

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Saša JERŠIN

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA
BETA-GLUKANOV IZ JEČMENOVE MOKE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Saša JERŠIN

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA BETA-GLUKANOV
IZ JEČMENOVE MOKE**

MAGISTRSKO DELO
Univerzitetni študij – 2. stopnja Živilstvo

**ISOLATION AND CHARACTERISATION OF BARLEY
FLOUR BETA-GLUCANS**

M.SC. THESIS
Master Study Programmes: Food Food Science and Technology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Živilstvo. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti, Oddelku za živilstvo, Katedri za biokemijo in kemijo živil.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Blaža Cigića, za somentorja doc. dr. Igorja Pravsta in za recenzenta doc. dr. Tomaža Požrla.

Mentor: prof. dr. Blaž Cigić

Somentor: doc. dr. Igor Pravst

Recenzent: doc. dr. Tomaž Požrl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Saša Jeršin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 547.458:664.786:641.1:663.022(043)=163.6
KG	ječmen/ ječmenova moka/ β -glukani/ izolacija β -glukanov/ karakterizacija β -glukanov/ funkcionalna živila/ aditivi/ pijače/
AV	JERŠIN, Saša, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	CIGIČ, Blaž (mentor)/ PRAVST, Igor (somentor)/ POŽRL, Tomaž (recenzent)
KZ	SI – 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2014
IN	IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA BETA-GLUKANOV IZ JEČMENOVE MOKE
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)
OP	XI, 81 str., 12 pregl., 21 sl., 85 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	β-glukani so polisaharidi v katerih so molekule glukoze povezane z β-1,3 in β-1,4 glikozidnimi vezmi. Ker zaužiti β-glukani dokazano zmanjšujejo resorpcijo holesterola in njegovo vsebnost v plazmi, ter posledično zmanjšujejo verjetnost za pojav kardiovaskularnih bolezni, obstaja velik interes za pripravo živil z visoko vsebnostjo β-glukanov. Namen našega raziskovalnega dela je bil optimizirati postopek izolacije β-glukanov in okarakterizirati pridobljene izolate. Kot izhodni material smo uporabili z β-glukani obogateno ječmenovo moko. V prvem sklopu smo optimizirali postopek izolacije. Uporabili smo različne glikozidaze in peptidaze, da bi hidrolizirali polimerne molekule, ki jih ne uvrščamo med β-glukane. Ugotovili smo, da največjo vsebnost β-glukanov dosežemo v izolatih, kjer smo v postopkih uporabili amiloglukozidazo in alkalazo. Izolat smo določili suho snov, vsebnost β-glukanov, škroba, proteinov, fenolnih spojin in mineralov. Analizirali smo tudi viskoznost vodnih raztopin ter ocenili molsko maso izoliranih β-glukanov. Izolat β-glukanov smo uporabili kot dodatek v pijače in pripravljene izdelke senzorično ocenili. Ugotovili smo, da je izolat, ki smo ga sami pripravili, senzorično sprejemljivejši od komercialno dostopnega, saj je bil bolj topen, pripravljena pijača pa je bila bistrejša. Prav tako se je izkazal za kakovostnejšega pri rezultatih drugih analiz.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 547.458:664.786:641.1:663.022(043)=163.6

CX barley/ barley flour/ β -glucan/ isolation of β -glucans/ characterisation of β -glucans/ functional foods/ additives/ beverages/

AU JERŠIN, Saša

AA CIGIČ, Blaž (supervisor)/ PRAVST, Igor (co-advisor)/ POŽRL, Tomaž (reviewer)

PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2014

TI ISOLATION AND CHARACTERISATION OF BARLEY FLOUR BETA-GLUCANS

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)

NO XI, 81 p., 12 tab., 21 fig., 85 ref.

LA SI

AL sl/en

AB β -glucans are polysaccharides of glucose molecules connected with β -1,3 and β -1,4 glycosid bonds. It was proven, that when ingested, β -glucans reduce cholesterol resorption and its concentration in blood plasma and consequently reduce the occurrence of cardiovascular diseases. That is the main reason for the increasing interest in development of food products with high β -glucan content. The purpose of research was to optimise the process of isolation of β -glucans and to characterise the obtained isolates. Flour enriched with β -glucans was used as a material for isolation. In the first part we have optimised the process of isolation. Various glycosidases and peptidases were applied in order to hydrolyse the polymers other than β -glucans. We have obtained the isolate with the highest content of β -glucans content, when suspension of flour was treated with amyloglucosidase and alcalase. Dry matter, content of β -glucan, starch, proteins, phenolic compounds and minerals were determined for prepared isolates. We have also measured the viscosity of the aqueous solutions, which allowed us to estimate the molecular weight of isolated β -glucans. One of the β -glucan isolates was used as an additive in beverages. Sensory analysis revealed that the isolate we have prepared is sensorially more acceptable, as it is more soluble and beverages are less cloudy than those prepared with commercial isolate.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2.1 SPLOŠNO O β -GLUKANIH	3
2.2 FIZIKALNOKEMIJSKE LASTNOSTI β -GLUKANOV	5
2.2.1 Strukturne lastnosti.....	5
2.2.2 Topnost β -glukanov.....	6
2.2.3 Viskoznost β -glukanov	7
2.2.4 Tvorba gela	7
2.3 IZOLACIJA β -GLUKANOV	9
2.3.1 Ekstrakcija β -glukanov.....	10
2.3.1.1 Topni β -glukani	10
2.3.1.2 Netopni β -glukani.....	11
2.3.1.3 Novejše metode ekstrakcije.....	12
2.3.1.3.1 Ultrazvočna ekstrakcija	12
2.3.1.3.2 Ekstrakcija z vročo vodo pod visokim pritiskom (PHWE).....	13
2.3.2 Vpliv procesiranja na ekstrakcijo β -glukanov	15
2.3.3 Hidroliza β -glukanov	16
2.3.3.1 Kislinska hidroliza.....	16
2.3.3.2 Encimska hidroliza.....	17
2.3.3.2.1 Lichenaza	17
2.3.3.2.2 β -glukozidaza	20
2.4 FUNKCIONALNOST β -GLUKANOV	22
2.4.1 Prebava prehranske vlaknine	22

2.4.2 Vpliv na metabolični sindrom	23
2.4.3 Vpliv na zniževanje holesterola.....	25
2.5 UPORABA β -GLUKANOV	25
2.5.1 Izdelki iz žit	26
2.5.2 Mlečni izdelki.....	27
2.5.3 Mesni izdelki	27
2.5.4 Pijače	28
3 MATERIALI IN METODE	30
3.1 MATERIALI	30
3.1.1 Vzorci.....	30
3.1.1.1 Valechol [®] moka	30
3.1.1.2 Izolati β -glukanov	30
3.1.1.3 Encimi	31
3.1.1.4 Živila, v katera smo dodajali β -glukane	31
3.1.2 Reagenti.....	32
3.1.3 Oprema.....	33
3.2 METODE.....	33
3.2.1 Optimizacija ekstrakcije in izolacije β -glukanov iz različnih virov	33
3.2.2 Določanje vsebnosti β -glukanov v različnih vzorcih	35
3.2.2.1 Določanje β -glukanov v Valechol [®] moki	36
3.2.2.2 Določanje β -glukanov v izolatu	36
3.2.3 Določanje škroba	37
3.2.3.1 Določanje škroba v izolatu.....	37
3.2.3.2 Določanje škroba v Valechol [®] moki	38
3.2.4 Določanje proteinov po Bradfordovi.....	38
3.2.5 Določanje fenolnih spojin	39
3.2.6 Določanje vsebnosti vode	40
3.2.7 Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS)	41
3.2.8 Merjenje viskoznosti	41
3.2.9 Določanje β -glukanov v živilih	44
3.2.10 Senzorična analiza.....	46

4 REZULTATI Z RAZPRAVO	49
4.1 KARAKTERIZACIJA RAZLIČNIH SUROVIN ZA IZOLACIJO β -GLUKANOV	49
4.2 KARAKTERIZACIJA RAZLIČNIH IZOLATOV β -GLUKANOV	50
4.2.1 Vsebnost β -glukanov	50
4.2.2 Vsebnost škroba	53
4.2.3 Vsebnost fenolnih spojin.....	55
4.2.4 Vsebnost proteinov	55
4.2.5 Vsebnost vode	56
4.2.6 Vsebnost mineralov	56
4.2.7 Celokupna primerjava β -glukanskih izolatov	57
4.2.8 Viskoznost β -glukanskih izolatov	58
4.3 DODATEK β -GLUKANOV V ŽIVILA.....	59
4.4 SENZORIČNA ANALIZA	60
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula β -1,3-1,4-glukanov (Havrlentová in sod., 2011).	4
Slika 2: Posplošen prikaz strukture žitnih β -glukanov in njihove razgradnje do oligosaharidov z lichenazo. Puščice s prekinjeno črto kažejo na mesta hidrolize z lichenazo (Lazaridou in Biliaderis, 2007).	18
Slika 3: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti proteinov po metodi Bradford (1976)	39
Slika 4: Umeritvena krivulja za določanje polifenolov	40
Slika 5: Shematični prikaz kapilare za Ubbelohde viskozimeter (Russo, 2008).....	43
Slika 6: Odstotek v raztopino izluženih β -glukanov iz Valechol [®] in iz zdrobljenega ječmenovega zrnja po različnih časih.....	49
Slika 7: Odstotek ekstrahiranega škroba iz različnih začetnih materialov za ekstrakcijo β -glukanov	50
Slika 8: Vsebnost β -glukanov v različnih izolatih.....	52
Slika 9: Vsebnost β -glukanov v izolatih izoliranih samo z alkalazo.....	53
Slika 10: Vsebnost škroba v različnih izolatih	54
Slika 11: Vsebnost škroba v izolatih, izoliranih samo z alkalazo	54
Slika 12: Odvisnost razmerja med η_{sp} in γ SS od koncentracije v suhi snovi v izolatih β -glukanov	58
Slika 13: Primerjava raztopin izolatov β -glukanov v čaši. Desno zgoraj je raztopina izolata Cargill Barley Betafiber (izolat K), levo spodaj raztopina z izolatom I.	60
Slika 14: Primerjava raztopin izolatov β -glukanov. Desno je raztopina izolata I, levo pa raztopina izolata Cargill Barley Betafiber (izolat K).	61
Slika 15: Primerjava raztopin izolatov β -glukanov v steklenici. Levo je raztopina izolata I, desno pa raztopina izolata Cargill Barley Betafiber (izolat K).	61
Slika 16: Primerjava vzorca izolata Cargill (izolat K) raztopljenega v pijači iz bezgovega sirupa (A1) in kontrolnega vzorca pijače iz bezgovega sirupa (B1)	63
Slika 17: Primerjava vzorca izolata Cargill (A2) in vzorca izolata I (B2), oba raztopljeni v pijači iz bezgovega sirupa	64
Slika 18: Primerjava kontrolnega vzorca pijače iz bezgovega sirupa (A3) in vzorca izolata I raztopljenega v pijači iz bezgovega sirupa (B3)	65
Slika 19: Primerjava vzorca izolata Cargill raztopljenega v pijači iz malinovega sirupa (A4) in kontrolnega vzorca pijače iz malinovega sirupa (B4)	66
Slika 20: Primerjava vzorca izolata Cargill (A5) in vzorca izolata I (B5), oba raztopljeni v pijači iz malinovega sirupa.....	67
Slika 21: Primerjava kontrolnega vzorca pijače iz malinovega sirupa (A6) in vzorca izolata I raztopljenega v pijači iz malinovega sirupa (B6)	68

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni izolati	31
Preglednica 2: Uporabljeni encimi	31
Preglednica 3: Za laboratorijsko delo uporabljeni reagenti.....	32
Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema in pribor.....	33
Preglednica 5: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje proteinov	39
Preglednica 6: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje polifenolov	40
Preglednica 7: Vsebnost fenolov v različnih izolatih	55
Preglednica 8: Vsebnost proteinov v različnih izolatih	55
Preglednica 9: Rezultati analize ICP-MS: Vsebnost mineralov v izolatih in Valechol [®] moki	56
Preglednica 10: Skupna vsebnost mineralov v posameznem vzorcu, izražena v µg/g	57
Preglednica 11: Prikaz celokupne sestave vzorca izolata I in vzorca izolata K, prikazana kot W [%] izolata	57
Preglednica 12: Topnost β-glukanov v pijačah in jogurtu.....	59

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Časi pretoka vodnih raztopin izolatov β -glukanov skozi kapilaro pri merjenju viskoznosti
- Priloga B: Meritve pri določanju vsebnosti β -glukanov v različnih izolatih
- Priloga C: Meritve pri določanju vsebnosti škroba v različnih izolati β -glukanov
- Priloga D: Vprašalnik za senzorično ocenjevanje pijač pripravljenih z dodatkom β -glukanov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

C3	celotriozilna enota
C4	celotetrazilna enota
FC	Folin Ciocalteu
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma z masno spektrometrijo
M_w	molska masa
PHWE	visokotlačna ekstrakcija z vročo vodo
rA	razredčena alkalaza
RPM	obrati na minuto
TFA	trifluoroocetna kislina
TRIS	tris-hidroksimetil-aminometan
η_{sp}	specifična viskoznost
$[\eta]$	intrinzična viskoznost
γ	masna koncentracija
W	masni delež

1 UVOD

Funkcionalna živila predstavljajo širok spekter živil, ki naj bi ohranjala zdravje, ali celo prispevala k boljšemu zdravstvenemu stanju. So pomembna in zanimiva tržna niša, saj sodobni potrošnik postavlja zahteve ne samo po zdravi hrani, temveč tudi hrani z dodano vrednostjo. Slednje za proizvajalca predstavlja izziv, kako bi lahko z aplikacijami funkcionalnih komponent razvili nove, ali pa izpopolnili tradicionalne izdelke in tako ponudili nove možnosti zdravega prehranjevanja (Raspor in Rogelj, 2001, Pravst, 2012).

Biološko aktivne komponente v funkcionalnih živilih torej ugodno vplivajo na zdravje tistega, ki jih uživa, ali pa izzovejo ugodne fiziološke učinke. Učinki vsakega živila, ki se mu pripisujejo funkcionalne lastnosti, morajo biti znanstveno potrjeni. Funkcionalno živilo mora ostati živilo. Za funkcionalna živila se lahko torej štejejo le prava živila, ki so vključena v vsakdanjo prehrano in so učinkovita ob uživanju v običajnih količinah (Salobir, 2001).

Začetek kulture ječmena naj bi segal 8000 do 10000 let nazaj, na območje Srednjega vzhoda, od koder se je ječmen razširil po svetu in tako predstavljal enega izmed temeljnih pridelkov v kmetijstvu starega sveta. Medtem ko v številnih regijah sveta, kot so Severna Afrika, Bližnji vzhod, visokogorja Centralne Azije, rog Afrike, andske in pribaltske države, ječmen še vedno predstavlja pomembno živilo, pa v večini držav zahodnega sveta služi predvsem kot živalska krma in surovina za slajenje (AbuMweis in sod., 2010).

V zadnjem času se je zopet pojavilo zanimanje za to starodavno žito, razlog za to pa se skriva v številnih pozitivnih učinkih na zdravje, ki so posledica uživanja ječmena. Med pozitivne učinke spadajo predvsem zmanjševanje tveganja za nastanek kardiovaskularnih bolezni na račun zniževanja holesterola v krvi in preventivno delovanje proti inzulinski rezistenci (Keenan in sod., 2007).

Aktivne sestavine, ki so zaslužne za pozitivne učinke ob uživanju ječmena so β -glukani. β -glukani spadajo med topno prehransko vlaknino, ki je sestavljena iz nerazvejanih polisaharidov z (1 $\rightarrow$ 4) in (1 $\rightarrow$ 3) vezmi povezanimi β -D-glukopiranozilnih enot v različnih razmerjih. Med žiti imata najvišjo vsebnost oves in ječmen. Za zagotovitev učinka zniževanja tveganja za nastanek kardiovaskularnih bolezni, je potrebno zaužiti 3 g β -glukanov na dan (AbuMweis in sod., 2010).

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil razvoj metode izolacije β -glukanov iz ječmenove moke z uporabo proteolitičnih in glikolitičnih encimov ter obarjanjem β -glukanov. Metodo izolacije smo želeli optimizirati tako, da bi imeli kar največji možen izkoristek izolacije in kar najbolj čist izolat. V pridobljenem izolatu in sami moki smo določili vsebnost β -glukanov, prav tako smo določili tudi ostale komponente, kot so voda, škrob, proteini, polifenoli, pepel in minerali. Analizirali smo tudi njihove fizikalno kemijske lastnosti, kot so topnost, molska masa in viskoznost. Analizirali smo tudi topnost izolatov v različnih živilskih matriksih, kot so npr. vino, pijače s sladili, mleko in jogurt. Na koncu smo pridobljen izolat uporabili še pri pripravi pijače iz sirupa ter opravili senzorično analizo in s tem preverili kakšna bi bila možnost uporabe β -glukanskega izolata v pijačah.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bomo z uporabo encimov za hidrolizo škroba in proteinov, ter nadaljnjim obarjanjem iz ječmenove moke Valechol[®] pridobili izolat, ki bo bogat z β -glukani.

Predvidevali smo, da bo pridobljen izolat β -glukanov dobro topen v vodi in v raztopinah s pH v območju med 3 in 4.

Predvidevali smo, da bo pridobljen izolat vseboval polimerne in nehidrolizirane β -glukane.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNO O β -GLUKANIH

β -glukani, kemijsko β -1,3-1,4-glukani, spadajo pod topno prehransko vlaknino, ki se nahaja predvsem v celičnih stenah žit. So linearni polisaharidi, v celoti sestavljeni iz glukoze. Sekvence D-glukopiranozilnih enot, ki so povezane z β -1,4 glikozidnimi vezmi, so ločene z enojnimi β -1,3 povezavami. Običajno se v sekvencah, ki so povezane z β -1,4 vezmi nahajajo 3 ali 4 molekule glukoze, vendar so našli tudi daljše odseke (do 13 molekul glukoze za β -glukane topne v vodi in do 20 za β -glukane netopne v vodi) (Izydorczyk in sod., 1998a, 1998b).

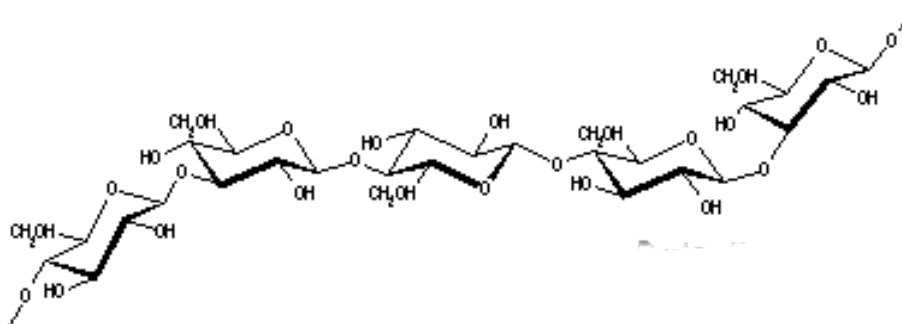
Posebej bogata vira β -glukanov sta oves in ječmen, medtem ko jih ostala žita, kot sta pšenica in rž, vsebujejo v zelo nizkih koncentracijah (Cloetens in sod., 2012). Oves tako vsebuje 1,8-7,9 % β -glukanov (Saastamoinen in sod., 2004), ječmen vsebuje 2,8-11 % β -glukanov, medtem ko so v rži ugotovili prisotnost 2,5 % β -glukanov (Johansson, 2006). Ječmen in oves se ne razlikujeta le v vsebnosti β -glukanov, temveč tudi glede molekulskih in strukturnih lastnosti, kot so molska masa, topnost, razmerje med β -1,3 in β -1,4 vezmi in konformacija. β -glukani iz ovsa naj bi v splošnem imeli večjo molekulsko maso kot β -glukani pridobljeni iz ječmena (Cloetens in sod., 2012). V primerjavi s celulozo je topnost β -glukanov boljša ravno zaradi β -1,3 glikozidnih vezi. Te vezi naredijo molekule β -glukanov manj pravilne oblike, kar jim preprečuje, da bi se organizirale v rigidne, zelo urejene strukture (Johansson, 2006).

Molska masa β -glukanov pridobljenih iz različnih virov se močno razlikuje, variira namreč med 49000 in 3×10^6 g/mol. Molska masa β -glukanov je močno odvisna od predhodne toplotne obdelave surovine, metode izolacije in od metode, ki se uporablja za njihovo nadaljnje določevanje. Razlike so opazne tudi med β -glukani izoliranimi iz različnih kultivarjev (Johansson, 2006).

Topne β -glukane lahko ekstrahiramo v vodi ali v pufru pri različnih temperaturah, poleg pa lahko vključimo še encimsko hidrolizo škroba in proteinov ter ekstrakcijo maščob z ustreznimi topili. Netopne β -glukane lahko ekstrahiramo iz netopne vlaknine po predhodni odstranitvi arabinoksilanov z $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (Johansson, 2006).

Za določevanje vsebnosti β -glukanov se običajno uporablja kislinška ali encimska hidroliza β -glukanov do glukoze. Glukoza, ki se sprostí med hidrolizo se običajno določi s plinsko ali tekočinsko kromatografijo, ali pa posredno preko encimov, ki oksidirajo nastalo glukozo do različnih obarvanih produktov, ki jih lahko spektrofotometrično določimo z merjenjem absorbance v vidnem delu spektra. Taki encimi so npr. oksidaze in heksokinaze. Z encimsko hidrolizo v prvi stopnji nastanejo različni oligosaharidi, na

podlagi katerih lahko po nadaljnji analizi s tekočinsko kromatografijo, sklepamo na sekvenco β -1,3 in β -1,4 glikozidnih vezi v β -glukanski molekuli (Johansson, 2006).



Slika 1: Strukturna formula β -1,3-1,4-glukanov (Havrlentová in sod., 2011).

Poleg β -glukanov se ječmenovem zrnju nahajajo tudi drugi polisaharidi. Med njimi so najbolj zastopani celuloza, arabinoksilani, glukomanani in citoplazemski fruktani. V celičnih stenah endosperma so β -glukanske komponente linearne molekule, kjer približno 30 % povezav med molekulami predstavljajo β -1,3 glikozidne vezi, 70 % pa β -1,4 glikozidne vezi. Sestava škrobnega dela endosperma in aleuronske plasti okrog njega je kvalitativno povsem enaka, vendar se deleži posameznih komponent razlikujejo. Tako npr. endosperm sestoji iz približno 70 % β -glukanov in 20 % arabinoksilanov, medtem ko aleuronska plast vsebuje 26 % β -glukanov in 67 % arabinoksilanov, oba dela pa vsebujeta podobno količino glukomanana in celuloze (Brennan in Cleary, 2005).

Vsebnost β -glukanov v ovsu in ječmenu je odvisna tako od genetskih, kot tudi od okoljskih dejavnikov (Cloetens in sod., 2012), pri čemer Brennan in Cleary (2005) navajata, da so genetski vplivi močnejši od vplivov okoljskih dejavnikov. Tako so dokazali, da je vsebnost β -glukanov višja v šestvrstičnih sortah ječmena kot v dvovrstičnih. Dokazali so tudi, da imajo kultivarji voščenega ječmena, ki imajo višjo vsebnost amilopektina, tudi višjo vsebnost β -glukanov. Od okoljskih dejavnikov, ki vplivajo na končno vsebnost β -glukanov v ječmenu in ovsu, je najpomembnejši dejavnik razpoložljivost vode med zorenjem žita. Tako naj bi bila v ječmenu, ki je bil pred žetvijo izpostavljen sušnim pogojem, vsebnost β -glukanov višja in ravno obratno, v ječmenu, ki je bil pred žetvijo izpostavljen vlažnim pogojem, vsebnost β -glukanov nižja. Do takih sprememb morda pride zato, ker je v sušnih pogojih slabša sinteza in nalaganje škroba v zrnju, ali pa ker je v teh pogojih sinteza β -glukanov boljše (Brennan in Cleary., 2005).

Zaradi njihovih fizikalno kemijskih lastnosti so β -glukani v živilski industriji uporabni kot nadomestki maščob, stabilizatorji in zgoščevalci. Hkrati so vzbudili veliko zanimanja tudi na področju funkcionalnih živil, saj štejejo za komponente živil, ki imajo pozitiven vpliv na zdravje človeka. Leta 1997 je tako FDA odobrila sledečo zdravstveno trditev na živilih, ki vsebujejo β -glukane: »Prehrana z visokim deležem topne prehranske vlaknine iz ovsa in

nizkim vnosom nasičenih maščobnih kislin in holesterola lahko zmanjša tveganje za nastanek srčnožilnih bolezni.« Leta 2012 je tudi EC odobrila zdravstveno trditev za β -glukane in sicer: » β -glukani prispevajo k vzdrževanju normalne ravni holesterola v krvi.« (Uredba EU 432/2012). Za doseganje teh pozitivnih učinkov je potreben dnevni vnos topne prehranske vlaknine iz ovsa ali ječmena najmanj 3 g/dan). Istega leta sta bili za β -glukane iz ječmena in ovsa odobreni tudi zdravstveni trditvi, ki se nanašata na zniževanje tveganja za razvoj bolezni. Za ječmenove β -glukane je bila tako odobrena trditev, katere vlagatelj je bilo podjetje Valens Int. d.o.o.: » β -glukani iz ječmena dokazano znižujejo holesterol v krvi. Povišan holesterol je dejavnik tveganja za razvoj koronarne bolezni srca.« (Uredba EU 1048/2012).

2.2 FIZIKALNOKEMIJSKE LASTNOSTI β -GLUKANOV

2.2.1 Strukturne lastnosti

β -glukani, pridobljeni iz različnih žitnih virov, kot so ječmen, oves in pšenica, se zdijo podobni, kar nakazujejo tudi nekatere analize, npr. nuklearna magnetna resonanca (NMR), kjer so za vse tri vrste žit posneli skoraj povsem enak spekter. Ob HPLC analizi oligosaharidov sproščenih ob hidrolizi z lichenazo, pa so ugotovili, da med njimi kljub navidezni strukturni podobnosti obstajajo razlike. Encim lichenaza specifično hidrolizira β -1,4 glikozidne vezi in tako razgradi β -glukane na oligosaharide z različno stopnjo polimerizacije. Glavni produkti hidrolize β -glukanov iz žit so 3-O- β -celobiozil-D-glukozne in 3-O- β -celotriozil-D-glukozne enote, pride pa tudi do nastanka dekstrinom podobnih oligosaharidov, ki nastanejo ob hidrolizi tistega dela na polimerni molekuli, ki vsebuje več kot 3 zaporedne glukozne ostanke, povezane z β -O-4 vezmi (Lazaridou in sod., 2004). Ugotovili so, da so v molekulah β -glukanov celotriozilni in celotetrazilni segmenti razporejeni precej naključno (Buliga in sod., 1986).

Kot že prej omenjeno, je sestava oligosaharidov po razgradnji z lichenazo podobna med posameznimi kultivarji iste vrste žit, medtem ko so opazne razlike med različnimi žiti. Količina trisaharidov je tako največja pri pšenici (67-72 %), nato pa se zmanjšuje in pri ječmenu znaša 52-69 %, pri ovsu pa 53-61 %, medtem ko je količina prisotnih tetrasaharidov ravno obratna in pri pšenici znaša 21-24 %, pri ječmenu 25- 33 % in pri ovsu 34-41 %. Razlike v vsebnosti trisaharidov in tetrasaharidov med β -glukani iz različnih virov se odražajo tudi v molskem razmerju celotrioznih in celotetroznih enot (C3:C4), pri čemer to razmerje v pšenici znaša 3,0-4,5, pri ječmenu 1,8-3,5, pri rži 1,9-3,0 in pri ovsu 1,5-2,3. Različni podatki iz literature kažejo, da obstajajo razlike v razmerju C3:C4 tudi med posameznimi kultivarji iste vrste. Tako naj bi imele voščene sorte ječmena v primerjavi z nevoščenimi večje razmerje C3:C4. Prav tako naj bi se razmerje C3:C4 razlikovalo tudi glede na del zrna, kjer se nahajajo β -glukani. Tako imajo β -glukani, ki se

nahajajo v aleuronskem delu zrna večje razmerje C3:C4, kot pa β -glukani, ki se nahajajo v endospermu (Lazaridou in Biliaderis, 2007).

Struktura β -glukanov ni pomembna le za ugotavljanje razlik med posameznimi vrstami β -glukanov, pač pa vpliva tudi na številne fizikalne lastnosti β -glukanov. Tako ima njihova struktura pomemben vpliv na to, kako se obnašajo v raztopinah v smislu topnosti, spremembe viskoznosti in tvorbe gela (Je-Hoon in sod., 2012).

Poleg ostalih strukturnih lastnosti, na fizikalne lastnosti β -glukanov vpliva tudi njihova molska masa. Molska masa izoliranih β -glukanov lahko močno variira, razlogi za to pa so različni. Eden izmed njih je različna sestava celične stene. Znano je namreč, da je iz žit, ki imajo debelejšše celične stene, težje ekstrahirati β -glukane z visoko molekulsko maso. Na molsko maso ekstrahiranih β -glukanov zagotovo vpliva tudi izbrana metoda ekstrakcije, saj uporabljeno topilo in temperatura ekstrakcije vplivata na topnost β -glukanov. Med ekstrakcijo lahko pride tudi do aglomeracije, kar je povezano predvsem s čistostjo izbranega topila, ali pa pride do različnih depolimerizacijskih procesov, kot posledica onesnaženja z mikroorganizmi, ki izločajo encime (β -glukanaze), ki lahko razgradijo β -glukane. Vsi ti dejavniki pripomorejo k temu, da je molska masa ekstrahiranih β -glukanov manjša (Skendi in sod., 2003).

2.2.2 Topnost β -glukanov

Kemijske lastnosti β -glukanov se odražajo v njihovi topnosti v vodi in v njihovi razširjeni, fleksibilni konformaciji verige. β -glukanske molekule vsebujejo tudi celulozi podobne segmente, kar lahko pripomore k oteženemu raztapljanju. β -glukani, ki vsebujejo več zaporednih β -1,4 glikozidnih vezi, so zaradi tvorbe intramolekularnih vodikovih vezi nagnjeni k agregaciji in posledično je njihova topnost manjša. β -1,3 glikozidne vezi razbijejo urejenost z β -1,4 glikozidnimi vezmi povezanih sekvenc in povzročijo, da postane molekulska struktura β -glukanov bolj fleksibilna, s tem pa β -glukani bolj topni (Buliga in sod., 1986). Predvidevajo, da razmiki, ki jih ustvarijo β -1,3 glikozidne vezi, ohranjajo verigo v neurejeni konformaciji in tako preprečujejo, da bi prišlo do tesnega naleganja molekul. Posledica tega je, da polisaharidi ostanejo v raztopini. Prav tako pa nekatere raziskave poročajo, da segmenti v obliki heliksa, ki so sestavljeni iz vsaj treh zaporednih celotriozilnih ostankov, tvorijo konformacijsko stabilno, urejeno domeno in na tak način zmanjšujejo topnost β -glukanov (Lazaridou, 2007). V povezavi s tema dvema mehanizmoma agregacije β -glukanov, so nekateri avtorji predlagali, da večja količina celotriozilnih fragmentov in večje razmerje β -1,4 in β -1,3 glikozidnih vezi, lahko razloži razlike v topnosti frakcij β -glukanov, ki jih pridobimo z različnimi metodami ekstrakcije (Izydorczyk in sod., 1998a).

2.2.3 Viskoznost β -glukanov

Nadalje je verižna konformacija β -glukanov odgovorna za to, da lahko te molekule zavzamejo velike hidrodinamske volumne in s tem tvorijo raztopine z visoko intrinzično viskoznostjo. Vrednosti za intrinzično viskoznost naj bi variirale med 0,3 in 9,6 g/dL, odvisno od molske mase β -glukanov, znano pa je, da so β -glukani v splošnem polimeri z visoko molekulsko maso. Viskoznost raztopine β -glukanov je torej funkcija koncentracije in molske mase polimera, njegove verižne konformacije in prisotnih medmolekulskih interakcij. Pri koncentracijah, ki presegajo kritično koncentracijo polimera, se začnejo polimerne verige zapletati in prekrivati in ob tem se lahko viskoznost raztopine β -glukanskih molekul 4x poveča (Izydorczyk in sod., 2008). Raztopine β -glukanov so nenenewtonske tekočine, natančneje, njihovo obnašanje je tipično za viskoelastične raztopine. To pomeni, da raztopina pri nizkih strižnih razmerjih izkazuje višjo viskoznost, pri visokih strižnih razmerjih pa pride do zmanjšanja viskoznosti (Storsley in sod., 2003). To so potrdile tudi številne raziskave, ki so jih izvedli na tem področju. Böhm in Kulicke (1999a, 1999b) sta preučevala viskoelastično obnašanje raztopin β -glukanov z različnimi molskimi masami. Za vse vzorce sta potrdila, da β -glukani res tvorijo viskozne vodne raztopine, ki lahko ob višji koncentraciji tudi gelirajo. Razlike v viskoznosti so bile med posameznimi molskimi masami precej velike, zato lahko potrdimo, da je merjenje viskoznosti primeren način določanja molske mase snovi. S preučevanjem viskoznosti vodnih raztopin β -glukanov se je ukvarjala tudi Liisa Johansson s sod. (2008) in je v svoji raziskavi primerjala viskoznost vodnih raztopin ječmenovih in ovsenih β -glukanov. Zanimalo jih je, ali lahko na viskoznost vodnih raztopin, poleg molske mase, vplivajo tudi strukturni dejavniki. S tem namenom so uporabili ječmenove in ovsene β -glukane s podobno molsko maso in ugotovili, da obstajajo opazne razlike v viskoznosti in v raztapljanju različnih β -glukanov, zato sklepajo, da na ta dva parametra vplivajo tudi strukturne lastnosti β -glukanov, predvsem razmerje C3:C4. Sposobnost β -glukanov, da tvorijo viskozne raztopine je ključnega pomena tudi zaradi fizioloških učinkov, ki jih ima njihovo uživanje (Wood, 2002).

2.2.4 Tvorba gela

V prejšnji točki je bilo opisano kako se β -glukani obnašajo v vodnih medijih in tvorijo viskozne raztopine. V določenih pogojih pa se reološke lastnosti β -glukanov lahko spremenijo in takrat govorimo o agregacijskem fenomenu – tvorbi gela.

Tvorbo gela vodnih raztopin β -glukanov z različnimi molskimi masami, različnimi uporabljenimi koncentracijami in temperaturnimi režimi so preučevali številni raziskovalci. V raziskavi, ki so jo izvedli Vaikousi in sod. (2004), so preučevali tvorbo gela v vodnih raztopinah ječmenovih β -glukanov, v odvisnosti od njihove molske mase in uporabljene koncentracije. Ugotovili so, da je molska masa tisti dejavnik, ki najbolj vpliva

na reološke spremembe vodnih raztopin β -glukanov. Vzorci raztopin β -glukanov z nizko molekulsko maso, so agregirali hitreje kot tisti z večjo molsko maso. Na stopnjo agregacije je vplivala tudi koncentracija, saj se je trdota gela povečevala sorazmerno s povečevanjem koncentracije. S segrevanjem nastalih gelov so potrdili tudi njihovo termoreverzibilnost. Termoreverzibilnost gelov pomeni, da neka snov, ko je ohlajena tvori gel, ob ponovnem segrevanju pa zopet dobimo viskozno raztopino. Tudi Lazaridou in sod. (2003) so potrdili, da β -glukani z nižjo molsko maso hitreje tvorijo gel, z naraščajočo molsko maso pa se podaljšuje tudi čas potreben za tvorbo gela. Stopnja tvorbe gela naj bi se prav tako povečevala s povečevanjem koncentracije in ustreznim temperaturnim režimom. Optimalna temperatura za tvorbo gela naj bi bila med 25 in 35 °C. Pri ugotavljanju termoreverzibilnosti nastalih gelov so ugotovili, da višja kot je molska masa β -glukanov, višje temperature so potrebne, da se nastali gel zopet utekočini. V svoji raziskavi so Tosh in sod. (2003) preučevali, kakšna je tvorba gela v primeru delno hidroliziranih β -glukanov. Želeli so tudi ugotoviti, kakšne so optimalne temperature za agregacijo takih raztopin. Ugotovili so, da je izbira optimalne temperature za agregacijo delno hidroliziranih β -glukanov ključnega pomena. Pri segrevanju do 90 °C naj ne bi prišlo do depolimerizacije β -glukanov, medtem ko so temperature do 60 °C prenizke, da bi se β -glukani lahko popolnoma raztopili. Rezultati njihovih raziskav so pokazali, da se iz raztopin, ki so bile raztopljene pri 90 °C, tvori gel bistveno počasneje kot pri raztopinah, za katere so uporabili nižje temperature. Gel, ki se je tvoril iz raztopine segrete na 90 °C, je bil po sedmih dneh še vedno mehkejši od gela, ki so ga pripravili iz raztopin obdelanih z nižjo temperaturo, po štirih dneh. Sklenili so, da je optimalna temperatura za tvorbo gela iz takih vzorcev v območju med 70 in 80 °C, saj se pri tej temperaturi dosežemo najboljši kompromis med topnostjo β -glukanov in časom tvorbe gela.

Geli iz β -glukanov lahko nastanejo tudi v ponavljajočih ciklih zamrzovanja in tajanja, kjer lahko celo relativno razredčene raztopine (1-4 %) tvorijo gele kot posledica agregacije polimernih molekul med zamrzovanjem (Lazaridou in Biliaderis, 2004). Ta proces imenujemo kriogelacija, gele, ki se pri tem tvorijo pa kriogeli. β -glukanski hidrogeli, ki se tvorijo pri temperaturi nad 0 °C in kriogeli, ki se tvorijo pod 0 °C predstavljajo tridimenzionalno strukturo, ki jo tvorijo s številnimi vodikovimi vezmi povezani polimeri (Lazaridou in Biliaderis, 2007). Ta proces v grobem sestoji iz dveh faz. V prvi fazi pod vplivom zamrzovanja pride do delne precipitacije, kar se kaže v tvorbi šibkega gela, medtem ko druga faza predstavlja rast nastajajoče kriostrukture med tajanjem. Kriogelacija se pogosto uporablja za tvorbo gela iz sintetičnih substanc, vendar tudi kriogelacija naravnih polisaharidov poteka po enakem principu. Pri tem gre za vzpostavljanje številnih nekovalentnih interakcij med posameznimi verigami makromolekul, kot tudi znotraj ene verige. Postopek kriogelacije izboljša nekatere funkcionalne lastnosti gelov, zato so taki geli zelo obetavni za uporabo, predvsem z namenom enkapsulacije različnih bioaktivnih komponent, na različnih področjih, kot so biomedicina, biotehnologija in živilska industrija (Lazaridou in Biliaderis, 2004).

Parametre, ki vplivajo na končne lastnosti kriogelov, lahko razdelimo na dve skupini. V prvo skupino spadajo parametri, ki so odvisni začetnega materiala, to so koncentracija raztopine, molekulska masa in struktura. V drugo skupino pa spadajo parametri, ki so odvisni od samega postopka kriogelacije. Sem spadajo parametri, kot so število ciklov zamrzovanja in tajanja, temperatura in čas trajanja posameznih delov cikla. Lazaridou in Biliaderis (2004) sta v svoji raziskavi, katere predmet je bil preučevanje kako molekulske lastnosti (struktura, molska masa, razmerje C3:C4) β -glukanov vplivajo na tvorbo gelov v postopku kriogelacije. Ugotovila sta, da so tako izkoristek, kot tudi termične in mehanske lastnosti nastalih gelov v veliki meri odvisne od začetne koncentracije raztopine, števila ciklov zamrzovanja in tajanja, ter strukturnih lastnosti β -glukanov, predvsem molekulske mase in števila celotrioznih enot v strukturi molekule. β -glukani z nižjo molekulsko maso in večjih deležem C3 enot, tvorijo bolj goste gele. Do tega naj bi prišlo zaradi večje mobilnosti molekul in večjega števila urejenih regij v molekuli, kar se odraža v tvorbi elastičnih gelov. Termostabilnost kriogelov se povečuje z večanjem molske mase in večjim številom C3 enot v strukturi molekule. β -glukani z visoko molsko maso in majhnim številom C3 enot naj bi tvorili zelo čvrste gele, ki so odporni na močne deformacije.

2.3 IZOLACIJA β -GLUKANOV

Ker β -glukani v ječmenovem zrnju predstavljajo manjšinski del vseh prisotnih komponent (3-7 %), je potrebno razviti postopke za njihovo izolacijo in koncentracijo s kar največjim možnim izkoristkom. Čeprav je v literaturi opisanih mnogo postopkov za koncentracijo β -glukanov že na ravni surovine, pa so vsi v grobem razdeljeni na dva glavna segmenta.

Prvi segment predstavljajo suhi postopki, kamor spadajo tehnološki postopki obdelave žita, kot so suho mletje, sejanje in elutriacija. Pri slednjem postopku, ki je zelo učinkovit, gre za ločevanje lažjih delcev od težjih v navzgor usmerjenem toku plina ali tekočine. Običajno se uporablja za ločevanje delcev večjih od 1 μ m. Osnovni princip temelji na tem, da se manjši oz. lažji delci dvigajo kvišku, ker je njihova terminalna hitrost manjša (hitrost s katero padajo skozi tok plina oz. tekočine) od hitrosti dvigajočega se toka plina oz. tekočine. Takšni postopki zagotavljajo visoko vsebnost β -glukanov, saj po takšni obdelavi pridobimo končni proizvod z vsebnostjo do 15,2 % β -glukanov, ki pa je hkrati tudi izhodna surovina za nadaljnjo izolacijo β -glukanov.

Drugi segment postopkov predstavljajo mokri postopki. Ti so kompleksnejši v primerjavi s suhimi postopki, saj so sestavljeni iz dveh ali treh faz. Žitni otrobi ali moka, ki služijo kot osnovna surovina, se suspendirajo v topilu. Najpogosteje se kot topila uporabljajo voda, polarna topila s pH v bazičnem območju ali alkoholne raztopine. Kot rezultat dobimo vodni ekstrakt, ki poleg β -glukanov vsebuje še druge komponente, kot so škrob, proteini in maščobe, zato je v naslednji fazi potrebno čiščenje vodnega ekstrakta. β -glukane je potrebno ločiti iz raztopine s precipitacijo z alkoholom, ali pa s kakšnim drugim

postopkom, kot je npr. zamrzovanje in nato odtajanje ekstrakta. Potem ko izoliramo in posušimo precipitat, ta vsebuje od 20 do 70 % β -glukanov. Mokre postopke zelo pogosto uporabljajo mnogi raziskovalci, vendar se zaradi različnih uporabljenih izhodnih materialov za pridobivanje β -glukanov postopki spreminjajo in vedno znova optimizirajo. Kljub najrazličnejšim spremembam pa je znano, da na izkoristek ekstrakcije najbolj vplivajo naslednji dejavniki: temperatura, pH, čas ekstrakcije ter razmerje med topilom in uporabljeno surovino (Benito-Román in sod., 2011).

2.3.1 Ekstrakcija β -glukanov

Večino β -glukanov, ki se nahajajo v ječmenovem zrnju lahko ekstrahiramo s polarnimi topili s pH v alkalnem območju, obstaja pa tudi manjši delež β -glukanov, ki jih lahko ekstrahiramo le z vodo. Razlog zakaj v večini niso ekstraktabilni z vodo ni povsem znan, vendar se predvideva, da je vzrok v tem, da esterske vezi vežejo netopen del β -glukanov v endospermu ječmenovega zrna. Prav tako bi razlog za njihovo slabo vodno ekstrakcijo lahko predstavljale nekovalentne interakcije med β -glukani in celulozo ali med β -glukani in arabinoksilani (Izydorczyk, 1998a).

Na začetku se je β -glukanom, ki jih ne moremo ekstrahirati z vodo, v primerjavi s tistimi, ki jih lahko, posvečalo le malo pozornosti. Edini parameter, po katerem naj bi razlikovali med tema dvema vrstama β -glukanov, je molska masa molekul. Tako naj bi bila molska masa β -glukanov ekstraktabilnih v vodi manjša ob molske mase β -glukanov ekstraktabilnih v alkalnih polarnih topilih (Izydorczyk, 1998b).

2.3.1.1 Topni β -glukani

β -glukane lahko iz izhodnega materiala ekstrahiramo na več načinov. Učinkovitost posamezne metode je odvisna od različnih dejavnikov, običajno sta to izbira topila in temperatura ekstrakcije. Pomembno pri ekstrakciji topnih β -glukanov je to, da se v vodi pri različnih temperaturah raztapljajo molekule različnih velikosti in dobimo različen izkoristek ekstrakcije (Johansson in sod., 2006). Izydorczyk in sodelavci (1998a) so ekstrahirali β -glukane iz ječmena z vročo vodo pri 40 °C in pri 65 °C. Izkoristek ekstrakcije je znašal 1,4 % in 1,3 % mase ječmenovega zdroba. V nadaljevanju so oba ekstrakta še precipitirali z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in po precipitaciji analizirali posamezne frakcije. Ugotovili so, da so frakcije, ki so jih dobili s precipitacijo z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ob 45 % nasičenju ekstrakta, vsebovale večinoma β -glukane, medtem ko so frakcije, ki so jih dobili s precipitacijo ob večjem nasičenju (45-100 %) vsebovale več arabinoksilanov in manj β -glukanov. Ob primerjavi obeh ekstraktov so ugotovili, da so tisti, ki so bili ekstrahirani pri temperaturi 65 °C, vsebovali β -glukane z večjo molsko maso, večjo viskoznostjo in večjim številom β -1,4 glikozidnih vezi.

Irakli in sod. (2004) so podoben eksperiment naredili na šestih grških kultivarjih ječmena. β -glukane so ekstrahirali z vročo vodo pri 47 °C in jih nato precipitirali z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ s 37 % nasičenjem ekstrakta. Z uporabo encimov so odstranili škrob in proteine in tako dobili zelo čist izolat β -glukanov (>93 % suhe snovi). Robertson in sod. (1997) so ekstrahirali ječmenove β -glukane s pomočjo 0,15 M NaCl pri različnih temperaturah. Izkoristek njihove ekstrakcije je pri temperaturi 38 °C znašal 28 %, pri 65 °C 49 % in pri 100 °C 55 %.

Ekstrakcijo β -glukanov iz ječmena in ovsja je izvedel tudi Bhatti (1995), ki jo je za razliko ob prej omenjenih raziskovalcev izvedel z NaOH. Po čiščenju je ekstrakt iz ječmenove moke vseboval 76 % β -glukanov, ekstrakt iz ovsene moke pa 69-72 % β -glukanov. Ekstrakcije v bazičnem pH sta se lotila tudi Wood (1991) in Suortti (1993). Wood je za ekstrakcijo uporabil Na_2CO_3 , Suortti pa NaOH. Poleg teh dveh metod sta uporabila še encimske metode in sicer sta uporabila vročo vodo v kombinaciji s termostabilnimi α -amilazami, v drugi encimski metodi pa vročo vodo in različne ksilanaze. Pri raziskavi, ki jo je izvedel Suortti (1993) je izvedel, da se da največ β -glukanov ekstrahirati z NaOH, medtem ko je Wood (1991) ugotovil, da lahko z Na_2CO_3 zelo učinkovito ekstrahiramo β -glukane iz ječmenove moke. Zelo čist ekstrakt β -glukanov lahko dobimo z uporabo metode po Westerlundu in sod. (1993). Ta metoda vključuje razmaščevanje vzorca s propan-2-olom in petroletrom, raztapljanje v vodi pri 96 °C in encimsko hidrolizo škroba s termostabilno α -amilazo. Proteine so hidrolizirali s pomočjo pankreatina. Ekstrahirane polisaharide so nato precipitirali s 60 % etanolom, precipitat pa raztopili v vodi. Raztopina so nadalje obdelali s 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, s čimer so se iz raztopine izločili le β -glukane, medtem ko so arabinoksilani ostali v raztopini. Precipitirane β -glukane je potrebno nato še skoncentrirati z uporabo dialize ter jih po končanem koncentriranju liofilizirati.

2.3.1.2 Netopni β -glukani

Metodo, ki se pogosto uporablja za analizo netopnih β -glukanov, so razvili Gruppen in sod. (1992). Metoda je bila razvita za analiziranje vsebnosti netopne prehranske vlaknine v pšenici, vendar je uporabna tudi za številne druge vzorce. Vključuje izolacijo topne in netopne prehranske vlaknine s pomočjo segrevanja vzorca v vodni kopeli pri 63 °C. Precipitat, t.i. netopno frakcijo prehranske vlaknine je nato potrebno obdelati z $\text{Ba}(\text{OH})_2$, zato da iz vzorca odstranimo arabinoksilane. Ob tem Ba^{2+} ioni ohranjajo β -glukane v netopni fazi, medtem ko se arabinoksilani izperejo iz vzorca. Po končanem odstranjevanju arabinoksilanov lahko β -glukane enostavno ekstrahiramo z vodo. Po tej metodi so Izydorczyk in sod. (1998b) določili netopne β -glukane, potem ko so iz ječmena ekstrahirali topne β -glukane. Po končani ekstrakciji z $\text{Ba}(\text{OH})_2$, so z vodo in NaOH frakcionirali netopno prehransko vlaknino. Tudi oni so dokazali, da frakcija z $\text{Ba}(\text{OH})_2$ vsebuje arabinoksilane, vodna frakcija pa β -glukane. Ko so določali, katere monosaharide vsebuje NaOH frakcija, so ugotovili, da vsebuje arabinozo, ksilozo in glukozo. V drugi raziskavi so

Manthey in sod. (1999) analizirali vsebnost in sestavo tako topne, kot tudi netopne prehranske vlaknine v ovsu. Vzorce so inkubirali v natrijevem acetatu pri 100 °C, ob prisotnosti α -amilaze, po končani hidrolizi pa so vzorce izpostavili še hidrolizi z amiloglukozidazo. Vzorce so nato centrifugirali in precipitirali, ostanek po precipitaciji pa je predstavljal netopen del prehranske vlaknine.

2.3.1.3 Novejše metode ekstrakcije

2.3.1.3.1 Ultrazvočna ekstrakcija

Konvencionalne metode za ekstrakcijo polisaharidov so kompleksne in pogosto neučinkovite, kar se kaže v manjšem izkoristku. Take ekstrakcije so med drugim tudi dolgotrajne in zahtevajo večjo porabo energije za procese kot so segrevanje in hlajenje ter mešanje. Tudi metode, ki se uporabljajo za ekstrakcijo β -glukanov niso izjema. Prenos snovi je oviran zaradi povečane viskoznosti raztopin, dodaten problem pa predstavljajo še relativno nizke koncentracije β -glukanov v izhodnih surovinah in počasna difuzija topila v delce izhodne surovine, npr. moke. Za izboljšanje prenosa snovi in posledično učinkovitosti ekstrakcije veliko obeta uporaba ekstrakcije s pomočjo ultrazvoka (UZ). Ultrazvočna ekstrakcija je tehnika, pri kateri apliciramo ultrazvočne valove direktno na vzorec suspendiran v ekstrakcijskem topilu. Ko so tekočine sonificirane pri visokih intenzitetah UZ, se ta začne širiti v tekočino in ustvarja alternirajoč visok in nizek pritisk. V teh kontinuiranih cikli visokega in nizkega pritiska v tekočini nastanejo majhni mehurčki, ki se razpočijo, ko ne morejo več absorbirati energije (Benito-Román in sod., 2013a). Med tem pojavom, ki mu pravimo kavitacija, pride do močnega lokalnega segrevanja in povečanja pritiska, tudi do 5500 °C in 50 MPa. Med kavitacijo nastanejo mikrotokovi, ki izjemno pospešijo prenos snovi in toplote. Na prej omenjenih območjih lokalnega pregrevanja se tudi drastično pospešijo kemijski procesi, ki potekajo v mediju (Picó, 2013).

Benito-Román in sod. (2013a) so v svoji raziskavi ugotavljali, kakšna sta izkoristek in struktura β -glukanov ekstrahiranih z ultrazvočno ekstrakcijo v primerjavi z običajno ekstrakcijo v jeklenem tanku. Kot osnovno surovino so v tej raziskavi uporabili kultivar ječmena, ki vsebuje 6-7 % β -glukanov. Pred samim postopkom ekstrakcije so ječmenovo moko 2 uri segrevali v 80 % etanolu in s tem inaktivirali β -glukanaze (encime, ki so odgovorni za hidrolizo β -glukanov). Dobljen aglomerat so nato posušili, zmleli in iz njega ekstrahirali β -glukane. Vzorec za ekstrakcijo so pripravili tako, da so 20 g vzorca suspendirali v 200 mL 80 % etanola in ga tri ure kuhali pri 55 °C ob stalnem mešanju na frekvenci 1000 min⁻¹. Po končanem kuhanju so suspenzijo 9 min centrifugirali pri 5000 min⁻¹. V dobljenem supernatantu so nato določili izkoristek ekstrakcije in vsebnost β -glukanov. Za ultrazvočno ekstrakcijo so suspendirali enako količino moke v enaki količini vode in suspenzijo vstavili v 250 mL posodico s plaščem. Suspenzijo so sonificirali pri

24 kHz z močjo 400 W. Hladna voda v plašču posodice s suspenzijo je ohranjala temperaturo suspenzije na 55 °C. Po končani ekstrakciji so suspenzijo centrifugirali in v supernatantu določili vsebnost β -glukanov in izkoristek ekstrakcije. Vsebnost β -glukanov so določili s pomočjo kompleta reagentov »Mixed-linkage β -glucan« proizvajalca Megazyme International Ltd. Molsko maso izoliranih β -glukanov so določili s pomočjo izključitvene kromatografije (HPLC-SEC), pri kateri se komponente vzorca ločijo glede na velikost oz. molsko maso. Večje molekule za prehod skozi pore gela potrebujejo manj časa, zato se izločijo prve, medtem ko manjše molekule potrebujejo več časa in se izločijo kasneje. Ugotovili so, da so bili izkoristki ekstrakcij v območju od 40,5 do 66,1 %, molska masa ekstrahiranih β -glukanov pa je bila od 262 do 461 kDa. Ugotovili so, da je ekstrakcija s pomočjo UZ z vidika izkoristka β -glukanov malo boljša od običajne ekstrakcije v jeklenem tanku. Za bolj učinkovito se je izkazala tudi z vidika molske mase pridobljenih β -glukanov, saj so pridobili več β -glukanov z visoko molsko maso. Ugotovili so, da je učinkovitost UZ ekstrakcije odvisna predvsem od amplitude in časa ekstrakcije. Tako so največji izkoristek dosegli kadar so v suspenzijo dovedli več energije s pomočjo UZ valovanja (962,5 kJ/L), izkoristek je takrat znašal kar 66,1 %, vendar so dobili β -glukane z nižjimi molskimi masami, okrog 269 kDa. Z zmanjšanjem intenzivnosti UZ valovanja (vnos energije 170 kJ/L), se izkoristek ekstrakcije drastično zmanjša na 44,3 %, vendar s tem pridobimo β -glukane z višjo molsko maso, okrog 461 kDa. Glavna prednost ultrazvočne ekstrakcije je čas in nižja poraba energije, saj celoten čas ekstrakcije traja pri najvišjem vnosu energije le 3 minute, kar se zdi bolj uporabno za morebitne aplikacije v industrijske procese pridobivanja β -glukanov.

2.3.1.3.2 Ekstrakcija z vročo vodo pod visokim pritiskom (PHWE)

Ekstrakcija z vročo vodo pod visokim pritiskom je t.i. »zelena« ekstrakcijska metoda, saj ne zahteva uporabe nevarnih topil, njena uporaba pa je razširjena pri različnih matriksih okoljskih, živilskih in rastlinskih vzorcev (Chin Chye in sod., 2010). Pri uporabi konvencionalnih tehnik za ekstrakcijo β -glukanov je potrebna predhodna inaktivacija β -glukanaz v surovini (npr. v ječmenovi moki), ki razgrajujejo β -glukane in povzročijo manjšo ekstrakcijo β -glukanov, ki imajo nižjo molekulsko maso. Slabost pri konvencionalnih tehnikah je to, da se kljub inaktivaciji encimov z namenom ohranjanja visoke molske mase, izkoristek ekstrakcije zniža. Zato se stremi k razvoju novih tehnik, ki bi zagotovile hitro inaktivacijo endogenih encimov, v enem samem koraku, z vodo kot edinim topilom. PHWE torej predstavlja novo, vsestransko in obetavno tehnologijo za pridobivanje številnih dragocenih ekstraktov in bioaktivnih komponent. Ta tehnika je primerna za ekstrakcijo β -glukanov, saj vroča voda pod visokim pritiskom predstavlja tako medij za inaktivacijo endogenih encimov, kot tudi učinkovito topilo (Benito-Román in sod., 2013b).

PHWE je tehnika, ki izkorišča uporabo vode pri povišanih temperaturah pod kontroliranimi tlačnimi pogoji. Natančneje, gre za uporabo vode kot topila, ki dosega od 100 (običajna temperatura vrelišča) do 374 °C (kritična točka). Med spreminjanjem tlaka z namenom povišanja temperature vrelišča vode pride do drastičnih sprememb lastnosti vode, kot so gostota, površinska napetost, viskoznost in sposobnost difuzije vode. Do teh sprememb pride predvsem zaradi povišanja temperature, sam tlak ima le manjši vpliv. Take spremembe privedejo do povečanega prenosa snovi med ekstrakcijo. Voda ogreta na tako visoko temperaturo ima namreč manjšo viskoznost in večjo sposobnost difuzije, kot jo ima voda pri sobni temperaturi, kar se odraža v večji difuziji vode v matriks vzorca in večje sproščanje topnih komponent (Chin Chye in sod., 2010). K večjemu sproščanju topnih komponent v raztopino pripomorejo tudi prekinitve vodikovih vezi med ogljikovimi hidrati in trdnim matriksom. Pod vplivom visokih temperatur pa lahko pride tudi do nekaterih nezaželenih sprememb, kot je nastanek različnih razgradnih produktov zaradi hidrolize makromolekul. V primeru polisaharidov se ti ob previsoki temperaturi razgradijo do monosaharidov, ti pa lahko reagirajo in tvorijo različne razgradne produkte, kot so furfural (nastane iz pentoz) ali 5-hidroksimetilfurfural (nastane iz heksoz) (Rogalinski in sod., 2008). Med samo ekstrakcijo je potrebno ohranjati tak tlak, da voda ostane v tekočem agregatnem stanju, t.j. 15 barov pri 200 °C in 85 barov pri 300 °C. V primeru, da se tlak zmanjša pod vrednost, ki je potrebna za vzdrževanje vode v tekoči fazi, se ustvari pregreta para (Chin Chye in sod., 2010). V nekaterih drugih virih je navedeno, da je pri obdelavi vzorcev rastlinskega materiala priporočljivo ohranjati tlake okrog 50 barov (Benito-Román, 2013b).

Namen raziskave, ki so jo izvedli Benito-Roman in sod. (2013b) je bil preučiti parametre PHWE, ki vplivajo na učinkovitost ekstrakcije β -glukanov iz ječmena. Preučevali so torej vpliv temperature, časa in pritiska na izkoristek ekstrakcije in molekulsko maso ekstrahiranih β -glukanov, hkrati pa so analizirali tudi koliko razgradnih produktov se tvori med ekstrakcijo in pri kakšnih pogojih. Ugotovili so, da imata čas in temperatura velik vpliv na izkoristek ekstrakcije. Za temperature do 155 oz. 160 °C izkoristek ekstrakcije narašča, nad to temperaturo pa se količina β -glukanov v raztopini začne zmanjševati. Spremembe v lastnostih vode pri temperaturi do 160 °C povzročijo, da pride do cepljenja vodikovih vezi in posledično sproščanja β -glukanov v raztopino, nadaljnje zvišavanje temperature pa privede do razpada β -glukanov in pojava razgradnih produktov razpada monosaharidov. Poleg visokih temperatur tudi dolgi časi ekstrakcije povzročijo zmanjševanje vsebnosti β -glukanov v ekstraktu. Velja pravilo, da daljši kot je čas ekstrakcije, večja je razgradnja β -glukanov v ekstraktu. Kot glavne razpadne produkte med PHWE so detektirali celulozo, glukozo, fruktozo, piruvaldehid in 5-hidroksimetilfurfural. Pri preučevanju vpliva tlaka na izkoristek ekstrakcije in molsko maso β -glukanov so ugotovili, da povečanje tlaka vodi do ekstrakcije β -glukanov z večjo molsko maso, vendar je ob tem izkoristek ekstrakcije manjši. Ob primerjavi PHWE s konvencionalno ekstrakcijo so ugotovili, da je imela prva sicer slabši izkoristek (53,7 % proti 73,2 % za

konvencionalno ekstrakcijo), vendar ob tem dobimo β -glukane, ki imajo večjo molsko maso (200 kDa za PHWE in 55 kDa za konvencionalno ekstrakcijo). Za optimalne pogoje PHWE so potrdili temperaturo 155 °C, čas 18 min in tlak 50 bar. Pri teh pogojih je doseženo najugodnejše razmerje med izkoristkom ekstrakcije in molsko maso ekstrahiranih β -glukanov, hkrati pa ob tem ne nastanejo neželeni razgradni produkti.

2.3.2 Vpliv procesiranja na ekstrakcijo β -glukanov

Različni tehnološki postopki različno vplivajo na ekstraktabilnost in molsko maso β -glukanov. Andersson in sod. (2004) so v svoji raziskavi ugotovili, da niti zames testa, niti peka kruha ni vplivala na spremembo razmerja med celotriozilnimi in celotetraozilnimi deli v β -glukanski molekuli. Kljub temu so zaključili, da β -glukane lahko razgradijo endogeni encimi, ki so prisotni v ječmenovi ali pšenični moki, ki se uporablja za izdelavo kruha. V nekaterih drugih raziskavah so dokazali, da se med peko ne zmanjša ekstraktabilnost β -glukanov, se pa zmanjša njihova molska masa, medtem ko so pri zamrzovanju opazili ravno obratno, saj se je zmanjšala njihova ekstraktabilnost, ne pa tudi molska masa. Kuhanje naj prav tako ne bi povzročilo zmanjšanja izkoristka ekstrakcije ali molske mase. Ker β -glukani spadajo v fermentabilen segment prehranske vlaknine je očitno, da fermentacija vpliva na ekstraktabilnost β -glukanov iz žit. Kot so potrdili Lambo in sod. (2005), naj bi med fermentacijo ovsa prišlo do zmanjšanja vsebnosti topnih in netopnih β -glukanov.

V raziskavi, ki jo je izvedla Liisa Johansson s sodelavci (2007) so želeli ugotoviti, kako različni tehnološki postopki vplivajo na učinkovitost ekstrakcije β -glukanov iz različnih surovin in izdelkov. Pri tem so kot surovine za izolacijo uporabili ovsene kosmiče, otrobe in koncentrat otrobov, ovseno kašo, kruh in fermentiran oves. Vzorce so pripravili na sledeče načine. Kašo so pripravili tako, da so ovsene kosmiče, ki so predstavljali 11 % skupnega volumna, 10 minut kuhali v vreli vodi. Ovsen kruh so z direktnim zamesom testa pripravili iz pšenične moke, soli, kvasa in vode. Surovinam so dodali še koncentrat ovsenih otrobov v tolikšni meri, da so dosegli 1,7 % koncentracijo β -glukanov. Kot vzorec fermentiranega ovsa so uporabili komercialni jogurtni napitek z dodatkom ovsenih otrobov. Topno in netopno frakcijo β -glukanov iz pripravljenih izdelkov (kaša, kruh, fermentiran napitek) so ekstrahirali iz izdelkov takoj po pripravi in po sušenju čez noč na 60 °C. Določili 37-77 % topnih β -glukanov in 10-49 % netopnih ekstrahiranih β -glukanov iz posameznih vzorcev. Ugotovili so, da vsi postopki obdelave živil vplivajo na vsebnost β -glukanov. Količina ekstrahiranih β -glukanov je bila v kosmičih nižja kot v kaši, kar je smiselno, saj so β -glukani povezani s celulozo in drugimi neceluloznimi polisaharidi v celični steni, med kuhanjem pa se sprostijo iz tega matriksa. Pečenje kruha iz pšenične moke z dodatkom β -glukanov zmanjša ekstraktabilnost njihove topne frakcije. Predvidevajo da zaradi encimske aktivnosti encimov prisotnih v moki. V tej raziskavi so ugotovili, da fermentacija poveča ekstrakcijo β -glukanov. Rezultati za ekstraktabilnost β -

glukanov iz posušenih vzorcev so pokazali zmanjšanje ekstraktabilnost v kruhu in fermentiranem napitku in povečanje pri kaši. Ob preučevanju strukturnih razlik med topnimi in netopnimi β -glukani so ugotovili razlike v razmerju med celotriozilnimi in celotetrazilnimi enotami, vendar na same strukturne lastnosti ti tehnološki postopki ne vplivajo.

2.3.3 Hidroliza β -glukanov

Za določanje vsebnosti ekstrahiranih β -glukanov je le te potrebno hidrolizirati in njihovo koncentracijo posredno določiti glede na koncentracijo sproščene glukoze. V nadaljevanju bom opisala najpogostejši tehniki hidrolize β -glukanov. To sta kislinska in encimska hidroliza. Opisala bom tudi encime, ki jih uporabljamo pri encimski hidrolizi.

2.3.3.1 Kislinska hidroliza

Z uporabo različnih kislin lahko hidroliziramo polisaharide do monosaharidov v različnih matriksih. Najpogosteje se za hidrolizo β -glukanov uporabljajo trifluoroocetna (TFA), žveplena (H_2SO_4) in klorovodikova (HCl) kislina (Johansson in sod., 2006). V eni izmed zgodnejših raziskav, ki so ji izvedli Olson in sod. (1988), so z uporabo 2 M TFA pri 121 °C (1 uro) določali različne monosaharide v živilih, prehransko vlaknino in fekalni preostanek prehranske vlaknine po prebavi. Podobno so tudi Manthey in sod. (1999) analizirali monosaharide v prehranski vlaknini iz ovsa. Slaba lastnost TFA je, da ne more dovolj razgraditi β -1,4 glikozidnih vezi, zato je potrebna uporaba H_2SO_4 , pri kateri pa je potrebno pred nadaljnjo analizo ali kromatografijo odstraniti žveplove ione. Prednost TFA je, da jo lahko iz vzorca odstranimo zgolj z evaporacijo (Lebet in sod., 1997).

Tosh in sod. (2004) so primerjali kako encimska in kislinska hidroliza s HCl vplivata na fizikalno kemijske lastnosti β -glukanov, zlasti na njihovo sposobnost tvorbe gela. Pri določanju količine sproščene glukoze so ugotovili, da se je pri kislinski hidrolizi sprosti več, vendar kislinska hidroliza ni tako specifična kot encimska, zato so se verjetno razgradili še drugi polisaharidi prisotni v β -glukanskem preparatu, ne samo β -glukani. Do podobnih sklepov so prišli tudi Sibakov in sod. (2013), ki so prav tako primerjali encimsko in kislinsko hidrolizo ovsenih otrobov. Ob primerjavi kislinske hidrolize z encimsko so ugotovili, da sta tako stopnja kot vzorec hidrolize pri teh dveh metodah različna. Pri kislinski hidrolizi so potrdili večji izkoristek vodnega ekstrakta (48,2-52,6 %), medtem ko je le ta pri encimski hidrolizi znašal le 29-47,1 %. Glede na to so sklepali, da je encimska hidroliza bolj specifična od kislinske, kar se odraža v manjšem izkoristku. Komercialni encim, ki so ga uporabili, je bil namreč specifičen le za cepljenje β -1,4 glikozidne vezi, medtem ko je kislina očitno razcepila še β -1,3 glikozidne vezi. Zaključili so, da je encimska hidroliza učinkovitejša od kislinske, saj ne zahteva tako ostrih pogojev (visoka temperatura, dolg čas) in je bolj specifična.

Johansson in sod. (2006) so prav tako primerjali encimsko hidrolizo s kemijsko. Pri tem so preučevali učinkovitost vseh treh prej omenjenih kislin (TFA, H₂SO₄ in HCl) v primerjavi z encimsko hidrolizo z encimom lichenazo. Vzorci na katerih so izvedli hidrolizo so bili koncentrat ovsenih β -glukanov, ovseni kosmiči in polnozrnat oves. Pri tem so ugotovili, da vse tri kisline pri visokih koncentracijah pod enakimi pogoji (120 °C, 1 h) razgradijo β -glukane na praktično enako količino glukoze. Pri uporabi nizkih koncentracij kislin so kot glavni produkt hidrolize v največjem delu dobili glukozo, vendar tudi nekaj celobioze in drugih oligomerov. Ko so znižali temperaturo na 70 °C, je glavni produkt še vedno predstavljala glukosa, vendar je bilo ostalih razpadnih produktov zelo malo. Povzeli so, da sta tako encimska, kot tudi kislinska hidroliza primerni metodi za hidrolizo vzorcev, ki imajo visoko vsebnost β -glukanov in nizko topnost.

2.3.3.2 Encimska hidroliza

V naravi razgradnjo β -glukanov katalizirajo encimi β -glukanaze, ki jih lahko razdelimo v 4 glavne kategorije, glede na vrsto glikozidne vezi, ki jo cepijo. Tako ločimo β -1,3-1,4 glukanaze oz. lichenaze, ki cepijo β -1,3 in β -1,4 glikozidne vezi, β -1,4 glukanaze ali celulaze, ki cepijo β -1,4 glikozidne vezi, β -1,3 glukanaze ali laminarinaze, ki cepijo β -1,3 glikozidne vezi in β -1,3(4) glukanaze (Chaari in sod., 2012).

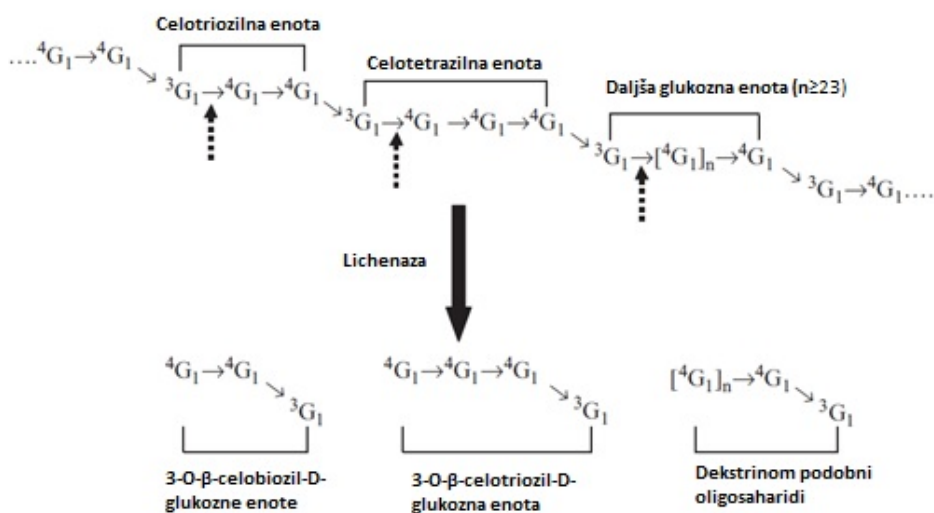
Encimska hidroliza je specifična in občutljiva metoda za fragmentacijo številnih polisaharidov. Uporablja se tako za sekvenčno analizo β -glukanov v vzorcu, kot tudi za rutinsko določanje njihove vsebnosti v različnih vzorcih (Izydorczyk, 1998a). Najpogosteje uporabljana encimska metoda za določanje vsebnosti β -glukanov je AOAC 995.15 metoda (McCleary in sod., 1991), ki vključuje uporabo dveh encimov in sicer lichenazo in β -glukozidazo. Lichenaza hidrolizira β -glukane do oligosaharidov, β -glukozidaza pa nastale oligosaharide razcepi do glukoze. Količina nastale glukoze se nato spektrofotometrično določi posredno preko obarvanih produktov, ki se tvorijo ob dodatku glukozooksidaznega/peroksidaznega reagenta (McCleary in sod., 1991). Ta metoda se uporablja v številnih raziskavah (v osnovni ali modificiranih različicah), hkrati pa tudi nekateri proizvajalci ponujajo komplet reagentov, ki vsebujejo encime in reagente potrebne za izvedbo te metode. Komplet reagentov, ki ga pogosto uporabljajo v raziskavah in ki smo ga tudi sami uporabili za eksperimente, je komplet »Mixed-linkage β -glucan« proizvajalca Megazyme International Ltd. V nadaljevanju bom opisala glavna encima, ki se lahko uporabljata za hidrolizo β -glukanov in njuno uporabo predstavila na praktičnih primerih iz različnih objav.

2.3.3.2.1 Lichenaza

Encim 1,3-1,4- β -D-glukan 4-glukanohidrolaza, bolje poznan kot lichenaza ali β -glukanaza, spada v skupino glikozidnih hidrolaz. Cepi β -1,3 glikozidne vezi na mestu razvejanja z β -

1,4 glikozidnimi vezmi, pri čemer nastanejo večinoma trisaharidi in tetrasaharidi. Lichenaze proizvajajo različne vrste bakterij rodu *Bacillus*, med njimi tudi *Bacillus subtilis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. macerans*, *B. licheniformis* in *B. polymixa*, ter še nekatere druge vrste, kot so *Clostridium thermocellum*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Rhizobium meliloti* in *Cellvibrio mixtus* (Chen in sod., 1997).

Naravna substrata, ki ju hidrolizirajo lichenaze sta β -glukan, ki se nahaja v endospermu žit, in lichenan, ki se nahaja v celičnih stenah islandskega lišaja (*Centraria islandica*). Glavni produkti hidrolize β -glukanov so trisaharidi 3-O- β -celobiozil-D-glukopiranoze in tetrasaharidi 3-O- β -celotriozil-D-glukopiranoze (Anderson, 1975).



Slika 2: Posplošen prikaz strukture žitnih β -glukanov in njihove razgradnje do oligosaharidov z lichenazo. Puščice s prekinjeno črto kažejo na mesta hidrolize z lichenazo (Lazaridou in Biliaderis, 2007).

Poleg uporabnosti v analitiki, so lichenaze uporabne tudi v številnih procesih v pivovarski industriji, kjer se uporabljajo za zmanjševanje viskoznosti in motnosti drozge, za povečevanje izkoristka med drozganjem in pridobivanja manj viskozne sladice. Uporabljajo se tudi kot dodatek krmi živali, da povečajo prebavljivost β -glukanov in povečajo izkoristek hranil v krmi. Zanimiva je tudi uporaba v detergentih za pranje perila, kjer služijo za odstranjevanje madežev živil bogatih z β -glukani (Chaari in sod., 2012a).

Čeprav naj bi lichenaze proizvajale številne bakterije, pa tudi nekatere glive in rastline, so industrijsko najbolj uporabne lichenaze, ki jih proizvajajo bakterije iz rodu *Bacillus*. Lichenaze, ki jih proizvajajo bakterije rodu *Bacillus* imajo molekulsko maso 25-30 kDa in optimalen pH blizu nevtralnega območja (6-7,5). Optimalna temperatura za njihovo delovanje je v območju od 45 do 65 °C, vendar se razlikuje med posameznimi vrstami in

sevi (Chaari in sod., 2012a). Še posebej velik potencial kažejo lichenaze, ki jih proizvajajo bakterije vrste *Bacillus subtilis* v submerznem načinu kultivacije (Chaari in sod., 2012b).

Vedno nove industrijske aplikacije narekujejo trend razvoja v smeri odkrivanja endoglukanaz, s širokim temperaturnim in pH območjem delovanja, dobro stabilnostjo in visoko specifičnostjo za substrat. Tem pogojem ustrezajo termostabilne endoglukanaze, saj so specifične in aktivne v širokem območju pH (Chaari in sod., 2012a). S tem namenom so se izvajale številne raziskave, med katerimi je tudi raziskava, ki jo je izvedla Elgharbi in sod. (2013). Želeli so izvesti biokemijsko karakterizacijo termostabilne lichenaze, ki jo proizvaja plesen *Aspergillus niger* US368. Kot substrat za preučevanje vpliva temperature in pH na aktivnost encima so uporabili 0,2 % ječmenov β -glukan. Za določanje pH območja delovanja encima so pogoje hidrolize postavili na temperaturo 65 °C in za spreminjanje pH uporabili različne pufre. Obratno so pri preučevanju temperaturnega območja delovanja encima, le te preverjali pri pH vrednosti 5, temperature pa so variirale od 40 do 80 °C. Specifičnost encima so testirali na različnih substratih. Ti substrati so bili ječmenov β -glukan, lichenan, laminarin in karboksimetilceluloza (CMC), vsi pri koncentraciji 0,2 %. Hkrati jih je zanimal kako na potek hidrolize vpliva prisotnost različnih kovinskih ionov. Ugotovili so, da imajo β -glukanaze plesni *Aspergillus niger* US368 optimalno temperaturo pri 65 °C, in optimalno pH območje delovanja med 3 in 6,5, medtem ko je bila najvišja aktivnost opažena pri pH vrednosti od 4 do 5. Pri temperaturi 65 °C niso opazili delovanja encimov pri pH višjem od 6,5. Pri pH 5 so potrdili aktivnost encima, z najvišjo aktivnostjo pri 60 °C. Pri preučevanju stabilnosti encima, so dokazali, da je encim po 1 uri inkubacije na 37 °C stabilen v pH območju od 3 do 10. Dokazali so tudi da je termostabilen, saj je po 45 min inkubacije na 60 °C ohranil vso svojo aktivnost, po 90 min na 60 °C pa 70 % aktivnosti. Prav tako so določili še razpolovne čase encimske aktivnosti pri različnih temperaturah in sicer je ta pri 50 °C znašala 150 min, pri 60 °C 135 min, pri 65 °C 90 min in pri 70 °C le 30 min. Pri 80 °C izolirana lichenaza ni bila več stabilna oz. je bila neaktivna. Pri preučevanju vpliva različnih kovinskih ionov na delovanje encima so ugotovili, da je njegovo delovanje popolnoma inhibirano ob prisotnosti Fe^{2+} , Mn^{2+} in Cu^{2+} , delno pa je inhibiran s strani Mg^{2+} in Zn^{2+} (2 % inhibicija), Ca^{2+} (11 % inhibicija) in Co^{2+} (52 % inhibicija). Podatki, ki so jih dobili s analiziranjem specifičnosti delovanja izoliranega encima na različnih substratih, so potrdili da je izoliran encim res lichenaza, saj je hidroliziral le ječmenov β -glukan in lichenan, medtem ko sta laminarin in karboksimetilceluloza ostala nehidrolizirana. Ob rezultatih, ki so jih dobili v eksperimentih te raziskave so potrdili, da ima ta sev plesni *Aspergillus niger* velik potencial za industrijsko pridobivanje encima lichenaze.

V svoji raziskavi so Chaari in sod. (2012a) želeli okarakterizirati dve lichenazi, ki ju proizvaja bakterija *Bacillus licheniformis* UEB CF. Tudi oni so želeli izvedeti v kakšnem pH in temperaturnem območju delujeta ta dva encima, kakšen je pH in temperaturni optimum in kako na njuno delovanje vpliva prisotnost različnih kovinskih ionov. Pri

analizi molekulske mase obeh encimov, ki ju tvori ta sev bakterije *B. licheniformis* so ugotovili, da se pridobljena encima precej razlikujeta. Eden (E1) je namreč po molekulski masi primerljiv z lichenazami, ki jih tvorijo ostale bakterije tega rodu (30 kDa), medtem ko je bil drugi izolirani encim (E2) znatno večji, saj je njegova molska masa je znašala kar 55 kDa. Za encim E1 so ugotovili, da ima optimalni pH pri vrednosti 5, v območju od pH 4 do pH 7 pa obdrži kar 80 % svoje aktivnosti. Aktivnost mu pade na 50 % šele pri pH 10. Encim E2 je izkazal, da ima optimalen pH pri vrednosti 7, v območju od pH 4 do pH 10 pa je ohranil 70 % svoje aktivnosti. Optimalen pH obeh encimov je precej primerljiv lichenazam izoliranim iz drugih vrst *Bacillus spp.*, izjemo predstavljajo le lichenaze izolirane iz bakterij vrste *B. brevis*, ki imajo optimalen pH delovanja pri vrednosti 9. Preučevanje stabilnosti izoliranih encimov je pokazalo, da sta oba encima zelo stabilna v širokem območju pH, pri čemer po 48 h pri 4 °C v območju od pH 4 do 10 ohranita več kot 90 % svoje aktivnosti, medtem ko po 72 h pri enakih pogojih encim E1 izgubi 30 % aktivnosti, encim E2 pa 15 %. Kot optimalno temperaturo za delovanje encima E1 so določili 70 °C, za encim E2 pa 60°C. Oba encima sta izkazala 60% svoje aktivnosti v temperaturnem območju od 40-70 °C. Pri preučevanju kako na delovanje omenjenih encimov vplivajo različni kovinski ioni (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} in Hg^{2+}) pri koncentraciji 2,5 mM, so ugotovili, da imajo nanju različen vpliv. Divalentni Ca^{2+} ioni so za 32,7 % povečali delovanje encima E1 in encima E2 pa za 12 %. Nekateri drugi viri navajajo, da Ca^{2+} ioni zavirajo delovanje lichenaz, vendar je znano, da naj bi kalcijevi ioni povečali afiniteto encima do substrata s tem, da stabilizirajo konformacijo njegovega katalitičnega mesta. Hg^{2+} ioni so pri obeh encimih popolnoma inhibirali njuno delovanje, do tega je verjetno prišlo zato, ker Hg^{2+} vpliva na tiolne skupine. Dodatek Fe^{2+} , Co^{2+} in Zn^{2+} ni bistveno vplival na aktivnost E2, medtem ko je imel vpliv na E1. Prisotnost Zn^{2+} je znižala aktivnost E1 na 21,43 %, prisotnost Fe^{2+} na 50 %, prisotnost Co^{2+} na 64,28 % in prisotnost Cu^{2+} na 71,42 % začetne aktivnosti encima. V nasprotju z ostalimi objavami, ki so preučevale vpliv teh ionov na aktivnost lichenaz, so v tej raziskavi dokazali, da na encim E2 nimajo učinka.

2.3.3.2.2 β -glukozidaza

Encim β -glukozidaza, drugače imenovan tudi β -D-glikozid glukohidrolaza ali z oznako EC 3.2.1.21, katalizira hidrolizo β -glikozidnih vezi, ki so prisotne v različnih alkilnih in arilnih glikozidih in v različnih z β -glikozidnimi vezmi povezanih oligosaharidih, ob čemer kot produkt hidrolize nastane glukoza. β -glukozidaze so pomemben razred encimov, saj med drugim s sinergističnim delovanjem skupaj s celobiohidrolazami in endoglukanazami sodelujejo pri razgradnji celuloze. Specifičnost β -glukozidaz je različna, močno je odvisna od vira encima. V naravi so ubikvitarni, saj jih proizvajajo najrazličnejši organizmi, od bakterij, plesni, kvasovk, do rastlin in živali (Tiwari in sod., 2013). β -glukozidaze imajo pomembno vlogo v številnih bioloških procesih, kot so razgradnja strukturnih in rezervnih

polisaharidov, interakcije med gostiteljem in patogenom, celično signaliziranje in onkogeneza (Krisch in sod., 2012).

Filamentozne glive so znane kot dobre proizvajalke β -glukozidaz in številnih drugih encimov. Za razliko od njih pa je le malo β -glukozidaz, ki so bile izolirane iz zigomicet. Tako je Judit Krisch s sod. (2012) v svoji raziskavi želela izolirati in okarakterizirati β -glukozidaze, ki jih proizvaja termofilna zigomiceta *Rhizomucor miehei*. Ta plesen je zanimiva s stališča morebitnega pridobivanja β -glukozidaz, saj proizvaja veliko ekstracelularnih encimov, med njimi poleg β -glukozidaze tudi nekatere lipaze in proteaze. Ugotovili so, da ima β -glukozidaza iz plesni *Rhizomucor miehei* temperaturni optimum v območju od 65 do 70 °C. Optimalna temperatura te β -glukozidaze je bila rahlo višja od optimalne temperature ostalih fungálnih β -glukozidaz, ki imajo temperaturni optimum pri temperaturah pod 65 °C. Izoliran encim je bil stabilen 4 h pri 20-50 °C, pri višjih temperaturah pa je prišlo do drastičnega zmanjšanja njegove stabilnosti. Za izolirano β -glukozidazo so ugotovili, da ima optimalen pH pri vrednosti 5, tako kot je bilo v drugih raziskavah določeno za β -glukozidaze iz drugih virov. Pri preučevanju substratne specifičnosti so ugotovili, da hidrolizira oligosaharide, ki vsebujejo β - in α -1,4 ter β -1,2 glikozidne vezi, kot so tiste prisotne v celobiozi, laktozi, maltozi in soforozi. Po pričakovanjih so ugotovili, da encim nima nobenega vpliva na hidrolizo celuloze, laminaribioze, saharoze, salicina, amigdalina, laminarina in trehaloze. Od vseh substratov, ki jih je *R. miehei* β -glukozidaza lahko razgradila, je imela največji hidrolitični učinek na celobiozo.

Mikroorganizem, ki se veliko uporablja za pridobivanje β -glukozidaz za pivovarsko industrijo, je nitasta plesen *Trichoderma reesei*. Njene β -glukozidaze se uporabljajo za razgradnjo β -glukanov, ki povzročajo težave med varjenjem piva. *Trichoderma reesei* izloča številne celololitične encime, ki so še posebej zanimivi zaradi hidrolitičnega učinka na celulozne oligosaharide. Ti encimi s svojim delovanjem povzročijo spremembe v stopnji polimerizacije β -glukanov (Henriksson in sod., 1995). V raziskavi, ki so jo izvedli Henriksson in sod. (1995), so želeli ugotoviti, kako β -glukozidaze plesni *Trichoderma reesei* vplivajo na hidrolizo ječmenovih β -glukanov. Po 2,5 h trajajoči hidrolizi izolata ječmenovih β -glukanov z M_w 250 kDa, niso določili nobenih produktov hidrolize z visoko M_w . Po tem času se je molekulska masa že razgrajenih β -glukanov zmanjšala le 10 kDa. Po 5 h so se že pojavili nizkomolekularni produkti, po 24 h pa so zaznali močno povečanje reducirajočih sladkorjev. Končni produkti hidrolize so bili disaharidi, trisaharidi in tetrasaharidi. V disaharidnih frakcijah so s pomočjo HPLC na reverzni fazi določili tudi nekaj glukoze. Pomembno je poudariti, da v tej raziskavi niso uporabili nobenega drugega encima za predhodno razgradnjo β -glukanov. Pri uporabi v analitiki običajno najprej uporabimo encim, ki β -glukane razgradi do oligosaharidov, šele nato apliciramo β -glukozidazo, ki nastale oligosaharide razgradi do glukoze. Z nuklearno magnetno resonanco (NMR) so potrdili, da ti encimi hidrolizirajo le β -1,4 glikozidne vezi, medtem

ko so β -1,3 glikozidne vezi ostale nedotaknjene. Po 72 h hidrolize se je odstotek β -1,4 glikozidnih vezi z začetnih 71 % zmanjšal na 40 %, medtem ko je odstotek β -1,3 glikozidnih vezi ostal enak, 29 %. Za β -glukozidaze plesni *Trichoderma reesei* so dokazali, da so delujejo kot ekso-encimi, odcepljajo namreč fragmente z nereducirajočega konca polimerne molekule, s tem pa povzročajo postopne majhne spremembe v stopnji polimerizacije β -glukanske molekule.

2.4 FUNKCIONALNOST β -GLUKANOV

V zadnjem času se veliko pozornosti posveča β -glukanom, ker delujejo podobno kot topna prehranska vlaknina. Pod pojem prehranska vlaknina spadajo vse komponente rastlinskega materiala, ki so odporne na razgradnjo s humanimi prebavnimi encimi. Med funkcionalne učinke prehranske vlaknine spadajo skrajšanje časa prehoda hrane skozi črevo, posledično preprečevanje zaprtosti in zmanjšano tveganje za nastanek raka na debelem črevesu. Dokazano je bilo tudi, da uživanje primernih količin prehranske vlaknine znižuje raven holesterola v krvi ter uravnava raven glukoze v krvi, kar je še posebej pomembno pri prehrani diabetikov. Prehranska vlaknina sodeluje tudi pri tvorbi kratkoverižnih maščobnih kislin in s svojim prebiotičnim delovanjem spodbuja rast koristne mikrobiote v prebavnem traktu (Brennan in Cleary, 2005).

Pozitivni učinki prehranske vlaknine so odvisni predvsem od dveh dejavnikov in sicer od količine zaužite prehranske vlaknine in od njene kakovosti. Funkcionalni učinki β -glukanov se povezujejo predvsem z njihovimi reološkimi lastnostmi, kot sta viskoznost in sposobnost tvorbe gela (Brennan in Cleary, 2005).

2.4.1 Prebava prehranske vlaknine

Uživanje prehranske vlaknine, tako topne, kot tudi netopne, kaže na spremembe v gastrointestinalnem traktu. Topna vlaknina v gastrointestinalnem traktu zaradi visoke sposobnosti za vezavo vode močno nabrekne, in predstavlja substrat za mikrobo fermentacijo, medtem ko netopna vlaknina povečuje volumen suhe snovi v črevesju. Po zaužitju β -glukani začnejo vezati vodo, nabrekati in se raztapljati, odvisno od tega kako so bili predhodno pripravljeni (že raztopljeni in termično obdelani), s tem se poveča tudi volumen snovi v želodcu, kar prispeva k večjemu občutku sitosti. Raziskave o tem, kako uživanje topne vlaknine, kamor spadajo tudi β -glukani, vpliva na praznjenje želodca, so si nasprotujoči, vendar je najbolj sprejet koncept ta, da topna prehranska vlaknina upočasni praznjenje želodca, vendar se grobi delci iz gastrointestinalnega trakta izločijo hitreje, kar se kaže v pozitivnem učinku na prebavo (Daou in Zhang, 2012).

V tankem črevesu β -glukani ostanejo nespremenjeni, saj jih tam prisotni encimi ne morejo razgraditi, zaradi česar se njihova viskoznost še poveča. Viskoznost se poveča tudi zaradi

večje tvorbe mucinov (glikozilirani proteini z visoko molekulsko maso). Znano je, da ravno uživanje prehranske vlaknine spodbuja večjo tvorbo mucinov v tankem črevesu. Po prehodu β -glukanov iz tankega črevesa se njihova viskoznost poveča, vendar ne zaradi prisotnosti encimov in žolčnih soli, saj β -glukani ne tvorijo kompleksov z njimi. Razlog za povečanje viskoznosti je verjetno sprememba pH bližje nevtralnemu (6,8), ob čemer se začnejo tvoriti večji agregati samih β -glukanov. Obnašanje β -glukanov v gastrointestinalnem traktu kaže na to, da imajo različne frakcije prehranske vlaknine optimalne stopnje zakisanja, pri katerih se sprostijo določeni polimeri in se s tem poveča viskoznost snovi. Pod to stopnjo kompleksi asociranih polimernih molekul razpadejo in viskoznost raztopine se zmanjša (Daou in Zhang, 2012).

V debelem črevesu pride do fermentacije prehranske vlaknine, tudi β -glukanov. Glavni produkti te fermentacije so kratkoverižne maščobne kisline, večinoma sestavljene iz očetne, propionske in butirične kisline. Kot že prej omenjeno, prehranska vlaknina deluje kot prebiotik, t.j. kot neprebavljiva komponenta hrane, ki pozitivno vpliva na gostitelja (človeka) s tem, da selektivno spodbuja rast nekaterih bakterijskih sevov, ki so koristni za zdravje gostitelja. β -glukani se tako razgradijo v debelem črevesu, kar vpliva na povečanje teže suhe snovi v črevesu, večinoma na račun povečanja bakterijskih celic. Mikrobne celice lahko vežejo več vode in tako povečajo vsebnost vode v fecesu. V debelem črevesu se torej β -glukani obnašajo kot substrat za nastanek kratkoverižnih maščobnih kislin. Različni oligosaharidi, ki so prisotni v β -glukanih, s svojo različno fermentabilnostjo, selektivno spodbujajo rast različnih bakterijskih sevov. Tako imajo pozitivne učinke na zdravje črevesja, predvsem zaradi svojega prebiotičnega delovanja, kar se kaže v povečevanju volumna blata na račun bakterijskih celic in njihove vezave vode (Daou in Zhang, 2012).

2.4.2 Vpliv na metabolični sindrom

Metabolični sindrom je definiran kot skupek presnovnih nepravilnosti, kamor spadajo debelost v predelu trebuha, hipertenzija, nizka koncentracija HDL lipoproteinskih delcev v krvi, povišani trigliceridi v krvi in hiperglikemija, skupaj z inzulinsko rezistenco. Ljudje z metaboličnim sindromom so izpostavljeni petkrat večjemu tveganju za nastanek diabetesa tipa 2 in dvakrat večjemu tveganju za nastanek kardiovaskularnih bolezni. Glavni faktorji, ki vodijo do razvoja metaboličnega sindroma so prehrana z visoko vsebnostjo maščob in nasičenih maščobnih kislin, uživanje ogljikovih hidratov z visokim glikemičnim indeksom in nizek vnos prehranske vlaknine. Uživanje β -glukanov lahko pomaga preprečiti pojav metaboličnega sindroma, saj naj bi njihovo uživanje vplivalo na zniževanje apetita, posledično nižji vnos energije, kar vodi do znižanja telesne teže in zmanjšanja tveganja za pojav metaboličnega sindroma (Cloetens in sod., 2012).

Vpliv β -glukanov sicer ostaja brez nedvoumnih dokazov, predvsem zato, ker v nekaterih raziskavah niso dokazali vpliva β -glukanov na znižanje telesne teže in obsega okrog pasu, v drugih raziskavah, kjer so posamezniki s prekomerno telesno težo shujšali, ne morejo zagotovo trditi, da so β -glukani edini razlog, da je prišlo do znižanja telesne teže in obsega okrog pasu. Kakorkoli, obstajajo različne razlage mehanizmov, na podlagi katerih bi lahko sklepali o pozitivnem učinku β -glukanov na zdravje. Eden izmed možnih mehanizmov je ta, da prehranski vnos β -glukanov poveča viskoznost želodčne vsebine (Dikeman in sod., 2006). Povečana viskoznost vsebine želodca povzroči počasnejše praznjenje želodca po zaužitju trdnega ali tekočega obroka, tako da se ob želodčni sluznici oblikuje plast vode, zaradi česar se zmanjša aktivnost encimov in upočasni absorpcija hranil skozi mukozno plast, kar upočasni prebavo in absorpcijo hranil. Zaradi tega oseba občuti sitost prej kot običajno, posledično pa se zniža energijski vnos s hrano (Marciani in sod., 2001).

β -glukani vplivajo tudi na hormone, ki se nahajajo v črevesju. Hormoni kot so leptin, glukagonu podoben peptid 1, peptid YY in holecistokinin zavirajo apetit, medtem ko ga hormon grelin spodbuja. Na privzem hrane seveda poleg teh fizioloških dejavnikov vplivajo tudi drugi, nefiziološki dejavniki, ki so odvisni od vsakega posameznika in od okolja v katerem se nahaja. Šest od desetih študij, ki so bile vključene v preglednem članku na temo β -glukanov in njihovega vpliva na metabolični sindrom, ki so ga pripravili Cloetens in sod. (2012) potrjuje domnevo, da β -glukani vplivajo na sproščanje hormonov v črevesju in s tem vplivajo na apetit. Ponovno lahko rečemo, da bi bilo potrebno več študij, ki bi nedvoumno potrdile možnost zdravljenja metaboličnega sindroma z uživanjem β -glukanov. Trdimo pa lahko, da so β -glukani učinkoviti kot preventiva. Prav tako je potrebno vedeti, da je bila večina teh študij opravljena na zdravih ljudeh, z normalno telesno težo in da ni nujno, da bi do enakih dognanj prišli, če bi obravnavali ljudi s prekomerno telesno težo. Poleg tega je težko primerjati študije, v katerih se uporabljajo različni odmerki β -glukanov in različni tipi β -glukanov, ki se med seboj razlikujejo v topnosti, viskoznosti in molski masi, ter so uporabljani v različnih matriksih, kajti vsi ti dejavniki vplivajo na viskoznost želodčne vsebine, ter posledično na praznjenje želodca.

Eden izmed simptomov za metabolični sindrom je tudi pojav hiperglikemije. O hiperglikemiji kot indikatorju za pojav metaboličnega sindroma govorimo takrat, kadar je koncentracija glukoze v krvi na tešče višja od 5,6 mmol/L oz. 100 mg/dL. Taka koncentracija glukoze v krvi je tudi dejavnik tveganja za nastanek bolezni diabetes tipa 2, ki je kronična bolezen, za katero je značilna povišana koncentracija glukoze v krvi zaradi neučinkovitega delovanja encima inzulina. V tem primeru lahko govorimo o inzulinski rezistenci. Verjetnost za nastanek te bolezni poveča uživanje živil z nizko vsebnostjo topne prehranske vlaknine iz žit ter živil visokim glikemičnim indeksom, ki zahtevajo večji odziv inzulina (Cloetens in sod., 2012). Uživanje hrane, bogate z β -glukani deluje preventivno na pojav inzulinske rezistence. β -glukani se lahko uporabljajo tudi v prehrani diabetikov (Östman in sod., 2006). Prehrana bogata z β -glukani spodbuja delovanje inzulina na jetrne

celice tako da zavira fosforilacijo serina na inzulinskem receptorju (Ahmad in sod., 2012). V eni izmed študij, ki so jih izvajali na ljudeh s prekomerno telesno težo, so Beck in sod. (2009) opazili znižanje odziva inzulina in povečanje koncentracije holecistokinina in peptida YY po obroku. V drugi študiji, ki so jo izvedli Granfeldt in sod. (2008) so ugotavljali kako različne količine dodanih β -glukanov vplivajo na zniževanje odziva inzulina in koncentracije glukoze po obroku. Ugotovili so, da bi bilo najbolj učinkovito uživanje 4 g β -glukanov na dan. Nižje količine (3 g) niso pokazale statistično značilnega vpliva na zniževanje odziva inzulina in koncentracije glukoze po obroku, čeprav je trend nakazoval na zniževanje teh parametrov. Na tak način bi lahko β -glukani dolgoročno vplivali na metabolični profil bolnikov z diabetesom tipa 2 (Ahmad in sod., 2012).

2.4.3 Vpliv na zniževanje holesterola

Epidemiološke študije so pokazale, da uživanje topne prehranske vlaknine, kamor spadajo tudi β -glukani, zniža absorpcijo lipidov, kar zmanjša tveganje za pojav kardiovaskularnih bolezni. Ječmenove ali ovsene β -glukane so začeli vključevati v najrazličnejše živilske izdelke, kot so npr. žita za zajtrk, pijače, kruh in hrana za dojenčke, vse z namenom izboljšanja prehranskega statusa in pozitivnih učinkov na zdravje posameznika (Tiwari in Cummins, 2011).

V študiji, ki so jo izvedli Keenan in sod. (2007), so želeli ugotoviti, kako uživanje različnih količin β -glukanov, z različnimi molekulskimi masami vpliva na zniževanje LDL in skupnega holesterola, ter na razmerje med LDL in HDL holesterolom. V dvojno slepi, randomizirani, kontrolirani študiji, ki je bila izvedena v 5 paralelkah za vsako skupino, so na vzorcu moških in žensk s hiperholesterolemijo uporabili β -glukane z visoko molekulsko maso (HMW) v količini 3 g in 5 g na dan, ter β -glukane z nizko molekulsko maso (LMW), prav tako v količini 3 in 5 g na dan, ter kontrolni vzorec, ki ni vseboval dodanih β -glukanov. Koncentrat β -glukanov so uživali v žitih za zajtrk, ter v nizkoenergijski pijači iz tropskega sadja (5 % soka). Sama študija je trajala 6 tednov, pred začetkom pa so udeležence še 4 tedne privajali na novo dieto. Po koncu študije so ugotovili zmanjšanje LDL holesterola v vseh 4 skupinah. LDL holesterol se je zmanjšal za 9 % pri skupinah, ki so uživale 3 g β -glukanov na dan in 13-15% zmanjšanje pri skupinah, ki so uživale 5 g β -glukanov na dan. Podobne rezultate je pokazalo tudi več drugih raziskav (AbuMweis in sod., 2010).

2.5 UPORABA β -GLUKANOV

Zaradi številnih funkcionalnih lastnosti β -glukanov je želja tako potrošnikov, kot tudi živilske industrije, da bi β -glukane vključili v različne tradicionalne in nove živilske proizvode, bodisi kot funkcionalno sestavino, ali pa kot različne tehnološke dodatke, kot so gostila, stabilizatorji, emulgatorji.

Zaradi njihovih odličnih reoloških lastnosti, predvsem visoke viskoznosti pri relativno nizkih koncentracijah, se lahko uporabljajo v obliki hidrokoloidov (Lazaridou in Biliaderis, 2004), pa tudi v obliki prahu, kar omogoča aplikacijo pri proizvodnji različnih izdelkov, npr. pekovskih izdelkov, testenin, mesnih in mlečnih izdelkov in pijač.

2.5.1 Izdelki iz žit

Skendi in sod. (2010) so preučevali, kako molska masa β -glukanov vpliva na reološke lastnosti testa in kruha. Ugotovili so, da večja kot je vsebnost β -glukanov v moki, bolje testo absorbira vodo in večja je vsebnost vode in vodna aktivnost v kruhu. Hkrati je dodatek β -glukanov podaljšal čas zamesa testa, testo je bilo bolj stabilno in odporno na deformacijo ter raztegljivo, kruh pa je imel po peki večji volumen. Ugotovili so tudi, da dodatek β -glukanov vpliva na barvo skorje kruha, ki je pod vplivom dodatka postala bolj temna od kontrolnega vzorca.

V študiji, ki sta jo izvedla Kalinga in Mishra (2009), sta želela ugotoviti, kako vpliva zamenjava deleža maščobe z β -glukani na reološke in fizikalne lastnosti biskvitnega testa, ter na splošno kakovost takih biskvitov. Pri analizi konsistence testa so ugotovili, da večja kot je vsebnost β -glukanov, manj je pripravljena biskvitna masa tekoča. Konsistenca testa je zelo pomemben parameter, ki določa končno kakovost biskvitnega testa tako, da vpliva na volumen izdelka. Večja viskoznost testa namreč omogoča, da lahko v testo vtepemo več zraka, kar se kaže tudi v volumnu končnega izdelka. Na volumen končnega izdelka vpliva tudi količina uporabljene maščobe, saj tudi ta prispeva k večji količini vmešanega zraka v biskvitno maso. Tako imajo biskviti z nizko vsebnostjo maščobe manjši volumen in so bolj ploščati. V njihovi raziskavi je imel najmanjši volumen biskvit, ki je imel 40 % zamenjavo maščobe z β -glukani, in največji volumen tisti, ki ni imel dodanih β -glukanov oz. tisti z 20 % dodatkom. Potrdili so tudi vpliv na barvo izdelka, saj so imeli biskviti z dodanimi β -glukani svetlejšo sredico in temnejšo skorjo od kontrolnega vzorca. Dodatek β -glukanov vpliva na tršo teksturo, ki je bila še sprejemljiva edino v primeru biskvita z 20 % dodatkom, zato so svoje ugotovitve zaključili s sklepom, da je možno zamenjati 20 % maščobe z β -glukani, ne da bi bistveno vplivali na kakovost končnega izdelka.

Dexter in sod. (2004) so preučevali možnost uporabe β -glukanov v proizvodnji testenin. Ugotovili so, da 20 % dodatek β -glukanov v zdrob iz durum pšenice nima bistvenih vplivov na senzorične lastnosti testenin. Testenine s toliko dodanimi β -glukani so bile po teksturi bolj zrnate in imele temnejšo barvo z rdečkastim podtonom. Pri zamenjavi zdroba s 7,5 % β -glukanov so Aravind in sod. (2012) ugotovili, da ni bilo opaznih nobenih razlik v izgubi testenin med kuhanjem, lepljivosti, absorpciji vode in pri senzoričnem ocenjevanju arome in teksture, v primerjavi s kontrolnim vzorcem brez dodatka β -glukanov. Pri večjem deležu zamenjave (15 in 20 %) pa so tako kot Dexter in sod. (2004) opazili spremembe saj

so bile testenine bolj rjave, trde in so imele slabšo aromo, ter so hkrati bile tudi bolj žvečljive, gumijaste in manj mokaste.

2.5.2 Mlečni izdelki

V raziskavi, ki so jo izvedli Konuklar in sod. (2004), so preučevali vpliv dodatka hidrokoloidnega preparata ovsenih β -glukanov na teksturo in senzorične lastnosti 3 mesece zorenega sira Cheddar z nizko vsebnostjo maščobe. Ugotovili so, da so siri z dodatkom β -glukanov mehkejši in imajo krajši čas topljenja, medtem ko se v elastičnosti in povezanosti sirnega testa ne razlikujejo od kontrolnega vzorca. Ob ocenjevanju arome so kontrolne vzorce sirov ocenili kot manj grenke, bolj maslene in manj škrobnate kot vzorce sirov z dodatkom β -glukanov. Te rezultate lahko povezujemo z večjo vsebnostjo maščobe in nižjo vodno aktivnostjo v kontrolnih vzorcih. V grobem lahko povzamemo, da je drastično zmanjševanje deleža maščobe v Cheddar siru s pomočjo β -glukanov v obliki hidrokoloidov, povečalo mehkobo sirov in poslabšalo senzorične lastnosti.

Volikakis in sod. (2004) so pripravili sir zoren v slanici po tradicionalnem postopku iz kravjega mleka tako, da so delež maščobe zmanjšali za 70 %. Pri tem so uporabili dodatek β -glukanov v dveh koncentracijah in sicer 0,7 % in 1,4 %. Hkrati so pripravili in nadalje analizirali tudi kontrolni vzorec polnomastnega sira in kontrolni vzorec sira z znižano vsebnostjo maščobe. Pri sirih, ki so bili obogateni z β -glukani, so določili večji izkoristek proizvodnje, ter nižji pH kot pri kontrolnih vzorcih, zlasti po 60 in 90 dneh. Pri obogatenih sirih je bila ves čas procesa (še posebej pa po 60 in 90 dneh) intenzivnejša proteoliza kot pri kontrolnih vzorcih, kar potrjuje rezultate analiz. Ob analizi reoloških lastnosti sirov so ugotovili, da v primerjavi s kontrolnim vzorcem z nizko vsebnostjo maščobe, dodatek β -glukanov izboljša vse teksturne parametre. Predvidevajo, da dodatek β -glukanov vpliva na razvoj kazeinske mreže. Senzorična analiza je pokazala, da siri z dodatkom β -glukanov ne dosegajo senzorične kakovosti kontrolnih sirov. Medtem ko ocenjevalci v trdoti in elastičnosti sirov niso zaznali bistvenih razlik, so bile opazne razlike v izgledu in okusu ter aromi sira. Barva sirov z dodanimi β -glukani je imela sivkast odtenek, o okusu in aromi pa so ocenjevalci podali naslednje deskriptorje napake sirov z dodanimi β -glukani: po fižolu, po travi, po moki in po kuhanem.

2.5.3 Mesni izdelki

Uporaba β -glukanov je obetavna proizvodnji mesnih izdelkov iz mletega mesa, kot so različni sekljanci. Z zmanjševanjem maščobe v mesnih sekljancih vplivamo na videz, teksturo in aromo mesnin, s čimer pa se zmanjšuje sprejemljivost takih mesnin pri potrošnikih. Proizvajalci tako uporabljajo različne pristope, ki pripomorejo k zmanjševanju nezaželenih sprememb zaradi zmanjševanja deleža maščobe v mesnih sekljancih. Ti pristopi vključujejo uporabo različnih nemesnih dodatkov, ki pomagajo ohraniti primerno

teksturo in še bolj pomembno, sposobnost za vezavo vode. S tega vidika so različni ogljikovi hidrati zelo učinkoviti pri izboljševanju izkoristka pri kuhanju, izboljševanju teksture in tudi zniževanju cene proizvoda. S tega vidika so β -glukani tehnološko učinkovit in hkrati zdrav nadomestek za maščobo v mesnih izdelkih in bi lahko predstavljali nov segment funkcionalnih mesnih izdelkov.

Piñero in sod. (2008) so preučevali kako dodatek β -glukanov (13,45 %) vpliva na fizikalne, kemijske, mikrobiološke in senzorične lastnosti govejih pleskavic z nizko vsebnostjo maščobe (<10 %). Te pleskavice so primerjali s kontrolnim vzorcem pleskavic, ki so vsebovale 20 % maščobe. Ker imajo β -glukani izjemno dobro sposobnost za vezavo vode, so v pleskavicah z dodatkom β -glukanov določili boljši izkoristek po kuhanju, manjše izločanje maščobe in večjo vsebnost vode v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Pleskavice z dodatkom so bile tudi precej mehkejše od kontrolnih; senzorični preskuševalci so njihovo teksturo opisali kot kašasto. Glede mikrobiološkega profila se pleskavice z dodatkom niso razlikovale od kontrolnih. V zamrznjenem stanju so ohranile nespremenjeno kakovost 60 dni. Senzorična analiza je pokazala, da so pleskavice z dodatkom mehkejše, sočnejše, vendar imajo slabšo aromo, zaradi nižje vsebnosti maščobe in arome, ki jo prispeva sam dodatek β -glukanov.

2.5.4 Pijače

Poseben izziv predstavlja tudi proizvodnja funkcionalnih pijač z dodatkom β -glukanov. V pijačah namreč lastnosti, ki so zaželeni pri izdelavi drugih živilskih izdelkov, kot so npr. povečana viskoznost in tvorba gela, postanejo moteče. Prav tako lahko velik problem predstavlja tudi slabo raztapljanje β -glukanov, njihovo kasnejše posedanje ali motnost raztopine. Vsekakor ne smemo pozabiti njihovega vpliva na senzorično kakovost obogatitvenih pijač, ki so zaradi dodatka lahko bolj viskozne ali bolj trpke. Vsi ti dejavniki, ki otežujejo uporabo β -glukanov v pijačah so razlog za številne raziskave na tem področju in optimizacije izolacije β -glukanov, ki nam omogočajo, da dosežemo večjo čistost izolata in posledično čim boljšo topnost, manjšo viskoznost in motnost.

Namen raziskave, ki so jo izvedli Ahmadi in sod. (2009) je bila optimizacija izolacije β -glukanov iz ječmena ter preučiti kakšna je možnost uporabe pridobljenega izolata za proizvodnjo funkcionalne pijače z dodatkom β -glukanov. β -glukane so izolirali iz ječmenove moke, ki je vsebovala 11,48 % skupne prehranske vlaknine, od tega 4,87 % β -glukanov. Izolat, ki so ga pripravili je vseboval 75,05 % topne prehranske vlaknine, kamor spadajo tudi β -glukani, 10,25 % netopne prehranske vlaknine, celokupna prehranska vlaknina je znašala 85,30 %. Po izolaciji so pripravili pijače z različnimi koncentracijami dodanih β -glukanov. Tako so pripravili pijače, ki so vsebovale 0, 0,2, 0,4, 0,8 in 1 % β -glukanov. Po dodatku β -glukanov v pijačo, so z merjenjem barve po CIELAB sistemu opazili povišanje L^* vrednosti (določa svetlost barve; 0 je absolutno črna, 100 pa absolutno

bela), medtem ko se je b^* vrednost (določa lego barve na rumeno-modri osi; b^* je rumena, $-b^*$ pa modra) postopoma zniževala. Opazili so tudi, da se viskoznost in kislost pijače postopoma povečujeta s povečevanjem koncentracije dodanih β -glukanov. Senzorična analiza je pokazala, da so pijače z 0,2 in 0,4 % dodanimi β -glukani zelo podobne kontrolni pijači brez dodatka β -glukanov. Potrdili so tudi, da dodatki do 0,8 % nimajo bistvenega vpliva na aromo, barvo in sprejemljivost pijače.

Zanimiva je bila tudi raziskava, ki so jo izvedli Temelli in sod. (2004), prav tako z namenom, da preučijo možnost uporabe izolata β -glukanov na področju funkcionalnih pijač. Izvedli so tudi senzorično analizo, s katero so primerjali kakovost pijač z okusom pomaranče z dodanimi β -glukani s pijačami z dodanim pektinom. Hkrati so ocenjevali tudi stabilnost pijač v obdobju 12 tednov. Pijače z okusom pomaranče so pripravili iz naravne esence pomaranče in iz olja pomarančne lupine, kateremu so bili odstranjeni terpeni. Tako so pripravili 3 pijače v treh paralelkah z različno vsebnostjo β -glukanov in sicer 0,3, 0,5 in 0,7 %. V enakih koncentracijah so pripravili tudi pijače, ki so namesto β -glukanov vsebovale pektin. Šolan panel senzoričnih preskuševalcev je ocenil podobno sadno, pomarančno aromo, aromo po lupini in sladkost pri vseh vzorcih, opazili pa so razlike v kislosti različnih vzorcev. Ocenili so, da so pijače z 0,3 % dodanih β -glukanov podobne tistim z dodatkom pektina pri enaki koncentraciji, medtem ko so bile pijače z 0,5 in 0,7 % dodanih β -glukanov bolj viskozne od kontrolnih pektinskih vzorcev. Kljub temu so si bile ocene za sprejemljivost različnih pijač podobne. Ob preučevanju stabilnosti pijač so ugotovili, da v obdobju 12 tednov ni prišlo do povečane mikrobne rasti ali sprememb v pH vrednosti. S kolorimetričnimi meritvami so ugotovili, da se v prvem tednu intenzivnost barve pri vseh pijačah zmanjša, nato pa se stabilizira. Medtem ko so ugotovili, da s povečevanjem koncentracije uporabljenih β -glukanov, pijače postanejo svetlejšje barve in bolj motne, česar niso zaznali pri pijačah z dodanim pektinom. Opazili so, da motnost pijač z dodanimi β -glukani izgine v prvih treh tednih skladiščenja. Na podlagi tega sklepajo, da bi β -glukani lahko bili primeren dodatek za proizvodnjo funkcionalnih pijač, ki bi bile vsečne tudi potrošnikom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

3.1.1.1 Valechol[®] moka

Za analizo in izolacijo β -glukanov smo uporabili Valechol[®] moko, ki jo proizvaja podjetje Valens Int. d.o.o. Gre za ječmenovo moko, ki predstavlja koncentriran vir v vodi topne prehranske vlaknine ječmenovega zrna, od katere pomemben del predstavljajo β -glukani. Valechol[®] moka po zagotovilih proizvajalca vsebuje ≈ 15 % β -glukanov v suhi snovi.

3.1.1.2 Izolati β -glukanov

β -glukane smo izolirali iz Valechol[®] moke s pomočjo encimov alkalaze, amilaze in amiloglukozidaze. Z različnimi kombinacijami teh encimov smo pripravili 4 različne izolate. Izolat A je bil pripravljen le z dodatkom alkalaze, izolat B z dodatkom alkalaze in α -amilaze, izolat C z dodatkom alkalaze in amiloglukozidaze, ter izolat D z dodatkom alkalaze, amilaze in amiloglukozidaze. V vseh izolatih, razen B in D, smo določili vsebnost β -glukanov, škroba, proteinov ter polifenolov. Na osnovi preliminarnih rezultatov smo se odločili, da bomo za nadaljnje analize uporabili le izolat A in izolat C.

Poleg v zgoraj navedenih izolatov, ki smo jih iz ječmenove moke ekstrahirali in izolirali sami, smo za analize uporabili še enega izmed komercialnih izolatov in sicer Barley Betafiber proizvajalca Cargill. Izolat se trži pod imenom Barlív[®]. Opis proizvajalca pravi, da preparat vsebuje nerazvejane, linearne β -glukane z β -1,3 in β -1,4 glikozidnimi vezmi, ki so jih pridobili po precipitaciji topne frakcije hidrolizata z etanolom. Za hidrolizo so uporabili encima celulazo in α -amilazo. Preparat Barley Betafiber naj bi vseboval najmanj 70 % β -glukanov. V tem vzorcu smo določili vsebnost β -glukanov, škroba ter izmerili viskoznost s kapilarnim viskozimetrom.

Za boljši pregled so v spodnji preglednici (Preglednica št. 1) navedeni vsi uporabljeni izolati z oznakami, ki se bodo uporabljale za njihovo označevanje v nadaljevanju in njihova priprava. V poglavju Rezultati z razpravo bodo tako navedene samo oznake vzorcev, ne pa tudi njihovi opisi.

Preglednica 1: Uporabljeni izolati

Vir ekstrakcije	Oznaka vzorca	Hidroliza
Lasten izolat, izoliran iz Valechol®	I	Amiloglukozidaza + alkalaza, z regulacijo pH
Lasten izolat, izoliran iz Valechol®	A	Alkalaza, z regulacijo pH
Lasten izolat, izoliran iz Valechol®	B	α -amilaza + alkalaza, z regulacijo pH
Lasten izolat, izoliran iz Valechol®	C	Amiloglukozidaza + alkalaza, z regulacijo pH
Lasten izolat, izoliran iz Valechol®	D	Amiloglukozidaza + α -amilaza + alkalaza, z regulacijo pH
Lasten izolat, izoliran iz Valechol®	E-1h	Alkalaza, z regulacijo pH, čas hidrolize 1 h
Lasten izolat, izoliran iz Valechol®	F-3h	Alkalaza, z regulacijo pH, čas hidrolize 3 h
Lasten izolat, izoliran iz Valechol®	G-1h	Alkalaza, brez regulacije pH, čas hidrolize 1 h
Lasten izolat, izoliran iz Valechol®	H-3h	Alkalaza, brez regulacije pH, čas hidrolize 3 h
Komercialni izolat Cargill Barley Betafiber	K	Celulaza + α -amilaza
Ječmenovi β -glukani ($M_w=229 \times 10^3$ g/mol), Megazyme standard	J	N/A
Ovseni β -glukani ($M_w=70,6 \times 10^3$ g/mol), Megazyme standard	O	N/A

3.1.1.3 Encimi

V spodnji preglednici so navedeni vsi encimi, ki smo jih uporabljali bodisi pri določanju vsebnosti β -glukanov (lichenaza, β -glukozidaza), bodisi pri postopku ekstrakcije β -glukanov (alkalaza, α -amilaza, amiloglukozidaza) ali pri določanju vsebnosti škroba v različnih vzorcih (α -amilaza, amiloglukozidaza). Vsi encimi so bili vedno pripravljeni po spodaj navedenih postopkih, zato bodo v poglavju Metode navedene le uporabljene količine tako razredčenih encimov.

Preglednica 2: Uporabljeni encimi

Encim	Priprava encima
Lichenaza*	75 μ L lichenaze + 1425 μ L 20mM fosfatni pufer, pH 6,5
β -glukozidaza*	75 μ L β -glukozidaze + 356 μ L 200 mM acetatni pufer, pH 4,5 + 1069 μ L H ₂ O
Alkalaza (SI-P4860-50ML)	40 μ L alkalaze + 760 μ L 250 mM TRIS pufer, pH 7
α -amilaza (SI-A7595-50ML)	40 μ L α -amilaze + 360 μ L 20 mM fosfatni pufer, pH 6,5
Amiloglukozidaza (SI-10115-1G-F)	4 mg amiloglukozidaze + 400 μ L 200 mM acetatni pufer, pH 4,5

* β -Glucan Assay Kit (Mixed Linkage), Megazyme

3.1.1.4 Živila, v katera smo dodajali β -glukane

Del eksperimenta je predstavljala tudi analiza stabilnosti β -glukanov iz izolatov v različnih pijačah in mlečnih izdelkih. Namen je bil ugotoviti, kako se β -glukani v teh matriksih raztopijo, ali se posedejo in kako vplivajo na druge lastnosti izdelka (motnost, povečana viskoznost). Izbrali smo naslednja živila oz. izdelke: mleko 3,5 % m.m., mleko 1,6 %

m.m., jogurt 1,6 % m.m., belo vino z 11 % alkohola, Coca cola zero in Deit (pijača s sladili). Poleg živil smo kot modelni sistem uporabili tudi 200 mM citratni pufer s pH 3,5.

3.1.2 Reagenti

V spodnjih preglednici (Preglednica št. 3) so prikazani vsi uporabljeni reagenti.

Preglednica 3: Za laboratorijsko delo uporabljeni reagenti

Reagent	Proizvajalec	Uporaba
Ocetna kislina	Merck, Nemčija	Priprava pufra
Natrijev dihidrogen fosfat	Merck, Nemčija	Priprava pufra
Natrijev hidroksid	Merck, Nemčija	Priprava pufra
Tris-hidroksimetil-aminometan (TRIS)	Merck, Nemčija	Priprava pufra
Citronska kislina	Merck, Nemčija	Priprava pufra, kot realni matriks
Folin-Ciocalteu reagent	Sigma-Aldrich, Nemčija	Določanje fenolov
Galna kislina	Merck, Nemčija	Določanje fenolov
Natrijev karbonat	Merck, Nemčija	Določanje fenolov
Bradfordov reagent	Sigma-Aldrich, Nemčija	Določanje proteinov
Kimotripsinogen	Sigma-Aldrich, Nemčija	Določanje proteinov
GOPOD reagent	Mixed-linkage β -glukan kit, Megazyme, Ireland	Določanje vsebnosti β -glukanov in škroba
Standard glukoze	Mixed-linkage β -glukan kit, Megazyme, Ireland	Določanje vsebnosti β -glukanov in škroba
Standard ječmenovih β -glukanov	P-MWBGS-Beta-Glucan MW Standard, Megazyme, Ireland	Merjenje viskoznosti, določanje vsebnosti β -glukanov
Standard ovsenih β -glukanov	P-MWBGS-Beta-Glucan MW Standard, Megazyme, Ireland	Merjenje viskoznosti, določanje vsebnosti β -glukanov
MilliQ voda	UL, BF z uporabo aparata Millipore, ZDA	Razredčevanje, raztapljanje

3.1.3 Oprema

V spodnjih preglednici (Preglednica št. 4) je prikazana uporabljena laboratorijska oprema.

Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema in pribor

Oprema	Proizvajalec
Avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
Tehtnica	Gorenje, Slovenija
Analitska tehtnica	Mettler Toledo, Švica
Vibracijski stresalnik (vrtinčnik)	Vibromix
Termoblok	FALC Instruments, Italija
pH meter HI 221	Hanna Instruments, Italija
Spektrofotometer	HP 8453 UV-VIS
Viskozimeter Visco Clock K300	Schott Instruments, Nemčija
Kapilarni viskozimeter	Schott Instruments, Nemčija
Centrifuga	Hettich Rotanta 460R, Nemčija
Centrifuga	Eppendorf Centrifuge 541c, Nemčija
Kuhalnik	
Pečica s termostatom	
Liofilizator	
Digestorij	
Hladilnik z zamrzovalnikom	
Steklene čaše	
Steklene bučke	
Steklene palčke	
Plastične mikrocentrifugirke	
Nastavki za pipete	
Steklene vial	
Zaščitne rokavice	
Parafilm	
0,45 µm filter	
Injekcijske brizge	
Spatula	

3.2 METODE

3.2.1 Optimizacija ekstrakcije in izolacije β-glukanov iz različnih virov

Namen optimizacije ekstrakcije in izolacije β-glukanov iz različnih virov je bil ugotoviti, kateri izmed uporabljenih izhodnih materialov in kateri izmed uporabljenih postopkov izolacije, omogoča najboljši izkoristek β-glukanov. Kot izhodne materiale za ekstrakcijo β-glukanov smo uporabili Valechol® moko, ječmenovo kašo in zdrobljeno ječmenovo zrnje. Pri eksperimentu optimizacije izolacije β-glukanov, smo uporabili različne kombinacije encimov z namenom, da bo izbrana metoda izolacije imela kar najboljše razmerje med čistostjo izolata β-glukanov in izkoristkom izolacije.

Vse nadaljnje analize smo izvajali na že prej pripravljenem izolatu β-glukanov, ki je bil izoliran po skoraj povsem enakemu protokolu kot izolat C, vendar v večjih količinah.

3.2.1.1 Izolacija β -glukanov iz Valechol[®] moke

V čašo smo zatehtali 40 g moke in jo suspendirali v 800 mL vrele mQ vode. Pred tem smo stehtali čašo z vodo in vzorcem, da smo ob koncu kuhanja dodali vodo, ki je izparela. Suspenzijo smo tako kuhali 10 minut in med tem stalno mešali, da smo ohranjali homogeno zmes. Po koncu kuhanja smo čašo ohladili na sobno temperaturo v ledeni kopeli na sobno temperaturo. Ker je bila suspenzija pregosta, da bi jo lahko precedili skozi gazo, smo vsebino čaše kvantitativno prenesli v več 50 mL centrifugirk in centrifugirali 10 minut na 4000 min^{-1} . Po koncu centrifugiranja smo bistro raztopino iz vseh centrifugirk prelili v čisto čašo. Nato smo pripravili za vsak vzorec dve 50 mL centrifugirki in v vsako od njiju prenesli 35 mL bistre raztopine. Ker smo v tej fazi pripravili 4 različne izolate, smo sledili 4 različnim protokolom.

V centrifugirko, kamor smo prenesli 35 mL bistre raztopine, smo v vzorca A in B dodali 350 μL mQ vode, v vzorca C in D pa 350 μL encima amiloglukozidaze. Nato smo vse vzorce inkubirali 1 uro pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jih občasno premešali. Po pretečenem času smo v vse vzorce dodali 700 μL 250 mM TRIS pufra s pH 7, da smo zagotovili optimalen pH za encim alkalazo, ki smo ga v vse vzorce dodali v količini 350 μL . V vzorca A in C smo dodali še 350 μL mQ vode, v vzorca B in D pa 350 μL encima α -amilaze. Nato smo vzorce ponovno inkubirali 1 uro na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jih med tem občasno premešali. Po končani inkubaciji, smo vzorce 10 minut centrifugirali na 4000 min^{-1} . Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant in zavrgli usedlino. Nato smo iz vsake paralelke za posamezni vzorec zbrali 27 mL supernatanta in ga prenesli v novo 50 mL centrifugirko, kamor smo dodali še 18 mL 96 % etanola. Po dodatku etanola smo čez noč pustili vzorce v hladilniku, da so se popolnoma oborili. Naslednje jutro smo vzorce ponovno centrifugirali in nato ločili oborino od supernatanta, ter jo sprali s 30 mL ohlajenega 50 % etanola. Oborino iz obeh paralelk smo nato prenesli v prej stehtano 15 mL centrifugirko, in jo sprali z nekaj mL 96 % etanola, ter vzorce ponovno centrifugirali. Po končanem centrifugiranju smo odlili etanol in vzorce osušili s prepihanjem z dušikom. Nato smo vzorce liofilizirali čez noč, naslednje jutro pa smo določili izkoristek izolacije.

Eden izmed kasnejših eksperimentov je obsegal tudi izolacijo β -glukanov iz Valechol[®] moke le s pomočjo alkalaze. Pri tem smo eksperiment zastavili tako, da bi izvedeli kakšen je izkoristek izolacije oz. kakovost izolata, če ga izoliramo s pomočjo alkalaze v 10x manjši koncentraciji (osnovna raztopina encima je bila redčena 1:200), kot pri prvem eksperimentu, in če ga izoliramo s pomočjo alkalaze v enaki koncentraciji, kot pri prejšnjem eksperimentu, vendar brez predhodne regulacije pH. Hkrati smo spremljali tudi kako na samo izolacijo β -glukanov vpliva čas trajanja hidrolize z alkalazo.

Tako smo pripravili 4 vzorce v dveh paralelkah in sicer:

- vzorec z nižjo koncentracijo alkalaze, čas trajanja hidrolize 1 ura (E-1 h),
- vzorec z nižjo koncentracijo alkalaze, čas trajanja hidrolize 3 ure (F- 3 h),
- vzorec brez regulacije pH, čas trajanja hidrolize 1 ura (G- 1 h),
- vzorec brez regulacije pH, čas trajanja hidrolize 3 ure (H- 3 h).

Protokol za izolacijo β -glukanov le s pomočjo alkalaze je enak kot v prejšnjem eksperimentu, s to razliko, da smo k 35 mL bistre raztopine takoj dodali 350 μ L ustrezno razredčene alkalaze (1:200) in vzorce nato inkubirali 1 uro ali 3 ure pri 60 °C. V nadaljevanju smo postopali enako, kot pri ostalih eksperimentih. Učinkovitost izolacije smo določali po protokolu za določanje vsebnosti β -glukanov v izolatu.

3.2.2 Določanje vsebnosti β -glukanov v različnih vzorcih

Za določanje vsebnosti β -glukanov smo uporabili metodo dvostopenjske hidrolize β -glukanov z encimoma lichenazo in β -glukozidazo. Lichenaza cepi β -1,3 glikozidne vezi do krajših oligosaharidov, β -glukozidaza pa cepi β -1,4 glikozidne vezi v prej nastalih oligosaharidih, do glukoze. Po končani hidrolizi smo spektrofotometrično določili odziv glukoze z merjenjem absorbance pri 510 nm. Odziv glukoze lahko določimo na podlagi spremembe barve raztopine, ki nastane ob dodatku GOPOD reagenta. GOPOD reagent je komercialna mešanica encimov glukoza oksidaze in peroksidaze. Glukozo v raztopini torej določimo posredno preko nastalega peroksida tako, da glukoza oksidaza pretvori D-glukozo v D-glukonat in vodikov peroksid, ob delovanju peroksidaze na peroksid pa se tvorijo rdeče obarvani kinonimini, ki jih lahko spektrofotometrično določimo pri 510 nm.

Poleg vzorcev je za analizo potrebno pripraviti še standard glukoze in slepe vzorce. Standard glukoze smo pripravili tako, da smo 20 μ L standarda glukoze s koncentracijo 1 g/L razredčili s 40 μ L mQ vode. Eden od slepih vzorcev je vedno vseboval le 60 μ L mQ vode in 900 μ L GOPOD reagenta, drugi od slepih vzorcev pa je vseboval enake reagente kot navaden vzorec, le da smo namesto raztopine vzorca dodali enako količino vode. Tudi tem vzorcem smo dodali 900 μ L GOPOD reagenta in jih inkubirali 20 minut pri 40 °C, ter po končani inkubaciji izmerili absorbanco pri 510 nm in izračunali koncentracijo β -glukanov v vzorcu.

$$\gamma_{\beta\text{-glukani}} = \frac{A_{\text{vzorec}} - A_{\text{slepa}}}{A_{\text{standard}} \times V_{\text{vzorec}}} \times 0,9 \times R \quad \dots(1)$$

Pri tem oznaka $\gamma_{\beta\text{-glukani}}$ predstavlja masno koncentracijo β -glukanov v vzorcu, izražena v mg/mL. Oznaka A_{vzorec} pomeni absorbanco vzorca raztopine β -glukanov, A_{slepa} absorbanco slepega vzorca, A_{standard} pa absorbanco standarda glukoze s koncentracijo 1 g/L. Oznaka

V_{vzorca} pomeni volumen vzorca (v našem primeru je bilo to 30 μL). Faktor 0,9 služi za korekcijo zaradi razcepa polisaharida do glukoze, R pa pomeni uporabljeno redčitev.

3.2.2.1 Določanje β -glukanov v Valechol[®] moki

Za določanje β -glukanov v Valechol[®] moki smo zatehtali 50 mg Valechol[®] moke v 50 mL centrifugirko, kamor smo dodali 100 μL 50 % etanola, da se je vzorec bolje suspendiral, in 2 mL 20 mM natrijevega fosfata s pH 6,5. Ob dodatku pufra se moka hidratizira in nabrekne, ob čemer β -glukani preidejo v raztopino. Po dodatku etanola in fosfatnega pufra, smo vzorec premešali na vrtinčniku in kuhali v vreli vodni kopeli nekaj minut, med čemer smo vzorec večkrat premešali. Po končanem kuhanju smo vzorec ohladili pod tekočo vodo. Ko je bil vzorec ohlajen, smo dodali 100 μL encima lichenaze in inkubirali 1 uro pri 50 °C. V času trajanja inkubacije smo vzorec večkrat premešali na namiznem mešalu. Po končani inkubaciji smo dodali 3 mL 200 mM natrijevega acetata s pH 4 in 7 mL vode. Vzorec smo nato centrifugirali 10 min pri 4000 min^{-1} . Po končanem centrifugiranju smo iz 50 mL centrifugirke prenesli 30 μL bistre raztopine vzorca v 1,5 mL plastično epico in dodali 30 μL β -glukozidaze. Po dodatku β -glukozidaze smo vzorec 15 minut inkubirali na 40 °C. Po končani inkubaciji smo v reakcijsko mešanico dodali 900 μL GOPOD reagenta in ponovno inkubirali 20 minut na 40 °C. Po končani inkubaciji lahko spektrofotometrično določimo odziv glukoze z merjenjem absorbanca pri 510 nm.

3.2.2.2 Določanje β -glukanov v izolatu

Za določanje β -glukanov v izolatu smo najprej pripravili raztopino β -glukanov tako, da smo v 15 mL centrifugirke zatehtali 50 mg izolata β -glukanov in ga raztopili v 7 mL mQ vode. Raztopino smo nato segrevali v vreli vodni kopeli toliko časa, dokler se izolat ni popolnoma raztopil in se ni raztopina zbistnila. Po končanem raztapljanju smo vzorec ohladili pod tekočo vodo. Po končanem ohlajanju smo prenesli 250 μL prej pripravljene raztopine v 2 mL plastično mikrocenrifugirko, ter dodali 700 μL 20 mM natrijevega fosfata s pH 6,5 in 50 μL encima lichenaze. Po dodatku encima smo vzorec 1 uro inkubirali v termobloku pri 50 °C. Med potekom inkubacije smo vzorec večkrat premešali na namiznem mešalu. Po končani inkubaciji pa smo v reakcijsko mešanico dodali 1000 μL 200 mM natrijevega acetata s pH 4,5. Dobro smo premešali in nato odvzeli 30 μL vzorca in ga prenesli v 1,5 mL mikrocenrifugirko, kamor smo dodali še 30 μL encima β -glukozidaze. Po dodatku encima smo vzorec 15 minut inkubirali pri 40 °C. Po končani inkubaciji smo dodali še 900 μL GOPOD reagenta in ponovno 20 minut inkubirali pri 40 °C. Po končani inkubaciji smo prelili vsebino mikrocenrifugirke v kiveto in spektrofotometrično določili glukozo pri 510 nm.

3.2.3 Določanje škroba

Za določanje škroba v Valechol[®] moki, kaši, zdrobljenem ječmenovem zrnju in različnih izolatih smo uporabljali metodo encimske razgradnje z amilazo in amiloglukozidazo. Standardni vzorec s katerim smo preverjali pravilno delovanje metode, je vsakič predstavljala pšenična moka tipa 500. α -amilaza in amiloglukozidaza sta encima, ki ju uvrščamo v skupino hidrolaz, natančneje med glikozidne hidrolaze. α -amilaza ima α -1,4 endoglikozidazno aktivnost, pri čemer nastanejo različni oligosaharidi, kot so dekstrini in disaharidi, npr. maltoza. Amiloglukozidaza pa z nereducirajočega dela verige amiloze in amilopektina cepi α -1,4- in α -1,6-glikozidne vezi, do glukoze, ki jo lahko spektrofotometrično določimo enako, kot smo določali odziv glukoze pri določanju vsebnosti β -glukanov. Iz dobljenih spektrofotometričnih meritev in upoštevajoč razredčitev izračunano vsebnost škroba v vzorcu.

3.2.3.2 Določanje škroba v Valechol[®] moki

Za določanje škroba v moki je potrebno najprej pripraviti suspenzijo moke, kar pripravimo tako, da med segrevanjem v vreli vodni kopeli 20 mg moke suspendiramo v 3 mL mQ vode. Po končanem suspendiranju smo sledili protokolu, ki je do konca druge hidrolize enak protokolu za določanje škroba v izolatu. Po koncu druge hidrolize pa je potrebno vzorec moke razredčiti tako, da iz reakcijske mešanice v mikrocentrifugirki odvzamemo 200 μ L vzorca in ga razredčimo z 800 μ L mQ vode. Iz tako razredčene mešanice nato odvzamemo 30 μ L vzorca, dodamo 30 μ L mQ vode in 900 μ L GOPOD reagenta. Po dodatku GOPOD reagenta vzorce inkubiramo 20 min na 40 °C, po pretečenem času pa spektrofotometrično določimo glukozo pri 510 nm.

Standardni vzorec pšenične moke tip 500 smo pripravili enako kot vzorec Valechol[®] moke. Pri vsakem določevanju škroba smo poleg vzorcev pripravili tudi slepe vzorce in standard za glukozo, kot je opisano v poglavju 3.2.2.1 Določevanje β -glukanov v Valechol[®] moki.

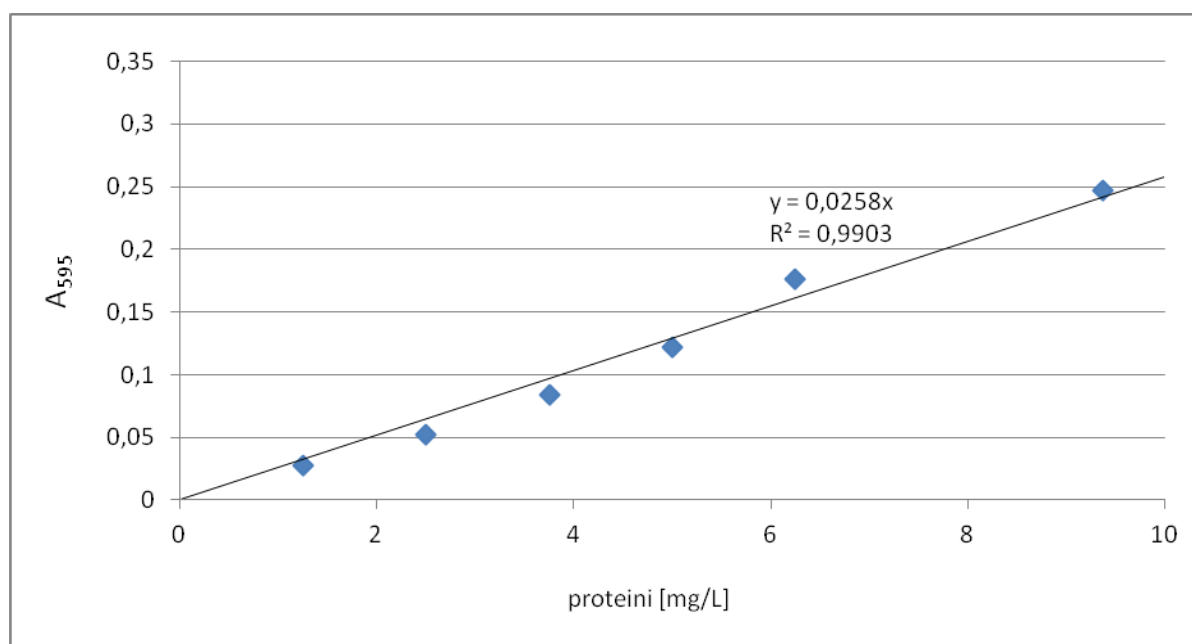
3.2.4 Določanje proteinov po Bradfordovi

Metoda po Bradfordovi je kolorimetrična metoda, ki se uporablja za določanje vsebnosti proteinov v vzorcu. Princip metode je, da se ob vezavi barvila Coomassie briljantno modro na proteine, absorpcijski maksimum barvila premakne s 465 nm valovne dolžine na 595 nm. To opazimo kot spremembo barve barvila iz rdeče v bolj ali manj intenzivno modro barvo, ki jo nato spektrofotometrično ovrednotimo z merjenjem absorbance pri 595 nm (Bradford, 1976).

Določanje vsebnosti proteinov v vzorcih izolatov smo začeli tako, da smo v 1,5 mL mikrocentrifugirko odpipetirali 400 μ L raztopine izolata, ki smo jo pripravili tako, da smo raztopili 50 mg izolata v 7 mL mQ vode. V mikrocentrifugirko smo dodali še 560 μ L mQ vode in 40 μ L Bradfordinega reagenta, ter dobro premešali na namiznem mešalu. Po 10 minutah smo nato izmerili absorbanco pri 595 nm. Poleg smo pripravili še slepi vzorec, ki je namesto 400 μ L raztopine izolata vseboval enako količino mQ vode. Za določanje vsebnosti proteinov po metodi Bradford, smo naredili umeritveno krivuljo s kimotripsinogenom, na podlagi katere smo določili vsebnost proteinov v naših vzorcih.

Preglednica 5: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje proteinov

Vzorec	Kimotripsinogen [μL], $\gamma=50\mu\text{g/mL}$	Fosfat [μL]	Voda [μL]	Bradfordov reagent [μL]
UK1	0	560	200	40
UK2	20	540	200	40
UK3	40	520	200	40
UK4	60	485	200	40
UK5	80	460	200	40
UK6	100	410	200	40
UK7	150	360	200	40
UK8	200	310	200	40



Slika 3: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti proteinov po metodi Bradford (1976)

3.2.5 Določanje fenolnih spojin

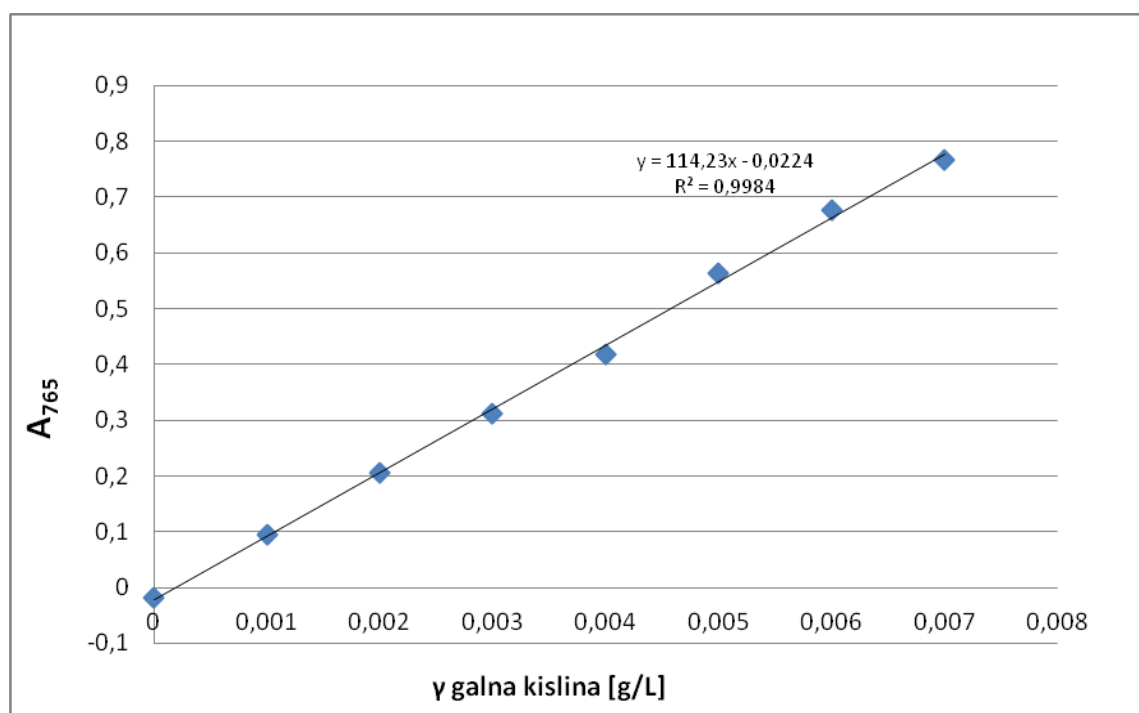
Fenolne spojine smo določali po metodi Singleton in Rossi (1965), pri kateri vzorec ne zahteva posebne priprave. Princip metode temelji na tem, da se v alkalni raztopini fenolne spojine oksidirajo s Folin Ciocalteuevim reagentom. Koncentracijo fenolov, ki so prisotni v vzorcu lahko določimo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 765 nm. Pri tem je koncentracija prisotnih fenolov premosorazmerna izmerjeni absorbanci (Singleton in Rossi, 1965). Metoda se sicer uporablja za določanje celokupne vsebnosti rastlinskih fenolov. Ker metoda ni specifična, z njo določimo različne reducente v vzorcu (Prior in sod., 2005).

V 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 500 μL raztopine izolata β -glukanov, ki smo jo pripravili tako, da smo raztopili 50 mg izolata v 7 mL mQ vode. V mikrocentrifugirko smo nato dodali 900 μL vode in 300 μL Folin-Ciocalteu (FC) reagenta, ki smo ga razredčili v dvakratni količini vode. Po dodatku FC reagenta smo raztopino dobro

premešali in po 5 minutah dodali 300 μL 20 % natrijevega karbonata (Na_2CO_3), dobro premešali na namiznem mešalu in po 60 minutah izmerili absorbanco pri 765 nm. Za določanje vsebnosti fenolov smo pripravili umeritveno krivuljo z galno kislino, ki smo jo pripravili v koncentraciji 0,1 mg/mol. Na podlagi umeritvene krivulje smo tako lahko določili vsebnost fenolov v analiziranih vzorcih.

Preglednica 6: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje polifenolov

Vzorec	Galna kislina [μL], $\gamma=0,1$ g/L	mQ voda [μL]	FC [μL]	20% Na_2CO_3 [μL]
UK1	0	1400	300	300
UK2	20	1380	300	300
UK3	40	1360	300	300
UK4	60	1340	300	300
UK5	80	1320	300	300
UK6	100	1300	300	300
UK7	120	1280	300	300
UK8	140	1260	300	300



Slika 4: Umeritvena krivulja za določanje polifenolov

3.2.6 Določanje vsebnosti vode

Vsebnost vode smo določali zato, da bi ugotovili koliko vode vsebujejo vzorci, oz. kako čist je material. V prej stehtane prazne 2 mL steklene vial, smo v dveh paralelkah zatehtali 100 mg Valechol[®] moke in 100 mg izolata β -glukanov v eni paralelki. Vzorce smo nato dali v pečico, ogreto na 105 °C za 6 ur. Po pretečenem času smo vzorce ponovno tehtali in izračunali vsebnost vode.

3.2.7 Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS)

Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo je različica masne spektroskopije, ki se uporablja za elementno analizo. Odlikuje jo visoka občutljivost in hitrost analize, možne pa so tudi analize izotopov. S to metodo lahko določimo kovine in nekatere nekovine v ppb koncentracijah. Princip metode je, da se v vroči plazmi argona vzorec razprši in ionizira. Kationi, ki so nastali z odcepitvijo elektrona, nato potujejo skozi vmesnik, kvadrupolni masni analizator, v katerem se kationi ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z).

Vzorci so pripravljani v ustrezno obliko za določanje z ICP-MS s pomočjo razklopa v nizkem pH in povišani temperaturi in tlaku in obsevanju vzorca z mikrovalovi, kar poveča hitrost termičnega razpada molekul in topnost težkih kovin v mediju. V celico za razklop smo prenesli $\approx 0,5$ g vzorca in dodali 8 mL HNO_3 ter 1 mL H_2O_2 . Program razgradnje z mikrovalovi je imel dve stopnji. V prvi stopnji se je celica z vzorcem v 10 min segrela na 180 °C, v drugi stopnji pa se je ta temperatura vzdrževala nadaljnjih 10 min. Ko se je celica ohladila na sobno temperaturo, smo vzorec kvantitativno prenesli v plastične posodice in jih dopolnili do 20 mL z vodo za določanje elementov v sledovih.

Kalibracijsko krivuljo smo pripravili v razponu med 0 ppm in 4 ppm z redčenjem kalibracijskega standarda Multi-Element Standard Solution IV v 3,6 M HNO_3 . Meritve smo opravili na aparaturi Agilent 7500 Series ICP-MS. Pretok nosilnega plina smo nastavili na 0,9 L/min, pretok vzdrževalnega plina na 0,25 L/min, pretok helija pa na 5 mL/min. Razprševalec in hitrost črpalke smo nastavili na 0,07 rpm. Dolžino meritve smo nastavili na 0,1000 s. Vsak rezultat je bil povprečje treh meritev, ki smo jim odšteli signale slepega vzorca. Elementno koncentracijo smo določili iz kalibracijske krivulje. Eksperimenti so bili opravljeni na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Kemijskem inštitutu.

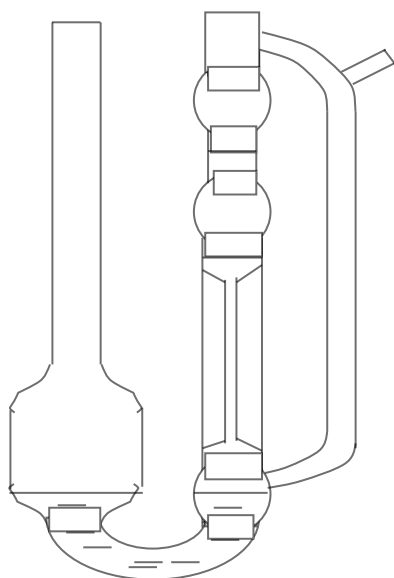
3.2.8 Merjenje viskoznosti

Viskoznost je merilo za upor tekočine do pretoka. Upor nastane zaradi notranjih sil trenja, katerega vzrok so premikanja plasti tekočin. Do premikanja plasti tekočin pride takrat, ko na tekočino delujemo s silo. Med tem, ko tangencialna sila deluje na vrhno plast tekočine, in spodnja plast miruje, se del energije prenese na naslednjo plast in nato spet na naslednjo itd. Zaradi trenja se tako vsaka plast tekočine giblje bolj počasi, dokler ni hitrost plasti tekočine ob spodnji plošči enaka nič. Strižne sile, ki delujejo med posameznimi plastmi tekočine delujejo tako, da zadržujejo hitrejšo in pospešujejo počasnejšo plast tekočin (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Kapilarna viskozimetrija, ki smo jo tudi sami uporabili za merjenje viskoznosti je konceptualno enostavna. Gre le za primerjavo časa, ki je potreben za prehod določenega volumna raztopine, v kateri je raztopljen nek polimerni topljenec, s časom pretoka čistega topila. Velja, da je čas pretoka premo sorazmeren z viskoznostjo oz. obratno sorazmeren z gostoto (Russo, 2008).

Pri tem je $[\eta]$ oznaka za intrinzično viskoznost, M je molekulska masa, K in α pa sta konstanti, ki sta določeni za vsak polimer posebej. Razvidno je torej, da večja molekulska masa topjenca rezultira v večji viskoznosti raztopine. V okviru magistrskega dela smo pomerili viskoznost raztopin standardnih β -glukanov (Megazyme) z znanimi molekulskimi masami. Intrinzične viskoznosti izolatov smo potem primerjali z intrinzičnimi viskoznostmi standardov β -glukanskih izolatov Megazyme in na ta način ocenili območje povprečnih molekulskih mas v pripravljenih izolatih.

V našem eksperimentu smo za merjenje viskoznost uporabljali kapilarni viskozimeter Schott Viscoclock, s katerim smo določali viskoznost glede na čas pretoka raztopine skozi kapilaro. Uporabljali smo kapilaro z oznako 501 03, 12/03. Glede na princip merjenja Schott Viscoclock spada med Ubbelohde kapilarne viskozimetre. Tako kot ostali kapilarni viskozimetri tudi ta deluje po principu merjenja laminarnega pretoka določenega volumna raztopine, ki jo želimo analizirati, skozi kapilaro pri določeni temperaturi, ki mora biti ves čas merjenja konstantna. Z merjenjem časa pretoka celotnega volumna tekočine skozi dve točki na kapilari, lahko izračunamo specifično viskoznost raztopine, če imamo podatek za pretok vode oz. drugega čistega topila skozi kapilaro. Pri merjenju viskoznosti je pomembna tudi regulacija pritiska. Pri nekaterih viskozimetrih sta tako oba konca kapilare izpostavljena različnima pritiskoma, pri drugih pa je pretok skozi kapilaro ustvarjen le s pomočjo gravitacijske sile. Kapilarni viskozimeter Schott Visco Clock spada med slednje.



Slika 5: Shematični prikaz kapilare za Ubbelohde viskozimeter (Russo, 2008)

Sestavni deli kapilarnih viskozimetrov so:

- posoda za tekočino
- kapilara znanih dimenzij

- merilnik pritiska,
- merilnik pretoka,
- termometer za merjenje temperature tekočine,
- naprava za vzdrževanje konstantne temperature.

Za merjenje s takim viskozimetrom moramo najprej napolniti posodo s tekočino do oznake. Nato tekočino prečrpamo in tako napolnimo kapilaro do nivoja vrhnjega nivoja, ter nato merimo čas, ki je potreben za pretok tekočine od vrhnjega nivoja, do spodnjega nivoja na kapilari. Iz izmerjenega časa za pretok raztopine vzorca in časa za pretok čistega topila, lahko nato izračunamo specifično viskoznost, ki nam da informacijo o molski masi preučevane snovi.

Viskoznost smo merili v vzorcih izolata, ki smo jih pripravili v različnih koncentracijah (0,2 g/L, 0,4 g/L, 0,7 g/L, 1 g/L in 2 g/L). Poleg vzorcev izolatov, smo pomerili viskoznost še za čisto topilo, filtrirano mQ vodo in za glukozo s koncentracijo 1 g/L. Najprej smo pripravili vzorec z najvišjo koncentracijo (2 g/L) in nato iz te raztopine ustrezno razredčevali, da smo dobili še ostale, nižje koncentracije. Vsi vzorci, vključno z vodo in raztopino glukoze, so bili pred merjenjem filtrirani skozi 0,45 μ m filter in termostatisirani 15 minut. Viskoznost smo merili tako, da smo napolnili kapilaro in merili čas pretoka med dvema točkama na kapilari. Ob menjavi vzorcev smo kapilaro večkrat sprali z destilirano vodo in nato še z nekaj mL naslednjega vzorca. Po treh setih enega vzorca z različnimi koncentracijami smo kot kontrolo ponovno pomerili vodo, da bi se prepričali, da ne dobivamo lažno previsokih rezultatov zaradi adsorpcije polisaharidov na stene kapilare. Po končanem merjenju smo izračunali specifično viskoznost (η_{sp}) raztopin.

3.2.9 Določanje β -glukanov v živilih

Zanimalo nas je, kakšna je stabilnost β -glukanov izoliranih iz Valechol[®] moke v različnih realnih matriksih živil. Najprej smo analizirali različna živila, da bi ugotovili, če so ta sploh primerna na uporabo v nadaljnjih analizah, saj smo z GOPOD reagentom zaznali tudi prosto glukozo.

Vzorci, ki smo jih analizirali so bili:

- mleko 1,6 % m.m,
- mleko 3,5 % m.m.,
- belo vino (suho),
- jogurt 1,6 % m.m,
- pijača Coca-cola Zero (s sladili),
- pijača Deit (s sladili).

Vse vzorce smo razredčili v razmerju 7:1, odvzeli smo 4,2 mL vzorca in ga razredčili z 0,6 mL vode. Iz razredčene raztopine smo nato odvzeli 200 μ L vzorca in dodali 560 μ L 200 mM fosfatnega pufra in 40 μ L lichenaze. Hkrati smo pripravili še slepe vzorce zato, da smo vedeli kakšno ozadje nam da nek vzorec. Pripravili smo jih enako, le da smo namesto 40 μ L lichenaze dodali 40 μ L vode. Nato smo vzorce inkubirali 1 uro pri 50 °C. Po pretečenem času smo v vse vzorce dodali 200 μ L 1000 mM acetatnega pufra. Nato smo vzorce razredčili tako, da smo odvzeli 400 μ L vzorca in dodali 225 μ L vode.

Za končno analizo smo pripravili vzorce na sledeč način:

- 30 μ L razredčenega vzorca (vzorček z encimom) + 30 μ L β -glukozidaze + 900 μ L GOPOD reagenta,
- 30 μ L razredčenega vzorca (slepi vzorec) + 30 μ L vode + 900 μ L GOPOD reagenta,
- 30 μ L razredčenega vzorca (slepi vzorec) + 30 μ L vode + 900 μ L vode.

Vzorec brez GOPOD reagenta smo pripravili zato, da smo lahko eliminirali tudi njegov prispevek k ozadju. Vzorce z dodatkom β -glukozidaze smo inkubirali še 15 min na 40 °C, vzorce z dodatkom GOPOD reagenta pa še 20 min na 40 °C. Po pretečenem času smo vzorce centrifugirali in izmerili absorbanco pri 510 nm.

Potem ko smo izmerili absorbanco, smo izbrali tiste realne matrikse, ki so se glede prispevanja k ozadju izkazali za primerne za nadaljnje analize. Ti vzorci so bili vino in pijači s sladili, Deit in Coca-cola Zero. V nadaljevanju nas je zanimalo kakšno je posedanje β -glukanov raztopljenih v realnih matriksih. Vzorce za to analizo smo pripravili tako, da smo v šest 2 mL mikrocentrifugirke zatehtali 10 mg β -glukanskega izolata I in ga s segrevanjem v vreli vodni kopeli raztopili v 200 μ L mQ vode. Ko so bili tako pripravljeni β -glukani raztopljeni, smo jim dodali 1,4 mL vzorca (vino, jogurt, Coca-cola, Deit in voda). Vzorce smo premešali na vrtinčniku in iz njih odvzeli 100 μ L raztopine, ki smo jo prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirke. Te vzorce smo označili z oznako A in so predstavljali vzorce pred centrifugiranjem. Nato smo vzorce za 2 dni hranili v hladilniku in po tem času analizirali njihovo posedanje tako, da smo jih naprej 10 min centrifugirali pri 14000 min⁻¹. Po končanem centrifugiranju smo od vsakega vzorca odvzeli 100 μ L in ta volumen prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Te vzorce smo označili z oznako B in so predstavljali vzorce po centrifugiranju. Vsem 12 vzorcem (A in B) smo dodali 280 μ L 200 mM fosfatnega pufra in 20 μ L lichenaze. Vzorce smo nato inkubirali 1 h pri 50 °C, vmes pa smo jih večkrat premešali na namiznem mešalu. Po končani inkubaciji smo vzorcem dodali 100 μ L 1000 mM acetatnega pufra in jih razredčili z 281 μ L mQ vode. Iz te razredčene mešanice smo odvzeli 30 μ L vzorca in mu dodali 30 μ L β -glukozidaze. Vzorce smo nato inkubirali 15 min na 40 °C. po pretečenem času smo vzorcem dodali 900 μ L GOPOD reagenta. Hkrati smo pripravili še standard za glukozo in slepi vzorec. Po dodatku GOPOD reagenta smo vzorec, slepi vzorev in standard za glukozo inkubirali 20

min na 40 °C. po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali in merili absorbanco pri 510 nm.

3.2.10 Senzorična analiza

Senzorična analiza je definirana kot znanstvena disciplina, ki meri, analizira in interpretira reakcije na tiste značilnosti živil, ki jih lahko zaznamo s petimi osnovnimi čuti (vid, okus, vonj, sluh in otip). Senzorična analiza se uporablja na različnih področjih, npr. pri razvijanju novih izdelkov, za kontrolo kakovosti surovin in končnih izdelkov, za spremljanje kakovosti izdelka med skladiščenjem, za analize konkurenčnih izdelkov, pri iskanju vzrokov neželenih sprememb posameznih senzoričnih lastnosti, za ugotavljanje vsečnosti izdelka pri potrošnikih ter različne tržne preiskave (Golob in sod., 2006).

Za senzorično ocenjevanje je bil sestavljen panel sedmih šolanih preskuševalcev. V senzoričnem laboratoriju so ocenjevali senzorične lastnosti treh šifriranih vzorcev pijače na osnovi bezgovega sirupa in treh šifriranih vzorcev pijače na osnovi malinovega sirupa. Eden izmed trojice vzorcev je predstavljal kontrolo, pijača iz bezgovega ali malinovega sirupa brez dodanega izolata β -glukanov, druga dva pa vsebovala že prej pripravljeno raztopino β -glukanov, od tega je bil eden izmed izolatov pripravljen v našem laboratoriju iz Valechol[®] moke, drugi pa je bil komercialni izolat Cargill Barley Betafiber.

Vzorce za senzorično analizo smo pripravili tako, da smo raztopili 10 g izolata I, oz. komercialnega izolata K v 0,5 L vode v plastenki Dana. Pijače smo pripravili v redčitvenem razmerju 1+8 (1 del sirupa in 8 delov vode) v 0,75 L steklenicah, kamor smo dodali 98 g sirupa, 238 g raztopine izolata ali vode, v primeru kontrolnega vzorca, ter dolili še 366 g vode.

Metoda za ocenjevanje pripravljenih pijač je bila primerjava določenih lastnosti izdelka v parih. Vzorci za ocenjevanje so bili pripravljeni v količini 40 mL v prozornih plastičnih kozarčkih volumna 0,25 L. Vzorci so bili šifrirani in so zagotavljali anonimnost. Vsak ocenjevalec je dobil 6 parov vzorcev, od tega 3 pare vzorcev pijače iz bezgovega sirupa in 3 pare pijače iz malinovega sirupa, kjer so primerjali naslednje lastnosti: vonj, motnost, viskoznost, sladkost, kislost, grenkost in okus, ter na koncu podali še splošno oceno.

Za ocenjevanje pijač z dodatkom β -glukanov smo uporabili lestvico, razdeljeno na dva pola. Vsak pol je predstavljal enega izmed vzorcev. Vsak pol je obsegal 3 kategorije za opis intenzivnosti izražene lastnosti v primerjavi z drugim vzorcem, in vrednost 0, ki so jo označili v primeru kadar med vzorcema niso opazili nobene razlike. Te kategorije so bile označene z znakom +, in sicer so preskuševalci lastnost, ki je bila malo bolj izražena kot v drugem vzorcu, označili z znakom +, lastnost, ki je bila bolj izražena s ++ in lastnost, ki je bila mnogo bolj izražena z znakom +++. Če so bile ocenjevane lastnosti bolj izražene pri

drugem vzorcu, je bil enak princip ocenjevanja, le da so ocenjevalci izbirali kategorije na polu, ki je bil namenjen drugemu vzorcu. Na dnu vsakega ocenjevalnega lista je bil pripravljen prostor, kamor so lahko ocenjevalci zabeležili dodatna opažanja glede ocenjevanega para vzorcev ali opisno razložili svojo oceno za posamezno lastnost. Za namen obdelave podatkov pridobljenih s senzorično analizo smo te podatke podali kot številčno os od 1 do 7, pri čemer vrednost 4 predstavlja vrednost, pri kateri med vzorcema ni bilo zaznane nobene razlike. Vrednosti manjše od 4 pomenijo večjo ali manjšo izraženost neke lastnosti na polu prvega vzorca (vzorca A), vrednosti nad 4 pa večjo ali manjšo izraženost neke lastnosti na polu drugega vzorca (vzorca B).

Merila za ocenjevanje posameznih lastnosti so bila naslednja:

Vonj

- A je po vonju boljši kot B (+, ++, +++)
- Ne zaznam razlike (0)
- B je po vonju boljši kot A (+, ++, +++)

Motnost

- A je bolj moten kot B (+, ++, +++)
- Ne zaznam razlike (0)
- B je bolj moten kot A (+, ++, +++)

Viskoznost

- A je bolj viskozen kot B (+, ++, +++)
- Ne zaznam razlike (0)
- B je bolj viskozen kot A (+, ++, +++)

Sladkost

- A je slajši kot B (+, ++, +++)
- Ne zaznam razlike (0)
- B je slajši kot A (+, ++, +++)

Kislost

- A je bolj kisel od B (+, ++, +++)
- Ne zaznam razlike (0)
- B je bolj kisel od A (+, ++, +++)

Grenkost

- A je bolj grenak od B (+, ++, +++)
- Ne zaznam razlike (0)

- B je bolj grenek od A (+, ++, +++)

Okus

- A ima boljši okus kot B (+, ++, +++)
- Ne zaznam razlike (0)
- B ima boljši okus kot A (+, ++, +++)

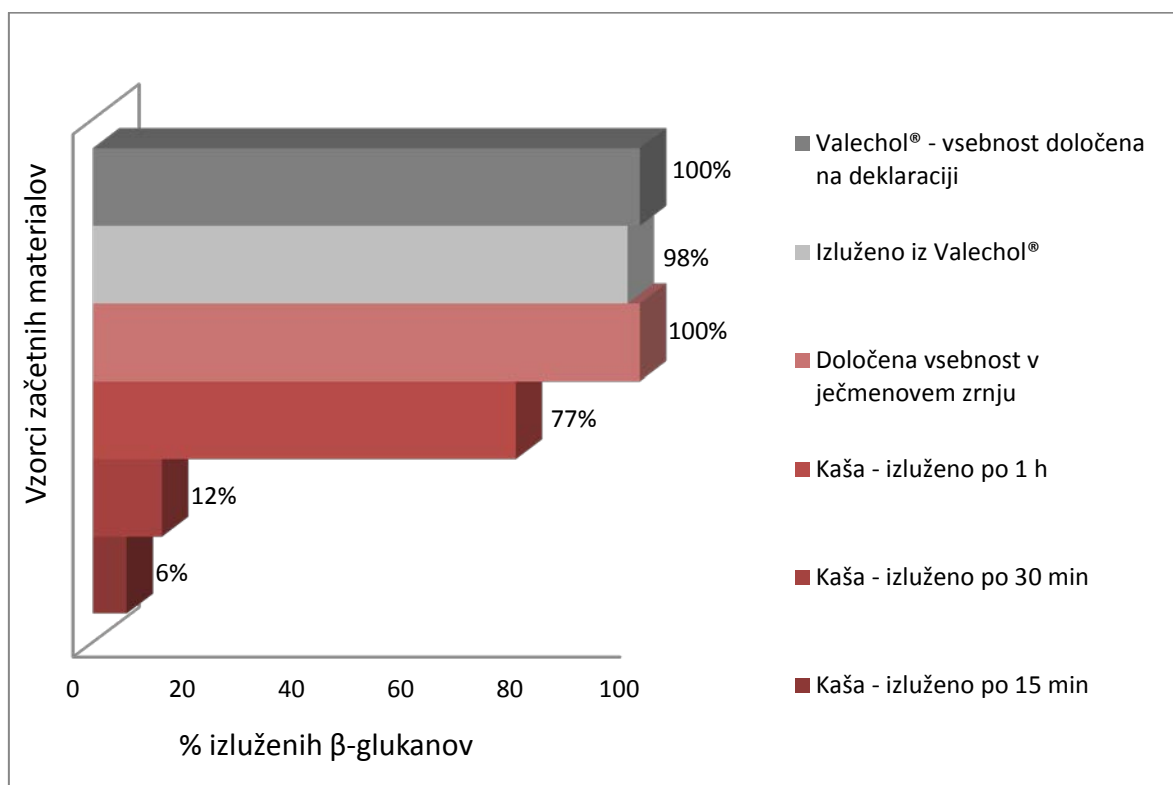
Splošna ocena

- A je celokupno boljši kot B (+, ++, +++)
- Ne zaznam razlike (0)
- B je celokupno boljši kot A (+, ++, +++)

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

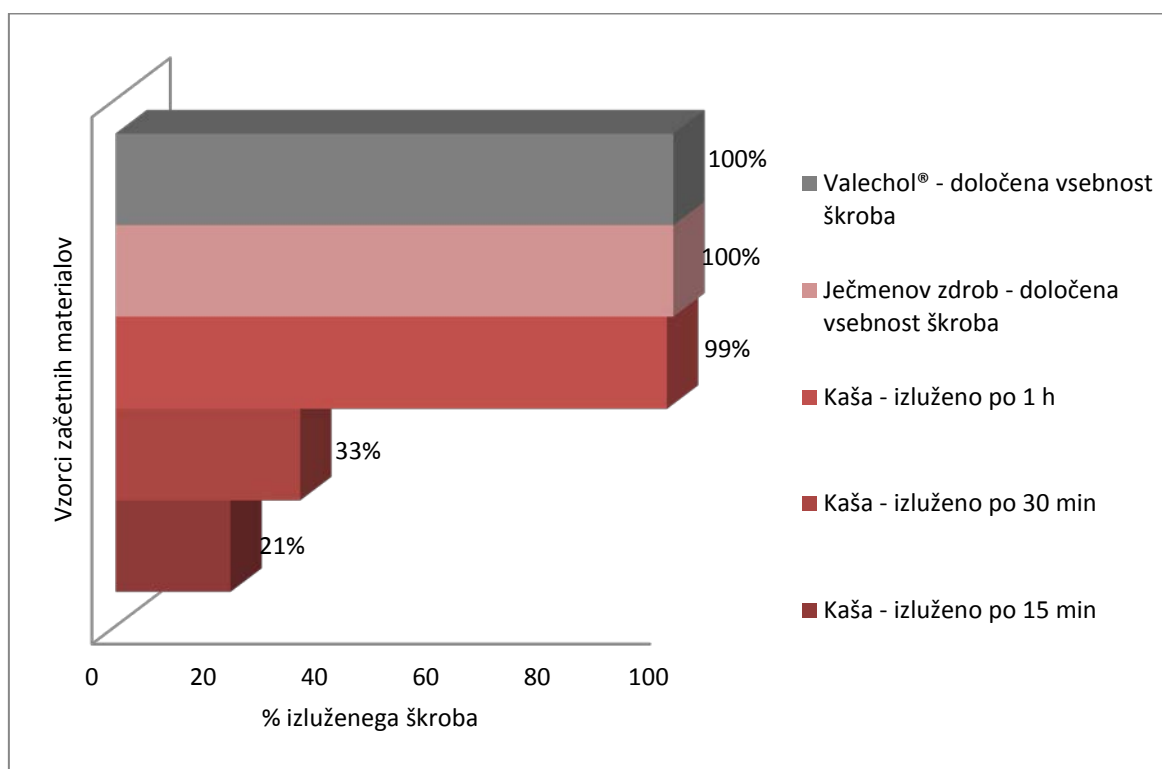
4.1 KARAKTERIZACIJA RAZLIČNIH SUROVIN ZA IZOLACIJO β -GLUKANOV

V okviru predeksperimenta smo nameravali ugotoviti, kateri izmed uporabljenih začetnih materialov bi bil glede na izkoristek ekstrakcije najbolj optimalen vir za ekstrakcijo β -glukanov. Kot začetne surovine smo uporabili Valechol[®] moko, ječmenovo kašo in ječmenov zdrob. Posamezne vire β -glukanov smo suspendirali v vodi in raztopine termično obdelali, kot je pojasnjeno v poglavju Materiali in metode. Nato smo v izluženi raztopini določili koncentracijo β -glukanov ter upoštevajoč razredčitve izrazili kakšen delež glede na zatehto predstavljajo izluženi β -glukani. Glede na sliko št. 6 lahko trdimo, da je Valechol[®] moka najbolj primerna za ekstrakcijo β -glukanov. Iz Valechol[®] moke, ki po deklaraciji vsebuje $\approx 15\%$ β -glukanov, smo jih namreč ekstrahirali kar $14,6\%$, t.j. 98% vseh prisotnih β -glukanov. Iz ječmenovega zrnja smo izlužili β -glukane po enakem postopku kot za Valechol[®]. Delež izluženih β -glukanov je znašal $5,2\%$, za kar smo predpostavili, da so to vsi β -glukani, ki jih je možno izlužiti iz ječmenovega zrnja. Glede na to vrednost smo ocenili delež, ki se je izlužil v raztopino med kuhanjem ječmenovega zrnja po različnih časih kuhanja. Po 15 min kuhanja se je v raztopino izlužilo 6% vseh prisotnih β -glukanov, po 30 min 12% in po 1 h 77% vseh prisotnih β -glukanov.



Slika 6: Odstotek v raztopino izluženih β -glukanov iz Valechol[®] in iz zdrobljenega ječmenovega zrnja po različnih časih

Pri določanju škroba smo v Valechol® moki določili vsebnosti škroba 31,4 %, v ječmenovem zrnju pa 52,8 %. Tudi tu se je Valechol® izkazal za boljši izhodni material za izolacijo β -glukanov, saj se pri kaši s podaljševanjem časa kuhanja, povečuje tudi izločanje škroba, zato ni primeren začetni material za izolacijo β -glukanov. Tako je npr. po 15 min kuhanja v raztopino izluženega že 11 % škroba, kar je 21 % celotnega škroba v ječmenovem zrnju, po 30 min 17,5 %, kar je 33 % celotnega škroba v ječmenovem zrnju, po 1 h pa se izluži že praktično ves škrob, ki je prisoten v ječmenovem zrnju.



Slika 7: Odstotek ekstrahiranega škroba iz različnih začetnih materialov za ekstrakcijo β -glukanov

4.2 KARAKTERIZACIJA RAZLIČNIH IZOLATOV β -GLUKANOV

4.2.1 Vsebnost β -glukanov

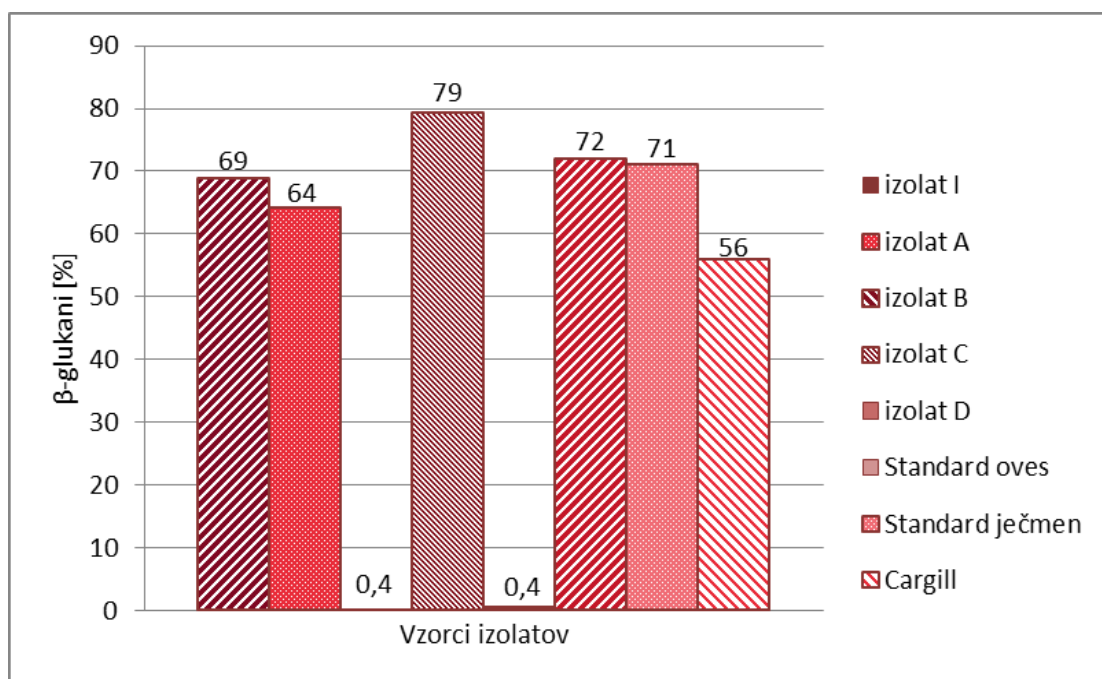
Vsebnost β -glukanov smo določili v vseh izolatih, ki smo jih pripravili sami, to so izolati A (izoliran z alkalazo), B (izoliran z α -amilazo in alkalazo), C (izoliran z alkalazo in amiloglukozidazo), D (izoliran z α -amilazo, alkalazo in amiloglukozidazo) in I (izoliran z alkalazo in amiloglukozidazo), v dveh Megazyme standardih in komercialnem vzorcu β -glukanov Cargill Barley Betafiber.

Na sliki št. 8 so prikazani zbrani rezultati vsebnosti β -glukanov v vseh izolatih. Vidimo lahko, da je največ β -glukanov vseboval izolat C, ki je bil pripravljen po skoraj povsem

enakem postopku kot izolat I. Encima uporabljena za pripravo tega izolata sta bila amiloglukozidaza in alkalaza, edina razlika v postopku izolacije izolata I in izolata C je bila, da smo za izolat C za spiranje oborine β -glukanov uporabili leden etanol, medtem ko je bil za izolacijo izolata I uporabljen etanol na sobni temperaturi. To je morda tudi eden izmed razlogov, zakaj je bila kljub enakemu postopku vsebnost β -glukanov v dveh izolatih različna, saj so pri nižji temperaturi le ti manj topni kot pri sobni temperaturi.

Spremembe v protokolu izolacije in uporabi encimov so rezultirale v relativno velikih razlikah v vsebnosti β -glukanov v izolatih z izjemo izolata A. Za pripravo izolata A smo od encimov uporabili le alkalazo in kljub temu pripravili relativno čist izolat z visoko vsebnostjo β -glukanov, kar bi lahko bilo obetavno za namen izolacije na industrijskem nivoju, saj z uporabo le enega encima namesto dveh močno zmanjšamo stroške izolacije in čas priprave. Ko smo pripravljali vodne raztopine različnih izolatov β -glukanov za merjenje viskoznosti, se je izolat A popolnoma raztopil, enako kot izolata I in C. Medtem ko se je izolat A kljub nekaj manjši vsebnosti β -glukanov še vedno izkazal za uporabnega, sta bila izolata B in D popolnoma neuporabna, saj praktično nista vsebovala β -glukanov. Za pripravo izolata B smo uporabili encima α -amilazo in alkalazo, za pripravo izolata D pa encime amiloglukozidazo, α -amilazo in alkalazo. Encim α -amilazo smo uporabili, ker smo predpostavili, da bomo dobili izolat, ki bo vseboval manj škroba in veliko β -glukanov, vendar je možno, da je bil pripravek α -amilaze nečist in je vseboval encime z β -glikozidazno aktivnostjo. Posledično bi se lahko β -glukani delno razgradili. Po liofilizaciji se sta se izolata B in D od ostalih razlikovala tudi vizualno. Medtem ko so bili izolati A, C in I kredaste in drobljive teksture, sta bila izolata B in D zelo zbita in trda.

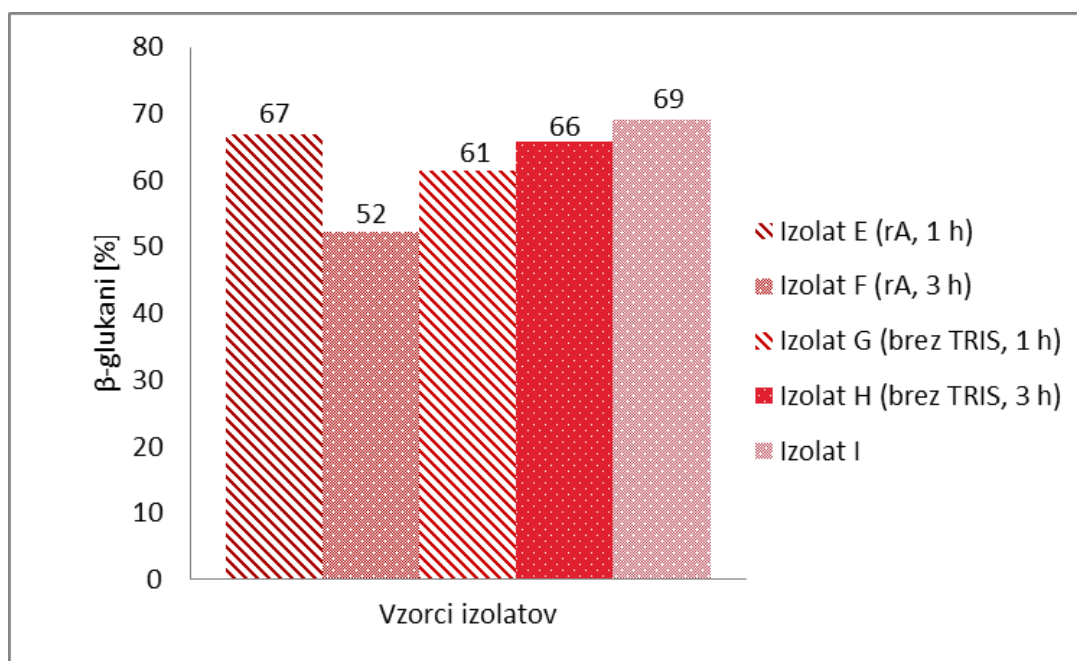
Po zagotovilih proizvajalca naj bi izolat Cargill Barley Betafiber vseboval najmanj 70 % β -glukanov, mi pa smo jih lahko določili samo 56 %. Razloga za tako odstopanje ne poznamo, saj smo uporabili povsem enako metodo določanja vsebnosti β -glukanov, kot za vse druge izolate, vendar bi morda lahko to odstopanje povezali tudi z visoko vsebnostjo mineralov, ki smo jo določili z ICP-MS analizo in je prikazana v preglednicah št. 10 in 11. V svoji raziskavi je Elgharbi s sodelavci (2013) ugotovila, da nekateri kovinski ioni delno ali pa povsem inhibirajo delovanje encima lichenaze. Ioni, ki v odvisnosti od koncentracije inhibirajo delovanje encima so Fe^{2+} , Mn^{2+} in Cu^{2+} , od katerih je ravno Fe^{2+} in Mn^{2+} zelo veliko prisotnega v izolatu K. Ioni, ki delno inhibirajo delovanje lichenaze in so v velikih koncentracijah prisotni v izolatu K pa so Mg^{2+} , Ca^{2+} in Zn^{2+} . Če se opremo na ta dognanja, je možno, da je bila zaradi visoke vsebnosti kovinskih ionov v vzorcu Cargill Barley Betafiber, aktivnost lichenaze zmanjšana, zaradi česar je iz molekul β -glukanov nastalo manj oligosaharidov in posledično po hidrolizi z β -glukozidazo tudi manj glukoze.



Slika 8: Vsebnost β-glukanov v različnih izolatih

Ker smo ugotovili, da že samo z alkalazo dobimo relativno visoke vsebnosti β-glukanov v izolatu, smo opravili še dodatne eksperimente, kjer smo zmanjšali koncentracijo encima oz. izvedli hidrolizo brez dodanega pufra. Za alkalazo smo se odločili ob predpostavki, da so proteini, poleg mineralov, najbolj moteča komponenta v β-glukanskem izolatu, ker povzročajo penjenje in trpkost v okusu.

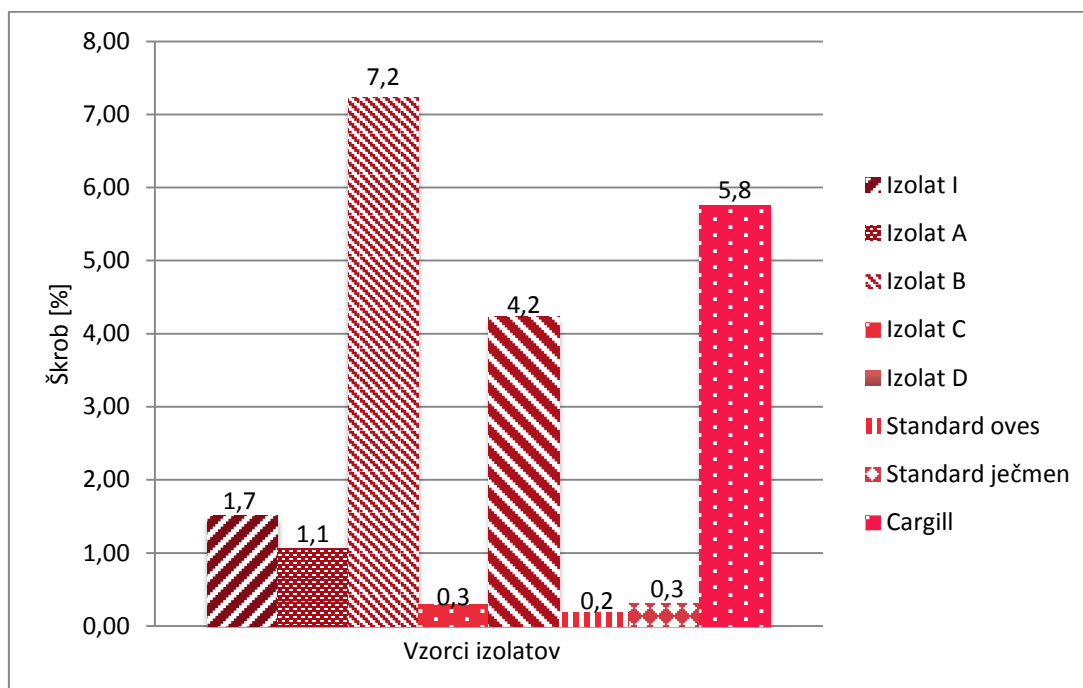
Izolate izolirane samo z alkalazo smo razdelili na dve skupini in sicer na skupino, v kateri smo uporabili nižjo koncentracijo encima in smo regulirali pH z dodatkom 250 mM TRIS pH 7. V drugi skupini pa smo uporabili višjo koncentracijo encima, vendar brez regulacije pH. V vsaki od obeh skupin nas je zanimalo tudi kako vpliva čas trajanja hidrolize, zato smo en izolat hidrolizirali 1 uro, drugega pa 3 ure. Na sliki št. 9 lahko vidimo, da je vsebnost β-glukanov v vseh izolatih relativno visoka v primerjavi z izolatom I. Ti rezultati so spodbudni za morebitno nadaljnje optimizacije ekstrakcije β-glukanov, predvsem za industrijske namene, kjer si želimo zmanjšati stroške, ki jih predstavlja uporaba večjih encimov in z vidika zdravja tudi uporabo morda nepotrebnih reagentov, v našem primeru je bil to TRIS pufer. Pri tem se je kljub vsemu potrebno zavedati kompromisa, ki se sklene med zniževanjem stroškov proizvodnje in čistostjo izolata.



Slika 9: Vsebnost β-glukanov v izolatih izoliranih samo z alkalazo

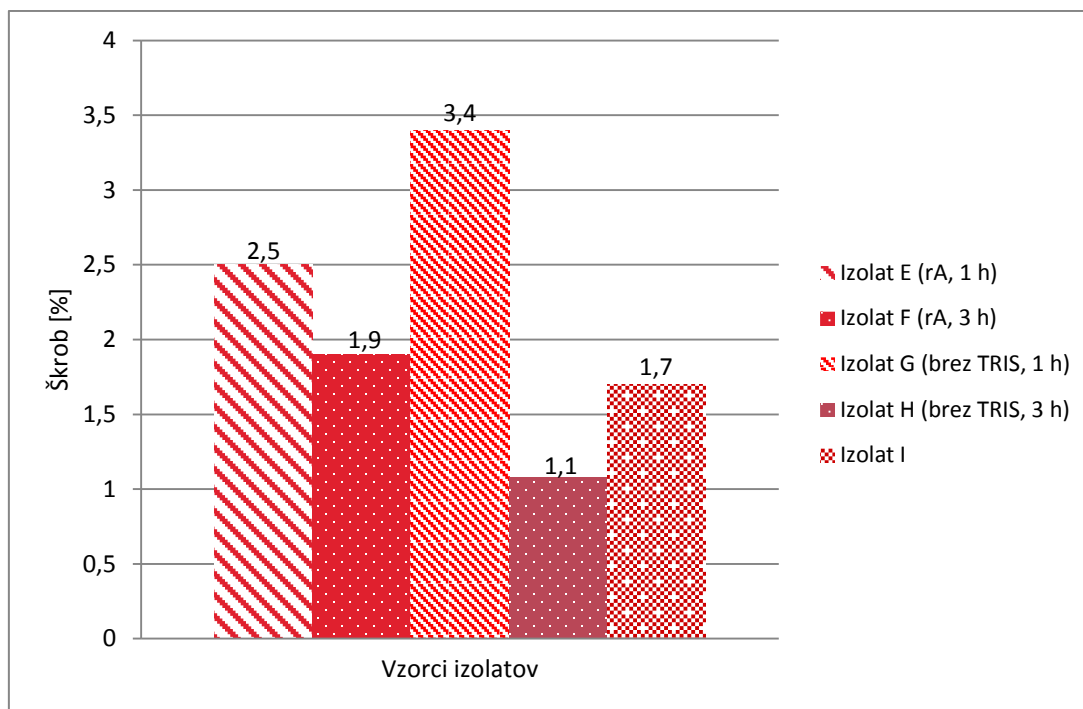
4.2.2 Vsebnost škroba

Prav tako kot vsebnost β-glukanov, smo v vseh izolatih analizirali tudi vsebnost škroba (prikazano na sliki št. 10). Za škrob je bilo zaželeno, da ga izolati vsebujejo čim manj in tako se je za optimalnega izkazal vzorec izolata I, ki je vseboval celo manj škroba od ječmenovega β-glukanskega standarda proizvajalca Megazyme. Oba standarda in izolat vsebujeta manj kot 0,5 % škroba, medtem ko ostali izolati vsebujejo večji odstotek škroba. Veliko škroba vsebuje tudi komercialni izolat K (Cargill), kar 5,8 %. Med izolati, ki smo jih pripravili sami izstopata izolata B in D, ki prav tako vsebujeta veliko škroba, vzorec izolata D ga vsebuje 4,2 %, vzorec izolata B pa kar 7,2, čeprav smo pri pripravi obeh izolatov uporabili encime, ki cepijo α-glikozidne vezi med glukoznimi enotami.



Slika 10: Vsebnost škroba v različnih izolatih

Na sliki št. 11 je prikazana vsebnost škroba v % v izolatih, pripravljenih samo z alkalazo. Vsebnosti škroba so dovolj nizke, da jih lahko primerjamo z ostalimi izolati, ki so bili izolirani z večimi encimi. Nekoliko višjo vsebnost škroba ima samo izolat G, ki je bil pripravljen brez regulacije pH in s časom trajanja hidrolize 1 h.



Slika 11: Vsebnost škroba v izolatih, izoliranih samo z alkalazo

4.2.3 Vsebnost fenolnih spojin

Določene fenolne spojine kot so katehini in fenolne kisline (ferulna, p-kumarna, vanilinska in p-hidroksibenzojska kislina) so prisotne že v samem ječmenovem zrnju (Klausen in sod., 2010). Zato lahko kljub temu, da je bil uporabljen material za izolacijo β -glukanov ječmenova moka, ki vsebuje manj fenolnih snovi kot celo ječmenovo zrnje, pričakujemo prisotnost fenolnih spojin tudi v izolatih. Poleg že znanih izolatov I, A, C in K, smo vsebnost fenolnih spojin določili tudi v izolatih, ki smo jih pripravili v dodatnem eksperimentu, kjer smo želeli ugotoviti, ali je možno dobiti kakovosten izolat β -glukanov, če postopek izolacije modificiramo tako, da uporabimo le en encim (alkalazo). V spodnji preglednici št. 7 vidimo, da vsi izolati vsebujejo $\approx 0,1$ % fenolnih spojin. Najmanj jih vsebuje izolat C. Največ jih vsebuje izolat E, to je vzorec, ki smo ga pripravili s pomočjo razredčene alkalaze, pri čemer smo regulirali pH s TRIS pufrom, pH 7.

Preglednica 7: Vsebnost fenolov v različnih izolatih

Vzorec	Fenolne spojine [%]
Izolat I	0,14
Izolat A	0,10
Izolat C	0,09
Izolat K	0,12
Izolat E (rA, 1 h)	0,15
Izolat F (rA, 3 h)	0,14
Izolat G (brez TRIS, 1 h)	0,13
Izolat H (brez TRIS, 3 h)	0,13

4.2.4 Vsebnost proteinov

V spodnji preglednici št. 8 so prikazani rezultati določanja vsebnosti proteinov po Bradfordovi metodi. Vidimo lahko, da najmanj proteinov vsebuje izolat I (le 0,1 %), medtem ko jih največ (0,34 %) vsebuje izolat K. Te rezultate lahko povežemo tudi z opažanji pri pripravi vzorcev za senzorično ocenjevanje, ko smo videli, da se vzorec K zelo peni in težko raztaplja, medtem ko pri izolatu I nismo opazili takšnih problemov. Prisotnost proteinov v izolatih zagotovo zmanjša njihovo uporabnost.

Preglednica 8: Vsebnost proteinov v različnih izolatih

Vzorec	Proteini [%]
Izolat I	0,10
Izolat A	0,13
Izolat C	0,18
Izolat K	0,34
Izolat E (rA, 1 h)	0,30
Izolat F (rA, 3 h)	0,22
Izolat G (brez TRIS, 1 h)	0,27
Izolat H (brez TRIS, 3 h)	0,30

4.2.5 Vsebnost vode

S sušenjem smo ugotavljali koliko vode vsebujejo vzorci. Pri Valechol® moki smo določili, da je vsebnost vode 8,3 %, medtem ko je izolat vseboval 15,1 % vode. Relativno veliko razliko lahko pripišemo večji higroskopičnosti izolata. Pri ostalih izolatih in komercialnem preparatu suhe snovi nismo določali, saj zaradi destruktivnosti metod in relativno velikih zateht nismo imeli dovolj materiala.

4.2.6 Vsebnost mineralov

V spodnji preglednici so prikazani rezultati, ki smo jih dobili z ICP-MS elementno analizo. Vidimo lahko, da v Valechol® moki prevladujeta Mg in K, hkrati pa sta to tudi najbolj zastopana elementa v obeh izolatih. Izolat I in Valechol® sta si proporcionalno zelo podobna po sestavi elementov, v obeh so najbolj zastopani K, Mg, Ca in Na. Večje razlike so opazne v elementni sestavi komercialnega izolata K, ki je zelo bogat z minerali, vsebuje namreč približno 15x več Ca in vsaj 3x več Mg, ki v raztopinah pogostokrat tvorita slabo topne komplekse in bi lahko prispevala k motnosti v primeru uporabe v pijačah. Izolat K je namreč vseboval več kot 2000 µg/g Mg, kar je pri dani redčitvi presegalo občutljivost ICP-MS instrumenta. Vsebuje tudi bistveno več mineralov, ki se v izolatu I nahajajo v zelo nizkih koncentracijah. Ti minerali so Na, Al, Cr, Mn, Fe, Ni in Zn.

Kljub temu, da so nekateri minerali kot npr. Ca in Fe pomembni v prehrani, pa so v samem izolatu nezaželeni. Predvsem relativno visoka vsebnost železa bi lahko negativno vplivala na uporabo v pijačah, saj železovi ioni delujejo kot katalizatorji oksidacije fenolnih spojin (povzročajo porjavitev) in askorbinske kisline (vitamin C). Visoka vsebnost Ca lahko posredno vpliva tudi na povečanje viskoznosti raztopine, če polisaharidi vsebujejo negativno nabite skupine. Ca²⁺ ioni v takšnih polisaharidih (npr. pektin) lahko tvorijo mostičke med različnimi polisaharidnimi molekulami. Tako lahko iz meritev viskoznosti lahko sklepamo, da je molska masa topljenca večja od dejanske.

Preglednica 9: Rezultati analize ICP-MS: Vsebnost mineralov v izolatih in Valechol® moki

Vzorec	Minerali						
	Na [µg/g]	Mg [µg/g]	Al [µg/g]	K [µg/g]	Ca [µg/g]	Cr [µg/g]	Mn [µg/g]
Izolat I	29,1 ± 1	696 ± 25	5,10	1343 ± 46	92,7 ± 3	0,06	1,48
Izolat K	633 ± 5	>2000	162 ± 2	1554 ± 15	1434 ± 17	13,8	40,4
Valechol®	51,7	1697 ± 20	3,59	>2000	290 ± 4	0,10	16,9
Vzorec	Minerali						
	Fe [µg/g]	Co [µg/g]	Ni [µg/g]	Cu [µg/g]	Zn [µg/g]	Cd [µg/g]	Pb [µg/g]
Izolat I	10,0 ± 2	0,03	1,67	0,43	1,09	0,01	0,01
Izolat K	127 ± 1	0,11	6,43	0,75	18,6	0,04	0,13
Valechol®	60,3 ± 1	0,01	0,16	5,21	34,4 ± 1	0,02	0,02

Ob obravnavi teh rezultatov lahko tudi pojasnimo možne vzroke za nekatere druge lastnosti izolatov. Že ob vizualnem pregledu izolatov smo opazili, da je komercialni izolat K sive barve in je deloval nečist, kar bi lahko pojasnili z večjo vsebnostjo mineralov.

Ob pregledu spodnjih rezultatov vidimo, da ima izolat K tudi več mineralov od Valechol[®] moke, medtem ko izolat I vsebuje manj mineralov.

Preglednica 10: Skupna vsebnost mineralov v posameznem vzorcu, izražena v $\mu\text{g/g}$

Vzorec	Skupna vsebnost mineralov [$\mu\text{g/g}$]
Izolat I	2180,68
Izolat K	>5990,26
Valechol [®]	>4159,41

4.2.7 Celokupna primerjava β -glukanskih izolatov

V preglednici št. 11 je prikaz prispevka posameznih skupin spojin kot masni delež izolata. Kot sem predhodno že omenila, pri komercialnem izolatu nismo določali vsebnosti vode, zato je prispevek nedefiniranih komponent precej večji kot pri izolatu I. Tudi če bi upoštevali, da oba izolata vsebujeta približno enak delež vode, komercialni izolat K še vedno vsebuje precej večji delež neanaliziranih komponent ($\approx 22\%$), kot izolat I ($13,7\%$).

Preglednica 11: Prikaz celokupne sestave vzorca izolata I in vzorca izolata K, prikazana kot W [%] izolata

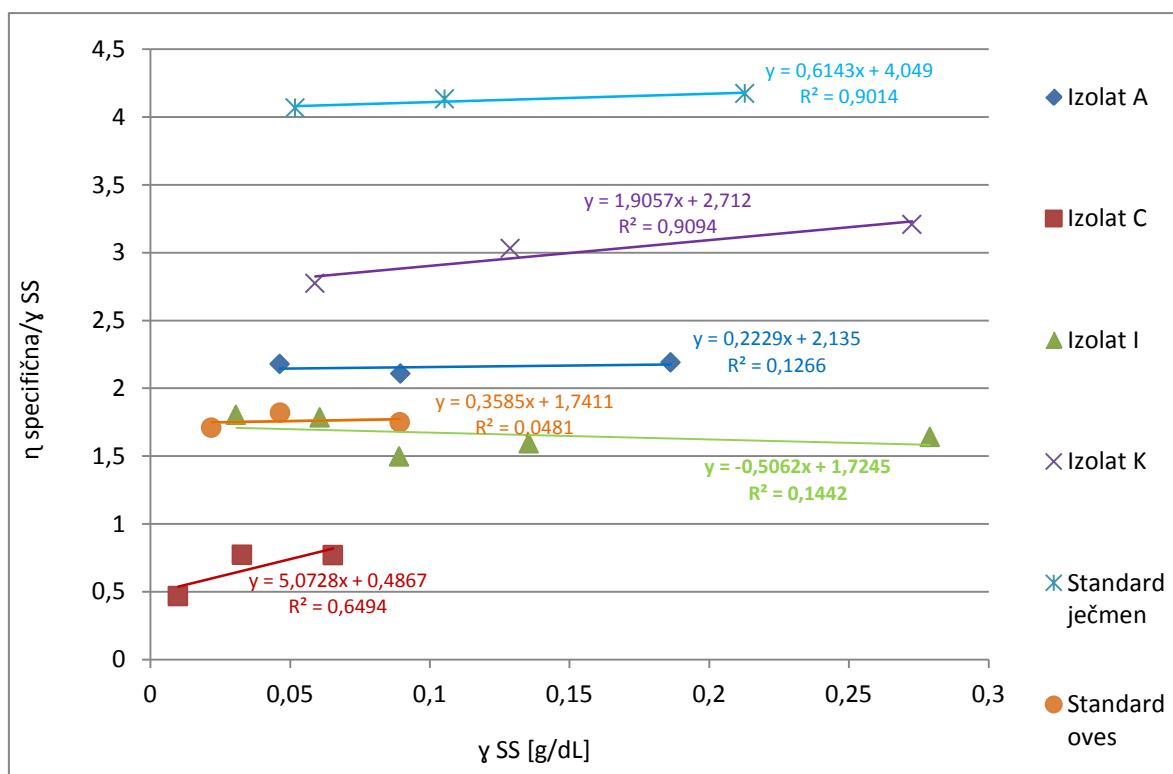
Določene spojine	Izolat I	Izolat K (Cargill)
β -glukani	69	56
Škrob	1,7	5,8
Fenolne spojine	0,14	0,12
Proteini	0,1	0,34
Minerali	0,22	0,6
Voda	15,1	N/A
Ostalo	13,7	37,1

Izolat I je vsebuje več β -glukanov v primerjavi z izolatom K. Prav tako je vseboval 3x manj škroba in vsaj 3x manj mineralov, kar smo omenili že pri predstavitvi rezultatov pridobljenih z ICP-MS. Oba izolata sta vsebovala zelo malo fenolnih spojin (izražene kot galna kislina s FC testom), izolat K celo nekaj manj od izolata I. To je verjetno povezano z nizko vsebnostjo fenolov v samem izhodnem materialu, ječmenovi moki. V specifikaciji, ki jo je Cargill vložil na FDA, je navedeno, da njihov izolat Barley betafiber vsebuje več kot 70 % β -glukanov, kar se ne sklada z rezultati naših analiz. Že prej smo omenili, da je morda razlog za tako nizko določeno vrednost β -glukanov v primerjavi s specifikacijo v tem, da vzorec izolata K vsebuje veliko mineralov. Minerali lahko motijo delovanje encima lichenaze, kar se odraža v manjši razgradnji β -glukanov do oligosaharidov in posledično do glukoze. Prav tako izolat K vsebuje relativno veliko proteinov v primerjavi z izolatom I, kar se je odražalo tudi v oteženemu raztapljanju vzorca in večjemu penjenju vodne raztopine izolata K. Omeniti pa je potrebno, da smo pri analizi β -glukanov v primerjavi s predlaganim protokolom proizvajalca Megazyme, uporabili večje koncentracije encimov, ki razgrajujejo β -glukane. Posledično bi po klasičnem protokolu najverjetneje določili še manjšo vsebnost β -glukanov.

4.2.8 Viskoznost β -glukanskih izolatov

Z merjenjem viskoznosti vodnih raztopin β -glukanov smo poleg tega, da smo pridobili podatek o viskoznosti raztopin, ki jih tvori dodatek različnih koncentracij posameznega izolata β -glukanov, želeli pridobiti tudi molsko maso izoliranih β -glukanov. S tem namenom smo izmerili viskoznost tudi dvema standardoma β -glukanov z znano molsko maso. Ta standarda sta bila ječmenov standard z molsko maso 229×10^3 g/mol in standard ovsenih β -glukanov z molsko maso $70,6 \times 10^3$ g/mol. Standarda sta bila del nabora β -glukanskih standardov » β -Glucan MW Standard« proizvajalca Megazyme.

Kot je razvidno iz slike št. 12 ima najvišjo viskoznost Megazyme standard ječmenovih β -glukanov z molsko maso 229×10^3 g/mol, sledi pa mu komercialni izolat K. Vidimo lahko tudi, da ima izolat I praktično enako viskoznost kot Megazyme standard ovsenih β -glukanov, kar pomeni, da ima tudi izolat I molsko maso približno 70×10^3 g/mol. Izolat A ima glede na te rezultate merjenja viskoznosti molsko maso nekje med 70×10^3 g/mol in 100×10^3 g/mol. Majhno viskoznost ima izolat C, kar tudi kaže na majhno molsko maso, ki je verjetno še vedno večja od 10×10^3 g/mol. Z vidika možnosti aplikacije tega izolata kot dodatka v pijače je to pozitivna lastnost, vendar ne tudi s funkcionalnega vidika, saj so kot smo že večkrat poudarili, funkcionalne lastnosti β -glukanov povezane s povečano viskoznostjo. Izolat C je najverjetneje že preveč hidroliziran, da bi ga lahko uporabili kot funkcionalni dodatek z namenom povečanja viskoznosti v živila.



Slika 12: Odvisnost razmerja med η_{sp} in γ_{SS} od koncentracije v suhi snovi v izolatih β -glukanov

Na molsko maso β -glukanov v veliki meri vpliva predhodna toplotna obdelava začetnega materiala in metoda izolacije, razlikuje pa se seveda tudi glede na vir iz katerega smo pridobili β -glukane. Liisa Johansson (2006) je v svoji doktorski disertaciji navedla, da se molska masa različnih oz. različno pridobljenih β -glukanov močno razlikuje, vendar da variira v območju med 49000 in 3×10^6 g/mol.

Tudi z merjenjem viskoznosti smo pokazali, da je glede na naš cilj, da se izolirane β -glukane uporabi kot dodatek v pijače, najbolj primeren izolat I, saj ima nižjo viskoznost od komercialnega izolata, hkrati pa je njegova molska masa še vedno dovolj visoka, bi lahko imela funkcionalne učinke.

4.3 DODATEK β -GLUKANOV V ŽIVILA

Da bi lahko uporabili izolat I kot dodatek v pijače in živila, je bilo potrebno preveriti, ali se β -glukani v teh pijačah posedajo na dno, ali pa so stabilni in ostanejo v raztopini. Do posedanja bi lahko prišlo, ker pijače vsebujejo organska topila (vino) ali imajo neprimeren (nizek) pH. Ker komercialni test za določanje β -glukanov v končni fazi temelji na določitvi glukoze, smo izbrali takšne pijače, ki vsebujejo malo proste glukoze, ki bi lahko motila pri določitvi β -glukanov. Kot smo pokazali v preglednici št. 12, je v izbranih pijačah vsebnost glukoze manjša od 1 g/L, v jogurtu pa je koncentracije 1,1 g/L. Po dodatku izolata I smo po protokolu za analizo β -glukanov v pijačah, določili večje vsebnosti glukoze (χ_{pred}). Vrednosti v oklepajih pa predstavljajo prispevek β -glukanov (od izmerjene vrednosti je odštet slepi vzorec), ki je z izjemo pijače Deit, kjer je verjetno prišlo do eksperimentalne napake, primerljiv s količino določene glukoze, ko smo izolaze dodali v vodo in citrat, ki predhodno nista vsebovala glukoze.

Nato smo pijače in jogurt obogaten z β -glukani prenesli v hladilnik in po dveh dneh le te centrifugirali in v supernatantu ponovno določili β -glukane (χ_{po}). Iz rezultatov v preglednici št. 12 je razvidno, da se β -glukani tudi po centrifugiranju ne posedajo in ostanejo v raztopini. Ti rezultati so zelo obetavni za nadaljnjo možnost uporabe β -glukanov. Edino izjemo je predstavljalo vino, v katerem se se β -glukani oborili. Razlog za obarjanje je najverjetneje v vinu prisoten etanol (11 %), ki se uporablja tudi v postopku izolacije β -glukanov kot obarjalno sredstvo.

Preglednica 12: Topnost β -glukanov v pijačah in jogurtu

Vzorec	$\chi_{\text{(slepa)}}$ [g/L]	$\chi_{\text{(pred)}}$ [g/L]	$\chi_{\text{(po)}}$ [g/L]
Belo vino	0,33	4,16 (3,83)	1,56 (1,23)
Jogurt	1,1	5,61 (4,51)	5,93 (4,83)
Coca-cola Zero (pijača s sladili)	0,18	4,32 (4,14)	4,2 (4,02)
Deit (pijača s sladili)	0,86	3,8 (2,94)	4,67 (3,81)
Citrat, pH 3,5	/	4,15	4,17
Voda	/	4,32	4,25

4.4 SENZORIČNA ANALIZA

Za senzorično analizo smo pripravili pijače iz sirupa z dodatkom β -glukanov. Pripravili smo malinov in bezgov sirup z dodatkom β -glukanov Barley Betafiber proizvajalca Cargill (izolat K), ter enaka sirupa z dodatkom izolata, ki smo ga izolirali sami, izolata I. Kontrolna vzorca sta bili pijači iz sirupa brez dodanih β -glukanov.

Izolat smo v pijačo iz sirupa dodajali v obliki raztopine, ki smo jo morali predhodno pripraviti. Pripravili smo jo z raztapljanjem β -glukanov v vroči vodi, saj v hladni niso topni. Že med samih postopkom priprave raztopine β -glukanov smo opazili razlike med vzorcema. Medtem ko je imel izolat I dobro topnost v vroči vodi, se ni penil ter raztopina ni bila preveč motna, je izolat β -glukanov Barley Betafiber že ob dodatku vroče vode tvoril gel, ki je bil opazen kot usedlina na dnu čaše. Gel smo ob daljšem segrevanju in intenzivnem mešanju uspeli deloma raztopiti. Prav tako se je vzorec med raztapljanjem zelo penil, ter bil bolj moten in v primerjavi z raztopino izolata I bolj sive barve. Te razlike med raztopinama različnih izolatov so dobro vidne na spodnjih slikah.



Slika 13: Primerjava raztopin izolatov β -glukanov v čaši. Desno zgoraj je raztopina izolata Cargill Barley Betafiber (izolat K), levo spodaj raztopina z izolatom I.



Slika 14: Primerjava raztopin izolatov β -glukanov. Desno je raztopina izolata I, levo pa raztopina izolata Cargill Barley Betafiber (izolat K).



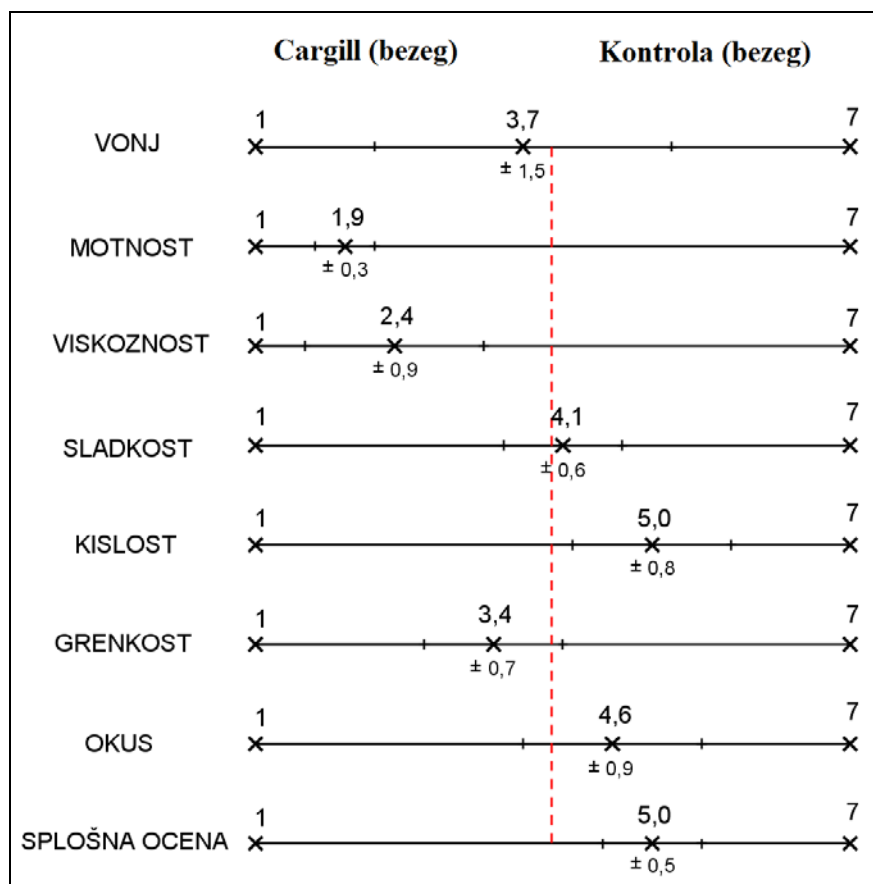
Slika 15: Primerjava raztopin izolatov β -glukanov v steklenici. Levo je raztopina izolata I, desno pa raztopina izolata Cargill Barley Betafiber (izolat K).

Slike od 16 do 21 prikazujejo rezultate senzorične analize, v kateri so preskuševalci med sabo primerjali 6 parov vzorcev. Parametri in način ocenjevanja so navedeni v poglavju Metode, primer ocenjevalnega lista pa se nahaja v poglavju Priloge.

Kot je razvidno tudi iz spodnjih slik, so bile kombinacije vzorcev naslednje:

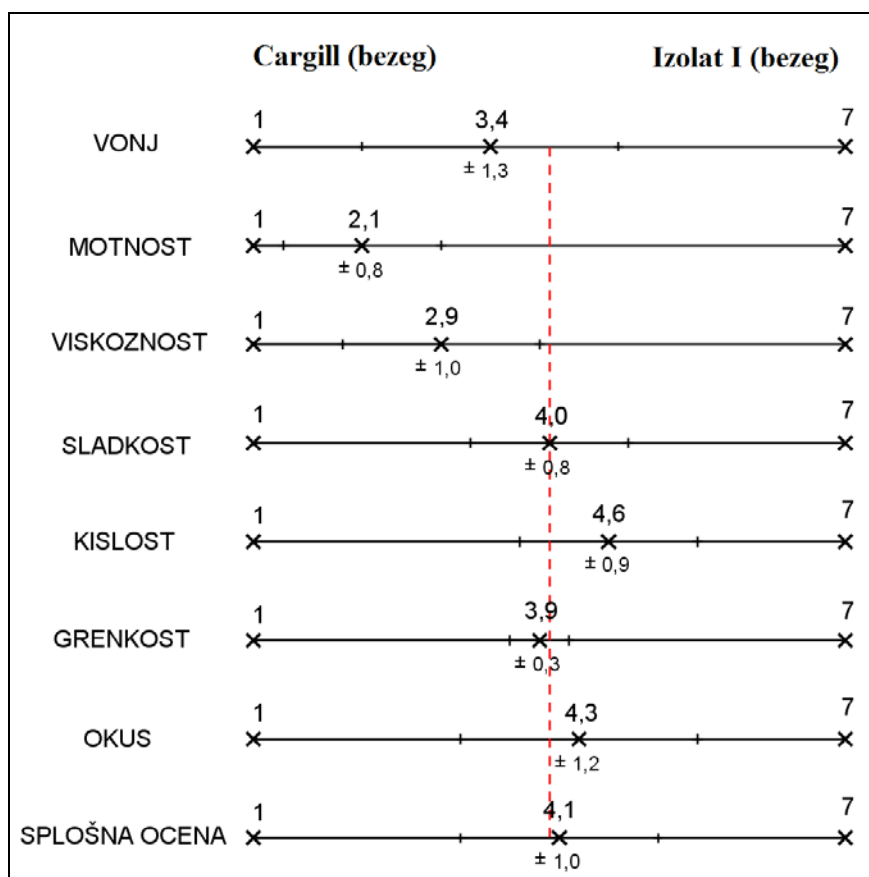
- Komercialni izolat Cargill Barley Betafiber v pijači iz bezgovega sirupa (A1) in kontrolni vzorec pijače iz bezgovega sirupa (B1);
- Izolat Cargill (A2) in izolat I (B2), oba raztopljena v pijači iz bezgovega sirupa;
- Kontrolni vzorec pijače iz bezgovega sirupa (A3) in vzorec izolata I, raztopljen v pijači iz bezgovega sirupa (B3);
- Vzorec izolata Cargill v pijači iz malinovega sirupa (A4) in kontrolni vzorec pijače iz malinovega sirupa (B4);
- Vzorec izolata Cargill (A5) in izolata I (B5), oba raztopljena v pijači iz malinovega sirupa.
- Kontrolni vzorec pijače iz malinovega sirupa (A6) in vzorec izolata I (B6) raztopljen v pijači iz malinovega sirupa.

Pri ocenjevanju prvega para vzorcev so preskuševalci ocenili kontrolni vzorec (B1) na splošno boljšega od komercialnega izolata Cargill Barley Betafiber. Iz rezultatov senzorične analize je razvidno, da je bil vzorec z dodanim izolatom mnogo bolj moten od kontrolnega vzorca. Prav tako je bil tudi bolj viskozen, kar je bilo z vidika senzorike moteče. Prav tako je bil vzorec z dodanim izolatom bolj grenak, medtem ko v sladkosti preskuševalci praktično niso zaznali razlik. Aromo vzorca A1 so opisovali z deskriptorjem »po kuhanem«, čemur je verjetno vzrok postopek priprave izolata, ki vključuje kuhanje moke.



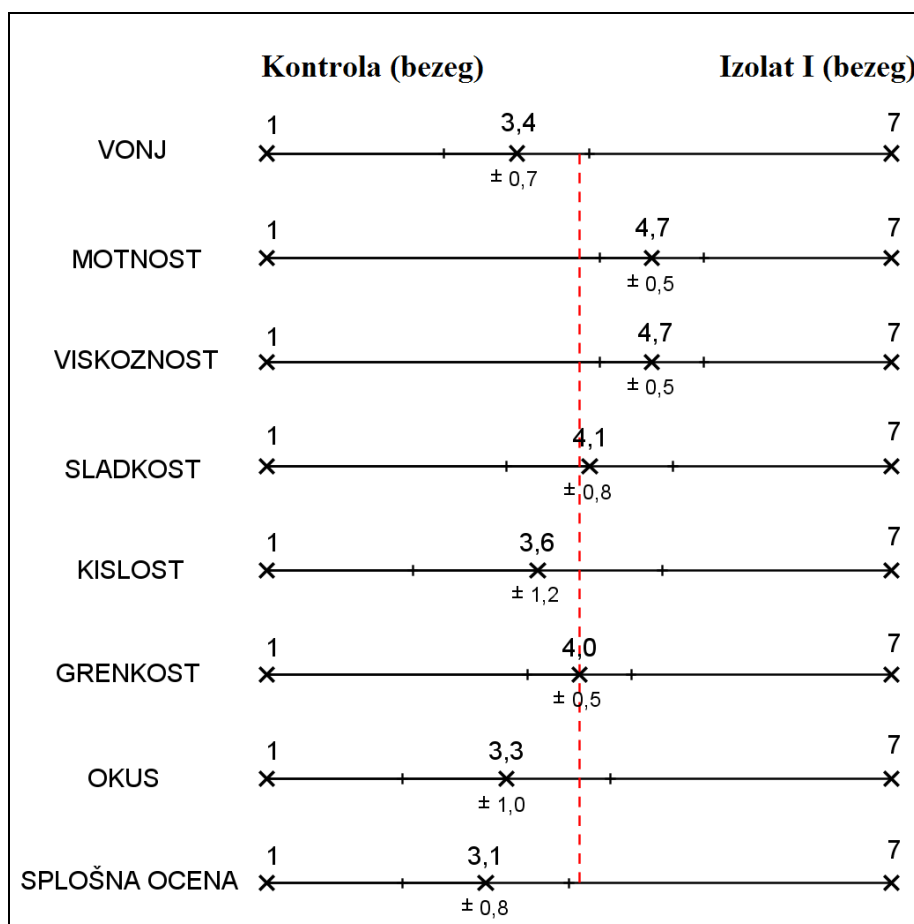
Slika 16: Primerjava vzorca izolata Cargill (izolat K) raztopljenega v pijači iz bezgovega sirupa (A1) in kontrolnega vzorca pijače iz bezgovega sirupa (B1)

Na sliki št. 17 vidimo, da ni možno oceniti kateri izmed izolatov je bil po splošni senzorični oceni boljši, če smo ju raztopili v bezgovem sirupu. Vidimo namreč lahko, da sta grenkost in sladkost pri obeh ocenjeni enako. Kljub ti navidezni enakovrednosti obeh izolatov pa lahko vidimo, da je bil izolat Cargill Barley Betafiber spet ocenjen za bolj motnega in viskoznega v primerjavi z vzorcem pijače z izolatom I. Pri tem paru vzorcev so preskuševalci oba vzorca ocenili kot nekoliko trpka, vzorec izolata I pa tudi kot oljnatega. Za okus so bili mnenja, da je vzorec z izolatom I boljši od izolata Cargill zato, ker ima bolj izražene kisline, ter je zato bolj osvežilen, čeprav po obdelavi rezultatov, ki jih vidimo na lestvici za okus ni možno trditi, da je okus statistični signifikantno boljši.



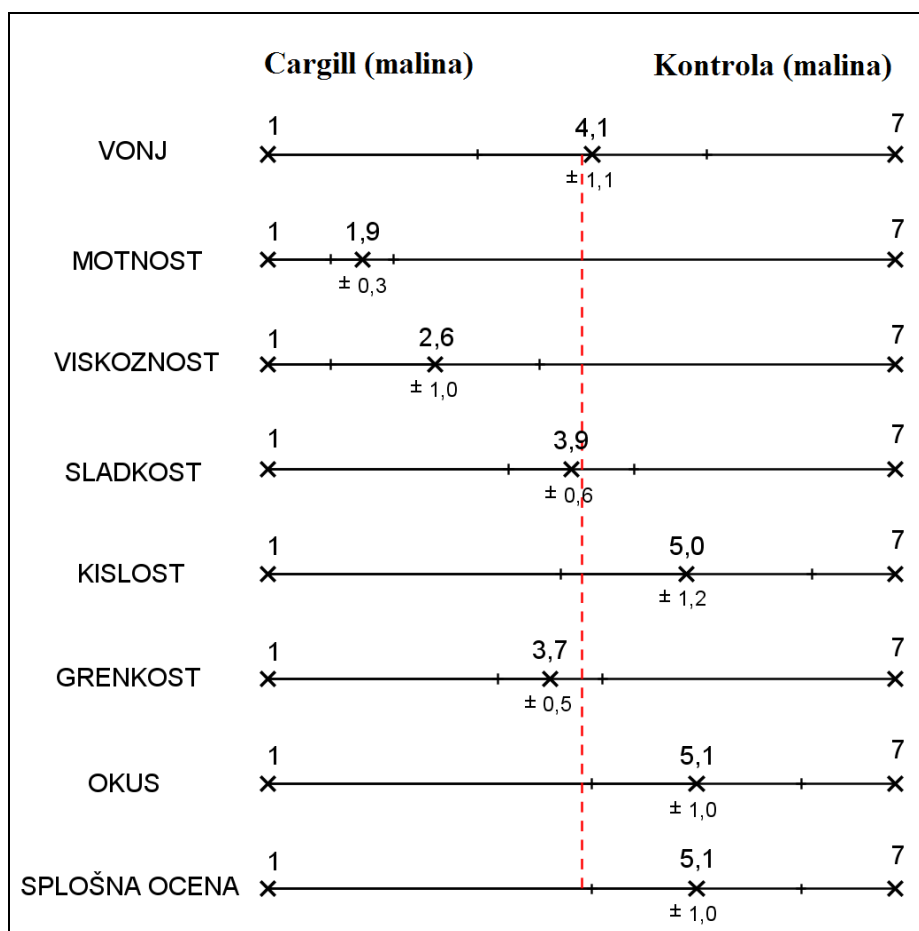
Slika 17: Primerjava vzorca izolata Cargill (A2) in vzorca izolata I (B2), oba raztopljena v pijači iz bezgovega sirupa

Na sliki št. 18 vidimo primerjavo kontrolnega vzorca (A3) z vzorcem, ki je vseboval izolat I (B3) v bezgovem sirupu. Iz analize rezultatov je razvidno, da je vzorec z dodanim izolatom bolj viskozen in moten od kontrolnega vzorca, vendar ni bilo zaznati večjih razlik v sladkosti, kislosti ali grenkosti obeh vzorcev. Dva ocenjevalca nista med vzorcema zaznala nobene razlike, eden izmed preskuševalcev pa je izpostavila, da je razlika le v vonju in sicer, da ima vzorec z dodanim izolatom I slabši vonj. Po splošnem vtisu je bil vzorec z dodanim izolatom ocenjen slabše od kontrolnega vzorca, predvsem zaradi večje motnosti in viskoznosti.



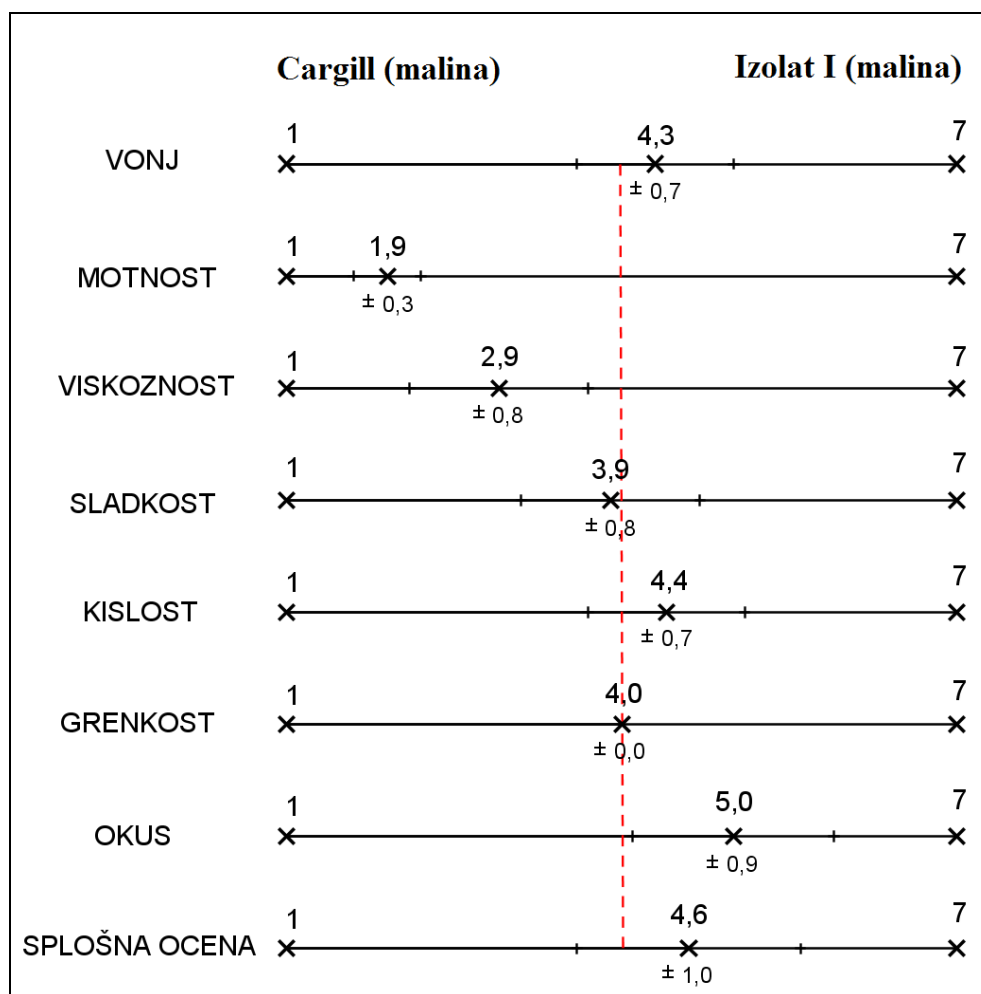
Slika 18: Primerjava kontrolnega vzorca pijače iz bezgovega sirupa (A3) in vzorca izolata I raztopljenega v pijači iz bezgovega sirupa (B3)

Na sliki št. 19 je prikazana primerjava vzorca izolata Cargill (A4) raztopljenega v pijači iz malinovega sirupa in kontrolnega vzorca. Tudi v tem primeru je bil vzorec z dodanim izolatom bolj moten in viskozen od kontrolnega vzorca. V sladkosti in grenkosti ni bilo bistvene razlike, celokupno pa je bil bolje ocenjen kontrolni vzorec. Preskuševalci so vzorec z izolatom Cargill znova ocenili kot oljnatega. Hkrati so ga zaradi prisotne pene in neraztopljenih delcev označili za neprivlačnega.



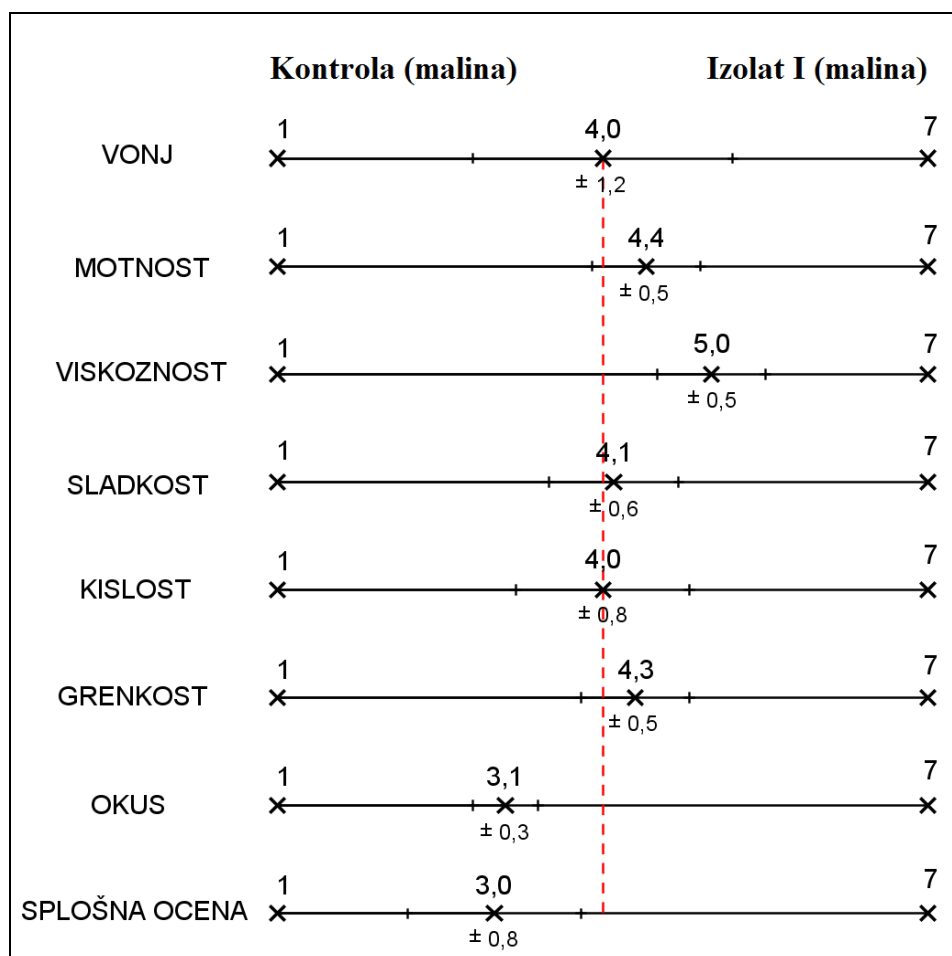
Slika 19: Primerjava vzorca izolata Cargill raztopljenega v pijači iz malinovega sirupa (A4) in kontrolnega vzorca pijače iz malinovega sirupa (B4)

Primerjava vzorca izolata Cargill (A5) in vzorca izolata I (B5), oba raztopljena v pijači iz malinovega sirupa, je predstavljena na sliki št. 20. Vzorec z izolatom K je bil bolj moten in viskozen od vzorca z izolatom I. Pri drugih parametrih ni bilo bistvene razlike med vzorcema, četudi je bil v vseh primerih vzorec, ki je vseboval izolat I, ocenjen bolje. V okusu in celokupnem okusu se je za boljšega izkazal vzorec z izolatom I, čeprav razlike niso statistično značilne.



Slika 20: Primerjava vzorca izolata Cargill (A5) in vzorca izolata I (B5), oba raztopljena v pijači iz malinovega sirupa

Kot zadnji par vzorcev so preskuševalci ocenili kontrolni vzorec (A6) in vzorec z izolatom I (B6), oba pripravljena v pijači iz malinovega sirupa (slika št. 21). Vzorec z dodanim izolatom I je bil malo bolj moten (ni statistično značilno) in bolj viskozen od kontrolnega vzorca. V vonju, sladkosti, kislosti in grenkosti ni bilo večjih razlik, po okusu in celokupnem vtisu pa je bil kontrolni vzorec ocenjen bolje od tistega z dodanim izolatom. Za ta par vzorcev so preskuševalci ocenili, da je med njima minimalna razlika in sicer predvsem v tem, da ima vzorec z dodanim izolatom pookus.



Slika 21: Primerjava kontrolnega vzorca pijače iz malinovega sirupa (A6) in vzorca izolata I raztopljenega v pijači iz malinovega sirupa (B6)

Če povzamemo vse rezultate lahko rečemo, da noben izmed izolatov ne dosega senzorične kakovosti sirupov brez dodatkov, predvsem zaradi povečane viskoznosti, ki je neznačilna za običajne pijače. Prav tako je moteča tudi motnost, predvsem v primeru izolata Cargill, kjer so preskuševalci izpostavili prisotnost neraztopljenih delcev v obliki gela. Na osnovi rezultatov senzorične analize lahko trdimo, da je izolat I primernejši kot dodatek pijačam v primerjavi z izolatom Cargill, predvsem zato, ker ni tako moten, hkrati pa je tudi s samega tehnološkega vidika priročnejši, saj za razliko od izolata Cargill raztapljanje ne predstavlja problema. Kot smo videli že v enem izmed prejšnjih eksperimentov, kjer smo analizirali obnašanje β -glukanov v različnih realnih matriksih živil, β -glukani v izolat I ostanejo stabilni v raztopini tudi po nekajdnevem shranjevanju in centrifugiranju. Tudi če primerjamo oba izolata s kontrolnim vzorcem, je bil po celokupni oceni izolat I bližje kontrolnemu vzorcu, kot je bil izolat Cargill. Razlika je bila predvsem v dejstvu, da najbolj moteči lastnosti pijač z dodatkom β -glukanov (viskoznost in motnost), nista bili tako močno izraženi kot pri izolat Cargill.

Kot že omenjeno v pregledu objav, so tudi Ahmadin in sod. (2009) v svojem eksperimentu s senzorično analizo ugotovili, da dodatki β -glukanov do 0,8 % nimajo bistvenega vpliva na aromo, barvo in sprejemljivost pijače, ter so po senzoričnih lastnostih podobne kontrolni pijači brez dodatka β -glukanov. Pijače, ki smo jih pripravili z dodatkom izolatov so vsebovale 5 g izolatov v 702 g končne raztopine soka, ki so ga preizkuševalci senzorično ocenjevali. Vsebnost β -glukanov je tako primerljiva z vsebnostjo v omenjeni študiji. Sklenemo lahko, da ima izolat I potencial kot dodatek k pijačam, zlasti če bi bila taka funkcionalna pijača predstavljena potrošnikom ustrezen način. Pojasniti bi bilo potrebno, da polisaharidi v vodnem mediju tvorijo viskozne raztopine in da je v primeru β -glukanov to ena lastnosti, ki pripomore k ugodnemu učinku na zdravje in tako povečana viskoznost izdelka ne bi vzbujala nelagodja zaradi zaznavanja pijačam tuje lastnosti.

5 SKLEPI

Namen naloge bil razvoj metode izolacije β -glukanov iz ječmenove moke z uporabo proteolitičnih in glikolitičnih encimov ter obarjanjem β -glukanov z vodnimi raztopinami etanola.

Optimizacija ekstrakcije:

- Za ekstrakcijo β -glukanov iz Valechol[®] moke smo uporabili encime alkalazo, α -amilazo in amikoglukozidazo.
- Postopka izolacije za vzorca A (alkalaza) in C (alkalaza + amiloglukozidaza) sta bila učinkovita, saj sta pridobljena izolata vsebovala relativno visoko vsebnost β -glukanov in bila relativno čista. Po enakem postopku kot izolat C, je bil predhodno izoliran tudi izolat I, smo s tem eksperimentom znova potrdili učinkovitost postopka izolacije.
- Postopka izolacije za vzorca B (alkalaza + α -amilaza) in D (alkalaza + α -amilaza + amiloglukozidaza) sta se izkazala za neuporabna, saj je bila vsebnost β -glukanov v pripravljenih izolatih zelo majhna.
- V dodatnem eksperimentu, kjer smo ekstrahirali izolate z alkalazo in z oz. brez regulacije pH, smo ugotovili, da je po takem postopku vsebnost β -glukanov v izolatu relativno visoka. Vzorci pri katerih je hidroliza trajala 1 h sicer vsebujejo nekoliko več škroba od ostalih izolatov, medtem ko vzorci, pri katerih je hidroliza trajala 3 h vsebujejo približno enako škroba kot ostali izolati (npr. izolat I ga vsebuje 1,7 %, izolat z uporabo razredčene alkalaze (rA) po 3 urah pa 1,9 %).
- Sklenemo lahko, da je postopek izolacije z alkalazo in amiloglukozidazo optimalen, saj dobimo izolat, ki vsebuje velik delež β -glukanov in je relativno čist. Postopek izolacije samo z alkalazo bi lahko bil uporaben za industrijske namene, kjer bi izbrali kompromis med čistostjo izolata in cenovno ugodnostjo in časovno učinkovitostjo izolacijskega postopka.

Karakterizacija vzorcev:

- V vzorcih izolata in Valechol[®] moke smo določili vsebnost β -glukanov, škroba, fenolnih spojin, proteinov, mineralov, suhe snovi in preko viskoznosti ocenili molsko maso. Izolata I in K smo še senzorično ocenili kot dodatek k pijačam iz sirupa.
- Vsebnost β -glukanov in škroba smo določali z »Mixed Linkage β -glucan Assay« kitom proizvajalca Megazyme.
- Vsebnost β -glukanov je bila najvišja v vzorcih C (79 %) in I (69 %), najnižja pa v vzorcih B in D, ki sta bila popolnoma hidrolizirana in sta vsebovala le 0,4 % β -glukanov. Prav tako je manj β -glukanov vseboval komercialni izolat K (56 %).
- Vsebnost škroba je bila najnižja v izolatih C (0,2 %), A (1,1 %) in I (1,7 %), najvišja pa v izolatih B (7,2 %), K (5,8 %) in D (4,2 %).
- Vsebnost fenolnih snovi smo določali po Folin Ciocalteu metodi. V vseh izolatih je bila zelo nizka, v nobenem primeru ni presegala 0,15 %.

- Vsebnost proteinov smo določali po Bradfordovi metodi. Tudi vsebnost proteinov je bila relativno nizka v vseh izolatih. Najnižno vsebnost proteinov je bila določena v izolatu I (0,1 %), najvišja pa v izolatu K (0,34 %).
- Predvidevali smo, da bo izolat dobro topen v vodi in v raztopinah s pH v območju med 3 in 4, kar smo potrdili v eksperimentu, kjer smo analizirali topnost in posedanje β -glukanov v realnih matriksih. Izolat I se je izkazal za stabilnega v vodnih raztopinah, pijačah (Deit, Coca-cola Zero) in modelni raztopini citratnega pufra s pH 3,5, saj se ni posedel po dvodnevem shranjevanju v hladilniku in centrifugiranju.
- Z ICP-MS analizo smo analizirali vsebnost mineralov v vzorcih izolata I in K, ter Valechol[®] moki. Največ mineralov je vseboval izolat K (>5990,26 $\mu\text{g/g}$), sledila je Valechol[®] moka (>4159,41 $\mu\text{g/g}$), najmanj mineralov pa je vseboval izolat I (2180,68 $\mu\text{g/g}$). Izolat K je v visokih koncentracijah vseboval tudi nekatere elemente (Mg, Ca, Fe, Ni, Zn, Mn, Al), ki so bile v izolatu I prisotne v nižjih koncentracijah.
- Z merjenjem viskoznosti smo posredno ocenili tudi molsko maso izolatov. Kot standarda za določanje molske mase preko viskoznosti smo uporabili ječmenov β -glukanski standard z M_w 229×10^3 g/mol in standard ovsenih β -glukanov z M_w $70,6 \times 10^3$ g/mol. Oba standarda sta bila del kita » β -glucan M_w Standard« proizvajalca Megazyme. Med analiziranimi izolati je imel največjo viskoznost ječmenov β -glukanski standard, sledili pa so mu vzorci izolatov K (> 100×10^3 g/mol), A ($\approx 70 \times 10^3 < 100 \times 10^3$ g/mol) standard ovsenih β -glukanov in I ($\approx 70 \times 10^3$ g/mol). Najnižno viskoznost je imel izolat C.
- Rezultati senzorične analize pijač iz sirupa z raztopljenimi β -glukani (izolat I in K) niso bili statistično značilni, vendar smo na podlagi pripisanih komentarjev sklenili, da je izolat I bolj primeren kot dodatek pijačam predvsem zaradi lažjega raztapljanja ter manjše viskoznosti in motnosti.

6 POVZETEK

Glavni namen te magistrske naloge je bil optimizirati metodo izolacije β -glukanov tako, da bi postopek imel čim večji izkoristek in da bi z njim lahko pridobili kar najbolj čist izolat. Našo osnovno surovino je predstavljala ječmenova moka Valechol[®], ki je vsebovala ≈ 15 % β -glukanov, iz katere smo izolirali β -glukane z različnimi encimi in pod različnimi pogoji hidrolize. S tem smo različne β -glukanske izolate, ki smo jih celostno okarakterizirali. Določili smo jim vsebnost β -glukanov in škroba, z metodo Bradford (1975) smo določili proteini in z metodo Singleton in Rossi (1965) vsebnost fenolnih spojin. Poleg izolatov, ki smo jih pripravili sami, smo imeli še 2 β -glukanska standarda proizvajalca Megazyme, s pomočjo katerih smo lahko ocenili viskoznost nekaterih naših izolatov. Imeli smo tudi komercialni izolat β -glukanov, Cargill Barley Betafiber, ki nam je služil za primerjavo z našim izolatom I. Izolata K (Cargill Barley Betafiber) in izolat I smo uporabili tudi kot dodatek k pijačam in ju senzorično ocenili. Ob medsebojnih primerjavah, se je v vseh vidikih izolat I izkazal za boljšega v primerjavi s komercialnim izolatom K.

Na začetku naloge smo postavili tri hipoteze in sicer:

- da bomo z uporabo encimov za hidrolizo škroba in proteinov ter nadaljnjim obarjanjem iz ječmenove moke pridobili izolat, ki bo bogat z β -glukani,
- da bo pridobljen izolat dobro topen v vodi in v raztopinah s pH v območju med 3 in 4,
- da bo pridobljen izolat vseboval polimerne in nehidrolizirane β -glukane.

Prvo hipotezo smo potrdili z eksperimentom ekstrakcije β -glukanov iz začetnega materiala s pomočjo različnih encimov (alkalaza, α -amilaza, amiloglukozidaza). Uporabili smo različne kombinacije encimov, za optimalno pa se je izkazala kombinacija alkalaze in amiloglukozidaze, saj smo s tem izolirali izolat C, ki je vseboval 79 % β -glukanov. Po enakem postopku je bil predhodno izoliran tudi izolat I, ki mu je bilo določena 69 % vsebnost β -glukanov. Prvi možen razlog za tako razliko je obarjanje β -glukanov z etanolom. V primeru izolata C smo jih obarjali z ledenim etanolom, medtem je bil za izolat I uporabljen etanol sobne temperature in so bili tako β -glukani bolj topni. Drugi razlog pa je v visoki higroskopičnosti materiala in tako zaradi vezane vode pri enaki masi določimo manj β -glukanov. Izolacija z alkalazo in amiloglukozidazo je zadostila tudi kriteriju glede čistosti izolata, saj je vseboval le malo drugih komponent. Vsebnost škroba v izolatu I je bila 1,7 %, fenolnih spojin 0,14 %, proteinov 0,10 % in vsebnost mineralov 0,22 %. V izolatu I nismo določili 13,74 % snovi. Sem lahko spadajo še drugi polisaharidi, kot so arabinoksilani in celuloza, ki jih nismo mogli določiti.

Drugo hipotezo smo potrdili z eksperimentom topnosti in stabilnosti β -glukanov v vodnih raztopinah in realnih matriksih. Realne matrikse so predstavljale pijače (Deit, Coca-cola Zero, belo vino) in mlečni izdelki (jogurt). Kot modelno raztopino smo pripravili še citratni pufer s pH 3,5. β -glukani raztopljeni v vodi, živilih in modelni raztopini so ostali stabilni v

raztopini in se niso posedli. Da je β -glukanski izolat I dobro topen in stabilen v vodnih raztopinah s pH območjem med 3 in 4 smo videli tudi pri pripravi vzorcev za senzorično analizo, saj nismo imeli noben težav pri raztapljanju, za razliko od komercialnega izolata, ki je bil relativno slabo topen in so še po končanem raztapljanju v raztopini ostali delci v obliki gela, ki so bili zelo moteči za samo senzorično pijačo pripravljene z dodatkom β -glukanov.

Z analizo viskoznosti, preko katere smo vzorcem izolatov ocenili molsko maso, smo potrdili tretjo hipotezo in sicer, da vzorec izolata I vsebuje polimerne in nehidrolizirane molekule β -glukanov. Viskoznost vodnih raztopin β -glukanov z različnimi koncentracijami smo izmerili s kapilarnim viskozimetrom, s katerim merimo čas pretoka raztopine s polimernim topljencem skozi kapilaro, v primerjavi s časom pretoka čistega topila. Da smo lahko ocenili molsko maso različnih izolatov, smo izmerili viskoznosti tudi β -glukanskim standardom z znano molsko maso. To sta bila standard ječmenovih β -glukanov z molsko maso 229×10^3 g/mol in standard ovsenih β -glukanov z molsko maso $70,6 \times 10^3$ g/mol. Izolatu I smo ocenili molsko maso na $\approx 70 \times 10^3$ g/mol, kar je zelo pozitivno tako z vidika funkcionalnosti, kot tudi z vidika nadaljnje uporabe v pijačah. β -glukanom s tako molsko maso namreč lahko pripišemo potencialni funkcionalni učinek, hkrati pa nimajo tako visoke viskoznosti, da bi bila onemogočena njihova uporaba kot dodatek v pijačo.

7 VIRI

- AbuMweiss S.S., Jew S., Ames N.P. 2010. β -glucan from barley and its lipid-lowering capacity: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64: 1472-1480
- Ahmad D., Anjum F.M., Zahoor T. 2012. β -glucan: A valuable functional ingredient in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 3: 201-212
- Ahmad D., Anjum F.M., Zahoor T., Nawaz H. 2009. Extraction and utilization of barley beta-glucan for the preparation of functional beverage. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11, 6) 737-740
- Anderson M.A., Stone B.A. 1975. A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases. *FEBS Letters*, 52, 2: 202-207
- Andersson A.A.M., Ärmo E., Grangeon E. 2004. Molecular weight and structure units of (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- β -glucans in dough and bread made from hull-less barley milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 40: 195-204
- Aravind N., Sissons M., Egan N. 2012. Effect of beta-glucan on technological, sensory and structural properties of durum wheat pasta. *Cereal Chemistry*, 89, 2: 84-93
- Beck E.J., Tosh S.M., Batterham M.J., Tapsell L.C. 2009. Oat beta-glucan increases postprandial cholecystokinin levels, decreases insulin response and extends subjective satiety in overweight subjects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53,10: 1343–1351
- Benito-Román O., Alonso E., Lucas S. 2011. Optimisation of the β -glucan extraction conditions from different waxy barley cultivars. *Journal of Cereal Science*, 53: 271-276
- Benito-Román O., Alonso E., Cocero M.J. 2013a. Ultrasound-assisted extraction of β -glucans from barley. *LWT – Food Science and Technology*, 50: 57-63
- Benito-Román O., Alonso E., Cocero M.J. 2013b. Pressurized hot water extraction of β -glucans from waxy barley. *Journal of Supercritical Fluids*, 73: 120-125
- Bhatty R.S. 1995. Laboratory and pilot plant extraction and purification of β -glucans from hull-less barley and oat brans. *Journal of Cereal Science*, 22: 163-170

- Böhm N., Kulicke W.M. 1999a. Rheological studies of barley (1→3), (1→4)-β-glucan in concentrated solution: investigation of the viscoelastic flow behaviour in the sol-state. *Carbohydrate Research*, 315: 293-301
- Böhm N., Kulicke W.M. 1999b. Rheological studies of barley (1→3), (1→4)-β-glucan in concentrated solution: mechanistic and kinetic investigation of the gel formation. *Carbohydrate Research*, 315: 302-311
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 1-2: 248-254
- Brennan C. S., Cleary L. J. 2005. The potential use of cereal (1→3, 1→4)-β-D-glucans as functional food ingredients. *Journal of Cereal Science*, 42: 1-13
- Buliga G.S., Brant D.A., Fincher G.B. 1986. The sequence statistics and solution conformation of barley (1→3, 1→4)-β-D-glucan. *Carbohydrate Research*, 157: 139-156
- Chaari F., Bhiri F., Blibech M. 2012a. Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 47: 509-516
- Chaari F., Kamoun A., Bhiri F. 2012b. Statistical optimization for the production of lichenase by a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF in solid state fermentation using pea pomace as a novel solid support. *Industrial Crops and Products*, 40: 192-198
- Chen H., Li X.L., Ljungdahl L. 1997. Sequencing of a 1,3-1,4-β-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: Properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. *Journal of Bacteriology*, 179, 19: 6028-6034
- Chin Chye T., Swee Ngim T., Hong Yong J.W. 2010 Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217: 2484-2494
- Cloetens L., Ulmius M., Johansson-Persson A. 2012. Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome. *Nutrition Reviews*, 70: 444-458
- Daou C., Zhang H. 2012. Oat beta-glucan: Its role in health promotion and prevention of diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 355-365

- Dexter J.E., Izydorczyk M.S., Marchylo B.A., Schlichting L.M. 2004. Texture and color of pasta containing mill fractions from hull-less barley genotypes with variable content of amylose and fibre. V: Using cereal science and technology for the benefit of consumers. 12th ICC Cereal and Bread Congress. Proceedings of workshop: May 23-26, 2004, Harrogate, UK. Cuvain S.P., Salmon S.S., Young L.S (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing: 488-493
- Dikeman C.L., Murphy M.R., Fahey G.C. 2006. Dietary fibers affect viscosity of solutions and simulated human gastric and small intestinal digesta. *Journal of Nutrition*, 136: 913-919
- Elgharbi F., Hmida-Sayari A., Sahnoun M. 2013. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lichenase from *Aspergillus niger* US368. *Carbohydrate Polymers*, 98: 967-975
- FDA. 1997. FDA final rule for federal labeling: health claims; oats and coronary heart disease. Silver Spring, U.S Food and Drug Administration: 97 str.
<http://www.fda.gov/> (Spetember, 2014)
- Golob T., Bertonecelj J., Doberšek U., Jamnik M. 2006. Senzorična analiza živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- Granfeldt Y., Nyberg L., Björck I. 2008. Muesli with 4 g oat β -glucans lowers glucose and insuline responses after a bread meal in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62: 600-607
- Gruppen H., Hamer R.J., Voragen A.G.J. 1992. Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 1. Extraction of polymers with alkali. *Journal of Cereal Science* 16: 41-51
- Havrlentová M., Petrušáková Z., Burgárová A. 2011. Cereal β -glucans and their significance for the preparation of functional foods – a review. *Czech Journal of Food Science*, 29, 1: 1-14
- Henriksson K., Teleman A., Suortti T. 1995. Hydrolysis of barley (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan by a cellobiohydrolase II preparation from *Trichoderma reesei*. *Carbohydrate Polymers*, 26: 109-119
- Irakli M., Biliaderis C.G., Izydorczyk M.S., Papadoyannis I.N. 2004. Isolation, structural features and rheological properties of water-extractable β -glucans from different

- Greek barley cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1170-1178
- Izydorczyk M.S., Macri L.J., MacGregor A.W. 1998a. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides – I. Water-extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, 35: 249-258
- Izydorczyk M.S., Macri L.J., MacGregor A.W. 1998b. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides – II. Alkali-extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, 35: 259-269
- Izydorczyk M.S., Dexter J.E. 2008. Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products – a review. *Food Research International*, 41: 850-868
- Je-Hoon R., Suyoung L., SangGuan Y. 2012. Effects of barley and oat β -glucan structures on their rheological and thermal characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 89: 1238-1243
- Johansson L., Virkki L., Antilla H. 2006. Hydrolysis of β -glucan. *Food Chemistry*, 97: 71-79
- Johansson L. 2006. Structural analyses of (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan of oats and barley. Academic dissertation. Helsinki, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology: 85 str.
- Johansson L., Tuomainen P., Anttila H. 2007. Effect of processing on the extractability of oat β -glucan. *Food Chemistry*, 105: 1439-1445
- Johansson L., Karesoja M., Ekholm P., Virkki L. 2008. Comparison of the solution properties of (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucans extracted from oats and barley. *LWT – Food Science and Technology*, 41: 180-184
- Kalinga D., Mishra V.K. 2009. Rheological and physical properties of low fat cakes produced by addition of cereal β -glucan concentrates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33: 384-400
- Keenan J.M., Goulson M., Shamliyan T. 2007. The effects of concentrated barley β -glucan on blood lipids in a population of hypercholesterolaemic men and women. *British Journal of Nutrition*, 97: 1162-1168

- Konuklar G., Inglett G.E., Warner K., Carriere C.J. 2004. Use of a β -glucan hydrocolloidal suspension in the manufacture of low-fat Cheddar cheeses: textural properties by instrumental methods and sensory panels. *Food Hydrocolloids*, 18: 535-545
- Krisch J., Bencsik O., Papp T. 2012. Characterisation of a β -glucosidase with transgalactosylation capacity from the zygomycete *Rhizomucor miehei*. *Biosource Technology*, 114: 555-560
- Lambo A.M., Öste R., Nyman M. 2005. Dietary fibre in fermented oat and barley β -glucan rich concentrates. *Food Chemistry*, 89: 283-293
- Lazaridou A., Biliaderis C.G., Izydorczyk M.S. 2003. Molecular size effects on rheological properties of oat β -glucans in solution and gels. *Food Hydrocolloids*, 17: 693-712
- Lazaridou A., Biliaderis C.G., Micha-Screttas M., Steele B.R. 2004. A comparative study on structure-function relations of mixed-linkage (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) linear β -D-glucans. *Food Hydrocolloids*, 18: 837-855
- Lazaridou A., Biliaderis C.G. 2004. Cryogelation of cereal β -glucans: structure and molecular size effects. *Food Hydrocolloids*, 18: 933-947
- Lazaridou A., Biliaderis C.G. 2007. Molecular aspects of β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science*, 46, 2: 101-118
- Lebet V., Arrigoni E., Amadó R. 1997. Neutral-sugar determination by HPAEC-PAD to characterise polysaccharide degradation by colonic bacteria. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 205: 257-261
- Manthey F.A., Hareland G.A., Huseby D.J. 1999. Soluble and insoluble dietary fiber content and composition in oat. *Cereal Chemistry* 76: 417-420
- Marciani L., Gowland P.A., Spiller R.C. 2001. Effect of meal viscosity and nutrients on satiety, intragastric dilution, and emptying assessed by MRI. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280: 1227-1233
- McCleary B.V., Codd R. 1991. Measurement of (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55: 303-312

- Olson A.C., Gray G.M., Mei-Chen C. 1988. Monosaccharides produced by acid hydrolysis of selected foods, dietary fibers, and faecal residues from white and whole wheat bread consumed by humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 300-304
- Östman E., Rossi E., Larsson H. 2006. Glucose and insulin responses in healthy men to barley bread with different levels of (1→3, 1→4)-β-glucans; predictions using fluidity measurements of *in vitro* enzyme digest. *Journal of Cereal Science*, 43: 230-235
- Picó Y. 2013. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 43: 1-16
- Piñero M.P., Parra K., Huerta-Leidenz N. 2008. Effect of oat's soluble fiber (β-glucan) as a fat replacer on physical, chemical, microbiological and sensory properties of low-fat beef patties. *Meat Science*, 80: 675-680
- Pravst I. 2012. Functional foods in Europe: A focus on health claims. V: Scientific, health and social aspects of the food industry. Valdez B. (ed.). Rijeka, InTech: 183-184
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302
- Raspor P., Rogelj I. 2001. Funkcionalna hrana – definicije. V: Funkcionalna hrana. Zbornik 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8.-9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 25-36
- Robertson J.A., Majsak-Newman G., Ring S.G. Selvendran R.R. 1997. Solubilization of mixed linkage (1→3), (1→4)-β-D-glucans from barley: effects of cooking and digestion. *Journal of Cereal Science*, 25: 275-283
- Rogalinski T., Ingram T., Brunner G. 2008 Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures, *Journal of Supercritical Fluids*, 47: 54–63
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 309-320
- Russo P. 2007. Intrinsic viscosity. Louisiana, Louisiana State University: 10 str. macro.lsu.edu/howto/IntrinsicVisc.doc (September, 2014)

- Saastamoinen M., Hietaniemi V., Pihlava J.M. 2004. β -glucan contents of groats of different oat cultivars in official variety, in organic cultivation, and in nitrogen fertilization trials in Finland. *Agricultural and Food Science*, 13: 68-79
- Salobir K. 2001. Prehransko fiziološka funkcionalnost maščob. V: Funkcionalna hrana. Zbornik 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8.-9. november 2001. Žlender B., Gašperlin. L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 121-135
- Sibakov J., Myllymäki O., Suortti T. 2013. Comparison of acid and enzymatic hydrolyses of oat bran β -glucan at low water content. *Food Research International*, 52: 99-108
- Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 3: 144-158
- Skendi A., Biliaderis C.G., Lazaridou A., Izydorczyk M.S. 2003. Structure and rheological properties of water soluble β -glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*. *Journal of Cereal Science*, 38: 15-31
- Skendi A., Biliaderis C.G., Papageorgiou M., Izydorczyk M.S. 2010. Effects of two barley β -glucan isolates on wheat flour dough and bread properties. *Food Chemistry*, 119: 1159-1167
- Storsley J.M., Izydorczyk M.S., You S. 2003. Structure and physicochemical properties of β -glucans and arabinoxylans isolated from hull-less barley. *Food Hydrocolloids*, 17: 831-844
- Suortti T. 1993. Size-exclusion chromatographic determination of β -glucan with post-column reaction detection. *Journal of Chromatography*, 632: 105-110
- Temelli F., Bansema C., Stobbe K. 2004. Development of an orange-flavoured barley beta-glucan beverage. *Cereal Chemistry*, 81, 4: 499-503
- Tiwari U., Cummins E. 2011. Meta-analysis of the effect of β -glucan intake on blood cholesterol and glucose levels. *Nutrition*, 27: 1008-1016
- Tiwari P., Misra B.N., Sangwan N.S. 2013. β -glucosidases from fungus *Trichoderma*: An efficient cellulase machinery in biotechnological applications. *BioMed Research International*, 2013: ID203735 doi: 10.1155/2013/203735: 10 str.

- Tosh S.M., Wood P.J., Wang Q. 2004. Structural characteristics and rheological properties of partially hydrolysed oat β -glucan: the effects of molecular weight and hydrolysis method. *Carbohydrate Polymers*, 55: 425-436
- Tosh S.M., Wood P.J., Wang Q. 2003. Gelation characteristics of acid hydrolysed oat beta-glucan solutions solubilized at a range of temperatures. *Food Hydrocolloids*, 17: 523-527
- Uredba Komisije (EU) št. 432/2012 z dne 16. maja 2012
- Uredba Komisije (EU) št. 1048/2012 z dne 8. novembra 2012
- Vaikousi H., Biliaderis C.G., Izydorczyk M.S. 2004. Solution flow behavior and gelling properties of water-soluble barley (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- β -glucans varying in molecular size. *Journal of Cereal Science*, 39: 119-137
- Volikakis P., Biliaderis C.G., Vamvakas C. 2004. Effects of a commercial oat β -glucan concentrate on the chemical, physico-chemical and sensory attributes of a low fat white-brined cheese product. *Food Research International*, 37: 83-94
- Westerlund E., Andersson R., Åman P. 1993. Isolation and chemical characterization of water-soluble mixed-linked β -glucans and arabinoxylans in oat milling fractions. *Carbohydrate Polymers*, 20: 115-123
- Wood P.J., Weisz J., Blackwell B.A. 1991. Molecular characterization of cereal β -glucans. Structural analysis of oat β -D-glucan and rapid structural evaluation of β -D-glucans from different sources by high performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chemistry*, 68: 31-39
- Wood P.J. 2002. Relationships between solution properties of cereal β -glucans and physiological effects – a review. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 313-320

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorju prof. dr. Blažu Cigiću. Hvala za nesebično, strokovno pomoč, ves čas, ki ste mi ga namenili, potrpežljivost in moralno podporo, kadar je bilo težko in se je napredek ustavil.

Doc. dr. Igorju Pravstu hvala za somentorstvo in hiter pregled naloge. Hvala tudi doc. dr. Tomažu Požrlu za hitro recenzijo naloge in Lini Burkan Makivić za hiter pregled. Vsem res hvala za prilagodljivost.

Zahvaljujem se tudi držbi Valens Int. d.o.o. za posredovane vzorce ječmenove moke, β -glukanov in materialov za laboratorijsko delo.

Zahvala gre tudi Tjaši Prevci in doc. dr. Polonci Kralj za opravljene ICP-MS analize na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, ter Kemijskem inštitutu.

Hvala mami in očetu, ker sta mi omogočila brezskrben študij in me bodrila. Hvala sošolcem, ki ste naredili študijska leta res zabavna. Peter, hvala za ljubezen, motivacijo, spodbudo ter polnjenje omare s piškoti in drugimi kriznimi pripomočki.

PRILOGE

Priloga A: Časi pretoka vodnih raztopin izolatov β -glukanov skozi kapilaro pri merjenju viskoznosti

Priloga A 1: Časi pretoka za izolat I

γ [g/dL]	t [s]	γ SS [g/dL]	η specifična	η specifična/ γ SS
0,02	292,97	0,017	0,030677221	1,804542397
0,04	301,5	0,034	0,060668426	1,784365461
0,07	309,57	0,0595	0,089076517	1,497084322
0,1	322,77	0,085	0,135505717	1,594184904
0,2	363,56	0,17	0,279021988	1,64130581

Priloga A 2: Časi pretoka za izolat A

γ [g/dL]	t [s]	γ SS [g/dL]	η specifična	η specifična/ γ SS
0,025	298,71	0,02125	0,046281378	2,177947186
0,05	311,07	0,0425	0,089573847	2,107619931
0,1	338,67	0,085	0,186243433	2,191099207

Priloga A 3: Časi pretoka za izolat C

γ [g/dL]	t[s]	γ SS [g/dL]	η specifična	η specifična/ γ SS
0,025	288,33	0,02125	0,00992411	0,467016929
0,05	294,87	0,0425	0,03283129	0,772500944
0,1	304,16	0,085	0,065359019	0,768929638

Priloga A 4: Časi pretoka za standard ječmenovega izolata

γ [g/dL]	t [s]	γ SS [g/dL]	η specifična	η specifična/ γ SS
0,015	301,21	0,01275	0,051870649	4,068286221
0,03	316,53	0,0255	0,105382628	4,13265206
0,06	347,3	0,051	0,212848928	4,17350839

Priloga A 5: Časi pretoka za standard ovsenega izolata

γ [g/dL]	t [s]	γ SS [g/dL]	η specifična	η specifična/ γ SS
0,015	291,6	0,01275	0,021795501	1,709451038
0,03	298,62	0,0255	0,046405962	1,819841633
0,06	310,86	0,051	0,089272782	1,750446715

Priloga A 6: Časi pretoka za izolat K

t [s]	γ [g/dL]	γ SS [g/dL]	η specifična	η specifična/ γ SS
303,37	0,025	0,02125	0,058956309	2,774414554
323,4	0,05	0,0425	0,128849846	3,031761078
364,58	0,1	0,085	0,272616208	3,207249506

Priloga B: Meritve pri določanju vsebnosti β -glukanov v različnih izolatih

Vzorec	W [%]
Izolat I	68,2
	71,0
	65,6
	65,4
	71,1
	70,3
	67,3
	68,3
	71,8
	73,3
Izolat A	60,6
	64,1
	68,2
	64,3
Izolat B	0,4
Izolat C	84,1
	74,3
Izolat D	0,43
Standard oves	72
Standard ječmen	71
Vzorec K	56

Priloga C: Meritve pri določanju vsebnosti škroba v različnih izolati β -glukanov

Vzorec	W [%]
Izolat I	1,49
	1,67
	1,57
	1,33
	1,49
Izolat A	1,03
	1,09
	1,05
Izolat B	7,22
Izolat C	0,12
	0,19
	0,41
	0,43
Izolat D	4,23
Standard oves	0,19
Standard ječmen	0,31
Izolat K	5,76

Priloga D: Vprašalnik za senzorično ocenjevanje pijač pripravljenih z dodatkom β -glukanov

Primerjaj vzorca A in B.

- Če **ni razlike**, obkroži **0**
- Če je **majhna razlika**, obkroži **+**
- Če je **srednje velika razlika**, obkroži **++**
- Če je **velika razlika**, obkroži **+++**

Vonj

A je po vonju boljši od B			Ne zaznam razlike	B je po vonju boljši od A		
+++	++	+	0	+	++	+++

Motnost

A je bolj moten od B			Ne zaznam razlike	B je bolj moten od A		
+++	++	+	0	+	++	+++

Viskoznost

A je bolj viskozen od B			Ne zaznam razlike	B je bolj viskozen od A		
+++	++	+	0	+	++	+++

Sladkost

A je bolj sladek od B			Ne zaznam razlike	B je bolj sladek od A		
+++	++	+	0	+	++	+++

Kislost

A je bolj kisel od B			Ne zaznam razlike	B je bolj kisel od A		
+++	++	+	0	+	++	+++

Grenkost

A je bolj grenek od B			Ne zaznam razlike	B je bolj grenek od A		
+++	++	+	0	+	++	+++

Okus

A je po okusu boljši od B			Ne zaznam razlike	B je po okusu boljši od A		
+++	++	+	0	+	++	+++

Splošna ocena

A je celokupno boljši od B			Ne zaznam razlike	B je celokupno boljši od A		
+++	++	+	0	+	++	+++