



raziskovalna naloga

**Vpliv kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*
in *Saccharomyces boulardii* na potek
alkoholne fermentacije jabolčnega vina**

druga področja (živilstvo)

Avtorji: Žan ŠUBIC, Ela ZAKOLAR, Neža BOGATAJ

Mentor: TADEJA POLAJNAR, univ. dipl. inž. živ. teh.

Strahinj, marec 2025

I KAZALO (VSEBINE)

I KAZALO (VSEBINE).....	I
II KAZALO SLIK.....	II
III KAZALO GRAFOV.....	II
IV KAZALO TABEL.....	II
Zahvala.....	III
Povzetek.....	IV
Abstract.....	IV
1 UVOD.....	1
2 TEORETIČNI DEL.....	1
2.1 Jabolčno vino.....	1
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
2.3 <i>Saccharomyces boulardii</i>	2
2.4 Alkoholna fermentacija.....	2
2.5 Probiotiki.....	3
2.6 Senzorična analiza.....	3
3 RAZISKOVALNI DEL.....	3
3.1 CILJI IN HIPOTEZE.....	3
3.2 METODOLOGIJA.....	3
3.2.1 Opis vzorca raziskave.....	3
3.2.2 Opis postopka zbiranja podatkov.....	5
3.2.2.1 Določanje števila kvasovk.....	6
3.2.2.2 Določanje vsebnosti alkohola z ebulioskopom.....	7
3.2.2.3 Določanje vsebnosti sladkorja z refraktometrom.....	7
3.2.2.4 Določanje pH vrednosti s pH metrom.....	8
3.2.2.5 Določanje temperature s termometrom.....	9
3.2.2.6 Senzorično ocenjevanje.....	9
3.3 REZULTATI IN INTERPRETACIJA.....	9
3.3.1 Spremljanje števila kvasovk med fermentacijo.....	9
3.3.2 Spremljanje nastanka alkohola med fermentacijo.....	10
3.3.3 Spremljanje vsebnosti sladkorja med fermentacijo.....	10
3.3.4 Spremljanje vrednosti pH.....	11
3.3.5 Spremljanje temperature.....	12
3.3.6 Spremljanje števila živih kvasovk med fermentacijo in po fermentaciji z metodo barvanja z metilenskim modrilom.....	12
3.3.7 Senzorična analiza vzorcev.....	16
4 SKLEP.....	18
5 VIRI IN LITERATURA.....	18

II KAZALO SLIK

Slika 1: Fermentativni posodi zamašeni z gumijastima čepoma za zagotavljanje anaerobnih pogojev.	4
Slika 2: Tehtanje dehidriranih kvasovk.	4
Slika 3: Priprava PDA gojišča.	4
Slika 4: Različne razrečitve kvasovk na gojišču.	5
Slika 5: Postopek redčenja vzorca.	6
Slika 6: Neubauerjeva števna komora.	6
Slika 7: Neubauerjeva števna komora (mreža za preštevanje).	7
Slika 8: Ebulioskop.	7
Slika 9: Ročni refraktometer.	8
Slika 10: Digitalni refraktometer.	8
Slika 11: pH meter.	8
Slika 12: Termometer.	9
Slika 13: Dijak med mikroskopiranjem.	14
Slika 14: <i>Saccharomyces boulardii</i> pod mikroskopom.	14
Slika 15: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pod mikroskopom.	14
Slika 16: <i>Saccharomyces boulardii</i> pod mikroskopom.	15
Slika 17: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pod mikroskopom.	15
Slika 18: <i>Saccharomyces boulardii</i> pod mikroskopom.	15
Slika 19: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pod mikroskopom.	15
Slika 20: <i>Saccharomyces boulardii</i> pod mikroskopom.	16
Slika 21: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pod mikroskopom.	16
Slika 22: <i>Saccharomyces boulardii</i> pod mikroskopom.	16
Slika 23: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pod mikroskopom.	16
Slika 24: <i>Saccharomyces boulardii</i> pod mikroskopom.	17
Slika 25: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pod mikroskopom.	17

III KAZALO GRAFOV

Graf 1: Število kvasovk.	10
Graf 2: Spremljanje nastanka alkohola.	10
Graf 3: Sprememba količine sladkorja pri alkoholni fermentaciji <i>Saccharomyces boulardii</i> .	
Graf 4: Sprememba količine sladkorja med alkoholnim vrenjem pri <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	11
Graf 5: Primerjava porabe sladkorja pri <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>Saccharomyces boulardii</i> .	11
Graf 6: Spremljanje vrednosti pH.	12
Graf 7: Razlika v temperaturi.	12
Graf 8: Spremljanje števila živih kvasovk.	13

IV KAZALO TABEL

Tabela 1: Senzorična analiza vzorcev.	17
---------------------------------------	----

Zahvala

Zahvalili se bi radi naši mentorici Tadeji Polajnar za strokovno podporo pri načrtovanju in izvajanju naloge.

Zahvaljujemo se tudi laborantom Nejcju Gubancu in Meti Žefran za pomoč pri uporabi in pripravi laboratorijske opreme.

Zahvalo pa tudi Biotehniškem centru Naklo za možnost uporabe laboratorija in za priskrbo potrebnih materialov, jabolčnega soka ter pripomočkov, ki smo jih potrebovali pri raziskovanju.



Povzetek

Jabolčni sok smo fermentirali s pomočjo dveh vrst kvasovk: *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces boulardii*. Za poskus smo uporabili v šoli pridelan jabolčni sok, ki je bil predhodno pasteriziran in filtriran. Sok smo še dodatno sterilizirali v avtoklavu in s tem poskrbeli za uničenje vseh prisotnih mikroorganizmov in njihovih spor. Po sterilizaciji smo poskus izvedli v dveh paralelkah, z enako količino jabolčnega soka in različnim dodatkom kultur kvasovk. Fermentacijski posodi smo zaprli z gumijastima zamaškoma, skozi katera je bila povezana cevka, ki je neposredno vodila v drugo posodo z vodo. S tem smo omogočili nastanek anaerobnega okolja, primernega za potek alkoholnega vrenja. Med potekom same fermentacije, smo vsakih nekaj dni spremljali naslednje parametre: vsebnost sladkorja, vrednost pH, vsebnost alkohola, temperaturo ter število kvasovk (živih in mrtvih). Opazovali smo razliko v številu preživelih celic pri obeh sevih kvasovk. Izkazalo se je, da je bilo že po enem tednu fermentacije, število preživelih kvasovk *Saccharomyces boulardii* večje, kot pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. V naslednjih dneh se je to število vedno manj razlikovalo, saj sta obe vrsti kvasovk počasi odmirali. Po dveh tednih spremljanja parametrov, smo posodi z jabolčnim vinom postavili v hladilnik in po enem mesecu ponovno izvedli primerjave. Ugotovili smo, da se je v jabolčnem vinu z vrsto kvasovk *Saccharomyces boulardii* še vedno pojavilo večje število živih celic, kot pri *Saccharomyces cerevisiae*. Ob koncu poskusa smo s skupino preskuševalcev izvedli še senzorično analizo obeh vzorcev.

Ključne besede: jabolčno vino, fermentacija, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*

Abstract

Apple juice was fermented using two types of yeast: *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. For the experiment, we used apple juice produced at the school, which had been previously pasteurized and filtered. The juice was additionally sterilized in an autoclave, thus ensuring the destruction of all microorganisms and their spores present. After sterilization, the experiment was carried out in two parallel runs, with the same amount of apple juice and different additions of yeast cultures. The fermentation vessels were closed with rubber stoppers, through which a tube was connected, which led directly to another vessel with water. This enabled the creation of an anaerobic environment suitable for the course of alcoholic fermentation. During the course of the fermentation itself, the following parameters were monitored every few days: sugar content, pH value, alcohol content, temperature and the number of yeasts (live and dead). We observed a difference in the number of surviving cells in both yeast strains. It turned out that after just one week of fermentation, the number of surviving *Saccharomyces boulardii* yeasts was higher than that of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. In the following days, this number became less and less different, as both types of yeast slowly died off. After two weeks of monitoring the parameters, we placed the containers with apple wine in the refrigerator and after one month the comparisons were made again. We found that in apple wine with the *Saccharomyces boulardii* yeast species, a higher number of live cells still appeared than with *Saccharomyces cerevisiae*. At the end of the experiment, a group of testers performed a sensory analysis of both samples.

Key words: apple wine, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*

1 UVOD

Jabolčno vino je fermentirana alkoholna pijača, narejena iz jabolčnega soka. Velja za eno najstarejših fermentiranih pijač, ki je še danes zelo priljubljena po svetu in je v zadnjih letih postala dobro prodajana tudi v Sloveniji. Jabolčno vino, imenovano tudi cider, nastane z alkoholno fermentacijo jabolčnega soka, najpogosteje z dodatkom kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Z našo raziskovalno nalogo, smo primerjali potek alkoholnega vrenja jabolčnega soka ob dodatku dveh različnih vrst kvasovk: *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces boulardii*.

Saccharomyces cerevisiae, poznana kot pivska in pekovska kvasovka, spada med enocelične glive in igra pomembno vlogo pri proizvodnji hrane in pijače, poleg tega pa je pogosto del znanstvenih raziskav. Zanj je značilno, da spada med fakultativne anaerobe, kar pomeni da lahko raste in je metabolno aktivna tako v anaerobnih, kot v aerobnih pogojih.

Saccharomyces cerevisiae var. *boulardii* je kvasovka, znana kot probiotična kvasovka. Leta 1984 bila odkrita v indokitajskem tropskem sadežu ličiju. *Saccharomyces boulardii* je sev *Saccharomyces cerevisiae*, ki ga je mogoče razlikovati od drugih sevov iste vrste le po različnih molekularnih kriterijih. Najpogosteje je uporabljena v terapevtske namene, kot prehransko dopolnilo za preprečevanje in zdravljenje nekaterih stanj akutnega in kroničnega črevesnega vnetja.

V poskusu smo raziskovali vpliv kvasovk obeh sevov na alkoholno fermentacijo jabolčnega soka, senzorične razlike nastalih produktov in predvsem možnost preživetja obeh kvasovk v daljšem časovnem obdobju.

(<https://vizita.si/zdravje/prehrana/probiotiki.html>, 21.2.2025)

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Jabolčno vino

Jabolčno vino je fermentirana alkoholna pijača iz jabolčnega soka, ki se je v svetu pojavila že pred 3000 leti, v obdobju Starih Grkov in Rimljanov. Fermentirane pijače so namreč v preteklosti pogosto uživali namesto kontaminirane vode. Jabolčno vino ali cider se pripravi z biotehnološkim procesom alkoholnega vrenja, kjer se sladkor pretvori v etanol.

(<https://www.rtvlo.si/rtv365/arhiv/174929809?s=tv>, 21.2.2025)

2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je ena najbolj raziskanih kvasovk, saj se pogosto uporablja pri proizvodnji alkoholnih pijač in pekovskih izdelkov. Zaradi svoje gospodarske vrednosti velja za enega najpomembnejših mikroorganizmov. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* spada v skupino Ascomycetes, ki vključuje več kot 2000 rodov. Spolno se razmnožuje s sporami (askosporami) v askusih (1–4, ovalne oblike), vendar je ta način za industrijo nezanimiv. Ključno je vegetativno razmnoževanje z brstenjem. V idealnih pogojih cikel delitve kvasovke celice traja dve uri. Celice so ovalne oblike. Industrijski sevi so dobro prilagojeni na stresne pogoje, kot so visoka temperatura, ozmotski pritisk in prisotnost etanola, ki se pojavijo med fermentacijo. Prenesejo visoke koncentracije sladkorja, uspevajo pri nizkem pH ter kljubujejo

protimikrobnim snovem. Med kvasovkami rodu *Saccharomyces* je *S. cerevisiae* najbolj odporna na visoke temperature. Najpogosteje sodeluje pri fermentacijah okrog 18 °C, medtem ko lahko preživi tudi pri temperaturah do 45 °C.

(Skoliber, 2011; Vrhovnik, 2019)

2.3 *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii je znana kot probiotična kvasovka. Leta 1984 so jo odkrili v Indokitajskem tropskem ličiju in jo predstavili kot bioterapevtsko sredstvo. Gre za sorto vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ki se od drugih sevov tega rodu razlikuje le po specifičnih molekularnih značilnostih. Nedavne raziskave so pokazale, da so njene genomske in taksonomske lastnosti bolj sorodne vinskim sevom *S. cerevisiae*. Ta nepatogena kvasovka se že dolgo uporablja peroralno v terapevtske namene kot probiotik, ki je splošno zdravi populaciji na voljo kot prehranski dodatek. Kljub svojim pozitivnim lastnostim, pri proizvodnji funkcionalne hrane za ljudi, ni kaj dostikrat uporabljena. Med živili, ki jih je mogoče fermentirati s to kvasovko, so najbolj omenjeni mlečni izdelki, sadni sokovi, fermentirane pijače, žita, stročnice in podobni izdelki. Raziskave so pokazale, da peroralno uživanje probiotika *S. boulardii* pripomore, k preprečevanju in zdravljenju prebavnih težav kot so driske, sindrom razdražljivega črevesja, kolitis, kronične vnetne črevesne bolezni... Poleg tega pa pomaga pri okužbah, katere povzročajo bakterije *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* in druge, ter pri bolnikih s HIV.

(<https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.14037>, 21.2.2025)

2.4 Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija jabolčnega soka je biokemijski proces, pri katerem glikoliza predstavlja ključno presnovno pot. Glukoza se pretvarja v piruvat, pri čemer nastaja energija v obliki ATP ter različni stranski produkti. Pri razgradnji piruvata za pridobivanje energije ločimo dva presnovna modela:

1. Aerobni proces (dihanje ali respiracija) – tu pride do popolne oksidacije piruvata.

2. Anaerobni proces (vrenje ali fermentacija) – tu pride do pretvorbe piruvata v etanol.

Razgradnja glukoze do piruvata poteka enako v aerobnih kot v anaerobnih pogojih. Med alkoholno fermentacijo jabolčnega soka se reducirajoči sladkorji presnavljajo skozi proces glikolize, pri čemer nastaja piruvat (piruvična kislina), ki predstavlja pomembno stopnjo v procesu alkoholne fermentacije. Sledi dekarboksilacija piruvata, pri čemer se sprošča ogljikov dioksid (CO₂) in nastaja acetaldehid. Ta se nato v zadnji encimski reakciji reducira do etanola. Količina sproščenega CO₂ je kar 40- do 50-krat večja od volumna fermentirajočega mošta. Izkoristek alkoholne fermentacije, ki predstavlja količino etanola glede na porabljeni sladkor, znaša okrog 50 %. Po teoretičnih izračunih se 180 g sladkorja pretvori v 88 g CO₂ in 92 g etanola.

Ob koncu fermentacije se kvasovke in sadna kaša usedeta na dno rezervoarja, kjer tvorita kompaktno plast, ki se nato s pomočjo centrifugiranja izloči iz fermentacijske vsebine. Končna vsebnost alkohola in trajanje fermentacije sta odvisna od količine suhe snovi in aktivnosti kvasovk. Vsebnost alkohola v jabolčnem vinu se lahko razlikuje (od 5 do 8 vol.%), medtem ko fermentacija običajno poteka približno en teden.

(http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/zivilstvo/du2_somrak_eva.pdf, 21.2.2025)

2.5 Probiotiki

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju ravnovesja v prebavnem traktu z neposredno interakcijo z imunskimi celicami. Sama beseda "probiotik" dobesedno pomeni "za življenje". Izraz se po navadi nanaša na koristne žive bakterije v prehranskih dodatkih ali nekaterih obogatenih živilih. Med probiotike najpogosteje uvrščamo seve iz bakterijskih rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, pa tudi nekatere kvasovke, kot je *Saccharomyces boulardii*. Le ti so najpogosteje prisotni v fermentiranih živilih, kot so jogurt, kefir, kruh iz kislega testa, kislo zelje,...

(<https://vizita.si/zdravje/prehrana/probiotiki.html>, 21.2.2025)

2.6 Senzorična analiza

Senzorična analiza je znanost o merjenju in vrednotenju lastnosti živil z enim ali več človeškimi čutili s katerimi se ocenjuje in meri senzorične lastnosti kot so okus, vonj, tekstura, videz.

3 RAZISKOVALNI DEL

3.1 CILJI IN HIPOTEZE

Z raziskovalno nalogo smo si postavili naslednji hipotezi in cilj.

Hipotezi:

- Potek alkoholnih fermentacij obeh kvasovk se ne bo bistveno razlikoval
- Ob koncu fermentacije bo število preživelih kvasovk *Saccharomyces boulardii* višje

Cilj:

- Izdelati jabolčno vino s probiotičnim učinkom

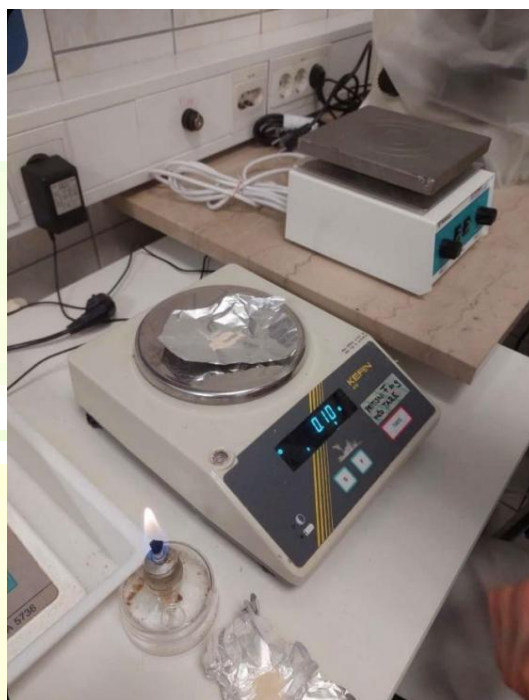
3.2 METODOLOGIJA

3.2.1 Opis vzorca raziskave

Za analizo smo uporabili pasteriziran jabolčni sok proizvajalca Biotehniški center Naklo. Poskus smo izvedli v dveh steklenih posodah, opremljenih z vrelnima vehama, ki sta preprečevali vstop kisika in s tem zagotavljali anaerobne pogoje. V vsako posodo smo dodali enako količino kvasovk.

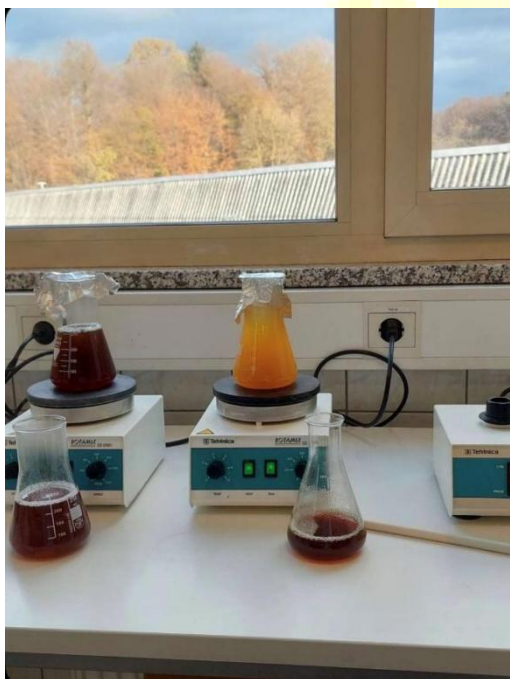


Slika 1: Fermentativni posodi, zamašeni z gumijastimi čepi za zagotavljanje anaerobnih pogojev
Foto: Ela Zalokar (21. 2. 2025)



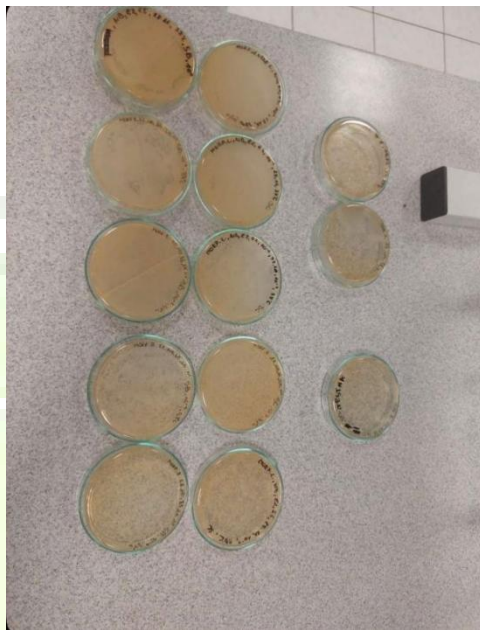
Slika 2: Tehtanje dehidriranih kvasovk
Foto: Ela Zalokar (28. 11. 2024)

Odmerjenih 0,5 g obeh vrst kvasovk smo rehidrirali v 100ml vode. Po rehidraciji, smo izvedli razredčitve 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} in razredčitvev 10^{-4} ter 1 ml vsake redčitve nacepili na PDA gojišča, ki smo jih za 5 dni inkubirali pri 25°C.



Slika 3: Priprava PDA gojišča
Foto: Ela Zalokar (28. 11. 2024)

Po petih dneh inkubiranja, smo primerjali njune morfološke značilnosti (oblika, velikost, barva kolonij) in ugotovili, da se po morfoloških kriterijih ne razlikujeta.



Slika 4: Različne razrečitve kvasovk na gojišču
Foto: Ela Zalokar (3. 12. 2024)

Za pripravo jabolčnega vina smo uporabili 5 g dehidriranih kvasovk in jih rehidrirali v majhni količini soka, nato pa dodali v 2,3 litra steriliziranega jabolčnega soka. Sok smo predhodno sterilizirali v avtoklavu za 30min na 101,3 kPa pri 121°C.

3.2.2 Opis postopka zbiranja podatkov

Fermentacija jabolčnega soka je potekala v laboratoriju s sobno temperaturo. Med samo fermentacijo smo vsake nekaj dni merili naslednje parametre: temperaturo, vsebnost alkohola, vsebnost sladkorja, število kvasovk in pH vrednost. S termometrom smo merili temperaturo jabolčnega soka/vina, z refraktometrom smo merili lomni količnik in posledično količino sladkorja, z ebulioskopom smo odčitali odstotke alkohola. Uporabili smo tudi pH meter in z njim izmerili pH, s pomočjo mikroskopa pa smo prešteli število kvasovk v mililitru substrata. Zbrane podatke smo pregledno zapisovali v razpredelnico, prve meritve smo izvedli 28. 11. 2024, zadnje pa 14. 2. 2025.

Poleg navedenih testov in meritev smo 21. 2. 2025 izvedli tudi test senzoričnih lastnosti. Test smo izvedli s pomočjo 24 dijakov zaključnega letnika programa živilsko-prehranski tehnik. Postopek štetja živih kvasovk smo ponovili še po dveh mesecih in rezultate prikazali z grafi.



Slika 5: Postopek redčenja vzorca
Foto: Neža Bogataj (28. 11. 2024)

3.2.2.1 Določanje števila kvasovk

Naš vzorec smo mikroskopirali z namenom preštevanja števila živih in neživih kvasovk. Da pa smo to izvedli, smo vzorec z razredčitvijo 10^{-2} nanесли na Neubauerjevo števno komoro, steklen pripomoček z vrisano mrežo, namenjeno štetju celic pod mikroskopom. Pri preštevanju smo si pomagali z barvanjem z metilenskim modrilom, ki prodre skozi celično membrano mrtvih celic in jih s tem obarva. Žive celice ostanejo brezbarvne, saj uspešno reducirajo barvilo in tako le ta ne vstopi v celico. Zaradi neenakomerno razporejenih kvasnih celic po Neubauerjevi števni komori, smo na črtni mreži poševno šteli posamezne kvadrante v sredinskem večjem kvadrantu. Tako smo prešteli 5 kvadrantov, sešteli rezultate živih in mrtvih celic, izračunali povprečje in po formuli za izračun števila celic v vzorcu izračunali njihove vrednosti.

Formula za izračun skupnega števila kvasovk v vzorcu jabolčnega vina:

$$N = x \times 25 \times 10^4$$

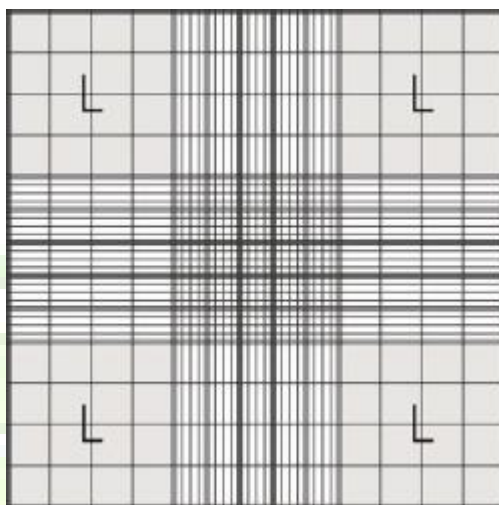
X - povprečno število kvasovk v petih kvadrantih

N - število kvasovk na mililiter



Slika 6: Neubauerjeva števna komora

Vir: <https://www.kefo.si/fuchs-rosenthal-counting-chamberdouble-> (21. 2. 2025)



Slika 7: Neubauerjeva števena komora (mreža za preštevanje)
Vir: <https://www.kefo.si/counning-chamber-accto-neubauer-improve> (21. 2. 2025)

3.2.2.2 Določanje vsebnosti alkohola z ebulioskopom

Vsebnost alkohola smo določali z ebulioskopom. Najprej smo s pipeto v uparjalnik nalili vodo do oznake, tako da se živo srebro termometra ne dotika gladine vode. Nato smo prižgali gorilnik in počakali, da je iz uparjalnika začela izhajati para. Ko se je nitka iz živega srebra umirila, smo merilno skalo premaknili do vrednosti 0 vol.%. Tako smo nastavili pozicijo vrelišča vode. Nato smo vodo odlili in na isto mesto nalili vzorec vina. Nato smo spet počakali, da se je živosrebrna nitka ustavila in tako odčitali vrednost alkohola v volumskih odstotkih. Na isti način smo koncentracijo alkohola izmerili pri obeh fermentacijah.



Slika 8: Ebulioskop

Vir: <http://www.pavin.hr/proizvod/aparat-za-mjerenje-alkohola-po-malligandu/> (16. 2. 2025)

3.2.2.3 Določanje vsebnosti sladkorja z refraktometrom

Količino sladkorja v obeh vzorcih smo merili z ročnim in digitalnim refraktometrom. Refraktometra delujeta na princip loma svetlobe. Ko tekočina pade na prizmo (merilnik) refraktometra, se svetloba lomi glede na koncentracijo raztopine. Pred začetkom merjenja ju je potrebno umeriti. To storimo tako, da na stekleno prizmo naprave kanemo kapljico

destilirane vode in preverimo, če se je nivo loma svetlobe izravnal z vrednostjo 0. Po umeritvi refraktometrov smo pri ročnem na prizmo kanili nekaj kapljic vzorca ter prekrili s steklenim pokrovom. Refraktometer smo usmerili proti svetlobi in pogledali skozi okular, skozi katerega smo uspeli razbrati vrednost sladkorja. Izmerjeno vrednost je pokazala črta med svetlim in temnim poljem. Z digitalnim refraktometrom je postopek določanja vsebnosti sladkorja enostavnejši. Po umeritvi, na senzor refraktometra enostavno kanemo kapljico vzorca in rezultat se neposredno izpiše na ekranu. Digitalni refraktometri so bolj natančni od ročnih, saj zmanjšajo subjektivne napake pri odčitavanju. Zanimalo nas je, kako se spreminja koncentracija sladkorja med potekom alkoholnega vrenja.



Slika 9: Ročni refraktometer

Vir:
<https://mihaela.si/izdelek/refraktometer-rocni-3-skale-atc/> (16. 2. 2025)



Slika 10: Digitalni refraktometer

Vir:
<https://www.ceneje.si/izdelek/5427892/gradbenistvo/elektrotehnicne-komponente/merilni-instrumenti-laboratorijska-oprema/kern-optics-digitalni-refraktometer-sladkor-ord-45bm-kern-optics-ord-45bm> (16. 2. 2025)

3.2.2.4 Določanje pH vrednosti s pH metrom

S pH metrom smo izmerili pH vrednost substrata Tako kot ostale naprave, je potrebno umeriti tudi pH meter. To smo storili s pomočjo pufrne raztopine, ki je imela pH vrednost 4. Po umerjanju smo elektrodo potopili v vzorca in na zaslonu odčitali pH vrednost jabolčnega vina. Zanimalo nas je, kateri vzorec bo imel po koncu fermentacije nižjo pH vrednost.



Slika 11: pH meter

Vir: <https://hannacan.com/product/laboratory-research-grade-two-channel->

3.2.2.5 Določanje temperature s termometrom

Med samim procesom smo spremljali tudi temperaturo vzorcev z navadnim tekočinskim termometrom.



Slika 12: Termometer

Vir: <https://www.ortopediasani> (21. 2. 2025)

3.2.2.6 Senzorično ocenjevanje

Senzorično analizo smo izvedli s pomočjo 24-ih dijakov zaključnega letnika programa živilsko-prehranski tehnik. Preizkuševalci so ocenjevali videz, vonj, okus in harmoničnost obeh vzorcev. Ocenjevalce smo predhodno seznanili z možnimi napakami jabolčnih vin.

3.3 REZULTATI IN INTERPRETACIJA

Po končani fermentaciji smo vse meritve, ki smo jih med raziskavo beležili, vnesli v skupno tabelo. S pomočjo tabel smo oblikovali grafe iz katerih smo analizirali potek fermentacije. S tem smo prišli do končnih ugotovitev in rezultatov.

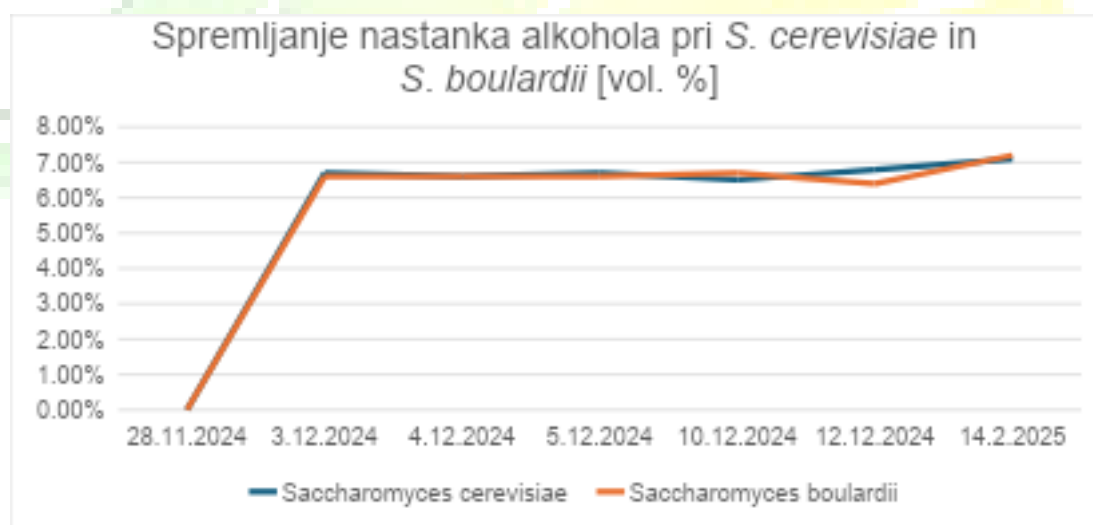
3.3.1 Spremljanje števila kvasovk med fermentacijo



Graf 1: Število kvasovk

Število kvasovk med fermentacijo narašča in po določenem času prične upadati, saj kvasovkam začne primanjkovati hranil, istočasno pa tudi nastali etanol deluje zaviralno na mikroorganizme. Opaziti je nekoliko večji porast v primeru fermentacije s *Saccharomyces boulardii*, vendar je rezultat ob koncu fermentacije med obema vzorcema izenačen. Potrebno je tudi poudariti, da metoda štetja kvasovk ni najbolj natančna, saj na ta način preštejemo vse mikroorganizme, tako žive kot mrtve.

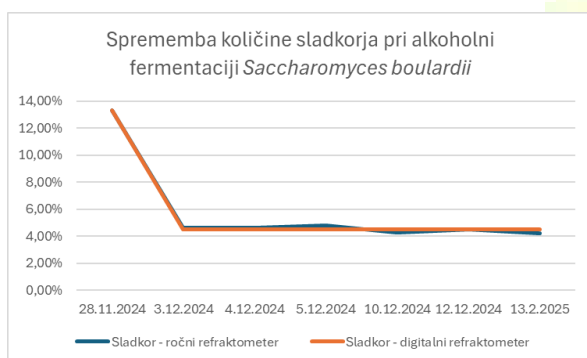
3.3.2 Spremljanje nastanka alkohola med fermentacijo



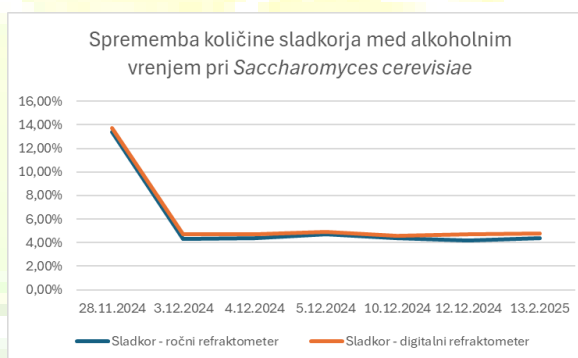
Graf 2: Spremljanje nastanka alkohola

Vsebnost alkohola je v obeh vzorcih enotno naraščala. Porast alkohola je bil najbolj intenziven v prvem tednu, pri 7 vol. % alkohola pa so vrednosti pričele stagnirati v obeh vzorcih.

3.3.3 Spremljanje vsebnosti sladkorja med fermentacijo

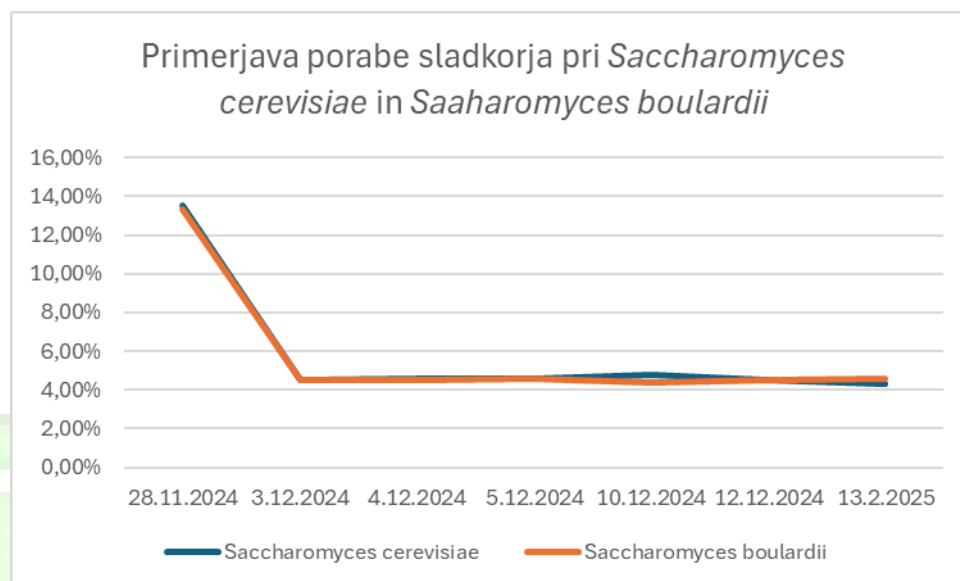


Graf 3: Sprememba količine sladkorja pri alkoholni fermentaciji *Saccharomyces boulardii*



Graf 4: Sprememba količine sladkorja med alkoholnim vrenjem pri *Saccharomyces cerevisiae*

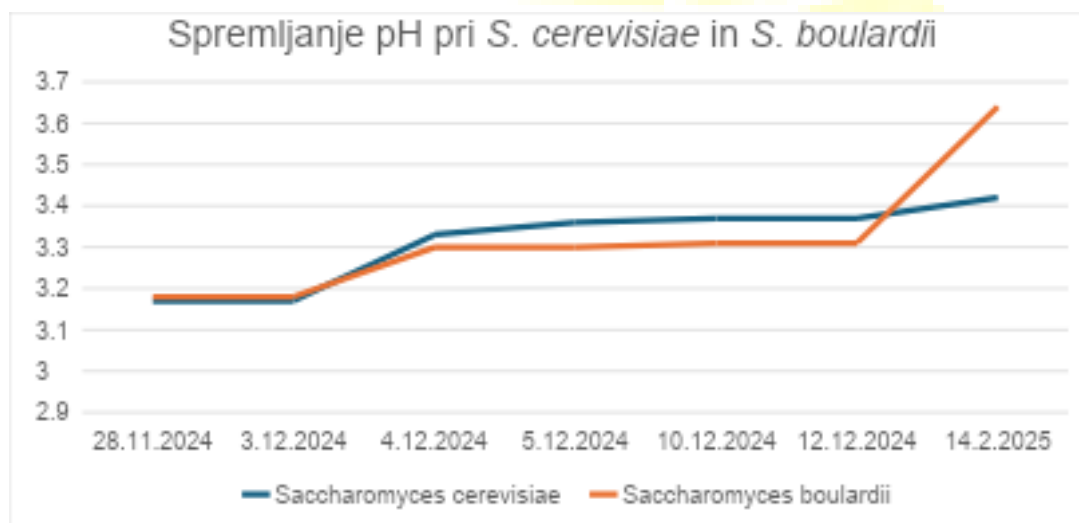
Kot vidimo prikazano na grafih smo z ročnim in digitalnim refraktometrom dobili skoraj enake rezultate. S tem smo dokazali točnost meritev.



Graf 5: Primerjava porabe sladkorja pri *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces boulardii*

Iz grafa lahko razberemo, da se poraba sladkorja med vzorcema ne razlikuje, kar pomeni, da sta kvasovki podobno metabolno aktivni.

3.3.4 Spremljanje vrednosti pH

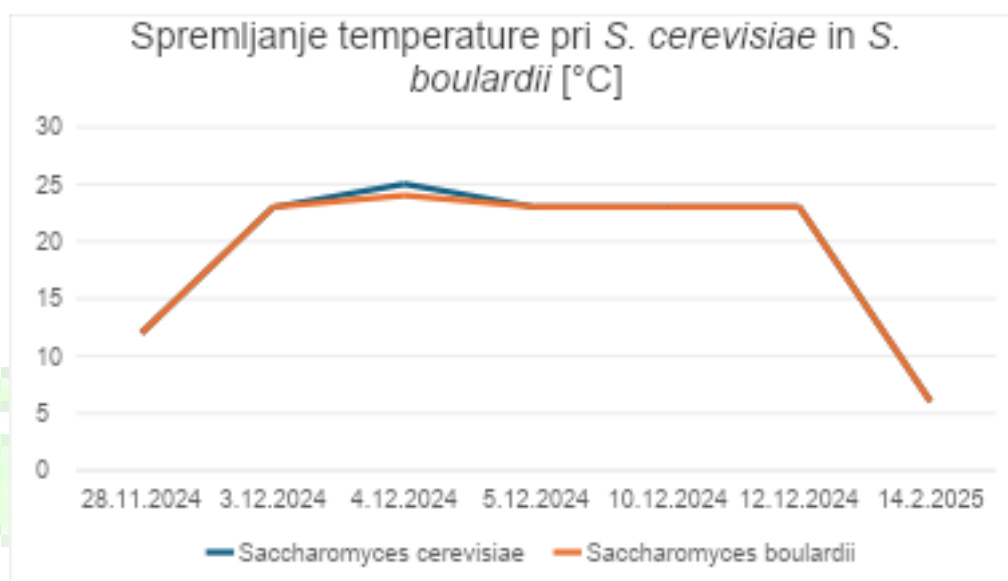


Graf 6: Spremljanje vrednosti pH

pH vrednost se med alkoholno fermentacijo lahko precej spreminja, saj je to rezultat kompleksnih kemijskih reakcij, ki potekajo med fermentacijo, vključno s proizvodnjo ogljikovega dioksida (CO_2) in etanola ter sproščanjem različnih kislih spojin. Spremembe pH so pomemben dejavnik pri fermentacijskem procesu, saj vplivajo na aktivnost kvasovk, hitrost fermentacije in kakovost končnega izdelka. pH med alkoholno fermentacijo običajno pada zaradi proizvodnje kislin in ogljikovega dioksida.

Iz grafa lahko razberemo, da je prišlo do napake v merjenju, saj naš pH narašča namesto pada.

3.3.5 Spremljanje temperature



Graf 7: Razlika v temperaturi

V obeh primerih je bila začetna temperatura nizka, saj sta bila vzorca pred poskusom odvzeta iz hladilnika. Sledila je dokaj stalna temperatura, ki je zagotavljala optimalno delovanje obeh vrst kvasovk. Izmerjena zadnja temperatura je tudi nižja, saj sta bila vzorca od konca fermentacije hranjena v hladilnici.

3.3.6 Spremljanje števila živih kvasovk med fermentacijo in po fermentaciji z metodo barvanja z metilenskim modrilom

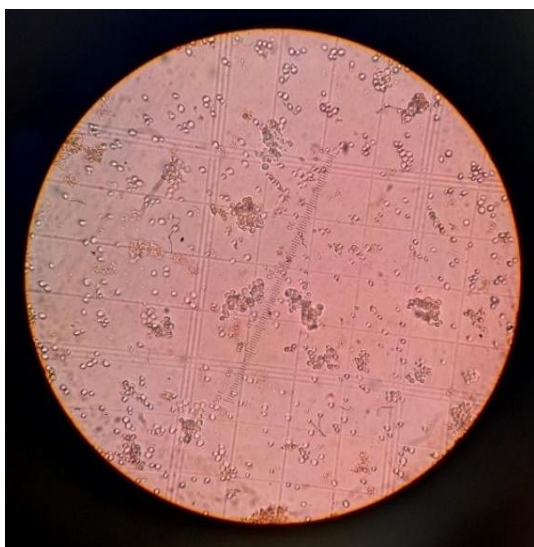


Graf 8: Spremljanje števila živih kvasovk

Iz grafa je razvidno, da je število preživelih kvasovk (v 1 mililitru) vrste *Saccharomyces boulardii* veliko večje, tako v času fermentacije, kot v času shranjevanja, ko se vrednosti nekoliko približata.



Slika 13: Dijak med mikroskopiranjem
Foto: Ela Zalokar (28. 11. 2024)

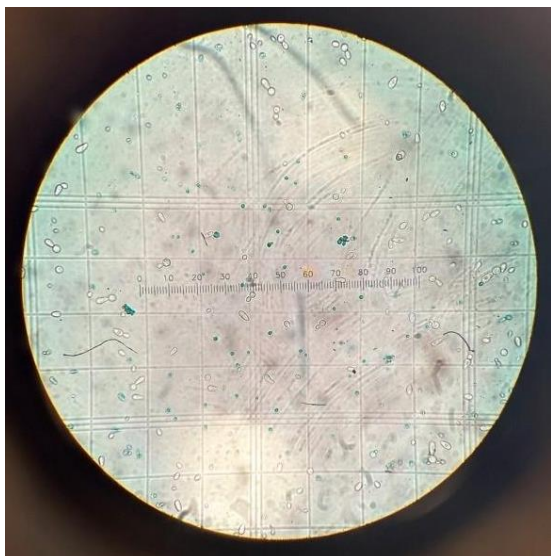


Slika 14: *Saccharomyces boulardii* pod mikroskopom,
Foto: Ela Zalokar (28. 11. 2024)

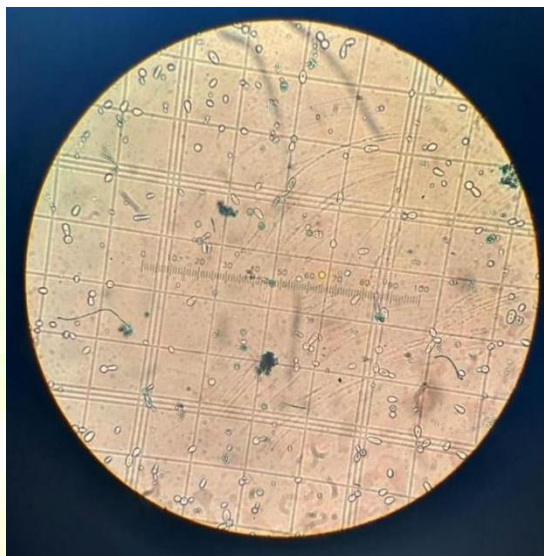


Slika 15: *Saccharomyces cerevisiae* pod mikroskopom,
Foto: Ela Zalokar (28. 11. 2024)

Na tej stopnji so kvasovke rehidrirane v jabolčnem soku in so pri obeh vrstah vse žive. Razredčene so do 10^{-4} .

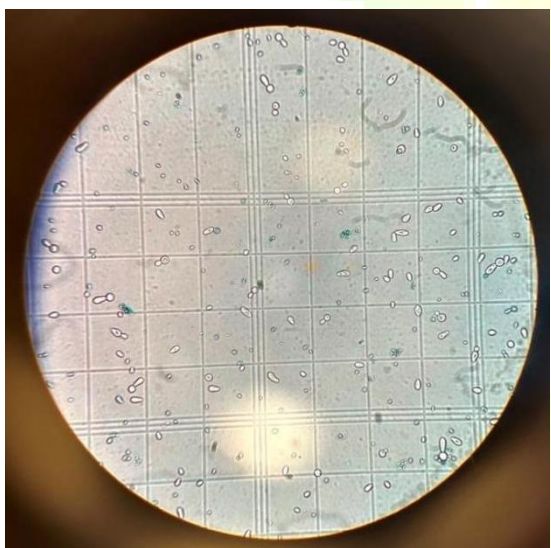


Slika 16: *Saccharomyces boulardii* pod mikroskopom
Foto: Ela zalokar (3. 12. 2024)

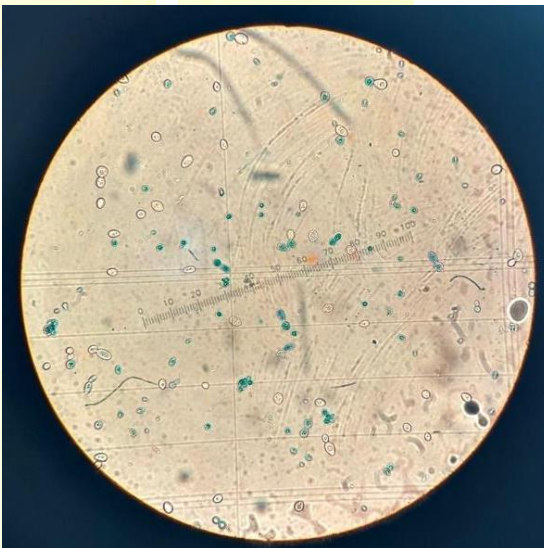


Slika 17: *Saccharomyces cerevisiae* pod mikroskopom
Foto: Ela zalokar (3. 12. 2024)

Po petih dneh fermentacije opazimo, da so celice pri obeh vrstah kvasovk začele odmirati. Zasedimo pa tudi, da je mrtvih celic pri *Saccharomyces cerevisiae* več..

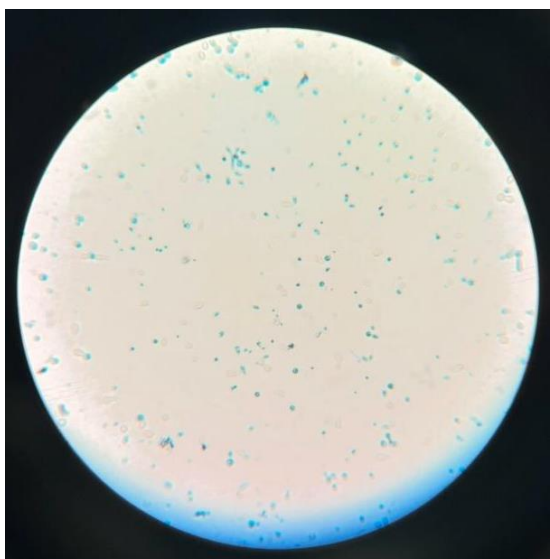


Slika 18: *Saccharomyces boulardii* pod mikroskopom
Foto: Ela Zalokar (5. 12. 2024)

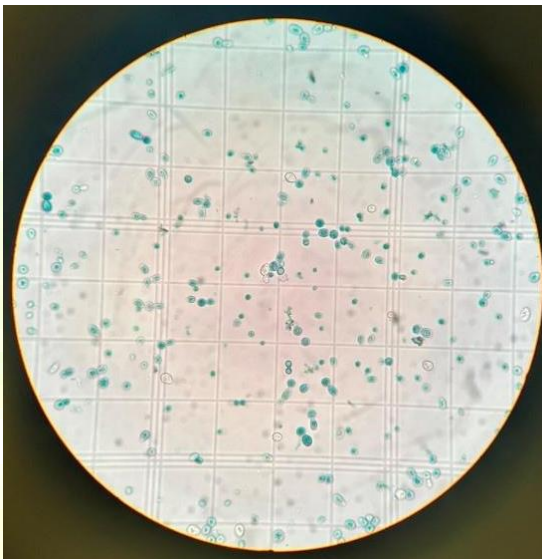


Slika 19: *Saccharomyces cerevisiae* pod mikroskopom
Foto: Ela Zalokar (5. 12. 2024)

Po sedmih dneh fermentacije znova opazimo, da je pri kvasovki *Saccharomyces boulardii* več živih celic.

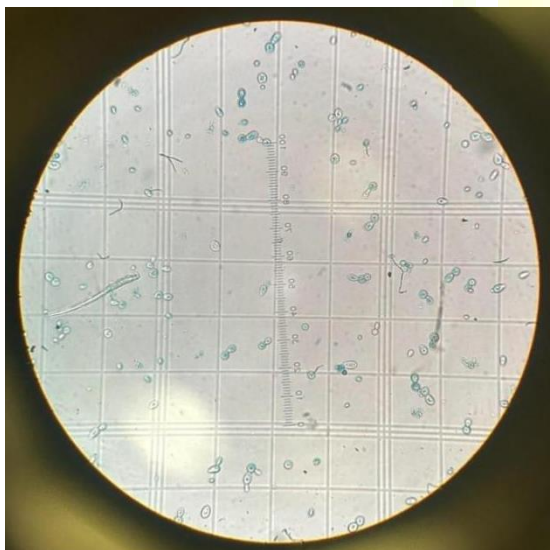


Slika 20: *Saccharomyces boulardii* pod mikroskopom
Foto: Ela Zalokar (10. 12. 2024)

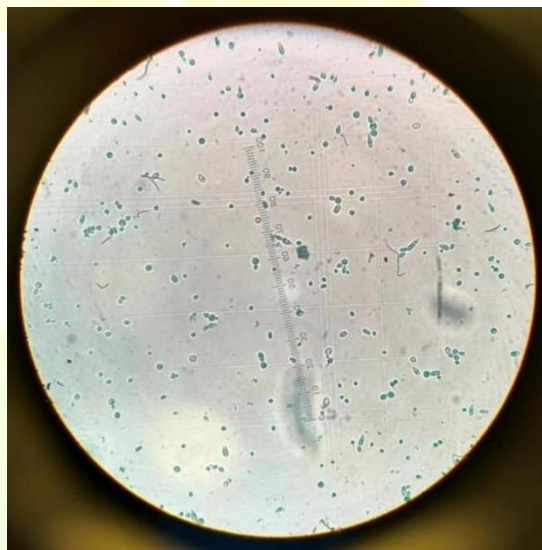


Slika 21: *Saccharomyces cerevisiae* pod mikroskopom
Foto: Ela Zalokar (10. 12. 2024)

Po dvanajstih dneh fermentacije opazimo, da je pri obeh vrstah kvasovk več kot polovica celic mrtvih. To je zaradi pomanjkanja hranilnih snovi in sladkorja. Povečal pa se je tudi odstotek alkohola, vse to zavira rast in razmnoževanje celic.

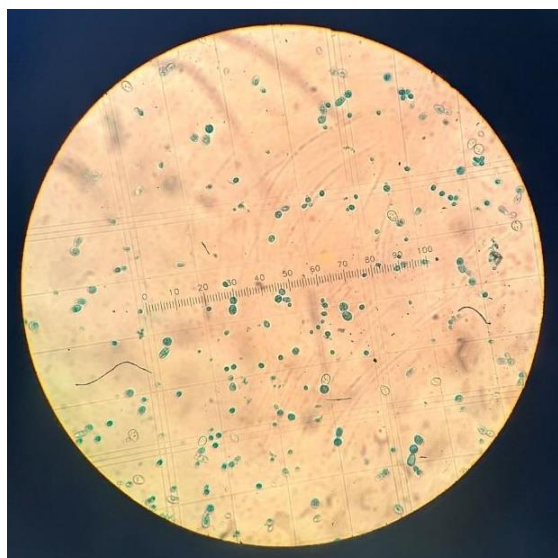


Slika 22: *Saccharomyces boulardii* pod mikroskopom
Foto: Ela Zalokar (12. 12. 2024)

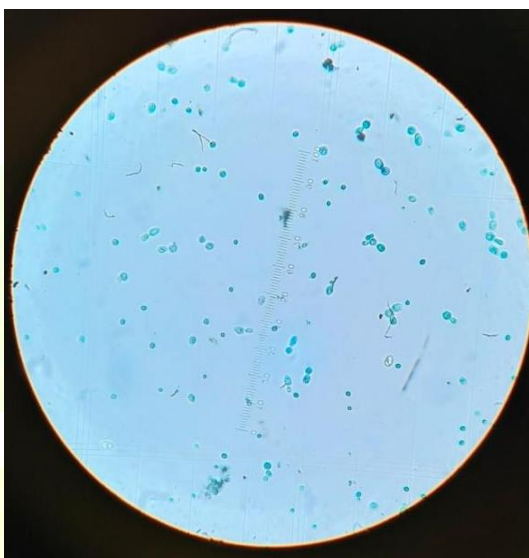


Slika 23: *Saccharomyces cerevisiae* pod mikroskopom
Foto: Ela Zalokar (12. 12. 2024)

Po štirinajstih dneh fermentacije se rezultati skoraj nič ne razlikujejo od rezultatov fermentacije po dvanajstih dneh, le da je po štirinajstih dneh še več mrtvih celic pri obeh vzorcih.



Slika 24: *Saccharomyces boulardii* pod mikroskopom
Foto: Ela Zalokar (14. 1. 2025)



Slika 25: *Saccharomyces cerevisiae*
Foto: Ela Zalokar (14. 1. 2025)

14.1.2025 smo zadnjič šteli kvasovke pod mikroskopom in opazovali njihovo preživelost. Prišli smo do zaključka, da imajo kvasovke *Saccharomyces boulardii* večjo sposobnost preživetja kot kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Čeprav so bile celice pri obeh vrstah kvasovk po večini že mrtve, se je pri vrsti *Saccharomyces boulardii* še vedno pojavila kakšna živa celica.

3.3.7 Senzorična analiza vzorcev

Tabela 1: Senzorična analiza vzorcev

ZAZNAVA	MOŽNO ŠTEVILO TOČK ZA DOLOČENO ZAZNAVO	POVPREČNO ŠTEVILO ZA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	POVPREČNO ŠTEVILO ZA <i>Saccharomyces boulardii</i>
Videz (bistrost, barva)	3	2	2
Vonj	5	4	3
Okus	8	6	3
harmoničnost	4	3	2
skupaj	Možnih točk 20	15	10

Kot je razvidno iz tabele, so prostovoljci jabolčno vino, ki je bilo narejeno s pomočjo *Saccharomyces cerevisiae* ocenili s povprečno oceno 15 točk, jabolčno vino, narejeno z dodatkom *Saccharomyces boulardii* pa s povprečno 10 točkami. Iz zbranih rezultatov, lahko sklepamo, da je največja razlika med vzorcema pri oceni okusa.

4 SKLEP

Z raziskovalno nalogo smo potrdili hipotezi, saj je bil potek alkoholne fermentacije v obeh vzorcih precej podoben, skoraj identičen, dokazali pa smo tudi višjo stopnjo preživelosti kvasovk vrste *Saccharomyces boulardii*.

Dosegli smo cilj raziskovalne naloge, saj smo izdelali jabolčno vino s probiotičnim učinkom. Senzorična analiza je pokazala, da je jabolčno vino narejeno s kvasovko *Sacharomyces boulardii* pridobilo slabše ocene, predvsem na račun okusa. Menimo, da bi z optimizacijo proizvodnje lahko izboljšali senzorične lastnosti izdelka, kar bi, poleg vsebnosti probiotikov, še dodatno doprineslo k višji dodani vrednosti izdelka in posledično povzročilo večje zanimanje potrošnikov na trgu.

Zavedamo se, da bi bilo potrebno naše delo nadgraditi, predvsem s spremljanjem živih celic kvasovk na gojišču in aplikacijo raziskovanih kvasovk v druge substrate.

Vsekakor je kvasovka *Sacharomyces boulardii* zanimiva za nadaljnje raziskovanje, saj vemo, da je zaradi sposobnosti preživetja pri nizkih pH vrednostih močno konkurenčna ostalim probiotičnim kulturam, ki se pojavljajo na trgu.

Ponosni smo, da smo izdelali kvaliteten izdelek in pri tem pridobili mnoge tako teoretične kot praktične izkušnje, ki nam bodo koristile pri nadaljnjem študiju.

5 VIRI IN LITERATURA

Saccharomyces boulardii. (2025). Pridobljeno 5. februarja 2025 s <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.14037>.

Saccharomyces cerevisiae. (2025). Pridobljeno 20. februarja 2025 s <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=118783&lang=slv>, <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=133447&lang=slv>, <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=118783&lang=slv>.

Probiotiki. (2025). Pridobljeno 11. februarja 2025 s <https://www.sfd.si/wp-content/uploads/sfd/datoteke/berlec.pdf>; <https://vizita.si/zdravje/prehrana/probiotiki.html>.

Avtoklaviranje. (2025). Pridobljeno 16. februarja 2025 s <https://www.medicinskislovar.com/avtoklaviranje/>, https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_Potato-Dextrose-Agar_EN_020718.pdf?srltid=AfmBOoqpU-U_YnXqfF0jBfP7INvM70s5Wa4AQldtidb_3ixkIxn1Gc2H.

Alkoholno vrenje. (2025). Pridobljeno 21. februarja 2025 s <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=133187&lang=slv>, <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=133162&lang=slv>.

RTV Slovenija. (2025). Pridobljeno 21. februarja 2025 s <https://www.rtv slo.si/rtv365/arhiv/174929809?s=tv>.

Somrak, E. (2025). Pridobljeno 21. februarja 2025 s http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/zivilstvo/du2_somrak_eva.pdf.

Fuchs-Rosenthalova štetna komora. (2025). Pridobljeno 21. februarja 2025 s <https://www.kefo.si/fuchs-rosenthal-counting-chamberdouble->.

Neubauerjeva izboljšana števna komora. (2025). Pridobljeno 21. februarja 2025 s <https://www.kefo.si/couting-chamber-accto-neubauer-improve>.

Aparat za merjenje alkohola po Malligandu. (2025). Pridobljeno 16. februarja 2025 s <http://www.pavin.hr/proizvod/aparat-za-mjerenje-alkohola-po-malligandu/>.

Ročni refraktometer – 3 skale ATC. (2025). Pridobljeno 16. februarja 2025 s <https://mihaela.si/izdelek/refraktometer-rocni-3-skale-atc/>.

Digitalni refraktometer KERN Optics. (2025). Pridobljeno 16. februarja 2025 s <https://www.ceneje.si/izdelek/5427892/gradbenistvo/elektrotehnicne-komponente/merilni-instrumenti-laboratorijska-oprema/kern-optics-digitalni-refraktometer-slackor-ord-45bm-kern-optics-ord-45bm>.

Ortopediasani. (2025). Pridobljeno 21. februarja 2025 s <https://www.ortopediasani>.

Skoliber. (2011); Vrhovnik. (2019).

