

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET**

**VJEŽBE IZ MODULA
*BIOTEHNOLOGIJA 2***

Voditeljica:

izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, listopad 2014.

1. VJEŽBA: ODREĐIVANJE UKUPNIH I INVERTNIH ŠEĆERA

Pod nazivom ugljikohidrati podrazumijevamo u prvom redu šećere, kao i tvari srodne šećerima. To su primarni oksidacijski proizvodi (aldehidi i ketoni) lančastih polihidroksilnih alkohola, kao i kondenzacijski derivati svih aldehida i ketona. Dakle, to su polihidroksialdehidi i polihidroksiketoni ili spojevi koji hidrolizom daju navedene spojeve.

Reducirajući ugljikohidrati zahvaljujući slobodnoj aldehidnoj odnosno keto-skupini imaju sposobnost redukcije metala iz alkalnih otopina njihovih soli.

Tipičan reagens za određivanje ugljikohidrata na bazi njihove redukcijske sposobnosti je:

ALKALNA OTOPINA Cu-SULFATA i K-Na-TARTARATA, FEHLING-ova OTOPINA.

Posljedica ove reakcije je crveno-smeđi talog (netopljiv) Cu_2O (bakreni oksidul, Cu^{+1} oksid).

Fehling-ovu otopinu reduciraju:

- 1. IZRAVNO : glukoza, fruktoza, maltoza i laktoza (reducirajući šećeri)**
- 2. NAKON HIDROLIZE: saharoza, oligo- i polisaharidi (nereducirajući izvori ugljika).**

Podjela ugljikohidrata s obzirom na njihova redukcijska svojstva:

1) UGLJIKOHIDRATI TOPLJIVI U VODI:

monosaharidi i neki disaharidi (laktoza i maltoza) → reduciraju Fehling-ovu otopinu
oligosaharidi i neki polisaharidi → reduciraju Fehling-ovu otopinu nakon hidrolize.

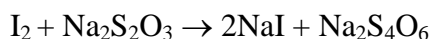
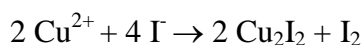
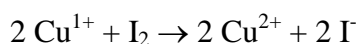
2) UGLJIKOHIDRATI KOJI HIDROLIZIRAJU U ZAGRIJANOJ OTOPINI RAZDRIJEĐENIH MINERALNIH KISELINA → npr. **ŠKROB**

3) UGLJIKOHIDRATI KOJI HIDROLIZIRAJU U KONCENTRIRANIM MINERALNIM KISELINAMA → npr. **CELULOZA.**

1. Određivanje količine šećera RS metodom (određivanje reducirajućih supstancija)

Princip određivanja:

Slobodne aldo- i keto- skupine reduciraju kupri ion (Cu^{2+}) iz Fehlingove otopine do kupro iona (Cu^{1+}). Posljedica ove reakcije je crveno-smeđi talog netopljivog bakrenog oksidula (Cu_2O). Kalijev jodid se dodaje ohlađenoj smjesi u suvišku, a smjesa se zakiseli s pomoću H_2SO_4 . Jod reagira s Cu^{1+} ionom, a suvišak joda se titrira otopinom natrijevog tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), uz škrob kao indikator (smjesa otopine joda i škroba daje tamnomodro obojenje) do prelaza u boju puti koja se treba zadržati jednu minutu.



Postupak

- 1) 10 mL uzorka se razrijedi dodatkom 15 mL destilirane vode.
- 2) Uzorku (25 mL) se zatim doda 10 mL otopine A (Fehling I) i 10 mL otopine B (Fehling II).
- 3) Kuha se točno 2 minute u tikvici s okruglim dnom od 250 mL uz povratno hladilo, ohladi pod mlazom vode i doda 10 mL otopine C (30%-tni KJ) i doda 10 mL otopine D (26 %-tne H_2SO_4).
- 4) Sve se dobro izmiješa i doda 2 mL škroba (1 %-tna otopina), te titrira s 0.1 mol L^{-1} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ do prijelaza plave boje u boju puti (treba se zadržati jednu minutu).

Glukoza test (kontrola): 5 mL otopine glukoze (10 g L^{-1}) + 20 mL destilirane vode (ukupan volumen 25 mL) i ponoviti prethodno opisan postupak.

Slijepa proba: 25 mL destilirane vode i ponoviti prethodno opisan postupak.

Račun:

$$\gamma (\text{reducirajuće supstancije} \equiv \text{RS}) = [50 (a - b) / [(a - c) \cdot d] \quad (\text{g L}^{-1})$$

a – volumen $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utrošen za slijepu probu (mL)

b - volumen $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utrošen za uzorak (mL)

c - volumen $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utrošen za kontrolu (glukoza test) (mL)

d - volumen uzorka uzet za analizu (10 mL)

2. Određivanje nereducirajućih šećera

Princip:

1. Hidroliza
2. Određivanje reducirajućih šećera

Nereducirajući šećeri se moraju prvo hidrolizirati na reducirajuće monosaharide pomoću kiseline ili enzimski, a tek onda odrediti pomoću Fehlingove otopine ili neke druge prikladne metode.

Zadatak: Odrediti nereducirajuće šećere u kemijski definiranoj (izvor ugljika i saharoza) podlozi i u kompleksnoj podlozi (melasnoj).

Postupak:

- Otpipetirati 7 mL uzorka u odmjernu tikvicu od 50 mL.
- Dodati 1 mL 21 % HCl i 10 mL destilirane vode
- Staviti na 10 min u vodenu kupelj temperature 65 °C (odmjerna tikvica pri tom ne smije biti začepljena!!!).
- Dodati 4 mL 21 % HCl i ostaviti 30 minuta na sobnoj temperaturi.
- Neutralizirati 20 %-tnom otopinom NaOH, ohladiti i nadopuniti destiliranom vodom do oznake.
- Od pripremljenog razrjeđenja uzeti 10 mL za daljnju analizu.

NAPOMENA: Ovaj propis vrijedi za početnu koncentraciju šećera u podlozi od otprilike 20 g/L. Smanjenjem koncentracije šećera povećava se volumen uzorka uzet za daljnju analizu.

RS metoda:

- U tikvicu s okruglim dnom volumena 250 mL doda se 10 mL uzorka i 15 mL destilirane vode.
- U 25 mL doda se 10 mL otopine A (Fehling I) i 10 mL otopine B (Fehling II).
- Kuha se točno 2 minute uz povratno hladilo.
- Zatim se ohladi pod mlazom vode te doda 10 mL otopine C (30% KI) i 10 mL otopine D (26% H₂SO₄).
- Sve se dobro izmiješa i doda 2 mL škroba (1% otopina) te titrira 0,1 M Na₂SO₂O₃ do prijelaza plave boje u boju puti koja se treba zadržati 1 minutu.

GLUKOZA TEST (KONTROLA)

Prethodno opisani postupak ponovi se s 5 mL 1%-tne glukoze i 20 ml destilirane vode (ukupni volumen 25 mL).

SLIJEPA PROBA

Prethodno opisani postupak ponovi se s 25 mL destilirane vode.

Račun:

$$RS = \frac{50 \cdot (a - b)}{(a - c) \cdot d}$$

RS = koncentracija reducirajuće supstancije (g L⁻¹)

a = mL 0,1 mol L⁻¹ Na₂S₂O₃ utrošeni za slijepu probu

b = mL 0,1 mol L⁻¹ Na₂S₂O₃ utrošeni za uzorak

c = mL 0,1 mol L⁻¹ Na₂S₂O₃ utrošeni za glukoza test

d = mL izvornog uzorka (supernatanta) uzeti za analizu

(npr. ako se uzme za analizu 7 mL supernatanta i razrijedi na 50 mL, a onda se 10 mL uzme u

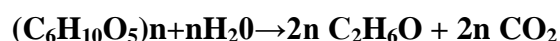
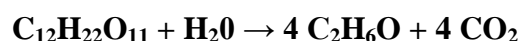
daljnju analizu dobije se da je $d = \frac{7}{50} \cdot 10 = 1,4$ mL)

2. VJEŽBA: Alkoholno vrenje na industrijskim sirovinama

1. RADNI MIKROORGANIZAM

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, askosporogeni kvasac iz porodice Saccharomycetaeae koji dobro previre D-fruktozu, D-glukozu, saharozu i maltozu. sporije previre D-manozu i D-galaktozu. Ovaj kvasac ne sintetizira enzim amilazu.

Bruto jednadžbe:



Proizvodnja etanola spada u najranije postupke koje je čovjek poznao tijekom povijesti (proizvodnja vina, piva i dr.). U industrijskoj proizvodnji alkohol se danas pretežno proizvodi iz repine i tršćane melase (izvor disaharida), te kukuruznog brašna kao škrobne sirovine. Ukoliko se koriste škrobne sirovine, potrebno je prvo izvršiti hidrolizu škroba na monosaharide (enzimima i kiselinom). Alkohol se iz komine izdvaja destilacijom, pri čemu se dobiva čisti rafinirani alkohol, tehnički alkohol (sadrži estere i aldehide) i viši alkoholi. Proces fermentacije se vodi u blago kiselom području (pH 4 – 5,5).

ZADATAK: Potrebno je proizvesti zadani volumen etilnog alkohola iz melase i škrobne sirovine, uz zadanu koncentraciju šećera i škroba u podlozi.

Grupa	1	2	3
Volumen EtOH (mL)	8	10	12
Konc. šećera (g/L)	70	80	95
Konc. škroba (g/L)	50	60	65

POSTUPAK RADA:

1. izračunati potrebne količine sirovina i pripremiti podloge
2. ošećeriti škrobne sirovine
3. sterilizirati podloge
4. inokulirati obje podloge s 2 % (v/v) suspenzije kvasca i staviti ih u termostat na 28 °C začepljenim s vrelnjačama
5. izvršiti destilaciju i refraktometrijski odrediti koncentraciju dobivenog alkohola
6. izračunati koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{p/s}$) i iskorištenje procesa (I)

PRIPREMA MELASNE PODLOGE:

Odvagne se u čašu izračunata količina melase sa poznatim sadržajem šećera da bi se dobila zadana konc. šećera. Melasa se dodatkom vodovodne vode prenese u menzuru (čahu dobro oprati) i nadopuni do izračunatog volumena. pH se podesi na 4,5 – 5 sa 0,5 M H_2SO_4 . Doda se $(NH_4)_2PO_4$ u koncentraciji od 2 g/L (kao izvor dušika i fosfora) i sve prebaci u Erlenmeyer tikvicu. Komina se sterilizira 30 minuta pri 120 °C (2 bara aps. tlaka).

PRIPREMA PODLOGE OD ŠKROBNIH SIROVINA

Odvagne se izračunata količina kukuruznog brašna i uz miješanje usipa u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL u kojoj se već nalazi izračunata količina vode zagrijane na 75 °C. Volumen vode se izračuna prema izrazu:

$$\mathbf{VOLUMEN\ VODE = VOLUMEN\ PODLOGE - (ODVAGA\ BRAŠNA \times 0,7)}$$

pH komine se podesi na 4-5 s 0,5 M H_2SO_4 . U podlogu se dodaju amilolitički enzimi u konc. 2 mL ili 0,1 g na 100 g brašna. Zatim se tikvica začepi vatenim čepom i kuha 45 minuta u autoklavu pri 127 °C (2,5 bara) da bi se škrob preveo u škrobni lijepak.

ODREĐIVANJE ALKOHOLA U PREVRELOJ KOMINI

Pomoću menzure odmjeri se 100 mL podloge i prebaci se u tikvicu za destilaciju s okruglim dnom, doda se 100 mL vode, te se podesi pH vrijednost podloge na približno 7 pomoću 1M otopine NaOH. Tikvica se priključi na aparatu za destilaciju, a destilat se prikuplja u odmjernu tikvicu od 100 mL. Kada je oko 2/3 volumena odmjerne tikvice ispunjeno destilatom, destilacija se prekida, odmjerna tikvica se nadopuni vodom do 100 mL, te se odredi refraktometrijska vrijednost ove otopine. Iz baždarnog dijagrama se očita odgovarajuća koncentracija alkohola.

Refraktometar

Refrakcijom se mjeri promjena prijeloma zraka svjetla na granici dviju različitih tvari, a dana je odnosom između brzine svjetla prolaskom kroz zrak i brzine svjetla prolaskom kroz tekućinu. Rad refraktometra se temelji na prolasku zrake svjetla iz rjeđe sredine (zrak) u gušću sredinu (destilat). Lom svjetla očitava se na skali refraktometra u obliku stupca sjene, odnosno na skali se očitava vrijednost koja se nalazi na granici svijetlog i tamnog polja. Očitavanje se vrši pri temperaturi od 20 °C, a za svako odstupanje se vrši korekcija (za svaka 3 °C iznad 20 °C očitavanju treba dodati 0,2%, a za niže temperature isti iznos oduzeti).

POSTUPAK:

Na suhu i čistu staklenu prizmu refraktometra staviti nekoliko kapi destilata te spustiti poklopac. Ogledalom usmjeriti svjetlost, da se postigne mogućnost očitavanja. Kompenzatorom iz vidnog polja eliminirati boje, da se dobije oštra, bezbojna granična linija. Polugu s okularom micati sve dok se horizontalna linija ne poklopi s graničnom linijom površina i tada očitati postotak suhe tvari na skali refraktometra. Poslije svakog očitavanja staklenu prizmu oprati destiliranom vodom i obrisati suhom krpom.

IZRAČUNAVANJE KOEFICIJENTA KONVERZIJE SUPSTRATA U PROIZVOD (Y_{p/s}) I ISKORIŠTENJA PROCESA (I)

Nakon završenih analiza izračunati koeficijent konverzije supstrata u produkt (Y_{p/s}) i iskorištenje procesa (I).

Koeficijent konverzije supstrata u proizvod (Y_{p/s})

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (\text{g/g; kg/kg})$$

P = koncentracija proizvoda na kraju procesa (g/L)

P₀ = koncentracija proizvoda na početku procesa (g/L)

S₀ = koncentracija supstrata na početku procesa (g/L)

S = koncentracija supstrata na kraju procesa (g/L)

Iskorištenje procesa (I)

$$I = Y_{p/s} (\text{stv.}) / Y_{p/s} (\text{teor.}) * 100 \quad (\%)$$

3. VJEŽBA: ODREĐIVANJE PROTEINA I SUHE TVARI BIOMASE

Metode kvantificiranja proteina:

1. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

Proteini se mogu određivati mjerenjem UV-apsorbancije pri 275 – 280 nm (prisutni ostatci tirozina, triptofana i fenilalanina u proteinu).

2. KEMIJSKE METODE

- **Kjeldahl-ova metoda** - proteini sadrže prosječno 16 % dušika, a ovom metodom se određuje proteinski dušik kao amonijak nakon razgradnje organske tvari.
- **Određivanje proteina formol-titracijom (metoda po Pyneu)**
- **Brza metoda za određivanje proteina (metoda po Stowellu)**

3. KOLORIMETRIJSKE METODE

- **Biuret reakcija** - Cu iz Cu-sulfata u alkalnoj otopini tartrata reagira s peptidnim vezama peptida i proteina i daje ljubičasto obojeni bakar-protein kompleks s maksimumom apsorpcije pri 540 nm.
- **Lowry metoda** - obojenje nastalo redukcijom fosforvolframove kiseline (reagens prema Folinu) – detekcija u području 500-750 nm
- **BCA metoda** - prvi korak je Biuret reakcija u kojoj se reducira Cu^{+2} u Cu^{+1} , u drugom koraku BCA reagens tvori kompleks sa Cu^{+1} , koji apsorbira pri 562 nm.
- **Metoda po Bradfordu** - vezanjem boje Coomassie Brilliant Blue na protein mijenja se valna dužina maksimalne apsorbcije boje s 465 nm na 595 nm.

Pri odabiru analitičke metode treba obratiti pažnju na količinu proteina prisutnih u uzorku, kao i na aminokiselinski sastav proteina, te tvari kovalentno vezane na protein, prvenstveno ugljikohidrate.

A. Brzo određivanje dušika po Stowellu

2,0 g ječmenog brašna pomiješa se u tikvici po Kjelhahl-u s 50 ml otopine NaOH koncentracije 50 g/100 ml, doda se 35 g NaOH u peletima, te se brzo destilira vodenom parom. Brzina destilacije se optimira kako ne bi došlo do jakog pjenjenja. Potrebno je predestilirati točno 100 ml destilata, koji se hvata u oko 25 ml 2%-tne borne kiseline. Po završetku destilacije, sadržaj dušika u destilatu se određuje titracijom s 0,025 M HCl ili 0,0125 M H₂SO₄, uz metiloranž ili miješani indikator.

- sadržaj proteina u ječmu (%):

$$proteini = \frac{0,14 \cdot a \cdot 6,25}{2}$$

- sadržaj proteina u ječmu na suhu tvar (%):

$$proteini_{s.tv.} = \frac{0,14 \cdot a \cdot 6,25}{2 \cdot (100 - w)}$$

a - utrošak 0,025 M HCl ili 0,0125 M H₂SO₄ (ml),

w – vlaga ječma (%)

B. Određivanje suhe tvari u ječmu

Postupak:

1. Izvagati praznu posudicu za određivanje suhe tvari.
2. U posudicu odvagati 5 g ječmenog brašna.
3. Suhu tvar odrediti sušenjem na 105 °C do konstantne mase.
4. Izvagati posudicu sa osušenim uzorkom.

Postotak vode u ječmenom brašnu računati prema jednadžbi:

$$w (\text{H}_2\text{O} \%) = [(m_2 - m_3) / (m_2 - m_1)] \times 100$$

w - maseni udio vode u uzorku (%)

m₁ - masa prazne posude (g)

m₂ - masa posude i uzorka prije sušenja (g)

m₃ - masa posude i osušenog uzorka (g)

Udio suhe tvari, izražen u postotcima, računati prema jednadžbi:

$$w (\text{suha tvar} \%) = 100 - w (\text{H}_2\text{O})$$

w - maseni udio suhe tvari u uzorku (%)

4. VJEŽBA: Analize mehaničkih, fizikalno-kemijskih i fizioloških svojstava pivskog ječma

Za proizvodnju ječmenog slada isključivo se primjenjuje pljevičasti dvoredni ječam (*Hordeum distichum*) koji se može sijati u proljeće (jare sorte) ili u jesen (ozime sorte). Uporaba ozimih i fakultativno ozimo-jarih sorti je novijeg datuma i sve se više širi, jer ove sorte daju veći prinos zrna. Za slađenje se, međutim, primjenjuje samo zrno odgovarajuće kakvoće. Kakvoća zrna ovisi o svojstvima sorte i uvjetima uzgoja (klima, sastav i geografski položaj poljoprivrednog zemljišta, gnojidba).

SLADARSKA KAKVOĆA JEČMENOG ZRNA SE OCJENJUJE PREMA:

- 1. vanjskom izgledu zrna** (boja i miris, vlažnost, oblik, veličina, ujednačenost i oštećenost zrna, osobine pljevice i relativan broj proklijalih zrna, čistoća sorte, prisutnost drugih žitarica, urodica i insekata);
- 2. mehaničkim i fizikalno-kemijskim analizama** (sortiranost, hektolitarska masa, masa 1000 zrna, udjel vode i proteina);
- 3. fiziološkim svojstvima** (klijavost, energija klijanja nakon 3 i 5 dana, hidrosenzibilnost, moć bubrenja ili sposobnost vezanja vode).

MEHANIČKE I FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE

Prema kakvoći, pivski se ječam dijeli u tri skupine kakvoće: prosječni, vrlo dobar i izvrstan ječam. Jedan od kriterija za takvu podjelu je veličina zrna ili sortiranost zrna. Sortiranje je najvažnija metoda fizikalno-mehaničkog ispitivanja zrna. Sastoji se od propuštanja ječma preko vibracijskih sita s duguljastim otvorima širine 2,8 mm, 2,5 mm i 2,2 mm i razdvajanja na tri frakcije:

- sve što ostaje na situ 1 (2,8 mm) i situ 2 (2,5 mm) je zrno I klase,
- sve što propada kroz sito 1 i 2, ali se zadržava na situ 3 je ječam II klase,
- sve što propada kroz sva tri sita je otpadni ječam, ili III klasa ječma, pa se prodaje za stočnu hranu.

Ječam I i II klase se u pravilu prerađuje odvojeno, jer je zbog različite debljine zrna i različita brzina upijanja vode.

Udjel vode u dobrom pivskom ječmu ne smije biti veći od 14 %, jer mu je u protivnom vrijeme čuvanja ograničeno, pa ga treba sušiti (dosušivati) prije ili tijekom skladištenja.

Udjel proteina u pivskom ječmu je vrlo značajan. Što je udjel proteina u zrnu veći to se zrno teže sladi, a gubici su pri slađenju veći. Osim toga, povećani udjel proteina u zrnu ječma smanjuje sadržaj ekstrakta u proizvedenom sladu. Koliko je udjel proteina viši, toliko je udjel ekstrakta (vodotopljivi dio) u sladu manji. Udjel proteina u dobrom pivskom ječmu obično iznosi od 11 do 12,5 %.

ODREĐIVANJE FIZIOLOŠKIH SVOJSTAVA

Pod pojmom **klijavosti** se podrazumijeva postotak živih zrna u uzorku ječma, bez obzira na trajanje poslijezetvenog dozrijevanja zrna. Udjel klijavih zrna mora biti najmanje 96 %.

Energija klijanja predstavlja postotak zrna što isključuju pod normalnim uvjetima slađenja nakon 3 ili nakon 5 dana. Velika energija klijanja ukazuje na dobro zdravstveno stanje ječmenog zrna i na potencijalno uspješan proces slađenja. Energija klijanja nakon 3 dana mora biti slična onoj nakon 5 dana (min 95 %).

Osjetljivost ječma na primanje vode (**hidrosenzibilnost**) može biti različita. Pod ovim se pojmom podrazumijeva pojava velikog smanjenja energije klijanja, kada je na raspolaganju više vode nego je potrebno za samo klijanje. Ona se određuje iz razlike energije klijanja prilikom močenja s različitim volumenima vode (4 i 8 ml) i kreće se od 10 % za ječam vrlo male osjetljivosti do preko 45 za ječam velike osjetljivosti prema vodi. Što je osjetljivost ječma prema vodi veća, to je kraće trajanje njegova močenja. Moć bubrenja ukazuje na sposobnost zrna da nakon 72 sata močenja primi maksimalni volumen vode, a kreće se u rasponu od ispod 45 % (nezadovoljavajuća) do iznad 50 % (vrlo dobra).

1. MEHANIČKA ODREĐIVANJA JEČMA

A) Hektolitarska masa

Cilindar za punjenje napuni se do oznake uzorkom ječma čija se hektolitarska masa određuje. Zatim se ječam presipa u cijev za punjenje tako da se cilindar za punjenje podigne na oko 3 – 4 cm od gornjeg ruba cijevi za punjenje i tijekom približno 8 sekundi ravnomjernim se mlazom čitava količina uzorka presipa u cijev. Potom se jednim trzajem izvuče nož iz proreza. Nakon pada uloška s ječmom u cilindar za mjerenje, jednim potezom i bez zastoja vrati se nož na mjesto, cilindar za mjerenje se odvoji od postolja, višak ječma iz cijevi za punjenje iznad noža se presipa van, skine se cijev za punjenje, izvadi nož, te se cilindar za mjerenje izvaže s točnošću od 0,5 g. Iz odgovarajućih tablica se na osnovi utvrđene mase uzorka ječma u cilindru očita hektolitarska masa.

B) Masa 1000 zrna (apsolutna masa)

Uzorak ječma (40 g) se izvaže na vagi s točnošću od 0,1 g. Ručno se odvoje polovice zrna, zrna urodica i strane nečistoće. Vaganjem se utvrdi masa nečistoća, te se ručno ili upotrebom uređaja za brojenje zrna, utvrdi broj zrna u čistom uzorku. Iz dobivenih podataka izračuna se masa 1000 zrna ječma, koja se izražava na zračno suhi ječam ili na suhu tvar ječma.

Proračun:

- masa 1000 zrna na zračno suhi ječam (g):

$$a.m. = \frac{(G - g) \cdot 1000}{n}$$

- masa 100 zrna ječma na suhu tvar ječma (g):

$$a.m._{s.tv.} = \frac{10(G - g) \cdot (100 - w)}{n}$$

G – odvagana ukupna masa uzorka (g)

g – utvrđena masa nečistoća u uzorku (g)

n – broj zrna u uzorku

w – vlaga ječma (%)

C) Procjena ekstrakta ječma prema Bishopovoj formuli

Prema ovoj formuli, sadržaj ekstrakta se može procijeniti na osnovi sadržaja dušika i mase 1000 zrna ječma:

$$E = A - 4,7 \cdot N + 0,1 \cdot G$$

gdje je:

E = ekstrakt ječma (% na s. tv.)

N = sadržaj dušika u ječmu (% na s. tv.)

G = masa 1000 zrna ječma (g na s. tv.)

Konstanta A ovisi o sorti ječma i iznosi:

$A = 84,5$ za dvoredne sorte ječma

$A = 80,0$ za šestoredne sorte ječma

Poznavanjem sorte ječma, koeficijent A se može izraziti s većom preciznošću. Prema radovima Komisije za analitiku EBC, kod pojedinih sorti ječma koeficijent A iznosi:

86,8 – Beka

86,5 – Union, Volla

86,0 – Domen, Wisa, Busser

85,4 – Ingrid, Proctor

85,2 – Isaria II, Kenia, Pallas

84,8 – Balder, Bonus, Calberg II, Herta, Pirolina, te većina starijih dvorednih sorti

84,0 – Delta

80,0 – većina šestorednih sorti ječma.

2. FIZIOLOŠKE KARAKTERISTIKE JEČMA

A) Određivanje klijavosti s H₂O₂

500 zrna ječma moči se 2 dana u svježe pripremljenoj 0,75 %-tnoj otopini H₂O₂. Trećeg dana se otopina za močenje dekantiranjem odlije, zrna se preliju sa svježih 200 ml 0,75 %-tne otopine H₂O₂ i ostave stajati na sobnoj temperaturi još daljnjih 2 dana. Nakon 4 dana odvoje se isključena zrna, ne isključena se izbroje, te se izračuna klijavost prema jednadžbi:

$$\text{klijavost} = \frac{500 - n}{5} \%$$

n – broj neisklijalih zrna.

B) Određivanje energije klijanja

100 zrna ječma stavi se u Petrijevu zdjelicu promjera 9 cm između dva lista filter papira, navlaži s točno 4 ml vodovodne vode i inkubira 3 dana pri 18 °C. Nakon inkubacije izbroje se isključena zrna. Broj isključalih zrna, izražen u postocima predstavlja po definiciji energiju klijanja.

C) Određivanje hidrosenzibilnosti zrna

Postupak je isti kao i kod određivanja energije klijanja, jedino se umjesto 4 ml, zrna vlaže s 8 ml vode. Hidrosenzibilnost predstavlja razliku u broju isključalih zrna kod ova dva postupka, izraženu u %.

Primjer: od 100 zrna ječma, vlaženjem sa 4 ml vode, tijekom tri dana isključalo je 96 zrna, a vlaženjem s 8 ml vode, 92 zrna.

Energija klijanja = 96 %

Hidrosenzibilnost = 96 – 92 = 4 %.

5. VJEŽBA: ANALIZE MEHANIČKIH, FIZIKALNO-KEMIJSKIH I FIZIOLOŠKIH SVOJSTAVA SLADA

Procjena kakvoće slada provodi se prema propisanim metodama analiza (EBC, ASBC, MEBAK).

Kakvoća slada se može provjeravati:

1. ručnom procjenom (mehanička analiza)
2. fizikalnim i fiziološkim određivanjima
3. kemijskim i fizikalno-kemijskim metodama.

ODREĐIVANJE EKSTRAKTA U SLADOVINI (Kongresna metoda, EBC)

Ukomljavanje kongresnim postupkom se primjenjuje za određivanje ekstrakta slada. Pod pojmom ekstrakt podrazumijevaju se svi sastojci (ugljikohidrati, proteini, aminokiseline, β -glukan, itd.) koji u uvjetima ukomljavanja prelaze u otopinu (sladovinu). Sadržaj ekstrakta se očitava iz službenih tablica za šećere (Tablica prema Plato-u) na osnovi gustoće sladovine $\gamma_{20/20}$. Vrijednost $\gamma_{20/20}$ predstavlja odnos masa određenog volumena sladovine i istog volumena vode pri 20 °C.

Zu samo određivanje ekstrakta, tijekom ove analize se prati reakcija s jodom (vrijeme ošećerenja, jodna proba), miris, pH, bistrina, boja i brzina cijedenja komine.

Ako se slad samelje grubo (gruba prekrupa), postupkom kongresnom ukomljavanja se kod slabije razgrađenog slada dobiva manje ekstrakta, dok se kod dobro razgrađenog slada dobiva skoro jednak udjel ekstrakta kao i od fino samljevenog slada.

Prema tome, na osnovi razlike ekstrakta dobivenog od fino i grubo mljevenog slada mogu se izvesti zaključci o citolitičkoj razgrađenosti slada.

1. MEHANIČKA, FIZIKALNA I FIZIOLOŠKA ANALIZA SLADA

A) Hektolitarska masa

Hektolitarska masa slada određuje se isto kao i kod ječma, ali se rezultat ne očitava iz tablice, nego se masa 1/4 litre slada (u kilogramima) množi sa 400. Kod slada, ona se obično kreće između 54 i 58 kg na zračno suhi slad.

B) Masa 1000 zrna slada

Određuje se isto kao kod ječma, a iznosi 28 do 38 g na zračno suhi slad, odnosno 25 –35 g na suhu tvar slada. Poznavanjem mase 1000 zrna ječma i mase 1000 zrna iz njega dobivenog slada, može se uvidjeti veličina gubitaka suhe tvari tijekom sladovanja.

C) Proba tonjenja

Odbroji se 100 zrna slada i potopi u vodu u velikoj staklenoj čaši. Nakon 3 i nakon 10 minuta izbroji se koliko je zrna potonulo i izračuna se srednja vrijednost. Kod dobro razgrađenog svijetlog slada, potone najviše 30 – 35 % zrna slada, a kod tamnog 25 – 30 % zrna slada. Kod ove probe se, također, uočava razlika između zrna koja stoje na dnu (staklenasta na vrhu zrna) i koja leže, kao i između zrna koja tonu na dno odmah, ili tek nakon određenog vremena (3 – 10 minuta).

Prema Chapon-u i Kretschmer-u, proba tonjenja može služiti i kao kriterij ujednačenosti i prhkosti, tj. razgrađenosti slada. Prema navedenim autorima, za izražavanje prhkosti i ujednačenosti slada primjenjuju se sljedeći parametri:

zrna koja tonu (%)	prhkost i ujednačenost slada
0 – 10	vrlo dobra (+++)
11 – 25	dobra (++)
26 – 45	zadovoljavajuća (+)
iznad 45	nezadovoljavajuća (-)

2. KEMIJSKA ANALIZA SLADA

A) Određivanje ekstrakta slada (“Kongresna metoda”)

50 g slada fino se samelje na EBC mlinu za slad. Od toga se u čaši kupelji za određivanje ekstrakta, poznate mase, ukomi s 200 ml vode zagrijane na 45-46 °C. Komina se homogenizira miješanjem staklenim štapićem, nakon čega se čaše s kominom termostatiraju u kupelji zagrijanoj na 45 °C tijekom 30 minuta, uz miješanje na 80 –100 okretaja/minuti.

Nakon termostatiranja na 45 °C, komina se 25 minuta grije do 70 °C, nakon čega se u kominu nadolije novih 100 ml destilirane vode (zagrijane na 70 °C), te se, uz miješanje, termostatira daljnjih 60 minuta na 70 °C. Zatim se komina tijekom 10 – 15 minuta ohladi na 20 °C, a u čašu s ohlađenom kominom se pažljivo dodaje destilirana voda do točno 450 g ukupne mase. Nakon nadopunjavanja, komina u čaši se dobro homogenizira miješanjem sa staklenim štapićem, te se profiltrira kroz naborani filter papir. Lijevak i filter moraju biti takvih dimenzija da cjelokupna količina komine odjednom stane u lijevak. Prvih 100 ml filtrata se vrati natrag u lijevak i nastavi se postupak filtracije. U filtratu se piknometrom odredi gustoća na 20 °C, te se iz tablica očita sadržaj ekstrakta (%).

Proračun:

- ekstrakt slada (E) izražen na zračno suhi slad:

$$E = \frac{e \cdot (800 - w)}{100 - e} (\%)$$

-ekstrakt slada izražen na suhu tvar ($E_{s.tv.}$):

$$E_{s.tv.} = \frac{100 \cdot E}{100 - w} (\%)$$

e = sadržaj ekstrakta u filtratu (%)

w = vlaga slada (%)

Tijekom određivanja ekstrakta slada prema kongresnoj metodi, zapaža se ili mjeri nekoliko pokazatelja, koji utječu na kvalitetu slada:

a) Miris sladovine. Zapaža se nakon ukomljavanja, a odgovara tipu slada. Ako pri analizi tamnog slada nema normalnog mirisa, tada se miris označava kao “nije aromatičan”. Svaka pojava stranog mirisa sladovine se zapaža i zapisuje.

b) Vrijeme ošećerenja komine. 10 minuta nakon što se komina zagrije na 70 °C, na porculanskoj pločici se pomiješa kap komine (izuzeta iz komine pomoću staklenog štapića) i 1-2 kapi 0,01 M otopine joda. Pojava plave, ljubičaste ili crvenkaste boje znak je da komina nije ošećerena. Postupak se ponavlja svakih 5 minuta, sve dok reakcija na jod ne bude negativna. Vrijeme ošećerenja izražava se u minutama, npr. “ispod 10 minuta”, “10 – 15 minuta”, “15 – 20 minuta” i sl. Ukoliko se u roku od 60 minuta komina ne ošećeri, pokus se ponavlja pri 75 °C s novom količinom slada. Ovaj pokus služi samo za utvrđivanje ošećerenja i ne može se primijeniti za određivanje ekstrakta.

c) Brzina filtracije. Nakon vraćanja prvih 100 ml filtrata u lijevak, otpočinja se s mjerenjem vremena. Ako se filtracija završi za manje od 1 sata, ona se označava izrazom “uobičajena”. Ukoliko filtracija traje preko 60 minuta, označava se izrazom “spora”. Ostale oznake, kao npr. mjerenje “vremena cijedenja” treba izbjegavati.

d) Bistrina sladovine. Zapaža se po završenoj filtraciji i označava kao “bistra”, “slabo opalna”, “opalna” ili “mutna”.

e) pH vrijednost sladovine. Mjeri se u filtriranoj sladovini pH-metrom.

f) Boja sladovine. Mjeri se u ml 0,05 M otopine ili u stupnjevima EBC, isto kao kod mjerenja boje piva. Boja se mjeri neposredno po završenoj filtraciji, jer u protivnom sladovina postaje tamnija, pa se dobiju pogrešni rezultati.

B) Određivanje boje sladovine

Boja sladovine mjeri se standardnom referentnom metodom (SRM), kojom se spektrofotometrijski očitava apsorbancija na 430 nm. Očitana apsorbancija se množi s faktorom 12.7 za SRM ili 25 za određivanje boje u EBC jedinicama:







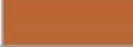

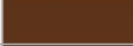
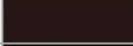




$$\text{SRM} = 12.7 \cdot D \cdot A_{430},$$

gdje je D faktor razrijeđenja.

Ako se intenzitet boje želi izraziti u EBC jedinicama, tada se koristi jednačba:

$$\text{EBC} = \text{SRM} \cdot 1.97$$

Boja se mjeri neposredno po završenoj filtraciji, jer u protivnom sladovina postaje tamnija, pa se mogu dobiti pogrešni rezultati (Slika 1).

SRM/Lovibond	Primjer	Boja	EBC
2	svijetli lager		4
3	Pilsner		6
4	Pilsner Uguell		8
6			12
8	pšenično		16
10	svijetli ale		20
13			26
17	tamni lager		33
20			39
24			47
29	Porter		57
35	Stout		69
40			79
70	vrhunski Stout		138

Slika 1. Tablica za izračunavanje boje sladovine i piva