje kvasovk z magnetno separacijo kvasovk .....</b>	<b>38</b>
4.2 DRUGI SKLOP .....	40
<b>4.2.1 Kinetika alkoholne fermentacije.....</b>	<b>40</b>
4.2.1.1 Prvi poskus (K-MD-APS2) .....	40
4.2.1.1.1 Sprememba koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo	40
4.2.1.1.2 Sproščanje CO <sub>2</sub> .....	41
4.2.1.2 Drugi poskus (K-MD-APS4 in K-MD-APS5) .....	42
4.2.1.2.1 Sprememba koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo	42
4.2.1.2.2 Sproščanje CO <sub>2</sub> .....	44
<b>4.2.2 HPLC analiza.....</b>	<b>45</b>
4.2.2.1 K-MD-APS2.....	45
4.2.2.1.1 Dinamika porabe sladkorjev .....	45
4.2.2.1.2 Dinamika tvorbe metabolnih produktov .....	46
4.2.2.2 K-MD-APS4 in K-MD-APS5 .....	48
4.2.2.2.1 Dinamika porabe sladkorjev .....	48
4.2.2.2.2 Dinamika tvorbe metabolnih produktov .....	49
4.3 PRIPRAVA IN ANALIZA PENINE .....	51
<b>4.3.1 Merjenje tlaka .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.2 Merjenje suhe biomase .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3.3 HPLC analiza.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3.4 TEM analiza.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.5 Analiza kovinskih ionov.....</b>	<b>59</b>
<b>5 SKLEPI .....</b>	<b>61</b>
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>62</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>63</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vcepki z različnimi količinami kvasovk in MD-APS, ter njihovo masno razmerje .....	33
Preglednica 2: Prikaz podatkov o izmerjenem tlaku v vzorcu pred odpiranjem .....	51
Preglednica 3: Prikaz podatkov vsebnosti suhe biomase v vzorcih .....	53

## KAZALO SLIK

Slika 1: Posnetek magnetnih nanodelcev MD-APS s presevnega elektronskega mikroskopa .....	19
Slika 2: Shematski prikaz načrta dela.....	21
Slika 3: Shematski prikaz poteka prvega poskusa.....	26
Slika 4: Mini fermentor (Mini ... , 2014).....	27
Slika 5: Shematski prikaz poteka drugega dela poskusa .....	28
Slika 6: Umeritvena krivulja za glukozo .....	30
Slika 7: Umeritvena krivulja za fruktozo .....	30
Slika 8: Umeritvena krivulja za glicerol.....	31
Slika 9: Umeritvena krivulja za etanol .....	31
Slika 10: TEM posnetka (pri dveh različnih povečavah) namagnetenih kvasovk s prebitni dodatkom magnetnih nanodelcev MD-APS .....	37
Slika 11: TEM posnetka (pri dveh različnih povečavah) namagnetenih kvasovk z magnetno separacijo .....	38
Slika 12: SEM posnetki (pri treh različnih povečavah) namagnetenih kvasovk z magnetno sepracijo. ....	39
Slika 13: Potek spremembe koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo .....	41
Slika 14: Kinetika oddanega CO <sub>2</sub> v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije.....	42
Slika 15: Potek spremembe koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo .....	43
Slika 16: Koncentracija suhe biomase ob koncu alkoholne fermentacije .....	43
Slika 17: Kinetika oddanega CO <sub>2</sub> v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije.....	44
Slika 18: Poraba glukoze med alkoholno fermentacijo pri 18 °C .....	45
Slika 19: Poraba fruktoze med alkoholno fermentacijo pri 18 °C .....	46
Slika 20: Nastajanje glicerola med alkoholno fermentacijo pri 18 °C.....	46
Slika 21: Nastajanje etanola med alkoholno fermentacijo pri 18 °C .....	47
Slika 22: Vsebnost kislin ob koncu alkoholne fermentacije .....	47
Slika 23: Poraba glukoze med alkoholno fermentacijo pri 18 °C .....	48
Slika 24: Poraba fruktoze med alkoholno fermentacijo pri 18 °C .....	48
Slika 25: Nastajanje glicerola med alkoholno fermentacijo pri 18 °C.....	49
Slika 26: Nastajanje etanola med alkoholno fermentacijo pri 18 °C .....	49
Slika 27: Vsebnost kislin ob koncu alkoholne fermentacij .....	50
Slika 28: Dinamika naraščanja tlaka v steklenicah z masnim razmerjem 1: 10.....	51
Slika 29: Potek spremembe koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo .....	52
Slika 30: Koncentracije suhe biomase v steklenicah z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev ob koncu alkoholne fermentacije .....	53
Slika 31: Koncentracija glukoze ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev .....	54
Slika 32: Koncentracija fruktoze ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev .....	55
Slika 33: Koncentracija glicerola ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev .....	55
Slika 34: Koncentracija etanola ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev .....	56
Slika 35: Vsebnost kislin v penini .....	56

Slika 36: TEM slika skupka kvasovk z magnetnimi nanodelci po koncu sekundarne fermentacije .....	57
Slika 37: TEM slika kvasovke z magnetnimi nanodelci po koncu sekundarne fermentacije (manjša povečava).....	58
Slika 38: TEM slika kvasovke z magnetnimi nanodelci po koncu sekundarne fermentacije (večja povečava) .....	58
Slika 39: Vsebnost nekaterih kovin v penini (ob koncu sekundarne fermentacije) .....	59
Slika 40: Vsebnost železa v zreli penini (ob koncu sekundarne fermentacije) .....	60
Slika 41: Vsebnost železa v penini z masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:10 med sekundarno fermentacijo .....	60

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	(3-amino-propil) silan
CO <sub>2</sub>	ogljikov dioksid
HPLC	visokotlačna kromatografija ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
ICP-MS	masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
kHz	kilohertz
MD	magnetni nanodelci
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
UV-VIS	ultravijolična-vidna
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	nanodelci železovega oksida maghemita

## 1 UVOD

Vinarstvo je gospodarska dejavnost, ki so jo ljudje poznali že pred tisočletji. Biokemijski procesi v moštu in vinu so zelo zapleteni in zahtevajo posebno pozornost med pridelavo vina. Napredek strmi k čim boljši kakovosti vina, vendar na kakovost vina vpliva veliko parametrov, kot so temperatura, klima, tla, lega, itd. Kakovost vina je odvisna tudi od kakovosti grozdja, zato je še posebej pomembna skrb za vinsko trto, na kateri raste grozdje. Prav tako pa velik pečat v kakovosti grozdja daje vinogradniška tehnologija. Vina posameznih sort se v različnih okoljih razlikujejo med seboj po glavnih sestavinah in organoleptičnih lastnostih (Bavčar, 2006).

Kvasovke so netaksonomska kategorija gliv, definirana z ozirom na morfološke in fiziološke značilnosti. So filogenetsko različna skupina organizmov in pripadajo dvema glavnima taksonomskima skupinama, in sicer *Ascomycota* in *Basidiomycota*. Kvasovke se nespolno praviloma razmnožujejo z brstenjem oziroma nekatere s cepljenjem. V anaerobnih razmerah metabolizirajo številne sladkorje, medtem, ko imajo v anaerobnih razmerah sposobnost fermentacije samo nekatere vrste. Nekatere izjeme med kvasovkami so lahko patogene (Raspor, 1996).

V sedanjem času je zelo veliko povpraševanja po penečih vinih. Zasluga za to gre predvsem proizvajalcem penečih vin, ki promovirajo svoja vina kot nekaj aristokratskega. Nekoč je bilo peneče vino tako namenjeno le višjim slojem, v sedanjem času pa so največji porabniki penečega vina ljudje srednjega sloja. Sredi 19. stoletja so se peneča vina približala tudi ženskam, čeprav je do takrat veljalo, da je vino le v domeni moških, v sedanjem času pa se pojavlja kot tipična piča ob pomembnejšem dogodku (Bavčar, 2006; Šikovec, 1996).

Nanotehnologija je nov pristop k razumevanju in obvladovanju lastnosti snovi v nanometrskem merilu. Te snovi pridobijo nove fizikalne in kemijske lastnosti, če je delec manjši od 100 nm, kar je  $10^{-7}$  m. Skupke takšnih materialov imenujemo nanodelci. Nanotehnologija se uporablja na različnih področjih, od prehrane, kemije, inženirstva in vse do medicine. Magnetni nanodelci so postali tehnološko izjemno pomembni s splošnim razvojem nanotehnologije. Med drugim se lahko uporablajo za pripravo magnetnih tekočin, v biomedicini in biotehnologiji. Njihova prednost je ta, da na nanodelce lahko vplivamo s pomočjo magnetnega polja ali pa jih na daljavo zaznamo preko njihovih magnetnih lastnosti. Eden od primerov je magnetna separacija, kjer na magnetne nanodelce selektivno vežemo določene biotehnološke produkte in jih nato izločimo iz mešanice s pomočjo magnetnega polja (Remškar, 2009).

Pri magnetnih materialih so pomembne predvsem snovi, pri katerih pride do interakcij med magnetnimi atomi, ki povzročijo, da se magnetni momenti posameznih atomov na večjem področju spontano usmerijo v isto smer. Take snovi imenujemo feromagnetne snovi. Tipične feromagnetne snovi so kovine Fe, Ni, Co in njihove zlitine in nekateri zmesni oksidi, kot so feriti (železova oksida maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) in magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), kobaltov ferit ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ )) (Thanh, 2012).

Tipična uporaba magnetnih delcev je v magnetni separaciji. Magnetna separacija se lahko uporablja za na primer ločevanje produktov biotehnoloških procesov. Magnetne delce

zmešamo z mešanico različnih molekul, na površino delcev se selektivno veže molekula produkta, ki jo nato iz mešanice magnetno izločimo. Za magnetne delce, ki se uporablajo v magnetni separaciji se pogosto uporablja izraz magnetni nosilci (Hafeli in sod., 1997).

Razen različnih molekul, lahko magnetno izločamo tudi žive celice. Primer uporabe magnetne separacije živih celic je opisan v diplomskem delu Suzane Boškovič, z naslovom Uporaba magnetnih nanodelcev za separacijo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v alkoholni fermentaciji. V omenjeni literaturi so uporabili magnetne nanodelce za sedimentacijo odmrle biomase vinskih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Magnetne nanodelce, prevlečene z amorfnim slojem silicijevega dioksida in z modificirano površino, ki je izkazovala pozitiven površinski električni naboj, so uspeli elektrostatsko vezati na površino kvasnih celic, ki izkazujejo negativen električni naboj (Boškovič, 2010). Zaradi absorbiranih magnetnih nanodelcev so se kvasovke odzivale na magnetno polje, kar je omogočilo učinkovito separacijo kvasne biomase.

## 1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

Naloga in cilj predložene študije je izogniti se zamudnemu in dragemu ročnemu delu ter skrajšati čas potreben za sedimentacijo izrabljene kvasne biomase v grlo steklenice med proizvodnjo penečega vina. Z ozirom na cilje raziskav bo naloga rešena po originalnem postopku, ki omogoča izločanje kvasne biomase z uporabo magnetnih delcev. Kvasovke izpostavimo magnetnim delcem v tekočem mediju v procesu, ki ga bomo zaradi enostavnosti v nadaljevanju imenovali »namagnetenje«, po revitalizaciji kvasovk pred sekundarno fermentacijo. Magnetni delci se ireverzibilno absorbirajo na površine vinskih kvasovk. Kvasovke z magnetnimi delci na površini (izrabljeno kvasno biomaso) iz izločimo z uporabo zunanjega magnetnega polja.

Namen dela je študij vpliva magnetizacije kvasnih celic in preučitev, kako magnetni delci vplivajo na fiziologijo kvasovk in kinetiko biosinteze v alkoholni fermentaciji grozdnega mošta in preveriti obstojnost magnetnih nanodelcev v vinskih medijih v vseh delih produkcijske faze, kar potrjujejo kemijske (HPLC) analize ter analize biomase z optično in elektronsko mikroskopijo (SEM, TEM).

Namen dela je bil predvsem raziskati vpliv magnetnih nanodelcev železovega oksida na kinetiko fermentacije. Delo je bilo zasnovano iz treh večjih sklopov.

Namen prvega sklopa je bil pripraviti kvasovke z absorbiranimi magnetnimi nanodelci (*namagnetene kvasovke*). V prvem sklopu je bilo potrebno optimizirati proces namagnetenja tako, da je bila čim večja koncentracija nanodelcev kar se da homogeno porazdeljena na površini kvasovk.

V drugem sklopu je bil namen ugotoviti, kako namagnetene kvasovke z različnim masnim razmerjem magnetni nanodelci (MD-APS): kvasovke, vplivajo na potek primarne alkoholne fermentacije. Hoteli smo ugotoviti, če obstaja razlika v poteku alkoholne fermentacije z namagnetenimi kvasovkami v primerjavi z neobdelano kulturo *Saccharomyces bayanus*, ter če magnetni nanodelci vplivajo na kemijsko sestavo vina.

V tretjem sklopu je bil namen ugotoviti, kako namagnetene kvasovke z različnim masnim razmerjem magnetni delci (MD-APS): kvasovke vplivajo na potek sekundarne alkoholne fermentacije. Hoteli smo ugotoviti, če obstaja razlika v poteku sekundarne alkoholne fermentacije z namagnetenimi kvasovkami v primerjavi z neobdelano kulturo *Saccharomyces bayanus* in ali se ob tem spremeni kemijska sestava penine. Poleg tega smo opazovali obstojnost magnetnih nanodelcev med sekundarno fermentacijo.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Naše delovne hipoteze so:

- Najprimernejši način priprave kvasovk obdanih z magnetnimi nanodelci je *namagnetenja* z intenzivnim mešanjem suspenzije kvasovk in suspenzije magnetnih nanodelcev.
- V primarni in sekundarni fermentaciji magnetni nanodelci vplivajo na kinetiko alkoholne fermentacije.
- Magnetni nanodelci vplivajo na sproščanje CO<sub>2</sub> v primarni in sekundarni fermentaciji.
- Magnetni nanodelci vplivajo na koncentracijo kislin, ki so zastopane v primarni in sekundarni fermentaciji.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KEMIJSKA SESTAVA VINA

Kemijska sestava vina se lahko zelo spreminja, saj je odvisna od številnih dejavnikov. Vino je izredno kompleksna pihača. Pri kemijski analizi morajo biti posamezne kemične sestavine v vinu v okviru zakonsko predpisanih vrednosti (Bavčar, 2006).

#### 2.1.1 Voda

Voda je v vinu najbolj zastopana spojina v vinu. Odstotek vode v vinu je od 75 do 85 % in je odvisen od kakovosti vina. Nižji je odstotek vode, višja je kakovost vina, ker so toliko bolj zastopane druge sestavine. Voda prehaja preko koreninskega sistema v grozdno jagodo, na tej poti pa se voda očisti nekaterih spornih sestavin, kot je na primer nitrat (Šikovec, 1996).

#### 2.1.2 Alkohol

Zakonsko je določeno da mora imeti vino najmanj 8,5 vol. % alkohola. Po vsebnosti alkohola lahko vina razdelimo v:

- a) lahka (60 do 80 g/l, kar je okrog 7,5 do 10 vol. %),
- b) srednje težka (80 do 100 g/l, kar je okrog 10 do 12,5 vol. %),
- c) težka (nad 100 g/l, kar je nad 12,5 vol. %).

##### 2.1.2.1 Etanol

Etanol je najpomembnejši alkohol v vinu, ki nastane v času alkoholne fermentacije. Vinu daje stabilnost, deluje kot topilo in zagotavlja posebne senzorične lastnosti. Etanol vpliva na metabolizem kvasovk in posledično tudi na vrsto ter količino nastalih spojin v vinu (Bavčar, 2006).

##### 2.1.2.2 Metanol

Metanol ali metilni alkohol ni proizvod alkoholne fermentacije, ampak je posledica hidrolize pektinskih snovi, pod vplivom encima pektinmetilesteraze (Lee in sod., 1979).

Koncentracija metanola v rdečih vinih je od 120 do 150 mg/l, v belih vinih pa je ta koncentracija od 40 do 120 mg/l. Metanol ne vpliva na senzorične lastnosti vina (Bavčar, 2006).

##### 2.1.2.3 Višji alkoholi

Višji alkoholi predstavljajo približno 50 % vseh aromatičnih snovi v vinu, če ne upoštevamo etanola. Pri zorenju vina se iz njih tvorijo estri. Njihova sinteza poteka med alkoholno fermentacijo, nastajajo pa lahko iz ustreznih aminokislin ali sladkorjev (Bavčar, 2006).

### **2.1.3 Organske kisline**

Kisline so ena izmed najpomembnejših faktorjev v vinu in so pomembne pri alkoholni fermentaciji, mikrobiološki stabilnosti vina, barvi in predvsem pri okusu vina (Yair, 2004).

Med alkoholno fermentacijo nastajajo različne organske spojine, kot so mlečna, ocetna in jantarna kislina, ter v zelo majhnih količinah še ostale kisline iz cikla trikarboksilnih kislin. Skupna koncentracija kislin v vinu je običajno v intervalu od 5,5 do 8,5 g/l. Imajo velik vpliv na senzorično ravnotežje vina. Kisline v vinu izražamo kot skupne, hlapne in nehlapne kisline (Bavčar, 2006).

### **2.1.4 Dušikove spojine**

V grozdnem soku se v času dozorevanja grozdja povečuje koncentracija dušikovih spojin. Korenine vinske trte sprejemajo dušik v obliki nitrata, ki se pretvori v amonijak in se prenaša ter kopiči v obliko aminokislin in aminokislinskih amidov. Koncentracija skupnega dušika v moštu znaša od 1,0 do 2,0 g/l. Anorganske dušikove spojine (amonijak in amonijeve spojine) dosegajo do 300 mg/l, ostali del dušikovih spojin pa so organske spojine. Med njimi so najpomembnejše prav proste aminokisline, ki dosegajo od 50 do 90 % koncentracije skupnega dušika. Prolin, glutamin, arginin, serin, treonin, glutamat in alanin sestavlja 75 do 85 % skupnih aminokislin v moštu (Bavčar, 2006).

Aminokisline v visoki koncentraciji povečujejo grenek okus vina. Med alkoholnim vrenjem se lahko nekatere aminokisline pretvorijo v vinsko aroma ali nezaželene višje alkohole s toksičnim učinkom (Šikovec, 1996).

### **2.1.5 Minerali**

Minerali imajo vlogo kot sestavni deli vitaminov in encimov, sodelujejo pri izmenjavi hranil med kvasovkam in okoljem ter reagirajo z drugimi sestavinami. Mineralne snovi pridejo v grozdrovno jagodo preko koreninskega sistema trte. Količina mineralnih snovi in bioelementov se v povprečju giblje v vinu od 1,8 do 4 g/l. Pomembne mineralne snovi v vinu so kalij, natrij, kalcij, magnezij, železo, fosfat, sulfat, klorid, nitrat in bor. Bioelementov je v vinu do 50 mg/l, ti pa so aluminij, arzen, barij, svinec, brom, fluor, jod, kobalt, baker, litij, mangan in ostali. Vsebnost mineralnih snovi je odvisna od lege, sorte, lastnosti tal, vremena, podnebja, stopnje zrelosti in celotne vinifikacije (Šikovec, 1996).

### **2.1.6 Fenolne spojine**

Fenolne spojine so pomembne, saj vplivajo na barvo, vonj in okus vina ter delujejo kot antioksidanti in konzervansi ter izkazujejo protimikrobnou aktivnost. Fenoli so ciklične benzenove spojine z eno ali več hidroksilnimi skupinami, katere delimo na flavonoide in neflavonoide (Bavčar, 2006).

#### **2.1.6.1 Flavonoidi**

Najbolj pogosti flavonoidi so antociani, flavonoli in flavan-3-oli oziroma flavanoli. Flavonoli in antociani se nahajajo v kožici grozdne jagode, njihova sinteza pa je

spodbujena s svetlobo. Flavonoidi lahko obstajajo v prosti obliki, vezani na druge flavonoide ali pa kot kombinacija naštetih oblik (Bavčar, 2006).

#### 2.1.6.2 Neflavonoidi

Neflavonoide fenolne spojine v vinu so razdeljene v hidroksicimetne in hidroksibenzojske kisline, stilbene in raznih spojin, kot sta kumarin in lignin. Znano je, da okrepijo in stabilizirajo barvo rdečih vin, prispevajo k okusu vina, nekateri od njih pa tudi kažejo močno biološko aktivnost (Rentzsch in sod., 2009).

#### 2.1.7 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati igrajo ključno vlogo v vinarstvu, prav tako pa prispevajo k okusu vina, ki daje sladek okus. Odstotek sladkorjev v rdečih vinih je običajno večji kot pa v belih vinih (Riberéau-Gayon in sod., 2006).

Sladkorji sodelujejo tudi pri aromi vina, skozi nekatere hlapne spojine. Glede na njihovo stopnjo polimerizacije jih lahko delimo na monosaharide, disaharide in polisaharide (Sanz in Castro, 2009).

Med monosaharide štejemo heksoze in pentoze, ki imajo pomembno vlogo pri mikrobiološki stabilnosti vina. Pomembni heksozi sta glukoza in fruktoza, katerih skupna koncentracija je med 150 in 300 g/l. Njuna koncentracija je bistvenega pomena pri določevanju zrelosti grozdja. Kvasovke najprej porabijo glukozo, nato pa še fruktozo. Med disaharide prištevamo saharozo, ki je pomembna energetska zaloga, sestavljena iz glukoze in fruktoze. Polisaharidi imajo v grozdju struktorno in energetsko funkcijo, njihova koncentracija pa je po navadi večja v rdečih vinih. Koncentracija polisaharidov je v zrelem vinu zelo majhna (Bavčar, 2006).

#### 2.1.8 Aromatične snovi

V vinu je poznanih več sto spojin, ki vplivajo na vonj, okus in aroma. Vonj vina je zelo kompleksna zadeva iz več razlogov. Eden teh razlogov je veliko število vin, ki izražajo različne arome. Velik razlog je pa tudi ta, da vina nimajo značilne arome, ampak imajo neko paleto različnih vonjav, ki so težko opredeljive (Baumes, 2009).

Spojine, odgovorne za vonj, so predvsem alkoholi, kisline, aldehydi, ketoni, terpeni, norizoprenoidi, pirazini in merkaptani. V vinu je teh spojin od 0,2 do 1,2 g/l, od tega pa je približno 50 % višjih alkoholov (Bavčar, 2006).

#### 2.1.9 Lipidi

Lipidi so bistvenega pomena pri strukturi in funkciji rastlinskih celic in celic kvasovk, vendar pa imajo samo olja, voski in steroidi neposredni vpliv na kakovost vina (Roufet in sod., 1986).

## 2.1.10 Vitaminii

Vitaminii obsegajo vrsto različnih kemikalij, ki sodelujejo pri regulaciji celične aktivnosti. V majhnih količinah jih najdemo v celicah grozdja, grozdnem soku in vinu. Vitaminii se občasno dodajo grozdnemu soku za spodbuditev hitrosti in pestrosti fermentacije (Eglinton in sod., 1993).

## 2.2 ALKOHOLNA FERMENTACIJA GROZDNEGA MOŠTA

Alkoholna fermentacija je pretvorba grozdnega mošta v alkohol in ogljikov dioksid. Medsebojno delovanje najrazličnejših vplivov (sladkorja, alkohola, vrednosti pH, itd.) ter številni vzporedni produkti alkoholne fermentacije pa v končni fazi določajo protimikrobnne lastnosti mošta in kasneje vina (Košmerl, 2007).

### 2.2.1 Vinske kvasovke

Na površini grozdne jagode in v moštu prevladujejo rodovi ne-*Saccharomyces* nesporogenih kvasovk, kot so rodovi *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, vendar pa na koncu vsake alkoholne fermentacije prevlada vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, ki je tudi znano kot »vinska kvasovka«. Znano je tudi, da različni sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* dajejo po kakovosti različna vina (Košmerl, 2007).

Znotraj rodu *Saccharomyces* iščemo seve, od katerih pričakujemo hiter začetek alkoholnega vrenja, alkoholno vrenje mora potekati enakomerno, brez zastojev in ne preburno, nastajati mora čim manj hlapnih kislin, med vrenjem ne sme nastajati preveč pene, ne smejo nastati velike količine SO<sub>2</sub>, nastali stranski proizvodi alkoholnega vrenja morajo biti taki, da povečujejo kakovost aromatičnih snovi in da ne nastajajo negativni proizvodi, ki zmanjšujejo kvaliteto (Šikovec, 1993).

### 2.2.2 Morfologija in citologija kvasovk

#### 2.2.1.1 Celična stena

Celična stena je multifunkcionalna organela, ki ščiti celico, ji daje obliko, omogoča kontakt med celicami in dovoljuje sprejem od zunaj (Fleet, 1991).

Celična stena je sestavljena iz hitina, ki je v veliki meri omejen na brazgotino brstov, proteinov, lipidov, fosfomanana in manana (Jackson, 2008).

Fosfomanana in manana je največ (31 % in 29 %), nato so proteini, ki predstavljajo 13 % celične stene, lipidov je 8,5 %, hitin pa predstavlja 4 % (Fleet, 1991).

#### 2.2.1.2 Celična vsebina

##### 2.2.1.2.1 Membrana

Membrana plazme deluje kot prepreka med celično zunanjostjo in njenou notranjostjo. Njena funkcija je regulacija vstopa hrani in izhod metabolitov. Sestavljena je iz približno enakega razmerja lipidov in proteinov, ter manjše količine ogljikovih hidratov, ki se

praviloma nahajajo samo na zunanjji steni membrane. Glavni lipidi membrane so razdeljeni na glicerolfosfolipide, sfingolipide in sterole. Fluidnost membrane je regulirana z nenasičenostjo fosfolipidov in vpliva na toleranco na etanol (Rose, 1993).

#### 2.2.1.2.2 Mitohondriji

Mitohondrije lahko neposredno lociramo ob citoplazemski membrani v obliki podolgovatih ali okroglih struktur s pomočjo elektronskega mikroskopa. Ocenuje se, da mitohondriji zavzemajo 12 % celotnega volumna celic. Njihovo obliko in število pogojujejo spremembe v celičnem ciklusu in v fiziološkem stanju organizma, ki je odvisno od okolja (Guerin, 1991; Visser in sod., 1995).

#### 2.2.1.2.3 Jedro

Jedro je sferoidne oblike s približno 2  $\mu\text{m}$  premera. S faznokontrastno mikroskopijo ga lahko v času intenzivne rasti lociramo med vakuolo in brstom ali pa ob največji vakuoli v mirujočih celicah. Vsi poznani procesi mejoze in mitoze potekajo v jedrni regiji, ta pa je omejena z membrano, ki ima pore za komunikacijo z notranjim okoljem. S pomočjo elektroforeznih tehnik v pulzirajočem polju lahko ločujemo kromosome kvasovk ter določamo njihovo število in velikost (Peberdy, 1989).

#### 2.2.1.2.4 Ostale citoplazmske strukture

Vakuole imajo pomembno nalogu pri notranjih tokovih snovi v celici, ki pa se spreminja med rastnim ciklom. Funkcija vakuole je vzdrževanje rezervoarja metabolitov in hidrolitičnih encimov (Zinser in Daum, 1995).

Lipidne kapljice so prisotne v številnih kvasovkah in sodelujejo v metabolizmu nekaterih substratov s svojimi katalitičnimi encimi. Transportne poti potekajo od jedra preko endoplazmatskega retikuluma v Golgijev aparat in nato v vakuole ali pa z vezikli na citoplazmatsko membrano in v zunanje okolje celice (Tanaka in Ueda, 1993; Schwencke, 1991).

### 2.2.2 Rast in delitev celice

Tako kot druge kvasovke, ki pripadajo razredu *Ascomycetes*, se lahko *S. cerevisiae* razmnožujejo nespolno ali vegetativno ali pa spolno z oblikovanjem askospor (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Vegetativno razmnoževanje nastopi takrat, ko se ne tvori micelij ali psevdomicelij, ampak se potomec oddeli od staršev, ko je primerno velik. Pri tem sprejme polovico prisotnih struktur staršev. Cikel je razdeljen na štiri faze (Strathern in sod., 1981):

- a) G<sub>1</sub>-telofaza, začetek sinteze DNK,
- b) S- čas sinteze DNK,
- c) G<sub>2</sub>- konec sinteze DNK,
- d) G<sub>0</sub>- stacionarna faza.

### 2.2.3 Starterske kulture vinskih kvasovk

Večina vinarjev uporablja komercialne starterske kulture, ki so selekcionirane glede na fermentacijske lastnosti, senzorične značilnosti, tehnološke lastnosti in metabolne lastnosti z zdravstvenega vidika. Starterske kulture morajo tudi zadostiti zahtevam za industrijsko producijo, kot so naprimer toleranca na SO<sub>2</sub>, toleranca na visoke sladkorne stopnje mošta, toleranca na visoke in nizke temperature, majhno penjenje, toleranca na visok tlak, itd. Napredek strmi k uporabi kombinacije različnih sevov iste vrste *Saccharomyces cerevisiae* v starterskih kulturah. Pozornost pa je potrebno tudi nameniti pripravi zdrave starterske kulture, ki je podvržena čim manjšim stresom (Košmerl, 2007).

### 2.2.4 Dodatek hrane za kvasovke

Hranila se dodajajo takoj po bistrenju mošta ali v manjših količinah med vrenjem, saj s tem izboljšamo pogoje za rast in razmnoževanje kvasovk v času alkoholnega vrenja. Kot hranila se dodajo dodatni viri dušika in vitaminov. Pomanjkanje teh spojin se pokaže najkasneje po štirih dneh, ko nastane že določena količina alkohola. Posledica pomanjkanja hranil je upočasnitev fermentacije ali celo zaustavitev fermentacije ter tvorba večjih koncentracij ocetne kisline in/ali vodikovega sulfida (Bavčar, 2006; Košmerl, 2007).

### 2.2.5 Fizikalno-kemijske razmere med alkoholno fermentacijo

Sestava grozdnega soka je eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na rast in metabolizem kvasovk, s tem pa tudi na hitrost alkoholne fermentacije. Poznani so tudi vplivi sorte, letnika in stopnje zrelosti grozdja na hitrost alkoholne fermentacije in tvorbo ogljikovega dioksida. Tudi odmiranje kvasnih celic vpliva na upočasnitev proti koncu alkoholne fermentacije, povezano pa je tudi s količino sladkorja v moštu (Košmerl, 2007).

Glukoza in fruktoza se med glikolizo in anaerobno razgradnjo presnavljata predvsem v etanol, poleg pa kvasovke ustvarjajo tudi ostale najpogosteje aromatske spojine, ki so prisotne v vinu. Kvasovke prav tako krepijo in vplivajo na razvoj specifičnih arom s tvorbo različnih količin hlapnih snovi (Laffort in sod., 1989).

### 2.2.6 Stresni dejavniki za kvasovke med alkoholno fermentacijo

Med stresne dejavnike, ki pomembno vplivajo na celično rast kvasovk, spadajo temperatura, toksini, razpoložljivost esencialnih hranilnih snovi, osmotski tlak, pH in prisotnost inhibitorjev rasti ali drugih toksičnih spojin (Košmerl, 2007).

#### 2.2.7.1 Pomanjkanje hranil

Počasna fermentacija je eden izmed procesov, pri katerem se dramatično zaustavi fermentacija sladkorjev, kar posledično pušča veliko ne povretega sladkorja v vinu po koncu fermentacije. Zaustavitev fermentacije ponavadi poteče zaradi pomanjkanja hranil, največkrat virov dušika in fosfata. V takem primeru je pomembno, da se hranila doda pravočasno, da ne pride do prevelikih poškodb celic (Boulton in sod., 1996).

#### 2.2.7.2 Toksičnost etanola

Etanol je znan inhibitor privzemanja sladkorja in aminokislin v kvasne celice, kar posledično vpliva na manjši prirast biomase. Inhibitorni efekt etanola na celice se pokaže predvsem proti koncu fermentacije, in sicer kot toksični učinek na plazemsko membrano in njeno prepustnost, pri čemer pride do izgube kalcija in magnezija iz kvasne celice (Boulton in sod., 1996).

#### 2.2.7.3 Toksini

Toksične snovi prihajajo iz grozdja in lahko vplivajo na fermentacijo. Največji vpliv na fermentacijo imajo fluorovi ioni v kombinaciji z etanolom. Kvasovke rodu *Saccharomyces* inhibirajo tudi organske kisline, predvsem tiste s srednjo dolgo verigo in *cis* maščobne kisline. Te snovi niso naravno prisotne v moštu, ampak so sintetizirane s pomočjo raznih mikroorganizmov ali pa so prisotne kot razni ostanki pesticidov. Določeni sevi *Saccharomyces* sintetizirajo tudi tako imenovane *killer* faktorje, ki inhibirajo občutljive kvasovke svoje vrste (*killerji K1, K2 in K3*). Inhibitorni učinek ima tudi mikotoksin trihotecen, ki ga sintetizira *Fusarium* (Boulton in sod., 1996).

#### 2.2.7.4 Temperatura

Optimalna temperatura alkoholne fermentacije je približno 18 °C, pri čemer fermentacije ne smemo peljati preveč v odstopanja, da ne pride do zaustavitve fermentacije. Temperatura tudi pomembno vpliva na fluidnost membrane (Boulton in sod., 1996).

### 2.3 PENEČA VINA

#### 2.3.1 Zgodovina

Bistveno nemogoče je ugotoviti, kdaj točno se je začela proizvodnja penečih vin, saj naj bi se sam začetek začel po nesreči – pojav ogljikovega dioksida kot napake vina je v bistvu postalo novo odkritje in zaželena lastnost. Prvi zapisi o spremembah vina segajo že v biblijske čase, gre pa za popolnoma naraven pojav, ki ga tedaj še niso razumeli. Prvi dokumenti, ki odkrivajo peneča vina, segajo v leto 1718 v Francijo, ki svoje peneče vino imenuje kot šampanjec (izraz izvira iz pokrajine Champagne), dejansko pa naj bi se proizvodnja začela že dobrih 20 let prej, in sicer že leta 1695. Dom Perignon sicer ni izumil samega peneča vina, je pa bil zaslужen, da so se uvedle boljše tehnike vinogradništva in kletarjenja. V bistvu se je trudil, da vina ne bi postala peneča po prekinjeni fermentaciji pozimi in ponovni fermentaciji spomladji. Ločil je bele sorte od rdečih, ukazal prebirati gnilo in poškodovano grozdje od zdravega ter uporabljal mirnejši transport od vinograda do stiskalnic (Stevenson, 2003).

## 2.3.2 Proizvodnja penečih vin

### 2.3.2.1 Klasični postopek- v zaprti steklenici

Klasični postopek v zaprti steklenici poteka tako, da se steklenice, ki so odporne na tlak napolni z osnovnim vinom (mešanico različnih sort in letnikov). Dovoljeno je dodajanje vrelnega likerja (24 g/l), da se spodbudi sekundarna alkoholna fermentacija. Vrelni liker vsebuje saharozo, raztopljen v osnovnem vinu, selekcionirane kvasovke in dodatna hranila za kvasovke, predvsem dušikove spojine in vitamine. Pri vrenju se iz 4 g saharoze tvori 1 bar tlaka, kar pomeni, da se pri popolnem povretju dodatka saharoze ustvari tlak 6 barov (Stevenson, 2003; Bavčar, 2006).

Po ustekleničenju vina se steklenice z ojačanimi steklenimi stenami prenese v minimalno osvetljeno in hladno klet (12-14 °C), kjer poteče sekundarna fermentacija in traja približno od pol meseca do meseca in pol. Sekundarno fermentacijo se stalno nadzoruje z analizami deleža sladkorja in tlaka v steklenicah. Fermentaciji sledi zorenje, kjer se oblikujejo značilne arome in lahko traja od nekaj mesecev pa do nekaj let (Bavčar, 2006).

Po končanem zorenju sledi stresanje, s čimer se odstrani ostanek kvasovk nujen za stekleničenje bistrega vina. Usedlina v steklenici se prenese v vrat steklenice in se iz ležečega položaja na vsakih 15 dni obrne za 1/8 obrata in postopno povečuje naklon vse dokler ni steklenica pravokotna s tlemi. Sledi odstranjevanje sedimenta ali degoržiranje, pri čemer se vino ohladi na približno 5 °C in vrat steklenice potopi v raztopino glikola ali kalcijevega klorida, da usedlina zamrzne. Zamrznjeno usedlino iz steklenice potisne nadtlak po odstranitvi kronskega pokrovčka skupaj z delom vina, hkrati pa se doda odpremni liker, ki vpliva na značaj znamke penečega vina (Bavčar, 2006).

Opisana metoda je od leta 1994 zaščiteni in zahteva, da se na vsa peneča vina, pridelana izven pokrajine Champagne (Šampanija), označi, da so bila pridelana po klasični metodi in ne šampanjski (Stevenson, 2003).

### 2.3.2.2 Charmat postopek-v visokotlačnem jeklenem tanku

Ta metoda se od klasične metode razlikuje v tem, da sekundarna fermentacija poteka v nerjavnečih posodah (tankih), ki zdržijo visok tlak penečega vina. Glede na čas trajanja kontakta vina in usedline ločimo kratko in dolgo charmat metodo (Buxaderas in López Tamames, 2003).

Pri kratki charmat metodi se osnovnemu vinu doda polnilni liker, ki ima podobno koncentracijo saharoze kot liker pri klasični metodi, doda pa se tudi približno 10 % s kvasovkami obogatenega vina. Fermentacija poteka pri temperaturi 12-13 °C, ko pa je v tanku dosežen tlak 4 bara, se temperatura zniža na 8 °C in kvasovke potonejo na dno tanka, po koncu zorenja pa se opravi stabilizacija vina na tartrate in odstrani kvasovke s filtracijo ali centrifugiranjem. Pred ustekleničenjem se doda še sladni liker skupaj z žveplovim dioksidom. Ta metoda se predvsem uporablja za slajša peneča vina muškatne sorte (Bavčar, 2006).

Podaljšano charmat metodo uporabljajo za organoleptičnih lastnosti penečega vina, ki so bližje karakteristikam penečih vin, pridobljenih s klasično metodo. Pri tej metodi se vino dlje časa zadržuje v fermentacijskih tankih (vsaj 6 mesecev), zorenje na drožeh pa povzroči razvoj aromatskih spojin. Tako pridobimo suho peneče vino, zato mora dodan sladkor povreti in pri nastalem tlaku 6 barov se vino hrani na sobni temperaturi, sledi pa dekantiranje in centrifugiranje. Takšna vina staramo 7-14 mesecev, pri čemer se oblikujejo značilne organoleptične lastnosti (Buxaderas in López Tamames, 2003).

### 2.3.2.3 Transferni postopek

Metoda izvira iz Italije, sekundarna fermentacija pa poteka v steklenicah – podobno kot pri klasični metodi. Pri tej metodi se prenaša vino iz steklenic v tanke. Vino je v steklenicah s kronskimi pokrovčki vsaj 9 mesecev, potem pa se skupaj z usedlino prenese v tanke. Naslednji postopek ravnjanja z penečim vinom je enak kot pri charmat metodi. Prednost transferne metode pred klasično je izenačevanje kakovosti v skupnem tanku (Buxaderas in López Tamames, 2003).

### 2.3.2.4 Kontinuirni postopek- v visokotlačnem jeklenem tanku

Pravzaprav gre za rusko kontinuirno metodo, pri kateri so tanki vina povezani med sabo. V osnovno vino v prvi tank po vrsti dodajo kvasovke in sladkorje. Tako steče fermentacija v prvem tanku in se nadaljuje po številnih tankih naprej ter potuje skozi lesne oblance, na katerih se zadržijo odmrle kvasovke. Postopek traja nekje tri tedne in je primeren za osnovna vina slabše kakovosti (Stevenson, 2003).

### 2.3.3 Fizikalno-kemični procesi v penečem vinu

#### 2.3.3.1 Tlak ( $\text{CO}_2$ )

S sekundarnim alkoholnim vrenjem nastane veliko ogljikovega dioksida ali  $\text{CO}_2$ , ki tvori svojevrsten nasičen sistem z vinom.  $\text{CO}_2$  je v vinu zastopan v treh oblikah, in sicer kot prosti  $\text{CO}_2$ , raztopljeni in vezani:

- a) prosti  $\text{CO}_2$ : v plinasti obliki predstavlja praktično celotni tlak v steklenici ter se pri odpiranju v celoti porazgubi,
- b) raztopljeni  $\text{CO}_2$ : v vinu se nahaja v obliki ogljikove kisline, njegova količina pa je odvisna od temperature, tlaka in sestave vina, predvsem od alkohola in ekstrakta vina,
- c) vezani  $\text{CO}_2$ : v obliki etilestra ogljikove kisline in dietil karbonata. Predstavlja približno 20 % vsega  $\text{CO}_2$  in je odvisen od sekundarne alkoholne fermentacije. Je nestabilen in se pri povišani temperaturi in zmanjšanju tlaka postopoma sprošča in prehaja v ogljikovo kislino, ta pa v raztopljeni  $\text{CO}_2$ , ki preide v prosto obliko (Liger-Belair, 2010).

#### 2.3.3.2 Iskrenje in penjenje

Pri odpiranju hermetično zaprte steklenice se zniža temperatura na površini vina, ki izhaja v obliki pare. Ta sprememba izzove kondenzacijo hlapnih snovi vina, ki izhajajo v obliki pare. Porušenje ravnotežja različnih oblik ogljikove kisline povzroči prenasičenje vina, kar se odraža v sproščanju plina. V začetku je sproščanje zelo močno, nato pa se zmanjšuje dokler povsem ne preneha. Velikost mehurčkov je odvisna od stopnje vlažnosti trdnih delcev: čim večja je, manjši je premer mehurčkov, ki se sproščajo. Če se mehurčki sproščajo eden za drugim, daje to videz finih verižic in mora trajati čim dlje. Ta pojav imenujemo iskrenje. Intenzivnost sproščanja  $\text{CO}_2$  je odvisna od tlaka  $\text{CO}_2$ , stopnje nasičenosti vina z  $\text{CO}_2$  in sestave vina (Liger-Belair, 2010).

Za peneča vina je značilna tudi tvorba pene, ki nastane na površini vina. Pena se v začetku nenehno obnavlja. Proses poteka tako, da se najvišje ležeči mehurčki razpočijo, drugi pa so razpršeni in tvorijo meglico v prostoru pod peno. Razpočene mehurčke nadomestijo drugi, in sicer s prehodom raztopljeni ogljikove kisline v peno. V začetku je tvorba novih mehurčkov večja kot njihova disperzija, zato se tudi količina pene povečuje, nato pa jakost sproščanja pojenja in tako se tudi pena zmanjšuje. Za kakovost penečih vin je pomembno, da se čim dlje zadržuje na površini vina majhna prostornina pene, ki se neprestano obnavlja (Liger-Belair, 2010).

### 2.3.4 Proizvodnja penečega vina po klasičnem postopku

#### 2.3.4.1 Kvasovke

Kvasovke za peneča vina so na voljo v obliki tekočine ali aktivnih suhih snovi v obliki imobiliziranih kvasovk (Torresi in sod., 2011). Prednost imobiliziranih kvasovk je v tem,

da po končanem vrenju, ležanju in zorenju peneče vino nima droži v steklenicah, temveč so te kvasovke ostale v opni, zato ni potrebnega stresanja, da bi spravili droži do zamaška. Za peneča vina se uporabljajo selekcionirane kvasovke vrst *S. cerevisiae* in *S. bayanus*. *S. cerevisiae* se uporabljajo za primarno vrenje in pozitivno vplivajo na aroma, značaj in kakovost penečega vina, *S. bayanus* pa so odgovorne za sekundarno fermentacijo (Šikovec, 1993).

Za zagotovitev sekundarne alkoholne fermentacije v vsaki steklenici je potrebno vsaj 1 milijon kvasnih celic na mililiter. Selekcionirane kvasovke morajo biti za uspešno fermentacijo odporne na tlak, etanol, nižje temperature, SO<sub>2</sub>, proti koncu fermentacije morajo odmreti ali postati neaktivne, ne smejo se lepiti na stene steklenic, ne smejo se tvoriti v skupke ali proizvajati nezaželenih arom ali vonja (Zoecklein, 2002).

#### 2.3.4.2 Primarno alkoholno vrenje

Primarna fermentacija poteka lahko poteka v sodih ali tankih iz nerjavečega jekla. Vino po primarni fermentaciji je suho – z zelo visoko vsebnostjo kisline, vendar po karakterju dokaj nevtralno. Iz tega razloga, da bo takšno vino ohranilo svojo svežino, je pomembno, da ima po primarnem vrenju povišane kisline, fermentacija pa ne sme trajati predolgo (Stevenson, 2003).

Temperatura vrenja pri primarni fermentaciji ne sme presegati 20 °C. Alkoholno vrenje ne sme biti preburno, dodane selekcionirane kvasovke *S. cerevisiae* pa preprečujejo rast divjih kvasovk, kot sta rodova *Pichia* in *Hansenula* (Jackson, 2000).

#### 2.3.4.3 Sekundarno alkoholno vrenje

Po primarnem vrenju se opravi zelo nežno čiščenje in se pretoči v čist sod. K temu se doda vredni liker (*liqueur de tirage*), ki vsebuje vino, selekcionirane kvasovke, hranila, bentonit in sladkor. Vino se ustekleniči in zapre s kronskim pokrovčkom (Stevenson, 2003).

Sekundarna fermentacija poteka na 12-15 °C v temnem prostoru, doda se pa tudi kvasovke *S. bayanus* (Jackson, 2000).

#### 2.3.4.4 Avtoliza kvasovk

Avtoliza kvasovk je počasen pojav in se prične, kadar v vinu začne primanjkovati sladkorja in ostalih hranil. Iz tega razloga kvasovke začnejo porabljati svoje lastne zaloge in jih tako izčrpajo do te meje, da pride do degeneracije celične stene, pri čemer kvasovke začnejo odmirati. Komponente avtolize kvasovk pa so med drugim zelo koristne. Na primer proteini dajo penečemu vinu karakter in pozitivno vplivajo na stabilnost pene. Sprostijo se tudi triacilgliceridi iz kvasovk v vino, pomembna pa je tudi razgradnja prostih maščobnih kislin in diaciglicerolov. Te spojine razpadajo še na manjše, ki doprinesajo k izboljšanju vonja in okusa penečih vin (Torresi, 2011).

Na trgu obstaja veliko preparatov, ki so primerni za hitrejšo avtolizo kvasovk, med njimi je na voljo tudi beta glukanaza, ki je komercialno največkrat sintetizirana s *Trichoderma spp.*.

Celična stena *S. cerevisiae* je sestavljena iz manoproteinov in vlaken glukana in hitina, katere vezi cepi beta glukanaza (Torresi, 2011).

#### 2.3.4.5 Degoržiranje in zamašitev steklenice

Po fermentaciji je potrebno odstraniti sediment iz steklenice tako, da je pri tem izguba vina najmanjša. Sediment je potrebno spraviti v vrat steklenice, kar lahko traja tudi več tednov. Postopek poteka strojno in v zelo kratkem času naprava steklenico obrne in hitro odstrani kvasni čep ter steklenico znova pokrije in uravnava količino vina v steklenici (Jackson, 2000).

Postopek, s katerim to dosežemo, se imenuje degoržiranje, pri čemer vrat steklenice potopimo v določen medij in zamrznemo in tako strjen sediment odstranimo, dodamo odpremni liker in zamašimo z plutastim zamaškom, ki ga ovijemo s kovinsko folijo in žico. V vratu steklenice je nameščena polovica zamaška. Takšne steklenice se hranijo najmanj tri mesece pred prodajo, čas pa se za dobra vina lahko podaljša tudi do dveh let (Stevenson, 2003).

#### 2.3.5 Shranjevanje in serviranje penečih vin

Peneča vina so bolj občutljiva na temperaturo, kot mirna vina. Idealna temperatura shranjevanja za krajši rok je med 12 in 18°C, za daljši rok pa je priporočljiva temperatura med 9 in 11°C. Peneča vina moramo shranjevati v temnejših prostorih ali v zabojih. Peneča vina lahko shranjujemo v pokončnem položaju in ne v ležečem, kot mirna vina (Stevenson, 2003).

Bela peneča vina z manj ekstrakta ponudimo pri 7 °C, bolj polna pa pri 8 °C, rose pri 10 °C, rdeča pa pri 12 °C. Kozarci za peneča vina so na dovolj visokem peclju v obliki iztegnjene tulpe s širokim podstavkom, da lahko uživamo v počasnem sproščanju in iskrenju mehurčkov CO<sub>2</sub> (Šikovec, 1996).

### 2.4 NANOTEHNOLOGIJA

Nanotehnologija ima vse večji vpliv na področja znanosti in tehnologije, njeni obeti pa so veliki še posebej v proizvodnji materialov v nanoelektroniki, medicini, varovanju zdravja, biotehnologiji, informatiki in zagotavljanju varnosti. Vse to pa pomeni da bo nanotehnologija imela velik vpliv na družbena dogajanja. Mnogi zagotavljajo, da bo nanotehnologija prinesla rešitev mnogih tehnoloških problemov in posledično izboljšala tudi ekonomski standard in izboljšala raven življenja. Velika pričakovanja so predvsem v medicini, kjer bi s pomočjo nanotehnologije zdravili do sedaj neozdravljive bolezni ali pa pridobivali nove biomateriale, ki bi jih uporabili pri izdelavi umetnih vsadkov. Koncept nanotehnologije pripisujemo Nobelovemu nagrajencu Richardu Feynmanu, ki ga je podal v svojem predavanju leta 1959, v katerem je nakazal možnosti za operiranje s posameznimi atomi. Izraz nanotehnologija je prvi uporabil Norio Taniguchi leta 1974, ki je definiral kot proizvodno tehnologijo, s katero dosežemo izredno natančnost in ultramajhne dimenzijs (Remškar, 2009).

### 2.4.1 Nanodelci

Nanodelci so drobni skupki materiala, ki so manjši od 100 nanometrov. Velikost nanometer si zelo težko predstavljamo, saj je milijarda nanometrov en meter. Tudi delci, ki sestavljajo tanke plasti ali pa tanki igličasti kristali ali nitke spadajo med nanodelce. Oblika nanodelcev je zelo pomembna informacija, saj oblika delca natančno določa njegovo površino, na tej površini pa so proste kemijske vezi ali pa električni naboj, ki vpliva na kemijske in fizikalne lastnosti delca (Remškar, 2009).

### 2.4.2 Magnetni nanodelci

Magnetni nanodelci so zelo majhni delci magnetnega materiala, katerih značilna nanolastnost je superparamagnetizem. Izkazovati morajo visoko nasičeno magnetizacijo, običajno pa tudi visoko magnetno susceptibilnost. Magnetni nanodelci se bodo v bližnji prihodnosti uporabljali na različnih področjih medicine. Večinoma so v uporabi nanodelci železovega oksida maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) in magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Slednji se veliko uporablajo v medicini saj so kemijsko stabilnejša oblika in veljajo za varne za uporabo *in vivo*. Nanodelci se zaradi svoje specifične površine radi združujejo v skupke (agglomerate), vendar med uporabo *in vivo* v medicini ne sme priti do aglomeracije, saj bi lahko prišlo do mašenja žil (Makovec, 2009).

### 2.4.3 Vezava magnetnih nanodelcev na kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

V diplomskem delu Suzane Boškovič, 2010, z naslovom Uporaba magnetnih nanodelcev za separacijo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v alkoholni fermentaciji je opisan postopek vezave magnetnih nanodelcev na kvasovke. V omenjeni raziskavi so avtorji izdelali hitro metodo uporabe magnetnih nanodelcev za sedimentacijo odmrle biomase vinskih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Magnetne nanodelce, ki so izkazovali pozitiven površinski električni naboj, jim je uspelo elektrostatsko vezati na površino kvasnih celic, ki izkazujejo negativen električni naboj. Ob tem so v sekundarni fermentaciji *Saccharomyces cerevisiae* v primarnem vinu preverjali mikrobno fiziologijo vinskih kvasovk z absorbiranimi magnetnimi nanodelci. Ugotovili so, da ne prihaja do pomembnejših sprememb, ki bi jih zaznali v meritvah redoks potenciala in pH-vrednosti, ter, da ne prihaja do kvalitativnih sprememb v produkciji metabolitov etanola, glicerola in ostalih alkoholov. V mejah normalnosti so tudi nastajanje organskih kislin, prihaja pa do sprememb v kinetiki procesa sekundarne fermentacije. V sekundarni fermentaciji je prihajalo do hitrejše porabe glukoze in fruktoze in hitrejšemu nastajanju vseh metabolnih produktov. Z uporabo magnetnih nanodelcev so pospešili sedimentacijo kvasne biomase v magnetnem polju, ter pospešili postopek odstranjevanja odmrle kvasne biomase. S tem so izumili tudi nov originalen tehnološki postopek pridelava penin (Boškovič, 2010).

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Mikroorganizem

Za primarno in sekundarno fermentacijo smo uporabili vcepek:

- šampanjskih kvasovk vrste *Saccharomyces bayanus* (LALVIN EC 1118)

Kvasovke smo pred uporabo rehidrirali po naslednjem postopku:

Zatehtamo starter kulturo vrste *Saccharomyces bayanus* ( $c = 0,3 \text{ g/l}$ ) in dodamo hrano za kvasovke ( $c = 0,3 \text{ g/l}$ ) GO-FERM (Danstar ferment AG, Švica). Vse skupaj rehidriramo v raztopini mošta in vode (10 ml+10 ml) 20 minut pri temperaturi 37 °C. Raztopino mošta in vode, smo predhodno segrevali na temperaturo 35-37 °C. Rehidracijo izvajamo v vodni kopeli (Büchi; Waterbath B-480).

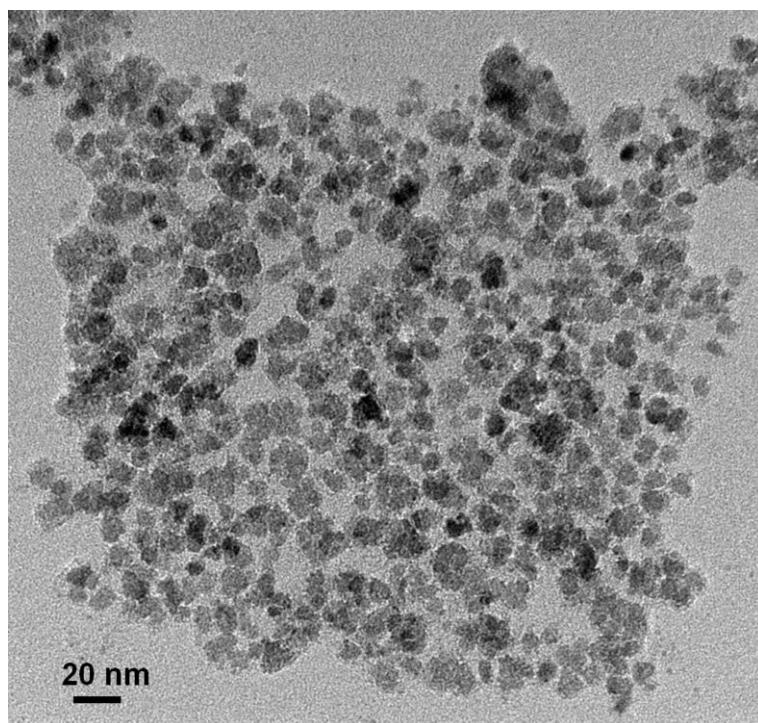
#### 3.1.2 Substrat

Za substrat smo uporabili:

- grozdni mošt, sorte sauvignon (letnik 2010) iz Ptujske kleti. Dodali smo tudi hrano za kvasovke GO-FERM, ki se doda v vodo za rehidracijo kvasovk, v koncentraciji 0,3 g/l. Moštu, ki smo ga uporabili za fermentacije v laboratorijskem merilu, ni bilo dodanega žveplovega dioksida. Mošt je bil filtriran pred postopkom izvedbe fermentacije. Grozdni mošt je bil do uporabe zamrznjen na temperaturi -25 °C. Okoli 2 ure pred postopkom fermentacije smo mošt inkubirali (INNOVA 4230) na temperaturi, pri kateri poteka fermentacija (18 °C),
- osnovno vino zvrst rebule in chardonnaya, ki je bilo uporabljenko v sekundarni fermentaciji (pri peninah).

#### 3.1.3 Magnetni nanodelci

Magnetni nanodelci (MD-APS) so bili sintetizirani v laboratoriju za Sinteze materialov na Institutu Jožef Stefan, po metodi opisani v literaturi (Čampelj in sod., 2009). Nanodelci železovega oksida maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) so v povprečju veliki okoli 13 nm (Slika 1). Na površino nanodelcev je bil vezan (3-amino-propil) silan (APS). Molekula APS se veže z svojimi silanolnimi skupinami (-Si-OH) na površino nanodelca, terminalna amino skupina pa štrli navzven in v vodi pri vrednostih pH pod približno 9 zagotavlja nanodelcem pozitiven površinski naboj (Čampelj in sod., 2009). Nanodelci MD-APS so bili v obliki vodne suspenzije koncentracije 2 mg/ml.



Slika 1: Posnetek magnetnih nanodelcev MD-APS s presevnega elektronskega mikroskopa

### 3.1.4 Kemikalije

Komponente standarda za umeritev HPLC sistema so bile:

- vinska kislina, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA),
- jabolčna kislina, (Fluka Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija),
- mlečna kislina, (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- ocetna kislina, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA),
- citronska kislina, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA),
- glicerol, (Kemika, Zagreb, Hrvaška, PA),
- glukoza, (Kemika, Zagreb, Hrvaška, PA),
- fruktoza, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA),
- etanol, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA).

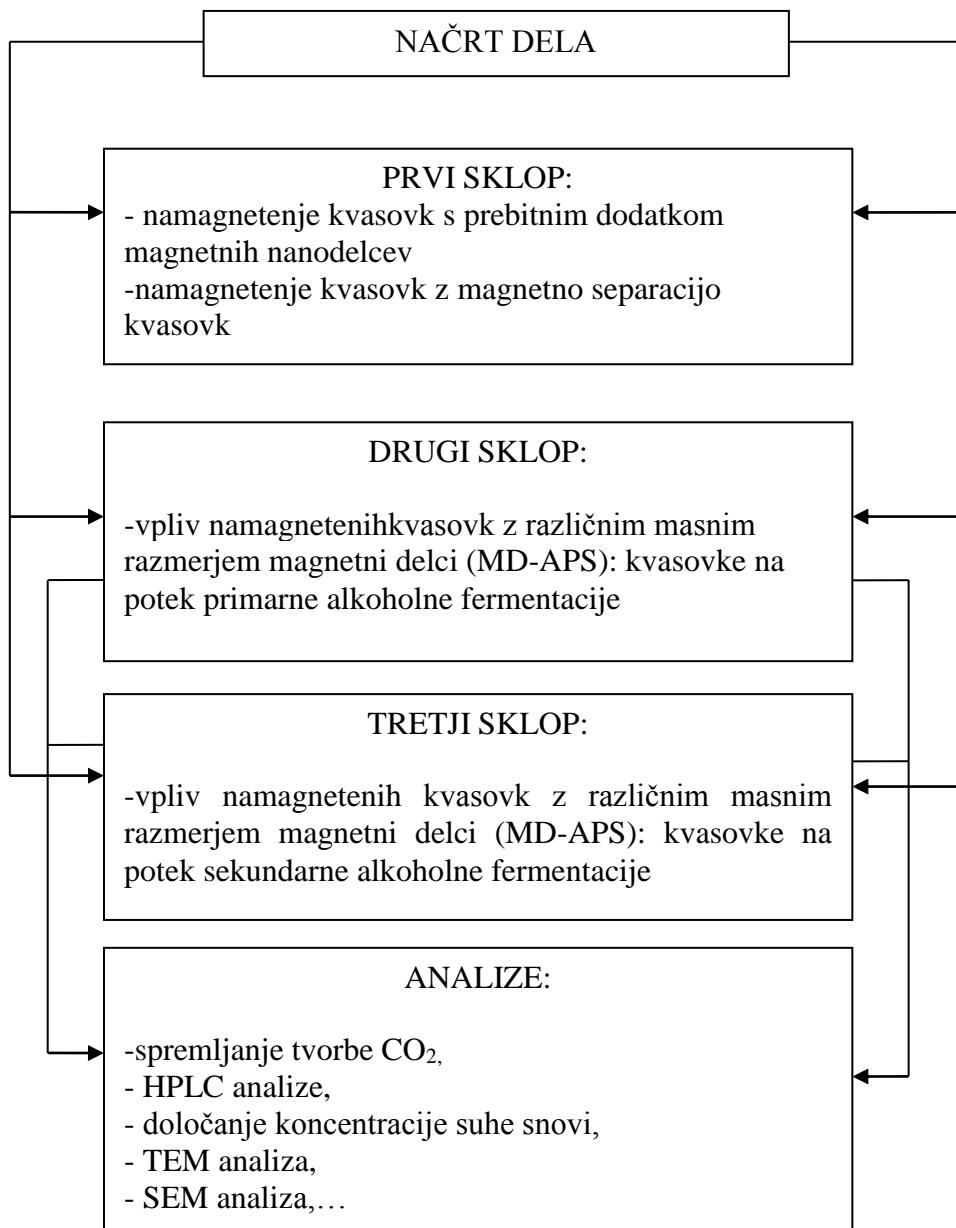
### 3.1.5 Oprema

Uporabili smo naslednjo opremo:

- pH - meter, Metrohm, 827 pH lab, Švica,
- magnetno mešalo, IKA RCT basic, Nemčija,

- tehtnica, Mettler Toledo, AG 104, Švica,
- liofilizator, Kambič, Slovenija,
- steklovina (erlenmajerice, merilni valji, čaše, pipete, palčke, bučke,...),
- inkubator, Innova 4230, ZDA,
- fermentorji (2 l in 1 l),
- HPLC izokratski sistem, ki je bil sestavljen iz: HPLC črpalka Knauer V7324, kolona Knauer V7337, injekcijski ventil z  $20 \mu\text{l}$  injekcijsko zanko, detektor Knauer V7119 in avtomatski podajalnik vzorcev Knauer (Sistem je bil podprt z računalnikom s programsko opremo za zajemanje in obdelavo podatkov Eurochrom) in
- masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS): Agilent Technologies 7500ce ICP-MS Palo Alto, USA.

### 3.2 NAČRT DELA



Slika 2: Shematski prikaz načrta dela

V svojem delu smo izhajali iz rezultatov predhodne raziskave, ki je opisana v diplomskem delu Suzane Boškovič (2010), z naslovom Uporaba magnetnih nanodelcev za separacijo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v alkoholni fermentaciji. V raziskavi so avtorji kvasovke izpostavili magnetnim nanodelcem, da so se ti absorbirali na njihovo površino. Tako *namagnetenje* kvasovk omogoči njihovo magnetno separacijo in naj bi se uporabljalo za hitro, magnetno izločanje izrabljene kvasne biomase iz penečega vina po njegovi sekundarni fermentaciji v tlačnih steklenicah. Poudarek raziskave je bil na vplivu magnetnih nanodelcev na metabolizem kvasovk. Izkazalo se je, da magnetni nanodelci na površini kvasovk, ne vplivajo bistveno na potek alkoholne fermentacije. Ugotovljeno je bilo, da magnetni nanodelci pospešijo kinetiko alkoholne fermentacije.

Na osnovi tega dela je bila tudi razvita metoda priprave penečih vin, ki temelji na magnetni separaciji kvasovk in nanodelcev iz penine. Stabilna vodna suspenzija magnetnih nanodelcev je dodana suspenziji kvasovk v fiziološki raztopini, ki je predhodno rehidrirana 20 minut pri temperaturi 37 °C. Mešanica suspenzij nanodelcev in kvasovk je nato izpostavljena gradientu magnetnega polja, da se izloči sediment kvasovk, na katerih so se adsorbirali nanodelci (Boškovič, 2010).

V diplomskem delu Suzane Boškovič (2010) so se izkazali različni problemi. Uporabljala je magnetne nanodelce železovega oksida, prevlečene s tanko plastjo amorfnega silicijevega oksida. Da so omogočili elektrostatsko absorpcijo na negativno nabite površine kvasovk, so na površino magnetnih nanodelcev vezali molekule 3-(2-amino-etil-amino) propil silan (APMS), tako da so ti izkazovali pozitiven površinski električni naboj. Sinteza takih nanodelcev je kompleksna in bi bila za uporabo v pripravi penečih vin ekonomsko neupravičena. Problem je bil tudi v relativno slabi pokritosti površine kvasovk z nanodelci. Tukaj nastane problem, saj se kvasovke med fermentacijo delijo in se količina magnetnih nanodelcev na posamezni kvasovki zmanjša.

V svojem delu smo uporabili magnetne nanodelce železovega oksida maghemita, na površino katerih so bile vezane molekule APS (MD-APS). Ker nanodelcev v tem primeru ni potrebno prevleči s silicijevim oksidom, je njihova sinteza mnogo cenejša.

Namen dela je bil predvsem raziskati vpliv magnetnih nanodelcev železovega oksida na kinetiko fermentacije. Delo je bilo zasnovano iz treh večjih sklopov. Namen prvega sklopa je bil pripraviti kvasovke z absorbiranimi magnetnimi nanodelci (*namagnetene kvasovke*). Optimizirali smo proces namagnetanja tako, da je bila čim večja koncentracija nanodelcev kar se da homogeno porazdeljena na površini kvasovk. V drugem sklopu je bil namen ugotoviti, kako namagnetene kvasovke z različnim masnim razmerjem magnetni nanodelci (MD-APS): kvasovke, vplivajo na potek primarne alkoholne fermentacije. Hoteli smo ugotoviti, če obstaja razlika v poteku alkoholne fermentacije z namagnetenimi kvasovkami v primerjavi z neobdelano kulturo *Saccharomyces bayanus*, ter če magnetni nanodelci vplivajo na kemijsko sestavo vina. V tretjem sklopu je bil namen ugotoviti, kako namagnetene kvasovke z različnim masnim razmerjem magnetni delci (MD-APS): kvasovke vplivajo na potek sekundarne alkoholne fermentacije. Hoteli smo ugotoviti, če obstaja razlika v poteku alkoholne fermentacije z namagnetenimi kvasovkami v primerjavi z neobdelano kulturo *Saccharomyces bayanus* in ali se ob tem spremeni kemijska sestava penine. Poleg tega smo opazovali obstojnost magnetnih nanodelcev med sekundarno fermentacijo.

### 3.3 METODE DELA

V prvem sklopu smo uporabljali različno masno razmerje magnetnih nanodelcev (MD): kvasovke ter poskušali optimalno porazdeliti magnetne nanodelce na površini membrane kvasovk in jih nato izločili iz suspenzije raztopine. Poskušali smo ugotoviti optimalne pogoje pri katerih izpostavimo kvasovke nanodelcem, da pride do homogene porazdelitve magnetnih nanodelcev na površino kvasovk. To smo zasledovali z elektronsko mikroskopijo. Na osnovi preprostih poizkusov magnetne separacije namagnetenih kvasovk iz vina z uporabo permanentnega magneta, smo optimizirali masno razmerje med kvasovkami in nanodelci.

Namagnetene kvasovke smo nato preizkušali v primarni in v sekundarni fermentaciji. Med potekom primarne in sekundarne alkoholne fermentacije smo izvajali meritve koncentracije suhe snovi, spremeljanje tvorbe CO<sub>2</sub> in HPLC analize, določanje koncentracije suhe snovi, magnetnosti kvasovk, ter TEM in SEM analize.

### 3.4 IZVEDBA PRVEGA SKLOPA

#### 3.4.1 Namagnetenje kvasovk s prebitim dodatkom magnetnih nanodelcev

V tem eksperimentu namagnetenja kvasovk smo skušali doseči absorpcijo čim večje količine magnetnih nanodelcev na njihovo površino. Nanodelce smo zato dodali v razmerju, ki je večje od ocenjenega za popolno pokritost površine kvasovk z nanodelci. Ko bi se po izpostavitvi kvasovk suspenziji nanodelcev maksimalna koncentracija nanodelcev absorbirala na kvasovke, bi ostal del nanodelcev še »v prebitku« neabsorbiran. Ker so v tem primeru razen namagnetenih kvasovk po koncu procesa v suspenziji tudi prebitni nanodelci, v tem primeru za ločevanje namagnetenih kvasovk iz suspenzije ne moremo uporabljati magnetne separacije, saj bi ta pritegnila tudi prebitne magnetne nanodelce. Za ločevanje namagnetenih kvasovk od prebitnih nanodelcev smo uporabili filtracijo z nučiranjem.

##### 3.4.1.1 Priprava suspenzij

Pripravimo dvakrat po 1 l suspenzije kvasovk s koncentracijo 2 g/l in dvakrat po 200 ml suspenzije MD-APS s koncentracijo 1 ml/l. Izhodno in pripravljeno suspenzijo MD-APS izpostavimo ultrazvoku (Sonics & Materials, ZDA, 40 kHz) za 1 minuto. Suspenziji kvasovk in suspoziji MD-APS smo pH uravnali s pomočjo ocetne kisline na vrednost 4.

##### 3.4.1.2 Namagnetenje kvasovk

Kvasovke namagnetimo s postopnim dodajanjem suspenzije magnetnih nanodelcev v suspozijo kvasovk. pH obeh suspenzij je bil uravnan na 4, kjer je razlika v površinskem naboju kvasovk (Boškovič, 2010) in MD-APS (Čampelj in sod., 2009) največja in bo omogočila močne elektrostatske privlačne sile med obema vrstama.

0,4 l suspozije MD-APS (1ml/l) smo izpostavili ultrazvoku (Sonics & Materials, ZDA, 1 min., 40 kHz). V suspozijo MD-APS smo po kapljici iz birete dodajali suspozijo rehidriranih kvasovk (2 g/l). Celoten volumen suspozije kvasovk je bil 2 l. Dodajali smo

jo po kapljicah s hitrostjo približno 5 ml/min. Po končanem postopku smo namagnetene kvasovke ločili od nevezanih MD-APS s filtracijo na filtru tipa BA83 z velikostjo por 0,2  $\mu\text{m}$ . Predpostavili smo, da se bodo večje namagnetene kvasovke na filtru zaustavile, medtem, ko bodo šli manjši, prebitni nanodelci skozi filter. Po filtraciji smo filtrat sprali z 2 l vode. Pri filtraciji je prišlo do problemov z zamašitvijo filtra. Poizkusili smo tudi celulozno acetatni membranski filter (Celulose acetate filter, velikost por 1,2  $\mu\text{m}$ ) vendar so problemi ostali. Zaradi problemov s filtracijo smo lahko pripravili le manjšo količino namagnetenih kvasovk. Namagnetene kvasovke smo liofilizirali. Kvasovke namagnetene na ta način sem uporabil v primarni fermentaciji na Fakulteti za Kemijo in kemijsko inženirstvo (K-MD-APS-2).

### **3.4.2 Namagnetenje kvasovk z magnetno separacijo kvasovk**

V tem eksperimentu namagnetenja kvasovk smo skušali doseči optimalno absorpcijo magnetnih nanodelcev na površino kvasovk, pri čemer bi bili magnetni nanodelci enakomerno porazdeljeni na površini kvasovk. V prvem primeru smo v suspenzijo MD-APS po kapljicah dodali suspenzijo kvasovk (K-MD-APS-4). V drugem primeru pa smo suspenzijo MD-APS intenzivno mešali z mehanskim mešalom, ko smo dodali celotno količino suspenzije kvasovk (K-MD-APS-5). Po izpostavitvi kvasovk suspenziji magnetnih nanodelcev se nanodelci homogeno absorbirajo na površino kvasovk. Tako dobimo suspenzijo namagnetenih kvasovk, ki jih nato z magnetno separacijo izločimo. Pod čašo smo postavili magnet in počakali nekaj minut, da se je izločil sediment kvasovk, na katerih so se adsorbirali magnetni nanodelci.

#### **3.4.2.1 Priprava suspenzij**

Pripravimo 1,5 l suspenzije kvasovk s koncentracijo 2 g/l in dvakrat po 220 ml suspenzije MD-APS, s koncentracijo 1g/l. Izhodno in pripravljeno suspenzijo MD-APS postavimo na ultrazvok. Suspenziji kvasovk in suspenziji MD-APS smo pH uravnali na vrednost 4 z ocetno kislino.

#### **3.4.2.2 Namagnetenje kvasovk**

0,44 l suspenzije MD-APS (1g/l) smo izpostavili ultrazvoku, da smo »razbili« skupke magnetnih nanodelcev. V suspenzijo MD-APS smo naenkrat zlili suspenzijo rehidriranih kvasovk, ob tem pa mešali s kovinskim mešalom. Po končanem postopku smo namagnetene kvasovke izločili z magnetno separacijo. Predpostavili smo, da se bodo namagnetene kvasovke pritrstile na dno čaše, kjer smo imeli postavljen magnet, ne-namagnetene kvasovke pa bodo prosto plavale. Postopek se je izkazal za uspešno metodo pridobivanja namagnetenih kvasovk. Namagnetene kvasovke smo nato liofilizirali. Kvasovke, namagnetene na ta način, smo uporabili v primarni fermentaciji na Fakulteti za Kemijo in kemijsko inženirstvo.

### **3.4.3 Analiza sedimenta**

#### **3.4.3.1 TEM analiza**

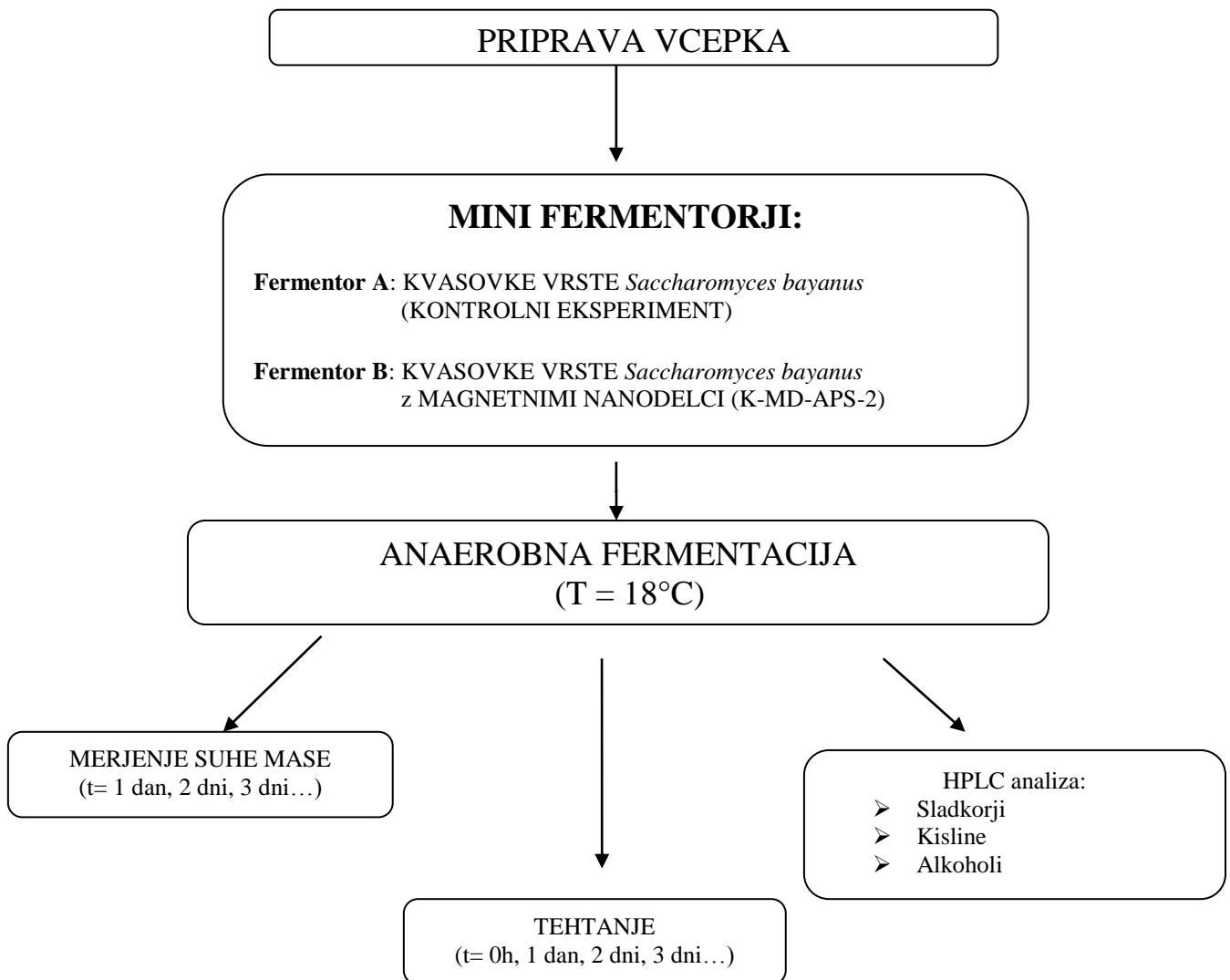
Vzorec sedimenta je bil analiziran s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM Jeol 2100). Vzorec za TEM je bil pripravljen s sušenjem suspenzije sedimenta v etanolu na podporni TEM mrežici.

#### **3.4.3.2 SEM analiza**

Vzorec za SEM je bil pripravljen z nanosom liofiliziranega sedimenta na prevodni trak na površino pa je bil naprašen ogljik, ker mora biti površina vzorca za SEM prevodna. Vzorci so bili analizirani na FEG SEM JEOL7600 F.

### 3.5 IZVEDBA DRUGEGA SKLOPA

#### 3.5.1 Izvedba prvega poskusa



Slika 3: Shematski prikaz poteka prvega poskusa

##### 3.5.1.1 Priprava vcepka

Vcepek smo pripravili tako, da smo kvasovke vrste *Saccharomyces bayanus* zatehtali (obdane ali neobdane z magnetnimi nanodelci) ( $c = 0,3 \text{ g/l}$ ) in dodali hrano za kvasovke ( $c = 0,3 \text{ g/l}$ ) GO-FERM (Danstar ferment AG, Švica). Vse skupaj smo rehidrirali v raztopini mošta in vode (10 ml+10 ml) 20 minut pri temperaturi 37 °C. Raztopino mošta in vode, smo predhodno segrevali na temperaturo 35-37 °C. S tem postopkom smo rehidrirali dva različna vcepka. Rehidracijo smo izvedli v vodni kopeli (Büchi; Waterbath B-480). V prvem vcepku so bile šampanjske kvasovke, v drugem vcepku pa so bile šampanjske

kvasovke obdane z magnetnimi nanodelci (K-MD-APS-2). Po končani rehidraciji smo dodali 20 ml mošta in počakali 10 minut (da se kvasovke lažje prilagodijo).

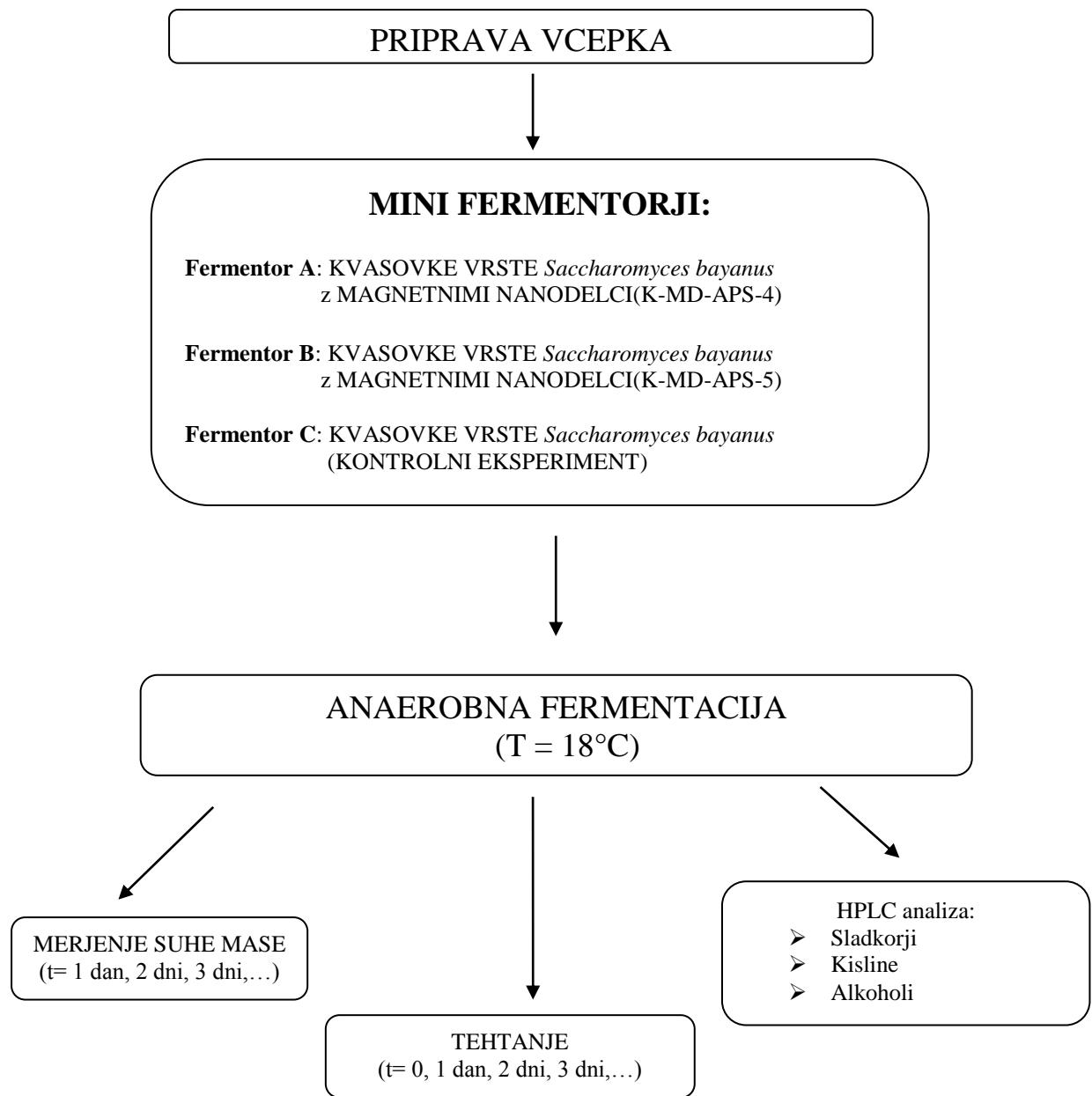
### 3.5.1.2 Anaerobna fermentacija

Fermentacija je potekala 16 dni, pri temperaturi 18 °C, v dveh minifermmentorjih (1 l) z vrelnimi vehami (Slika 4). V vsak minifermotor je bil dodan vcepek ( $c=0,3\text{ g/l}$ ) in grozdni mošt. Minifermotorja smo tehtali vsak dan, saj je bila na ta način izračunana tvorba  $\text{CO}_2$ . Vsak dan (razen na začetku fermentacije) je bilo iz vsakega minifermotorja odvzetih po 20 mL vzorca, ki je bil prefiltiran in dodan v plastične epruvete (15 ml), za HPLC analizo. Filtrni papir (0,22  $\mu\text{m}$ ) smo shranili v petrijevko in ga uporabili za merjenje suhe mase.



Slika 4: Mini fermentor (Mini ..., 2014)

### 3.5.2 Izvedba drugega poskusa



Slika 5: Shematski prikaz poteka drugega dela poskusa

#### 3.5.2.1 Vcepek

Vcepek smo pripravili v skladu s opisanim protokolom v poglavju 3.5.1.1

#### 3.5.2.2 Anaerobna fermentacija drugega poskusa

Fermentacija je potekala 10 dni, pri temperaturi 18 °C, v treh minifermentorjih (1 l) z vrelnimi vehami. V vsak minifermentor je bil dodan vcepek in grozjni mošt.

Minifermatorje smo tehtali vsak dan, saj je bila na ta način izračunana tvorba CO<sub>2</sub>. Vsak dan (razen na začetku fermentacije) je bilo iz vsakega minifermatorja odvzetih po 20 ml vzorca, ki je bil prefiltriran in dodan v plastične epruvete (15 ml), za HPLC analizo. Filtrni papir (0,22 µm) smo shranil v petrijevko in ga uporabili za merjenje suhe mase.

### 3.5.3 Analitske metode

#### 3.5.3.1 Spremljanje nastajanja CO<sub>2</sub>

Med fermentacijo smo spremljali sproščanje CO<sub>2</sub>. Količino sproščenega CO<sub>2</sub> smo določili z merjenjem izgube mase substrata (ob upoštevanju odvzetih vzorcev) v minifermatorjih z vrelnimi vehami.

#### 3.5.3.2 Določanje koncentracije suhe mase

Med fermentacijo smo vsak dan (razen na začetku fermentacije) odvzeli iz vsakega minifermatorja po 20 ml vzorca in ga prefiltrirali skozi filtrni papir (0,22 µm). Filtrni papir z vzorcem smo shranili v petrijevko in izmerili suho maso. Suho maso smo izmerili v pečici (Mettler Toledo HR 83, ZDA), v katero smo postavili filtrni papir z vzorcem. Koncentracijo suhe biomase smo izračunali po enačbi 1:

$$\text{konc. suhe biomase (x)} = \frac{A-b}{0,02l} \text{ (g/l)} \quad \dots(1)$$

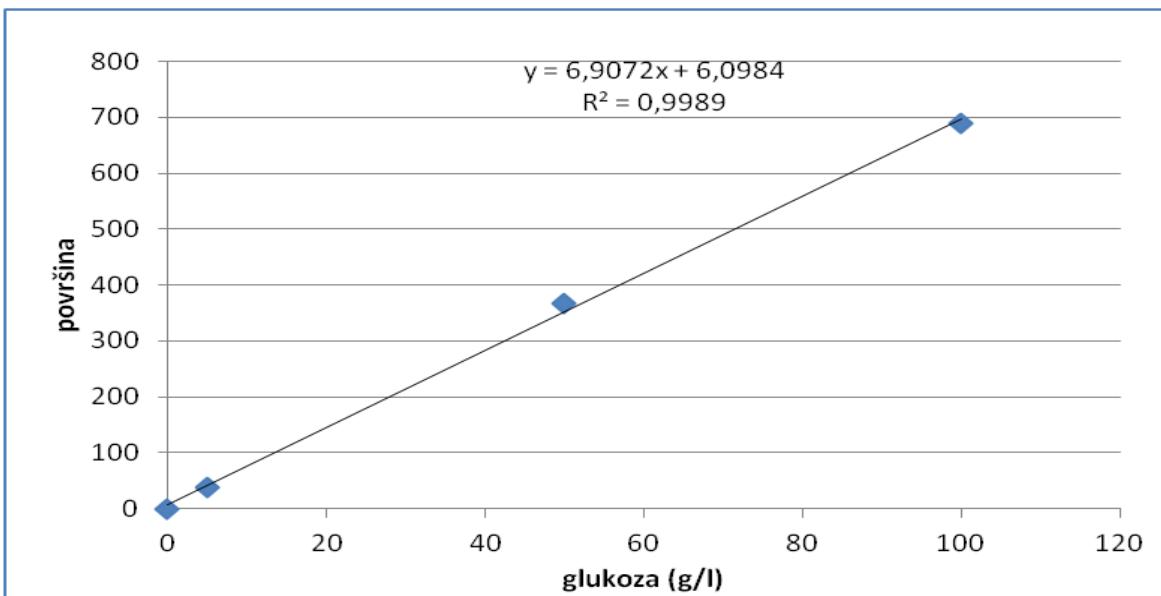
A...masa filter papirja v vzorcem (g)

b...masa filter papirja (g)

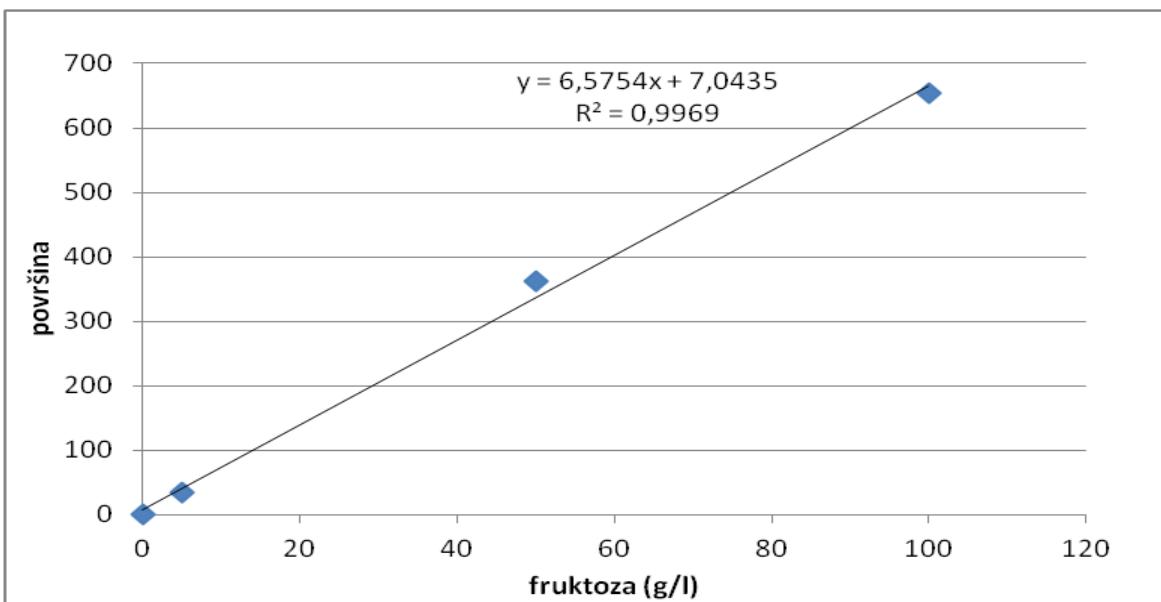
#### 3.5.3.3 HPLC analiza

S pomočjo HPLC analize smo v okviru HPLC izokratskega sistema kvalitativno in kvantitativno določili vsebnost organskih kislin (vinske, jabolčne, mlečne in ocetne kisline), sladkorjev (glukoze, fruktoze), glicerola in etanola. Organske kisline smo detektirali preko UV-VIS detektorja pri valovni dolžini 210 nm, sladkorje, glicerol in etanol pa preko RI diferencialnega refraktometra. S pripravo standardov različnih koncentracij za posamezne spojine smo izdelali umeritvene krivulje ter s pomočjo njih preračunali koncentracije merjenih spojin v preiskovanih vzorcih.

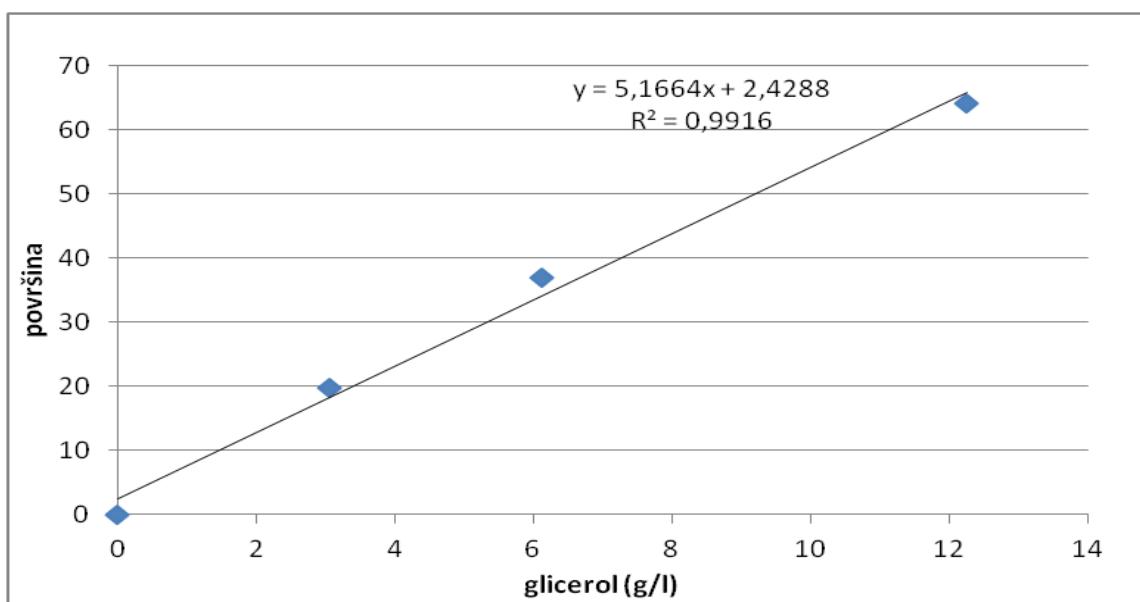
Vzorce, ki smo jih uporabil za HPLC analizo smo predhodno filtrirali s celulozno nitratnimi membranskimi filtri (velikost por = 0,2 µm). Za določanje kislin smo kot mobilno fazo uporabili 0,015 M raztopino H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, za sladkorje in alkohole pa destilirano vodo. Temperatura kolone je bila 65 °C, pretok mobilne faze pa 0,5 ml/min.



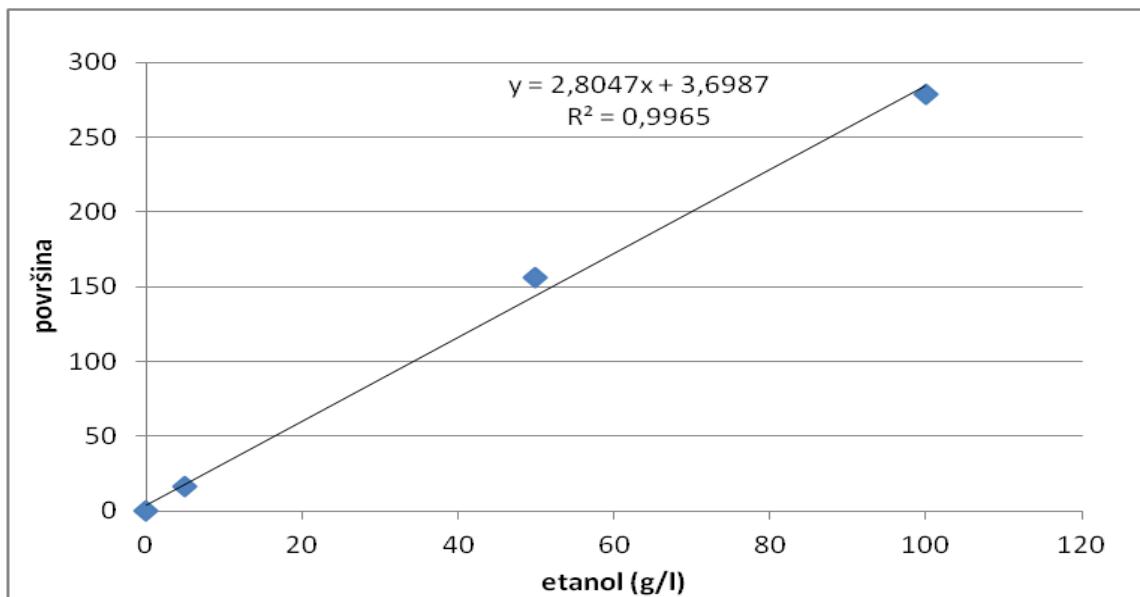
Slika 6: Umeritvena krivulja za glukozo



Slika 7: Umeritvena krivulja za fruktozo



Slika 8: Umeritvena krivulja za glicerol



Slika 9: Umeritvena krivulja za etanol

### 3.5.3.4 Nacepljanje vzorca na agar plošče

V drugem delu poskusa smo po desetih dneh vzeli 1 ml vzorec iz fermentorja B ter ga razmazali po agar plošči. Vzorec smo nacepili na tri agar plošče. Agarne plošče smo nato inkubirali ( $T=37\text{ }^\circ\text{C}$ ), ter jih vsaki drugi dan pregledali, če je prišlo do tvorbe kolonij.

### 3.6 POIZKUS PRIPRAVE PENINE

#### 3.6.1 Priprava vcepkov

##### 3.6.1.1 Rehidracija kvasovk

V 50 ml centrifugirke smo zatehtali po 0,42 g liofiliziranih kvasovk, jim dodali 10 ml vode in 10 ml vina, ki smo ga predhodno segreli na približno 18 °C (belo vino, rebula in chardonnay). Vino je bilo iz vinske kleti Saksida iz Zalošč. Centrifugirke smo postavili v vodno kopel, ki je bila predhodno segreta na 37 °C. Rehidracija kvasovk je potekala 20 minut.

##### 3.6.1.2 Priprava suspenzije kvasovk

V 1 l čašo smo nalili 400 ml mlačne vode in dodali rehidrirane kvasovke. To suspenzijo smo nato mešali s pomočjo mešala disperzeja, ki povzroča velike strižne sile, kar razbija skupke kvasovk.

##### 3.6.1.3 Priprava suspenzije MD-APS

V 200 ml vode smo dodali različno količino MD-APS. Osnovna suspenzija MD-APS je bil 6,9 %, pH pa je imela okoli 4. Predhodno in izhodno suspenzijo smo izpostavili ultrazvoku s sekundnim intervalom pulzerja (60 %, 1 minuta).

#### 3.6.2 Namagnetenje kvasovk

Suspenzijo MD-APS smo dodali suspenziji kvasovk, ki se je predhodno mešala s pomočjo mešala. Vseh 200 ml suspenzije MD-APS smo zlili naenkrat v suspenzijo kvasovk in pustili 4-5 minut, da je prišlo do čim boljše homogenizacije. Po končanem mešanju smo pod čašo dodali magnet, da so se namagnetene kvasovke posedle na magnet. Po posedanju namagnetenih kvasovk smo preostanek tekočine odlili stran, da smo dobili samo usedlino, ki je ostala na dnu čaše. Usedlino smo s spiranjem (z belim vinom, rebula in chardonnay) sprali v centrifugirko in dodali vina do 40 ml. Na tak način smo pripravili vseh 22 vcepkov, z isto količino kvasovk in različno količino MD-APS (Preglednica 1). Vse centrifugirke smo zamašili z vato in jih zložili v transportno posodo iz stiroporja. V preglednici 1 sta zapisana tudi dva vzorca, kjer je bila pridobljena usedlina (kvasovke+MD-APS) liofilizirana (S1 in S2). Ta dva vzorca smo pripravili prejšnji dan po istem postopku, z razliko v tem, da smo usedlino, ki je ostala, liofilizirali čez noč.

Preglednica 1: Vcepki z različnimi količinami kvasovk in MD-APS, ter njihovo masno razmerje

Oznaka vzorca	Količina kvasovk (g)	Količina MD-APS (ml)	Masno razmerje (kvasovke: MD-APS)
S1-2	0,38 g	0,55	1:10
S3-10 + S17-20	0,42	0,605	1:10
S11-12	0,42	2	1:3
S13-14	0,42	0,12	1:50
S15-16	0,42	0,06	1:100
S21-24 (nula)	0,42	/	/

### 3.6.3 Potek stekleničenja vina

Dodajanje vcepkov v vino in stekleničenje je bilo narejeno v kleti Saksida v Zaloščah. Vzorec S1 in S2, v katerih so bile liofilizirane kvasovke smo morali predhodno rehidrirati. Rehidracija je potekala pri okoli 37 °C, 20 minut. Po končani rehidraciji smo vcepek prelimili v steklenico z vinom.

#### 3.6.3.1 Prenos vcepkov v vino

Najprej smo pripravili v plastični kadi 20 litrov vina, ki smo ga kasneje uporabili pri stekleničenju. Uporabili smo zvrst chardonnaya in rebule. Vina smo zmešali skupaj, da smo dobili lepo barvo, ter da smo dobili primerno količino kislin. Mešanici vin smo dodali 0,5 kg sladkorja ( $c=0,025 \text{ kg/l}$ ). Vino smo točili v prozorne steklenice z volumnom 0,75 l. V vsako steklenico smo nalili približno pol litra vina, dodali vcepek, nato pa dolili še preostanek vina, da je bila steklenica polna. Steklenice smo nato zaprli s kronskim pokrovčkom.

### 3.6.4 Magnetna separacija

Obnašanje sedimenta v vinu v steklenicah v gradientu magnetnega polja se je zasledovalo s spremeljanjem časa, ki je potreben za separacijo na dveh magnetih na površini steklenice. Na steklenico sta bila prilepljena (z lepilom) dva magneta (Nd-Fe-B, 5 cm x 3 cm x 1,2 cm), na vsako stran steklenice enega, vzdolžno, približno 5 cm od dna steklenice. Vsebino steklenice smo dobro pretresili in jo postaviti z zamaškom navzdol. Za steklenico je bila nameščena luč. Na ta način smo merili koliko časa je potrebno, da pride do sedimentacije kvasne biomase na magnetu.

### 3.6.5 Analiza vsebine steklenice po določenem času

Po določenem času smo izmerili tlak v steklenicah. Steklenice smo odprli in izločili namagnetene kvasovke z magnetno separacijo. Sediment smo liofilizirali in ga uporabili za analize.

#### 3.6.5.1 Merjenje tlaka v steklenicah za penino

Tlak smo merili s pomočjo manometra. Manometer smo namestili na vrh steklenice in preluknjali kronske pokrovček, da smo lahko izmerili tlak v steklenici. Zanimalo nas je, če prisotni magnetni nanodelci vplivajo na potek alkoholne fermentacije. Primerjali smo tudi tlak v peninah z različnimi masnimi razmerji magnetnih nanodelcev in kvasovk. Tlak je bil izmerjen v različnih časovnih zaporedjih.

#### 3.6.5.2 Določanje koncentracije suhe biomase

Odvzeli smo 40 ml vzorca iz vsake steklenice in ga prefiltrirali skozi filtrni papir (0,22 µm). Filtrni papir z vzorcem smo shranili v petrijevko in izmerili suho maso. Suho maso smo izmerili v pečice (Mettler Toledo HR 83, ZDA) v katero smo postavili filtrni papir z vzorcem. Koncentracijo suhe biomase smo izračunali po Enačbi 2:

$$\text{konc. suhe biomase (x)} = \frac{A-b}{0,04l} \text{ (g/l)} \quad \dots(2)$$

A...masa filter papirja z vzorcem (g)

b...masa filter papirja (g)

#### 3.6.5.3 HPLC analiza

Analiza je potekala enako kot je opisana v poglavju 3.5.3.3.

#### 3.6.5.4 Analiza kovinskih ionov

Po separaciji kvasovk in nanodelcev iz penine nas je zanimalo, če se magnetni nanodelci raztaplja oziroma, če je ostalo še kaj teh nanodelcev v penini. Po magnetni separaciji kvasovk z nanodelci smo vzeli 15 ml penine za kasnejšo analizo kovinskih ionov in jo zamrznili. Za analizo je bilo nato uporabljenih 10 ml penine. Vzorce je bilo potrebno odmrzniti, centrifugirati na 4000 rpm za 5 minut, nato pa jih 100x redčiti z 1 % HNO<sub>3</sub> in pomeriti z ICP-MS. Kot primerjavo smo vzeli kontrolno penino (brez magnetnih nanodelcev).

### **3.6.6 Analiza sedimenta**

#### **3.6.6.1 TEM analiza penine**

Vzorec sedimenta po določenem času sekundarne fermentacije je bil analiziran s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM Jeol 2100). Vzorec za TEM je bil pripravljen s sušenjem suspenzije sedimenta v etanolu na podporni TEM mrežici.

## 4 REZULTATI

### 4.1 NAMAGNETENJE KVASOVK

Ugotovili smo, da je ta postopek namagnetenja kvasovk z magnetno separacijo primernejši od postopka namagnetenja kvasovk s prebitnim dodatkom magnetnih nanodelcev. Pri postopku namagnetenja kvasovk s prebitnim dodatkom MD je prihajalo do zamašitve por filtra zaradi visoke koncentracije suspenzije MD. Tudi ob uporabi filter papirja z večjimi porami je prihajalo do zamašitve por, tako da za tolikšno koncentracijo MD, kot jo mi potrebujemo, ta postopek ni primeren. Postopek namagnetenja kvasovk z magnetno separacijo se je izkazal za uspešnega. Glede na dobljene rezultate smo se odločili, da za pripravo namagnetenih kvasovk v sekundarni fermentaciji, uporabimo postopek namagnetenja kvasovk z magnetno separacijo in ne s prebitnim dodatkom magnetnih nanodelcev.

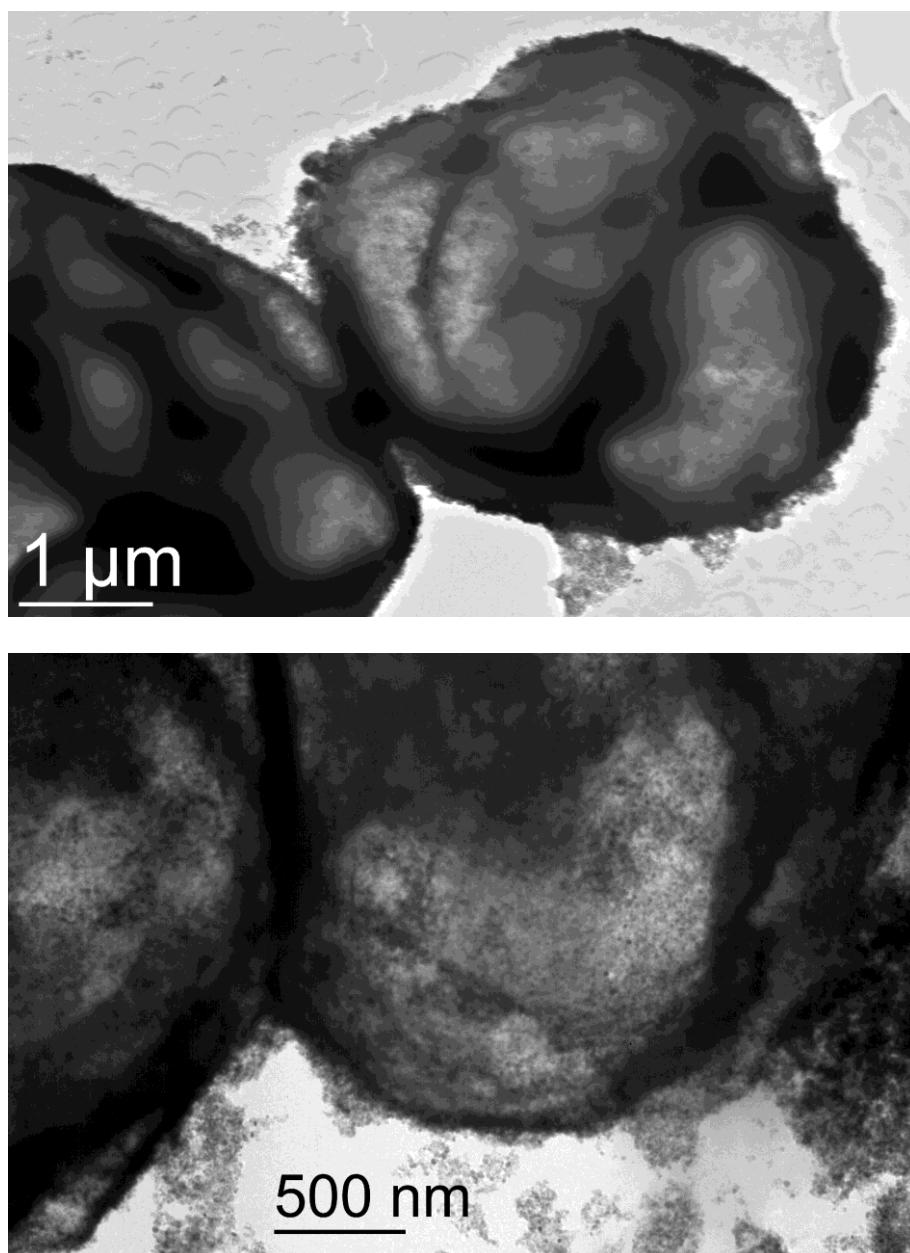
#### 4.1.1 Namagnetenje kvasovk s prebitnim dodatkom magnetnih nanodelcev

Pri vodni filtraciji smo opazili, da prihaja do zamašitve por v filtru, po večkratnem spiranju. Nastala je filtrna pogača, ki je bila nepropustna za suspenzijo magnetnih nanodelcev in kvasovk. Zato smo čez filter prelimi samo 400 ml suspenzije MD-APS s kvasovkami, nato pa zamenjali filtrni papir. Uporabili smo tudi filter, ki je imel velikost por  $1,2 \mu\text{m}$ , vendar je po večkratnem spiranju tudi tukaj prihajalo do zamašitve por. Zaradi tega smo se odločili, da naredimo suspenzijo magnetnih nanodelcev, ki je bila 0,02 % in ugotovili, da potem ne prihaja do takojšnje zamašitve por. Vendar tudi ta način ni bil najbolj primeren, saj na ta način ne moremo pridobiti večjih količin namagnetenih kvasovk. Uporabili smo tudi diskasto mešalo, da smo z njim ustvarjali suspenzijo magnetnih nanodelcev in kvasovk ter s tem preprečevali takojšnje usedanje delcev in nastanek filtrne pogače. Liofilizacija je bila uspešna, tako da smo te vzorce uporabili za primarno fermentacijo. TEM analiza je pokazala pri prebitku magnetnih nanodelcev, da so kvasovke obdane z debelo plastjo magnetnih nanodelcev. Slika 10 prikazuje TEM posnetek namagnetenih kvasovk s prebitnim dodatkom magnetnih nanodelcev MD-APS. Na slikah je vidno, da je velika večina površine kvasovk prekrita z magnetnimi nanodelci. Nanodelci na tej sliki so vidni kot zrnata struktura na površini kvasovk in na posameznih mestih poleg kvasovk. Del nanodelcev torej leži tudi poleg kvasovk. To je vsaj delno lahko posledica tega, da se kvasovke med sušenjem skrčijo in se zato zmanjša njihova površina in nanodelci zato odpadejo s površine.

V primerjavi z nanodelci MD-Si-APMS, ki so bili uporabljeni v predhodni raziskavi (Boškovič, 2010), smo v primeru nanodelcev MD-APS uspeli na površino kvasovk absorbirati nanodelce v mnogo večji površinski koncentraciji. Razlog je v razmerju sil med delci v suspenziji med namagnetenjem. Površinski naboj maghemitnih nanodelcev MD-Si-APMS velikosti 13 nm in prevlečenih z 2 nm silikatno plastjo je bil uravnан z vezavo visoke površinske koncentracije 3-(2-aminoethylamino) propilmetildimethoksilana (APMS) na površino. Zaradi velike površinske koncentracije amino skupin na površini so bili nanodelci pozitivno nabiti. Njihova vodna suspenzija, v kateri so bile kvasovke izpostavljene nanodelcem, je bila popolnoma stabilna. Nanodelci MD-Si-APMS se zaradi velikega pozitivnega naboja močno vežejo na negativno nabito površino kvasovk. Po drugi strani pa se med seboj močno odbijajo zaradi elektrostatskih odbojnih sil. Odbojne sile

med delci preprečujejo, da bi se naložili na površino kvasovk v veliki površinski koncentraciji. Magnetni nanodelci MD-APS pa v vodi ne tvorijo povsem stabilne suspenzije. Nanodelci so v suspenziji prisotni v obliki majhnih aglomeratov velikosti okoli 100 nm (Makovec in sod., 2011).

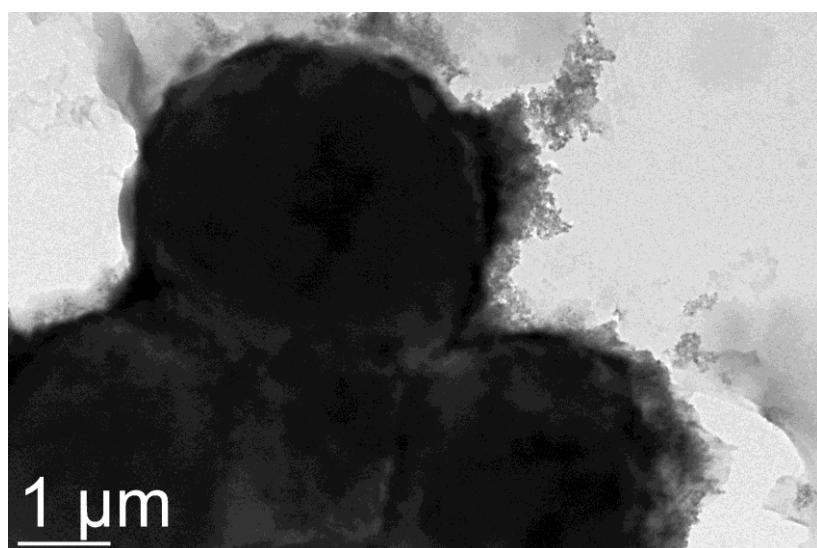
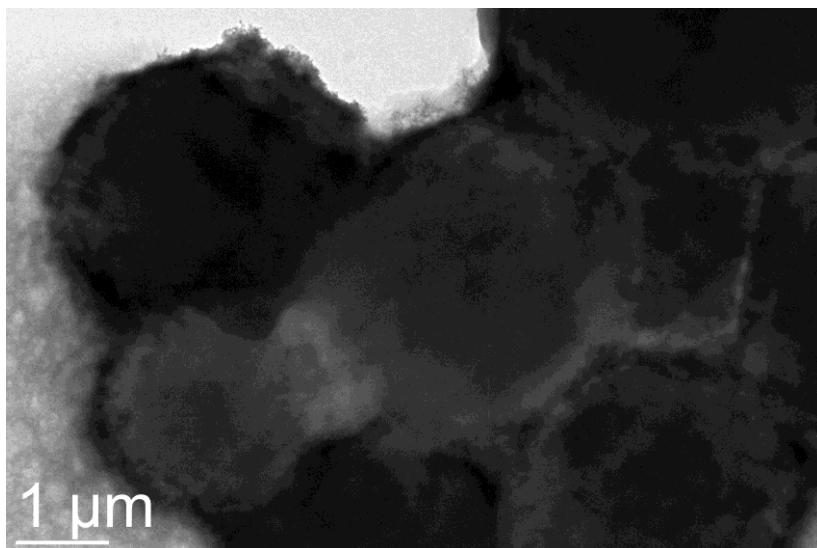
To dokazuje, da delujejo med nanodelci MD-APS manje odbojne sile kot v primeru nanodelcev MD-Si-APMS, hkrati pa je njihov pozitivni naboj očitno dovolj visok, da omogoča učinkovito absorpcijo na negativno nabite kvasovke.



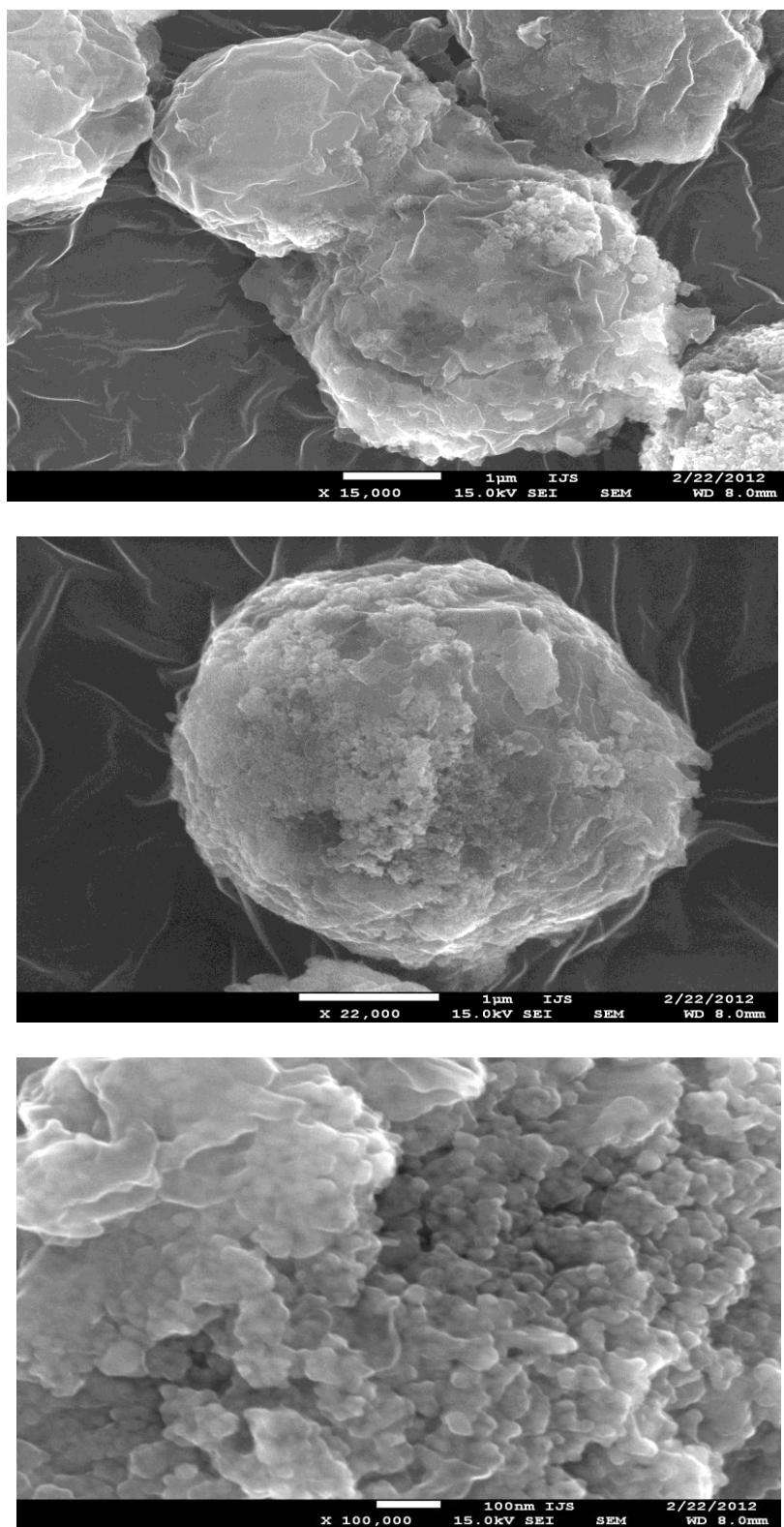
Slika 10: TEM posnetka (pri dveh različnih povečavah) namagnetenih kvasovk s prebitni dodatkom magnetnih nanodelcev MD-APS

#### 4.1.2 Namagnetenje kvasovk z magnetno separacijo kvasovk

Namagnetene kvasovke po določenem času ( $t = 0,5$  h) smo po izpostavitvi magnetnim nanodelcem posedli na dno čaše z uporabo permanentnega magneta, odvečno suspenzijo s kvasovkami, na katerih ni bilo absorbiranih dovolj nanodelcev, pa smo odvzeli. Kasnejši pregled odvzetega dela je pokazal, da je *ne-namagnetenih* kvasovk zelo malo. Mešanje s kovinskim mešalom se je izkazalo za uspešno, saj s tem ustvarjamo pogoje za čim boljšo homogenost absorpcije MD-APS na površino kvasovk. Homogenost porazdelitve MD-APS na kvasovkah po namagnetenju smo preverili s TEM in SEM analizo. Slika 11 prikazuje TEM posnetek kvasovk namagnetenih z magnetno separacijo. Nanodelci so relativno homogeno porazdeljeni po vseh kvasovkah, je pa njihova površinska koncentracija manjša kot v primeru namagnetenja s prebitnim dodatkom. Tudi na SEM posnetkih (Slika 12) se vidi relativno homogena porazdelitev nanodelcev po kvasovkah. Nanodelci so sicer razporejeni po površini kvasovke v obliki skupkov.



Slika 11: TEM posnetka (pri dveh različnih povečavah) namagnetenih kvasovk z magnetno separacijo



Slika 12: SEM posnetki (pri treh različnih povečavah) namagnetenih kvasovk z magnetno separacijo.

Liofilizacija je bila uspešna, tako da smo te vzorce uporabili za nadaljnjo primarno fermentacijo.

## 4.2 DRUGI SKLOP

V prvem poizkusu smo želeli preveriti, kako zelo velika površinska prekritost kvasovk z nanodelci učinkuje na njihov metabolizem. Vzorec je bil pridobljen s postopkom namagnetenje kvasovk s prebitim dodatkom magnetnih nanodelcev MD-APS (K-MD-APS-2). V tem primeru je površina kvasovk skoraj povsem prekrita z nanodelci. Kot se je izkazalo sicer tak način namagnetenja kvasovk ni uporaben za pripravo večje količine vcepkov za šampanizacijo. Hoteli smo predvsem preveriti, ali povzroči taka maksimalna prekritost površine kvasovk razliko v poteku alkoholne fermentacije v primerjavi z neobdelano kulturo *Saccharomyces bayanus*, ter če magnetni nanodelci vplivajo na kemijsko sestavo vina.

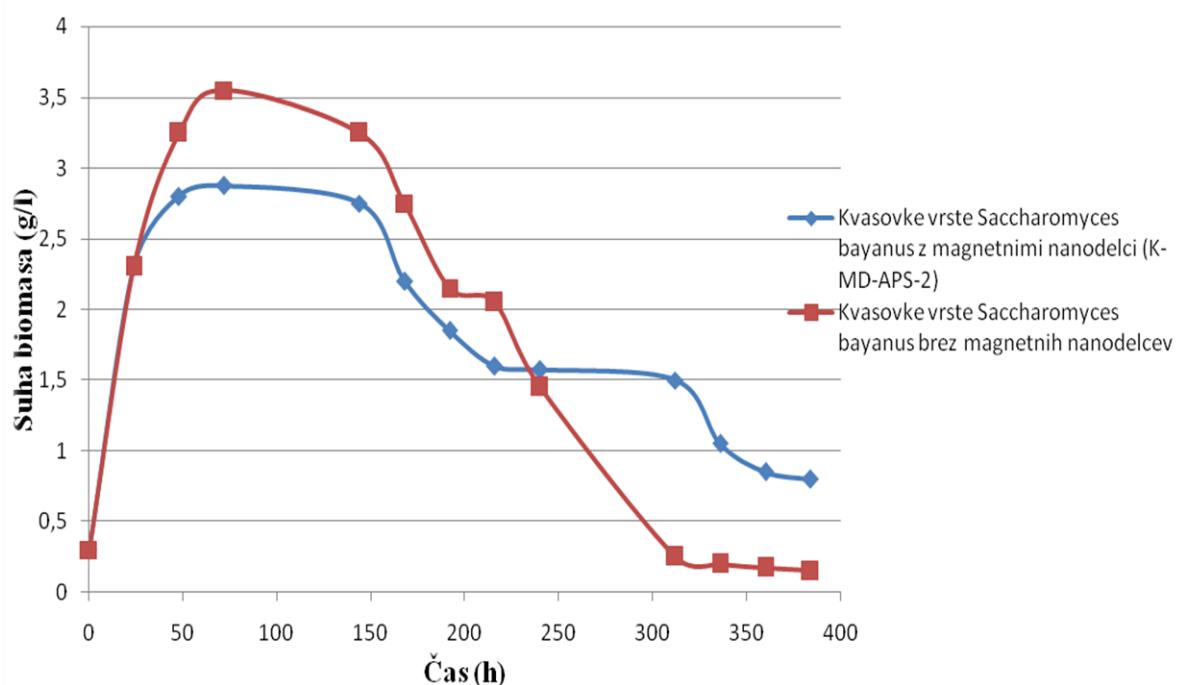
V drugem poskusu smo uporabili magnetne delce MD-APS. Vzorca sta bila pridobljena s postopkom namagnetenje kvasovk z magnetno separacijo kvasovk. V prvem primeru smo v suspenzijo MD-APS po kapljicah dodali suspenzijo kvasovk (K-MD-APS-4). V drugem primeru pa smo suspenzijo MD-APS intenzivno mešali z mehanskim mešalom, ko smo dodali celotno količino suspenzije kvasovk (K-MD-APS-5). V tem primeru je površina kvasovk manj prekrita z nanodelci, kot v prvem poizkusu, vendar še vedno zadostna, da bi bila metoda primerna za pripravo vcepkov za šampanizacijo. Kot se je izkazalo, je metoda, kjer intenzivno mešamo z mehanskim mešalom in dodamo celotno količino suspenzije kvasovk, najprimernejša za pripravo večje količine vcepkov za šampanizacijo. Ta metoda se je tudi uporabila pri tretjem sklopu za poizkus priprave penine. Metoda, kjer v suspenzijo MD-APS po kapljicah dodajamo suspenzijo kvasovk je zamudna, zato je tudi manj primerna. Hoteli smo predvsem preveriti, ali povzroči prekritost površine kvasovk razliko v poteku alkoholne fermentacije v primerjavi z neobdelano kulturo *Saccharomyces bayanus*, ter če magnetni nanodelci vplivajo na kemijsko sestavo vina.

### 4.2.1 Kinetika alkoholne fermentacije

#### 4.2.1.1 Prvi poskus (K-MD-APS2)

##### 4.2.1.1.1 Sprememba koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo

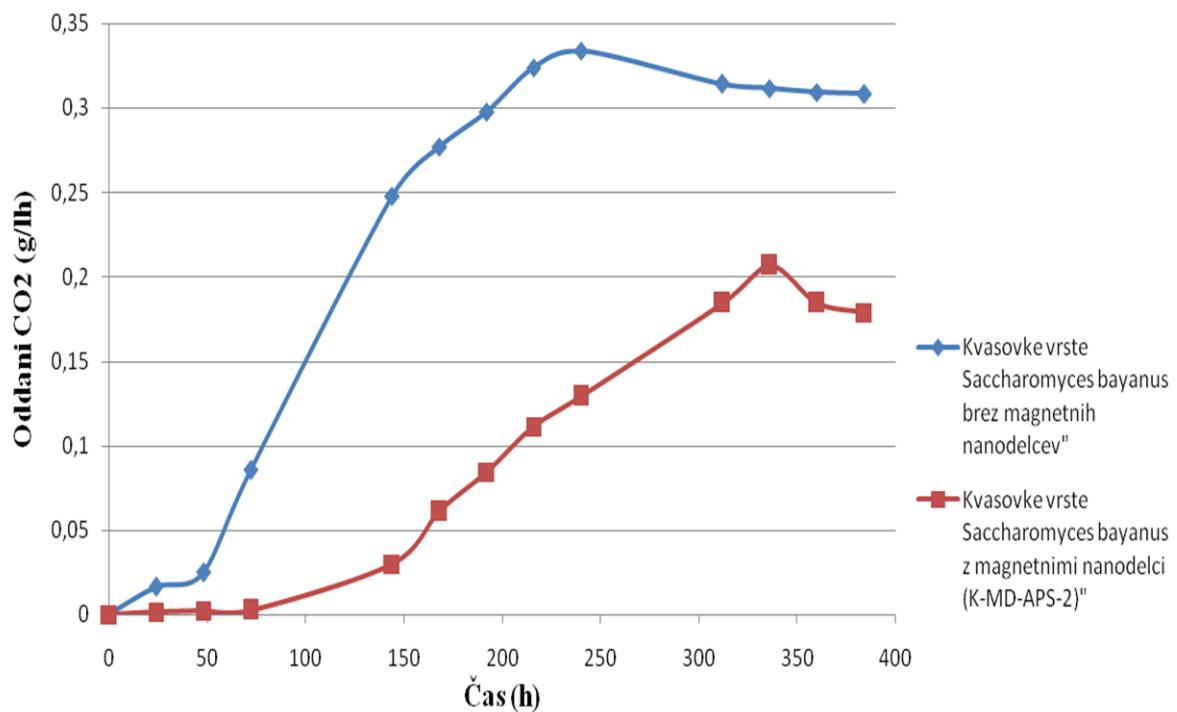
Na sliki 13 je vidno, da se je koncentracija suhe biomase med fermentacijo hitreje zmanjševala v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Na sliki 13 je prikazano, da je bila koncentracija suhe biomase ob koncu fermentacije najnižja v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da magnetni nanodelci vplivajo na potek spremembe koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo.



Slika 13: Potek spremembe koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo

#### 4.2.1.1.2 Sproščanje CO<sub>2</sub>

Na sliki 14 je prikazano sproščanje CO<sub>2</sub> med alkoholno fermentacijo. V vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke vrste *Saccharomyces bayanus* brez magnetnih nanodelcev je bilo več sproščenega CO<sub>2</sub> med alkoholno fermentacijo, kot pa v vzorcu kjer so bile dodane kvasovke vrste *Saccharomyces bayanus* z magnetnimi nanodelci. Opazimo lahko, da so razlike v količini sproščenega CO<sub>2</sub>, tako da magnetni nanodelci vplivajo na dihanje. Opaziti je tudi da je bila faza prilagajanje celične rasti daljša v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci. Zato je bila tukaj faza eksponentne rasti daljša in značilno manj strma v primerjavi z vzorcem, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Vse to je vplivalo, da je bilo sproščenega manj CO<sub>2</sub> v določenem času, v vzorcu kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci. Med devetim in enajstim dnevom se je sprostilo največ CO<sub>2</sub>, med 0,3-0,35 g/lh. Nato pa sledi upadanje sproščanja CO<sub>2</sub>. Iz rezultatov lahko sklepamo, da magnetni nanodelci vplivajo na sproščanje CO<sub>2</sub>.

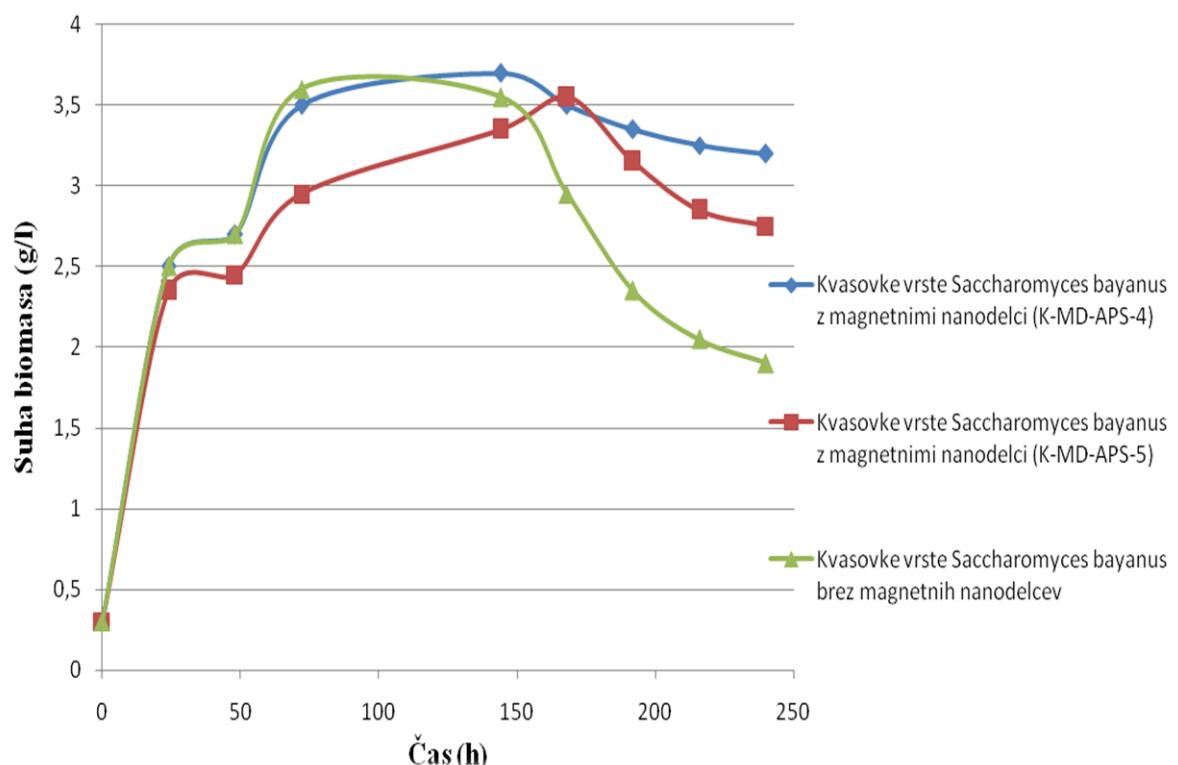


Slika 14: Kinetika oddanega CO<sub>2</sub> v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije

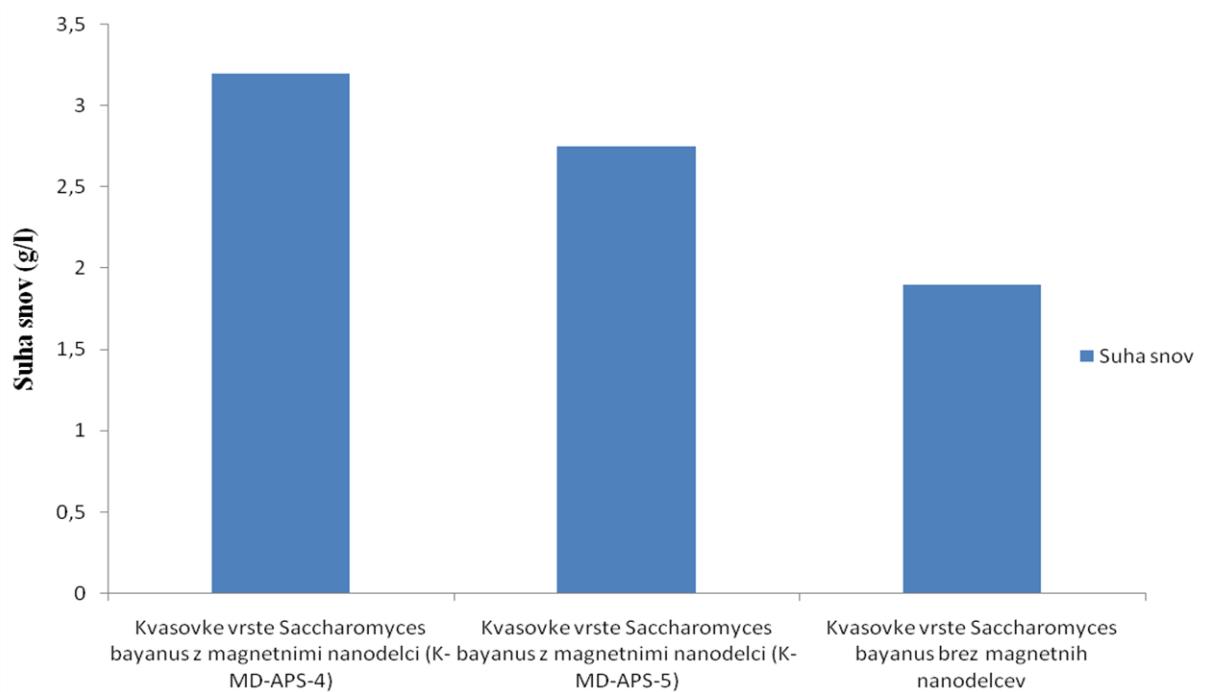
#### 4.2.1.2 Drugi poskus (K-MD-APS4 in K-MD-APS5)

##### 4.2.1.2.1 Sprememba koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo

Na sliki 15 je vidno, da se je koncentracija suhe biomase na začetku alkoholne fermentacije linearno povečevala, pri vseh treh vzorcih. Najhitreje se je suha biomasa zmanjševala v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Slika 16 prikazuje koncentracijo suhe biomase ob koncu alkoholne fermentacije. Opazimo lahko, da je bila koncentracija suhe biomase ob koncu alkoholne fermentacije najnižja v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da magnetni nanodelci vplivajo na potek spremembe koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo.



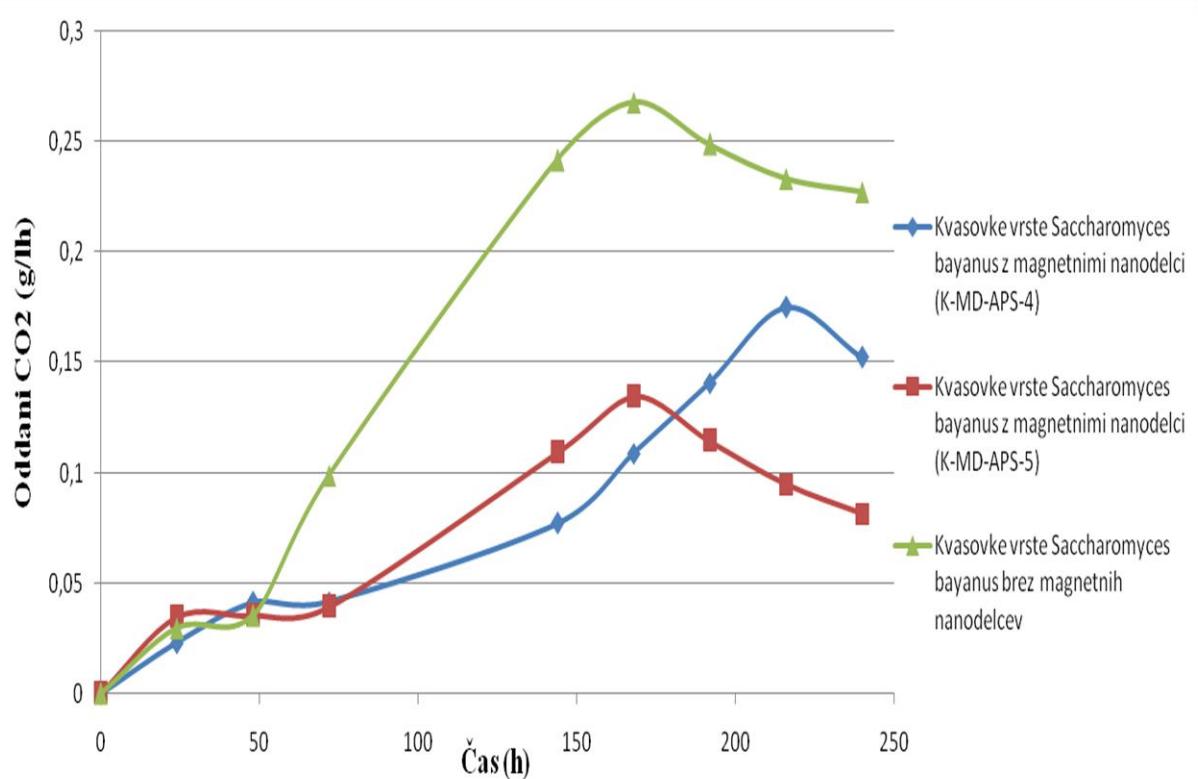
Slika 15: Potek spremembe koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo



Slika 16: Koncentracija suhe biomase ob koncu alkoholne fermentacije

#### 4.2.1.2.2 Sproščanje CO<sub>2</sub>

Na sliki 17 se vidi, da je bilo v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev, več sproščenega CO<sub>2</sub> v določenem času, kot pa drugih dveh vzorcih, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci. Opaziti je, da so razlike v količini sproščenega CO<sub>2</sub>, tako da magnetni nanodelci vplivajo na dihanje. V vzorcu kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci (postopek dodajanje po kapljicah) je opaziti, da je bila eksponentna faza rasti daljša, kot pa v drugih dveh vzorcih. Med šestim in osmim dnevom se je sprostilo največ CO<sub>2</sub>, med 0,24- 0,27 g/lh. Iz prikazanega lahko sklepamo, da magnetni nanodelci vplivajo na sproščanje CO<sub>2</sub>.



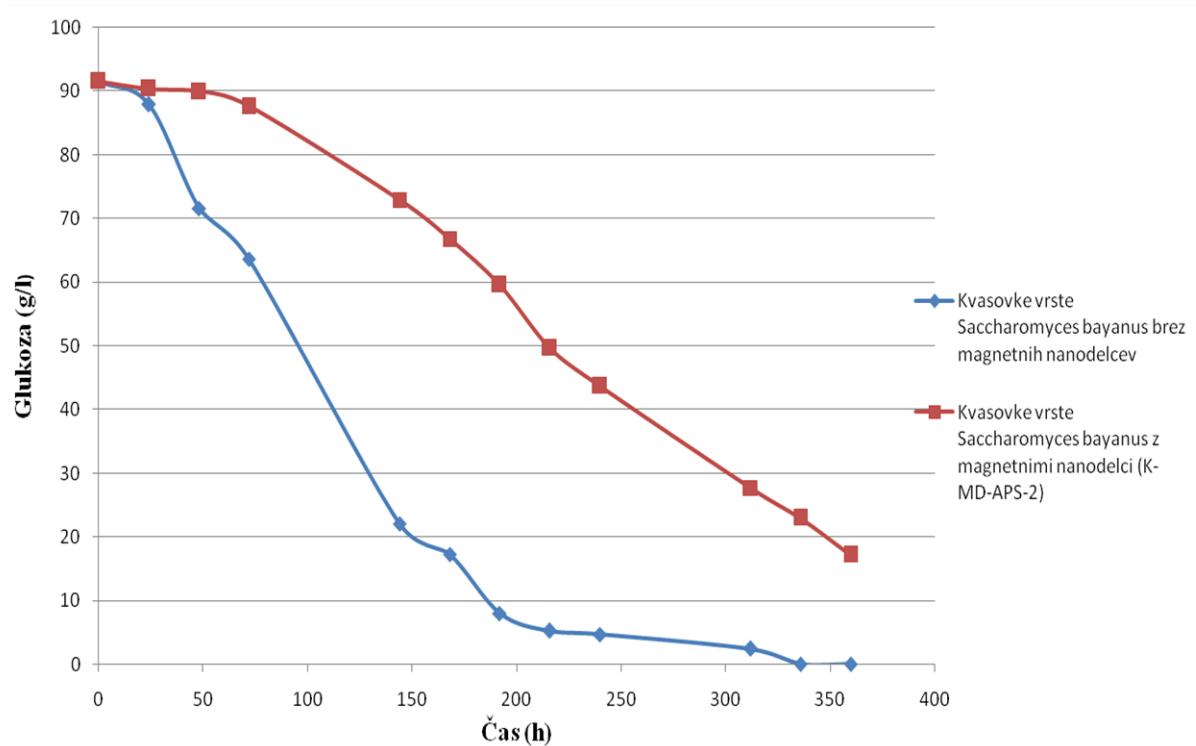
Slika 17: Kinetika oddanega CO<sub>2</sub> v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije

## 4.2.2 HPLC analiza

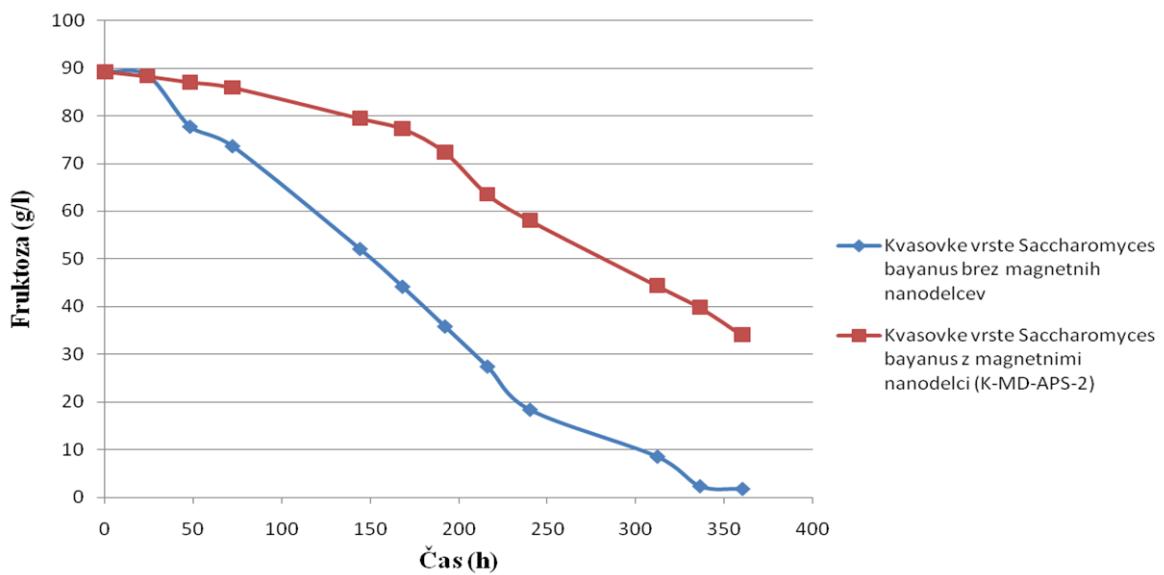
### 4.2.2.1 K-MD-APS2

#### 4.2.2.1.1 Dinamika porabe sladkorjev

Slike 18 in 19 nam predstavljata porabo sladkorjev glukoze in fruktoze med alkoholno fermentacijo. Hitrost porabe sladkorjev glukoze in fruktoze je večja in bolj intenzivna v vzorcu, kjer niso prisotni magnetni nanodelci. V vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci, ne pride do celotne porabe glukoze in fruktoze. Hitrost porabe glukoze med alkoholno fermentacijo je nekoliko večja kot pri porabi fruktoze.



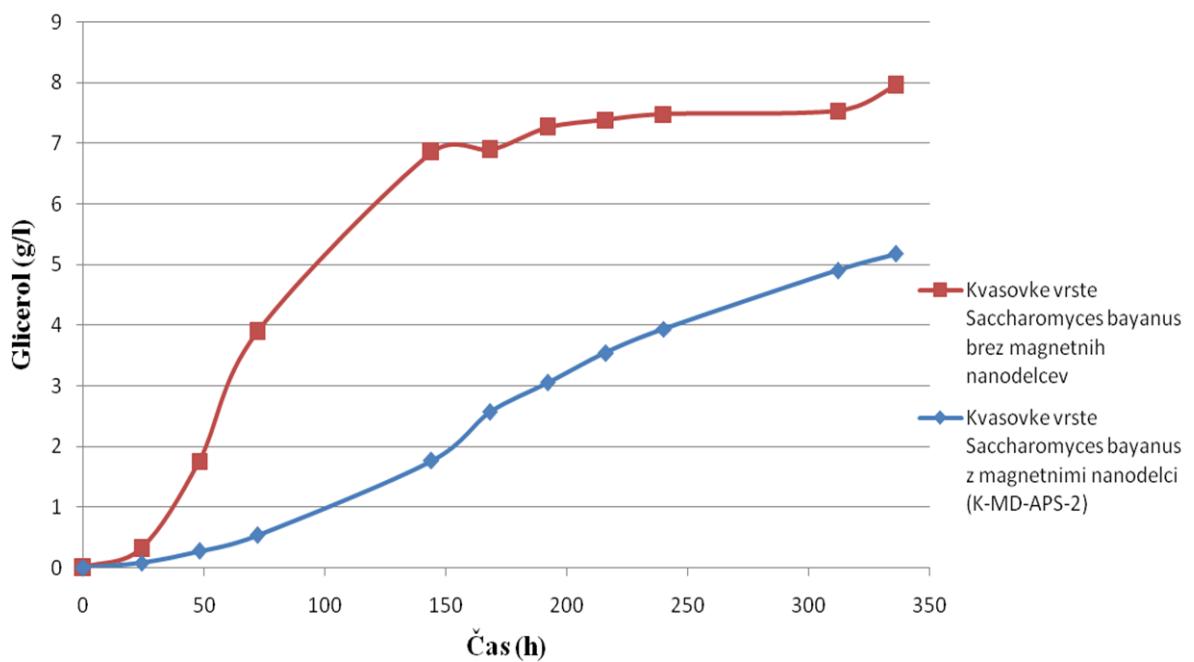
Slika 18: Poraba glukoze med alkoholno fermentacijo pri 18 °C



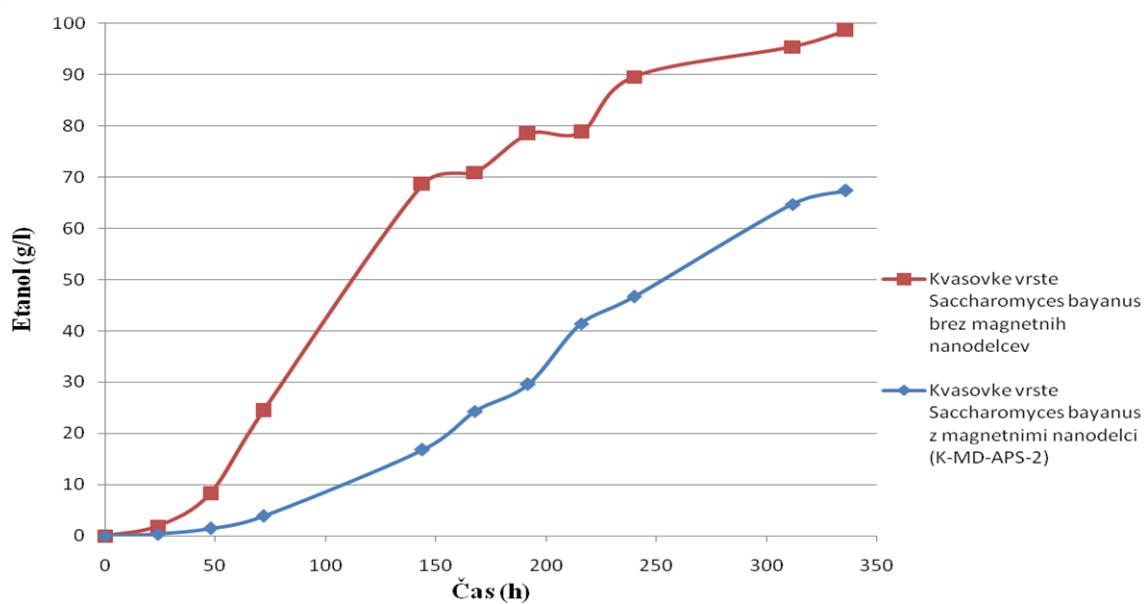
Slika 19: Poraba fruktoze med alkoholno fermentacijo pri 18 °C

#### 4.2.2.1.2 Dinamika tvorbe metabolnih produktov

Iz slik 20 in 21 je razvidno, da magnetni nanodelci vplivajo na nastajanje glicerola in etanola. Producija glicerola in etanola je večja v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Najvišja končna koncentracija glicerola je približno 8 g/l, najvišja končna koncentracija etanola pa je približno 100 g/l.

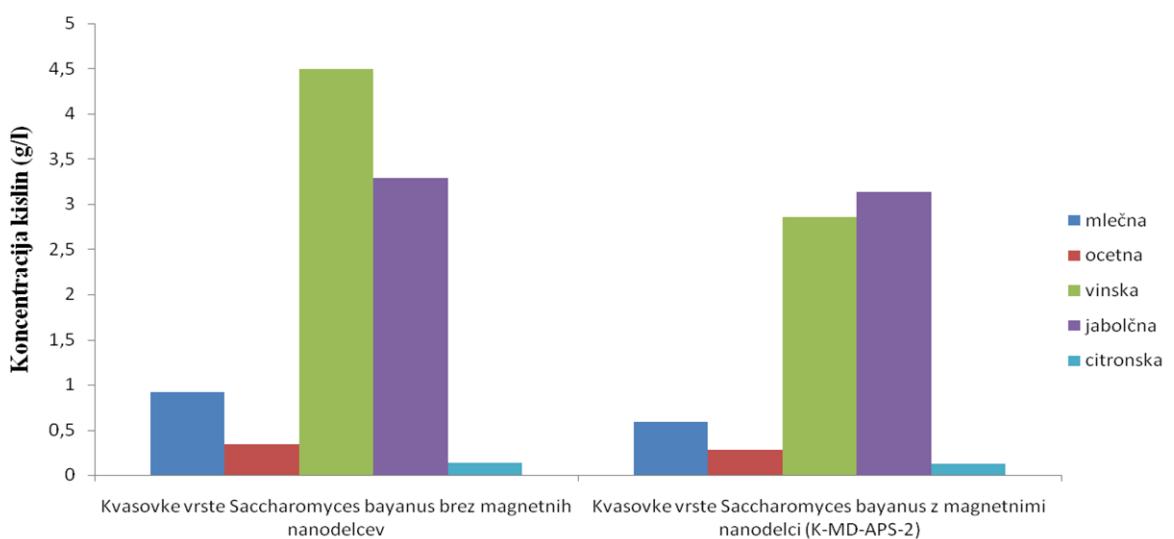


Slika 20: Nastajanje glicerola med alkoholno fermentacijo pri 18 °C



Slika 21: Nastajanje etanola med alkoholno fermentacijo pri 18 °C

Slika 22 nam prikazuje vsebnost kislin ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci in šampanjske kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Zanimalo nas je, če magnetni nanodelci vplivajo na nastanek in količino kislin med alkoholno fermentacijo. Iz grafa lahko sklepamo, da so ocetna, citronska in jabolčna kislina zastopane v podobnih koncentracijah pri obeh vzorcih. Vinska kislina je povisana v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Prav tako je mlečna kislina nekoliko povisana v vzorcih, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev, kar vpliva na boljši okus pridelka.

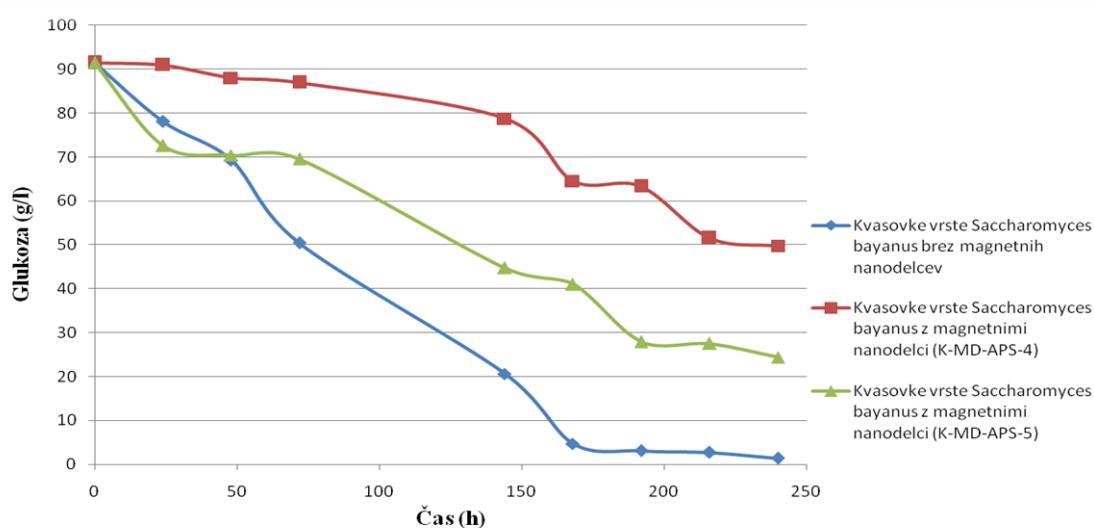


Slika 22: Vsebnost kislin ob koncu alkoholne fermentacije

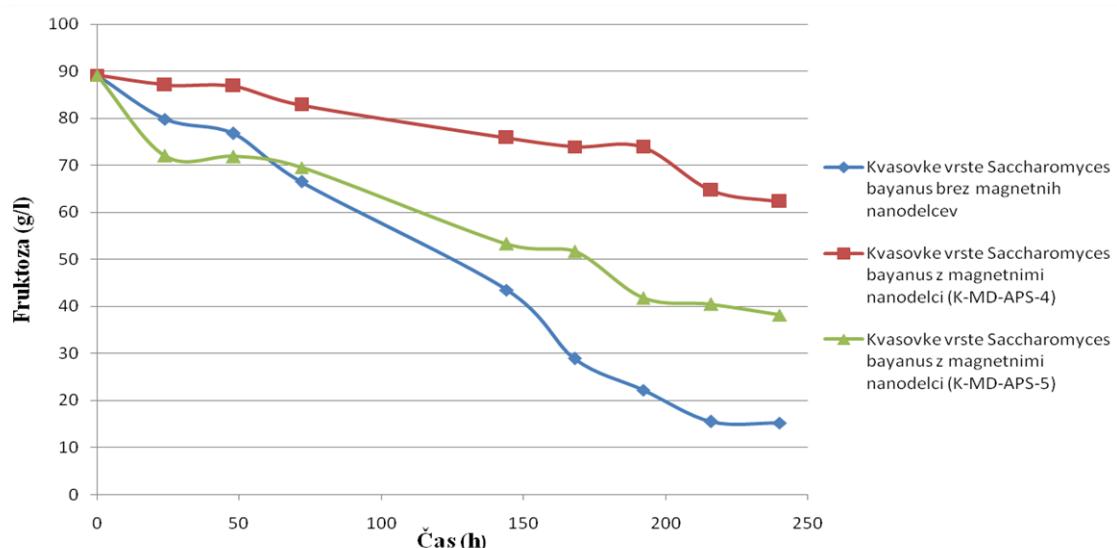
#### 4.2.2.2 K-MD-APS4 in K-MD-APS5

##### 4.2.2.2.1 Dinamika porabe sladkorjev

Slike 23 in 24 nam predstavljata porabo sladkorjev glukoze in fruktoze med alkoholno fermentacijo. Hitrost porabe sladkorjev glukoze in fruktoze je večja in bolj intenzivna v vzorcu, kjer niso prisotni magnetni nanodelci. V vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci, ne pride do celotne porabe glukoze in fruktoze. V vzorcu kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci, pripravljene po metodi mešanja s kovinskim mešalom, je večja poraba glukoze in fruktoze, kot pa v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci pripravljene z metodo dodajanja po kapljicah. Hitrost porabe glukoze med alkoholno fermentacijo je nekoliko večja kot pri porabi fruktoze.



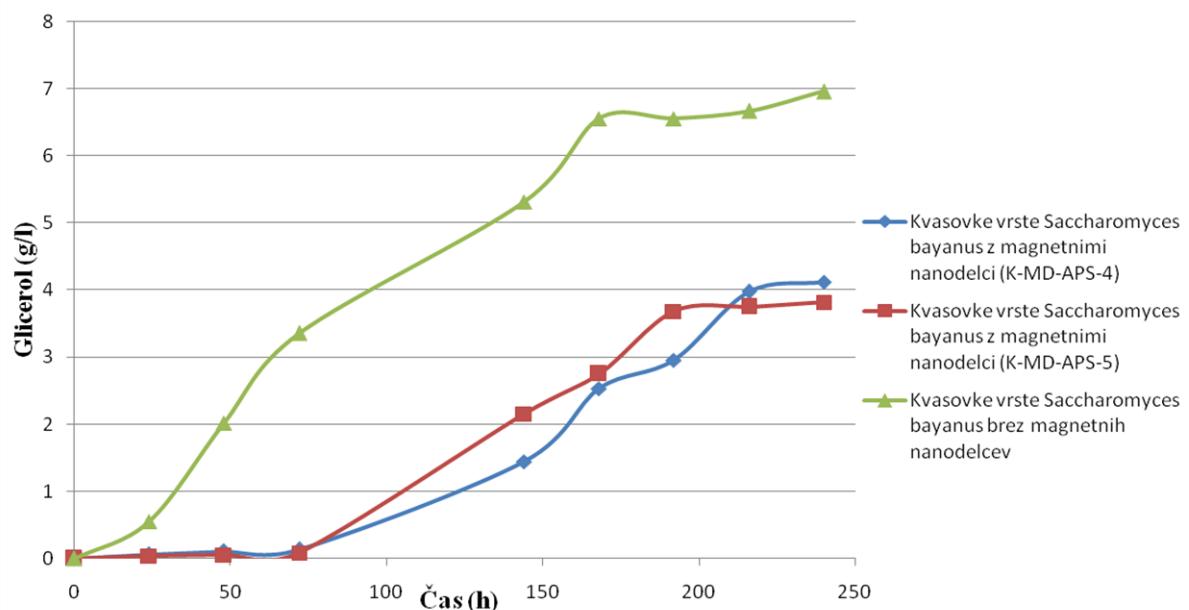
Slika 23: Poraba glukoze med alkoholno fermentacijo pri 18 °C



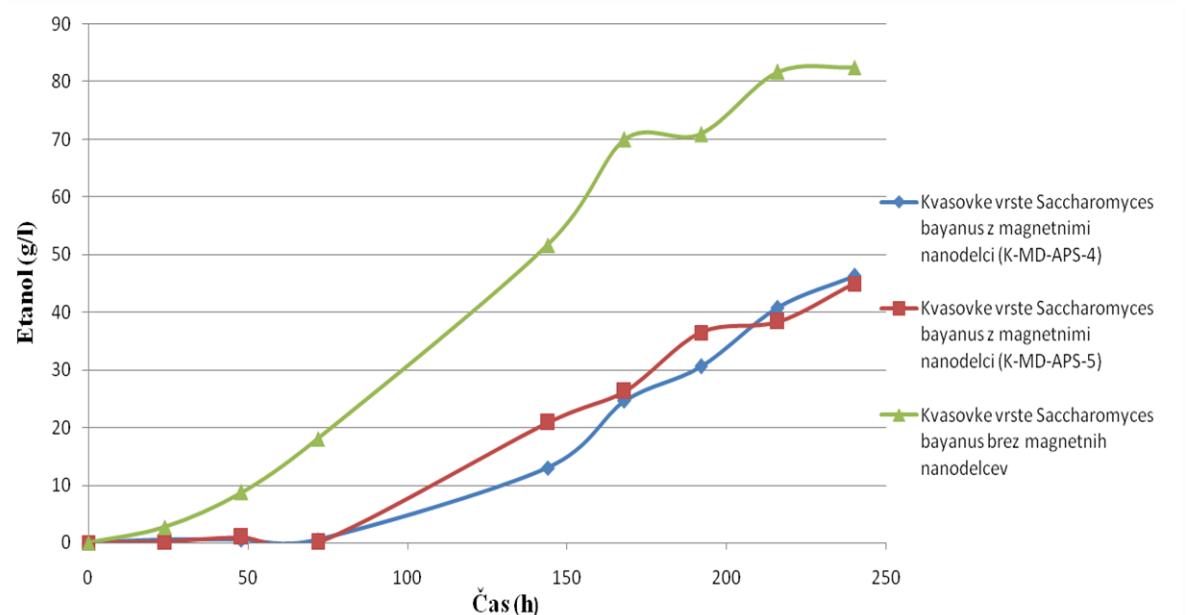
Slika 24: Poraba fruktoze med alkoholno fermentacijo pri 18 °C

#### 4.2.2.2.2 Dinamika tvorbe metabolnih produktov

Iz slik 25 in 26 je razvidno, da magnetni nanodelci vplivajo na nastajanje glicerola in etanola. Producija glicerola in etanola je večja v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Producija glicerola in etanola je približno enaka v vzorcih, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci. Najvišja končna koncentracija glicerola je približno 7 g/l, najvišja končna koncentracija etanola pa je približno 85 g/l.

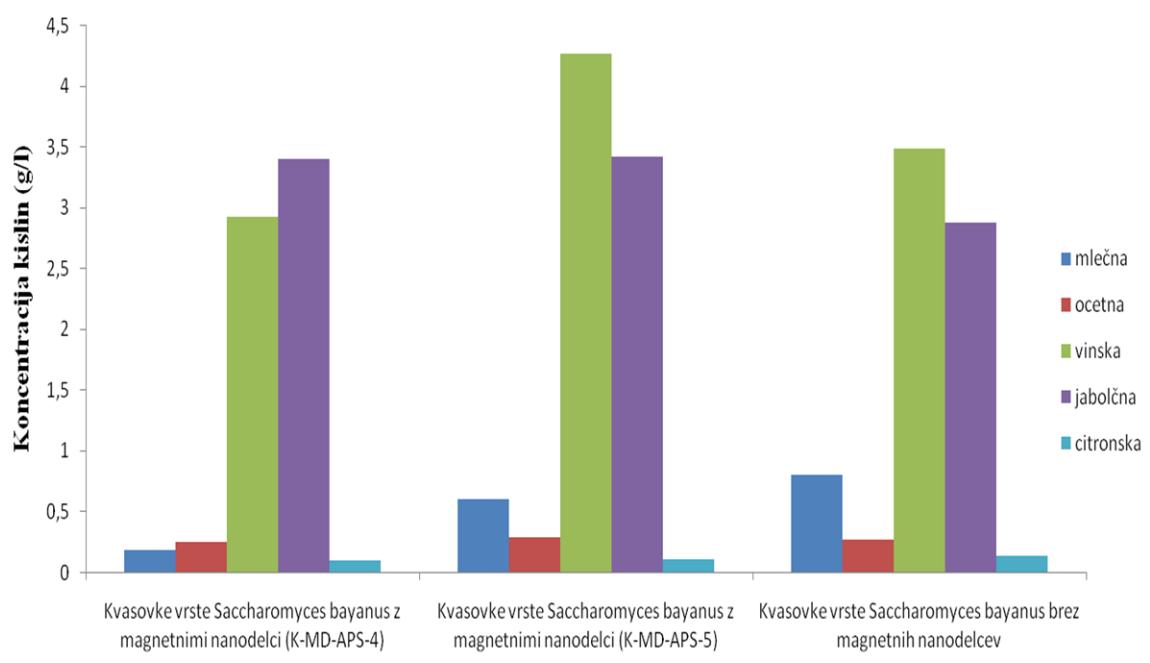


Slika 25: Nastajanje glicerola med alkoholno fermentacijo pri 18 °C



Slika 26: Nastajanje etanola med alkoholno fermentacijo pri 18 °C

Slika 27 nam prikazuje vsebnost kislin ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci in kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Zanimalo nas je, če magnetni nanodelci vplivajo na nastanek in količino kislin med alkoholno fermentacijo. Iz grafa lahko sklepamo, da so ocetna in citronska kislina zastopane v podobnih koncentracijah pri vseh treh vzorcih. Jabolčna kislina je podobno zastopana v vzorcih, kjer so bile dodane kvasovke z magnetnimi nanodelci in povisana v primerjavi z vzorcem, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev. Mlečna kislina je nekoliko povisana v vzorcih, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev, kar vpliva na boljši okus pridelka.

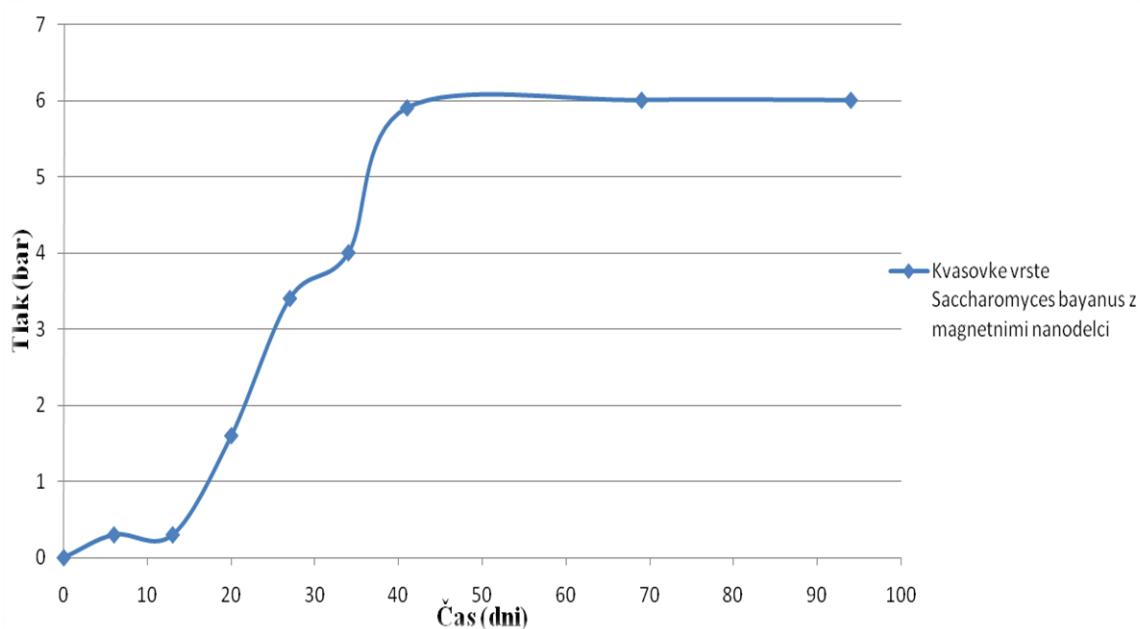


Slika 27: Vsebnost kislin ob koncu alkoholne fermentacij

## 4.3 PRIPRAVA IN ANALIZA PENINE

### 4.3.1 Merjenje tlaka

Iz rezultatov v preglednici 2 in iz slike 28 je razvidno, da tlak (steklenice z masnim razmerjem 1: 10) narašča in doseže tlak okoli 6 barov. Iz tabele 2 je tudi razvidno, da je tlak po koncu fermentacije enak v vseh steklenicah. Se pravi, da ni razlik med steklenicami, v katerih so bila različna masna razmerja magnetnih nanodelcev in kvasovk. Iz rezultatov lahko sklepamo, da količina nanodelcev pri nastajanju tlaka ni pomembna.



Slika 28: Dinamika naraščanja tlaka v steklenicah z masnim razmerjem 1: 10

Preglednica 2: Prikaz podatkov o izmerjenem tlaku v vzorcu pred odpiranjem

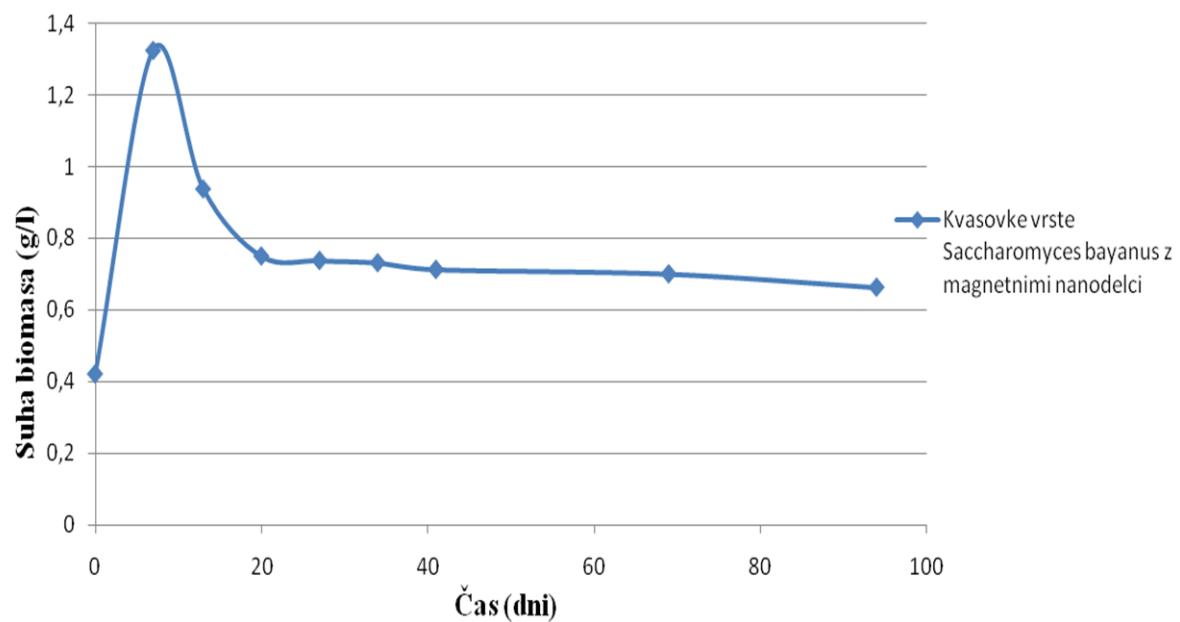
Št. vzorca	Masno razmerje (kvasovke: MD-APS)	Čas (dni)	Tlak (bar)
S3	1:10	6	0,3
S6	1:10	13	0,3
S7	1:10	20	1,6
S8	1:10	27	3,4
S5	1:10	34	4,0
S9	1:10	41	5,9
S17	1:10	69	nad 6
S4	1:10	94	nad 6
S1	1:10 (liof.)	94	nad 6
S11	1:3	94	6
S13	1:50	94	nad 6
S15	1:100	94	nad 6
S21	/	94	6

#### 4.3.2 Merjenje suhe biomase

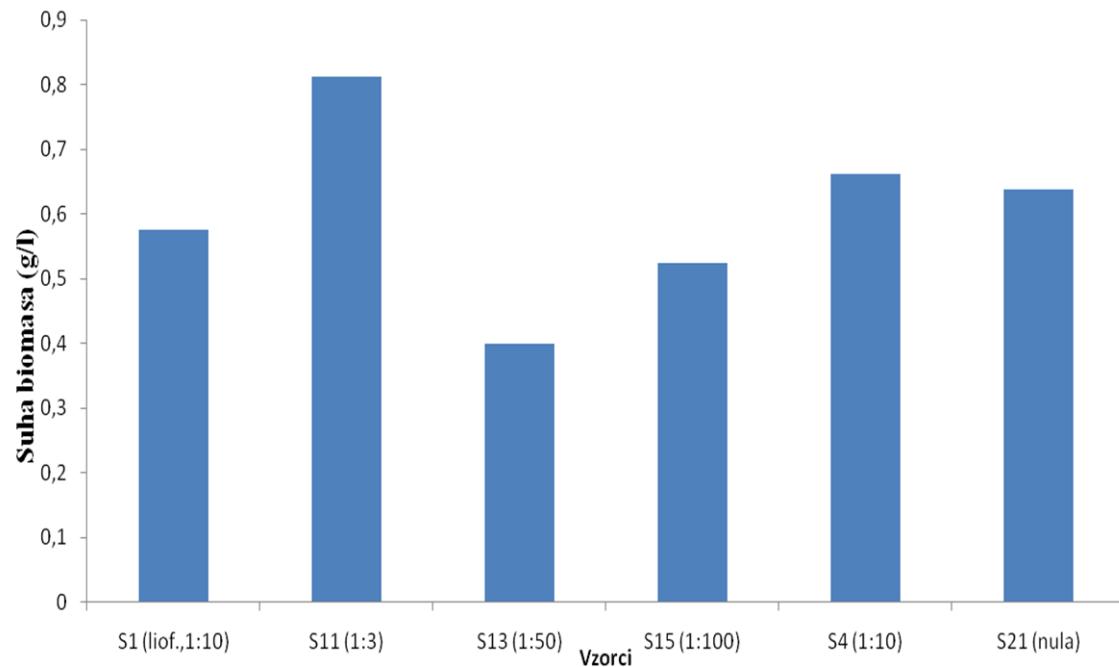
Na sliki 29 je prikazan potek spremembe koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo v vzorcih, kjer so bile dodane kvasovke in magnetni nanodelci v razmerju 1:10. Slika 30 prikazuje, kolikšna je bila koncentracija suhe biomase v vzorcu z različnim masnim razmerjem magnetnih nanodelcev in kvasovk ob koncu fermentacije. Iz njega opazimo, da je koncentracija suhe biomase podobna v vzorcu, kjer je bilo masno razmerje kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:10, v primerjavi s kontrolno penino (nula), katera ni vsebovala magnetnih nanodelcev. V vzorcih z drugačnim masnim razmerjem, pa koncentracija suhe biomase ni podobna, v primerjavi s kontrolno penino, katera ni vsebovala magnetnih nanodelcev.

Koncentracije suhe biomase v različnih vzorcih so prikazane v preglednici 3.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da magnetni nanodelci vplivajo na koncentracijo suhe biomase ob koncu fermentacije, če niso v pravem masnem razmerju s kvasovkami.



Slika 29: Potek spremembe koncentracije suhe biomase med alkoholno fermentacijo



Slika 30: Koncentracije suhe biomase v steklenicah z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev ob koncu alkoholne fermentacije

Preglednica 3: Prikaz podatkov vsebnosti suhe biomase v vzorcih

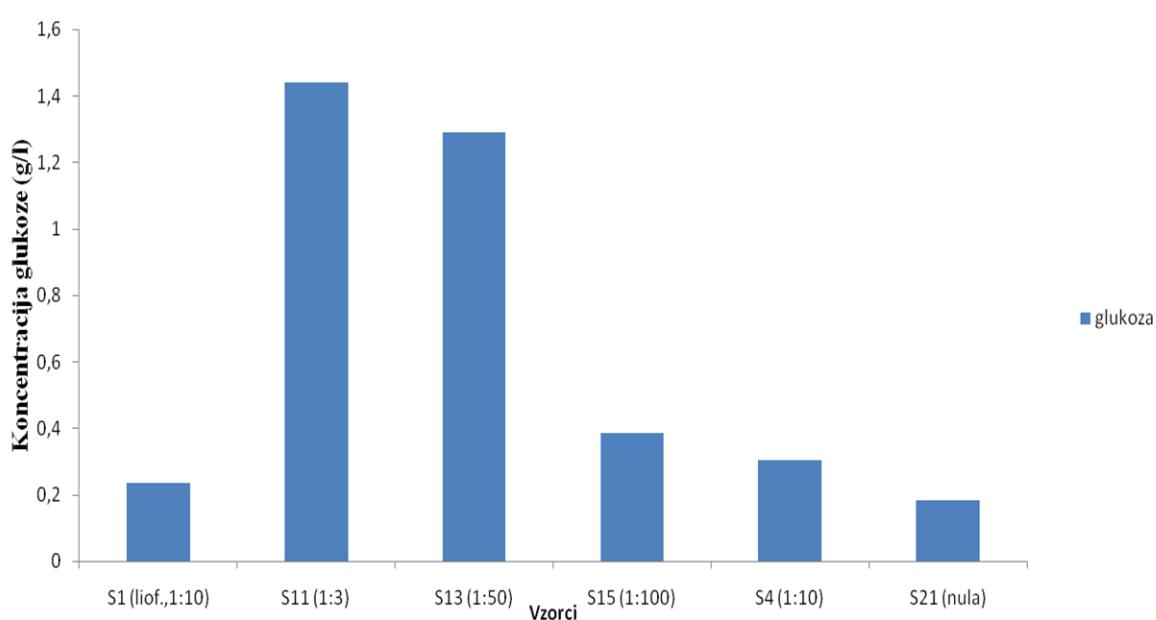
Št. vzorca	Masno razmerje (kvasovke: MD-APS)	Čas (dni)	Suha biomasa (g/l)
S3	1:10	6	1,33
S6	1:10	13	0,94
S7	1:10	20	0,75
S8	1:10	27	0,74
S5	1:10	34	0,73
S9	1:10	41	0,71
S17	1:10	69	0,70
S4	1:10	94	0,66
S1	1:10 (liof.)	94	0,64
S11	1:3	94	0,81
S13	1:50	94	0,4
S15	1:100	94	0,53
S21	/	94	0,64

#### 4.3.3 HPLC analiza

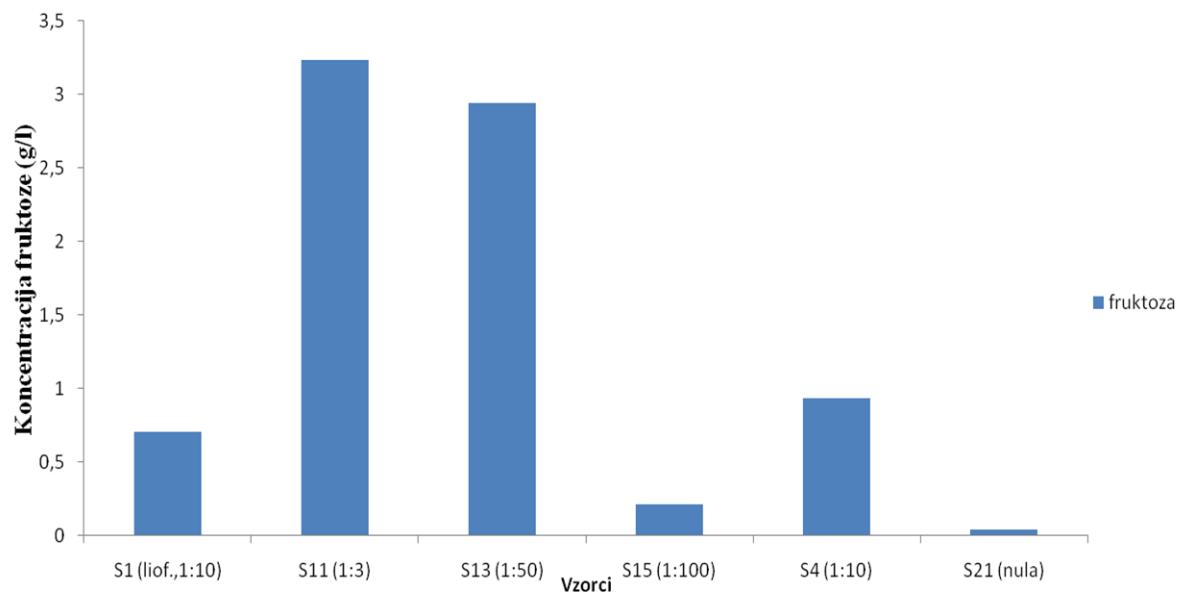
Na slikah 31 in 32 sta prikazani koncentraciji glukoze in fruktoze ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev v primerjavi s kontrolno penino, katera ni vsebovala magnetnih nanodelcev. Koncentracija glukoze in fruktoze je bila v vseh vzorcih višja v primerjavi s kontrolo. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da magnetni nanodelci vplivajo, da se glukoza in fruktoza ne pretvorita v primarne in sekundarne metabolite.

Na sliki 33 je prikazana koncentracija glicerola ob koncu alkoholne fermentacije, v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev primerjavi s kontrolno penino, katera ni vsebovala magnetnih nanodelcev. Koncentracija glicerola je bila v vseh vzorcih nižja v primerjavi s kontrolo. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da magnetni nanodelci vplivajo na manjšo tvorbo glicerola.

Na sliki 34 je prikazana koncentracija etanola ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev v primerjavi s kontrolno penino, katera ni vsebovala magnetnih nanodelcev. Koncentracija etanola je bila podobna v vzorcih z masnim razmerjem 1:10 in 1:100 v primerjavi s kontrolo. V preostalih vzorcih pa je bila koncentracija etanola nižja. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da magnetni nanodelci vplivajo na manjšo tvorbo etanola.



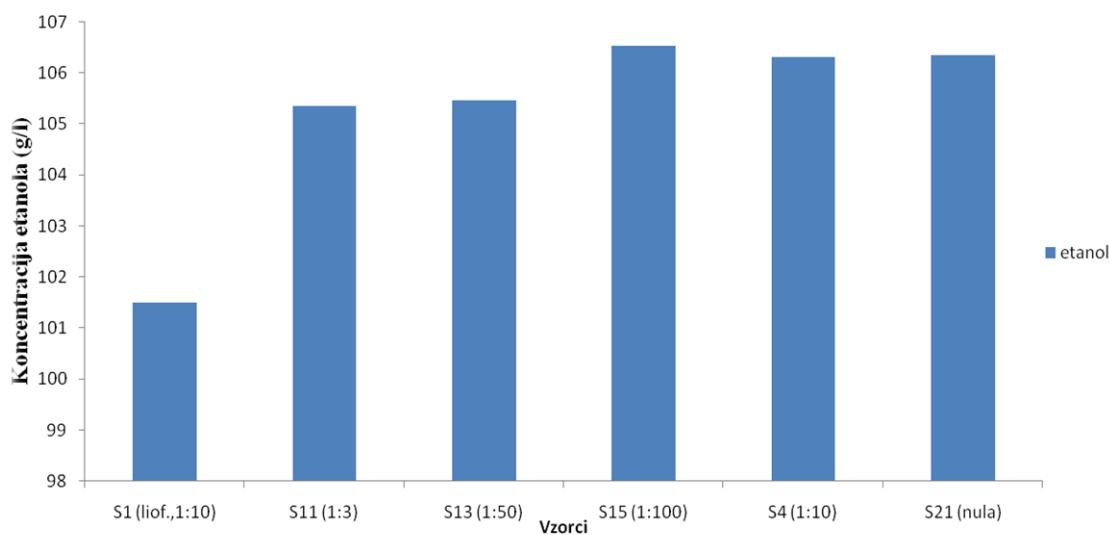
Slika 31: Koncentracija glukoze ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev



Slika 32: Koncentracija fruktoze ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev

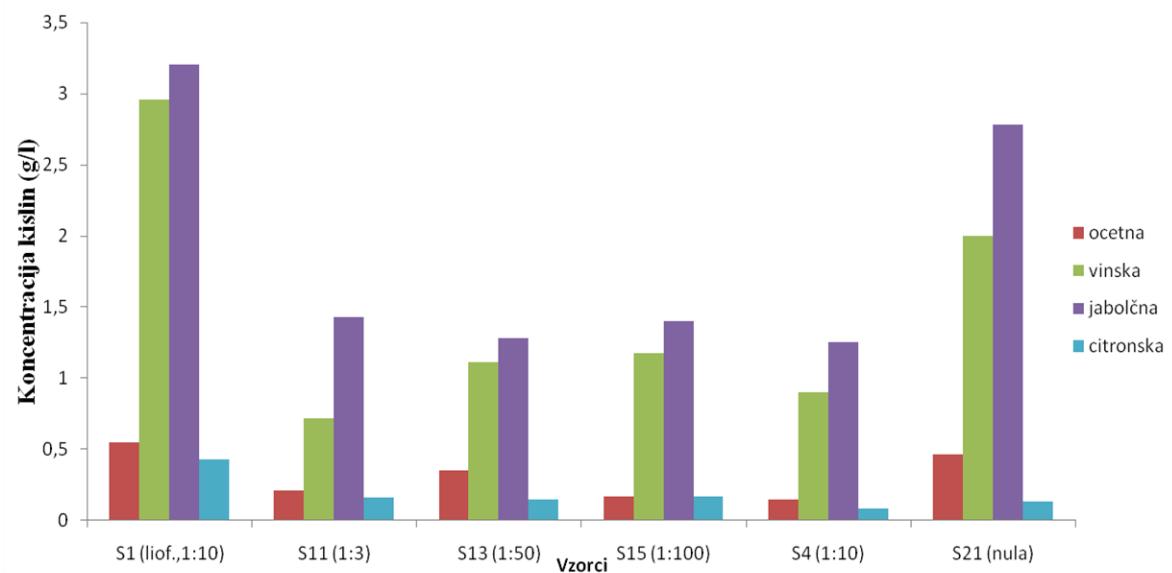


Slika 33: Koncentracija glicerola ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev



Slika 34: Koncentracija etanola ob koncu alkoholne fermentacije v vzorcih z različnim masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev

Slika 35 nam prikazuje vsebnost kislin v peninah z različnimi masnimi razmerji med kvasovkami in magnetnimi nanodelci, vključno z nulto (kontrolno), ki ni vsebovala magnetnih nanodelcev. Zanimalo nas je, če prisotnost magnetnih nanodelcev vpliva na nastanek kislin v penini. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je citronska kislina zastopana v podobnih koncentracijah, pri vseh vzorcih, razen pri vzorcu S1. Vsebnost mlečne kisline je zastopana v manjših koncentracijah v primerjavi s kontrolo, razen v vzorcu S13. Ocetna in jabolčna kislina sta zastopani v podobni koncentraciji samo pri vzorcu S1, v primerjavi s kontrolo, v preostalih vzorcih pa je koncentracija ocetne in jabolčne kisline nižja. Vinska kislina se razlikuje v vseh vzorcih, v primerjavi s kontrolo.

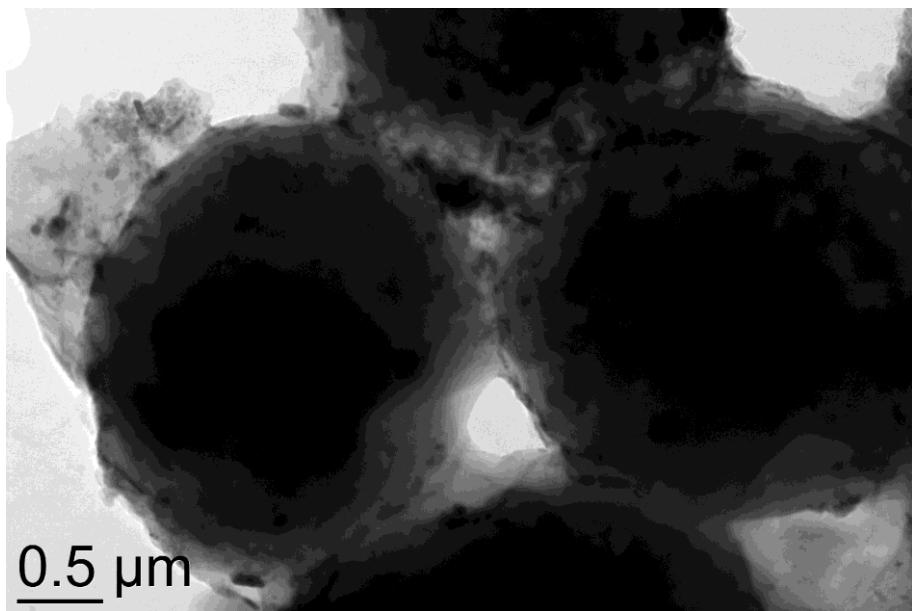


Slika 35: Vsebnost kislin v penini

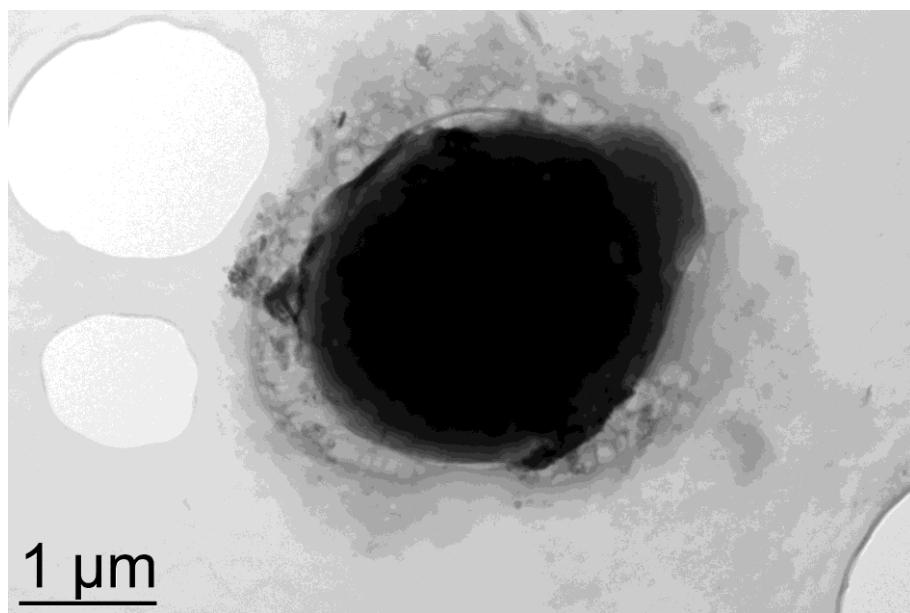
#### 4.3.4 TEM analiza

Po 69 dneh je bila narejena TEM analiza sedimenta v vzorcu S17. Pri namagnetenuju kvasovk za ta vzorec smo uporabili masno razmerje med kvasovkami in magnetnimi nanodelci 1:10. Na TEM sliki 36 se vidi, da so kvasovke v obliki večjih skupkov. Na kvasovkah so jasno vidni temnejši nanodelci anizotropnih oblik. Okoli kvasovk je venec amorfnega materiala, v katerem so pogosti slabo kristalinični nanodelci velikosti od nekaj 10 nm do več 100 nm (sliki 37 in 38). Amorfni material je verjetno večinoma sestavljen iz kalijevega tartrata.

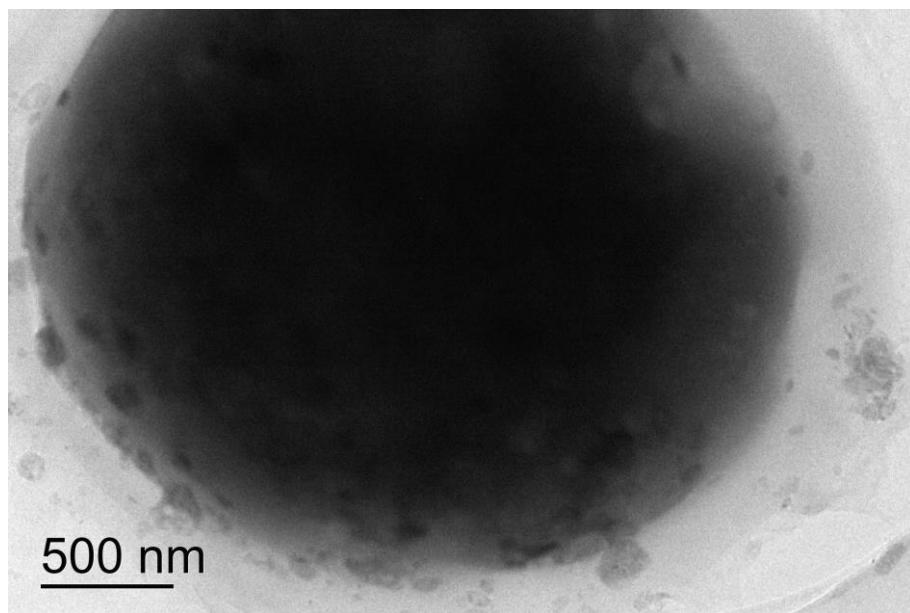
Podrobnejša analiza nanodelcev, prisotnih na in ob kvasovkah je pokazala, da ne gre za maghemitne nanodelce uporabljeni za namagneteno. EDS analiza sicer pokaže prisotnost železa, vendar pa se njihova morfologija in kristalna struktura ne ujema z nanodelci MD-APS. Zelo verjetno je prišlo do spremembe nanodelcev zaradi njihovega raztplavljanja v vinu. Železov oksid maghemit je sicer topen v mineralnih kislinah, pri nizkih vrednostih pH. Na primer, raztplavljanje je zelo počasno še pri vrednostih pH okoli 2 (Kralj in sod., 2010), zato raztplavljanja v vinu, kjer je pH 3,2, nismo pričakovali. Vendar pa imajo na raztplavljanje železovega oksida očitno velik vpliv organske kisline, ki so zelo dobri kompleksanti, ki z  $\text{Fe}^{3+}$  ioni tvorijo stabilne komplekse. To je očitno privedlo do delnega raztplavljanja magnetnih nanodelcev in s tem izgube magnetnih lastnosti namagnetene kvasne biomase.



Slika 36: TEM slika skupka kvasovk z magnetnimi nanodelci po koncu sekundarne fermentacije



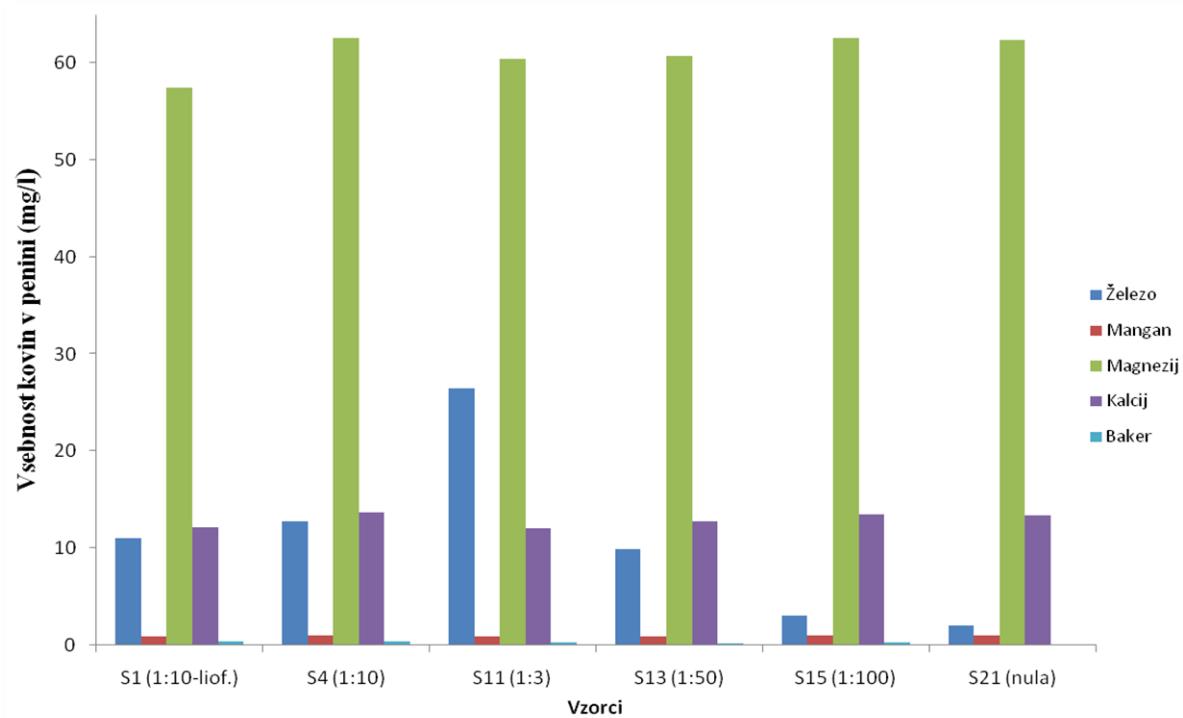
Slika 37: TEM slika kvasovke z magnetnimi nanodelci po koncu sekundarne fermentacije (manjša povečava)



Slika 38: TEM slika kvasovke z magnetnimi nanodelci po koncu sekundarne fermentacije (večja povečava)

#### 4.3.5 Analiza kovinskih ionov

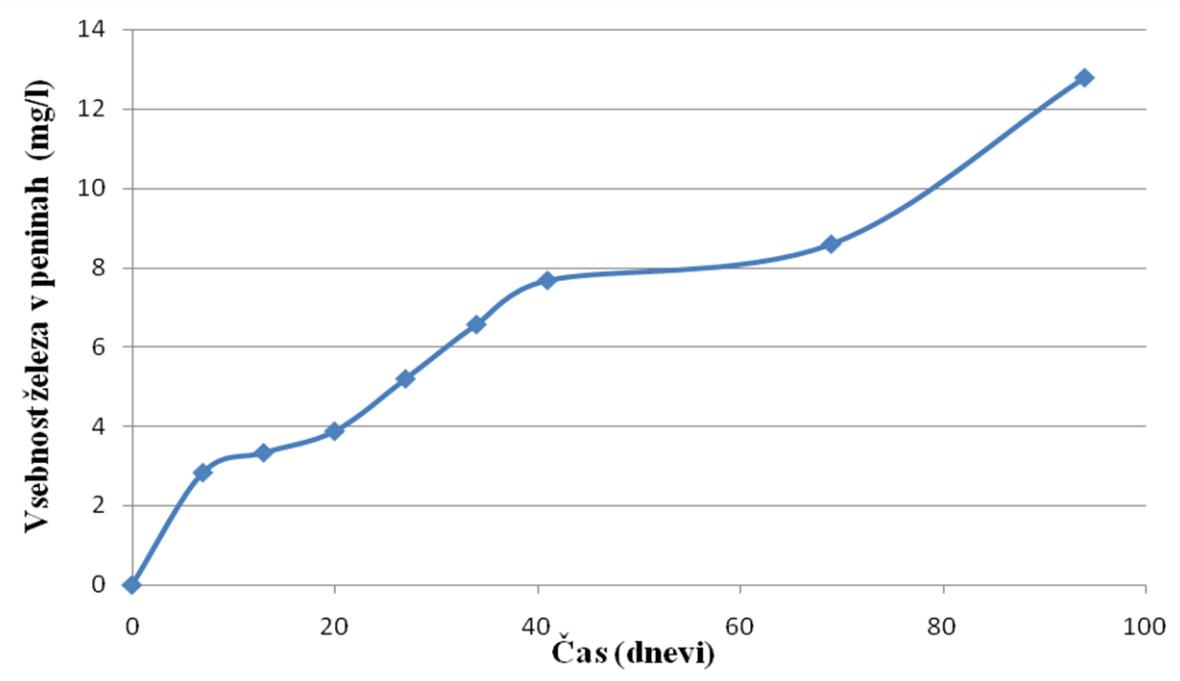
Da bi potrdili raztpljanje magnetnih nanodelcev med sekundarno fermentacijo vina, smo opravili tudi analizo kovinskih ionov v vinu. Trdno snov smo ločili od penine s filtracijo in ultracentrifugiranjem. Za primerjavo smo imeli kontrolno penino (nula). Slika 39 nam prikazuje vsebnost nekaterih kovinskih ionov v penini. Slika 40 nam prikazuje vsebnost železovih ionov v peninah. Iz obeh grafov je razvidno, da se različni vzorci razlikujejo predvsem po vsebnosti železovih ionov. Vsebnost železa je bila največja v vzorcu S11, kjer je bilo izhodno masno razmerje kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:3. Najmanjša vsebnost železa pa je bila v vzorcu S15, kjer je masno razmerje kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:100. Rezultat jasno potrjuje, da se maghemitni nanodelci po daljšem času raztpljajo v vinu. Iz slike 41 je tudi razvidno, da se vsebnost železa v penini z masnim razmerjem 1:10, povečuje tekom fermentacije, verjetno zato, ker se magnetni nanodelci raztpljajo v penini.



Slika 39: Vsebnost nekaterih kovin v penini (ob koncu sekundarne fermentacije)



Slika 40: Vsebnost železa v zreli penini (ob koncu sekundarne fermentacije)



Slika 41: Vsebnost železa v penini z masnim razmerjem kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:10 med sekundarno fermentacijo

## 5 SKLEPI

- V magistrski nalogi smo preučevali pripravo kvasovk, obdanih z maghemitnimi magnetnimi nanodelci, ki smo jih nato uporabili v primarni in sekundarni fermentaciji, ter ob tem študirali njihov vpliv na kinetiko metabolizma.
- Pri pripravi kvasovk, obdanih z magnetnimi nanodelci smo ugotovili, da je najprimernejši način *namagnetenja* z intenzivnim mešanjem suspenzije kvasovk in suspenzije magnetnih nanodelcev v razmerju kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:10. Po absorpciji nanodelcev na kvasovke te magnetno izločimo iz suspenzije.
- Ugotovili smo, da v primarni in sekundarni fermentaciji magnetni nanodelci vplivajo na kinetiko alkoholne fermentacije. Ugotovili smo, da upočasnijo in zmanjšajo kinetiko alkoholne fermentacije. Hitrost porabe sladkorjev je v primarni in sekundarni fermentaciji manjša in manj intenzivna. Magnetni nanodelci upočasnijo in zmanjšajo produkcijo etanola in glicerola.
- Magnetni nanodelci vplivajo na sproščanje CO<sub>2</sub> v primarni fermentaciji, saj je manj intenzivno, ni pa razlike v doseženem končnem tlaku v sekundarni fermentaciji.
- V sekundarni fermentaciji (tehnologija penečih vin) smo uporabili različna masna razmerja med kvasovkami in magnetnimi nanodelci (MD-APS). Ugotovili smo, da višja koncentracija nanodelcev vpliva na manjše končne koncentracije glicerola in etanola oziroma večje končne koncentracije glukoze in fruktoze.
- Ugotovili smo, da so v primarni fermentaciji ocetna, citronska in jabolčna kislina podobno zastopane. Vinska kislina v kontrolnem vzorcu, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev, je edina ostala praktično nespremenjena. Prav tako je mlečna kislina nekoliko povišana v vzorcih, kjer so bile dodane kvasovke brez magnetnih nanodelcev, kar vpliva na boljši okus pridelka.
- V sekundarni fermentaciji je citronska kislina zastopana v podobnih koncentracijah, pri vseh vzorcih, razen pri vzorcu kjer je bilo masno razmerje kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:10. Vsebnost mlečne kisline je zastopana v manjših koncentracijah v primerjavi s kontrolo, razen v vzorcu kjer je bilo masno razmerje kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:50.
- Ocetna in jabolčna kislina sta prisotni v podobni koncentraciji samo pri vzorcu, kjer je bilo masno razmerje kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:10, v primerjavi s kontrolo, v ostalih vzorcih pa sta koncentraciji ocetne in jabolčne kisline nižji. Vinska kislina se razlikuje v vseh vzorcih, v primerjavi s kontrolo.
- Ugotovili smo, da se po nekem času v sekundarni fermentaciji magnetni nanodelci začnejo raztopljalati, tako da maghemitni nanodelci niso primerni za uporabo v tehnologiji penečih vin.

## 6 POVZETEK

V magistrski nalogi smo raziskovali vpliv magnetnih nanodelcev železovega oksida na kinetiko fermentacije. Delo je bilo zasnovano iz treh večjih sklopov.

V prvem sklopu smo pripravili namagnetene kvasovke s postopkom *namagnetenja* z intenzivnim mešanjem suspenzije kvasovk in suspenzije magnetnih nanodelcev. Ugotovili smo da je najprimernejše razmerje kvasovk in magnetnih nanodelcev 1:10. Po absorpciji nanodelcev na kvasovke te magnetno izločimo iz suspenzije. Postopek namagnetenja kvasovk s prebitim dodatkom magnetnih nanodelcev ni primeren, ker prihaja do zamašitve por filtra zaradi visoke koncentracije suspenzije MD.

Namagnetene kvasovke smo nato preizkušali v primarni in v sekundarni fermentaciji (drugi in tretji sklop). Med potekom primarne in sekundarne alkoholne fermentacije smo izvajali meritve koncentracije suhe snovi, spremljanje tvorbe CO<sub>2</sub> in HPLC analize, določanje koncentracije suhe snovi, magnetnosti kvasovk, ter TEM in SEM analize. Analize so pokazale, da magnetni nanodelci upočasnijo kinetiko alkoholne fermentacije in zmanjšajo produkциjo glicerola in etanola, hitrost porabe sladkorjev pa je manjša in manj intenzivna. Iz rezultatov je vidno da je produkcija glicerola in etanola manjša in manj intenzivna. Ugotovljeno je bilo, da magnetni nanodelci vplivajo na dihanje v primarni fermentaciji, ne vplivajo pa na dihanje v sekundarni fermentaciji. Višja koncentracija nanodelcev zavira kinetiko alkoholne fermentacije.

Analiza kislin v vzorcih ob koncu alkoholne fermentacije je pokazala da imajo magnetni nanodelci manjši vpliv na ohranjanje in nastanek kislin. V primarni fermentaciji so ocetna, citronska in jabolčna kislina podobno zastopane, vinska in mlečna pa sta nižji. V sekundarni fermentaciji je mlečna kislina večinoma zastopana v manjših koncentracijah v primerjavi s kontrolo, ocetna in jabolčna kislina je zastopana v podobni koncentraciji v primerjavi s kontrolo, vinska kislina pa se razlikuje v vseh vzorcih v primerjavi s kontrolo.

Iz rezultatov, lahko sklepamo, da se po določenem času v sekundarni fermentaciji magnetni nanodelci začnejo raztapljati, zato niso primerni za uporabo v tehnologiji penečih vin.

## 7 VIRI

- Buxaderas S., López Tamames E. 2003. Production of sparkling wines. V: Encyclopedia of food Sciences and nutrition. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.) Oxford, Academic Press: 6203-6209
- Baumes R. 2009. Wine aroma precursors. V: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. (eds.). New York, Springer Science Business Media: 251-265
- Bavčar D. 2006. Kletarjenje danes. Ljubljana, Kmečki glas: 286 str.
- Bidovec V. 1989. Okratoksinogene glice in razgradnja okratoksiна-A z mikrovalovi. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 232 str.
- Boškovič S. 2010. Uporaba magnetnih nanodelcev za separacijo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v alkoholni fermentaciji. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Kemijsko inženirstvo: 81 str.
- Boulton B.R., Singleton L.V., Bisson F.L., Kunkee E.R. 1996. Florence, yeast and biochemistry of ethanol fermentation. V: Principles and practices of winemaking. 2nd ed. New York, Springer: 102-181
- Eglinton, J. M., Buckingham, L., Henschke, P. A. 1993. Increased volatile acidity of white wines by chemical vitamin mixtures is grape juice dependent. V: Proceedings of the 8th Australian Wine Industry Technical Conference, 25–29 Oct., 1992, Melbourne. Victoria Stockley C. S., Johnstone P. A., Leske P. A., Lee T. H. (eds.). Adelaide, Winetitles: 197-198
- Fair JD., Kormos CM. 2008. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. Journal of Chromatography A, 1211, 1-2: 49-54
- Fleet G.H. 1991. Cell walls, the yeast. V: Yeast organelles. Vol. 4. 2<sup>nd</sup> ed. Rose A.H., Harisson J.S. (eds.). London, Academic Press: 194-264
- Guerin B. 1991. Mitochondria, The yeast. V: Yeast Organelles. Vol. 4. 2<sup>nd</sup> ed. Rose A.H., Harisson J.S. (eds.) London, Academic Press: 541-600
- Hafeli U., Schutt W., Teller J., Zborowski M. 1997. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. New York, Plenum Press: 596 str.
- Jackson R.S. 2008. Fermentation. V: Wine science principles and applications. 3<sup>rd</sup> ed. Jackson R.S. (ed.). London, Academic Press: 333-418
- Košmerl T. 2007. Alkoholna fermentacija mošta: izbrana poglavja pri predmetu tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.

Kralj S., Makovec D., Čampelj S., Drofenik M. 2010. Producing ultra-thin silica coatings on iron-oxide nanoparticles to improve their surface reactivity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322: 1847–1853

Laffort J.F., Romat H., Darriet. P. 1989. Les levures et l'expression aromatique des vins blancs. *La Revue des Oenologues*, 53: 9–12

Lee C.Y., Smith N.L., Nelson R.R. 1979. Relationship between pectin methylesterase activity and the formation of methanol in concord grape juice and wine. *Food Chemistry*, 4: 143-148

Liger-Belair G. 2012. Visual perception of effervescence in champagne and other sparkling beverages. *Advances in Food and Nutrition Research*, 61: 1-55

Makovec D. 2009. Uporaba magnetnih nanodelcev v medicini. *Življenje in tehnika*, 9: 36-41

Makovec D., Sajko M., Selišnik A., Drofenik M. 2011. Magnetically recoverable photocatalytic nanocomposite particles for water treatment. *Materials Chemistry and Physics*, 129: 83-89

Mini fermentor. 2014. Minneapolis, Northern Brewer, LLC.: 1 str.

<http://www.northernbrewer.com/shop/raise-your-game-secondary-fermentor-glass.html> (maj 2014)

Peberdy J.F. 1989. Fungi without coats--protoplasts as tools for mycological research. *Mycological Research*, 93: 1-20

Rentzsch M., Wilkens A., Winterhalter P. 2009. Non-flavonoid phenolic compounds. V: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds.). New York, Springer Science Business Media: 509-521

Remškar, M. 2009. Nanodelci in nanovarnost. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje, Urad RS za kemikalije: 103 str.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Don`eche B., Lonvaud A. 2006. The Microbiology of wine and vinifications. V: Handbook of enology. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Branco M.J., Jr. (ed.). West Sussex, John Wiley & Sons Ltd.: 4-241

Roufet, M., Bayonove, C. L., Cordonnier, R. E. 1986. Changes in fatty acids from grape lipidic fractions during crushing exposed to air. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37: 202–205

Rose A.H. 1993. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. *Journal of Applied Microbiology*, 74: 110–118

Sanz M.L., Castro I.M. 2009. Carbohydrates. V: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds.). New York, Springer Science Business Media: 231-246

Schwenke J. 1991. Vacuole, internal membraneous systems and vesicles, the yeast. V: Yeast organelles. Vol. 4. 2<sup>nd</sup> ed. Rose A.H., Harisson J.S. (eds.). London, Academic Press: 347-755

Stevenson T. 2003. World encyclopedia of champagne sparkling wine. 2<sup>nd</sup> ed. San Francisco, Absolute Press: 351 str.

Šikovec S. 1993. Vinarstvo. Od grozdja do vina. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 283 str.

Šikovec S. 1996. Vino pihača doživetja. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 317 str.

Tanaka A., Ueda M. 1993. Assimilation of alkanes by yeasts: functions and biogenesis of peroxisomes. Mycological Research, 97: 1025–1044

Thanh T.K.N. 2012. Magnetic nanoparticles: from fabrication to clinical applications. Broken Sound Parkway, CRC Press: 548 str.

Torresi S., Teresa Frangipane M., Anelli G. 2011. Biotechnologies in sparkling wine production: interesting approaches for quality improvement. Food Chemistry, 129: 1232-1241

Visser W., Van Spronsen E.A., Nanninga N., Pronk J.T., Kuenen G.J., Dijken J.P. 1995. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek, 67: 243-253

Zinser E., Daum G. 1995. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 11: 493–536

Zoecklein B. 2002. A review of méthode champenoise production. Virginia, Virginia Cooperative Extension: 28 str.

Yair M. 2004. Must and wine composition. V: Concepts in wine chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Margalit Y., Crum J. D. (eds.). San Francisco, Wine Appreciation Guild: 11-20

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Marinu Beroviču iz Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, ki mi je omogočil izdelavo magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi asistentom na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo za vso pomoč pri izvajanju praktičnega dela, še posebej dr. Matjažu Berlotu, za vso pomoč in usmerjanje pri izvajanju poskusov.

Zahvaljujem se tudi somentorju prof. dr. Darku Makovcu iz Instituta »Jožef Stefan«. Hvala za sprejem na Institut in omogočanje dela v laboratoriju. Hvala tudi za nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvala gre tudi ostalim delavcem Instituta »Jožef Stefan« na odseku za raziskave sodobnih materialov.

Zahvala gre tudi recenzentki prof. dr. Tatjani Košmerl iz Biotehniške fakultete, za hiter pregled naloge ter za vse ostale nasvete in pomoč.

Nenazadnje pa gre največja zahvala mojim staršem in ostali družini, ki so mi študij omogočili, ter punci Miši za podporo in vzpodbudne besede.