

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2015

JIRÍ ŽÁK

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav technologie potravin



Možnosti použití žita a dalších obilovin pro surogaci při výrobě piva

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Ing. Tomáš Gregor, Ph.D.

Vypracoval:

Mgr. Jiří Žák

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci Možnosti použití žita a dalších obilovin pro surogaci při výrobě piva vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Ing. Tomáši Gregorovi, Ph.D. za odborné vedení a konzultaci.

ABSTRAKT

Bakalářská práce **Možnosti použití žita a dalších obilovin pro surogaci při výrobě piva** se zaměřuje na pivovarsky významné vlastnosti obilovin menšinového pivovarnického významu, se zvláštním přihlédnutím k žitu (*Secale cereale*) a tritikale (\times *Triticosecale*). Na základě dostupných studií se tritikale jeví jako nadějná surovina, využitelná ve větším rozsahu jako zdroj škrobu, případně dusíku a diastatických enzymů. Žito bylo naproti tomu pro použití ve větším rozsahu zhodnoceno jako nepříliš vhodná surovina, jejíž hodnota spočívá především v ovlivnění sensorických vlastností u minoritních typů piva. Pro účely výroby bezlepkových piv by některé doposud vzácně používané drobnozrné druhy („millet“), zejména tef (*Eragrostis tef*), bylo vhodné považovat za obilniny vyžadující další pozornost.

Klíčová slova: arabinoxylany, enzymy, pentosany, slad, surogáty, tritikale, žito

ABSTRACT

Bachelor's thesis **Possibilities of rye and other cereal grains use as brewing adjuncts** focuses on minority cereals and their properties relevant for brewing industry, with special regard to rye (*Secale cereale*) and triticale (\times *Triticosecale*). As available studies suggest, triticale seems to be a promising material to be used in larger quantities as a source of starch, or to complement nitrogen and enzyme poor adjuncts. Rye, on the other hand, is a rather troublesome grain and offers little advantages for an extensive use. Nevertheless, it can be a valuable material for specialty beer production, due to its capability to impart specific flavours. With regard to gluten-free beer production, further attention should be paid to rarely used millets, especially teff (*Eragrostis tef*).

Keywords: adjuncts, arabinoxylans, enzymes, malt, pentosans, rye, triticale

OBSAH

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD | 7 |
| 2 | CÍLE PRÁCE | 8 |
| 3 | OBILNINY | 9 |
| 3.1 | Stavba obilky..... | 9 |
| 3.2 | Složení obilky..... | 10 |
| 3.2.1 | Polysacharidy..... | 10 |
| 3.2.1.1 | Škrob..... | 10 |
| 3.2.1.2 | Neškrobové polysacharidy..... | 12 |
| 3.2.2 | Proteiny..... | 16 |
| 3.3 | Obilniny s minoritním pivovarnickým významem..... | 17 |
| 3.3.1 | Millet..... | 17 |
| 3.3.2 | Čirok..... | 19 |
| 3.3.3 | Kukuřice..... | 20 |
| 3.3.4 | Rýže..... | 21 |
| 3.3.5 | Žito..... | 21 |
| 3.3.6 | Triticale..... | 22 |
| 4 | ENZYMY | 22 |
| 4.1 | Amylolytické enzymy..... | 22 |
| 4.2 | Proteolytické enzymy..... | 24 |
| 4.3 | Enzymy cytasového komplexu..... | 25 |
| 5 | VYUŽITELNOST ŽITA A TRITIKALE V PIVOVARNICTVÍ | 27 |
| 5.1 | Využitelnost žita..... | 27 |
| 5.2 | Využitelnost tritikale..... | 29 |
| 6 | ZÁVĚR | 31 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 32 |

1 ÚVOD

Výroba a konzumace kvašených obilných nápojů se pravděpodobně stala významnou součástí lidské kultury záhy poté, co neolitický člověk začal přecházet od kočování k zemědělskému způsobu života v trvalých sídlech a pěstované obilniny se staly dominantní složkou jeho obživy. Zásadní význam piva pro starověké zemědělské společnosti lze vyvozovat již z nejstarší známé literární památky, sumerského Eposu o Gilgamešovi ze třetího tisíciletí př. n. l., ve kterém se divoký muž Enkidu stane civilizovaným poté, co se naučí jíst chléb a pít pivo. Výroba piva byla zpočátku úzce spjata s výrobou pečiva, což je patrné například ze starobabylónského Hymnu pro Ninkasi, podle kterého byl jednou z pivovarských surovin tzv. bappir, fermentovaný ječný chléb (*Meussdoerffer, 2009*).

Staří zemědělci nepochybně používali libovolné dostupné suroviny, to znamená, že se k přípravě pečiva a piva používaly tytéž obiloviny. Tento přístup převládal v Evropě až do konce středověku a přetrvává dodnes v mnoha venkovských oblastech především Afriky, ale i Asie a střední a jižní Ameriky. V průmyslové výrobě dnes jednoznačně dominuje ječmen, v poslední době se však objevily výrazné tendence zavádět v pivovarství alternativní suroviny, hned z několika důvodů. Jedním z nich je snížení nákladů použitím škrobnatých surogátů, jako jsou nesladované obiloviny. S tím dále souvisí suroviny přidávané jako složka zmírňující nebo odstraňující negativní ovlivnění technologických vlastností vysokým podílem surogátu. Zejména v suchých tropických oblastech má velký význam snaha nahradit importovaný ječmen, který v místních podmínkách nelze efektivně pěstovat, lokálně dostupnými obilovinami. S použitím ječného sladu je také nemožná výroba piva vhodného pro osoby trpící celiakií, které u nás mohou tvořit nezanedbatelných 0,5% populace. Dalším důvodem je význam alternativních obilovin pro diverzifikaci trhu. Mnoho, zejména menších pivovarů se v poslední době zaměřuje na výrobu piv minoritních typů, u nichž může použití méně obvyklých surovin přinést cenné ovlivnění sensorických vlastností.

2 CÍLE PRÁCE

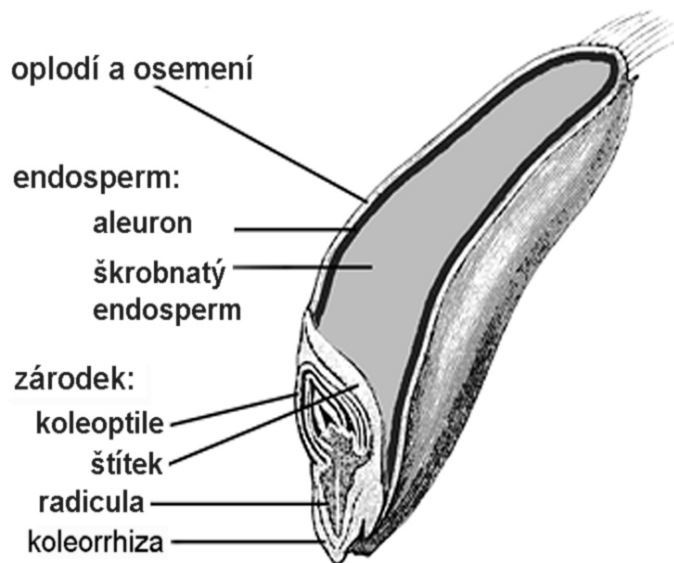
Cílem této práce je vypracovat literární rešerši na téma obilovin využitelných pro surogaci jako náhražky ječného sladu při výrobě piva, popsat jejich strukturu, složení a použitelnost se zvláštním přihlédnutím k žitu a tritikale, dále zvážit a navrhnout vhodné metody a dávkování surogátů obilného typu při výrobě piva.

3 OBILNINY

Jako obilniny se označují rostliny příslušející do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*, dříve také *Gramineae*) pěstované pro škrobnaté plody.

3.1 Stavba obilky

Plodem veškerých lipnicovitých je obilka (caryopsis), která obsahuje jediné semeno (obr. 1). Vnější obalovou vrstvu obilky představuje oplodí (pericarpium), které je v případě žita tvořeno dvěma až pěti vrstvami buněk. K němu pevně přirůstá vnitřní obalová vrstva, osemení (testa), tvořené buňkami silně redukovanými na kompaktní vrstvu ztlustlých buněčných stěn, nepravidelně prokládaných kutikulou. K osemení přiléhá aleuron, vrstva bohatá na proteiny, která z hlediska ontogeneze obilky představuje svrchní část živného pletiva čili endospermu. Vnitřní část obilky tvoří škrobnatý endosperm. Zárodek (embryum) přiléhá k endospermu štítkem (scutellum) a z vnější strany jej kryje oplodí a osemení. Základy stonku (plumula) a kořene (radicula) kryjí koleoptile a koleorrhiza. (Rovenská, 1973).



Obrázek 1: Stavba obilky pšenice (*Triticum aestivum*), upraveno podle *von Sachs, 1882*.

3.2 Složení obilky

Škrobnatý endosperm zabírá většinu objemu obilky a je tvořen převážně škrobem a v menší míře zásobními proteiny a strukturálními polysacharidy buněčných stěn. Aleuronová vrstva obsahuje fytáty, estery inositolu a kyseliny fosforečné, které tvoří chelatační komplexy s kovovými ionty a fungují tak jako zásobní forma jak kovů, tak fosforu, a většinu metabolicky aktivních proteinů, tj. albuminy a globuliny, které jsou během klíčení uvolňovány do škrobnatého endospermu. Oplodí a osemení jsou tvořeny hlavně celulosou, hemicelulosami a ligninem. V zárodku je obsažena většina lipidů a jednoduchých cukrů obilky, a dále, podobně jako v aleuronu, metabolicky aktivní proteiny a fosfor. V zastoupení jednotlivých složek v obilce se rozličné obilniny do určité míry liší (tab. 1).

Tabulka 1: Procentuální zastoupení složek zrna u vybraných obilnin (průměrné hodnoty)

| | Proteiny | Lipidy | Hrubá vláknina | Popeloviny | NFE ² |
|---|----------|--------|----------------|------------|------------------|
| Žito (<i>Secale cereale</i>) | 13,4 | 1,8 | 2,1 | 2,0 | 80,7 |
| Tritikale (x <i>Triticosecale</i>) | 15,2 | 1,9 | 2,2 | 1,9 | 78,6 |
| Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>) | 12,2 | 2,6 | 2,8 | 1,8 | 80,6 |
| Pšenice tvrdá (<i>Triticum durum</i>) | 13,2 | 2,8 | 2,8 | 2,0 | 79,2 |
| Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i>) | 11,5 | 2,2 | 5,6 | 2,9 | 77,8 |
| Oves (<i>Avena sativa</i>) | 17,1 | 6,4 | 11,3 | 3,2 | 62,0 |
| Rýže (<i>Oryza sativa</i>) | 7,6 | 2,4 | 10,2 | 4,7 | 75,2 |
| Rýže (<i>Oryza sativa</i>) – bílá ¹ | 7,8 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 90,7 |
| Kukuřice (<i>Zea mays</i>) | 11,4 | 4,8 | 2,6 | 1,9 | 79,4 |
| Čirok (<i>Sorghum bicolor</i>) | 11,0 | 3,2 | 2,7 | 1,8 | 81,3 |
| Proso seté (<i>Panicum miliaceum</i>) | 11,0 | 3,5 | 9,0 | 3,6 | 72,9 |
| Bér vlašský (<i>Setaria italica</i>) | 11,7 | 3,9 | 7,0 | 3,2 | 74,2 |
| Dochan sivý (<i>Pennisetum glaucum</i>) | 14,5 | 5,1 | 2,0 | 2,0 | 76,4 |
| Kalužnice křivoklasá (<i>Eleusine coracana</i>) | 8,0 | 1,5 | 3,0 | 3,0 | 75,0 |
| Milička habešská (<i>Eragrostis tef</i>) | 10,9 | 2,4 | 2,7 | 2,6 | 81,4 |
| Rosička útlá (<i>Digitaria exilis</i>) | 8,7 | 2,8 | 8,5 | 3,8 | 73,6 |

zdroj: Serna-Saldívar, 2010

1 – bílou rýží se rozumí rýžové zrna zbavené obalových vrstev a klíčku, tedy rýžový endosperm

2 – nitrogen-free extract, tj. bezdusíkaté extraktivní látky

3.2.1 Polysacharidy

3.2.1.1 Škrob

Škrob, zásobní polysacharid obilnin, se nachází v endospermu a tvoří většinu celkové hmotnosti zrna (v pšenici 58 – 76 %, v žitě 52 – 60 %, v ječmeni 56 – 66 %).

Ve své nativní formě se škrob vyskytuje ve formě částečně krystalických struktur, tzv.

škrobových zrn. Obilný škrob, na rozdíl od škrobů většiny ostatních rostlin, vytváří zrna dvou typů: větší (10 – 35 μm) diskovitá a menší (1 – 10 μm) kulovitá zrna. Na mikroskopické úrovni lze na škrobových zrnech rozeznat růstové kruhy, které představují střídající se krystalické a amorfnní vrstvy. Krystalické vrstvy jsou tvořeny paralelně uspořádanými řetězci větveného amylopektinu, zatímco amorfnní vrstvy obsahují místa větvení amylopektinu, řídce větvené úseky a asociovanou amylosu (*Koehler et Wieser, 2012*).

V procesu mletí dochází k mechanickému poškození části škrobových zrn a tato narušená zrna pak snadněji přijímají vodu a jsou náchylnější k amylyolýze (*Goesaert et al., 2009*).

Chemicky lze škrob považovat za komplex dvou strukturně odlišných polymerů α -D-glukosy: amylosy, tvořící 25 – 28% celkového škrobu, a amylopektinu, tvořícího 72 – 75% celkového škrobu.

Amylosa je tvořena lineárními řetězci 500 – 6000 glukosových jednotek, spojených α -(1,4) glykosidickými vazbami. Přestože je tento polymer obecně považován za zcela lineární, 25 – 55 % molekul amylosy obsahuje ojedinělá větvení, kde jsou dva lineární řetězce spojeny α -(1,6) glykosidickou vazbou. V důsledku své relativní vzácnosti nemají větvení na vlastnosti amylosy významější vliv a molekula jako celek se chová spíše jako nevětvená. (*Delcour et Hoseneý, 2010*)

Amylopektin sestává z krátkých řetězců 6 – 100 glukosových jednotek spojených α -(1,4) glykosidickými vazbami, které jsou α -(1,6) glykosidickými vazbami spojeny do rozsáhlých rozvětvených struktur dosahujících až 3 milionů glukosových jednotek. Lze rozlišit nevětvené vnější A-řetězce a vnitřní B-řetězce, nesoucí místa větvení. Celá molekula je ukončena jediným C-řetězcem obsahujícím redukující glukosovou jednotku. Rozložení míst větvení v molekule amylopektinu je nenáhodné, krátké (do 15 glukosových jednotek) A-řetězce a B1-řetězce tvoří trsy, které se na B-řetězcích vyšších řádů (B-2 o 35 až 40, B-3 o 70 až 80 a B-4 o více než 100 glukosových jednotkách) střídají s nevětvenými úseky (*Koehler et Wieser, 2012*).

Při dostatku vody (nad 27% hmotnosti) a za zvýšené teploty dochází k významným změnám struktury škrobu. Amylosa se uvolňuje do roztoku. Amylopektin přijímá hydratační vodu, jeho krystalická struktura je nevratně porušena a polymer přechází do amorfnního stavu. Tento jev se označuje jako mazovatění škrobu (*Goesaert et al., 2005*). Teplota mazovatění se výrazně liší u škrobů různých obilovin. Škrob pšenice, ječmene, žita a tritikale dosahuje 50% zmazovatění při teplotě 53 °C, škrob ova při teplotě 55 °C, škrob kukuřice, prosa a čiroku při teplotě 67 °C a škrob rýže až při teplotách nad 70 °C (*Delcour et Hoseneý, 2010*).

3.2.1.2 Neškrobové polysacharidy

Fruktany (také fruktosany) jsou složené sacharidy tvořené převážně nebo výhradně monosacharidem fruktosou a obsahují jednu nebo žádnou glukosovou jednotku. Jejich metabolismus úzce souvisí s metabolismem disacharidu sacharosy. Kromě zásobní funkce, významné zejména u hvězdčovitých rostlin (*Asteraceae*, dříve též *Compositae*), mají i osmoregulační funkci, která je spjata s odolností rostlin proti abiotickému stresu působenému mrazem nebo suchem (*Pollock, 1986*).

Základem pro syntézu fruktanů jsou oligosacharidy kestosy, mezi něž patří kestotriosy, trisacharidy tvořené jednou glukosovou a dvěma fruktosovými jednotkami, a 1,6-kestotetraosa (bifurkosa), tetrasacharid tvořený jednou glukosovou a třemi fruktosovými jednotkami. Kestotriosy vznikají připojením fruktosové molekuly k molekule sacharosy, a to k její fruktosové jednotce vazbou $\beta(2-1)$ v případě 1-kestosy, vazbou $\beta(2-6)$ v případě 6-kestosy nebo ke glukosové jednotce vazbou $\beta(2-6)$ v případě neokestosy. V molekule 1,6-kestotetraosy jsou k fruktosové jednotce sacharosy připojeny dvě molekuly fruktosy vazbami $\beta(2-1)$ a $\beta(2-6)$. K prodlužování řetězce fruktanů dochází připojováním dalších fruktosových jednotek k terminálním fruktosovým jednotkám kestopůsobením enzymů s fruktosyltransferasovou aktivitou. Od 1-kestosy jsou odvozeny fruktany inulinového typu, jejichž řetězce jsou spojeny vazbami $\beta(2-1)$. Od 6-kestosy jsou odvozeny fruktany levanového typu, jejichž řetězce jsou spojeny vazbami $\beta(2-6)$. Z neokestosy mohou vznikat fruktany obou typů, neoinuliny a neolevany. Řetězce graminanů, rozvětvených fruktanů odvozených od 1,6-kestotetraosy, obsahují oba typy vazeb (*Verspreet et al., 2015*).

Fruktany obsažené v obilkách žita, pšenice, tritikale a ječmene se řadí mezi graminany a mezi druhy jsou značné rozdíly jak v jejich celkovém obsahu, tak v zastoupení polymeračních stupňů. Na rozdíl od ječmene, který obsahuje jen malá množství (v průměru 0,4% celkové sušiny) fruktanů nízkého polymeračního stupně (převážně 3 a 4 monosacharidové jednotky), je průměrný obsah fruktanů v tritikale 2,3% sušiny a v žitě 4,2% sušiny (*Verspreet et al., 2015*). Vyšší fruktany (více než 9 monosacharidových jednotek) tvoří 19,2% celkového obsahu fruktanů v obilkách tritikale a 41,5% v obilkách žita (*Rakha et al., 2011*).

Fruktany v kyselém prostředí za zvýšené teploty, tedy v podmínkách převládajících během rmutování, scezování a chmelovaru, částečně podléhají hydrolyze. K rozkladu fruktanů na fruktosu a sacharosu dochází také působením mikrobiálních enzymů, kvasinky jsou z fruktanů žita schopny hydrolyzovat přibližně jednu třetinu celkového množství, přičemž vyšší polymery

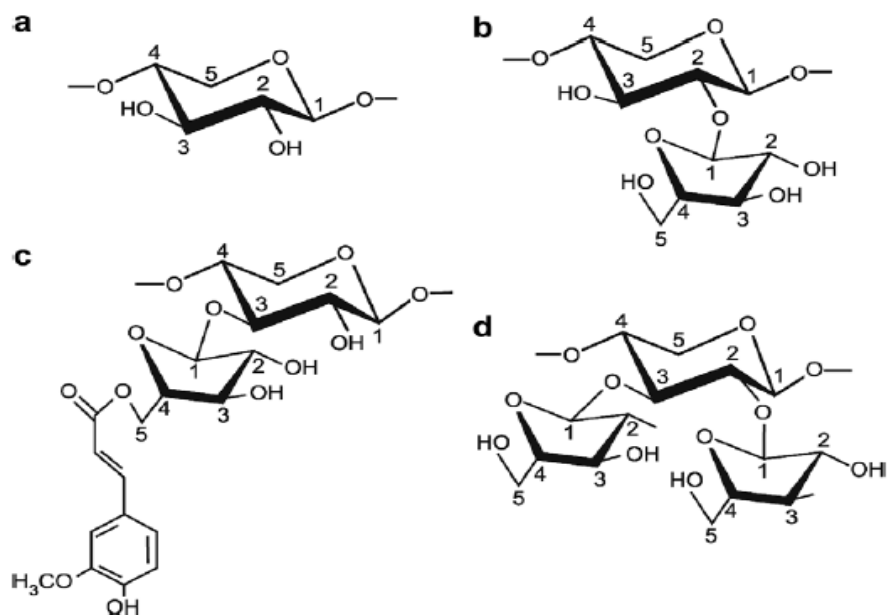
jsou vůči rozkladu odolnější. Schopnost využívat fruktany je podmíněna aktivitou invertasy, v přítomnosti kvasinek mutantních linií bez invertasové aktivity k hydrolyze fruktanů nedochází (*Verspreet, 2015*). Do jaké míry během pivovarského procesu dochází k degradaci fruktanů není dosud jasné (*Briggs, 2004*).

Strukturní polysacharidy, spolu s ligninem, polymerem fenylypropanoidního charakteru, hlavní složky buněčných stěn, zahrnují celulosu (buničinu) a hemicelulose, heterogenní skupinu slizových a gumovitých látek, mezi než se řadí polymery obsahující jak hexosy (glukosu, galaktosu a manosu) a od nich odvozené uronové kyseliny, tak pentosy (xylosu a arabinosu). Největší význam v pivovarnictví mají rozpustné arabinoxylany a β -glukany, které mohou výrazně ovlivnit viskozitu roztoku a koloidní stabilitu výsledného piva (*Preece et Hobkirk, 1953*).

Arabinoxylany jsou pentosami arabinosou a xylosou tvořené polysacharidy, které představují hlavní složku slizových látek zrna žita a tritikale. Část arabinoxylanů je rozpustná ve vodě, většina je nerozpustná v důsledku vazby na ostatní složky buněčných stěn.

Rozpustné arabinoxylany jsou tvořeny řetězci xylosových jednotek spojených $\beta(1-4)$ vazbami, na některýchž jsou vázány terminální arabinosové jednotky vazbami $\alpha(1-2)$ a $\alpha(1-3)$. Zastoupení nesubstituovaných, 2-substituovaných, 3-substituovaných a disubstituovaných xylosových jednotek je nenáhodné a lze nalézt alespoň dva typy polymerů (nebo rozdílných úseků téhož polymeru), jeden s nízkým poměrem arabinosy ke xylose, v nichž převažují nesubstituované a 3-substituované xylosové jednotky, druhý s vysokým podílem arabinosy a převahou 2-substituované a disubstituované xylosy (*Vinkx et Delcour, 1996; Izydorczyk et Biliaderis, 1995*).

Nerozpustné arabinoxylany je možné rozdělit do tří skupin. Jednu z nich tvoří polysacharidy s velmi nízkým poměrem arabinosy ke xylose (0,1 až 0,2), přítomné hlavně v aleuronové vrstvě zrna, patrně příbuzné pšeničné hemicelulose A. K jejich nerozpustnosti ve vodě přispívá tendence arabinosou nesubstituovaných xylosových řetězců vzájemně agregovat prostřednictvím nekovalentních vazeb. Druhá skupina je tvořena arabinoxylany velmi podobnými rozpustným arabinoxylanům, jejichž nerozpustnost ve vodě je způsobena vazbou na jiné složky buněčné stěny. Třetí skupinu tvoří složité rozvětvené polymery s vysokým poměrem arabinosy ke xylose ($>1,0$), značným zastoupením substituovaných arabinosových jednotek (40%) a terminálních xylosových jednotek (26%) a přítomností terminální galaktosy, glukuronové kyseliny a nesacharidových substituentů typu fenylypropanoidů, zejména ferulové kyseliny (*Vinkx et Delcour, 1996; Izydorczyk et Biliaderis, 1995*).



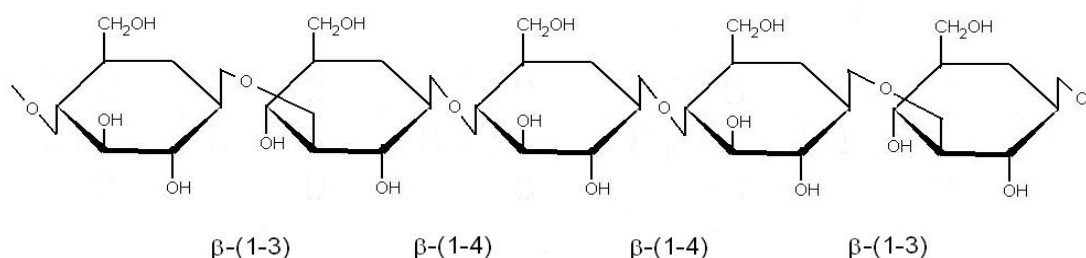
Obrázek 2: Strukturní prvky arabinoxylanů: (a) nesubstituovaná xylosová jednotka; (b) 2-substituovaná xylosová jednotka; (c) 3-substituovaná xylosová jednotka se zbytkem ferulové kyseliny; (d) disubstituovaná xylosová jednotka. Zdroj: *Izydorczyk et Dexter, 2008*

Ferulová kyselina, vázaná O-5 esterovou vazbou na terminální molekuly arabinosy, představuje hlavní nesacharidovou složku arabinoxylanů. Asi 85% jejího celkového obsahu je přítomno v nerozpustných arabinoxylanech, kde je hlavní příčinou jejich nerozpustnosti, protože tvoří kovalentní vazby s fenolickými látkami, včetně fenylylpropanoidů v ligninu a tyrosinových zbytků v proteinech (*Vinck et Delcour, 1996*), zejména ve strukturních proteinech typu extensinů (*Bidlack, 1992*).

Ferulová kyselina vázaná v rozpustných arabinoxylanech je zodpovědná za jev zvaný oxidativní gelovatění. Vodné roztoky arabinoxylanů, jsou-li vystaveny působení oxidačních činidel nebo enzymů typu peroxidasy, vykazují výrazný nárůst viskozity za současné tvorby dimerů ferulové kyseliny. Vytvoření kovalentní vazby mezi dvěma zbytky ferulové kyseliny vázanými na různých arabinoxylanových molekulách způsobuje jejich spojení do rozsáhlejších zesíťovaných struktur, jejichž součástí jsou často i proteiny a peptidy (*Vansteenkiste et al., 2004*).

β -glukany jsou polysacharidy složené z glukosových jednotek spojených β -glykosidickými vazbami. Patří mezi ně celuloza, hlavní strukturální složka buněčných stěn, tvořená lineárními řetězci až několika tisíc glukosových jednotek spojených vazbami $\beta(1-4)$, ale obvykle je tento termín vyhrazen pro kratší, ve vodě rozpustné lineární polymery obsahující jak $\beta(1-4)$, tak $\beta(1-3)$, které jsou hlavní součástí hemicelulos ječného endospermu, zatímco v obalových vrstvách ječmene a obilkách žita a tritikale nad nimi převažují arabinoxylany.

Řetězce β -glukanů jsou tvořeny převážně krátkými úseky dvou nebo tří $\beta(1-4)$ vázaných glukosových jednotek, vzájemně spojených $\beta(1-3)$ vazbami. Vzácněji se vyskytují delší (5 až 28 glukosových jednotek) úseky bez $\beta(1-3)$ vazeb, strukturálně odpovídající celuloze. Molekulární struktura β -glukanů se odhaduje na základě analýzy produktů jejich štěpení lichenasou, bakteriálním enzymem s β -glukanasovou aktivitou, který přednostně hydrolyzuje $\beta(1-4)$ vazby 3-substituovaných glukosových jednotek (*Izydorczyk et Dexter, 2008*). Z poměrného molárního zastoupení trisacharidu celobiosylglukosy, tetrasacharidu celotriosylglukosy a vyšších oligosacharidů ve vzniklé směsi štěpných produktů lze odvodit rozložení $\beta(1-3)$ a $\beta(1-4)$ vazeb v původních β -glukanech, které značně ovlivňuje jejich fyzikální vlastnosti, zejména rozpustnost ve vodě. Obecně lze říct, že přítomnost $\beta(1-3)$ vazeb omezuje schopnost β -glukanových řetězců agregovat, čím vyšší je tedy jejich zastoupení, tím vyšší je i rozpustnost příslušného polymeru. Obzvláště obtížně rozpustné jsou β -glukany obsahující větší množství delších, celuloze podobných úseků bez $\beta(1-3)$ vazeb (*Lazaridou et al., 2007*). Ve směsi produktů hydrolyzy ječného β -glukanu jsou trisacharidy, tetrasacharidy a vyšší oligosacharidy zastoupeny průměrně v poměru 59,2:29,2:10,9 (*Lazaridou et al., 2007*), zatímco v případě žitného β -glukanu v poměru 66,30:25,20:8,40 (*Ragae et al., 2008*).



Obrázek 3: Struktura obilného β -glukanu. Zdroj: *Barrington, 2012*

3.2.2 Proteiny

Tradičně se pro proteiny obilnin používá Osbournovo členění do čtyř skupin podle rozpustnosti: albuminy (rozpuštěné ve vodě), globuliny (nerozpuštěné ve vodě, rozpustné v roztocích solí), prolaminy (rozpuštěné v 60% až 70% ethanolu) a gluteliny (rozpuštěné ve zředěných kyselinách a zásadách). Malý podíl obilných proteinů, zahrnující membránové lipoproteiny, nespadá do žádné z těchto skupin.

Albuminy a globuliny jsou převážně metabolicky aktivní proteiny (enzymy a inhibitory enzymů) a nacházejí se hlavně v obalových vrstvách, aleuronové vrstvě a v zárodku. Prolaminy a gluteliny jsou zásobní proteiny obsažené ve škrobnatém endospermu, tvořené převážně repetitivními úseky bohatými na glutamovou kyselinu a prolin (*Shewry et Halford, 2002*). Prolaminy obilnin tribu *Triticeae* (pšeničné gliadiny, žitné sekaliny a ječné hordeiny) jsou u citlivých osob spojeny s chronickou autoimunitní poruchou tenkého střeva, tzv. celiakií (*Sabatino et Corazza, 2009*). Význam obilných proteinů pro pivovarskou výrobu spočívá jednak v enzymatické aktivitě některých z nich, jednak jako zdroje volných aminokyselin nezbytných pro výživu kvasinek. Zastoupení jednotlivých aminokyselin v obilkách žita a tritikale je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2: Podíl jednotlivých aminokyselin v celkové hmotě zrna, sušiny zrna a celkovém proteinu žita a tritikale.

| | Žito | | | Tritikale | | |
|-----------------|---------------|----------|------------|---------------|----------|------------|
| | % celkové hm. | % sušiny | % proteinu | % celkové hm. | % sušiny | % proteinu |
| Tryptofan | 0,154 | 0,173 | 1,041 | 0,157 | 0,175 | 1,198 |
| Threonin | 0,532 | 0,598 | 3,595 | 0,405 | 0,453 | 3,092 |
| Isoleucin | 0,549 | 0,617 | 3,709 | 0,479 | 0,535 | 3,656 |
| Leucin | 0,980 | 1,101 | 6,622 | 0,911 | 1,018 | 6,954 |
| Lysin | 0,605 | 0,680 | 4,088 | 0,365 | 0,408 | 2,786 |
| Methionin | 0,248 | 0,279 | 1,676 | 0,204 | 0,228 | 1,557 |
| Cystin | 0,329 | 0,370 | 2,223 | 0,275 | 0,307 | 2,099 |
| Fenylalanin | 0,674 | 0,757 | 4,554 | 0,638 | 0,713 | 4,870 |
| Tyrosin | 0,339 | 0,381 | 2,291 | 0,383 | 0,428 | 2,924 |
| Valin | 0,747 | 0,839 | 5,047 | 0,609 | 0,680 | 4,649 |
| Arginin | 0,813 | 0,913 | 5,493 | 0,671 | 0,750 | 5,122 |
| Histidin | 0,367 | 0,412 | 2,480 | 0,311 | 0,347 | 2,374 |
| Alanin | 0,711 | 0,799 | 4,804 | 0,486 | 0,543 | 3,710 |
| Kys. asparagová | 1,177 | 1,322 | 7,953 | 0,785 | 0,877 | 5,992 |
| Kys. glutamová | 3,662 | 4,115 | 24,743 | 4,006 | 4,476 | 30,580 |
| Glycin | 0,701 | 0,788 | 4,736 | 0,559 | 0,625 | 4,267 |
| Prolin | 1,491 | 1,675 | 10,074 | 1,184 | 1,323 | 9,038 |
| Serin | 0,681 | 0,765 | 4,601 | 0,593 | 0,663 | 4,527 |

zdroj: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2011

3.3 Obilniny s minoritním pivovarnickým významem

3.3.1 Millet

Slovo „millet“ v anglickém a francouzském jazyce označuje skupinu obilnin zahrnující větší množství drobnozrných druhů s krátkou vegetační dobou a vysokou tolerancí k suchu a vysokým teplotám. Pro absenci českého ekvivalentu budu v rámci této práce zmíněný termín používat v podobě **millet**, -u m. (6. j. -u).

Pěstování milletů je soustředěno především v suchých oblastech tropů a subtropů. Z pivovarnického hlediska mají menší význam, převážně jako lokálně dostupná surovina ve venkovských oblastech rozvojových zemí při výrobě tradičních kvašených nápojů, ale vzhledem k nepřítomnosti gliadinu a jeho homologů v obilkách mají určitý potenciál jako surovina pro výrobu bezlepkových piv.

Proso seté (*Panicum miliaceum* L., tribus *Paniceae*) představuje jedinou obilninu této skupiny, která je ve významnější míře pěstována v Evropě. Pochází pravděpodobně ze stepních oblastí střední Asie a severní Číny, kde jeho krátká vegetační doba a nenáročnost na kvalitu a zpracování půdy umožňovaly jeho pěstování kočovnými kulturami. Za časů Římské říše již bylo rozšířeno v Evropě, kde jeho význam a rozsah pěstování teprve během novověku po zavedení amerických plodin, brambor a kukuřice, postupně klesal (*FAO, 1995*).

Při sladování prosa je třeba zohlednit pomalý příjem vody v důsledku značné tloušťky pluch a vysoké požadavky na teplotu klíčení, jejíž optimum je 27 °C. Slad z prosa a z něj vyrobené sladiny se vyznačují slabou aktivitou β -amylasy, velmi světlou barvou, nízkou viskozitou a prokvasitelností srovnatelnou s běžnými ječnými slady (*Zarnkow et al., 2010*).

Bér vlašský (*Setaria italica* (L.) P. Beauv, tribus *Paniceae*), známý také jako čumíza, mohár, mušec nebo senegalské proso, je jedna z prvních pěstovaných obilnin. Pochází pravděpodobně z Číny, kde je jeho pěstování doloženo již ze sedmého století př. n. l. a do Evropy se dostalo už během neolitu. Na našem území byla jeho velkoklasá forma, zvaná čumíza (*Setaria italica* subsp. *maxima*), běžně pěstována do 16. století (*Kropáč et Kropáčová, 1966*). Využití čumízy pro výrobu piva je doloženo z jihu Ruska (*de Wet et al., 1979*). V současnosti se bér vlašský ve větší míře pro potravinářské účely pěstuje pouze v Číně a Koreji, v Evropě a Americe představuje okrajovou krmnou plodinu (*FAO, 1995*).

Sladování béru komplikuje jeho pomalé a nerovnoměrné klíčení, ostatními vlastnostmi se velmi podobá prosu (*Meussdoerffer et Zarnkow, 2009*).

Dochan sivý (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., tribus *Paniceae*), v Indii a Pakistánu známý jako bajra, v Africe pod řadou místních názvů (gero, uwele, biltug aj.), v anglicky psané literatuře se nejčastěji používá označení „pearl millet”. Pochází ze západní Afriky, odkud se rozšířil kolem začátku našeho letopočtu do střední a východní Afriky a Indie. Tato plodina má nejvyšší toleranci vůči suchu, vysokým teplotám a zasolení ze všech v současných obilnin, což umožňuje její pěstování v polopouštních oblastech, jinak nevhodných pro zemědělství (*Baltensperger, 2002*). Navzdory svému zásadnímu významu pro obyvatelstvo těchto oblastí je dochan doposud ve výzkumu a šlechtitelství přehlížen, zřejmě protože je pěstován téměř výhradně pro místní spotřebu a jeho průmyslový význam je nepatrný (*BOSTID, 1996*). V mnoha částech subsaharské Afriky je dochan využíván pro výrobu místních forem piva, jak v nesladované, tak sladované formě (*Meusdoerffer et Zarnkow, 2009*). Zrno dochanu je schopno velmi rychle přijímat vodu a zahájit klíčení a dostatečného rozluštění obvykle dosáhne do tří dnů. Aktivita amylytických enzymů v tomto sladu je nižší než u ječmene, ale nápadně vyšší než u většiny tropických obilovin. Naprostá většina sladu je dosud vyráběna v domácích podmínkách, do průmyslové výroby byl zaveden zatím jen v Zimbabwe, jako diastatický doplněk při výrobě piva z čiroku (*Pelembe et al. 2004*).

Kalužnice křivoklasá (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn, tribus *Eragrostideae*), známá spíše jako **korakan**, pravděpodobně pochází z Etiopské vysočiny, odkud se již v neolitu rozšířila do jižní Asie (*D'Andrea, 1999*). Ve srovnání s ostatními millety má korakan vyšší nároky na vlhkost, ale velmi dobře snáší podmínky tropických hor (*Obilana et Manyasa, 2002*), nachází tedy největší uplatnění ve vysoko položených oblastech Indie, Nepálu a východní Afriky (*BOSTID, 1996*). Na rozdíl od plodů ostatních lipnicovitých rostlin oplodí korakanu k semeni nepřirůstá a při mlácení je snadno uvolněno, plodem tedy z hlediska botanické morfologie není obilka, ale nažka (*Osvačilová, 1972*). V Keni je využíván sladovaný korakan spolu s nesladovanou kukuřicí pro výrobu místního piva zvaného Busaa. Tradiční postup sladování zahrnuje třídní klíčení v tenkých vrstvách pokrytých vlhkou pylovinou a následné sušení na slunci. Korakanový slad vyniká α -amylasovou aktivitou, která je v některých případech až srovnatelná s ječmenem, naproti tomu aktivita β -amylasy je velice nízká (*Nout et Davies, 1982*). Výzkum hodnotící sladovnické vlastnosti krajových odrůd v Tanzanii ukázal, že některé z nich ('Muhone' a 'Ulyo') jsou mimořádně vhodné pro výrobu tradičních východoafrických typů piva a naznačil určitou možnost použití korakanu namísto importovaného ječmene při výrobě spodně

kvašeného piva (*Shayo et al., 2001*). Vysoce výnosná indická odrůda 'INDAF-6' rovněž dosahuje příznivých sladovnických vlastností, ve srovnání s africkými odrůdami ovšem při delším klíčení za nižší teploty (*Malleshi et Desikachar, 1986*).

Milička habešská (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter, tribus *Eragrostideae*), známá spíše jako **tef**, je pěstována již od neolitu na Etiopské vysočině a mimo oblast svého původu se prakticky nerozšířila (*D'Andrea, 1999*). Díky mimořádné toleranci k extrémním rozdílům teplot mezi dnem a nocí, které jsou v tropických vysokohorských oblastech časté (přežívá mrazy až -15 °C), je v Etiopii úspěšně pěstována i v nadmořských výškách nad 3000 m (*BOSTID, 1996*). Nesladovaný tef se používá spolu se sladem z ječmene nebo pšenice dvouzrnky k přípravě místního piva zvaného shamit, z tefového sladu, někdy spolu s jinými obilovinami, se vyrábí podobný kvašený nápoj, zvaný tella (*Selinus, 1971*). Odrůdy tefu jsou v pivovarsky významných vlastnostech značně variabilní, přičemž některé, např. 'Kuncho', se aktivitou obou amylas, obsahem rozpustného dusíku a volných aminokyselin ve sladině a viskozitou sladiny nijak nevymykají z rozsahu hodnot běžných u ječných sladů. Negativní vlastnost tefu, společná všem odrůdám, je vysoká teplota mazovatení škrobu, okolo 70 °C (*Gebremariam et al., 2013*). Díky pozitivním technologickým vlastnostem některých svých odrůd tef v současnosti přitahuje značnou pozornost jako surovina pro výrobu bezlepkového piva (*Wray, 2014*).

Rosička útlá (*Digitaria exilis* (Kippist) Stapf, tribus *Paniceae*), známá jako fonio nebo acha, pochází z oblasti savan a polopouští západní Afriky. Ze všech v současnosti pěstovaných obilnin má nejmenší obilky a nejkratší vegetační dobu. V Nigerii a Togu se její nesladované zrna tradičně používá k výrobě kvašených nápojů (*Meussdoerffer et Zarnkow, 2009*), využití ve větším měřítku je ale omezené v důsledku obtížného posklizňového zpracování (*BOSTID, 1996*). Pro výrobu sladu není příliš vhodná kvůli extrémně vysokým ztrátám škrobu během klíčení a značné teplotní lability enzymů (*Nzelibe et Nwasike, 1995*).

3.3.2 Čirok

Pěstovaný čirok (*Sorghum bicolor* (L.) Moench, tribus *Andropogonae*), je pravděpodobně hybridního původu, na němž se mohly podílet planě rostoucí čiroky *S. propinquum*, *S. bicolor* subsp. *arundinaceum* a *S. halepense*. Jako kulturní rostlina vznikl pravděpodobně na území dnešního Súdánu a Etiopie, odkud se záhy rozšířil do střední a západní Afriky a jižní Asie. V současnosti se pěstuje v suchých tropických a subtropických oblastech celého světa (*Hancock, 2012*).

Téměř v celé subsaharské Africe se používá pro přípravu tradičních piv, jejichž výroba byla v některých státech, např. Jihoafrické Republice, úspěšně zavedena do průmyslu. Tato piva, souhrnně označovaná jako 'kaffir beer', se obvykle vyrábějí ze směsi čirokového sladu s nesladovaným čirokem, kukuřicí, případně jinými obilovinami, jejíž suspenze ve vodě se nejprve fermentuje pomocí kultury bakterií mléčného kvašení, poté převařuje a filtrací nebo odstředěním rmutu získaná sladina zakvašuje kvasinkami svrchního kvašení. Výsledné pivo je značně kyselé (pH asi 3,5) a obsahuje 2% až 4% alkoholu a vysoké množství zbytkového extraktu (*Serna-Saldívar, 2010*).

Od 80. let 20. stol. je čirok, zaváděn i do výroby piv evropského typu, převážně v afrických zemích a USA. Největším producentem čirokového piva je v současnosti Nigerie (*Shewale et Pandit, 2011*).

Výroba čirokového sladu obvykle zahrnuje máčení do vlhkosti 33%, klíčení po dobu 3 až 7 dní při teplotě 25 °C až 30 °C a sušení na slunci nebo proudem teplého vzduchu do 50 °C (*Serna-Saldívar, 2010*). Častěji než jako slad je čirok používán jako škrobnatý surogát v nesladované podobě a povařený, přičemž diastatickou aktivitu potřebnou pro zcukření zajišťuje slad z jiné obiloviny, obvykle ječmene, nebo přídavek enzymatického přípravku. Teplota mazovatění čirokového škrobu je 67 °C až 73 °C u afrických odrůd a 71 °C až 81 °C u indických odrůd a záhřev na tyto teploty má za následek inaktivaci sladových enzymů. Čirok má jako surovina pro výrobu sladu řadu dalších nežádoucích vlastností, jako je nízká aktivita enzymů cytasového komplexu a β -amylasy a u mnoha odrůd vysoký obsah kyanogenních glykosidů, uvolňujících při klíčení toxický kyanovodík (*Osuntogun et al., 1989; Taylor et al., 2006*) V současnosti je však šlechtění a zpracování čiroku pro pivovarské využití věnována značná pozornost a jeho použitelnost pro pivovarské využití se daří zlepšovat (*Owuama, 1999; Taylor et al. 2013*).

3.3.3 Kukuřice

Kukuřice setá (*Zea mays* L., tribus *Andropogonae*) začala být pěstována asi sedmi tisíci let př. n. l. ve střední Americe. Na původu kulturní kukuřice se mohly podílet i jiné, planě rostoucí druhy rodu *Zea*, známé jako teosinty (*Matsuoka et al., 2002*).

Kukuřičný slad se vyrábí vzácně, obvykle se pro pivovarské účely používá nesladovaná kukuřice pouze jako zdroj škrobu. Příprava kukuřičného zrna zahrnuje jeho drcení, během nějž je nezbytné odstranit klíčky, které jsou velmi bohaté na olej a mohou tvořit až 14% celkové

hmotnosti obilky. Dále se může provádět ošetření hrubého šrotu horkou parou, čímž je dosaženo zmazování škrobu, válcování a sušení získaných vloček. Takto zpracovanou kukuřici je možné používat v podílu až 90%, ovšem ovlivnění sensorických vlastností výsledného piva je značné (*Meussdoerffer et Zarnkow, 2009*).

3.3.4 Rýže

Rýže setá (*Oryza sativa* L., tribus *Oryzae*) vznikla před asi sedmi tisíci let jako domestikovaná forma tzv. rudé rýže (*O. rufipogon* Griff.), planě rostoucího druhu, který se často vyskytuje jako plevel v rýžových polích (*Molina et al., 2011*). V současnosti rýže představuje nejvýznamnější obilninu v mnoha oblastech východní, jihovýchodní a jižní Asie.

Rýžový slad se používá poměrně vzácně, například pro výrobu tradičních kvašených nápojů na severovýchodě Indie (*Meussdoerffer et Zarnkow, 2009*). Jako škrobnatý surogát v pivovarském průmyslu jsou nejčastěji používány zlomky škrobnatého endospermu vznikající při odstraňování obalových vrstev rýže broušením a leštěním. Další zpracování do vloček je možné, ale používá se méně často než u kukuřice (*Lloyd, 1986*). Nejvhodnější typ rýže pro surogaci představuje forma *japonica*, která se vyznačuje relativně nízkou teplotou mazování škrobu (*Meussdoerffer et Zarnkow, 2009*).

3.3.5 Žito

Žito (*Secale cereale* L., tribus *Triticeae*) je ve srovnání s ječmenem a pšenicí poměrně mladý kulturní druh. Nejstarší literární zmínku, kterou lze jednoznačně spojit s žitem, představuje krátká kapitola v přírodovědecké encyklopedii *Historia naturalis* římského autora Plinia Staršího. Zde je popisováno jako podřadná obilnina nepříjemné chuti pěstovaná v podhůří Alp a jako potravina používaná pouze v dobách neúrody k odvrácení hrozícího hladomoru (*Pliny the Elder et al., 1887*).

Lze předpokládat, že žito původně nebylo pěstováno jako samostatná plodina, ale vyskytovalo se jako plevel v porostech pšenice a spolu s ní se rozšířilo z východní Anatólie na území dnešního Turecka, pravděpodobné oblasti původu obou druhů, do Evropy. Selekcí tlaky, kterým bylo žito spolu s pšenicí v kultuře vystaveno, vedly k přirozenému výběru forem s kratší vegetační dobou, pevnějšími klasovými větveny a většími zrnky. Značná odolnost a nenáročnost žita při rozšíření zemědělství do chladnějších, výše položených a méně úrodných oblastí umožnila zvýšení jeho podílu v porostech a v konečném důsledku i úplné nahrazení

pšenice žitem (*Petr, 2008*). Záměrné pěstování žita jako samostatné plodiny se v Evropě značně rozšířilo zejména v oblastech germánského a keltského osídlení během doby železné a svůj význam si zde udrželo i za doby římské nadvlády. K dalšímu rozšíření jeho pěstování došlo během stěhování národů a raného středověku, kdy se žito stalo dominantní obilninou ve většině částí Evropy mimo středomořskou oblast (*Behre, 1992*).

3.3.6 Tritikale

Tritikale (\times *Triticosecale*, tribus *Triticeae*), hybrid pšenice (*Triticum*) a žita (*Secale*), pro nějž byl navržen také nevžitý český název žitovec, je v současnosti nejvýznamnější plodinou uměle vytvořenou člověkem. Pokusy s křížením zmíněných obilných druhů, s cílem spojit nenáročnost žita s vysokou výnosností pšenice, probíhaly od konce 19. století, ale teprve od 80. let 20. století začaly být nově vyšlechtěné formy schopny konkurovat rodičovským druhům (*Petr, 2008*).

4 ENZYMY

4.1 Amylolytické enzymy

Jako amylolytické, nebo též diastatické, se označují enzymy rozkládající škrobové polysacharidy na jednodušší produkty, tj. dextriny (oligosacharidy), maltosu (disacharid o dvou glukosových jednotkách) a monosacharid glukosu. Amylolytické enzymy, zvané též amylasy, katalyzující hydrolytické štěpení glykosidické vazby mezi glukosovými jednotkami amylosy a amylopektinu, se podle mechanismu účinku dále dělí do několika skupin.

α -amylasy (1,4- α -D-glukan-4-glukanohydrolasy, EC 3.2.1.1) jsou enzymy hydrolyzující α -(1,4) glykosidické vazby amylosy a amylopektinu na více či méně náhodných místech uvnitř řetězce. Výsledkem štěpení jsou lineární oligosacharidy o různé délce řetězce, při dostatečně dlouhém působení zpravidla 6 - 7 glukosových jednotek, a rozvětvené oligosacharidy obsahující α -(1,6) glykosidické vazby, tzv. α -limitní dextriny. α -amylasy bývají proto také označovány jako dextrinogenní nebo dextrinující amylasy.

maltogenní α -amylasa (4- α -D-glucan- α -maltohydrolasa, EC 3.2.1.133) představuje zvláštní případ enzymu patřícího biochemickým mechanismem účinku mezi α -amylasy, působícího však vždy blízko konců polysacharidových řetězců a jako produkt štěpení vytvářejícího, podobně jako β -amylasy, maltosu. Příbuzné jsou tzv. maltodextrinogenní α -amylasy (4- α -D-

glucan- α -maltotetrahydrolasa, EC 3.2.1.60 a 4- α -D-glucan- α -maltohexaosidasa, EC 3.2.1.98), které odštěpují oligosacharidy s velmi krátkými řetězci (4 a 6 glukosových jednotek), tzv. maltodextriny.

Obilná zrna před započetím klíčení mají velmi nízký až žádný obsah α -amylas. Ve významnější míře se α -amylasa tvoří až během klíčení v aleuronové vrstvě zrna, odkud se rychle uvolňuje do endospermu. Škrob, zejména pokud prošel procesem zmazovatění, se účinkem α -amylasy snadno a rychle rozkládá na dextriny, což se projevuje výrazným poklesem viskozity škrobového mazu.

α -amylasa izolovaná z bakterie *Bacillus subtilis* (BSuA) je vysoce termostabilní a uchovává si aktivitu až do teplot kolem 100 °C (*Asgher et al. 2006*), preparáty obsahující tento enzym jsou tedy vhodné pro zpracování surogátů s obtížně mazovatějícími škroby, které vyžadují považování.

β -amylasy (1,4- α -D-glukan-maltohydrolasy, EC 3.2.1.2) hydrolyzují α -(1,4) glykosidické vazby amylosy a amylopektinu na koncích jejich řetězců za odštěpení maltosy. Lineární amylosu jsou β -amylasy schopny přeměnit na maltosu téměř dokonale, rozvětvený amylopektin asi z 60%, při dosažení místa větvení se činnost enzymu v důsledku neschopnosti štěpit α -(1,6) glykosidickou vazbu zastavuje. Produktem štěpení je tedy rozvětvený polysacharid s krátkými postranními řetězci, tzv. β -limitní dextrin, a maltosa. β -amylasy se také označují jako zcukřující amylasy.

β -amylasa se, na rozdíl od α -amylas, ve zralých zrnech vyskytují ve velkém množství už před začátkem klíčení, ale jejich účinek na škrob v nativní formě je zanedbatelný. Ke svému plnému účinku β -amylasa vyžaduje škrob zmazovatělý nebo částečně naštěpený α -amylasou (*Delcour et al., 1986*).

Glukoamylasy (1,4- α -D-glukan 1,4- α -glukosidasy, EC 3.2.1.3), podobně jako β -amylasy, hydrolyzují α -(1,4) glykosidické vazby amylosy a amylopektinu na koncích řetězců, ovšem za odštěpení glukosy. Tyto enzymy mají slabou 1,6- α -glukosidasovou aktivitu, takže při dosažení místa větvení se jejich činnost nutně nezastavuje a teoreticky jsou schopny amylopektin a limitní dextriny úplně přeměnit na glukosu (*Delcour et Hosenev, 2010*).

Isoamylasa (EC 3.2.1.68) a **pullulanasa** (R-enzym, EC 3.2.1.41) jsou enzymy katalyzující štěpení α -(1,6) glykosidické vazby amylopektinu a limitních dextrinů za vzniku amylo-dextrinů, lineárních oligosacharidů strukturně podobných amylose o délce řetězce obvykle 20 - 30 glukosových jednotek, které jsou dále štěpitelné jinými typy amylas. Tyto enzymy se označují

také jako odvětvující enzymy nebo limitní dextrinasy (*Nakamura, 1996*).

Limitní dextrinasy se podobně jako α -amylasa začíná v aleuronové vrstvě zrna syntetizovat až s počátkem klíčení, na rozdíl od α -amylasy však její uvolňování do endospermu probíhá pomalu (*Møller, 2013*). Mimořádně vysoké hodnoty aktivity enzymů tohoto typu byly zjištěny v tefovém sladu (*Gebremariam et al., 2013*).

4.2 Proteolytické enzymy

Jako proteolytické enzymy nebo proteasy se označují enzymy hydrolyzující peptidové vazby proteinů nebo peptidů. Tyto enzymy lze v zásadě rozdělit na **endopeptidasy** (proteiny), které katalyzují štěpení peptidové vazby uvnitř řetězců proteinů za vzniku nejprve vyšších polypeptidů, tzv. peptonů, koloidních látek vykazujících většinu typických vlastností proteinů, a následně i kratších peptidů, a **exopeptidasy** (peptidasy), které katalyzují štěpení peptidové vazby koncových aminokyselinových zbytků proteinového nebo peptidového řetězce za vzniku volných aminokyselin. Během proteolytického štěpení jsou uvolňovány také amonné ionty, pravděpodobně působením amidas na glutamin a asparagin (*Briggs et al., 2004*).

Produkty proteas mají řadu technologicky významných vlastností. Vyšší peptidy mají pozitivní vliv na tvorbu a stabilitu pěny, ale přispívají ke tvorbě koloidních zákalů. Volné aminokyseliny se spolu s redukujícími sacharidy podílejí na tvorbě produktů Maillardovy reakce, z nichž mnohé jsou látky ovlivňující barvu nebo aroma piva. Volné aminokyseliny a do určité míry i oligopeptidy také představují zdroj metabolizovatelného dusíku pro kvasinky.

Naprostá většina proteolytických enzymů spadá do jedné ze čtyř tříd definovaných na základě chemického mechanismu jejich katalytického účinku.

Cysteinové (thiolové) proteasy (EC 3.4.22, dříve 3.4.4), u nichž se hydrolyzy peptidové vazby substrátu účastní thioskupina cysteinového zbytku v molekule enzymu, byly dlouho považovány za jedinou skupinu endoproteas podílející se významější měrou na štěpení proteinů obilného zrna (*Lhotský, 1971*). Patří sem několik enzymů typu papainu (EC 3.4.22.2, dříve 3.4.4.10), exprimovaných během klíčení v aleuronové vrstvě obilky, odkud postupně pronikají do endospermu. Z nich má v pivovarnictví význam především ječná endopeptidasa MEP-1 (Malt Endo-Peptidase-1).

Aspartátové proteasy (EC 3.4.23) zahrnují endopeptidasy, u nichž se hydrolyzy peptidové vazby substrátu účastní jedna nebo více (nejčastěji dvě) karboxylové skupiny zbytku kyseliny

asparagové. V aleuronové vrstvě klíčících obilek ječmene je exprimována proteasa HvAP (*Hordeum vulgare* Aspartic Protease), která se do endospermu neuvolňuje a její účast na štěpení zásobních proteinů během klíčení nebyla zjištěna, při proteolýze během rmutování však hraje menší, ale nezanedbatelnou roli (*Jones et Budde, 2005*). Naproti tomu v klíčících obilkách žita je dosud neidentifikovaný enzym (nebo komplex enzymů) patřící do skupiny aspartátových proteas zodpovědný za až 54% celkové proteolytické aktivity a na štěpení zásobních proteinů se již při klíčení podílí velmi výrazně. (*Brijs et al, 2002*).

Metaloproteasy, zahrnující jak metaloexopeptidasy (EC 3.4.17), tak metaloendopeptidasy (EC 3.4.24), pro katalytickou aktivitu vyžadují přítomnost dvojmocného kovového kationtu, nejčastěji Zn^{2+} , méně často i Co^{2+} a Mn^{2+} , jako kofaktoru. V ječmeni se vyskytuje nejméně devět metaloproteas, které projevují maximální aktivitu při pH 7 až 8, do určité míry aktivní ale zůstávají i při pH 4. Jejich podíl na celkové proteolytické aktivitě v průběhu klíčení klesá z 31% až na 9%, pravděpodobně jednak spolu se zvyšujícím se zastoupením nově syntetizovaných proteas ostatních typů, jednak v důsledku poklesu pH do kyselé oblasti.

Serinové proteasy, u nichž se hydrolýzy peptidové vazby substrátu účastní hydroxylová skupina serinového zbytku, zahrnují jak endopeptidasy (EC 3.4.21), tak exopeptidasy, karboxypeptidasy serinového typu (3.4.16). Podíl serinových endopeptidas na štěpení zásobních proteinů je, přestože jsou tyto enzymy v klíčících zrnech aktivní, patrně zanedbatelný nebo žádný jak u ječmene (*Jones et Budde, 2005*), tak u žita (*Brijs et al, 2002*). Serinové exopeptidasy ovšem hrají významnou úlohu (70% až 80%) při uvolňování volných aminokyselin z peptidů během rmutování (*Berne, 2005*).

4.3 Enzymy cytasového komplexu

Jedním z procesů probíhajících při klíčení obilného zrna je tzv. cytolytické rozluštění, enzymatické narušení složek buněčných stěn, které má za následek zvýšení jejich propustnosti a tím usnadnění ostatních procesů spojených s klíčením, a také snížení mechanické pevnosti, čímž se zrno stává křehčím. Enzymy katalyzující štěpení buněčných stěn při klíčení byly původně označovány jako cytasa. S ohledem na množství rozmanitých složek buněčné stěny je nutné cytasu považovat za velmi heterogenní komplex hydrolas (*Lhotský 1971*).

Celulasa (β -1,4-endoglukanhydrolasa, EC 3.2.1.4) je endoenzym štěpící glykosidické vazby celulosy, hlavní strukturní složky buněčných stěn. V obilných zrnech pravděpodobně není

syntetizována a celulasová aktivita zjištěná ve sladech je způsobena enzymy tohoto typu pocházejícími z kontaminujících bakterií nebo hub. (*Hoy et al., 1981; Wilhelmi et Morgan, 2001*).

β -glukanasa (β -1,3(4)-endoglukanhydrolasa, EC 3.2.1.6) štěpí β (1-4) vazby 3-substituovaných glukosových jednotek a svým účinkem tedy odpovídá mikrobiální lichenase. Má zásadní význam pro cytolytické luštění při sladování a dále pro degradaci rozpustných β -glukanů během rmutování, zejména při použití špatně rozluštěného sladu nebo nesladovaného zrna. Je poměrně termolabilní a při teplotách nad 45 °C rychle ztrácí aktivitu, což velmi omezuje její účinek na degradaci β -glukanů především při isothermickém rmutování (*Briggs et al., 2004*). Jsou známy i mutantní linie ječmene tvořící β -glukanasu stabilní do 51 °C (*Stewart et al., 2001*), ale do běžně pěstovaných odrůd příslušný znak zatím vnesen nebyl.

Laminarinasa (β -1,3-endoglukanhydrolasa, EC 3.2.1.39) je rovněž přítomna v klíčících obilkách a sladu. Má schopnost hydrolyzovat laminarin, strukturální polysacharid chaluž (*Phaeophyceae*), a komplexní houbové β -glukany, ale jejich účinek na obilné β -glukany je v důsledku nepřítomnosti po sobě následujících β (1-3) vazeb velmi omezený. Význam laminarinasy v obilninách je nejasný, ale pravděpodobně souvisí s obranou rostliny proti houbovým patogenům (*Jutidamrongphan et al., 1991*).

Mezi cytasové enzymy dále patří pentosanasy, tj. **endoxylanasa** (β -1,4-endoxylanhydrolasa, EC 3.2.1.8), štěpící β (1-4) vazby mezi xylosovými jednotkami arabinoxylanových řetězců, **α -arabinofuranosidasa** (EC 3.2.1.55), odštěpující koncové arabinosové jednotky z 2 nebo 3 pozic xylosy, **β -xylosidasa** (β -1, 4-xylan xylohydrolasa, EC 3.2.1.37), odštěpující koncové xylosové jednotky z xylanových oligosacharidů vznikajících činností endoxylanasy, a **ferulylesterasa** (EC 3.1.1.73), která hydrolyzuje O-5 esterovou vazbu mezi arabinosou a ferulovou kyselinou (*Harris et Ramalingam, 2010*). Míra degradace arabinoxylanů pentosanasami během klíčení zrna je ve srovnání s β -glukany nižší. Činnost endoxylanasy a ferulylesterasy působí uvolňováním arabinoxylanových molekul z nadmolekulárních komplexů zvyšování obsahu rozpustných arabinoxylanů, činnost arabinofuranosidasy snižuje rozpustnost arabinoxylanů a jejich vliv na viskozitu roztoku (*Briggs et al., 2004*). Volná ferulová kyselina, která se z arabinoxylanů může uvolňovat také působením ferulylesterasy produkované některými kmeny kvasinek, je během kvašení dekarboxylována na 4-vinylguaiakol, sensoricky aktivní látku typickou např. pro německá pšeničná piva, u jiných typů piv ovšem obvykle považovanou za nežádoucí (*Coghe et al., 2004*).

5 VYUŽITELNOST ŽITA A TRITIKALE V PIVOVARNICTVÍ

5.1 Využitelnost žita

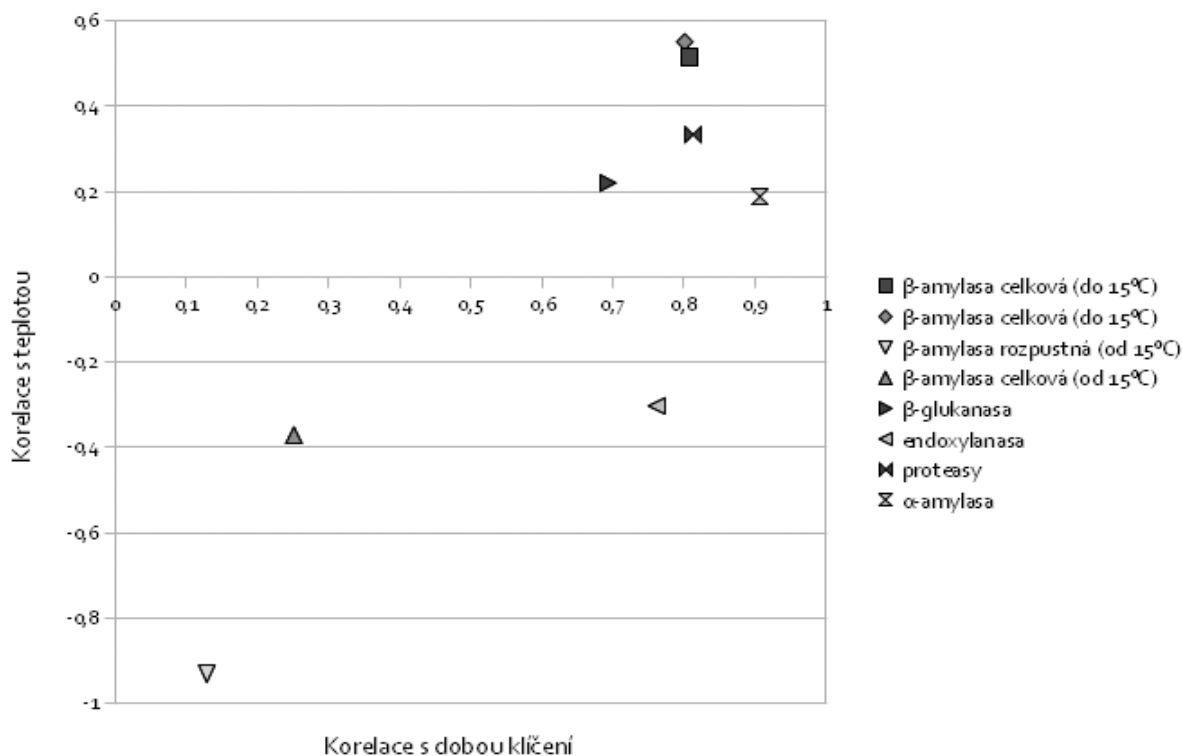
Nesladované žito je považováno za značně problematickou surovinu pro surogaci piva, nad jejímiž pozitivními vlastnostmi, jako je vysoká diastatická aktivita a nízká teplota mazovatění škrobu, výrazně převažují komplikace, které způsobuje především při scezování v důsledku absence pluch, velké schopnosti vázat a zadržovat vodu v nerozpustné frakci a vysoké viskozity sladiny. Při použití klasických scezovacích kádí lze očekávat prodloužení doby scezování o 30% až 50% při použití 10% až 20% podílu žita (*Hayden, 1993*) a o více než 90% při použití 30% podílu nesladovaného žita (*Pomeranz, 1973*). Nežádoucí nárůst viskozity sladiny není možné omezit ani vystavením nesladovaného žita působení sladových enzymů (*Pomeranz, 1973*). Z těchto důvodů se žito obvykle používá v nízkých podílech, nikoliv jako zdroj zkvasitelného extraktu, ale pro ovlivnění sensorických vlastností piva, často také za přidání rýžových pluch pro zlepšení struktury mláta (*Bernstein, 2010; Burnsilver, 2007*).

Při sladování žitného zrna je třeba zohlednit některé jeho vlastnosti vyplývající z absence pluch. Příjem vody žitnou obilkou je rychlejší a postačuje tedy kratší doba máčení. Povrch zrna je po nabobtnání obalových vrstev lepkavější než u ječmene a žitné obilky mají větší tendenci ulpívat jak na vybavení sladovny, tak na sobě navzájem. Klíček je odhalený a náchylný k mechanickému poškození, což je nezbytné při manipulaci s klíčícím žitem brát v úvahu (*Hayden, 1993*).

Yeshajahu Pomeranz at al. ve studii z roku 1973 hodnotili možnosti použití sladovaného žita několika severoamerických odrůd ('Caribou', 'Dominant', 'Elk', 'Frontier', 'Petkus', 'Sangaste', 'Von Lochow' a 'Pearl'). Žito bylo máčeno po dobu 18 hod při teplotě 16 °C do průměrné vlhkosti 45%, klíčeno po dobu 5 dní při teplotě 16 °C a hvozděno 2 hod při teplotě 85 °C. Získané slady byly srovnány s komerčně dostupným ječným sladem odrůdy 'Larker' a laboratorně připravenými slady z ječmene sladovnické odrůdy 'Larker' a krmné odrůdy 'Třebí'. U žitných sladů byla ve srovnání s ječnými slady zjištěna obecně vyšší aktivita α -amylasy, ale poněkud nižší celková diastatická mohutnost, výrazně vyšší absolutní obsah rozpustného dusíku i poměr rozpustného k celkovému dusíku (Kolbachovo číslo), tmavší barva sladiny a vyšší pH. Doba zcukřování žitných rmutů byla výrazně nižší (*Pomeranz, 1973*).

Florian Hübner et al. ve studii z roku 2010 hodnotili vliv podmínek při klíčení zrna na

vlastnosti žitného sladu a z něj vyrobené sladiny. Žito finské odrůdy 'Amilo' bylo máčeno při teplotě 15 °C do vlhkosti 45% a klíčilo při devíti různých kombinacích času (v rozsahu od 48 h do 144 h) a teploty (v rozsahu od 10 °C do 20 °C). Následně bylo žito předsušeno při teplotě 45 °C po dobu 8 hod a dosušeno při teplotě 55 °C po dobu 15 hod. U získaných sladů byla stanovena aktivita proteas, α -amylasy, β -amylasy, β -glukanasy a xylanasy. Sladiny byly připraveny a analyzovány kongresními metodami podle EBC (European Brewing Convention). Obsah rozpustného dusíku nebyl ovlivněn délkou ani teplotou klíčení, obsah volných aminokyselin vzrůstal spolu s délkou klíčení, ale na teplotě byl nezávislý. Extraktivita vzrůstala spolu s délkou klíčení, ale u sladů klíčených po dobu delší než 62 h byl již její nárůst nepatrný. Zkvasitelnost extraktu se pohybovala mezi 73,1% a 77,1% bez zjevné závislosti na času nebo teplotě. Aktivita amylolytických enzymů narůstala s délkou klíčení, v případě α -amylasy nezávisle na teplotě, u β -amylasy byl nárůst nejvyšší při teplotě 15 °C a výrazně se snižoval směrem k oběma extrémům. U β -glukanasy nebyl zjištěn významnější vliv teploty. Aktivita endoxylanasy vzrůstala s dobou klíčení a klesala s teplotou, stejně jako viskozita sladiny. Vztah aktivity studovaných enzymů k teplotě a době klíčení je pomocí korelací graficky znázorněn v obrázku 4. Vztah aktivity β -amylasy k teplotě by z důvodu unimodálního rozložení hodnot nebylo možné korelačním koeficientem popsat, data tedy byla pro účely grafu rozdělena na dva soubory, do 15 °C a od 15 °C. Na základě výsledků této studie je patné, že vlastnosti žitného sladu je možné do značné míry ovlivnit teplotou a dobou klíčení, přičemž jako nejvhodnější pro pivovarnické využití se jeví kombinace dlouhého klíčení za nižších teplot, blízkých 10 °C (*Hübner et al., 2010*).



Obrázek 4: Vztah aktivity enzymů k teplotě a době klíčení žita. Vstupní data převzata z *Hübner et al., 2010*

5.2 Využitelnost tritikale

Vysoká aktivita amylolytických enzymů v zrně tritikale, která omezuje jeho uplatnění jako suroviny v pekařství, se naopak jeví jako výhodná při využití jako pivovarského surogátu a spolu s nízkou teplotou mazovatění škrobu, zejména při srovnání s obtížně mazovatějícími škroby běžněji používaných surogátů kukuřice a rýže, umožňuje zpracování tritikale pomocí postupů rmutování navržených pro slad jen s minimálními předchozími úpravami. Vzhledem k nižšímu obsahu hemicelulos lze předpokládat menší vliv nesladovaného tritikale na viskozitu sladiny.

Jens Glatthar et al. ve studii z roku 2005 hodnotili vhodnost tří ozimých odrůd tritikale ('Trinidad', 'Lamberto' a 'Fidelio') pro využití k výrobě piva v nesladovaném stavu a srovnávali jejich vlastnosti s nesladovanou pšenicí ozimých odrůd 'Batis' a 'Flair'. Jejich metoda zahrnovala inkubaci suspenze směsi nesladovaného tritikale, případně pšenice, a ječného sladu v poměru 9:1 ve vodě při teplotě 64 °C po dobu 10 min, doplnění tohoto dílčího rmutu ječným sladem a vodou na poměr 1:1 a teplotu 50 °C a prodlevu při této teplotě po dobu 40 min. Následovaly prodlevy 60 min při teplotě 63 °C, 35 min při teplotě 70 °C a 10 min při teplotě 77 °C. Získané sladiny vykazovaly ve srovnání jak s čistým ječným sladem, tak se sladem s přidavkem

nesladované pšenice vesměs zvýšenou barvu, viskozitu a obsah pentosanů. Hodnoty pH byly u tritikale i pšenice oproti čistému ječnému sladu vyšší. Z hodnocených odrůd tritikale se jako nejvhodnější pro surogaci jeví 'Trinidad' s nejvyšším obsahem zkvasitelného extraktu a nejnižší viskozitou sladiny. Autoři zde navrhuji, aby se případné šlechtění tritikale pro pivovarské účely zaměřilo na zvyšování obsahu škrobu a snižování obsahu dusíku (*Glatthar, 2005*).

Ve studii z roku 1973 Y. Pomeranz et al. analyzovali vlastnosti sladu, sladiny a piva z devíti různých linií tritikale. Ve srovnání s ječmenem měla sladina a pivo obecně tmavší barvu, vyšší pH a aktivitu diastatických enzymů, přičemž mezi jednotlivými liniemi byly zjištěny značné rozdíly, především v aktivitě α -amylasy (*Arendt et Zannini, 2013*).

Olgica Grujić et al. se ve dvou studiích z let 2007 a 2009 zabývali vlivem použití jak nesladovaného, tak sladovaného tritikale v různých poměrech k ječnému sladu. V rámci první ze zmíněných studií bylo tritikale odrůd 'Odisej', 'AD 52', 'NS Tritic' sladováno standardním postupem pomocí mikroskladovacího zařízení „Seeger“ a použito v podílech 10%, 30%, 50% a 70% celkového sypání. Rmutování bylo provedeno infuzně s prodlevami 30 min při teplotě 45 °C a 60 min při teplotě 70 °C. Ve všech případech působil přídavek sladovaného tritikale zvýšení obsahu extraktu v mladině, zkrácení doby zcukřování (pod 10 min oproti 15 min u čistého ječného sladu), prodloužení doby stékání a viskozity, zvýšení obsahu rozpustného dusíku, pH a barvy a snížení prokvasitelnosti. Obsah extraktu byl nejvyšší při použití 10% podílu sladu z tritikale a se zvyšujícím se podílem mírně klesal. Doba stékání byla výrazně delší u odrůd 'AD 52', 'NS Tritic' v podílech 50% a 70%, v případě odrůdy 'Odisej' byla vyšší než u kontrolní sladiny z čistého ječného sladu, nebyla však podílem tritikale ovlivněna. Na změnu barvy mladiny měla větší vliv použitá odrůda, než její poměr k ječnému sladu, největší nárůst byl zaznamenán u 'AD 52' a nejmenší u 'Odisej'. Při použití odrůdy 'NS Tritic' bylo dosaženo vyšší prokvasitelnosti než u kontrolní sladiny (*Grujić et al., 2007*).

V druhé studii bylo obdobným způsobem hodnoceno použití nesladovaného tritikale odrůdy 'NST 3/07' v podílech 20%, 40%, 50% a 60% za přídavku komerčního enzymového preparátu Ultraflo max s β -glukanasovou aktivitou. S výjimkou doby zcukřování, která se prodloužila, mělo nesladované tritikale 'NST 3/07' ve srovnání s třemi odrůdami hodnocenými v předchozí studii překvapivě výrazně menší vliv na vlastnosti sladiny oproti kontrolnímu vzorku, jak s přídavkem enzymu, tak bez něj. Přídavek enzymu napomohl snížení viskozity a zvýšení získaného extraktu a prokvasitelnosti u sladin s obsahem tritikale nad 40% (*Grujić et al., 2007*).

6 ZÁVĚR

Jednou ze společných vlastností žita a tritikale, významných pro jejich pivovarskou využitelnost, je velký podíl proteinů v zrně a z něj plynoucí vysoký obsah rozpustného dusíku v mladině, což má důsledky jak negativní, tedy nízkou koloidní stabilitu piva a zvýšenou tvorbu zákalů, tak pozitivní, tedy dostatek asimilovatelného dusíku pro kvasinky. Této vlastnosti by se dalo snadno využít při výrobě piv s vysokým podílem surogátů bezdusíkatých a chudých na dusík, kde by přídavek tritikale nebo žita mohl sloužit k navýšení obsahu dusíku na optimální úroveň.

Tritikale se z obou obilovin jeví jako podstatně nadějnější pivovarská surovina a dosavadní studie naznačují, že by jeho použití ve větších podílech jako zdroje škrobu nemuselo přinášet vážnější komplikace. Slad z tritikale by díky své vynikající amylolytické aktivitě mohl být využit jako alternativa k ječnému sladu pro zpracování diastaticky slabých surogátů.

Nesladované žito se v důsledku značného vlivu na viskozitu sladiny nezdá být vhodným zdrojem škrobu pro surogaci a jeho pivovarnický význam spočívá pouze v použití malých podílů za účelem ovlivnění sensorických vlastností piva. Při použití žita ve větších množstvích by bylo třeba zvážit přídavek exogenních enzymů pro účinnější degradaci rozpustných hemicelulos, případně redukčních činidel pro omezení oxidativního gelovatění pentosanů. Žitný slad, přestože jsou jeho vlastnosti pro pivovarnické využití podstatně příznivější, s sebou nese nevýhody v podobě náročného sladování, kdy vyžaduje dlouhé klíčení a šetrnou manipulaci. Jeho hlavní hodnota spočívá, stejně jako u nesladovaného žita, ve vlivu na sensorické vlastnosti a tím v použitelnosti pro výrobu minoritních typů piva, ať už experimentálních nebo tradičních.

Některé další obiloviny zohledněné v této práci mají význam především v suchých tropických oblastech, kde ječmen v důsledku místní nedostupnosti představuje příliš nákladnou surovinu. V Evropě a ostatních oblastech pěstování ječmene jejich hodnota spočívá ve vhodnosti pro výrobu bezlepkového piva. Rýže a čirok, obiloviny k tomuto účelu nejčastěji využívané, se ovšem nevyznačují příliš vysokou enzymatickou aktivitou, bylo by tedy vhodné věnovat větší pozornost obilovinám schopným dosáhnout při klíčení vyšší diastatické mohutnosti, např. proso, korakan a především tef.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- D'Andrea, A. C., D. E. Lyons, Mitiku Haile, and E. A. Butler. "Ethnoarchaeological Approaches to the Study of Prehistoric Agriculture in the Ethiopian Highlands." *The Exploitation of Plant Resources in Ancient Africa*. By Marijke Van Der. Veen. New York: Kluwer Academic/Plenum, 1999. 101-22.
- Arendt, Elke, and Emanuele Zannini. "Triticale." *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. Oxford: Woodhead Pub., 2013. 201-19.
- Asgher, M., M. Javaid Asad, S.U. Rahman, and R.I. Legge. "A Thermostable α -amylase from a Moderately Thermophilic *Bacillus Subtilis* Strain for Starch Processing." *Journal of Food Engineering* 79.3 (2007): 950-55.
- Baltensperger, David D. "Progress with Proso, Pearl and Other Millets." *Trends in New Crops and New Uses: Proceedings of the Fifth National Symposium New Crops and New Uses Strength in Diversity*, Atlanta, Georgia, November 10-13, 2001. Ed. Jules Janick and Anna Whipkey. Alexandria: ASHS, 2002. 100-03.
- Barrington, Robert. "Fibre Does Not Delay Gastric Emptying." Web log post. *RdB Nutrition*. Robert Barrington, 23 Dec. 2012.
- Behre, Karl-Ernst. "The History of Rye Cultivation in Europe." *Vegetation History and Archaeobotany* 1.3 (1992): 141-156.
- Bernstein, Joshua M. "Rye Beers." *Imbibe Magazine*. Imbibe Media Inc., 20 Dec. 2010.
- Bidlack, Jim, Mike Malone, and Russell Benson. "Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants." *The Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 72 (1992): 51-56. Oklahoma State University.

- Board on Science and Technology for International Development. "Pearl Millet." *Lost Crops of Africa: Volume I: Grains*. N.p.: National Academies, 1996. 77-92.
- Briggs, D. E., C. A. Boulton, P. A. Brookes, and R. Stevens. *Brewing: Science and Practice*. Boca Raton: CRC, 2004.
- Brijs, Kristof, Isabel Trogh, Berne L. Jones, and Jan A. Delcour. "Proteolytic Enzymes in Germinating Rye Grains." *Cereal Chemistry* 79.3 (2002): 423-28.
- Burnsilver, Glenn. "Brewing With Rye: Tips from the Pros." *Brew Your Own* Mar.-Apr. 2007: n. pag. Web.
- Coghe, Stefan, Koen Benoot, Filip Delvaux, Bart Vanderhaegen, and Freddy R. Delvaux. "Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52.3 (2004): 602-08.
- Delcour, Jan A., and R. Carl. Hoseney. *Principles of Cereal Science and Technology*. St. Paul, MN: AACC International, 2010.
- Gebremariam, Mekonnen M., Martin Zarnkow, and Thomas Becker. "Effect of Teff (*Eragrostis Tef*) Variety and Storage on Malt Quality Attributes." *Journal of the Institute of Brewing* 119.1-2 (2013): 64-70.
- Glatthar, Jens, Juergen J. Heinisch, and Thomas Senn. "Unmalted Triticale Cultivars as Brewing Adjuncts: Effects of Enzyme Activities and Composition on Beer Wort Quality." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85.4 (2005): 647-54.
- Goesaert, H., K. Brijs, W.S. Veraverbeke, C.M. Courtin, K. Gebruers, and J.A. Delcour. "Wheat Flour Constituents: How They Impact Bread Quality, and How to Impact Their Functionality." *Trends in Food Science & Technology* 16.1-3 (2005): 12-30.

- Goesaert, Hans, Louise Slade, Harry Levine, and Jan A. Delcour. "Amylases and Bread Firming - an Integrated View." *Journal of Cereal Science* 50.3 (2009): 345-52.
- Grujić, Olgica, Uroš Miljić, and Jelena Pejin. "The Application of Triticale Instead of Barley Malt in the Beer Wort Production." *Food Processing, Quality and Safety* 1-2 (2009): 7-13.
- Grujić, Olgica, and Jelena Pejin. "The Application of Triticale Malt as the Substitute for Barley Malt in Wort Production." *Acta Periodica Technologica* 38 (2007): 117-26.
- Hancock, J. F. *Plant Evolution and the Origin of Crop Species*. 2nd ed. S.l.: CABI, 2012.
- Harris, A. D., and C. Ramalingam. "Xylanases and Its Application in Food Industry: A Review." *Journal of Experimental Sciences* 1.7 (2010): 1-11.
- Hayden, Rosannah. "Brewing with Rye." *Brewing Techniques* Sept.-Oct. 1993: n. pag. Web.
- Hoy, J. L., B. J. Macauley, and G. B. Fincher. "Cellulases Of Plant And Microbial Origin In Germinating Barley." *Journal of the Institute of Brewing* 87.2 (1981): 77-80.
- Hübner, Florian, Beatus D. Schehl, Kurt Gebruers, Christophe M. Courtin, Jan A. Delcour, and Elke K. Arendt. "Influence of Germination Time and Temperature on the Properties of Rye Malt and Rye Malt Based Worts." *Journal of Cereal Science* 52.1 (2010): 72-79.
- Izydorczyk, Marta S., and Costas G. Biliaderis. "Cereal Arabinoxylans: Advances in Structure and Physicochemical Properties." *Carbohydrate Polymers* 28.1 (1995): 33-48.
- Izydorczyk, M.S., and J.E. Dexter. "Barley β -glucans and Arabinoxylans: Molecular Structure, Physicochemical Properties, and Uses in Food Products-a Review." *Food Research International* 41.9 (2008): 850-68.
- Jones, Berne L. "Endoproteases of Barley and Malt." *Journal of Cereal Science* 42.2 (2005): 139-56.

- Jones, Berne L., and Allen D. Budde. "How Various Malt Endoproteinase Classes Affect Wort Soluble Protein Levels." *Journal of Cereal Science* 41.1 (2005): 95-106.
- Jutidamrongphan, W., J. B. Anderson, G. Mackinnon, J. M. Manners, R. S. Simpson, and K. J. Scott. "Induction of Beta-1,3-glucanase in Barley in Response to Infection by Fungal Pathogens." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4.3 (1991): 234-38.
- Koehler, Peter, and Herbert Wieser. "Chemistry of Cereal Grains." *Handbook on Sourdough Biotechnology*. By Marco Gobbetti and Michael Gänzle. New York: Springer, 2013.
- Kropáč, Z., and A. Kropáčová. "Bér." *Naučný Slovník Zemědělský*. Comp. V. Stehlík. Vol. 1. Praha: Ústav Vědeckotechnických Informací Pro Zemědělství, 1966.
- Lazaridou, A., C. G. Biliaderis, and Marta S. Izydorczyk. "Cereal B-glucans: Structures, Physical Properties, and Physiological Functions." *Functional Food Carbohydrates*. By Costas G. Biliaderis and Marta S. Izydorczyk. Boca Raton: CRC, 2007. 1-72.
- Lloyd, W. J. W. "Adjuncts." *Journal of the Institute of Brewing* 92.4 (1986): 336-45.
- Malleshi, N. G., and H. S. R. Desikachar. "Influence Of Malting Conditions On Quality Of Finger Millet Malt." *Journal of the Institute of Brewing* 92.1 (1986): 81-83.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M. M. Goodman, J. G. Sanchez, E. Buckler, and J. Doebley. "A Single Domestication for Maize Shown by Multilocus Microsatellite Genotyping." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.9 (2002): 6080-084.
- Meussdoerffer, Franz G. "A Comprehensive History of Beer Brewing." *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. By Hans Michael. Esslinger. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. 1-42.
- Meussdoerffer, Franz, and Martin Zarnkow. "Starchy Raw Materials." *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. By Hans Michael. Esslinger. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. 43-84.

- Molina, J., M. Sikora, N. Garud, J. M. Flowers, S. Rubinstein, A. Reynolds, P. Huang, S. Jackson, B. A. Schaal, C. D. Bustamante, A. R. Boyko, and M. D. Purugganan. "Molecular Evidence for a Single Evolutionary Origin of Domesticated Rice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.20 (2011): 8351-356.
- Møller, Marie Sofie. Structure, Function and Protein Engineering in Starch Debranching Enzyme Systems. Barley Limit Dextrinase and Its Endogenous Inhibitor. Thesis. Kgs. Lyngby: Technical University of Denmark, 2013.
- Nakamura, Yasunori. "Some Properties of Starch Debranching Enzymes and Their Possible Role in Amylopectin Biosynthesis." *Plant Science* 121.1 (1996): 1-18.
- Nout, M. J. R., and B. J. Davies. "Malting Characteristics Of Finger Millet, Sorghum And Barley." *Journal of the Institute of Brewing* 88.3 (1982): 157-63.
- Nzelibe, Humphrey C., and Chris C. Nwasike. "The Brewing Potential Of "Acha" (*Digitaria exilis*) Malt Compared With Pearl Millet (*Pennisetum typhoides*) Malts And Sorghum (*Sorghum bicolor*) Malts." *Journal of the Institute of Brewing* 101.5 (1995): 345-50.
- Obilana, A. B., and E. Manyasa. "Millets." *Pseudocereals and Less Common Cereals: Grain Properties and Utilization Potential*. By P. S. Belton and J. R. N. Taylor. Berlin: Springer, 2002. 177-219.
- Osuntogun, B. A., S. A. Adewusi, J. O. Ogundiwin, and C. C. Nwasike. "Effect of Cultivar, Steeping, and Malting on Tannin, Total Polyphenol, and Cyanide Content of Nigerian Sorghum." *Cereal Chemistry* 66.2 (1989): 87-89.
- Osvačilová, V. "Obilka." *Naučný Slovník Zemědělský*. Comp. V. Stehlík. Vol. 5. Praha: Ústav Vědeckotechnických Informací Pro Zemědělství, 1972.
- Owuama, Chikezie I. "Brewing Beer with Sorghum." *Journal of the Institute of Brewing* 105.1 (1999): 23-34.

- Pelembe, L. A. M., J. Dewar, and J. R. N. Taylor. "Effect of Germination Moisture and Time on Pearl Millet Malt Quality - With Respect to Its Opaque and Lager Beer Brewing Potential." *Journal of the Institute of Brewing* 110.4 (2004): 320-25.
- Petr, Jiří. *Žito a Tritikale: Biologie, Pěstování, Kvalita a Využití*. 1. ed. Praha: Profi Press, 2008.
- Pliny the Elder, John Bostock, and Henry T. Riley. *The Natural History of Pliny*. London: G. Bell, 1887.
- Pollock, C. J. "Tansley Review No. 5: Fructans And The Metabolism Of Sucrose In Vascular Plants." *New Phytologist* 104.1 (1986): 1-24.
- Pomeranz, Y., N. N. Standridge, J. J. Schreck, and E. D. Goplin. "Rye in Malting and Brewing." *Crop Science* 13.2 (1973): 213-15.
- Preece, I. A., and R. Hobkirk. "Non-Starchy Polysaccharides Of Cereal Grains Iii. Higher Molecular Gums Of Common Cereals." *Journal of the Institute of Brewing* 59.5 (1953): 385-92.
- Rakha, A., P. Åman, and R. Andersson. "Dietary Fiber in Triticale Grain: Variation in Content, Composition, and Molecular Weight Distribution of Extractable Components." *Journal of Cereal Science* 54.3 (2011): 324-31., 2011.
- Rovenská, Blanka. *Anatomický Atlas Žita*. 1. vyd. Praha: Academia, nakladatelství Československé Akademie Věd, 1973.
- Sabatino, Antonio Di, and Gino Roberto Corazza. "Coeliac Disease." *The Lancet* 373.9673 (2009): 1480-493.
- von Sachs, Julius. *Vorlesungen Uber Pflanzen-Physiologie*. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1882.

- Selinus, Ruth. *The Traditional Foods of the Central Ethiopian Highlands*. Rep. no. 7. Seattle: Harborview Medical Center, 1971.
- Serna-Saldívar, Sergio O. "Production of Malts, Beers, Alcohol Spirits, and Fuel Ethanol." *Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes*. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 2010. 417-62.
- Shayo, N. B., B. M. P. Tiisekwa, H. S. Laswai, and J. R. Kimaro. "Malting Characteristics of Tanzania Finger Millet Varieties." *LISHE: Tanzania Food and Nutritional Journal* 10.1 (2001): 1-4.
- Shewale, S. D., and A. B. Pandit. "Uses of Sorghum and Value Addition." Ed. Tomás D. Pereira. *Sorghum: Cultivation, Varieties and Uses*. New York: Nova Science, 2011. 1-44.
- Shewry, P. R., and N. G. Halford. "Cereal Seed Storage Proteins: Structures, Properties and Role in Grain Utilization." *Journal of Experimental Botany* 53.370 (2002): 947-58.
- Sorghum and Millets in Human Nutrition*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995. FAO Document Repository.
- Stewart, R. J., J. N. Varghese, T. P. J. Garret, P. B. Høj, and G. B. Fincher. "Mutant Barley (1-3,1-4)-beta-glucan Endohydrolases with Enhanced Thermostability." *Protein Engineering* 14.4 (2001): 245-53.
- Taylor, J. R. N., B. C. Dlamini, and J. Kruger. "125th Anniversary Review: The Science of the Tropical Cereals Sorghum, Maize and Rice in Relation to Lager Beer Brewing." *Journal of the Institute of Brewing* 119.1-2 (2013): 1-14.
- Taylor, John R.N., Tilman J. Schober, and Scott R. Bean. "Novel Food and Non-food Uses for Sorghum and Millets." *Journal of Cereal Science* 44.3 (2006): 252-71.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2011. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24.

- Vansteenkiste, E., C. Babot, X. Rouau, and V. Micard. "Oxidative Gelation of Feruloylated Arabinoxylan as Affected by Protein. Influence on Protein Enzymatic Hydrolysis." *Food Hydrocolloids* 18.4 (2004): 557-64.
- Verspreet, Joran, Emmie Dornez, Wim Van Den Ende, Jan A. Delcour, and Christophe M. Courtin. "Cereal Grain Fructans: Structure, Variability and Potential Health Effects." *Trends in Food Science & Technology* 43.1 (2015): 32-42.
- Vinkx, C.J.A., and J.A. Delcour. "Rye (*Secale Cereale* L.) Arabinoxylans: A Critical Review." *Journal of Cereal Science* 24.1 (1996): 1-14.
- de Wet, J. M. J., L. L. Oestry-Stidd, and J. I. Cubero. "Origins and Evolution of Foxtail Millets (*Setaria italica*)." *Journal D'agriculture Traditionnelle Et De Botanique Appliquée* 26.1 (1979): 53-64.
- Wilhelmi, Christian, and Keith Morgan. "The Hydrolysis of Barley β -glucan by the Cellulase EC 3.2.1.4 under Dilute Conditions Is Identical to That of Barley Solubilase." *Carbohydrate Research* 330.3 (2001): 373-80.
- Wray, Ed. "Producing Gluten-free Beer." *Campden BRI Newsletter* (Nov. 2014): 1.
- Zarnkow, Martin, Matthias Keßler, Werner Back, Elke K. Arendt, and Martina Gastl. "Optimisation of the Mashing Procedure for 100% Malted Proso Millet (*Panicum Miliaceum* L.) as a Raw Material for Gluten-free Beverages and Beers." *Journal of the Institute of Brewing* 116.2 (2010): 141-50.