



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Diplomsko delo

# **Določanje vsebnosti $\beta$ -glukanov v sladici in pivu**

September, 2016

Tamara Govejšek



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Tamara Govejšek

## **Določanje vsebnosti $\beta$ -glukanov v sladici in pivu**

Diplomsko delo

Maribor, september 2016



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

# Določanje vsebnosti $\beta$ -glukanov v sladici in pivu

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje

Študent: Tamara Govejšek  
Študijski program: univerzitetni študijski program I. stopnje Kemija  
Predvideni strokovni naslov: diplomirana kemičarka (UN)  
Mentor: doc. dr. Iztok Jože Košir  
Komentor: doc. dr. Matjaž Finšgar

Maribor, september 2016



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Številka: K1005390

Datum: 15.03.2016

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 44/2015)

izdajam

### SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

**Tamara Govejšek**, študent-ka univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje KEMIJA, lahko izdela diplomsko delo.

Mentor-ica: doc. dr. Iztok Jože Košir

Somentor-ica: doc. dr. Matjaž Finšgar

**Naslov diplomskega dela:**

DOLOČANJE VSEBNOSTI  $\beta$ -GLUKANOV V SLADICI IN PIVU

**Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:**

DETERMINATION OF  $\beta$ -GLUCAN CONTENT IN WORTH AND BEER

Diplomsko delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo diplomskega dela« in ga oddati v treh izvodih ter en izvod elektronske verzije do 30.09.2016 v referatu za študentske zadeve Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na senat članice v roku 3 delovnih dni.

Obvestiti:

- kandidata -ko,
- mentorja,
- somentorja,
- odložiti v arhiv



DEKAN:  
red. prof. dr. Zdravko Kravanja



FAKULTETA ZA KEMIJO IN  
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

## Kazalo

Kazalo .....	I
Izjava.....	II
Zahvala .....	III
Povzetek.....	IV
Abstract.....	V
Seznam tabel.....	VI
Seznam slik.....	VII
Uporabljeni simboli in kratice .....	VIII
1 Uvod in opredelitev problema.....	1
1.1 Tekočinska kromatografija .....	4
1.2 Fluorescenčni detektor .....	7
2 Eksperimentalni del.....	9
2.1 Materiali .....	9
2.1.1 Kemikalije.....	9
2.1.2 Laboratorijska oprema .....	9
2.1.3 Aparature .....	10
2.2 Laboratorijske metode .....	11
2.2.1 Priprava raztopin in vzorcev .....	11
2.2.2 Validacijski postopki za določanje vsebnosti $\beta$ -glukanov v sladici in pivu .....	11
2.2.3 Analiza realnih vzorcev .....	16
3 Rezultati in diskusija .....	17
3.1 Optimiranje analizne metode .....	17
3.2 Validacija analizne metode .....	22
3.2.1 Odzivnost detektorja in umeritvena krivulja .....	22
3.2.2 Ponovljivost in obnovljivost.....	23
3.2.3 Točnost .....	26
3.3 Meritve na realnih vzorcih .....	27
3.3.1 Določanje $\beta$ -glukanov v komercialno dostopnih pivih.....	27
3.3.2 Določanje $\beta$ -glukanov v drozgi, sladici, pivini in mladem pivu proizvedenem v mikropivovarni IHPS .....	29
4 Zaključek.....	31
5 Literatura .....	32
6 Življenjepis.....	34

## Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala sama, prispevki drugih so posebej označeni.

Pregledala sem literaturo s področja diplomskega dela po naslednjih geslih:

**Vir:** Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>)

<b>Gesla:</b>	<b>Število referenc</b>
Barley beta-glucan IN wort IN beer	227
Standard solutions of beta-glucan IN Calcofluor reagent	105
Hplc IN fld IN beer IN wort	8

**Vir:** COBISS/OPAC (<http://www.cobiss.si/scripts/cobiss?ukaz=getid>, COBIB.SI)

<b>Gesla:</b>	<b>Število referenc</b>
Barley beta-glucan	3
Beta-glukani	11

**Vir:** DKUM (<http://www.cobiss.si/scripts/cobiss?ukaz=getid>, COBIB.SI)

<b>Gesla:</b>	<b>Število referenc</b>
Validacija	99
Beta-glukani	11

**Skupno število pregledanih člankov:** 37

**Skupno število pregledanih knjig:** 4

Maribor, september 2016

Tamara Govejšek

## Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Iztoku Jožetu Koširju za praktične nasvete, vodenje in pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se somentorju doc. dr. Matjažu Finšgarju za pregled diplomske naloge.

Zahvalila bi se tudi Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije Žalec, ki mi je omogočil izvedbo eksperimentalnega dela diplomske naloge in vsem sodelavcem Laboratorija za agrokemijo in pivovarstvo, za vse nasvete, razumevanje in prijetno vzdušje.

Posebna zahvala pa gre staršem in sestri, ki so me bodrili in mi stali ob strani tekom študija. Najlepša hvala Mateju, ki je verjel vame in v moje zmožnosti, ter me spodbujal.

## Določanje vsebnosti $\beta$ -glukanov v sladici in pivu

### Povzetek

$\beta$ -glukani so polisaharidi, v katerih so glukoze molekule povezane z (1→3) in (1→4)  $\beta$  glikozidnimi vezmi. Zaradi različnega tipa povezav in razvejanosti, lahko  $\beta$ -glukani varirajo v topnosti, molekularni masi, terciarni strukturi in konformaciji. Vse te karakteristike imajo vpliv na različne imunske efekte. Ječmenovi  $\beta$ -glukani so koncentriran vir vodotopnih prehranskih vlaknin. Njihovi učinki so povezani s povišanjem viskoznosti v tankem črevesju. Zaradi viskoznosti se upočasnjuje vstajanje hranil in posledično se zmanjša glikemični indeks. Namen našega eksperimentalnega dela je bil določanje  $\beta$ -glukanov v sladici in pivu s tekočinsko kromatografijo in fluorescentno detekcijo. Metodo smo tudi optimirali in validirali s pomočjo osnovnih parametrov, kot so točnost, natančnost, obnovljivost, ponovljivost. LOD in LOQ nismo določevali, saj so vse koncentracije analita v naših vzorcih nad mejo določljivosti in so v našem merilnem območju.

Ugotovili smo, da naša umeritvena krivulja ni linearna temveč je krivulja drugega reda.  $R^2$  je 0,9975, kar pomeni, da se krivulja zadovoljivo prilega našim točkam umeritvene krivulje. Meritve smo izvajali v koncentracijskem območju od 25–300 mg/L. Standardne raztopine je bilo potrebno dnevno pripraviti sveže, saj so se tekom tedna umeritvene krivulje standardnih raztopin močno spreminjale. V nekaterih primerih smo morali vzorce redčiti v razmerju 1:9, zaradi previsokega odziva detektorja. Iz posnetih kromatogramov smo odčitali ploščine pod kromatografskimi vrhovi in s pomočjo enačbe umeritvene krivulje izračunali koncentracijo  $\beta$ -glukanov v pivu. Selektivnost metode smo potrdili s pomočjo specifičnih karakteristik FLD detektorja, ki uporablja specifični valovni dolžini vzbuditve in emisije  $\beta$ -glukanov.

**Ključne besede:**  $\beta$ -glukani, validacija, calcofluor reagent, pivo, HPLC-FLD

**UDK:** 543.2:663.4(043.2)



## Determination of $\beta$ -glucan content in wort and beer

### Abstract

$\beta$ -glucans are polysaccharides in which glucose molecules are linked with (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$  glycosidic bonds. Due to different types of links and branching  $\beta$ -glucans may vary in solubility, molecular weight, tertiary structure and conformation. All these characteristics have an impact on different immune effects. Barley  $\beta$ -glucans are a concentrated source of soluble dietary fiber. Their effects are associated with the generation of a greater viscosity in the small intestine. This greater viscosity results in slower absorption of nutrients and consequently reduces glycemic index. The purpose of our experimental work was the determination of  $\beta$ -glucans in wort and beer by liquid chromatography and fluorescence detection. The method was also validated with some basic parameters, such as precision, accuracy, reproducibility, repeatability. We did not analyze LOD and LOQ because, all the concentrations of analyte in the samples were well above the limit of quantification and were, therefore, in our measuring range.

We found that our calibration curve is not linear but it is a curve of the second order.  $R^2$  is 0.9975, which means that the curve satisfactorily fit our points of the calibration curve. The measurements were carried out in the concentration range between 25 and 300 mg/L. The standard solutions were prepared freshly each day due to the variation of the calibration curve data in the course of the week. In some cases, we diluted samples in the ratio of 1:9 because the detector response was too. The surfaces of the recorded chromatographic peaks were scanned, and the concentrations of  $\beta$ -glucans in the beer were calculated by the use of calibration curve. We have confirmed the selectivity of the method due to the specific characteristic of the FLD detector, which uses only specific wavelengths of excitation and emission of  $\beta$ -glucans.

**Key words:**  $\beta$ -glucans, validation, calcofluor reagent, beer, HPLC-FLD

**UDK:** 543.2:663.4(043.2)

## Seznam tabel

Tabela 2-1: Izračun volumna standardnih raztopin s pripadajočimi koncentracijami .....	13
Tabela 3-1: Prikaz meritev v dveh dneh pri obnovljivih pogojih .....	25
Tabela 3-2: Karakteristične vrednosti vzorcev .....	27
Tabela 3-3: Vsebnost $\beta$ -glukanov v drozgi, sladici in pivu proizvedenem v mikropivovarni na IHPS .....	30

## Seznam slik

Slika 1-1: Molekula $\beta$ -D-glukana z (1,3) $\rightarrow$ (1,4) vezmi iz ječmena [4] .....	1
Slika 1-2: Shematski prikaz sistema HPLC [17] .....	4
Slika 1-3: Shema tipičnega fluorescenčnega detektorja za tekočinsko kromatografijo [23]....	7
Slika 2-1: Tekočinski kromatograf Agilent technologies 1200 series.....	10
Slika 2-2: Ultrazvočna kopel, v kateri smo razplinjevali vzorce piv.....	10
Slika 2-3: Uporabljeni realni vzorci .....	16
Slika 3-1: Umeritvena krivulja prvega dne.....	17
Slika 3-2: Prikaz umeritvene krivulje drugega dne .....	18
Slika 3-3: Odvisnost ploščine kromatografskega vrha od koncentracije $\beta$ -glukanov v viali s pripravljenim vzorcem drugega dne .....	18
Slika 3-4: Umeritvena krivulja tretjega dne pri valovni dolžini vzbujevanja 360 nm in valovni dolžini emisije 425 nm .....	19
Slika 3-5: HPLC-kromatogram vzorca piva pri valovnih dolžinah vzbujevanja 395 nm in emisije 410 nm.....	20
Slika 3-6: HPLC-kromatogram drozge pri valovnih dolžinah vzbujevanja 395 nm in emisije 410 nm .....	20
Slika 3-7: HPLC-kromatogram vzorca standarda $\beta$ -glukana koncentracije 25 mg/L pri valovnih dolžinah vzbujevanja 395 nm in emisije 410 nm .....	21
Slika 3-8: Ploščina kromatografskega vrha v odvisnosti od koncentracije $\beta$ -glukanov .....	22
Slika 3-9: Diagram drozganja.....	29

## Uporabljeni simboli in kratice

### Simboli

$c$	množinska koncentracija (mol/L)
$n$	število meritev
$R^2$	kvadrat korelacijskega koeficienta
$s$	standardni odmik
$t$	čas
$t_{izr.}$	izračunana vrednost t-testa
$t_{teo.}$	teoretična vrednost t-testa
$V_1$	volumen osnovne standardne raztopine
$V_2$	volumen merilne bučke
$\bar{\chi}$	povprečje meritev

### Grški simboli

$\beta$	eksponent (-)
$\gamma$	masna koncentracija (mg/L)

**Kratice**

BRM	biološki modifikatorji odziva ( <i>Biological Response Modifier</i> )
CF	Calcofluor
EBC	Evropsko pivovarsko združenje ( <i>European Brewery Convention</i> )
EFSA	Evropska agencija za varno hrano ( <i>European Food Safety Authority</i> )
fg	femtogram ( $10^{-15}$ )
FLD	fluorescentni detektor
GC	plinska kromatografija ( <i>Gas Chromatography</i> )
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti ( <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
IHPS	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo ( <i>International Organization for Standardization</i> )
IZK (%)	izkoristek, podan v procentih
MEBAK	Srednje evropska pivovarska analizna komisija ( <i>Mitteuropäische Brautechnische Analysenkommission</i> )
LDL	lipoprotein z nizko gostoto ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
LOD	meja zaznavnosti ( <i>Limit Of Detection</i> )
LOQ	meja določljivosti ( <i>Limit Of Quantification</i> )
TLC	tankoplastna kromatografija ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
RSD	relativni standardni odmik
s.d.	standardni dodatek
UV–VIS	ultravijolična vidna svetloba



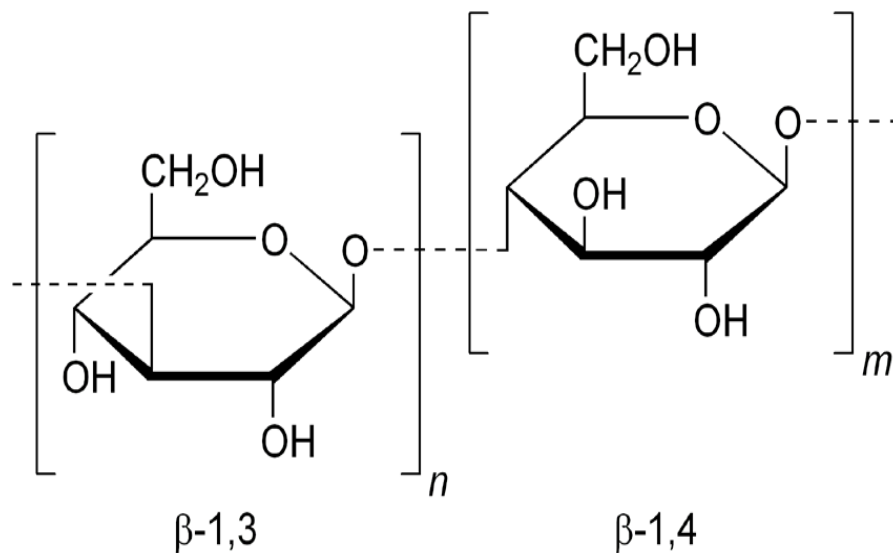
## 1 Uvod in opredelitev problema

Namen diplomskega dela je bil vpeljava in optimizacija metode za določanje  $\beta$ -glukanov v sladici in pivu s tekočinsko kromatografijo in fluorescentno detekcijo.  $\beta$ -glukani imajo v pivovarstvu izredni pomen, saj negativno vplivajo na viskoznost sladice in bistrost piva.

$\beta$ -glukani spadajo v skupino fiziološko aktivnih komponent imenovanih biološki modifikatorji odziva (BRM) in predstavljajo visoko ohranjene strukturne komponente celičnih sten v kvasu, glivah in morskih algah [1].

$\beta$ -glukani so polisaharidi v obliki vlaken in glavni elementi vlaknin v žitaricah, kot sta ječmen in oves ter v kvasu in medicinskih glivah [2].

Sestavljeni so iz dolgih linearnih verig glukoznih enot med seboj povezanih z  $\beta$ -vezmi. Približno 70 % teh povezav je med atomoma C-1 in C-4 v bližini glukozilnih enot ( $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 vez, najdena v celulozi) in preostanek med C-1 in C-3 atomoma v bližini glukoze ( $\beta$  1 $\rightarrow$ 3 vezi, katere ne najdemo v celulozi) [3]. Način povezave glukoznih enot je prikazan na sliki 1-1 [4].



Slika 1-1: Molekula  $\beta$ -D-glukana z (1,3)  $\rightarrow$  (1,4) vezmi iz ječmena [4]

Vezi 1 $\rightarrow$ 3 spremenijo strukturo molekule  $\beta$ -glukana in jo naredijo manj urejeno, bolj topno in bolj prebavljivo kot celulozo. V ječmenovi molekuli  $\beta$ -glukana je prisotnih 10 ali več

bližnjih 1→4 vezi. Ta celulozna območja prispevajo k netopnosti glukana. Delež relativno netopnega  $\beta$ -glukana v celičnih stenah imenujemo hemiceluloza, katero enostavno ekstrahiramo z vročo vodo in dobimo gumo [3].

Fizikalne lastnosti, kot so topnost v vodi in povzročitev visoke viskoznosti v raztopini prisotnega polisaharida, povzročajo probleme pri filtriranju piva, sladice in pivine [5].

Povečana viskoznost ovira črpanje in filtracijo zaradi česar je izkoristek manjši, donos ekstrakta nižji, prav tako stopnja filtracije kot tudi izgled želatinoznih izločkov v končnem pivu [6]. Problem filtracije v pivovarnah je bila konstantna tema raziskav že v 60-ih letih prejšnjega stoletja [7].

V ovsu in ječmenu so  $\beta$ -glukani lokalizirani skozi škrobne endosperme, medtem ko je pri pšenici najvišja koncentracija ob aleuronski plasti z nekaj malega v preostalem škrobnem endospermu. Aleuronska plast je najznačilnejše mesto za nastajanje encima v procesu slajenja. Hemiceluloza je osnovni gradnik celične stene endosperma. Sestavljene so iz  $\beta$ -glukana (80–90 %) in pentozana (10–20 %). Zaradi medsebojne povezave nerazgradljivih ostankov  $\beta$ -glukoze se tvori gel, zaradi katerega je cepitev  $\beta$ -glukana otežena. Gel vpliva na porast viskoznosti sladice in piva ter predstavlja problem pri filtraciji piva. V ječmenu in kvasu imamo veliko različnih encimov. Encimi razgradijo ovoj okrog škrobnih zrn. Pod vplivom  $\beta$ -glukanaze se  $\beta$ -glukan optimalno razgrajuje pri 45–50 °C. Razpade pri 60–65 °C pod vplivom  $\beta$ -glukan-solubilaze, katera je zelo odporna na temperaturo. Pri temperaturi od 60–70 °C se prične razgradnja beljakovin do aminokislin, kratkih in dolgih peptidov, medtem pa se ne more več razgrajevati, ker so endo- $\beta$ -glukanaze neaktivne že pri 52 do 55 °C. Zgodnje uničenje  $\beta$ -glukanaz, pomeni, da se ne ukvarjamo več s prostimi glukani. Tako  $\beta$ -glukan, kateri ni razgrajen v procesu slajenja, predstavlja vzrok težav v procesu varjenja [8].

Nekaj encimov je zadolženih za kompletno pretvorbo škroba v glukozo, eden izmed njih je  $\beta$ -amilaza. Je eksoencim, ki hidrolizira  $\alpha$  1→4 vezi, tako, da substrat pristopi iz nereducirajočega konca in odreže dve enoti molekule glukoze (maltoza).  $\beta$ -amilaza je prisotna v škrobnem endospermu surovega ječmena v neaktivni obliki. Toplotno je bolj labilna od  $\alpha$ -amilaze in se je večina uniči po 30–45 min drozganja pri 65 °C [3].  $\alpha$ -amilaza, katera nastaja med procesom drozganja, igra pomembno vlogo pri razgradnji ječmenovega škroba. Je pokazatelj celotnega razpada škroba [9]. Topnost  $\beta$ -glukanov narašča skozi proces slajenja, kjer  $\beta$ -glukani postanejo topni [10].



Vsebnost ječmenovih  $\beta$ -glukanov zaznamo z merjenjem specifične vezave calcofluora (CF) z  $\beta$ -glukani ali encimsko z uporabo  $\beta$ -glukanaze. CF selektivno veže  $\beta$ -glukane, kar omogoča analizo neprečiščenih in surovih izvlečkov. Prisotnost  $\beta$ -glukanov povečuje fluorescentno intenziteto CF in to uporabimo za identifikacijo in kvantifikacijo [11][12].

Zelo dobro so dokumentirane tudi zdravilne učinkovine  $\beta$ -glukanov z visoko molekulsko maso. Do vse večjega poudarka prihaja na pomenu prehranskih vlaknin kot delu uravnotežene prehrane. To velja tudi za topne vlaknine kot so  $\beta$ -glukani, za katere je bilo pokazano, da imajo efekt na glikemično in holestromično naravo živil. Za  $\beta$ -glukane splošno velja, da so zelo varni imunomodulatorji. Imunomodulator je snov, ki spodbuja obrambni mehanizem organizma.  $\beta$ -glukani povečajo naravno obrambo gostitelja proti nekaterim bakterijam, kvasovkam, in patogenim virusom. Poleg tega so pomembni v profilaksiji pri obsevanju [13].

V poskusu, da bi zmanjšali težave, ki jih povzročajo  $\beta$ -glukani v pivovarstvu in živalski krmi, so bili sprejeti različni pristopi, vključno z vzrejo ječmena z zmanjšanimi vsebnostmi te komponente, uporaba le dobro modificiranega slada in dodajanje encimov, ki delujejo na ječmenov  $\beta$ -glukan. Nobena od teh metod ni bila sprejeta za standardno proceduro zaradi pomanjkanja specifičnosti in omejenih kapacitet [14].

Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) je 8.12.2011 objavila, da je svet za dietetične izdelke, prehrano in alergije izdal znanstveno mnenje, da so  $\beta$ -glukani iz ječmena zniževalci holesterola v krvi in zmanjšujejo tveganje za nastanek koronarne srčne bolezni. Dnevna količina zaužitega naj bi bila najmanj 3 g/dan. Hrana in pijača morata vsebovati 1 g ječmenovih  $\beta$ -glukanov na obrok. Raven skupnega in LDL holesterola v krvi znižajo za 17 % [15].

Tako so tudi pri nas v Ljubljani 17.1.2012 z znanstvenimi inštitucijami (Inštitut za Nutricistiko, Nemška družba kliničnih raziskav A&R, Univerza Aarhus Danska), Ministrstvom za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Ministrstvom za gospodarstvo in s predstavniki slovenske živilske industrije potrdili prvo pozitivno ocenjeno zdravstveno trditev v Sloveniji [16].

## 1.1 Tekočinska kromatografija

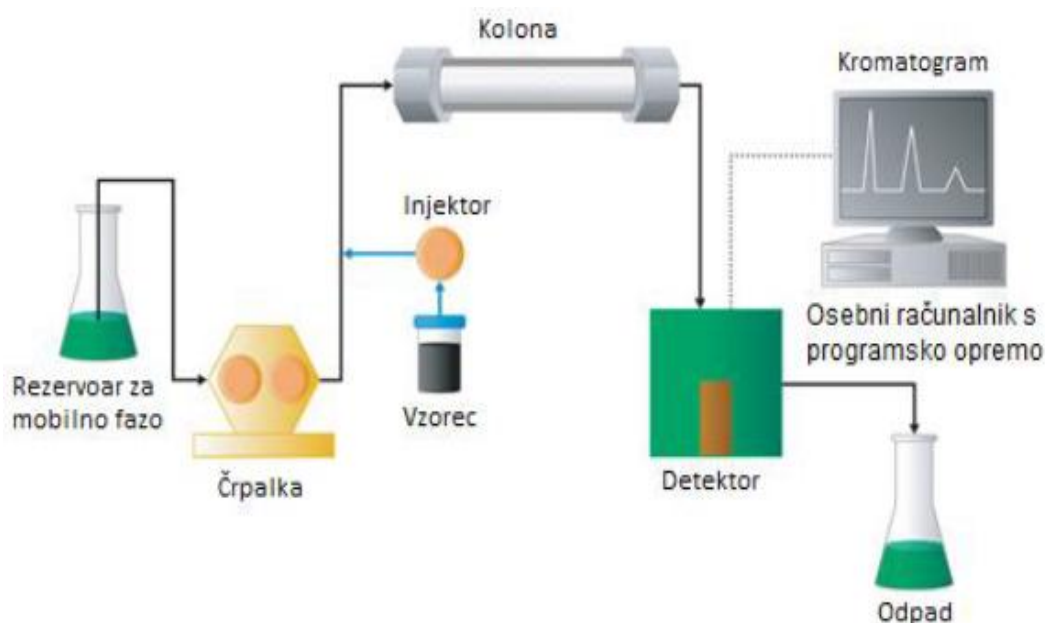
Kromatografija je pogosto uporabljena metoda, katera dovoljuje separacijo, identifikacijo in določitev kemijskih komponent v kompleksnih mešanicih. Separacija temelji na osnovi porazdelitve med mirujočo stacionarno fazo in potujočo mobilno fazo. Ločimo tri osnovne tipe kromatografij, tankoplastna (TLC), plinska (GC) in tekočinska (LC) [17].

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je kolonska kromatografija in najpogosteje uporabljena tehnika. Za stacionarno fazo uporabljamo delce velikosti od 0,5 do 10  $\mu\text{m}$  [18].

Zaradi svoje vsestranskosti se uporablja v forenziki, biokemiji, farmaciji in toksikologiji. Z njo preučujemo tudi okoljske in prehranske vzorce. Princip analitske tehnike je da, preko stacionarne faze potiskamo mobilno fazo v kolono z visokotlačno črpalko pod visokim tlakom [17].

Vzorce v tekoči obliki lahko izmerimo direktno, potem, ko odstranimo majhne delce ali po primerni ekstrakciji odstranitve matričnih motilcev. Trdne vzorce pa moramo najprej raztopiti v primernem topilu [19].

Spodnja slika 1-2 predstavlja shemo HPLC sistema, ki je sestavljen iz mobilne faze, injektorja, visokotlačne črpalke, kolone, detektorja in računalniškega sistema [17].



Slika 1-2: Shematski prikaz sistema HPLC [17]

## KOLONA

Kolona je bistveni del HPLC sistema, saj se v njej dogajajo najpomembnejši separacijski procesi. Izdelana je iz inertnega materiala (nerjaveče jeklo). Od dolžine kolone je odvisna njena ločljivost. V koloni lahko pride do različnih postopkov separacije: adsorpcija, porazdelitev in ločitev na osnovi velikosti molekul [18].

Pri našem delu smo uporabljali HPLC brez kolone, ki je sicer glavni del HPLC sistema. Tako so nam ostali samo injektor, črpalka in detektor.

## INJEKTOR

Injektor je sestavni del tekočinskega kromatografa. Ponovljivost injiciranja s tipično dozirno zanko mora biti dovolj dobra. Veliko HPLC instrumentov ima vključen avtomatski vzorčevalnik z avtomatskim injektorjem. Ta lahko večkratno zaporedno injicira različne volumne vzorca [17].

## ČRPALKA

Črpalka mora vzdrževati stabilen pretok mobilne faze in preprečevati pulziranje, ki povzroča neenakomeren pretok mobilne faze in se lahko sestava mobilne faze spreminja. To dosežemo z batoma, ki delujeta v nasprotnih smereh, eden črpa drugi se polni. Izboljšanje uravnavanja pretoka dosežemo z vstavitvijo tlačnih dušilcev med črpalko in injektor [20]. Plin pod tlakom, črpalka z rezervoarjem in batom, membranske črpalke in recipročne črpalke z eno, dvema ali več črpalnimi glavami so črpalke, ki zagotavljajo enakomeren pretok mobilne faze [18]. Sodobne črpalke že imajo vgrajene mikroprocesorje, ki omogočajo izokratično elucijo (MF konstantne sestave) in gradientno elucijo (MF spreminjajoče se sestave), ter ponovitve nastavljenih sekvenc [20].

V tem delu je mobilna faza imela enako sestavo med celotno analizo, zato tak postopek kromatografske ločitve imenujemo izokratična elucija [18].

## DETEKTOR

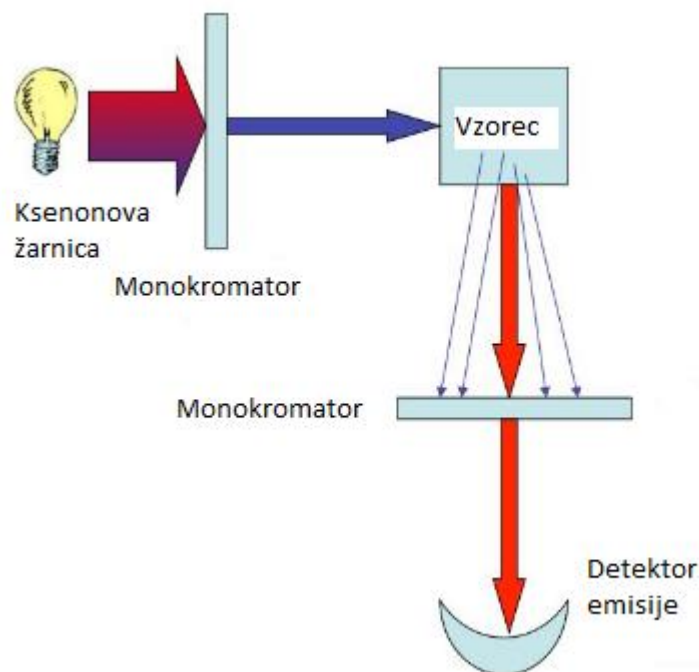
Detektor je aparatura, ki zazna komponente, katere se zaradi različnih fizikalnih in kemijskih interakcij ter lastnosti ločeno eluirajo iz kolone. Njegov odziv je podan kot kromatografski vrh, celoten zapis pa imenujemo kromatogram. Kromatogram nastane s pretvorbo električnega signala v analogni zapis, z uporabo ustreznih instrumentov (rekorder, integrator, računalnik). Kvantitativno informacijo podaja ploščina pod kromatografskim vrhom. So povzročitelji vidnosti ločenih substanc na koloni [18]. Njihov notranji volumen mora biti majhen, da lahko minimizirajo efekt razširitve kromatografskih vrhov [17]. Poznamo več vrst detektorjev: UV–VIS (ultravijolična vidna svetloba), fluorescentni, elektrokemični, masni spektrometer, detektor spremembe lomnega količnika, detektor na sipanje svetlobe. Najbolj razširjena uporaba detektorjev za tekočinsko kromatografijo je osnovana na absorpciji elektromagnetnega valovanja v polju ultravijolične ali vidne svetlobe. Moderni instrumenti uporabljajo detektor z nizom fotodiod (angl. *diode array*), ki lahko pokažejo celotni spekter separiranega analita skozi detektorsko celico [17]. V našem HPLC sistemu smo uporabljali fluorescenčni detektor.

## 1.2 Fluorescenčni detektor

Fluorescenčni detektorji so med bolj občutljivimi HPLC detektorji. Njihova občutljivost je 10-1000 krat večja kot občutljivost UV-VIS detektorja. Pojavu, ko so molekule vzbujene z elektromagnetnim valovanjem in naknadnim sproščanjem odvečne energije v obliki elektromagnetnega valovanja pravimo fotoluminiscenca [21].

Če je sproščanje elektromagnetne energije takojšnje ali pa se ustavi po odstranitvi vzbuditvenega sevanja, rečemo, da je snov fluorescenčna. Fluorescenca je zelo uporabna za proces detekcije in detektorji osnovani na fluorescenčnih meritvah zagotavljajo najvišje občutljivosti dostopne v HPLC. Tehnike, ki uporabljajo fluorescenco nudijo večjo občutljivost, vendar pa so bolj občutljive na instrumentalno nestabilnost (temperatura, tlak). Intenziteta je odvisna od vzbujene in emitirane valovne dolžine. Večina novejših detektorjev lahko hitro preklaplja med vzbuditveno in emitirano valovno dolžino oziroma delujejo pri večih hkrati in s tem ponujajo priložnost za detekcijo večih komponent v mešanici [22].

Na sliki 1-3 je prikazana shema fluorescenčnega detektorja, ki vsebuje ksenonovo žarnico, monokromatorja in pretočno celico z vzorcem [23].



Slika 1-3: Shema tipičnega fluorescenčnega detektorja za tekočinsko kromatografijo [23]

Fluorescenčni HPLC-detektor je komercialno dostopen. Njegova tipična meja zaznavnosti 10 fg je odvisna od komponente, instrumenta, in HPLC pogojev [17].

Fluorescenca je pogosto uporabljena na prehrabnem, okoljskem, in farmacevtskem področju. Ima veliko število pomembnih lastnosti, vključno z visoko občutljivostjo, selektivnostjo in ponovljivostjo [24].

## 2 Eksperimentalni del

Eksperimentalni del diplomske naloge sem opravljala na IHPS Žalec (Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije) v Laboratoriju za agrokemijo in pivovarstvo. Meritve sem izvajala na tekočinskem kromatografu s fluorescenčnim detektorjem (HPLC-FLD).

### 2.1 Materiali

#### 2.1.1 Kemikalije

- H<sub>2</sub>O demineralizirana voda (razred III, ISO standard 3696:1987) [25]
- Standardna raztopina  $\beta$ -glukanov,  $\gamma = 300$  mg/L (Scandinavian Brewery – Laboratory, Danska)
- Calcofluor reagent (CF), type II (Kat. št. SBL R#05, Scandinavian Brewery – Laboratory, Danska)

#### 2.1.2 Laboratorijska oprema

- Merilne bučke 10 mL (Duran, Nemčija)
- Čaše 100 mL (Simax, Češka)
- Avtosampler vial z belo oznako ND 9, (Micro + Polo, Slovenija)
- Avtomatske pipete 5 mL, 10 mL, 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L (Brand, Nemčija)
- Tekočinski kromatograf 1200 series s FLD detektorjem, (Agilent, ZDA)
- Ultrazvočna kopel (Baudelin Sonorex, Nemčija)

### 2.1.3 Aparature

Na spodnjih slikah 2-1 in 2-2 so prikazane uporabljene aparature.

- Tekočinski kromatograf



Slika 2-1: Tekočinski kromatograf Agilent technologies 1200 series

- Ultrazvočna kopel



Slika 2-2: Ultrazvočna kopel, v kateri smo razplinjevali vzorce piv



## 2.2 Laboratorijske metode

Po pregledu literature smo ugotovili, da je za določanje  $\beta$ -glukanov najbolj primerna modificirana fluorimetrična metoda s HPLC, povzeta po MEBAK metodi 2.5.2. [26]. Izbrano metodo smo vpeljali v delo in optimizirali ter delno validirali. Metoda povzeta po literaturi, naj bi bila ponovljiva [25]. Fluorimetrična metoda je objavljena v Analytici-EBC [25, 27, 28]. Metoda je uporabna za vse vrste sladice in piva. Meritve smo izvajali v območju od 25 do 300 mg/L. Z redčenjem osnovne standardne raztopine  $\beta$ -glukanov smo si pripravili dnevno sveže standardne raztopine za umeritveno krivuljo. Vzorce piva je bilo potrebno najprej razpliniti. Postavili smo jih v ultrazvočno kopel za 10 min in s tem odstranili prisotni  $\text{CO}_2$ . CF tvori kompleks z  $\beta$ -glukani. Tvorba kompleksa se odraža v bolj intenzivni fluorescenci, zato je pri vzorcih potrebno takojšnje injiciranje v HPLC sistem, kjer je mobilna faza kar reagent. V primeru visokih odzivnosti aparature vzorce ustrezno razredčimo z vodo.

### 2.2.1 Priprava raztopin in vzorcev

Za pripravo raztopin smo uporabljali demineralizirano vodo. Standardno raztopino  $\beta$ -glukanov s koncentracijo 300 mg/L smo naročili iz Scandinavian Brewery Laboratory PLC, Danska. Uporabili smo jo za pripravo standardnih raztopin za umeritveno krivuljo. Stabiliziran CF reagent smo prav tako naročili iz Scandinavian Brewery Laboratory PLC, Danska in ga uporabili za mobilno fazo.

### 2.2.2 Validacijski postopki za določanje vsebnosti $\beta$ -glukanov v sladici in pivu

Preden smo začeli z določevanjem vsebnosti  $\beta$ -glukanov v pivu, smo opravili validacijo metode. V ta namen smo določali linearnost, natančnost, ponovljivost, obnovljivost, ter izkoristek. LOD, LOQ nismo določali, ker so pričakovane vsebnosti  $\beta$ -glukanov v vzorcih sladice in piva relativno visoke in signifikantno višje od teoretičnih LOD in LOQ. Validacija je postopek, s katerim potrdimo, da uvedena metoda in merjeni rezultati izpolnjujejo zahteve za predvideno uporabo.

#### 2.2.2.1 Določitev umeritvene krivulje in linearnost

Kadar imamo več vzorcev s koncentracijami po širšem koncentracijskem območju, si pripravimo umeritveno krivuljo. V grafu na x-osi nanašamo koncentracije, na y-osi pa merjene ploščine. Naša krivulja ni linearna, ampak je krivulja drugega reda, kar je

predvideno že v sami metodi [28]. Zato smo si pripravili več različnih koncentracij standarda, da dobro pokrijemo naše delovno območje (Tabela 2-1). Iz osnovne raztopine  $\gamma = 300 \text{ mg/L}$ , smo si pripravili razredčene standardne raztopine. Po enačbi 2.0 smo izračunali potreben volumen, ga odpipetirali in dopolnili do oznake na 10 mL merilni bučki. Naše koncentracijsko delovno območje je od 25–300 mg/L.

$$V_1 = \frac{V_2 \cdot \gamma_2}{\gamma_1} \quad (2.0)$$

Kjer je:

$V_1$  = volumen osnovne standardne raztopine [mL]

$V_2$  = volumen merilne bučke v kateri smo raztopino razredčili [mL]

$\gamma_2$  = masna koncentracija delovne standardne raztopine [mg/L]

$\gamma_1$  = masna koncentracija osnovne standardne raztopine  $\beta$ -glukanov [300 mg/L]

Iz delovnih raztopin, ki smo si jih pripravili po zgoraj opisanem postopku, smo si odpipetirali po 1 mL vzorca v 2 viali. Iz vsake viale smo izvedli 2 injiciranja. Prav tako smo si na enak način naredili slepo vrednost (angl. *blank test*). V našem primeru je bila to demineralizirana voda, ISO 3696:1987. Za mobilno fazo smo uporabili CF reagent. Meritve za detekcijo  $\beta$ -glukanov smo izvajali pri naslednjih delovnih pogojih:

Fluorescenčni detektor:

- vzbujevalna valovna dolžina                      395 nm
- emitirana valovna dolžina                         410 nm

Kvarтерна črpalka:

- pretok    1 mL/min
- volumen injiciranja                                20  $\mu\text{L}$
- sobna temperatura                                 25 °C

Iz tabele 2-1 je razviden prikaz izračuna volumna osnovne standardne raztopine za pripravo delovnih raztopin umeritvene krivulje.

Tabela 2-1: Izračun volumna standardnih raztopin s pripadajočimi koncentracijami

$V_1$ [mL]	$V_2$ [mL]	$\gamma_2$ [mg/L]
0,83	10	25
1,67	10	50
2,50	10	75
3,33	10	100
5,00	10	150
5,83	10	175
6,67	10	200
8,33	10	250
10,00	10	300

$V_1$  = volumen osnovne standardne raztopine [mL]

$V_2$  = volumen merilne bučke v kateri smo raztopino razredčili [mL]

$\gamma_2$  = masna koncentracija delovne standardne raztopine [mg/L]

### 2.2.2.2 Določanje izkoristka

V pivu so lahko prisotne snovi, ki lahko pozitivno in negativno vplivajo na naše rezultate meritev, v smislu previsokih in prenizkih vrednosti. V ta namen smo določevali izkoristek (angl. *recovery test*). Znano koncentracijo  $\beta$ -glukanov smo dodali vzorcu piva in primerjali koncentracijo  $\beta$ -glukanov v pivu s in brez standardnega dodatka. Rezultate meritev smo statistično obdelali. Najprej smo preverili morebitne ubežnike z Diksonovim  $Q$ -testom, vendar le-teh ni bilo. Dobljene rezultate koncentracij  $\beta$ -glukanov smo primerjali s teoretično izračunano koncentracijo. Določevanje izkoristka smo izvedli na svetlem vzorcu piva in sicer tako, da smo v 10 mL bučko dodali 0,418 mL standardne raztopine 300 mg/L  $\beta$ -glukanov in dopolnili z 9,582 mL vzorca piva za koncentracijo 10 mg/L. Nato smo odpipetirali 1 mL raztopine vzorca v vialo. Iz ploščine dobljene pod kromatografskim vrhom smo s pomočjo enačbe umeritvene krivulje izračunali koncentracijo  $\beta$ -glukanov.

Primer:

$$\gamma_1 = 60,8 \text{ mg/L}, V_1 = 10 \text{ mL} \rightarrow m_1 = \gamma_1 \cdot V_1 = 0,608 \text{ mg}$$

$$\gamma_2 = 70,8 \text{ mg/L}, V_2 = 10 \text{ mL} \rightarrow m_2 = \gamma_2 \cdot V_2 = 0,708 \text{ mg}$$

Enačba standardnega dodatka:

$$\gamma_1 \cdot V_1 + \gamma_{st} \cdot V_{st} = \gamma_2 \cdot V_2 \quad (2.1)$$

$$V_{st} = 0,418 \text{ mL}$$

$$V_1 = 9,582 \text{ mL}$$

$$V_2 = V_{st} + V_1$$

$$\gamma_1 = \text{masna koncentracija brez standardnega dodatka [mg/L]}$$

$$V_1 = \text{volumen vzorca piva [mL]}$$

$$\gamma_{st} = \text{masna koncentracija standardne raztopine } \beta\text{-glukanov [300 mg/L]}$$

$$V_{st} = \text{volumen dodane standardne raztopine } \beta\text{-glukanov [mL]}$$

Enačba za izračun izkoristka:

$$IZK. (\%) = \frac{c \text{ (brez st. dodatka) } - c \text{ (s st. dodatkom)}}{10} \cdot 100\% \quad (2.2)$$

### 2.2.3 Analiza realnih vzorcev

Različne vrste piva (Slika 2-3) smo najprej temperirali na sobno temperaturo. Iz vsake steklenice smo v 100 mL čašo nalili približno 25 mL piva in ga dali za 10 min v ultrazvočno kopel, da smo odstranili ves CO<sub>2</sub>. Preskušanja smo izvedli pri sobni temperaturi. Po potrebi smo vzorce piva redčili tako, da smo 1 ml razplinjenega in temperiranega piva razredčili v 10 mL merilni bučki do oznake. Nato smo odpipetirali po 1 mL vzorca v dve viali in izvedli meritve po postopku 2.2.2.1.



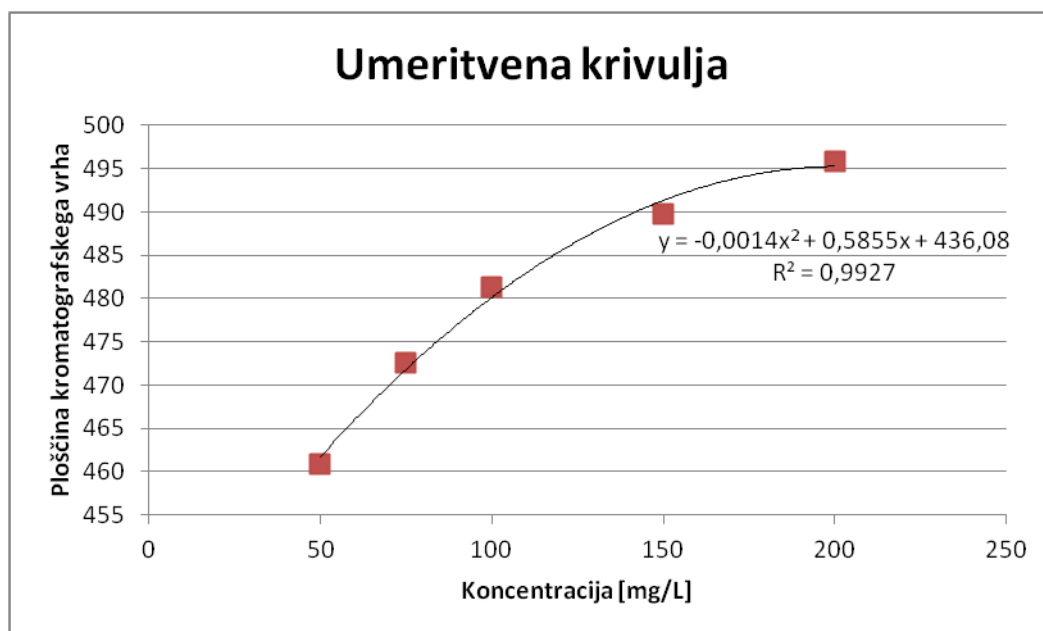
Slika 2-3: Uporabljeni realni vzorci

### 3 Rezultati in diskusija

#### 3.1 Optimiranje analizne metode

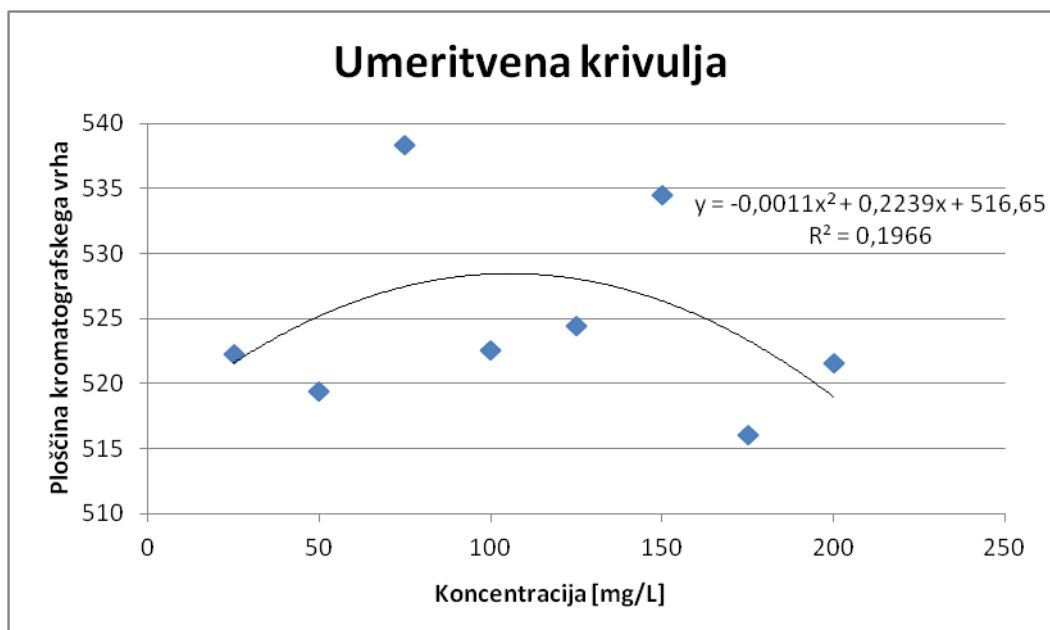
Eksperimentalni del smo začeli s pogoji, pri kateri sta bili valovna dolžina vzbujevanja 360 nm in valovna dolžina emisije 450 nm. Vzorcem piva smo dodajali 50 mL standardne raztopine  $\beta$ -glukanov in 1000  $\mu$ L CF reagenta. Za mobilno fazo smo uporabili filtrirano demineralizirano vodo.

Na sliki 3-1 je prikazana odvisnost ploščine kromatografskega vrha od koncentracije  $\beta$ -glukanov merjene pri valovni dolžini emitiranja 360 nm in valovni dolžini emisije 450 nm.



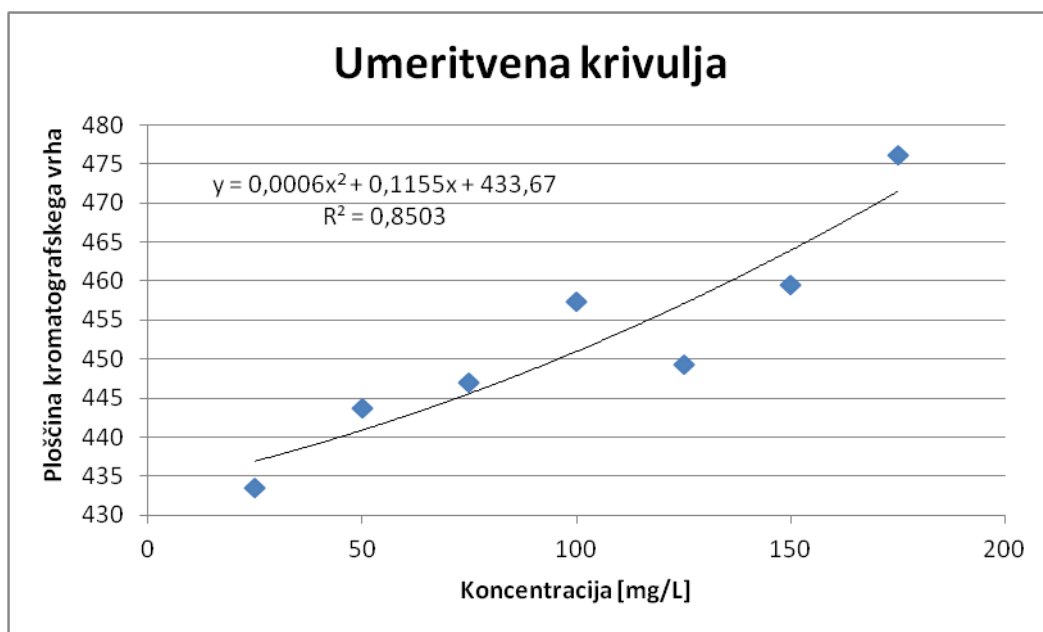
Slika 3-1: Umeritvena krivulja prvega dne

Dobro prilegajoča se umeritvena krivulja prvega dne se je močno spremenila že drugi dan. Prejšnji dan pripravljenim standardnim raztopinam  $\beta$ -glukanov za umeritveno krivuljo smo dodali po 1 mL vzorca v vialo in dodali 50 mL raztopine standarda  $\beta$ -glukanov koncentracije 300 mg/L in 1000  $\mu$ L CF reagenta ter izvedli meritve pri enakih valovnih dolžinah. Slika 3-2 prikazuje umeritveno krivuljo drugega dne.



Slika 3-2: Prikaz umeritvene krivulje drugega dne

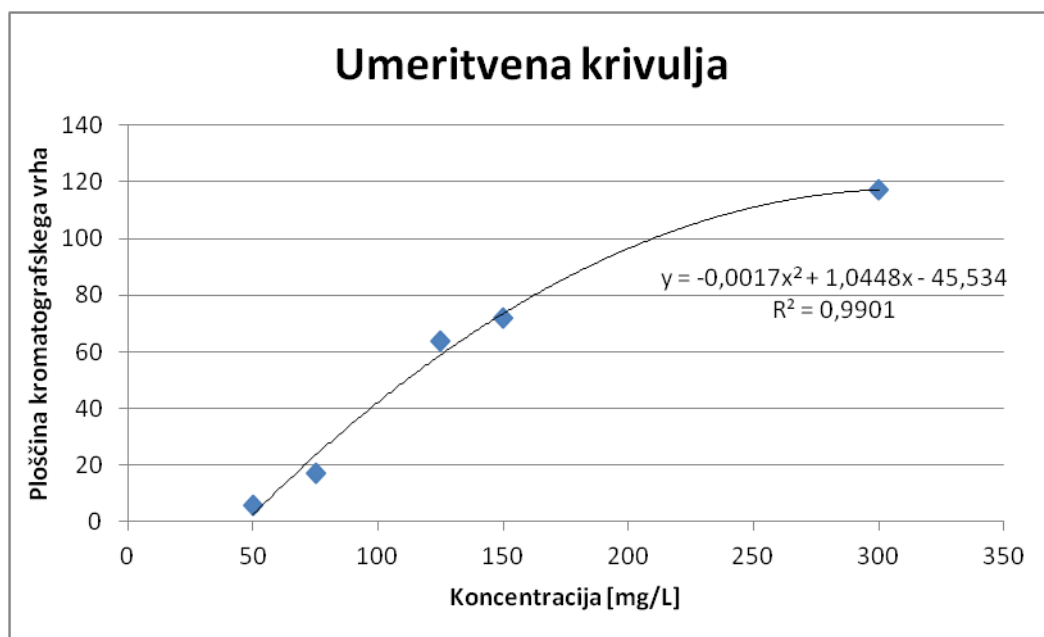
Nato smo te iste že pripravljene vzorce izmerili naslednji dan. Opazno spremembo umeritvene krivulje prikazuje slika 3-3.

Slika 3-3: Odvisnost ploščine kromatografskega vrha od koncentracije  $\beta$ -glukanov v viali s pripravljenim vzorcem drugega dne

Glede na te rezultate smo se odločili, da uporabimo drugo različico metode.



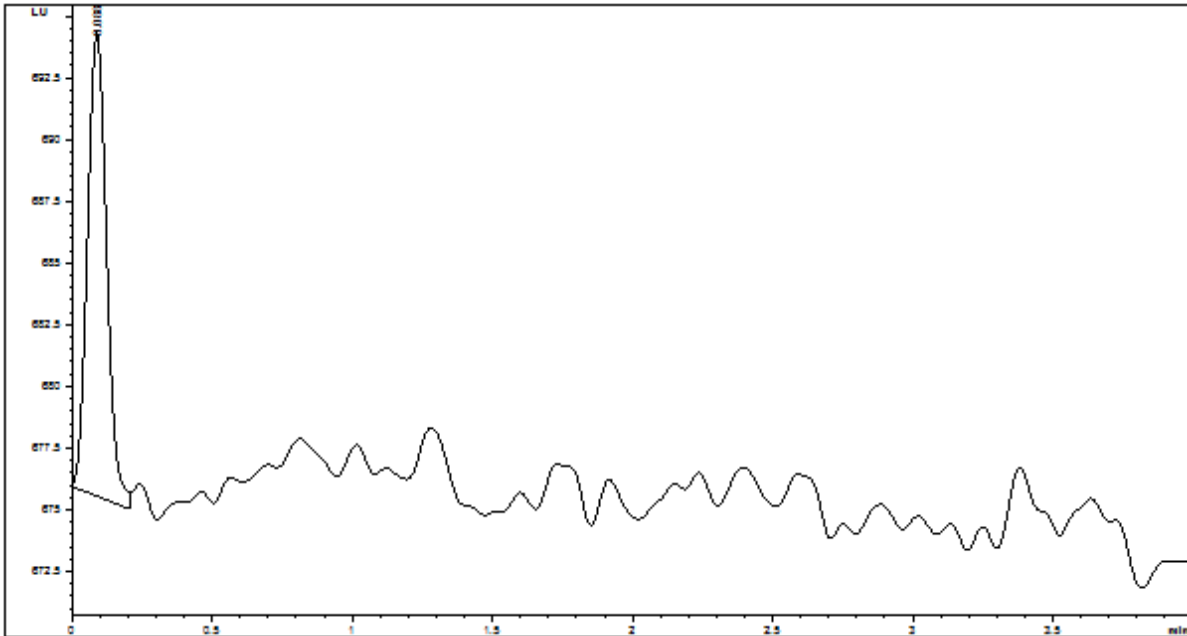
Tretji dan izvajanja meritev smo nastavili valovno dolžino vzbujevanja na 360 nm in valovno dolžino emisije na 425 nm. Umeritvena krivulja se dobro prilega k danim točkam, vendar pa so ploščine kromatografskega vrha zelo nizke. Slika 3-4 prikazuje prileganje umeritvene krivulje k danim točkam pri novih valovnih dolžinah vzbujevanja in emisije.



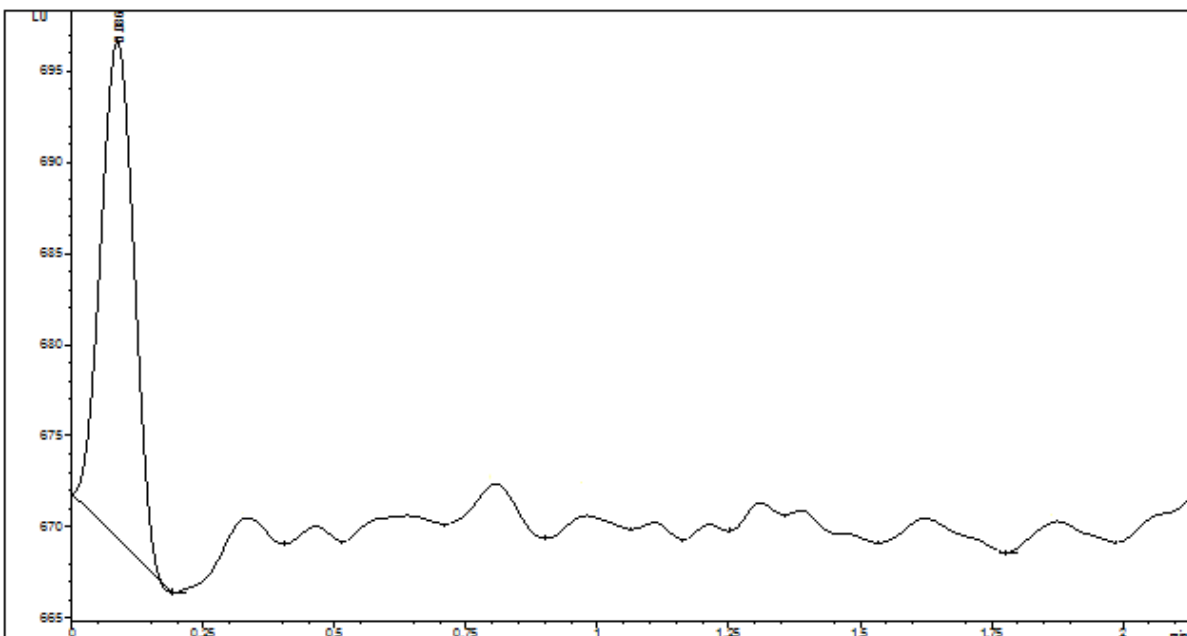
Slika 3-4: Umeritvena krivulja tretjega dne pri valovni dolžini vzbujevanja 360 nm in valovni dolžini emisije 425 nm

Po začetnih rezultatih dela smo ugotovili, da je potrebno umeritveno krivuljo pripraviti dnevno svežo. Potrebna so takojšnja injiciranja vzorcev. Glede na te ugotovitve smo si izbrali nove pogoje dela in meritve izvajali po njih. Posneli smo kromatograme pri različnih valovnih dolžinah in tako ugotovili, da sta pravi valovni dolžini vzbujevanja 395 nm in emisije 410 nm.

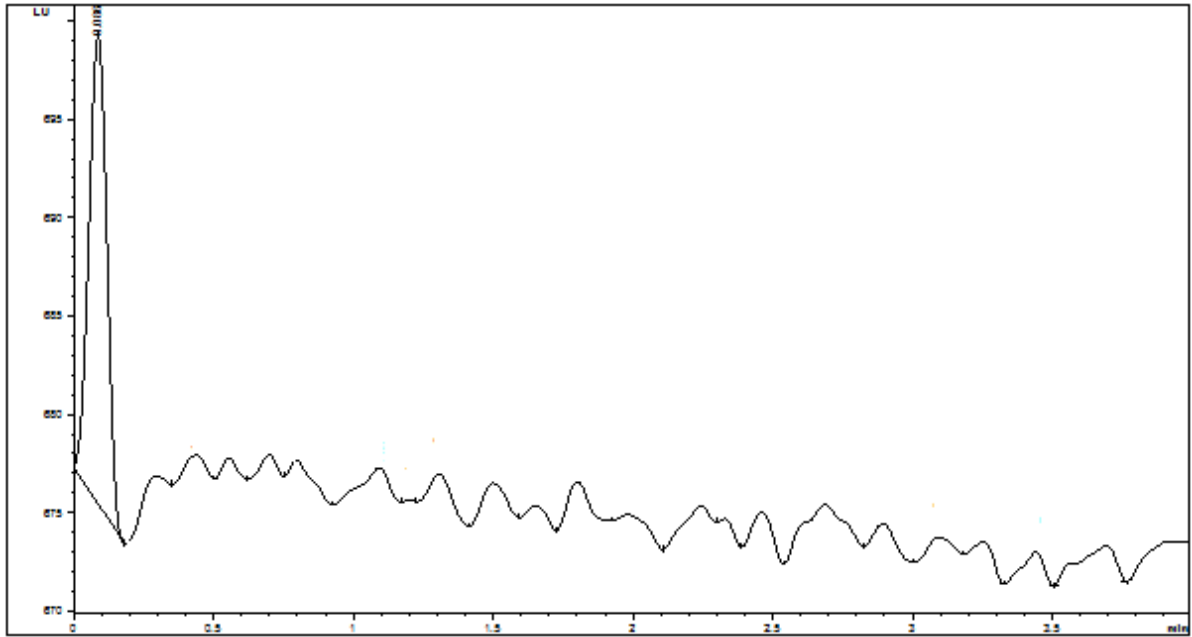
Spodnje slike 3-5, 3-6 in 3-7 prikazujejo HPLC kromatograme, ki so rezultat naših meritev.



Slika 3-5: HPLC-kromatogram vzorca piva pri valovnih dolžinah vzbujevanja 395 nm in emisije 410 nm



Slika 3-6: HPLC-kromatogram drozge pri valovnih dolžinah vzbujevanja 395 nm in emisije 410 nm



Slika 3-7: HPLC-kromatogram vzorca standarda  $\beta$ -glukana koncentracije 25 mg/L pri valovnih dolžinah vzbujevanja 395 nm in emisije 410 nm

## 3.2 Validacija analizne metode

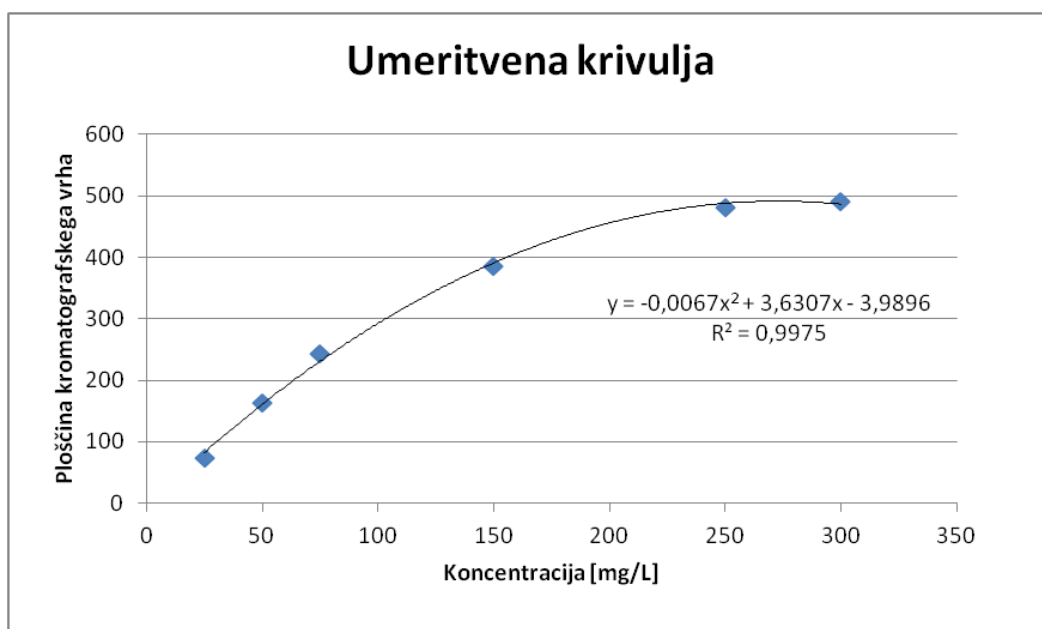
Validacija temelji na naslednjih parametrih:

- Odzivnost detektorja (v našem primeru odziv ni linearen pač pa je umeritvena krivulja funkcija drugega reda tako, da lahko to točko imenujemo tudi odzivnost detektorja na dano koncentracijo)
- Natančnost (dokažemo s ponovljivostjo in obnovljivostjo)
- Točnost (dokažemo s standardnim dodatkom in določitvijo izkoristka)

### 3.2.1 Odzivnost detektorja in umeritvena krivulja

Naša umeritvena krivulja ni linearna, ampak je regresija drugega reda. V Excelu smo izdelali umeritveno krivuljo. V graf smo na abscisno os nanesti koncentracije delovnih standardnih raztopin  $\beta$ -glukanov, na ordinatno os pa izmerjeno ploščino kromatografskega vrha. Metoda ni linearna znotraj območja med 25 in 300 mg/L.

Slika 3-8 prikazuje ploščino kromatografskega vrha v odvisnosti od koncentracije  $\beta$ -glukanov izmerjenih pri valovnih dolžinah vzbujevanja 395 nm in emisije 410 nm.



Slika 3-8: Ploščina kromatografskega vrha v odvisnosti od koncentracije  $\beta$ -glukanov

Enačba:

$$y = -0,0067x^2 + 3,6807x - 3,9896$$

$$R^2 = 0,9975$$

S pomočjo polinomske regresije smo določili parametre kvadratne enačbe, prikazane na sliki 3-8.

$$a = -0,0067$$

$$b = 3,6807$$

$$c = -3,9896$$

Dobljeni  $R^2$  se zadovoljivo prilega točkam umeritvene krivulje.

### 3.2.2 Ponovljivost in obnovljivost

#### *Natančnost*

Natančnost prikazuje sipanje posameznih meritev okoli povprečne vrednosti [29]. Določili smo jo s ponovljivostjo in obnovljivostjo z meritvami na šestih realnih vzorcih ter z enačbo 3.1 izračunali standardni odklon  $s$ .

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.1)$$

Kjer je:

$x_i$  je posamezna meritev

$\bar{x}$  je povprečje meritev

Za ponovljivost smo uporabili vzorec piva. V našem primeru smo imeli komercialno pivo tipa ležak. Metodo smo izvedli na šestih meritvah pod istimi pogoji (metoda, analitik, laboratorij, oprema, kemikalije, itd.). S  $Q$ -testom smo preverili, če je prisoten kakšen ubežnik. Rezultat je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik.

**Dixonov oz.  $Q$ -test**

Dixonov oz.  $Q$ -test je izkustveni test za iskanje ubežnikov. Kadar računamo povprečje meritev nas zanima ali je katera od meritev ubežnik (angl. *outlier*), in jo je treba ponovno preveriti ali celo izpustiti [29].

$$Q^{3-7} = \frac{x_2 - x_1}{x_{max} - x_1} \quad (3.0)$$

Kjer je:

$x_1$  = najmanjša vrednost

$x_2$  = druga najmanjša vrednost

$x_{max}$  = maksimalna vrednost

Preverjanje ubežnikov smo opravili s  $Q$ -testom. Rezultat je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik.

Obnovljivost smo izvajali v dveh zaporednih dneh pri obnovljivih pogojih (metoda, analitik, laboratorij, oprema, kemikalije, itd.).

Izračunali smo standardni odmik, relativni standardni odmik (RSD), povprečje in rezultate podali v spodnji tabeli 3-1.

S pomočjo  $t$ -testa smo določali primerljivost rezultatov med seboj.

Tabela 3-1: Prikaz meritev v dveh dneh pri obnovljivih pogojih

MERITVE	1. dan [mg/L]	2. dan [mg/L]
1	60,18	61,40
2	59,36	58,75
3	60,95	58,15
4	61,18	57,57
5	60,50	58,79
6	58,98	56,36
<b>Število meritev:</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Povprečje:</b>	<b>60,19</b>	<b>58,50</b>
<b>Standardni odmik:</b>	<b>0,87</b>	<b>1,68</b>
<b>Nivo signifikantnosti:</b>	<b>0,05</b>	
<b>Prostostna stopnja:</b>	<b>10</b>	
<b>Skupni standardni odmik:</b>	<b>1,34</b>	
<b><i>t</i>-test (izrač.)</b>	<b>2,19</b>	
<b><i>t</i>-teor.</b>	<b>2,23</b>	

S pomočjo F-testa smo primerjali standardne odmike dveh skupin meritev in ugotavljali ali obstaja razlika med obema skupinama meritev.

$$F(\text{izrač.}) = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{1,68^2}{0,87^2} = 3,73 \quad (3.2)$$

$$F(\text{teor.})(0,05;5,5) = 7,146$$

$F_{izr} < F_{teor}$ , zato med skupinama ni signifikantnih razlik in lahko izračunamo skupni standardni odmik, medtem ko pri  $F_{izr} > F_{teor}$  ne moremo izračunati skupnega standardnega odmika. Vidimo da je  $t(\text{teoretični})(0,05, 10) = 2,23 > t(\text{izračunani})$ , s tem smo dokazali, da med dvema skupinama meritev ni signifikantnih razlik in je metoda obnovljiva.

Glede na ugotovitev, da med skupinami meritev ni signifikantnih razlik, smo uporabili povprečje meritev prvega in drugega dne ter dobili skupni standardni odmik, kateri je 1,34 mg/L ter RSD = 2,26 %.

Na osnovi dobljenih rezultatov smo določili, da se rezultati lahko opravičeno podajajo kot cela števila, brez decimalnih mest. To je tudi predvideno v metodi Analytica-EBC, 3.10.2, 2007 [28].

Predvidena ponovljivost podana v metodi po Analytica-EBC za pivo je 1,7 mg/L, obnovljivost metode pa 5,2 mg/L, kar je več kot znaša naš rezultat [25]. Na osnovi tega sklepamo, da je metoda s stališča ponovljivosti in obnovljivosti uspešno validirana.

### **3.2.3 Točnost**

Pravilnost oz. točnost smo preverjali z določitvijo izkoristka.

#### ***3.2.3.1 Določanje izkoristka***

Meritve smo opravili na realnem vzorcu komercialnega piva tipa ležak s katerim smo določali tudi obnovljivost metode. Znano količino analita smo dodali vzorcu in opravili tri meritve. Izračunali smo izkoristek in s tem preverili točnost. Meritve smo izvedli po postopku opisanem v točki 2.2.2.2.

Koncentracija analita brez standardnega dodatka je bila 58,5 mg/L.

Za vse tri meritve smo izračunali izkoristek po enačbi 2.2 in izračunali njegovo povprečje, ki je znašalo 101,7 %. S tem lahko potrdimo, da je metoda točna.



### 3.3 Meritve na realnih vzorcih

#### 3.3.1 Določanje $\beta$ -glukanov v komercialno dostopnih pivih

Vzorci različnih vrst piv za analizo smo pripravili po postopku 2.2.2.2. Rezultati merjenih vzorcev piv, kupljenih v trgovini so podani v tabeli 3-2. Zraven rezultatov naših meritev so podani tudi osnovni podatki, ki določajo tip piva (ekstrakt v sladici, vsebnost alkohola, barva in tip piva v odvisnosti od uporabljene kvasovke za fermentacijo).

Tabela 3-2: Karakteristične vrednosti vzorcev

Vzorci	Ekstrakt [%]	Alkohol [%]	Barva piva	Vrsta piva v odvisnosti od fermentacije, tipa slada in vsebnosti alkohola	$\beta$ - glukani [mg/L]
1	14,12	5,99	temno	ale	<b>158</b>
2	16,09	6,82	svetlo	ležak	<b>173</b>
3	7,25	2,87	svetlo	pšenično	<b>103</b>
4	5,29	0,83	svetlo	pšenično brezalkoholno	<b>221</b>
5	13,14	5,55	temno	ale	<b>126</b>
6	12,44	4,94	temno	ale	<b>105</b>
7	9,17	3,68	temno	ale	<b>126</b>
8	15,17	6,39	svetlo	ležak	<b>108</b>
9	9,24	3,85	temno	ale	<b>199</b>

Tip piva, ale ali ležak, sta odvisna od vrste kvasovk. Kvasovke se delijo na dve skupini, kvasovke zgornjega vrenja in kvasovke spodnjega vrenja. Med seboj se razlikujejo po morfoloških, fizioloških in tehnoloških lastnostih. Kvasovke spodnjega vrenja se nahajajo v obliki samostojnih celic, med tem, ko kvasovke zgornjega vrenja tvorijo skupke celic. Manj encimov vsebujejo kvasovke spodnjega vrenja. Delitev na zgornje in spodnje vrenje je posledica njihovega različnega obnašanja v času vrenja. V času vrenja se kvasovke zgornjega vrenja zbirajo na površini, med tem, ko se kvasovke spodnjega vrenja na koncu fermentacije naložijo na dno. [8]

Ale je pivo zgornjega vrenja. Fermentirano je pri višjih temperaturah kot ležak (med 15 in 24 °C). Ležak je pivo spodnjega vrenja, ki je podvrženo fermentaciji pri temperaturah blizu ničle. Kvas povzroči fermentiranje piva med 5 in 13 °C. Proces lahko traja od nekaj tednov do nekaj mesecev.

Nekatere vzorce smo redčili, saj so koncentracije  $\beta$ -glukanov teh vzorcev izven našega delovnega območja. Temna piva (vzorci 1, 5, 6, 7, 9) vsebujejo približno 85 % svetlega slada in 15 % temnega slada. Temni slad, ki ga dobimo s praženjem svetlega, je dodan samo za okus.

Praženje slada se koristi za pridobivanje piv temne barve in posebne arome [8].

Praženje slada uniči aktivnost encimov pri temperaturi 46-78 °C. Hitri temperaturni prehod povzroči, da  $\beta$ -glukani ostanejo v otrobih nastalih pri drozganju in ne preidejo v sladico.

Vzorca 2 in 8 sta piva tipa ležak. Vzorec številka 3 je pšenično pivo. Pšenično pivo je po navadi narejeno iz 60 do 70 % ječmenovega in 30-40 % pšeničnega slada.

Iz slada zimske pšenice se pridobiva pivo svetle barve [8].

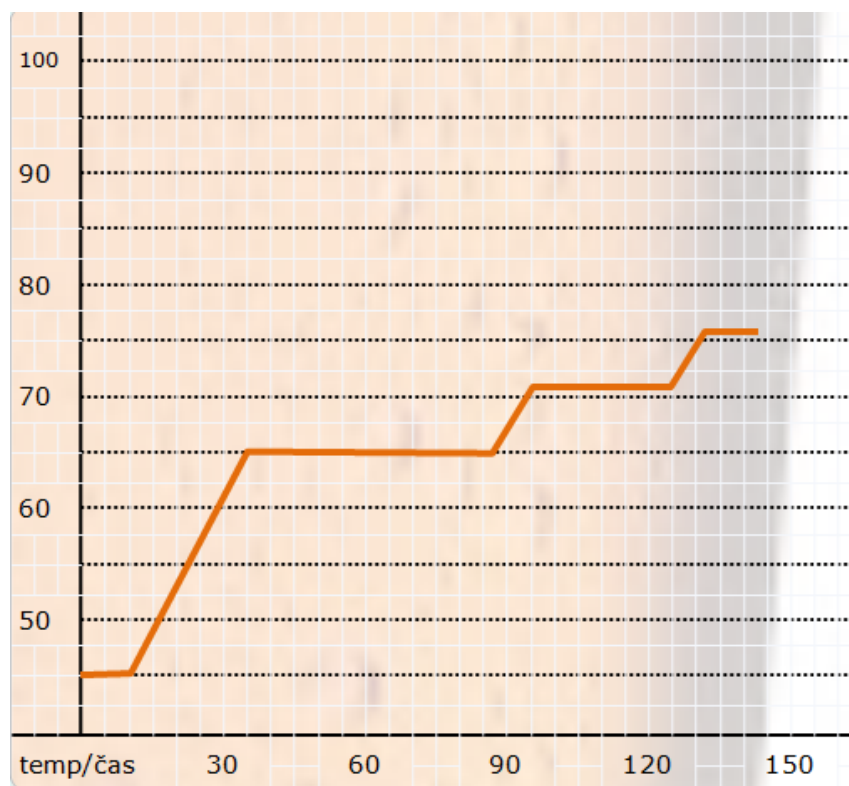
Vzorec številka 4 je pšenično brezalkoholno pivo. Dovoljena vsebnost alkohola v brezalkoholnem pivu je 0,5 %. Meritev je pokazala 0,83 % alkohola, kar pomeni, da je fermentacija šla predaleč ali pa pri naknadnem odstranjevanju alkohola le-ta ni bil odstranjen v zadostni meri.

Iz rezultatov vidimo, da vsebnost  $\beta$ -glukanov ni odvisna od barve piva, temveč od vrste slada, temperaturnega režima pri drozganju, načina fermentacije in načina zorenja.

Vse vrednosti so v pričakovanem območju, zaradi razlik med uporabljenimi sladi in različnimi tehnologijami.

### 3.3.2 Določanje $\beta$ -glukanov v drozgi, sladici, pivini in mladem pivu proizvedenem v mikropivovarni IHPS

Pivo varjeno na IHPS je bilo sestavljeno iz več različnih sladov in hmelja, ter ene vrste kvasa zgornjega vrenja Safale US-05 (Fermentis, Francija). Slad so posušena ali pražena žitna zrna. Hmelj da pivu grenak okus in aromo, kvas pa povzroči alkoholno vrenje. Zvarjeno pivo je vrste pale ale hladno hmeljeno. Na sliki 3-9 je prikazan diagram drozganja piva v mikropivovarni na IHPS. Proces je bil izveden v štirih stopnjah drozganja. Prva stopnja je potekala 10 min pri 45 °C, druga 50 min pri 65 °C, tretja 30 min pri 72 °C in četrta stopnja 10 min pri 76 °C.



Slika 3-9: Diagram drozganja

Kuhanje sladice smo prav tako izvedli v štirih stopnjah. Te stopnje se imenujejo hmeljenje. Med varjenjem se dodajajo različne vrste hmelja. Fermentacijo smo izvajali pri temperaturi 16–18 °C, 4–6 dni. Z dodajanjem kvasa smo povzročili alkoholno vrenje. Sladkorji so se pretvorili v alkohol, ogljikov dioksid in toploto. Pri tem so se sprostili tudi nosilci arome, ki jih kot sekundarne metabolite v okolje oddajajo kvasovke med fermentacijo. Fermentiranje poteka v zaprtih posodah različnih oblik in velikosti. Za bistrost piva je potrebna filtracija.

Hraniti ga je treba v temnem in hladnem prostoru, ker je občutljivo na sončno svetlobo in toploto.

V Tabeli 3-3 so prikazani rezultati določanja vsebnosti  $\beta$ -glukanov v drozgi, sladici, pivini in nefiltriranem mladem pivu, ki smo jih pripravili v mikropivovarni IHPS. Iz naraščanja vsebnosti  $\beta$ -glukanov je lepo razvidna dinamika sproščanja le-teh v posameznih fazah vrelnega diagrama. Nižja vsebnost  $\beta$ -glukanov v mladem pivu je posledica vezanja le-teh na večje aglomerate, ki se izločajo v fazi vrenja in zorenja.

Tabela 3-3: Vsebnost  $\beta$ -glukanov v drozgi, sladici in pivu proizvedenem v mikropivovarni na IHPS

Vzorci	Ekstrakt [%]	$\beta$ - glukani [mg/L]
drozga	13,43	<b>16</b>
sladica	13,55	<b>104</b>
pivina	12,12	<b>156</b>
nefiltrirano mlado pivo	2,50	<b>107</b>

## 4 Zaključek

Namen diplomske naloge je bil vpeljati, optimirati in delno validirati metodo za določevanje vsebnosti  $\beta$ -glukanov v sladici in pivu.

Analize smo izvajali s tremi različicami ene metode, da smo ugotovili katera je primerna za naše meritve. Spreminjali smo valovne dolžine vzbujevanja in emisije. Za mobilno fazo smo uporabili CF reagent namesto filtrirane deionizirane vode. Standardne raztopine za umeritveno krivuljo smo dnevno pripravili sveže, saj je drugače prišlo do prevelikih odstopanj pri dnevno izvedenih meritvah standardnih raztopin.

Validacijo smo opravili z izdelavo umeritvene krivulje v območju od 25 do 300 mg/L. Dobili smo krivuljo drugega reda, katere  $R^2$  je bil 0,9975. Tako lahko trdimo, da se dobljena krivulja dovolj dobro prilega točkam umeritvene krivulje. LOD in LOQ nismo določali, ker smo ugotovili, da so pričakovane koncentracije  $\beta$ -glukanov v vzorcih visoke in signifikantno višje od teoretičnih LOD in LOQ. S pomočjo računalniškega programa Excel smo obdelali rezultate ter jih v Wordu podali v tabelah. Rezultati ponovljivosti dveh zaporednih dni so bili medsebojno primerljivi. Obnovljivost metode smo dokazali s pomočjo  $t$ -testa. Z vrednostjo skupnega standardnega odmika smo ugotovili, da lahko podajamo rezultate na cela števila brez decimalnih mest. Nekateri prisotni snovi v pivu lahko negativno ali pozitivno vplivajo na izmerjene rezultate v smislu previsokih in prenizkih vrednosti. 101,7 % povprečni izkoristek nam podaja pravilnost merjenja in minimalen vpliv matriksa na določitev. Rezultati so temu primerno ustrezni. Vsebnost  $\beta$ -glukanov ni odvisna od barve piva, temveč od vrste slada, temperaturnega režima pri drozganju, načina fermentacije in načina zorenja. Zaradi razlik med uporabljenimi sladi in različnimi postopki pridobivanja piv so vse izmerjene vrednosti v pričakovanem območju.

Metoda je selektivna, na kar lahko sklepamo iz pojavljanja samo enega vrha, sprejemljivega izkoristka in odziva detektorja pri različnih koncentracijah. Hkrati je tudi znano, da spada FLD med zelo selektivne detektorje. Z izvedbo naših meritev na realnih vzorcih smo ugotovili, da je metoda primerna za vse vrste piv, sladice in pivin. Posebnih omejitev ni, razen razplinjanja in redčitve, če so ploščine pod kromatografskimi vrhovi previsoke.

## 5 Literatura

- [1] Novak M., Vetvicka V.  $\beta$ -glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *Journal of Immunotoxicology*. 5, 47 - 57, 2008.
- [2] Soo Young K., Hong Ji S., etc . Biomedical Issues of Dietary fiber  $\beta$ -Glucan. *J Korean Med Sci*. 21, 781-789, 2006.
- [3] Bamforth C.W. *Scientific Principles of Malting and Brewing*, Minnesota: American society of brewing chemists, 2010.
- [4] Otama L. et al Rapid Determination of High Molecular Weight Beta-Glucan Using a Photometric Method. *Thermo Fisher Scientific*. Finska. 2015.
- [5] Edney M.J., Marchylo B.A., MacGregor A.W. Structure of total barley beta-glucan. *Journal of the Institute of Brewing*. 97 (1,2), 39 - 44, 1991.
- [6] Silveira Celestino K.R., Cunha R.B., Felix C.R. Characterization of a  $\beta$ -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochemistry*. 23 (7), 2006.
- [7] Wood J., Paton D., Siddiqui I.R. Determination of  $\beta$ -glucans in oats and barley. *Cereal Chem*. 54 (3), 524-533, 1976.
- [8] Kunze W. *Tehnologija sladarstva i pivarstva*. Beograd: Jugoslovensko udruženje pivara, 1998.
- [9] Ingversen J., Englyst A. Evaluation of malting quality in a barley breeding programme use of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -glucan levles in malt as preselection tools. *Journal of the Institute of Brewing*. 95, 99-103, 1989
- [10] Marconi O. et al Effects of malting on molecular weight distribution and content of water-extractable  $\beta$ -glucans in barley. *Food Research International*. 64, 677-682, 2014.
- [11] Bhatti R.S., MacGregor A.W., Rossnagel B.G. Total and Acis-Soluble  $\beta$ -Glucan Content of Hulless Brley and Its Relationship to Acid-Extrct Viscosity. *Cereal Chem*. 68 (3), 221-27, 1991.
- [12] Vatandoust A. *Beta-Glucanase Activity and its Impact on Beta-Glucan Molecular Weight Degradation in Cereal Products Fortified with Beta-Glucan*. Canada 2012.
- [13] Vetvicka V., Novak M. *Biology and Chemistry of Beta Glucan*. Bentham Books, 2011.

- [14] McCleary B.V., Shameer I., Glennie-Holmes M. *Methods in Enzymology*. 160, 545-551, 1988.
- [15] PCT, PollyCell Technologies, 2011. <http://poly-cell.com/> (dostop 27.5.16)
- [16] Valens, Science-backed nutrition for healthy living. BBG, 2010. <http://barleybetaglucan.eu/sporocilo-za-javnost/> (dostop 27.5.16)
- [17] Skoog D.A., et al *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8.th edition, 2004
- [18] Brodnjak Vončina D. *Analizna kemija II, zbrano gradivo*. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2013
- [19] Harvey D. *Modern Analytical Chemistry*, 1.st edition, DePauw Univerity. McGraw Hill Higher Education 2000
- [20] Rouessac F., Rouessac A. *Chemical analysis. Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2.nd edition, John Wiley & Sons, France, 2007
- [21] Crawford Scientific Ltd., *Chromatography every step of the way*, 1998. <http://www.crawfordscientific.com/Chromatography-Technical-Tips-Diode-Array-Detector-Settings.html> (dostop 15.6.16)
- [22] Hplc.chem.shu.edu: New index - Analytical Chemistry Pages, 2015. [http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC\\_Book/Detectors/det\\_flur.html](http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/det_flur.html) (dostop 17.6.16)
- [23] Brian Cunningham, ECE 416 Fluorescence II, Illinois, 2013. <https://nanohub.org/resources/17359/about> (dostop 8.8.16)
- [24] Scott R. P. W. *Liquid chromatography detectors*, Chrom-Ed Book Series, 2003. [http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/LCD\\_S.pdf](http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/LCD_S.pdf) (dostop 10.6.16)
- [25] Analytica-EBC, High Molecular Weight  $\beta$ -Glucan Content of Beer: Fluorimetric Method. 9.31.2, 2008.
- [26] Jacob F. MEBAK: *Wort, Beer, Beer-based Bevarages*. Nemčija. 2013.
- [27] Analytica-EBC, High Molecular Weight  $\beta$ -Glucan Content of Wort: Fluorimetric Method. 8.13.2, 2004.
- [28] Analytica-EBC, High Molecular Weight  $\beta$ -Glucan Content of Barley: Fluorimetric Method. 3.10.2, 2007
- [29] *Izobraževanje, Z.z.t. Statistične metode in merilna negotovost*. Zbornik predavanj. Ljubljana, 1998.

## 6 Življenjepis

### OSEBNI PODATKI

Govejšek Tamara

📍 Griže 123/b, 3302 Griže (Slovenija)

☎ 031894606

✉ tamara.govejssek@hotmail.com

Spol Ženski | Datum rojstva 4.9. 1993 | Državljanstvo slovensko

### DELOVNE IZKUŠNJE

8/2014–9/2014

#### Počitniško delo

Mirosan, d.o.o., Petrovče (Slovenija)

cepljenje sadik

pobiranje jabolk

9/2014–10/2014

#### Počitniško delo

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec (Slovenija)

Pomoč v laboratoriju

8/2015–9/2015

#### Praktično usposabljanje

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec (Slovenija)

Analiza zemlje, vzorčenje hmelja

4/2016

#### Opravljanje eksperimentalnega dela

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec (Slovenija)

### IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

2008–2012

#### Gimnazijski maturant

Splošna in strokovna gimnazija, Velenje (Slovenija)

2012–2016

#### Univerzitetna diplomirana kemičarka

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor (Slovenija)



## KOMPETENCE

Materni jezik

slovenščina

Drugi jeziki

angleščina

nemščina

RAZUMEVANJE		GOVORJENJE		PISNO SPOROČANJE
Slušno razumevanje	Bralno razumevanje	Govorno sporazumevanje	Govorno sporočanje	
B2	B1	A2	A2	B1
A1	A1	A1	A1	A1

Stopnja: A1 in A2: Osnovni uporabnik - B1 in B2: Samostojni uporabnik - C1 in C2: Usposobljeni uporabnik

[Skupni evropski jezikovni okvir](#)

Vozniško dovoljenje B