

# Utjecaj promjene procesnih parametara na razgradnju $\beta$ -glukana tijekom slađenja golozrnog ječma

---

Kovačić, Azra

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:224645>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Azra Kovačić**

**UTJECAJ PROMJENE PROCESNIH PARAMETARA NA RAZGRADNJU  
 $\beta$ -GLUKANA TIJEKOM SLAĐENJA GOLOZRNOG JEČMA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za Procesno inženjerstvo  
Katedra za Bioprocesno inženjerstvo  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Tehnologija slada i piva  
**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj dana 27. lipnja 2019.  
**Mentor:** prof. dr. sc. Vinko Krstanović  
**Komentor:** dr. sc. Gordana Šimić, znanstvena savjetnica  
**Pomoć pri izradi:** doc. dr. Kristina Mastanjević

**Utjecaj promjene procesnih parametara na razgradnju  $\beta$ -glukana tijekom slađenja golozrnog ječma**

Azra Kovačić, 0113134893

**Sažetak:**

Razgradnja  $\beta$ -glukana jedan je od osnovnih zahtjeva prilikom procesa slađenja jer se njihovom uspješnom (dubokom) razgradnjom povećava iskorištenje ekstrakta iz zrna ječma. Iako je početni udjel  $\beta$ -glukana pretežito genotipsko svojstvo (zavisno od sorte) primjenom adekvatno podešenih procesnih parametara tijekom pojedinih faza slađenja može se značajno utjecati na stupanj njegove razgradnje i time, značajno poboljšati vrijednosti pokazatelja kvalitete gotovog slada. Golozrni ječam ima veći udjel  $\beta$ -glukana od standardnog pivskog ječma pa njihovoj razgradnji tijekom slađenja treba posvetiti veću pažnju. Cilj rada je ustanoviti na koji način se promjenom dijagrama slađenja može utjecati na povećanje stupnja razgradnje  $\beta$ -glukana. Zbog toga, zadatak rada je provesti mjerenje udjela  $\beta$ -glukana u polaznom ječmenom zrnu i gotovim sladovima u dva modificirana postupka slađenja s padajućom temperaturom klijanja i standardnom MEBAK postupku i procijeniti uspješnost svakog postupka s obzirom na postavljeni cilj. Dobiveni rezultati ukazuju da oba modificirana postupka slađenja utječu na smanjenje topljivosti  $\beta$ -glukana. Modificirani postupak mikroslađenja 1 s temperaturama močenja 18,5 – 19 °C u kombinaciji s padajućim temperaturama klijanja (19 – 15 °C) daje najbolje rezultate razgradnje  $\beta$ -glukana u odnosu na uspoređene postupke. Sorta Mandatar pokazuje veći uspjeh u smanjenju početnog udjela  $\beta$ -glukana u zrnu.

**Ključne riječi:** beta glukani, golozrni ječam, slad, slađenje, sladovina

**Rad sadrži:** 46 stranica  
23 slika  
3 tablica  
0 priloga  
43 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

1.	doc. dr. sc. Kristina Mastanjević	predsjednik
2.	prof. dr. sc. Vinko Krstanović	član-mentor
3.	dr. sc. Gordana Šimić, znanstvena savjetnica	član-komentorica
4.	doc. dr. sc. Antun Jozinović	zamjena člana

**Datum obrane:** 24. rujna 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**

**Faculty of Food Technology Osijek**

**Department of Process Engineering**

**Sub-department of Bioprocess Engineering**

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Graduate program Food Engineering**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Malting and Brewing Technology

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on July 27, 2019..

**Mentor:** Vinko Krstanović, PhD, full prof.

**Co-mentor:** Gordana Šimić, PhD, scientific advisor

**Technical assistance:** Kristina Mastanjević, PhD, assistant prof.

### **The Influence of Changing the Process Parameters on $\beta$ -Glucan Degradation During Malting Procedure of Hulless Barley**

Azra Kovačić, 0113134893

#### **Summary:**

One of the basic requirements during the malting process is degradation of  $\beta$ -glucans. Their successful (deep) degradation is important because it increases the yield of barley grain extract. Although the initial content of  $\beta$ -glucans is predominantly a genotypic trait (dependent on the variety), the application of adequately adjusted process parameters during certain malting phases can significantly affect the degree of degradation of  $\beta$ -glucans and, consequently, significantly improve the values of quality indicators in the obtained malt. Hulless barley has a higher content of  $\beta$ -glucans than standard barley used in beer production and thus their decomposition during malting requires more attention. The aim of this study is to determine how the degree of  $\beta$ -glucan degradation can be increased by adjusting the malting process. Therefore, the task is to measure the content of  $\beta$ -glucans in the starting barley grain and finished malt and wort in two modified malting procedures with decreasing germination temperatures, compare them to the standard MEBAK procedure and evaluate the success of each procedure in relation to the set goal. The obtained results indicate that both modified malting processes have the effect of reducing the solubility of  $\beta$ -glucans. The modified micromalting process 1 with wetting temperatures of 18.5 – 19 °C in combination with falling germination temperatures (19 – 15 °C) gives the best results of  $\beta$ -glucan degradation among the compared processes. The Mandatar variety shows greater success in reducing the initial content of  $\beta$ -glucans in the grain.

**Key words:** beta-glucans, hulless barley, malt, malting, wort

**Thesis contains:** 46 pages  
23 figures  
3 tables  
43 references

**Original in:** Croatian

#### **Defense committee:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Kristina Mastanjević, PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Vinko Krstanović, PhD, full prof.          | supervisor   |
| 3. Gordana Šimić, PhD, scientific advisor     | member       |
| 4. Antun Jozinović, PhD, assistant prof.      | stand-in     |

**Defense date:** September 24, 2021

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. PIVARSKI JEČAM .....	4
2.1.1. Građa i sastav ječmenog zrna.....	4
2.1.2. Golozrni ječam .....	8
2.1.3. Proizvodnja golozrnog ječma u Hrvatskoj.....	10
2.1.4. Sorte golozrnog ječma Osvit i Mandatar .....	11
2.2. PROIZVODNJA SLADA .....	12
2.3. B-GLUKANI.....	14
2.3.1. Značaj $\beta$ -glukana u pivarstvu.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
3.1. ZADATAK .....	19
3.2. MATERIJAL I METODE .....	19
3.2.1. Materijal .....	19
3.2.2. Metode rada .....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	33
4.1. REZULTATI .....	34
4.2. RASPRAVA .....	37
5. ZAKLJUČCI .....	40
6. LITERATURA .....	42

## Popis oznaka, kratica i simbola

EBC	Europska pivarska konvencija
MEBAK	Srednjoeuropska komisija za pivarsku analitiku
PIO	Poljoprivredni Institut Osijek
s.t.	suha tvar
U	Internacionalna jedinica enzimske aktivnosti (U = $\mu\text{mol}/\text{min}$ )

## **1. UVOD**

Sorte golozrnog ječma (*Hordeum vulgare nudum*) karakterizira odsustvo pljevice što predstavlja niz ekonomskih prednosti od kojih je u prvom redu olakšana obrada zrna prije upotrebe ili prerade. Zahvaljujući nedostatku pljevice, golozrne sorte pokazale su veći prinos alkohola u proizvodnji žitnih rakija i veći udio ekstrakta u proizvodnji piva. Ipak, njihova primjena u pivarstvu se tek istražuje zbog određenih izazova na koje se nailazi u procesu slađenja, što kasnije, dovodi do tehnoloških problema u proizvodnji piva. Slađenje podrazumijeva močenje, klijanje i sušenje proklijalog zrna čime se dobiva osnovna sirovina za proizvodnju piva – slad. Problemi koji se pojavljuju pri slađenju golozrnih sorti isključivo se dotiču uzročno-posljedičnih veza povišenog sadržaja  $\beta$ -glukana (karakterističnog za golozrne sorte), lošije modifikacije zrna i otežanog bubrenja. Posljedično, dobiveni gotovi slad je sniženih pokazatelja kvalitete (lošija friabilnost i fermentabilnost, snižen udio ekstrakta).

$\beta$ -glukani koji se pojavljuju u ječmu su linearni homopolisaharidi sastavljeni od jedinica glukoze međusobno povezanih  $\beta$ -1,4- i  $\beta$ -1,3-vezama, a njihova uloga u zrnu je izgradnja staničnih stijenki endosperma i aleuronskog sloja. Ukoliko su nedovoljno razgrađeni,  $\beta$ -glukani uzrokuju probleme kod ekstrakcije, filtracije i bistrenja piva, najviše zbog sposobnosti formiranja gela i povišenja viskoznosti otopine. Istraživanjem golozrnih sorti ječma (Habschied i sur., 2021; Krstanović i sur., 2015), primijećeno je da su ove sorte, u usporedbi sa sortama koje sadrže pljevicu, otpornije na modifikacijske promjene u fazi močenja, pokazujući smanjeno upijanje vode, zbog čega dolazi do nedovoljne razgradnje endosperma i lošije razgradnje  $\beta$ -glukana, a to izravno utječe na pokazatelje kvalitete gotovog slada.

Sorte Osvit i Mandatar novije su sorte golozrnog ječma čija primjena u proizvodnji slada i piva nije temeljito istražena. Kao i mnoge druge golozrne sorte, karakterizira ih visoki udio  $\beta$ -glukana. Ovaj rad istražuje kako primjena povišenih temperatura močenja u kombinaciji sa padajućim temperaturama klijanja utječe na konačni udio  $\beta$ -glukana u sladu. Provedena su dva modificirana postupka močenja i klijanja, a rezultati su uspoređeni s vrijednostima  $\beta$ -glukana u sladu dobivenim primjenom standardnog mikroslađenja prema MEBAK postupku.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. PIVARSKI JEČAM

Ječam je osnovna sirovina u tehnologiji piva. Tradicionalno se od ječma proizvodi slad, a procesom fermentacije vodenog ekstrakta slada nastaje pivo. Ječmom se danas često i zamjenjuje dio slada od kojeg se proizvodi pivo. Osim sladarstva i pivarstva, upotreba ječma kao sirovine ili prerađevine raširena je u ishrani životinja, prehrani ljudi i industriji. Industrijski se od ječma proizvode ječmeni i sladni sirupi koji se koriste, osim u pivarstvu, u industriji alkohola, tekstila te farmaceutskoj industriji (Divjak, 2005). Kao nusproizvod pri proizvodnji slada nastaju sladne klice koje se mogu iskoristiti kao dodatak hrani za životinje zahvaljujući nutritivno bogatom sastavu koji obiluje proteinima, vlaknima i vitaminima (Beluhan, 2001).

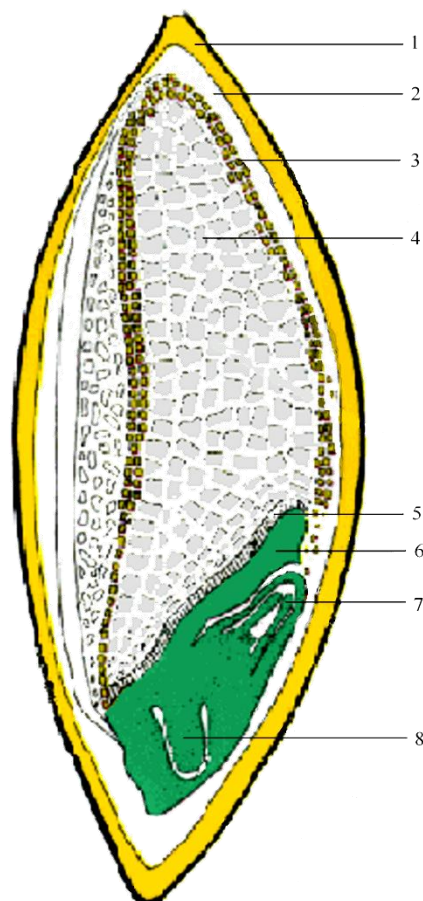
Botanički, ječam se svrstava u porodicu trava *Gramineae*. Za proizvodnju slada značajni su rodovi *Hordeum vulgare* i *Hordeum sativum*. Prema rasporedu zrna u klasu ječma razlikujemo dvoredni, šesteroredni i četveroredni ječam. Ječam se dijeli i prema vremenu žetve. Prema tome, razlikujemo jari ječam koji se sije od veljače do travnja te ozimi ječam s optimalnim vremenom sjetve sredinom listopada, ovisno o podneblju. Za potrebe pivarstva do sada je najčešće bio korišten *jari dvoredni ječam*. Pri oplemenjivanju ječma s ciljem dobivanja novih sorti, tehnološki su najznačajniji pokazatelji visoki udio ekstrakta te dobra citološka razgrađenost zrna (Leskošek-Čukalović, 2002; Šimić, 2009).

### 2.1.1. Građa i sastav ječmenog zrna

#### Građa ječmenog zrna

Zrno ječma vretenastog je oblika obavijeno pljevicom koja je srasla sa sjemenim opnama zrna. Golozrni ječam predstavlja izuzetak. Njegova pljevica nije srasla sa zrnom te se prilikom vršidbe uklanja ostavljajući zrno „golim“ (Leskošek-Čukalović, 2002).

Unutarnja građa zrna podrazumijeva tri osnovna dijela: embrionalni dio, endosperm i omotač (Kunze, 1998).



**Slika 1** Presjek zrna ječma: 1 – pljevica, 2 – perikarp (oplodnjača) i testa (sjemenjača), 3 – aleuronski sloj, 4 – endosperm, 5 – štitić (*scutellum*), 6 – embrio, 7 – začetak lista i stabljike, 8 – začetak korijena (Šimić, 2009; Gaćeša, 1979).

**Embrionalni dio** čini embrio sa začecima lisne klice i korjenčića. Embrionalni dio i endosperm su odvojeni tankim slojem tkiva štitića i slojem epitelnih stanica duguljastog polisadnog oblika tankih stijenki (Kunze, 1998). Štitić je polupropusna opna koja omogućuje prijelaz hranjivih tvari iz endosperma u klicu i obratno. U fazi klijanja, u klici se sintetiziraju enzimi koji kroz štitić prelaze u endosperm gdje kataliziraju razgradnju rezervnih hranjivih tvari. Ovo je izuzetno važno za proces slađenja ječma. Embrio zauzima oko 2,8 – 5 % mase zrna (Kovačević i Rastija, 2014; Gaćeša, 1979).

**Endosperm** je sastavljen od stanica ispunjenih škrobnim zrcima te čini najveći dio (75 – 80 %) suhe mase zrna ječma. Upravo je ovaj dio zrna najznačajniji za sadržaj ekstrakta u sladu, odnosno pivu. Prilikom klijanja, škrob pohranjen u ovim stanicama služi za proizvodnju energije potrebne za razvoj embrija. Osim škroba, u ovim se stanicama nalazi cjelokupna količina  $\beta$ -amilaze i dio dekstrinaza, enzima važnih u procesu slađenja. Stanične stijenke

stanica endosperma povezane su u čvrsti skelet od hemiceluloze, gumastih i proteinskih molekula. Stanične stijenke se sastoje od približno 71 %  $\beta$ -glukana i 23 % araboksilina. Endosperm je okružen aleuronskim slojem koji je bogat proteinima te od velikog značaja za nastajanje enzima tijekom slađenja. U aleuronskom sloju prisutni su još polifenoli, fosfor i ostale mineralne tvari te niz hidrolitičkih enzima koji sudjeluju u razgradnji zrna tijekom klijanja (Leskošek-Čukalović, 2002).

**Omotač zrna** sastoji se od sedam slojeva. Od njih su tri najznačajnija: sjemenjača ili testa, oplodnjača ili perikarp i pljevica. Testa je unutrašnja opna koja se nalazi uz aleuronski sloj zrna. Testa je polupropusna što znači da omogućava jedino prolaz čiste vode. Perikarp obavija testu a njega slijedi epidermis koji je izvana zaštićen pljevicom. Glavni gradivni elementi pljevice su celuloza i hemiceluloza. U njoj se mogu pronaći i spojevi poput tanina, gorkih sastojaka i testinske kiseline koji, iako prisutni u manjoj količini, mogu se negativno odraziti na kvalitetu piva (Kunze, 1998). U usporedbi s ostalim sortama, golozrni ječam u svojoj punoj zrelosti nema pljevicu sraslu sa zrnom, zbog čega, tijekom procesa žetve ona sama opada. Nedostatak pljevice isključuje navedeni negativni utjecaj tvari iz pljevice na kvalitetu piva (Lalić i sur, 2018).

### **Kemijski sastav ječmenog zrna**

Kemijski sastav zrna ječma može varirati u širokim granicama zavisno od sorte, agroekoloških uvjeta (zemljišta, klimatskih uvjeta, lokaliteta), primijenjenih agrotehničkih mjera pa čak i od zrna do zrna u jednoj istoj partiji (Gaćeša, 1979; Leskošek-Čukalović, 2002).

**Vlaga** u zrnu ječma može varirati od 12 % pa do 20 %, najčešće iznosi oko 14 – 15 %. Vlažnost zrna u zavisnosti je od klimatskih uvjeta prije i za vrijeme žetve. Poželjno je da je vlaga niža kako bi se ječam mogao uspješno čuvati (Kunze, 1998).

**Ugljikohidrati** su najzastupljeniji sastojci ječma. Ovo je široka skupina spojeva, a pojedini ugljikohidrati različito utječu na preradu i kvalitetu ječma. U značajnije spadaju škrob, šećeri, celuloza, hemiceluloza i gumaste tvari.

**Škrob** je najvažniji sastojak ječmenog zrna (Kunze, 1998). Njegov prosječni udio u suhoj tvari prikazan je u **Tablici 1**, premda može doseći i više vrijednosti (Leskošek-Čukalović, 2002). Škrob je od velikog značaja jer predstavlja uskladištenu energiju koja je potrebna za život zrna i rast embrija. Uskladišten je u škrobnim granulama u obliku amiloze i amilopektina.

Amiloza i amilopektin se bitno razlikuju svojom strukturom, što se odražava na mogućnost njihove razgradnje za vrijeme slađenja i komljenja (Kunze, 1998).

Amiloza je linearni polisaharid smješten u unutrašnjosti škrobnih granula i iznosi 20 – 25 % ukupne mase škroba ječmenog zrna. Sastoji se od 200 do 400 jedinica  $\alpha$ -D glukoze povezanih  $\alpha$ -(1,4) vezama. Amilopektin je razgranati polisaharid smješten na perifernim dijelovima škrobnih granula, čini 75 – 80 % ukupne mase škroba, a na višim temperaturama tvori škrobni lijepak. Sastavljen je od nekoliko tisuća jedinica  $\alpha$ -D glukoze povezanih  $\alpha$ -(1,4) vezama koje su na mjestima grananja povezane  $\alpha$ -(1,6) vezama (Kunze, 1998; Šubarić i sur., 2011).

**Šećeri** se u ječmu nalaze u klici i aleuronskom sloju, a služe za metabolizam embrija (Kunze 1998; Leskošek-Čukalović, 2002). Njihov udjel je malen (1 – 2 %), a znatnije količine nastaju tek tijekom klijanja razgradnjom škroba. Od šećera se mogu pronaći saharoza, rafinoza, glukoza, fruktoza i maltoza (Leskošek-Čukalović, 2002).

**Celuloza** u ječmu je strukturna komponenta pljevice (2 – 5 % zrna). Celuloza je netopljiv linearni polisaharid, enzimi slada je ne mogu razgraditi, stoga ne utječe na kvalitetu piva.

**Hemiceluloze** su sastojak staničnih stijenki endosperma (Kunze, 1998). Njihov sadržaj ovisi o sorti ječma i uvjetima uzgoja. Hemiceluloze se sastoje od dvije frakcije koje imaju različit utjecaj na proizvodnju i kvalitetu piva:  $\beta$ -glukana i pentozana (Leskošek-Čukalović, 2002).

**Bjelančevine**, iako se javljaju u relativno niskom udjelu u ječmu (**Tablica 1**), mogu negativno utjecati na kvalitetu piva, naročito bistroću. Promatrajući njihovo ponašanje u procesu proizvodnje piva, možemo ih podijeliti na proteine i njihove razgradne produkte. Zahvaljujući svojoj velikoj molekularnoj masi, bjelančevine su sklone taloženju prilikom denaturacije. Prema Osborne-u, bjelančevine se dijele u nekoliko grupa od kojih su u ječmu zastupljeni glutelini, globulini, prolamini i albumini. Razgradni produkti bjelančevina su topivi u vodi, stoga se teško uklanjaju i gotovo su uvijek prisutni u gotovom pivu (Kunze, 1998).

**Lipidi** su najvećim dijelom smješteni u aleuronskom sloju i klici. Najzastupljeniji su trigliceridi, no prisutna je i mala količina njihovih derivata. U sladovinu najčešće prelazi oko 0,5 % lipida, no i u toj količini se ne može zanemariti njihov utjecaj na metabolizam kvasca, stabilnost pjene i okus piva (Leskošek-Čukalović, 2002).

**Mineralne tvari** koje se najvećim udjelom pronalaze u ječmu su fosfor, silicij i kalij, najčešće u obliku njihovih soli. Od elemenata u tragovima prisutni su cink, bakar, mangan te čitav niz drugih elemenata koji imaju fiziološki značaj i utjecaj na zbivanja u toku fermentacije.

Od **ostalih spojeva** još prisutnih u ječmu, no bitnih u tehnologiji piva, mogu se izdvojiti taninske, odnosno fenolne tvari (sadržane u pljevici, daju gorčinu i trpkost pivu), vitamini B skupine te enzimi (Kunze, 1998).

**Tablica 1** Kemijski sastav suhe tvari zrna ječma (Lásztity, 1999)

<b>Prosječni sastav suhe tvari zrna ječma (% / s.t.)</b>	
<b>Ukupni ugljikohidrati</b>	78-83
Škrob	51-67
Saharoza	1-2
Monosaharidi	1-2
Arabinoksilani	4-8
B-glukani	2,5-6,0
Celuloza	2-5
<b>Ukupne bjelančevine</b>	8-15
Albumini i globulini	1-4
Hordeini	3-6
Glutelini	3-6
Aminokiseline i peptidi	0,5
<b>Ukupni lipidi</b>	2-3
Trigliceridi	0,5-1,3
Fosfo-i glikolipidi	0,5-1,3
Voskovi i steroli	0,1-0,2
<b>Mineralne tvari</b>	1,9-2,5

### 2.1.2. Golozrni ječam

Golozrni ječam latinskog naziva *Hordeum vulgare nudum* prepoznatljiv je po odsustvu pljevice nakon žetve zbog čega nije potrebna njegova naknadna obrada (ljuštenje, brušenje). Samim time olakšana je njegova primjena u prehrani ljudi ili ishrani životinja, transport, obrada i skladištenje. To čini njegovu uporabu ekonomičnijom jer dolazi do manje oštećenja i kontaminacije mikroorganizmima te su smanjeni gubitci u procesu mljevenja (Lalić i sur., 2013). U pogledu hranjivih tvari, golozrni ječam usporediv je s ostalim često upotrebljavanim

žitaricama. Tako u njemu pronalazimo visok sadržaj bjelančevina, dijetalnih vlakna i raznih elemenata u tragovima. Osim vlaknima, ove sorte ječma bogate su  $\beta$ -glukanima koji su također poznati po svom značaju u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Šimić i sur., 2017). Nadalje, golozrni ječam ima veliki potencijal kao alternativni izvor za proizvodnju škroba, s obzirom na svoju nisku proizvodnu cijenu i široku dostupnost (Chang and Lv, 2016).

Razvoj novih sorti golozrnog ječma započeo je u Kanadi 1970-ih godina, isprva za upotrebu u stočarstvu, a potom i za ljudsku prehranu. Kasnije, započinje se s ispitivanjem njegove namjene u tehnologiji piva i proizvodnji žitnih rakija (Scotch, Whisky). U proizvodnji žitnih rakija upotreba golozrnih sorti pokazala je veće prinose alkohola (Habschied i sur., 2021; Agu i sur., 2009). U tehnologiji slađenja, golozrni ječam, iako pogodan za proizvodnju kvalitetnog slada, nije još pronašao svoju namjenu (Shaveta i sur., 2019; Habschied i sur., 2021). Najvažnija prednost njegovog korištenja u pivarstvu je ekonomski aspekt. Budući da pljevica čini ekonomski nedostatak jer predstavlja gubitak suhe tvari (Rennecke i Sommer, 1979), povezano s time golozrni ječam ima 5 – 7 % (minimalno 2 %) više vrijednosti ekstrakta slada što je značajan pokazatelj kvalitete (Habschied i sur., 2021; Kerry i Barr, 1995; Edney i Langrell, 2004; Krstanović i sur., 2015; Evans i sur., 2014; Rossnagel i sur., 2012). Nasuprot tome, golozrni ječam ima određene nedostatke pri upotrebi kao sladna sirovina. Nedostatak pljevice čini embionalni dio golozrnog ječma nezaštićenim i izloženim oštećenjima za vrijeme manipulacije pa tako i slađenja. To može izazvati nepotpuno klijanje i lošiju razgrađenost slada što, po nekim autorima, može biti razlog lošijih pokazatelja kvalitete slada (Habschied i sur., 2021; Evans i sur., 2014).

Habschied i sur. (2021) proveli su komparativno istraživanje pokazatelja kvalitete slada usporedbom nekoliko sorti ozimog golozrnog ječma sa sortama ozimog ječma koje sadrže pljevicu. Rezultati (Habschied i sur., 2021.) pokazuju da su sorte golozrnog ječma otpornije na modifikacijske promjene koje nastupaju tijekom faze močenja zrna u procesu slađenja, točnije, sorte golozrnog ječma pokazale su smanjeno upijanje vode tijekom močenja te vrlo nisku friabilnost (pokazatelj razgrađenosti endosperma) u odnosu na sorte ozimog ječma koje sadrže pljevicu. Odgovarajuća optimizacija postupka slađenja, naročito produljeno vrijeme močenja i niže temperature klijanja, mogle bi se pokazati uspješnima u rješavanju ovog problema i donijeti bolje rezultate pokazatelja kvalitete slada (Habschied i sur., 2021).

Krstanović i sur. (2015) ukazuju kako je visok sadržaj  $\beta$ -glukana, koji je karakterističan za sorte golozrnog ječma (ispitivane sorte bile su Matko i GZ-184), razlog smanjenog upijanja vode u području endosperma zrna te niže aktivnost enzima, što ima za posljedicu slabiju razgrađenost tijekom slađenja. To izravno utječe na ostale pokazatelje kvalitete slada (Krstanović i sur, 2015).



**Slika 2** Golozrni ječam (Lalić i sur., 2018)

### **2.1.3. Proizvodnja golozrnog ječma u Hrvatskoj**

Usljed razvoja pivarstva i sladarstva u Republici Hrvatskoj, povećava se potražnja za pivarskim ječmom. Površine zasijane ječmom rastu i teži se ka povećanju kakvoće poznatih sorti. Za željenu pivarsku kvalitetu i visoki urod vrlo su važni uvjeti uzgoja i odgovarajuća tehnologija proizvodnje za što je neophodno osigurati odabir kvalitetnog sortimenta u samome početku (Kovačević i sur., 1994). U Republici Hrvatskoj do sada nije zabilježena tradicija uzgoja golozrnog ječma niti je u prehrambenoj industriji prepoznata mogućnost njegovog većeg namjenskog korištenja (Lalić i sur., 2013). Unazad nekoliko godina, na području Slavonije ispitivane su agronomske karakteristike određenih genotipova golozrnog ječma. Ustanovljeno je da ispitivani genotipovi pružaju značajne mogućnosti u pogledu korištenja pozitivne interakcije genotip-okolina kod određenih agronomskih svojstava i šire utvrđene adaptabilnosti. Ovo ukazuje da se može postići dobro korištenje agronomskog potencijala različitih regija Republike Hrvatske u pogledu uzgoja sorti golozrnog ječma (Abičić i sur., 2017).



### 2.1.4. Sorte golozrnog ječma Osvit i Mandatar

Sorte Osvit i Mandatar priznate su na temelju ispitivanja Sortne komisije Republike Hrvatske te su uvrštene na nacionalnu Sortnu listu RH i Zajedničku sortnu listu Europske Unije. Ispitivanje ovih sorti obavljeno je u Republici Hrvatskoj u Zavodu za sjemenarstvo i rasadničarstvo Osijek u trajanju od dvije godine. Obje sorte pokazuju povećan udio  $\beta$ -glukana u odnosu na uobičajene pivarske sorte (Lalić i sur., 2018).

**Osvit** sorta priznata je od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja Republike Hrvatske 2014. godine. Sorta je namijenjena ljudskoj prehrani i stočarstvu. Osvit je priznat kao različita, ujednačena i postojana sorta koja ima posebnu gospodarsku vrijednost. Dvogodišnjim ispitivanjem, sorta je pokazala rezultate uroda na razini oba standarda (sorte Barun i Favorit). Osvit spada u skupinu dvorednog golozrnog ječma. Ovo je srednje rana sorta koja dobro podnosi zimske nepogode, sušu i rasprostranjene biljne bolesti. Ima dobar koeficijent produktivnog busanja postižući oko 9000 klasova/m<sup>2</sup> i sjetvu od oko 400 – 450 klijavih zrna/m<sup>2</sup>. Stabljika doseže visinu od oko 85 cm, čvrsta je i elastična što ima za posljedicu dobru otpornost na polijeganje. Udio proteina u zrnu Osvita je 12 – 14 % (Lalić i sur., 2018).

**Mandatar** sorta priznata je 2017. godine od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja Republike Hrvatske. Sorta Mandatar je također namijenjena potrebama ljudske prehrane i stočarstva te prepoznata kao različita, ujednačena i postojana, pokazujući posebnu gospodarsku vrijednost i namjenu. Mandatar doseže visinu stabljike od oko 90 cm. Sorta je otporna na polijeganje i na nepovoljne uvjete poput suše i niskih temperatura. Postiže oko 900 klasova/m<sup>2</sup> i pokazuje dobar koeficijent produktivnog busanja. Udio proteina je nešto viši, 13 – 16 % (Lalić i sur., 2018).



**Slika 3** Sorta Osvit (Lalić i sur., 2018)



**Slika 4** Sorta Mandatar (Lalić i sur., 2018)

## 2.2. PROIZVODNJA SLADA

Proizvodnja slada, odnosno slađenje, podrazumijeva klijanje žitarica u kontroliranim uvjetima te termičku obradu dobivenog zelenog slada. Osušeni ječmeni slad naziva se pivski slad i on predstavlja osnovnu sirovinu za proizvodnju klasičnog piva. Industrijska proizvodnja slada se obavlja u sladarama (Leskošek-Čukalović, 2002). Naime, kako bi se mogli utvrditi optimalni uvjeti za slađenje ili provjeriti kvaliteta pivarskog ječma, slađenje se može provesti u umanjenom postrojenju tzv. mikrosladari, a proces se tada naziva mikroslađenje.

Slad se proizvodi isključivo od pivskog ječma koji zadovoljava određene kriterije kakvoće. Cilj slađenja je podvrgnuti zrno ječma specifičnim kemijskim i fizikalnim transformacijama. Primjenom određenih uvjeta, utječe se na povećanje enzimskog potencijala zrna i sintezu enzima. Osnovne faze procesa slađenja su: močenje, klijanje i sušenje zrna (Leskošek-Čukalović, 2002). U **Tablici 2** prikazani su uobičajeni uvjeti procesa slađenja prema Schuster i sur (1988).

**Tablica 2** Procesni parametri u različitim fazama slađenja (Schuster i sur., 1988)

Ječam	Skladištenje	Vlaga	12-14%
		Temperatura	12°C
Modifikacija endosperma	Močenje	Udjel vode	45%
	Klijanje	Vrijeme	5 dana
		Temperatura	12-16°C
Sušenje	Temperatura	Oko 85°C	
	Vlažnost	4%	
Slad	Dorada slada i skladištenje		

Ječam korišten za slađenje mora biti očišćen od stranih primjesa, a ako je nedavno obavljena žetva, pažljivo skladišten određeno vrijeme kako bi se prevladala „faza pospanosti“. U istaknutoj fazi ječam se ne može sladiti već ga je potrebno uskladištiti pazeći na uvjete vlage i temperature (Leskošek-Čukalović, 2002). Prije skladištenja je važno i sortiranje, jer različite

veliĉine zrna razliĉito upijaju vlagu ŝto bi moglo dovesti do neujednaĉene kvalitete slada (Kunze, 1998).

**Moĉenje** je prva tehnološka faza slaĉenja u kojoj se zrna vlaŝe potapanjem u vodu i oroŝavanjem kako bi se izazvalo klijanje. Potrebno je postići vlagu od 42 – 46 % kako bi klijanje bilo ravnomjerno a transformacije zrna optimalne. Temperatura vode za moĉenje treba biti u rasponu 10 – 18 °C. Ova faza traje oko 40 – 48 h, a sastoji se od naizmjeničnog potapanja zrna i cijedenja ili tzv. zraĉnog odmaranja. U fazi zraĉnog odmaranja, zrna su bez vode uz povremeno oroŝavanje i usisavanje osloboĉenog CO<sub>2</sub> (Leskoŝek-ĉukalović, 2002).

U poĉetku procesa moĉenja zrno jeĉma ubrzano upija vodu zbog ĉega njegov volumen raste (bubri), a ŝto je primijenjena temperatura viŝa, to je brŝe i upijanje vode. Kasnije se upijanje vode usporava. Prodiranjem vlage u unutraŝnjost zrna, dolazi do aktiviranja vaŝnih enzima i stimuliranja aktivnosti embrija. Zrno tada poĉinje disati, stoga je vrlo vaŝno osigurati dovoljnu koliĉinu O<sub>2</sub> zbog ĉega je vaŝna faza zraĉnog odmaranja (Kunze, 1998). Kada se na zrnu pojavi bijeli trag izdanka korijena, tradicionalno se zavrŝava moĉenje i zapoĉinje klijanje (Leskoŝek-ĉukalović, 2002).

**Klijanje** je tehnološki najvaŝnija faza slaĉenja jer u njoj dolazi do sinteze novih i aktivacije postojećih enzima koji vrŝe modifikaciju zrna (Kunze, 1998). Glavni cilj klijanja, te slaĉenja u cjelini, je postizanje ŝeljene modifikacije zrna koja ukljuĉuje formiranje enzimskog potencijala, sintezu i aktivaciju enzima, te odreĉenu kemijsku razgradnju endosperma kojom nastaje ekstrakt i mijenjaju se reološka svojstva zrna. *Ekstrakt* slada ĉine sve topljive komponente koje se ekstrahiraju iz slada ukomljavanjem (Leskoŝek-ĉukalović, 2002). Stupanj hidratacije i difuzija enzima unutar endosperma od odluĉujuće su vaŝnosti za uspješnu modifikaciju endosperma jeĉma u procesu klijanja (ŝimić, 2009; MacLeod i Duffus, 1964).

Prilikom klijanja u zrnu jeĉma nastaje nova biljka ŝto znaĉi da se odvija rast korjenĉića i lisne klice. Ovo zahtjeva veliku koliĉinu energije i sastojaka koji se crpe iz zrna uzrokujući tako razgradnju endosperma. No da bi se izbjegli preveliki gubitci sastojaka zrna, enzimska razgradnja se tijekom slaĉenja suzbija (Kunze, 1998). Razgradnja podrazumijeva citolitiĉku, proteolitiĉku i amilolitiĉku razgradnju zrna.

Citolitiĉka razgradnja obuhvaća razgradnju sastojaka staniĉnih stijenki, ponajprije endosperma kojeg ĉine molekule hemiceluloze i celuloze (Gaĉeŝa, 1979). Ovdje je

najznačajnija razgradnja  $\beta$ -glukana u kojoj sudjeluju endo- i egzo- $\beta$ -glukanaze (Gaćeša, 1979; Kunze, 1998).

Proteolitička razgradnja odvija se uz pomoć endo- i egzo-peptidaza, a zahvaća proteine, peptide i polipeptide (Gaćeša, 1979). U matriksu bjelančevina uklopljene su škrobne granule, te razgradnja bjelančevina omogućava  $\alpha$ -amilazi da započne s razgradnjom škroba. Osim toga, razgradnjom bjelančevina osiguravaju se aminokiseline neophodne za proces fermentacije sladovine u proizvodnji piva (Šimić, 2009; Enari i Sapanen, 1986).

Amilolitička razgradnja uključuje razgradnju škroba do dekstrina i šećera (Gaćeša, 1979). Za vrijeme klijanja škrob se hidrolizira do glukoze. Dio nje služi kao izvor energije, a dio kao početni materijal za sintezu novih spojeva potrebnih za rast mlade biljke (Šimić, 2009; Enari i Sapanen, 1986). Enzimi koji sudjeluju u ovim procesima su  $\beta$ -amilaza,  $\alpha$ -amilaza, granična dekstrinaza i R-enzim. Od ostalih enzima ističu se lipaza, fitaze, oksidaza i peroksidaza (Gaćeša, 1979). Za proizvodnju slada najznačajnije su reakcije razgradnje škroba, hemiceluloza i proteina (Kunze, 1998.).

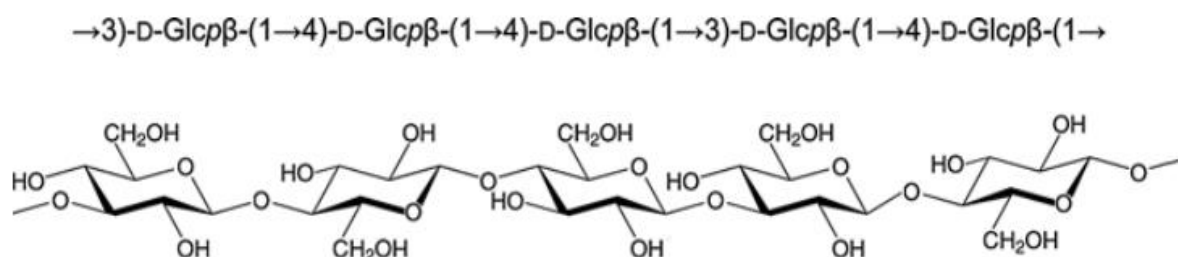
Uobičajeni procesni uvjeti faze klijanja prikazani su u **Tablici 2**. Proklijala se zrna ječma zbog zelene boje korjenčića nazivaju "zeleni slad" (Marić, 1995).

**Sušenje** je završna faza slađenja u kojoj se prekida rast klice i zaustavlja modifikacija zrna primjenom topline (Leskošek-Čukalović, 2002). Zeleni slad je lako kvarljiv, nestabilan materijal, a sušenjem se sprječavaju uvjeti razvoja mikroorganizama i zaustavljaju biokemijske i enzimске reakcije (Marić, 1995; Leskošek-Čukalović, 2002). Osim toga u ovoj se fazi formira karakteristična sladna aroma i boja potrebna za željeni tip piva. Za reakcije formiranja boje i arome prvenstveno su zaslužne su Maillard-ove reakcije, odnosno njihovi produkti melanoidini (Leskošek-Čukalović, 2002).

### 2.3. B-GLUKANI

U zrnu ječma,  $\beta$ -glukani su linearni homopolisaharidi smješteni uglavnom u staničnim stijenkama endosperma i aleuronskog sloja zrna (Šimić i sur., 2015; Holtekjølén i sur., 2006). Molekule  $\beta$ -glukana koje se pojavljuju u žitaricama sastoje se od nerazgranatih lanaca ostataka glukoze međusobno povezanih  $\beta$ -1,4- ili  $\beta$ -1,3- vezama (Šimić, 2009; Kunze, 1998). Prema Kunze (1998), u ovakvom tipu  $\beta$ -glukana  $\beta$ -1,4-veza ima oko 74% dok  $\beta$ -1,3-veza ima

oko 26%. U molekuli, ove veze nisu ravnomjerno raspoređene. Pod određenim okolnostima nastaju duži lanci samo s  $\beta$ -1,4-vezama, ili se pak sreće nekoliko uzastopnih  $\beta$ -1,3- veza, što uvelike utječe na strukturu same molekule, a time i na mogućnost njezine enzimске razgradnje (Kunze, 1998). U zrnu ječma pojavljuju se dvije vrste hemiceluloze – endospermnog tipa i pljevičastog tipa. Hemiceluloza endospermnog tipa sadrži mnogo  $\beta$ -glukana za razliku od one pljevičastog tipa (Gaćeša, 1979). Osim opisanih oblika pronađenih u žitaricama, u prirodi se molekule  $\beta$ -glukana pronalaze u mnogo oblika i izvora. Tako postoje linearni, nerazgranati, razgranati, ciklički i drugi  $\beta$ -glukani te mnogo njihovih kombinacija. Pojavljuju se u mnoštvu živih bića poput biljaka, gljiva, lišajeva, kvasaca i drugih mikroorganizama (Stone, 2009).



Slika 5 Molekula linearnog (1,3;1,4)- $\beta$ -glukana (Stone, 2009)

Kemijska i fizikalna svojstva  $\beta$ -glukana zaslužna su za njihov značaj u prirodi a određuju i njihovo ponašanje u tehnologiji piva. U vodenim otopinama njihove se molekule savijaju i okreću zauzimajući puno prostora i međusobno se sudarajući. Ovakvo ponašanje molekula uzrokuje međumolekularno trenje, što za tekućinu u kojoj se nalaze znači da joj raste svojstvo viskoznosti (Jin i sur, 2004). Lanci  $\beta$ -glukana mogu se hidratizirati, bubriti i tvoriti gel. Ova svojstva su u direktnoj ovisnosti odnosa njihovih  $\beta$ -1,4/ $\beta$ -1,3 veza i stupnja polimerizacije, odnosno molekulske mase. U ječmu,  $\beta$ -glukan je prisutan u topivom i netopivom obliku. Netopivi oblik kovalentnim je vezama povezan s proteinima u staničnim stijenkama, te pod djelovanjem određene proteolitičke aktivnosti, oslobađa se i prevodi u topivi oblik. Što je molekula  $\beta$ -glukana veća, to je manje topiva i tvori veće agregate (Kunze, 1998).

$\beta$ -glukani su poznati i kao biološki aktivne tvari s blagotvornim djelovanjem na zdravlje. Poljsko istraživanje Jurczyńska i sur. (2012) navodi da u ljudskom organizmu  $\beta$ -glukani

sudjeluju u procesima obnove stanica, metabolizmu i detoksikaciji raznih tvari te utječu na cjelokupno stanje tijela suzbijajući patološka stanja reaktivnih vrsta kisika i dušika, kao i procese u kojima sudjeluju. Reaktivne vrste kisika i dušika igraju važnu ulogu u patogenezi mnogih bolesti. Ustanovljeno je da (1,3/1,4)- $\beta$ -D-glukan dobiven iz zrna zobi ima citotoksična svojstva na neoplastičnim stanicama, što znači da mu se pripisuje antitumorska aktivnost (Jurczyńska i sur., 2012). Drugo istraživanje je ukazalo na svojstvo  $\beta$ -glukana da djeluje na snižavanje glikemijskog indeksa hrane tako što stvaranjem viskozne otopine u probavnom sustavu, usporava apsorpciju glukoze (Cavallero i sur., 2002).

### 2.3.1. Značaj $\beta$ -glukana u pivarstvu

Kada se pojavljuju u malim količinama u ječmu, odnosno pivu,  $\beta$ -glukani se smatraju korisnim sastojcima jer pridonose stabilnosti pjene i poboljšavaju organoleptička svojstva (pridonose punoći okusa) piva (Krstanović i sur, 2016; Havlová i sur., 2006). Ipak, njihova prisutnost je češće povezana s problemima u tehnologiji proizvodnje. Naročito su problematične enzimski nedovoljno razgrađene i netopive makromolekule ovih spojeva (Kunze, 1998). Zbog toga što  $\beta$ -glukani lako prelaze u gel, svrstavaju se u gumaste tvari i upravo ovo svojstvo čini njihovu razgradnju otežanom (Šimić, 2009; Kunze, 1998). Budući da tvore viskozne otopine u vodi,  $\beta$ -glukani, kao i arabinoksilani, uzrokuju probleme kod ekstrakcije, filtracije i bistrenja piva (Šimić, 2009; Enari i Sapanen, 1986; Marić, 2009). Stoga je enzimska hidroliza  $\beta$ -glukana značajna kod optimiranja postupka slađenja ječma (Šimić, 2009).

Količina  $\beta$ -glukana ovisi o nekoliko faktora no ponajprije o genetskom podrijetlu i okolišnim uvjetima ječma. U ječmu se sadržaj  $\beta$ -glukana kreće od 2,5 do 6 %, a ponekad i do 11 %. U procesu slađenja, osim razgradnje škroba i proteina, dolazi i do razaranja  $\beta$ -glukana djelovanjem enzima. Do problema dolazi kada ova razgradnja nije potpuna i u sladovini zaostaje velika količina nerazgrađenih  $\beta$ -glukana (Marić, 2009; Magdić, 2017). Filtrabilnost piva ne ovisi samo o količini  $\beta$ -glukana već i o obliku u kojem se oni nalaze, stoga je važniji čimbenik u kolikoj mjeri je došlo do stvaranja  $\beta$ -glukanskog gela kojeg tvore makromolekule ovih spojeva (Kunze, 1998). U razgradnji  $\beta$ -glukana ključna su dva enzima iz slada. Njihovi su temperaturni optimumi i proizvodi hidrolize različiti (Marić, 2009; Magdić, 2017):

$\beta$ -glukan +  $\beta$ -glukanaza (45 – 50 °C) →  $\beta$ -glukanski dekstrin

$\beta$ -glukan +  $\beta$ -glukan-solubilaza (60 – 65 °C) → otopljeni  $\beta$ -glukan

Ječam prirodno sadrži endo- $\beta$ -glukanazu, a egzo- $\beta$ -glukanaza se sintetizira u procesu slađenja.  $\beta$ -glukan-solubilaza pomaže  $\beta$ -glukanu da se oslobodi iz kompleksa s proteinima i njezina se aktivnost slađenjem poveća do čak 170 %. Citolitička razgradnja je ključan proces za ulazak enzima u unutrašnjosti endosperma, stoga joj se posvećuje najviše pažnje u rješavanju problema nedovoljne razgrađenosti  $\beta$ -glukana (Kunze, 1998; Magdić, 2017).

Na temelju nekoliko pokusa provedenih na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku, predviđa se kako bi intenziviranje postupka klijanja u kombinaciji s prilagođenim vremenom natapanja moglo imati pozitivan odraz na razgradnju  $\beta$ -glukana. Ovim izmjenama moglo bi se utjecati i na ukupne pokazatelje kvalitete slada, uključujući friabilnost (Krstanović i sur., 2015).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. ZADATAK

Slad od golozrnog ječma je vrsta specijalnog ječmenog slada koji se može koristiti sam ili u kombinaciji s osnovnim sladom, prvenstveno za proizvodnju žitnih rakija, ali u posljednje vrijeme i za proizvodnju piva. U proizvodnje slada od golozrnog ječma udio  $\beta$ -glukana u zrnu ječma ima izuzetan utjecaj na kvalitetu slada jer utječe na mnoge važne pokazatelje kvalitete piva (filtrabilnost, iskorištenje ekstrakta, koloidna stabilnost, punoća okusa, stabilnost pjene i dr.). Kako se radi o važnom pokazatelju kvalitete slada koji značajno utječe na kvalitetu gotovog piva, zadatak ovog ispitivanja je ustanoviti da li je moguće, i u kolikoj mjeri, modificiranjem postupka slađenja utjecati na poboljšanje razgradnje  $\beta$ -glukana u gotovom sladu i sladovoni bez da se pokvare ostali važni pokazatelji kvalitete slada. Osnovna značajka ovih sladova je visok udio topljivih  $\beta$ -glukana u sladovini. Za slađenje su odabrane dvije sorte golozrnog ječma Poljoprivrednog Instituta Osijek. Slađenja će se provesti standardnim postupkom i s dva postupka slađenja padajućih temperaturama klijanja (postupak 1 i 2) te će se odrediti koncentracije ukupnih i topljivih  $\beta$ -glukana u sladu i sladovini. Na temelju dobivenih rezultata, te njihovom usporedbom s dostupnim podacima u znanstveno-stručnoj literaturi, procijenit će se koliko se uspješno može utjecati na kvalitetu slada od golozrnog ječma promjenom procesnih parametara tijekom slađenja.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1. Materijal

Ispitivane su dvije sorte golozrnog ječma (sorte Osvit i Mandatar) iz sezone 2019. godine sortnih pokusa Poljoprivrednog Instituta Osijek. Pribavljeno je 10 kg zrna navedenih sorti. Uzorak za ispitivanje je prikupljen kao netretirano i dorađeno (očišćeno od stranih primjesa) zrno. Materijal za ispitivanje je neposredno nakon žetve izvagan i podijeljen na dijelove od po 1 kg te kao takav spremljen u papirnate vreće u kojima je čuvan na suhom i hladnom mjestu oko 3 mjeseca s ciljem prevladavanja posliježetvene pospanosti tzv. „dormantnosti“ zrna.

Eventualna mikrobiološka kontaminacija zrna mogla bi utjecati na ispitivane pokazatelje kvalitete, stoga je izvršena je kontrola uzoraka na prisutnost *F.graminearuma* i *F.culmorum* prema MEBAK analitici (metoda 2.6.) koja je dala zadovoljavajuće rezultate.

### 3.2.2. Metode rada

Metode korištene u ovom radu sadržane su u EBC (European Brewery Convention, Analytica 5. ed. (1998) Fachverlag Hans Carl, Nürnberg) analitičkom priručniku i MEBAK (Middle European Brewing Analysis Commission) analitičkim priručnicima (Brautechnische Analysenmethoden 3. ed. Band I (1997) i Band II (1993), Selbstverlag der MEBAK Freising-Weihenstephan).

Analitičke metode i postupci rada koji nisu provedeni prema gore navedenim propisima posebno su istaknuti i obrazloženi.

#### 3.2.2.1 Mikroslađenje

Standardno mikroslađenje koje u ovom radu služi kao referentno gledište provedeno je postupkom prema MEBAK-u. Ovaj postupak mikroslađenja usvojen je 6. travnja 1971. godine od strane *Middle European Brewing Analysis Commission* (Srednjoeuropska komisija za pivarsku analitiku, kraticom *MEBAK*) kao standardni postupak mikroslađenja koji se smatra referentnim za predviđanje i ocjenu kakvoće pivarskih i drugih sirovina. MEBAK postupak u osnovi je predviđen mikroslađenju pivarskog ječma. Kada se provodi mikroslađenje ostalih žitarica, uključujući i golozrni ječam, potrebno je izvršiti korekciju vlažnosti. Opća shema mikroslađenja bila je 3+4+1 (močenje + klijanje + sušenje) izražena u danima.

Močenje zrna u trajanju od 2 dana (uvjetno i treći dan) i sušenje zrna u trajanju od 1 dan provedeno je u močioniku i sušari mikrosladare tvrtke Seeger. Klijanje zrna u trajanju od 4 dana provedeno je u posudama tzv. Climatic test chamber (Climacell 222, Medcenter Einrichtungen GmbH).

Izvršena je korekcija relativne vlažnosti zraka pri klijanju golozrnog ječma na 90 % ( $\pm 1$  %). Uzorci su slađeni u količini od 1000 g.

Standardno mikroslađenje ječma provedeno je prema opisanom postupku (MEBAK, 1997):

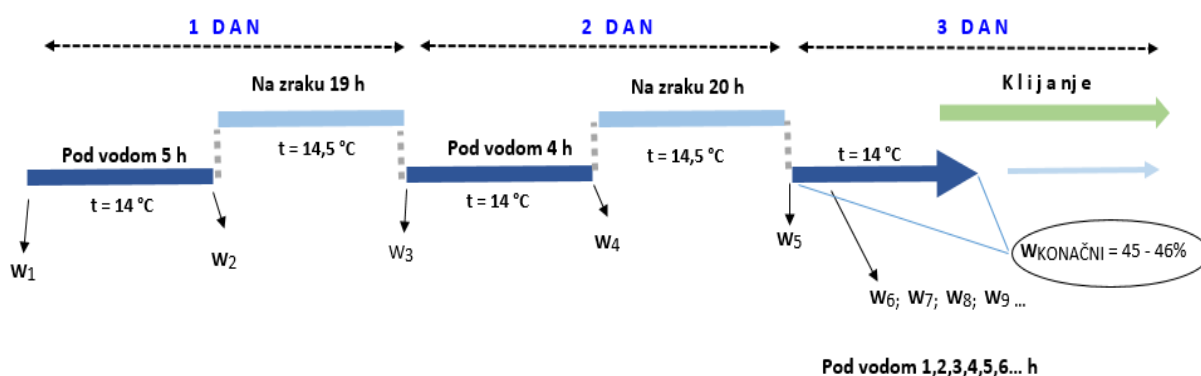
## MEBAK postupak standardnog mikroslađenja ječma (metoda 2.5.3.1)

### Priprema uzorka

Ječam koji se koristi za mikroslađenje kvalitetom treba odgovarati prvoj klasi (frakcije sita s otvorima 2,5 i 2,8 mm) te biti očišćen od stranih primjesa. Ječam treće klase potrebno je ukloniti. Za mikroslađenje se uzima količina od 1 kg zračno suhog ječma. Uzorkovanje i vaganje vrši se nakon čišćenja i klasiranja zrna.

### Močenje ječma

Močenje se odvija kombiniranim mokro-suhim postupkom što znači da se ječam naizmjenice potapa u vodu (faza pod vodom) te zatim cijedi i zadržava na zraku određeno vrijeme (faza zračnog odmaranja). Temperatura vode i zraka treba biti stalno održavana na  $14 \pm 0,1$  °C. Kako bi ova faza bila uspješna, potrebno je postići stupanj namočenosti od 45 %. Cijeli proces močenja traje 72 h, ili do postignutog zadanog stupnja namočenosti. Na **Slici 6** prikazana je shema procesa močenja ječma koje je provedeno postupkom prema MEBAK proceduri i navedenoj metodi. Na shemi su prikazane duljine trajanja mokrih i suhih faza močenja te primijenjene temperature za svaku fazu. Stupanj namočenosti zrna ječma u određenom trenutku procesa označen je slovom *w*.



Slika 6 Shema namakanja po postupku mikroslađenja MEBAK (metoda 2.5.3.1.)

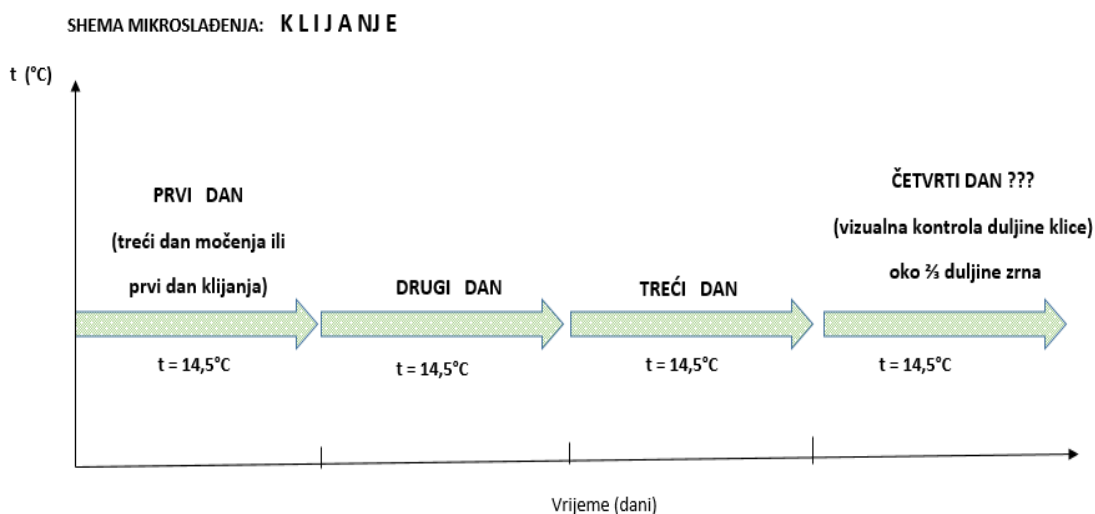
Može se primijetiti da jedan ciklus (faza pod vodom + faza zračnog odmaranja) traje 24 h ili jedan dan. Nakon završenog drugog ciklusa, ulaskom u treći dan močenja, skreće se pažnja na stupanj namočenosti zrna (*w*) uz pomoć kojeg će se odrediti kada je potrebno završiti proces zadnjeg potapanja. Močenje pod vodom se provodi do postignutog stupnja namočenosti od 44,5 % (budući da se računa da u zrnu ima 1 % površinske vode, stupanj

namočenosti izmjeren vaganjem zapravo treba iznositi 45,5 %). Ostatak trećeg dana, provodi se faza zračnog odmaranja.

Ukoliko se, vaganjem uzorka, utvrdi da nakon drugog ciklusa zrno ne može podnijeti treće močenje, stupanj namočenosti od 45 % podešava se orošavanjem.

### Klijanje ječma

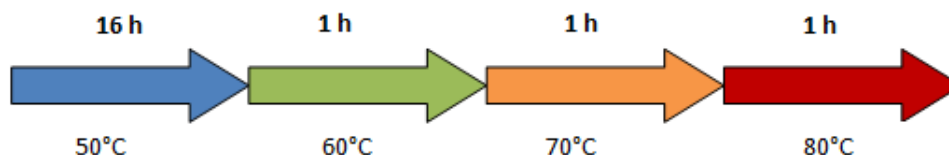
Klijanje se odvija postupkom tzv. „mirnog“ ili „pneumatskog“ klijanja kroz period od 4 dana. Temperatura vlažnog zraka za klijanje treba iznositi  $14 \pm 0,1$  °C, a temperatura zrna koje klija  $14,5 \pm 0,5$  °C (neprekidno). Relativna se vlaga zraka za klijanje, ako se primjenjuje mirno klijanje, treba održavati u rasponu 95 – 98 %. Ukoliko se primjenjuje pneumatsko klijanje, vlaga zraka za klijanje mora biti prezasićena. Za vrijeme klijanja, ječam je potrebno prevrtati 1 do 2 puta, ili navesti učestalost prevrtanja ako se klijanje odvija automatski. **Slika 7** prikazuje primijenjene uvjete temperature u odnosu na vremenske etape u postupku klijanja prema MEBAK-u.



**Slika 7** Shema klijanja po postupku mikroslađenja MEBAK (metoda 2.5.3.1.)

### Sušenje slada

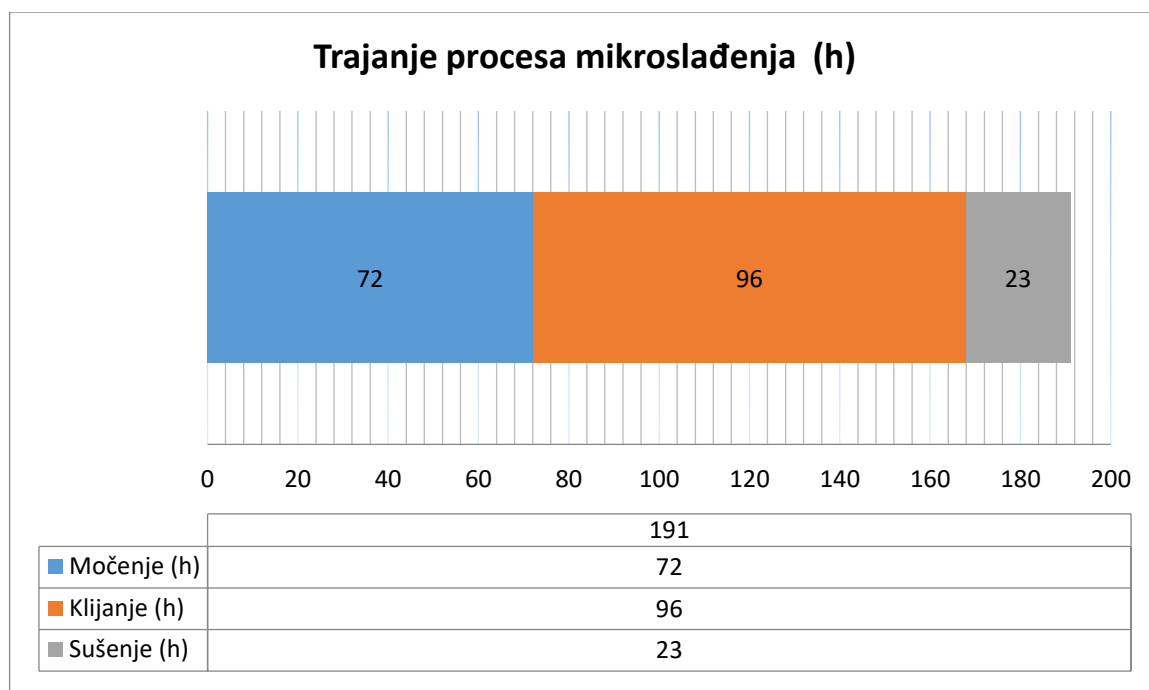
Prije započinjanja sušenja, vlaga zelenog slada mora iznositi 45 – 45,5 %. Sušenje je provedeno prema standardnoj MEBAK shemi prema sljedećim uvjetima (metoda 2.5.3.1.):



**Slika 8** Shematski prikaz vremenskih faza i temperatura primjenjenih u procesu sušenja po MEBAK-u

Vrijeme povisivanja temperature uključeno je u navedeno vrijeme sušenja. Mjerenje temperature obavlja se ispod rešetke. Tolerancija za odstupanje temperature je  $\pm 1$  °C. Zrak upotrebljen za sušenje ne smije sadržavati sumpor (MEBAK, 1997).

Trajanje cjelokupnog procesa mikroslađenja iznosi oko osam dana (191 h). Trajanje pojedinih operacija u satima prikazano je na **Slici 9**.



**Slika 9** Grafički prikaz trajanja pojedinih operacija u procesu mikroslađenja ječma



**Slika 10** (gore lijevo) Uređaj za mikroslađenje žitarica (PIO, 2020)

**Slika 11** (gore desno) Fotografija ječma u fazi klijanja (PIO, 2020)

**Slika 12** (dolje) Fotografija slada nakon završene faze sušenja (PIO, 2020)

Osušeni slad potrebno je očistiti od korjenčića i sladnih klica pritom pazeći da se zrno ne ošteti. U ovom pokusu to je učinjeno ručno, prosijavanjem kroz sito za korjenčiće. Nakon sušenja, slad je ostavljen da odstoji mjesec dana kako bi se stabilizirao prije provedene analize  $\beta$ -glukana.

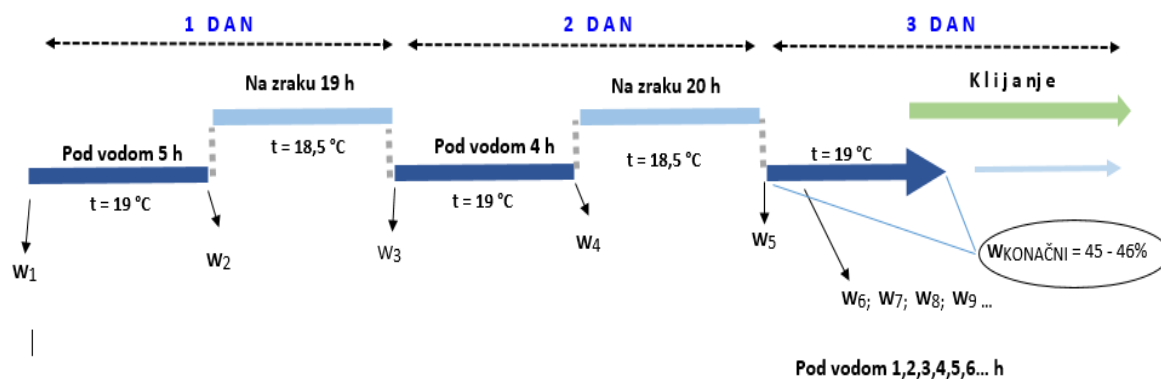
### Modificirani postupci mikroslađenja

Pored standardnog postupka mikroslađenja provedeni su i modificirani postupci mikroslađenja (postupci 1 i 2) u kojima su mijenjani procesni parametri – temperatura klijanja i vrijeme zadržavanja zrna na pojedinoj temperaturi prema shemama prikazanim na slikama 13, 14, 15 i 16.

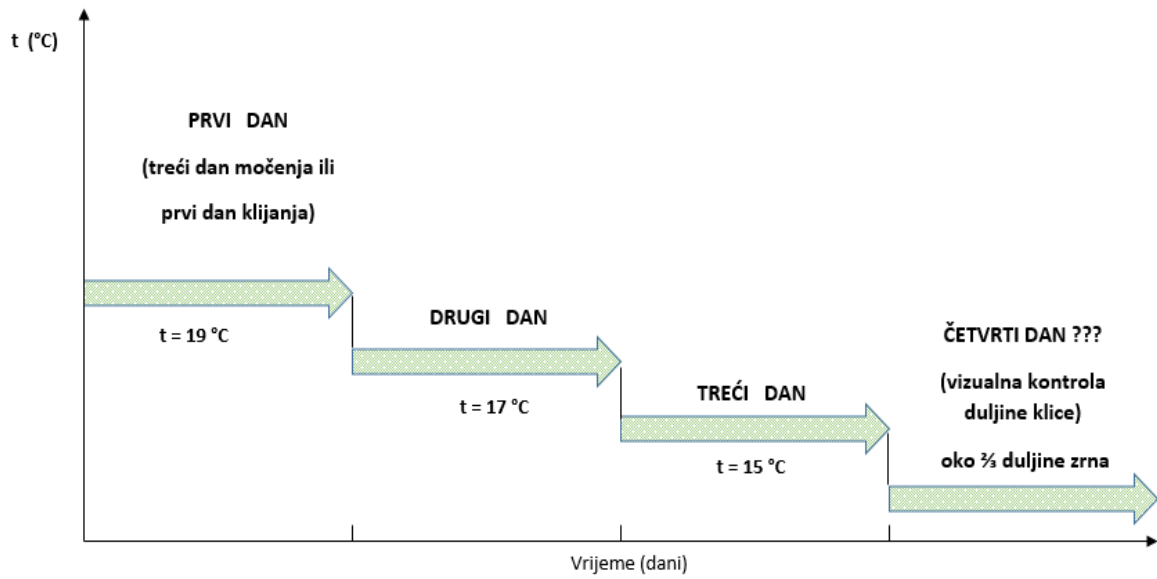
U modificiranim postupcima primijenjene su više temperature močenja u odnosu na standardni postupak, te padajuće temperature klijanja. Sušenje je u oba postupka provedeno prema standardnoj MEBAK shemi sušenja (metoda 2.5.3.1.) prikazanoj na slici 8.

U Postupcima mikroslađenja 1 i 2 izmijenjene su temperature močenja i klijanja ječma, dok su ostali uvjeti mikroslađenja jednaki MEBAK proceduri. Postupak mikroslađenja prema MEBAK-u primjenjuje nešto niže temperature močenja i klijanja koje se kreću u granicama 14 – 14,5 °C. Postupak mikroslađenja 1 primjenjuje temperaturu močenja 18,5 – 19 °C te padajuće temperature klijanja od 19 °C pa do 15 °C, dok Postupak mikroslađenja 2 ima najviše primijenjene temperature, 20 – 21 °C za močenje i padajuće od 21 °C do 17 °C za klijanje.

#### 1) Modificirani postupak mikroslađenja 1

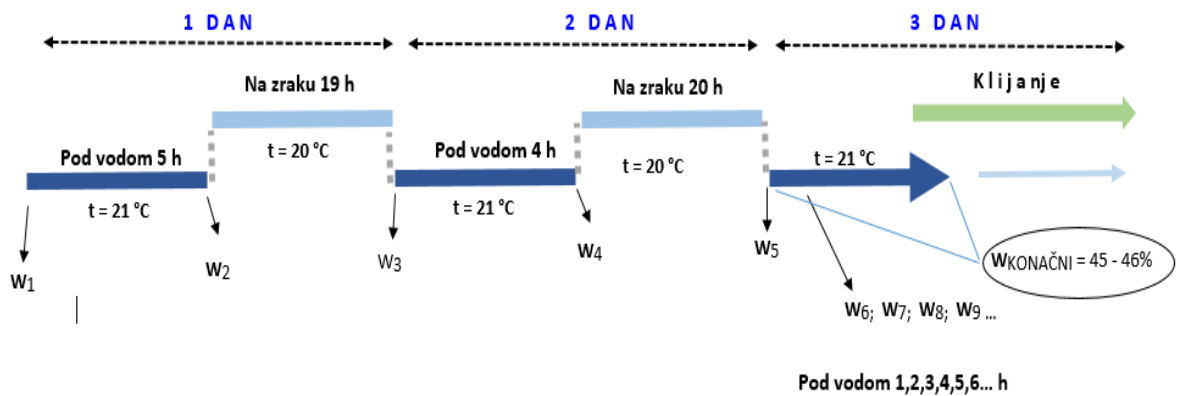


Slika 13 Shema namakanja po postupku mikroslađenja 1



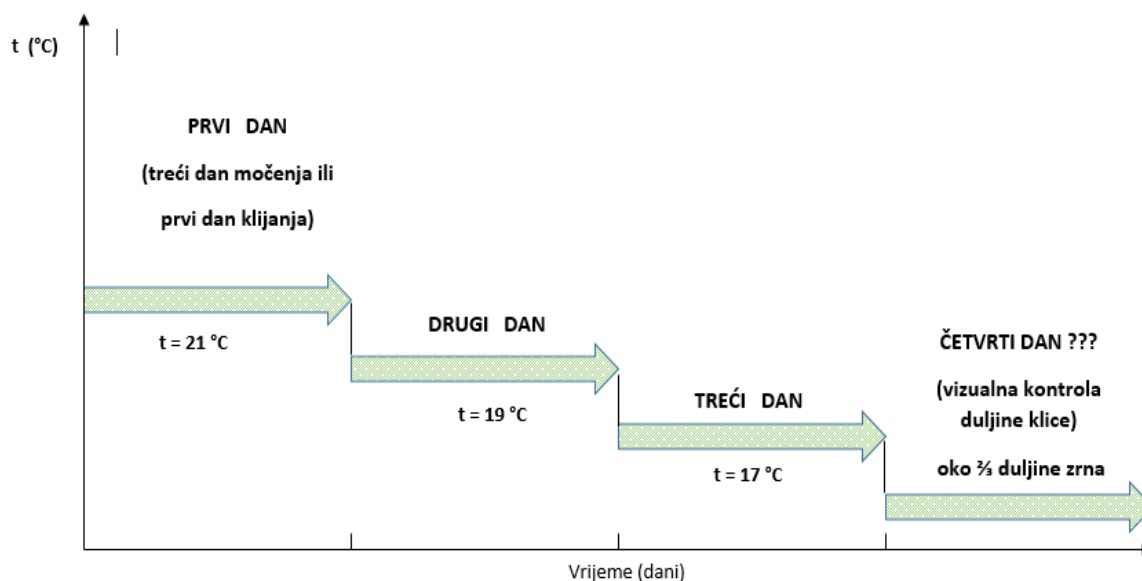
Slika 14 Shema klijanja po postupku mikroslađenja 1

## 2) Modificirani postupak mikroslađenja 2



Slika 15 Shema namakanja po postupku mikroslađenja 2





Slika 16 Shema klijanja po postupku mikroslađenja 2

### 3.2.2.2 Kongresna metoda ukomljavanja

Komljenje kongresnom metodom rađeno je prema EBC analitici (metoda 4.5.1.). Uzorci ječma usitnjeni su na laboratorijskom *DLFU disc mlinu* (Bühler Miag) na veličinu čestica 0,20 mm. Korištena je kupelj proizvodnje Lochner® prikazana na **Slici 17**.

Ukomljavanje se izvodi prema sljedećem postupku:

Izvaganih 50,00 g mljevenog slada prelije se s 200 mL destilirane vode temperature  $45^{\circ}\text{C}$  pri tome pazeći da ne dođe do stvaranja grudica. Uzorak se dobro promiješa i stavi u kupelj s odgovarajućim mješačima. Miješanje se vrši kroz cijeli proces komljenja. Prvih 30 minuta ukomljavanja, kupelj održava temperaturu na  $45^{\circ}\text{C}$ , zatim podiže temperaturu za  $1^{\circ}\text{C}$  po minuti kroz idućih 25 minuta. Kada je postignuta temperatura od  $70^{\circ}\text{C}$ , u uzorak se dodaje 100 mL destilirane vode zagrijane na  $70^{\circ}\text{C}$ . Proces se nastavlja održavanjem temperature ukomljavanja na  $70^{\circ}\text{C}$  kroz 1 sat. Kada je ekstrakcija slada završena, sladovinu je potrebno ohladiti na sobnu temperaturu unutar 10 – 15 min. Čaša s uzorkom se osuši i nadopuni destiliranom vodom kako bi ukupna masa uzorka iznosila 450,00 g. Sadržaj čaše se zatim filtrira kroz filter papir. Dobivena sladovina (filtrat) se može dalje analizirati (EBC, 1998).



Slika 17 Uređaj za ukomljavanje Lochner® (Poljoprivredni Institut Osijek, 2020)



Slika 18 Prikaz filtracije sladovine (Poljoprivredni Institut Osijek, 2020)

### 3.2.2.3 Određivanje vlažnosti zrna

Udio vode u zrnju neophodno je znati zbog što točnijeg izračuna  $\beta$ -glukana. U uzorcima brašna žitarica sadržaj vlage konstantno se kreće u rasponu 10-14% (Megazyme, 2017). Poželjna vrijednost je 11-12%, svakako ne iznad 12,5%.

U ovom radu vlažnost je određena sušenjem u sušnici (EBC-V Ann. 4.2.). Uzorak ječma usitnjen je na granulaciju  $\leq 1$  mm. Izvagano je 30,00 g mljevenog homogeniziranog uzorka i sušeno 2 h na temperaturi od 132°C u sušnici s toplim zrakom uz standardizirane uvjete, nakon čega je uzorak hlađen u eksikatoru do sobne temperature. Vlažnost je određena mjerenjem gubitka mase prekrupе prije i poslije sušenja prema **formuli (1)** (EBC, 1998).

Izračun:

$$Vlaga (\%) = \frac{m(\text{prije sušenja}) - m(\text{poslije sušenja})}{m(\text{prije sušenja})} \quad (1)$$

Gdje je:

$m(\text{prije sušenja})$  = masa prekrupе prije sušenja,

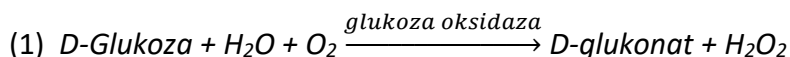
$m(\text{poslije sušenja})$  = masa prekrupе poslije sušenja.

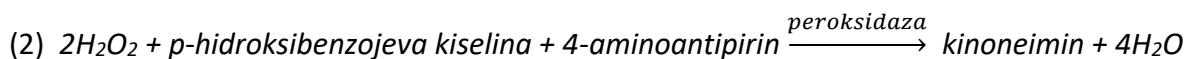
### 3.2.2.4 Određivanje udjela ukupnih $\beta$ -glukana u ječmu te ukupnih i topljivih $\beta$ -glukana u sladu i kongresnoj sladovini

Za određivanje  $\beta$ -glukana korištene su *Megazyme* brze metode određivanja. Ove metode odobrene su od strane *European Brewing Convention* a mogu se pronaći pod brojevima EBC 3.10.1, 4.16.1 i 8.13.1.

PRINCIP:

Uzorci se suspendiraju i hidratiziraju u puferskoj otopini pH 6.5, a zatim inkubiraju s pročišćenim enzimom lihenaze i filtriraju. Alikvot filtrata se zatim do kraja hidrolizira pročišćenom  $\beta$ -glukozidazom. Nastala D-glukoza se određuje reagensom glukoza-oksidadaza/peroksidaza prema prikazanom principu kemijskih reakcija (Megazyme, 2017):





TOČNOST:

Postiže se točnost određivanja sa standardnom pogreškom od  $\pm 3\%$ .

SPECIFIČNOST:

Test je specifičan za mješovito povezivanje [(1-3)(1-4)]- $\beta$ -D-glukana.

KIT ZA ODREĐIVANJE D-GLUKOZE:

*D-Glucose Assay Kit* (GOPOD Format) s granicom detekcije 100 mg/L za spektrofotometrijsko određivanje pri 510 nm.

### **Određivanje udjela ukupnih $\beta$ -glukana u ječmu (EBC metoda 3.10.1)**

Ječam je prvo potrebno jednolično i fino izmlijeti na veličinu čestica promjera otvora sita 0,5 mm. Uzorci ječmenog brašna poznate vlage se precizno važu (približno 0,5 g) u polipropilenske (ili staklene) epruvetice. U svaki uzorak se dodaje alikvot (1,0 mL) vodenog etanola (50 %-tnog) što pripomaže disperziji uzorka. Zatim se u svaki uzorak dodaje 5,0 mL natrijevog fosfatnog pufera (20 mM, pH 6,5) te se uzorci vorteksiraju. Epruvete se inkubiraju u kupelji s ključalom vodom cca. 2 minute, nakon čega se kratko vorteksiraju kako bi se spriječilo stvaranje grudica u formiranom gelu, te se nastavljaju inkubirati još 3 minute. Zatim se epruvete hlade na 40°C i dodaje im se 0,2 mL lihenaze (10 U). Epruvete se poklope, sadržaj se promiješa i inkubira 1 sat na 40°C. Potom se svaka epruveta nadopuni destiliranom vodom do 30,0 mL. Potrebno je dobro promiješati sadržaj epruveta i centrifugirati (cca. 1000 g 10 min). Pažljivo i precizno podijeliti dobivene alikvote u 3 čiste epruvete. U jednu od epruveta (slijepa proba) dodaje se 0,1 mL natrijevog acetatnog pufera (50 mM, pH 4,0), a u druge dvije dodaje se po 0,1 mL mješavine natrijevog acetatnog pufera (50 mM, pH 4,0) i  $\beta$ -glukozidaze (0,2 U). Slijedi inkubacija 15 minuta na 40°C. Nakon toga, u uzorke se dodaje po 3,0 mL GOPOD reagensa te se uzorke inkubira na 40°C narednih 20 minuta. Uzorci su tada spremni za određivanje apsorbance na 510 nm. Uspoređuje se rezultat slijepa probe s rezultatima uzoraka u kojima je nastupila reakcija (Megazyme, 2017).

**Određivanje udjela  $\beta$ -glukana u sladu (EBC metoda 4.16.1)**

Sladno brašno, mljeveno na veličinu čestica promjera otvora sita 0,5 mm, mase 1,0 g suspendira se u 5,0 mL otopine vodenog etanola (50 %). U kipućoj vodenoj kupelji uzorci se inkubiraju 5 minuta te zatim vorteksiraju. Dodaje se još 5,0 mL vodenog etanola (50 %) i ponovo vorteksira. Epruvete s uzorcima se centrifugiraju 10 minuta na 1000 g. Supernatant se odbacuje. Talog se rekonstituira u 10,0 mL vodenog etanola (50 %) te se postupak centrifugiranja i odbacivanja supernatanta ponovi. Dobiveni talog se rekonstituira sa 5,0 mL natrijevog fosfatnog pufera (20 mM, pH 6,5). Nastavak analize jednak je prethodnom postupku određivanja  $\beta$ -glukana u ječmu po metodi EBC 3.10.1 (Megazyme, 2017).

**Određivanje udjela  $\beta$ -glukana u sladovini (EBC metoda 8.13.1)**

U prethodno odvagano epruvetu za centrifugiranje otpipetira se 5,0 mL sladovine i doda 2,5 g fino usitnjenih kristala amonijevog sulfata. Epruveta se zatvori parafinom i pažljivim se okretanjem otope kristalići u uzorku. Takav uzorak se ostavi oko 20 h na temperaturi od 4°C. Potom se centrifugira 10 min na 1000 g nakon čega se supernatant odbaci. Talog se rekonstituira s 1,0 mL vodenog etanola (50%) i vorteksira nakon čega se doda još 10,0 mL vodenog etanola (50%) i promiješa laganim okretanjem epruvete. Slijedi centrifugiranje 5 minuta na 1000 g. Supernatant se odbacuje. Još jednom se ponovi čitav postupak rekonstituiranja taloga istom količinom vodenog etanola te centrifugiranje 5 minuta, nakon čega se supernatant odbacuje, a dobiveni talog se konačno rekonstituira puferom natrijevog sulfata (20 mM, pH 6,5) do volumena 4,8 mL (uz pomoć vage). Naposljetku, dodaje se 0,2 mL lihenaze (10 U) i inkubira se 5 minuta na 40°C nakon čega se centrifugira 10 minuta na 1000 g. Nastavak analize jednak je postupku određivanja  $\beta$ -glukana u ječmu po metodi EBC 3.10.1 (Megazyme, 2017).

Izračunavanje (% ili mg/L)  $\beta$ -glukana se izvodi prema Megazyme uputama zasebno za ječam, slad i sladovinu.



Slika 19 Megazyme set reagensa

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. REZULTATI

**Tablica 3** Rezultati udjela  $\beta$ -glukana u zrnu, sladu i sladovini ispitivanog ječma. Za zrno ječma rađeno prema EBC metodi **3.10.1**, slad prema EBC metodi **4.16.1**, a sladovinu prema EBC metodi **8.13.1** uz upotrebu Megazyme enzimskog kita.

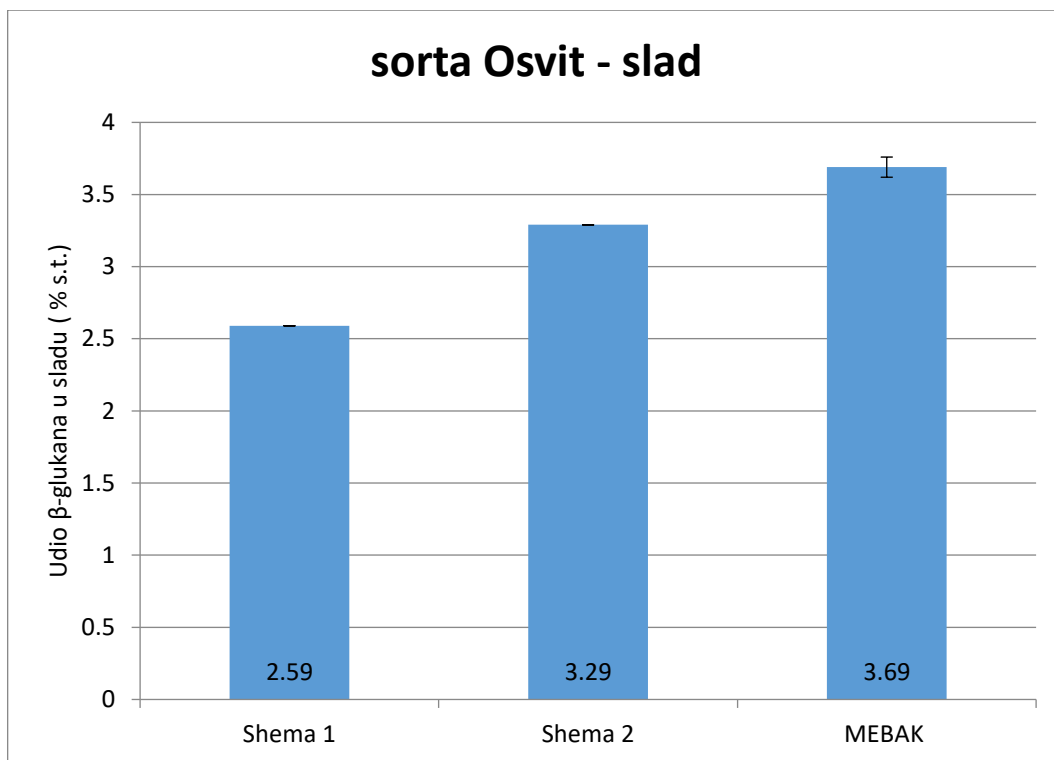
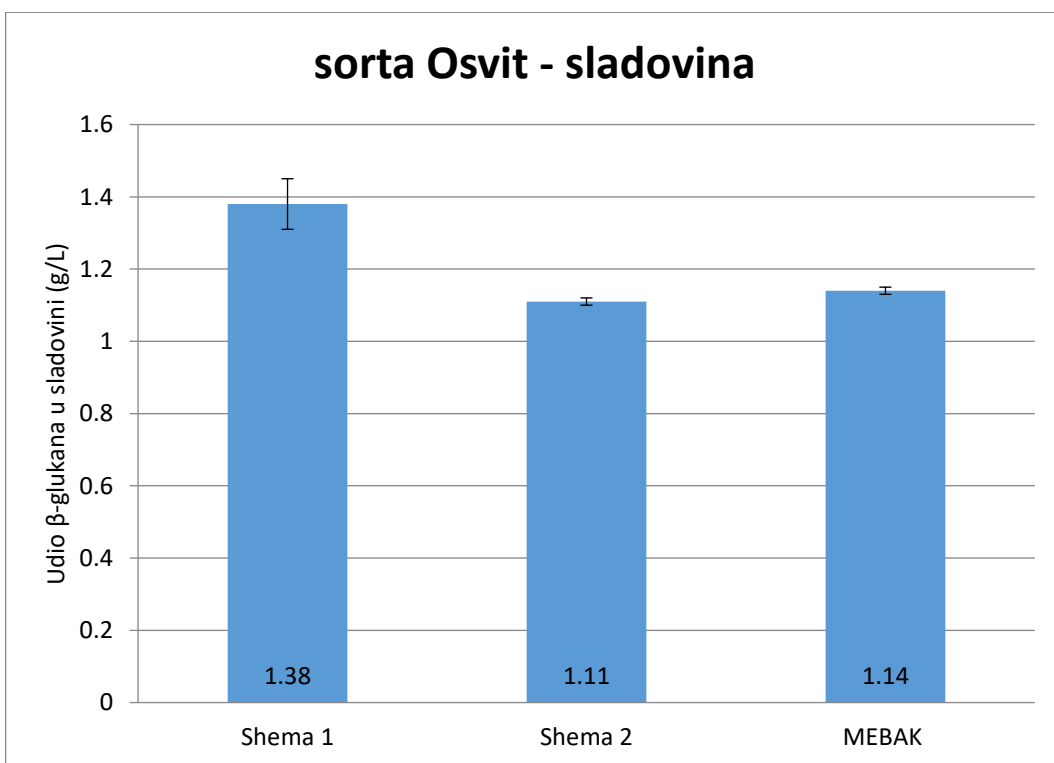
Uzorak	Broj uzorka	Shema slađenja	Udio $\beta$ -glukana u zrnu ječma (% S.T.)	Udio $\beta$ -glukana u sladu (% S.T.)	Udio $\beta$ -glukana u sladovini (g/L)
Osvit	1	-	4,74 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>		
	2	Shema 1		2,59 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	1,38 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
	3	Shema 2		3,29 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	1,11 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
	4	MEBAK		3,69 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,14 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
Mandatar	5	-	5,21 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>		
	6	Shema 1		2,08 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	1,62 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
	7	Shema 2		2,41 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	1,18 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
	8	MEBAK		2,69 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	1,16 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>

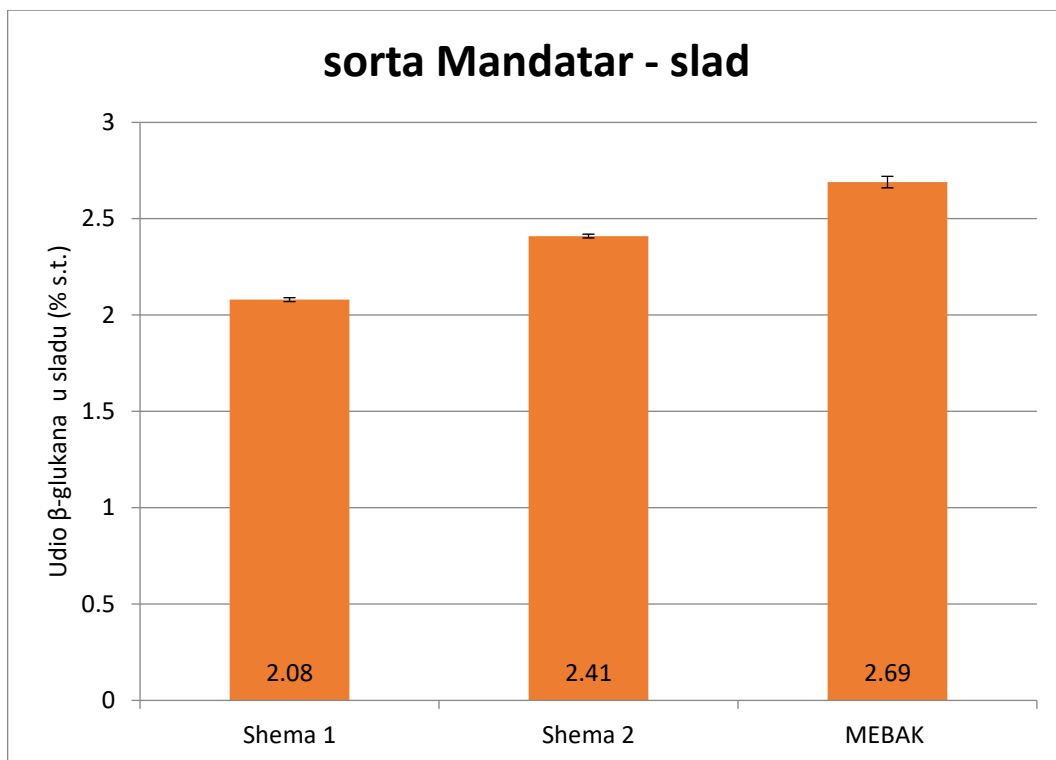
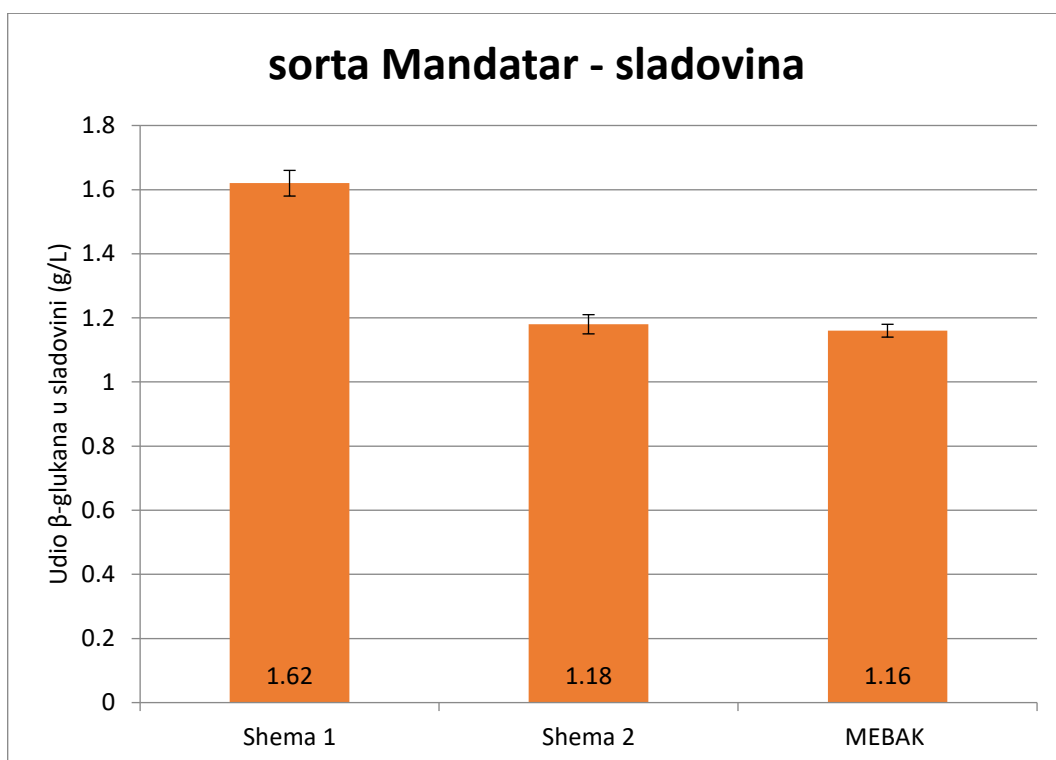
Prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n=2$ ); srednje vrijednosti označene istim slovom u istom stupcu nisu statistički značajno različite ( $p<0,05$ ) prema Fisherovom LSD testu najmanje značajne razlike

Brojevi uzoraka (1 – 8) iz **Tablice 3** mogu se očitati kako slijedi:

1. Golozrni ječam "Osvit"
2. Slad od golozrnog ječma "Osvit" (Postupak mikroslađenja 1)
3. Slad od golozrnog ječma "Osvit" (Postupak mikroslađenja 2)
4. Slad od golozrnog ječma "Osvit" (MEBAK postupak mikroslađenja)
5. Golozrni ječam "Mandatar"
6. Slad od golozrnog ječma "Mandatar" (Postupak mikroslađenja 1)
7. Slad od golozrnog ječma "Mandatar" (Postupak mikroslađenja 2)
8. Slad od golozrnog ječma "Mandatar" (MEBAK postupak mikroslađenja)



Slika 20 Udio  $\beta$ -glukana u sladu sorte OsvitSlika 21 Udio  $\beta$ -glukana u sladovini sorte Osvit

Slika 22 Udio  $\beta$ -glukana u sladu sorte MandatarSlika 23 Udio  $\beta$ -glukana u sladovini sorte Osvit

## 4.2. RASPRAVA

Sorte golozrnog ječma Osvit i Mandatar karakterizira visok udio  $\beta$ -glukana u zrnu, pa tako i u sladu i sladovini. Ovo se pripisuje otežanom upijanju vode za vrijeme slađenja zbog čega dolazi do smanjene citolitičke razgradnje. Modificiranim postupcima slađenja nastojalo se utjecati na bolje upijanje vode, snažniju citolitičku razgradnju i veću razgradivost zrna što bi, posljedično, pokazalo niže vrijednosti  $\beta$ -glukana kao željeni rezultat. U **Tablici 3** brojčano su prikazani rezultati analiza ispitivanih sorti. Ispitivan je početni udio  $\beta$ -glukanau zrnu, udio u sladu nakon mikroslađenja te u sladovini komljenom kongresnom metodom (EBC 4.5.1.). Obavljena su tri postupka mikroslađenja u kojima je standardni postupak mikroslađenja po MEBAK (metoda 2.5.3.1.) proceduri koristeći standardnu shemu mikroslađenja uzet kao referentno gledište za količinu  $\beta$ -glukana u sladu i sladovini. Pored njega, provedena su dva postupka mikroslađenja – prvi **Postupak mikroslađenja 1** (u **Tablici 3** označen kao „Shema 1“) i drugi **Postupak mikroslađenja 2** (u **Tablici 3** označen kao „Shema 2“). Njihove su sheme močenja i klijanja prikazane u prethodnom poglavlju.

Iz **Tablice 3** uočljivo je da oba postupka modificiranog mikroslađenja (Postupak 1 i 2), u obje ispitivane sorte, pokazuju uspjeh u smanjenju količina  $\beta$ -glukana u sladu.

**Slike 20 i 21** grafički prikazuju rezultate dobivene analizom  $\beta$ -glukana u sladu i sladovini ispitivanog uzorka sorte Osvit, dok se **Slike 22 i 23** odnose na sortu Mandatar.

Na **Slikama 20 i 22** jasno se može uočiti uspješnost smanjenja  $\beta$ -glukana u sladu primjenom modificiranih postupaka mikroslađenja u odnosu na MEBAK postupak.

Ako se usporede rezultati  $\beta$ -glukana u sladu modificiranih postupaka mikroslađenja s rezultatima dobivenih MEBAK postupkom primijećeno je sljedeće: Postupak mikroslađenja 1 dao je bolje rezultate smanjenja količine  $\beta$ -glukana kod obje ispitivanje sorte u usporedbi sa slađenjem po standardnoj MEBAK shemi. Najniža vrijednost  $\beta$ -glukana dobivena je primjenom Postupka 1 kod sorte Mandatar (udio  $\beta$ -glukana = 2,08 % s.t.).

Uzevši u obzir početnu količinu  $\beta$ -glukana u zrnu ječma sorte Osvit, MEBAK postupak mikroslađenja rezultirao je smanjenjem  $\beta$ -glukana za 1,05 % s.t. u odnosu na početni udio, Postupak 1 rezultirao je smanjenjem početne količine za 2,15 % s.t., dok je Postupak 2 to učinio za 1,45 % s.t.

Kada se promatra postignuto smanjenje količine  $\beta$ -glukana u zrnju ječma sorte Mandatar, MEBAK postupak mikroslađenja rezultirao je smanjenjem  $\beta$ -glukana u sladu od 2,52 % s.t., dok je Postupak 1 rezultirao smanjenjem početne količine za 3,13 % s.t., a Postupak 2 za 2,80 % s.t. u odnosu na početni udio.

Usporedbom ovih podataka primijećeno je da se kod obje ispitivane sorte, postiglo bolje smanjenje početnog udjela  $\beta$ -glukana u zrnju primjenom mikroslađenja po Postupku 1. Također, sorta Mandatar pokazala je veće smanjenje početnog udjela  $\beta$ -glukana od sorte Osvit, pri sva tri postupka mikroslađenja, a naročito kod Postupka 1.

Količina  $\beta$ -glukana u sladovini daje nešto drugačije rezultate. Analizom podataka prikazanih na **Slikama 21 i 23**, mikroslađenje po Postupku 1 daje najviše vrijednosti  $\beta$ -glukana u sladovini kod obje ispitane sorte, u usporedbi s količinom  $\beta$ -glukana u sladovini ostalih primjenjenih postupaka mikroslađenja. Najniži rezultati  $\beta$ -glukana u sladovini sorte Osvit (1,11 g/L) postignuti su Postupkom 2 dok je u sladovini sorte Mandatar (1,16 g/L) to postignuto mikroslađenjem prema MEBAK postupku. Budući da je u sladovini određivan udio topivih  $\beta$ -glukana, dok je u zrnju i sladu određivan udio ukupnih  $\beta$ -glukana, ovo bi moglo značiti da je kod Postupka mikroslađenja 1 došlo do prevođenja određene količine netopivih  $\beta$ -glukana u topive.

Nema preporuka za udio ukupnih  $\beta$ -glukana u sladu, relevantnije su količine koje se pronalaze u sladovini i preporuka je da u njoj ne prelaze 200 mg/L (Davis, 2006; Krstanović i sur., 2016). *European Brewery Convention* tolerira nešto više vrijednosti, do 250 mg/L (ili 0,25 g/L). Međutim, čak i ova količina često se teško dostiže naročito kada je ukupni udio  $\beta$ -glukana u polaznom zrnju iznad 4% (MEBAK, 1997; EBC, 1998; Krstanović i sur., 2016). Izmjerene količine  $\beta$ -glukana u sladovini sorti Osvit i Mandatar (**Slike 21 i 23**) ipak prelaze ove preporuke u sva tri ispitivana postupka slađenja.

Promjenom primijenjenih temperatura u procesu slađenja, kako je to učinjeno u modificiranim postupcima mikroslađenja u ovom ispitivanju, utječe se i na ostale pokazatelje kakvoće slada. Modificirani postupci mikroslađenja jednakih parametara slađenja sorti Osvit i Mandatar provedeni su u radu Kotris (2020) gdje su promatrani pokazatelji kvalitete dobivenog slada. Prema rezultatima Kotris (2020), zaključeno je kako je primjenom odgovarajućih postupaka slađenja moguće znatno poboljšati kakvoću gotovih sladova golozrnog ječma i dobiti sladove slične kakvoće kao i kod običnog ječma. Uočeno je

da porast temperature namakanja uzrokuje porast udjela ekstrakta, razlike finog i grubog ekstrakta i pH kongresne sladovine. Sorta Osvit dala je slad boljih svojstava od sorte Mandatar. Indikatori uspješnosti citolitičke razgradnje zrna pokazali su se najbolji primjenom postupka Mikroslađenja 1. Neki pokazatelji kvalitete pokazali su zadovoljavajuće željene vrijednosti, dok neki nisu (Kotris, 2020). Zbog toga se preporučuje daljnje istraživanje i optimizacija temperaturnog raspona idealnog za slađenje golozrnih sorti. Optimirati postupak slađenja po više parametara kvalitete je vrlo teško jer se neki međusobno isključuju, no podešavanjem procesnih parametara tijekom slađenja može se značajno utjecati na kvalitetu zrna i osigurati ciljne vrijednosti određenih važnih pokazatelja kvalitete slada (Krstanović, 2020).

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Povišena temperatura močenja goloznog ječma (sorte Osvit i Mandatar) u kombinaciji s padajućim temperaturama klijanja u postupku mikroslađenja djeluje na smanjenje udjela  $\beta$ -glukana u sladu.
2. Oba postupka modificiranog mikroslađenja, u obje ispitivane sorte, pokazuju uspjeh u smanjenju količine  $\beta$ -glukana u sladu.
3. Modificirani postupak mikroslađenja 1 s temperaturama močenja 18,5 – 19 °C u kombinaciji s padajućim temperaturama klijanja (19 – 15 °C) daje najbolje rezultate razgradnje  $\beta$ -glukana u odnosu na uspoređene postupke.
4. Sorta Mandatar pokazuje veći uspjeh u smanjenju početnog udjela  $\beta$ -glukana u zrnu.

## **6. LITERATURA**



- Abičić, I. i sur: Agronomske karakteristike OS-genotipova golozrnog ječma. U Zbornik radova/Proceedings, 52nd Croatian & 12th International Symposium on Agriculture, str. 199-202., Poljoprivredni fakultet, Osijek, 2017.
- Agu, R.C.; Bringham, T.A.; Brosnan, J.M.; Pearson, S: Potential of Hull-less Barley Malt for Use in Malt and Grain Whisky Production. *J. Inst. Brew.* 115, 128–133, 2009.
- Beluhan, S: Nova valorizacija sladnih klica, nusproizvoda sladara. *Svijet piva*, 6, 35; 10-13, 2001.
- Cavallero A, Empillit S, Brighenti F, Stanca A M: Higl (1-3,1-4)- $\beta$ -Glucan Barley Fractions in Bread Making and their Effects on Human Glycemic Response (2001.). *Journal of Cereal Science* 36, 2002.
- Chang, Y. & Lv, Y: Structure, functionality and digestibility of acetylated hullless barley starch, *Int. J. Food Prop.* 20 (8) 1818-1828, 2016.  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220013>.
- Davis, N. 2006. Malt and malt products. In: Bamforth, C.W. (ed.), *Brewing – New technologies*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK. pp. 68–101.
- Divjak T: Usporedba klasičnih i novih metoda za analizu pivarskog ječma i slada, *Diplomski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2005.
- Edney, M.J.; Langrell, D.E: Evaluating the Malting Quality of Hullless CDC Dawn, Acid-Dehusked Harrington, and Harrington Barley. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 62, 18–22, 2004.
- Enari T.M., Sapanen T: Mobilisation of endosperm reserves during the germination of barley. *J Inst Brew*, 92, 25-31, 1986.
- EBC – European Brewery Convention: *Analytica*, 5. ed. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 1998.
- Evans, D.E.; Stenholm, K.; Vilpola, A.; Home, S.; Hughes, G.; Evans, E.; Vilpola, A.; Stewart, D.C.; Stenholm, K.; Pöyri, S.; et al. Producing a Quality Malt from Hullless Barley. *MBAA Tech. Q.* 2014, 35, 375–382., 2014.
- Gaćeša S: *Tehnologija slada sa sirovinma za tehnologiju piva*. str. 13-16, 19-21, 33, 115, 118-120, 128, 132-135, 140, 141. Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, 1979.
- Habschied K. i sur.:Comprehensive Comparative Study of the Malting Qualities of Winter Hull-Less and Hulled Barley (2016–2019). *Fermentation* 2021, 7, 8., 2021.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation7010008>
- Havlová, P., Lancova, K., Váňová, M., Havle, J., Hajšlová, J: The effect of fungicidal treatment on selected quality parameters of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.* 54:1353–1360., 2006.

- Holtekjølen, A.K. & Uhlen, Anne & Brathen, E.S. & Sahlstrøm, Stefan & Knutsen, Svein: *Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. Food Chemistry*. 94. 348-358., 2006.
- Jin, Y.-L & Speers, Robert & Paulson, A.T. & Stewart, R.J: Barley  $\beta$ -glucans and their degradation during malting and brewing. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* vol. 41. pp. 231-240, 2004.
- Jurczyńska, Ewelina & Saczko, Jolanta & Kulbacka, Julita & Kawa-Rygielska, Joanna & Błażewicz, Józef: Beta-glucan as a natural anticancer agent. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 33. str. 217-220., 2012.
- Kerry, J.A.; Barr, A.R: Genetic variation in Key Malting Quality Traits in Hulless Barley. In *Proceedings of the 7th Australian Barley Symposium, Perth, Australia, 1995*; pp. 266-268., 1995.
- Kovačević V, Rastija M: *Žitarice*, str. 15, 16. Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek, 2014.
- Kovačević, J. i sur: Mogućnosti proizvodnje ječma i slada u Republici Hrvatskoj. *Poljoprivredne aktualnosti* 30,457-469, 1994.
- Krstanović V.; Havlik I.; Mastanjević K.; Lalić A.; Habschied K: Razvoj enzimskog potencijala različitih namjenskih sorti ječma tijekom slađenja. *Glasnik zaštite bilja* 6/2020. str. 22-30. *Stručni rad*, 2020.
- Krstanović i sur.: A Survey of Total  $\beta$ -Glucan Content in Croatian Barley Varieties. *Cereal Research Communications* 44(4), pp. 650–657 (2016). Akadémiai Kiadó, Budapest, 2016.
- Krstanović, V.; Mastanjević, K.; Velić, N.; Slačanac, V.; Vacek, K.; Gagula, G.; Mastanjević, K: Influence of malting procedure on the quality of hulless barley malt. In *Proceedings of the 8th International Congress FLOUR-BREAD 2015 and 10th Croatian Congress of Cereal Technologists BRAŠNO-KRUH 2015, Opatija, Croatia*; str. 168-176, 2015.
- Kunze W: *Tehnologija sladarstva i pivarstva* (7. njemačko izdanje preveo Gaćeša S), str. 4-10, 13,91- 94, 99-105, 139, Jugoslavensko udruženje pivara, Beograd, 1998.
- Lalić A i sur.: Razvoj proizvodnje i upotrebe golozrnog ječma u ljudskoj prehrani, stočarstvu i sladarstvu, str. 6-9, 49-52. Priručnik VIP projekta, Poljoprivredni institut Osijek, Osijek, 2018.
- Lalić, A. i sur.: *Rezultati oplemenjivanja golozrnog ječma na Poljoprivrednom institutu Osijek*, Zbornik sažetaka 6. Međunarodnog kongresa: *Oplemenjivanje bilja, sjemenarstvo i rasadničarstvo*; Matotan, Z.; Haramija, J. (ur.). Zagreb: Hrvatsko agronomsko društvo: 32–33. 2013
- Lásztity R: *The chemistry of barley*. U *Cereal Chemistry*. str. 168-191, R. Lásztity (ur.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 1999.

- Leskošek-Čukalović I: *Tehnologija piva 1. dio; Slad i nesladovane sirovine*, str. 1, 17-20, 31-40, 42-46, 93, 98, 118-128, 177. Poljoprivredni fakultet Beograd, Beograd, 2002.
- MacLeod A.M., Duffus J.H: Development of hydrolytic enzymes in germinating grain. *J Inst Brew*, 70, 521-528, 1964.
- Magdić M: Citolitička razgradnja zrna tijekom slađenja različitih sortnih skupina ječma. *Diplomski rad*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2017.
- Marić V, Nadvornik Z: *Pivo-tekuća hrana*, str. 19, 20. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.
- Marić V: *Tehnologija piva*, Veleučilište u Karlovcu, str. 39, 57, 90, 2009.
- MEBAK – Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommision Brautechnische Analysenmethoden, Bd. I, 3, izdanje, str. 71, 80, 81, 89-90, 1997.  
<https://www.mebak.org/de/methodensammlung.html> [11.11.2019.]
- Megazyme: Mixed-linkage beta-glucan Assay Procedure (McCleary Method). *Priručnik*, str. 1, 10-14, 2017 <https://www.megazyme.com/> [10.7.2021.]
- Rennecke, D.; Sommer, W. Use of naked barley in the brewing and malting process. *Lebensmittelindustrie*, str. 26, 66–68, 1979.
- Rossnagel, B.G.; Legge, W.; Edney, M.; Beattie, A.; Scoles, G: *5% > extract and more \$ for brewers—Hulless barley malt a dramatic difference*. American society of Brewing Chemists & Master Brewers Association of the Americas. In *Proceedings of the 2012 World Brewing Congress*, Portland, OR, USA, 28 July–1 August 2012.
- Schuster K., Weinfurtner, F. i Narziss L: *Die Technologie der Würzebereitung*, (1985). Tehnologija proizvodnje sladovine (prijevod S.Gaćeša). *Posl. zjed. ind. piva i slada Jug*, str. 15-18, 25-33, 236-243, 1988.
- Shaveta, S.; Kaur, H.; Kaur, S: Hulless Barley: A new era of research for food purposes. *J. Cereal Res.*, str. 11, 2019.
- Stone, B. A: Chapter 2.1: *Chemistry of  $\beta$ -Glucans*. U *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, str. 5-20. Department of Biochemistry, La Trobe University, Bundoora, Victoria, Australia, 2009.
- Šimić et al.:  $\beta$ -Glucan Content and  $\beta$ -Glucanase Activity of Winter and Spring Malting Barley Cultivars. U *Acta Alimentaria*, Vol. 44 (4), pp. 542–548. Poljoprivredni Institut Osijek, Osijek, 2015.
- Šimić, G. i sur: Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of malting and hulless barley grain and malt extracts, *Czech J. Food Sci.* 35 (1): 73-78. Agricultural Institute Osijek, Osijek, 2017.
- Šimić, G: Utjecaj genotipa i okolišnih uvjeta na parametre sladarske kakvoće ozimog ječma (*Hordeum vulgare L.*). *Disertacija*. Poljoprivredni institut Osijek, Osijek, 2009.

Šubarić D, Babić J, Ačkar Đ: *Tehnologija škroba: Interna skripta za kolegij: Tehnologija škroba*, str. 2. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2011

