

Postup č. 2: Hodnotenie fermentovaných produktov

Gravimetrické stanovenie množstva uvoľneného CO₂ (Laboratórny manuál k predmetu Mikrobiológia str. 73 – 74)

- Banky otvoriť a zvážiť po fermentácii
- Odpočítame rozdiel hmotnosti pred a po fermentácii
- Rozdiel nám udáva množstvo uvoľneného CO₂
- Pomocou stechiometrických rovníc vypočítame skvasenú glukózu v gramoch a množstvo vytvoreného alkoholu v gramoch

$$\text{skvasená glukóza (v g)} = \frac{180 \text{ x g CO}_2}{88}$$

$$\text{vytvorený alkohol (v g)} = \frac{92 \text{ x g CO}_2}{88}$$

- Intenzita kvasenia sa vyjadruje v % k pôvodnému množstvu cukru

Odmerať vytvorené množstvo EtOH – liehomerom a porovnať z prepočtom

Výsledok:

- stanoviť množstvo skvasenej glukózy a vytvoreného alkoholu pomocou stechiometrických rovníc
- porovnať použité spôsoby zisťovania množstva etanolu a popísať ich vhodnosť použitia
- mikroskopicky vyšetriť sediment, vypočítať vitalitu kvasiniek a spojiť túto informáciu s množstvom vyprodukovaného etanolu a zmenami parametrov akými boli teplota a pH
- porovnať vyprodukované množstvo etanolu medzi jednotlivými variantami
- výsledky vplyvu teploty, vplyvu pH na produkciu etanolu a vitalitu kvasiniek by mali byť spracované vo forme grafu

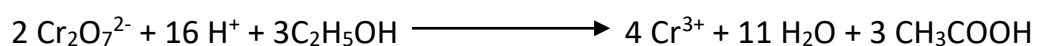
Determinácia koncentrácie etanolu vo vodných roztokoch titračnou metódou

Bezpečnosť

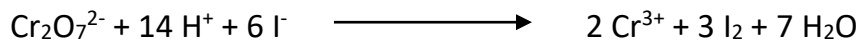
Na cvičenie je potrebné si zabezpečiť laboratórny plášť. Roztok kyseliny dvojchromanu je potrebné pripraviť bezpečne. Vyplachovanie akejkoľvek koncentrácie kyseliny musí byť robené veľmi opatrne. Ber na vedomie, že prv má byť do banky naliata voda a kyselinu pridávať do vody za konštantného miešania. Banka sa bude mierne zahrievať.

Úvod

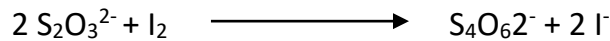
Táto metóda využíva redoxnú titráciu pre detekciu koncentrácie etanolu vo vodných roztokoch. Etanol je oxidovaný na kyselinu etánovú reakciou s prebytkom dvojchromanu draselného v kyseline.



Množstvo nezreagovaného dvojchromanu je potom zmerané pridaním iodidu draselného, ktorý rovnako oxiduje dvojchroman draselný za vzniku jódu.



Jód je potom titrovaný štandardným roztokom tiosíranom sodným a výsledok titrácie sa použije na kalkuláciu obsahu alkoholu vo vzorke.



Alkoholické nápoje akými sú pivo, víno, cídery a iné obsahujú okrem alkoholu aj iné oxidovateľné substancie, ktoré môžu interferovať pri titrácii. Preto je nutné vzorku umiestniť nad dvojchroman draselný v oddelených nádobách (vid. Obrázok). Voda a etanol sa pomaly odparujú a etanol prichádza do kontaktu s dvojchromanom ako prvý, rozpúšťa sa v ňom a ten ho oxiduje. Časom sa odparí viac etanolu a nakoniec zreaguje všetok etanol s dvojchromanom. Pre urýchlenie reakcie je nutné ponechať banku s odparujúcim sa etanolom na teplejšom mieste počas noci, zhruba 24 hodín.

Potrebné vybavenie

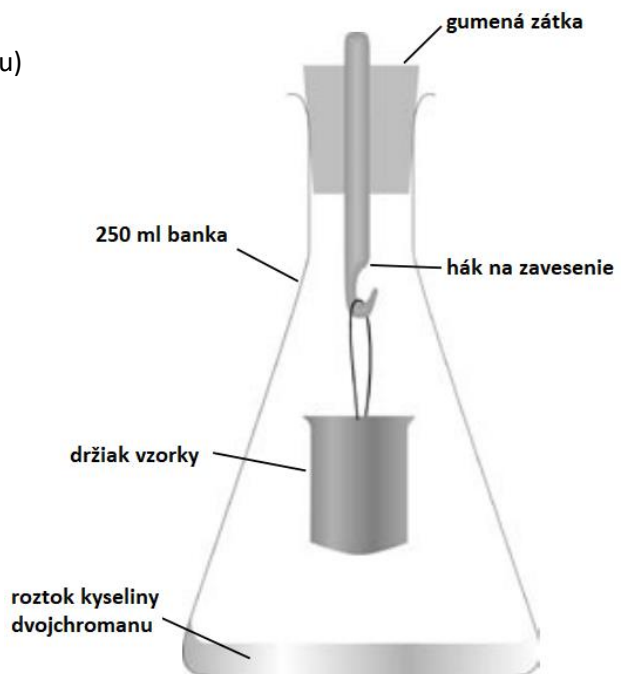
250 ml kónickú banku s uzáverom (gumenou zátkou)

Byretu

5 ml kadičku

10 ml a 1 ml pipetu so špičkami

Inkubátor (30°C)



Potrebné roztoky

Kyselina dvojchromanu draselného: 0,01 mol/l v 5,0 mol/l kyseliny sírovej. Pridať 125 ml vody do 500 ml banky. Opatrne pridať 70 ml koncentrovanej kyseliny sírovej za konštantného miešania. Roztok chladiť v studenej vode a pridať 0,75 g dvojchromanu draselného. Doplniť do 250 ml s destilovanou vodou.

Roztok škrobového indikátora: (1 % roztok). Rozpustiť 1 g rozpustného škrobu v 100 ml destilovanej vody. Počas zahrievania miešať do úplného rozpustenia, z kalného roztoku do priehľadného. Škrob stekutíe.

Roztok tiosíranu sodného: (0,03 mol/l). Pridať 7,44 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ do 1 l banky, rozpustiť pomocou destilovanej vody presne po rysku.

Roztok iodidu draselného: (1,2 mol/l). Rozpustiť 5 g KI v 25 ml destilovanej vody.

Postup práce:

Príprava vzorky:

Zriediť vzorku v pomere 1:20 v destilovanej vode (10 ml v 200 ml vody).

Titrácia:

1. premiestni 10 ml roztoku kyseliny dvojchromanu do 250 ml kónickej banky so zátkou
2. napipetuj 1 ml zriedenej vzorky do malej kadičky, ktorá bude umiestnená vo vnútri banky
3. zavesiť malú kadičku nad roztok dvojchromanu draselného v kyseline
4. uložiť banku do inkubátory na 24 hodín pri teplote 25-30°C
5. nasledujúci deň premiestniť banku a vyrovnáť teplotu na izbovú, potom odstrániť zátku a vybrať vzorku v kadičke
6. opláchnuť steny banky a doplniť 100 ml destilovanej vody a 1 ml roztoku iodidu draselného, premiešať, farba sa zmení na jantárovo hnedú
7. pripraviť aj slepý pokus titrácie, pridaním 10 ml kyseliny dvojchromanu draselného v banke, pridať 100 ml vody a 1 ml roztok iodidu draselného a premiešať.
8. Naplniť byretu roztokom tiosíranu sodného a titrovať každú banku. Keď sa jantárovo-hnedá farba roztoku zmení na žltú* ako bola na začiatku, je potrebné pridať 1 ml roztoku škrobu a pokračovať v titrácii do straty modro-hnedo-čierneho zafarbenia. Titrovať je potrebné najprv slepú vzorku. Potom titrujeme vzorku.

Pozor: * - ak sa titrácia z jantárovo-hnedej nezastaví na žltej, ale sa odfarbí roztok do priehľadnej farby, nie je možné titráciu vrátiť späť, existuje len jeden pokus, nebude tým pádom možné dokončiť úlohu

Kalkulácia výsledku:

Slepý pokus nám napovie, koľko kyseliny dvojchromanu bolo na začiatku experimentu. Ak nebol pridaný žiaden alkohol, všetok dvojchroman je prítomný. Slepý pokus je potrebný na porovnanie so vzorkou.

1. Zistiť množstvo tiosíranu sodného potrebného na titráciu vzorky
2. Zistiť množstvo tiosíranu sodného potrebného na titráciu slepej vzorky
3. Odčítať objem titrovaného tiosíranu sodného zo slepej vzorky od experimentálnej vzorky, tento objem bude použitý pre výpočet.
4. Vypočítať počet mólov tiosíranu sodného v objeme použitom na titráciu
5. Použitím rovníc, je potrebné zistiť vzťah medzi mólm tiosíranu sodného a mólm etanolu
 - Ak 6 mólov $S_2O_3^{2-}$ je ekvivalentom k 1 mólu $Cr_2O_7^{2-}$
 - A 2 móly $Cr_2O_7^{2-}$ sú ekvivalentom k 3 mólom C_2H_5OH
 - Potom 1 mól $S_2O_3^{2-}$ sú ekvivalentom 0,25 mólom C_2H_5OH
6. Použiť tento postup na výpočet mólov alkoholu vo vzorke
7. Pamätať na riedenie na začiatku (1:20), výsledok je potrebné násobiť riedením.
8. Konvertuj odpoveď v móloch na liter na percentuálny podiel alkoholu (gram na 100ml)

Mikroskopické vyšetrenie sedimentu

- Banku s kvasinkami dobre premiešať, kvôli homogenizácii kvasiniek v štave
- Na podložné sklíčko preniesť pipetkou kvapku šťavy s kvasinkami
- Pridať metylénovú modrú

- Prikryť krycím sklíčkom a pozorovať na 40 x
- V zornom poli spočítať živé a mŕtve kvasinky
- Pozn: živé sa metylénovou modrou nefarbia, mŕtve sa farbia na modro
- Vypočítať percento živých a mŕtvych
- Spojiť informáciu o vitalite s množstvom vyprodukovaného etanolu a zmenami parametrov akými boli teplota a pH
- Všetky výsledky práce prepojiť, dať ich do súvisu a vyjadriť grafmi