



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**SLEDOVÁNÍ OBSAHU LEPKU V ODRŮDÁCH
JEČMENE DOPORUČENÝCH PRO VÝROBU
ČESKÉHO PIVA**

MONITORING OF GLUTEN CONTENT IN BARLEY VARIETIES RECOMMENDED FOR THE
PRODUCTION OF CZECH BEER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Nikola Barčinová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zdeněk Svoboda, DiS.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1789/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Nikola Barčinová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie
Vedoucí práce: **Ing. Zdeněk Svoboda, DiS.**

Název bakalářské práce:

Sledování obsahu lepku v odrůdách ječmene doporučených pro výrobu Českého piva

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše na téma lepek, ječmen doporučený pro české pivo, obsah lepku v ječmeni a možnosti jeho stanovení
2. stanovení obsahu lepku metodou ELISA
3. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Nikola Barčinová
studentka

Ing. Zdeněk Svoboda, DiS.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTARKT

Na stanovenie obsahu lepku v odrodách jačmeňa doporučených pre výrobu Českého piva bola použitá sendvičová imunoanalýza ELISA. Je to momentálne najpoužívanejšia metóda na stanovenie lepku v potravinárskom priemysle.

Sledovanie obsahu lepku v surovinách a potravinách z nich vyrobených je dôležité hlavne pre ľudí trpiacich celiakiou. Intolerancia lepku je autoimunitné ochorenie, ktoré spôsobuje morfológické a funkčné zmeny tenkého čreva. Momentálne je jej najúčinnějšíou liečbou dodržiavanie bezlepkovej diéty.

V rámci bakalárskej práce bol sledovaný obsah lepku v 14 vzorkách jačmeňa. Na meranie bol použitý set RIDASCREEN® Gliadin. Výsledky boli spracované pomocou softwaru RIDA SOFT Win.NET. Obsah lepku sa vo vzorkách jačmeňa pohyboval v rozmedzí od 36,3 g/kg do 82,5 g/kg.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Lepok, jačmeň, celiakia, České pivo, ELISA

ABSTRACT

Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay ELISA was used for determination of gluten in barley varieties recommended for the production of Czech beer. Currently, it is the most widely used method for determining gluten in the food industry.

Monitoring the gluten content in raw materials and foods made from them is especially important for people suffering from celiac disease. Gluten intolerance is an autoimmune disorder that causes morphological and functional changes in the small intestine. Currently, the most effective treatment is following a gluten-free diet.

In this bachelor thesis, content of gluten in 14 barley samples was monitored. The RIDASCREEN® Gliadin set was used for the measurement. Results were evaluated with RIDA SOFT Win.NET software. Content of gluten in the barley samples varied from 36,3 g/kg to 82,5 g/kg.

KEYWORDS

Gluten, barley, celiac disease, Czech beer, ELISA

BARČINOVÁ, Nikola. Sledování obsahu lepku v odrůdách ječmene doporučených pro výrobu Českého piva [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147988>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Zdeněk Svoboda.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Chcela by som poďakovať vedúcemu bakalárskej práce Ing. Zdeněk Svoboda, DiS. za účinnú metodickú, pedagogickú a odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovaní mojej bakalárskej práce. Poďakovanie tiež patrí pani Doc. RNDr. Renatě Mikulíkové, Ph.D. za pomoc pri riešení problematiky experimentálnej časti tejto bakalárky.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
2.1	Jačmeň.....	8
2.1.1	Charakteristika	8
2.1.2	Anatómia a morfológia.....	9
2.1.2.1	Koreňová sústava	9
2.1.2.2	Steblo.....	9
2.1.2.3	Listy.....	9
2.1.2.4	Kvetenstvo a kvet	9
2.1.2.5	Obilka	10
2.2	Chemické zloženie jačmeňa	12
2.2.1	Sacharidy	12
2.2.2	Bielkoviny	13
2.2.2.1	Enzýmy.....	14
2.2.3	Lipidy	14
2.2.4	Vitamíny a minerálne látky	15
2.3	Využitie jačmeňa.....	16
2.3.1	Využitie pri výrobe sladu a piva	16
2.3.1.1	Výroba sladu	16
2.3.1.2	Výroba piva	21
2.3.2	České pivo.....	25
2.3.3	Zdravotne významné látky v slade a pive	26
2.4	Lepok.....	27
2.4.1	Celiakia.....	28

2.4.2	Bezlepkové pivo	29
2.5	Analýza bielkovín	30
2.5.1	Dôkazové stanovenia bielkovín	30
2.5.2	Stanovenie bielkovín	30
2.5.3	Stanovenie lepkových bielkovín metódou ELISA	30
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	32
3.1	Použité chemikálie a laboratórne vybavenie	32
3.1.1	Chemikálie, roztoky, materiály	32
3.1.2	Prístroje a zariadenia	32
3.2	Použité vzorky	32
3.3	Analýza lepku	34
3.3.1	Príprava vzoriek	34
3.3.2	Stanovenie lepku ELISA kitom	34
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	35
4.1	Validácia metódy	35
4.1.1	Výpočet neistôt merania	36
4.2	Výpočty a vyhodnotenie	37
4.3	Porovnanie množstva lepku v jednotlivých odrodách	38
4.4	Porovnanie výsledkov obsahov lepku a dusíkatých látok	40
5	ZÁVER	41
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	42
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	47
8	ZOZNAM PRÍLOH	48

1 ÚVOD

Lepok je obilná bielkovina, ktorá je významná v potravinárskom priemysle pre jej senzorické a technologické vlastnosti, ale aj pre jej negatívny vplyv na ľudský organizmus. Spôsobuje množstvo imunopatologických ochorení napr. celiakiu. Vyskytuje sa v pšenici, žite, ovse ale aj jačmeni.

Jačmeň je známy pre svoje využitie pri výrobe sladu a následne piva. V závislosti na obsah lepku je pre ľudí s celiakiou nevhodnou surovinou ako aj všetky produkty z neho vyrobené. Preto sa hľadajú spôsoby ako by mohli byť niektoré tradičné pochutiny a nápoje bezpečné aj pre ľudí s intoleranciou na lepok. V dnešnej dobe existuje viacero spôsobov prípravy bezlepkového piva. Jednou z možností je použitie alternatívnych obilnín ako napr. ciroku. Ďalšou možnosťou je použitie odrody jačmeňa a pšenice s nižším obsahom lepku, ktorý sa pri procese výroby sladu a piva eliminuje, degraduje. V neposlednej rade sa využíva enzymatická degradácia lepkových bielkovín.

Celiakia je autoimunitné ochorenie, ktoré postihuje asi 1% populácie západnej Európy. Spôsobuje morfológické zmeny tenkého čreva, ktoré vedú k zmene absorpcie živín. Príznaky tohto ochorenia sú rôznorodé, ale medzi základné patria poruchy trávenia, plynatosť, kŕče, hnačky a redukcia hmotnosti. U ľudí trpiacich celiakiou či precitlivosťou na lepok je väčšia predispozícia na výskyt osteoporózy či anémie. Zatiaľ najúčinnjšou liečbou tohto ochorenia je bezlepková diéta. Základným princípom tejto diéty je prijímanie potravín, ktorých obsah lepku je nižší ako 20 mg/kg. Tieto suroviny sú charakteristické pre vysoký obsah sacharidov a nízky obsah vlákniny, čo môže viesť k ďalším ochoreniam.

V súčasnosti existuje viacero metód na analýzu obilných bielkovín, ktoré vychádzajú zo základných inštrumentálnych metód. Jednou z najpoužívanejších analýz je imunoanalýza ELISA, ktorá sa používa buď v kompetitívnom alebo sendvičovom prevedení. Základným rozdielom medzi jednotlivými súpravami sú druhy protilátok, spôsob prípravy vzoriek či samotné použitie referenčných a kalibračných materiálov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Jačmeň

2.1.1 Charakteristika

Jačmeň patrí do čeľade lipnicovitých (Poaceae) a je významnou historickou obilninou, ktorá má v oblasti ľudskej výživy dôležité postavenie. História jeho pestovania siaha do obdobia 5. stor. p. n. l. do oblasti Ázie, odkiaľ sa táto plodina začala šíriť ďalej do Európy [1] [3]. Jačmeň môžeme rozdeliť podľa využitia do štyroch základných kategórií:

Jačmeň krmny – Do tejto kategórie zaradujeme jačmeň viacradový aj dvojradový, formy ozimné aj jarné, pluchaté aj bezpluché. K hlavným požiadavkám pre krmny jačmeň je vysoký obsah bielkovín, esenciálnych aminokyselín, škrobu a nízky obsah β -glukanov.

Jačmeň sladovnícky – V Českej republike prevažuje na výrobu sladu jarný jačmeň, ktorého požiadavky určuje norma ČSN 46 1100-5. Akosť je ovplyvnená napríklad obsahom bielkovín, β -glukanov, podielom predného zrna a klíčivosťou. Na kvalitu sladovníckeho jačmeňa má rovnako vplyv počasie a pôda.

Jačmeň priemyselný – Hlavným využitím jarného jačmeňa v priemysle je pri výrobe etanolu, škrobu, detergentov a farmaceutických prípravkov.

Jačmeň potravinársky – Používa sa na výrobu funkčných potravín, v ktorých sa uplatňuje účinok β -glukanov, α -tokotrienolu a antioxidantov na zníženie obsahu cholesterolu v krvi. Zrno jačmeňa sa využíva na výrobu krúp, vločiek, farmaceutických preparátov či potravinových doplnkov [1] [2].

Všetky odrody jačmeňa vychádzajú z druhu *jačmeňa siateho* (*Hordeum vulgare L.*), ktorý sa rozdeľuje na základné dva druhy:

- *Jačmeň siaty viacradový* (*Hordeum vulgare, convar. vulgare*)
- *Jačmeň siaty dvojradový* (*Hordeum vulgare, convar. distichon*)

Ďalšie delenie je v závislosti na období sadenia:

Jačmeň jarný – Preferuje sa prevažne na výrobu sladu a ako krmovina. Pestovanie je ovplyvnené hlavne kyslosťou pôdy, čo má vplyv na celkovú kvalitu jačmeňa. Jeho pestovanie je preto nevhodné v oblastiach postihnutých emisiami, ktoré by mali negatívny vplyv nielen na samotnú obilninu, ale aj na kyslosť pôdy.

Jačmeň ozimný – Jeho pestovanie je vhodné aj na menej úrodných pôdach, nie je náročný na podmienky, ale je náchylný na skoré sadenie. Je výrazne úrodnejší ako jarný jačmeň. Preto sa pestovanie dvojradového jačmeňa v ozimnej forme preferuje viac, v dôsledku väčšieho využitia v potravinárskom priemysle (výroba etanolu, whisky a krúp) a ako krmivo pre zvieratá [1].

2.1.2 Anatómia a morfológia

2.1.2.1 Koreňová sústava

Hlavnou funkciou koreňovej sústavy je stabilizovanie rastliny v pôde, čerpanie živín z pôdy, ich transport do celej rastliny a syntéza významných organických látok. Jačmeň má zväzkové korene, ktoré rozdeľujeme na primárne a sekundárne. Sekundárne sú mohutnejšie a vyrastajú z bazálnych uzlov. Primárne zasahujú až do hĺbky 140 cm a zastávajú dôležitú úlohu v období sucha pri udržovaní vlhkosti. Tvorba koreňovej sústavy sa neustále počas vegetatívnej fázy mení. Jej rast je ovplyvnený nie len vlhkosťou, živinami či vlastnosťami pôdy ale aj okolitými rastlinami. Na začiatku klíčenia obilky je v zárodku 5 – 6 a aj viac zárodočných korienkov. Základom primárneho koreňa je prostredný koreň – radícula, z ktorého postupne vyrastajú ďalšie korene. Považujú sa za sekundárne (adventívne) a stavebne sa líšia od primárneho. Prevažná časť koreňovej sústavy sa nachádza v hornej časti pôdy. Koreňové vlásky sa nachádzajú hlavne v strednej časti koreňovej sústavy a dotýkajú sa pôdných častíc. Zvyšujú absorpciu vlhky z pôdy a pri jej nedostatku vysychajú. Preto dlhodobé suchá negatívne vplyvajú na celkový rast rastliny. Vo vegetatívnej fáze dochádza k veľkej spotrebe dusíka a minerálnych látok rastlinou. Preto sa zväčšuje aj koreňová sústava. Jej dôležitou súčasťou sú cievné zväzky, ktorých stavba sa rozdeľuje na lykovú a drevnatú časť. Lyková časť má za úlohu transport organických živín a drevnatá časť minerálnych látok z podzemných častí rastliny do nadzemných [1] [4].

2.1.2.2 Steblo

Steblo spája jednotlivé anatomické časti (listy, kvety, korene) a tvorí celkovú oporu rastliny. U jačmeňa je duté a dosahuje výšku od 50-130 cm. Skladá sa z uzlov a článkov. Uzly sa nazývajú aj kolienka, oddeľujú jednotlivé články. Z uzlov vyrastajú jednotlivé listy a posledný nesie základ okvetia. Steblo obsahuje 5-8 článkov, na ktorých sa nachádzajú listové pošvy a tým steblo spevňujú. Steny sú pokryté z vonkajšej strany pokožkou, pod ktorou sa nachádza parenchymatické pletivo. Toto pletivo je tvorené chloroplastami spolu s chlorofylom. Vnútorňá časť steny je tiež pokrytá parenchymatickým pletivom. V stene sa nachádzajú cievné zväzky, ktoré rozvádzajú organické látky z koreňovej sústavy ďalej do rastliny. Celková stavba stebľa je do značnej miery ovplyvnená odrodou, hnojením a celkovým obsahom lignínu a celulózy [1] [4].

2.1.2.3 Listy

Listy pri jačmeni sú striedavé, pravotočivé, dvojradové a vyrastajú z uzlov. Čepel listu je špicatá a čiarkovaná. Sú dôležité z hľadiska výmeny plynov v procese fotosyntézy a vyparovania vody. Listy jačmeňa majú svetlozelenú farbu, ktorá ho odlišuje od ostatných obilnín. Plocha listu je na jednej strane širšia ako na druhej. Listy z vonkajšej strany a rovnako aj celá rastlina sú chránené krycím pletivom - pokožkou pokrytou voskom – kutikulou. Kutikula chráni rastlinu pred patogénmi, slnečným žiarením a nadmerným odparovaním vody [4].

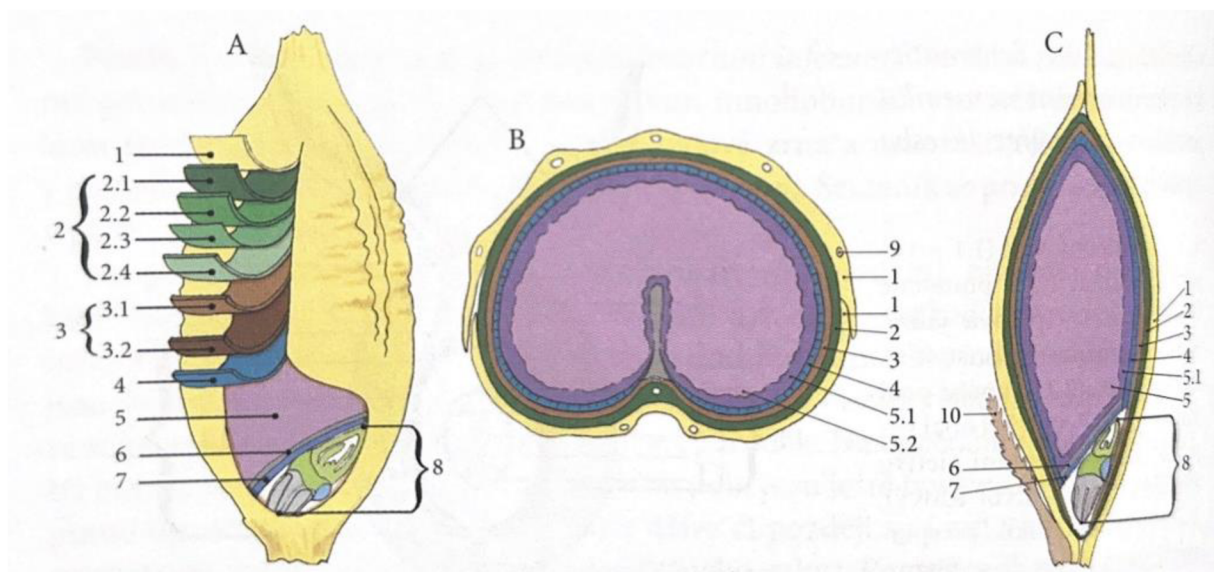
2.1.2.4 Kvetenstvo a kvet

Kvetenstvo je u jačmeňa nepravý klas - lichoklas. Klásky sú tvorené kvietkami, ktoré sú tvorené pluchou a pluškou. Vnútri sa nachádzajú samčie pohlavné orgány (3 tyčinky) a jeden

samčí orgán (piestik). Kvet jačmeňa je teda obojpohlavný a tým pádom je schopný samooplodnenia. Samotný piestik je tvorený semenníkom, čnelkou a dvoma perovými bliznami pokrytými papilami, ktorých úlohou je záchyt peľového zrnka. Semenník sa po oplodnení mení na plod a stena semenníku na oplodie [1] [5].

2.1.2.5 Obilka

Obilka (*plod*) je typ nažky, ktorý má nepukavý plod a vzrastené oplodie s osemením. Počas procesu ontogenézy dochádza k rastu obilky, v dôsledku delenia buniek a príjmu vody. Po tomto procese nasleduje plnenie samotného plodu. Tento proces je spojený s ukladaním zásobných látok napr. škrobu a dusíkatých látok. Jedným z dôležitých procesov, ktoré ovplyvňujú plnenie plodu je fotosyntéza. Do obilky je z pletív, ktoré sa podieľajú na fotosyntéze, delokalizovaná sacharóza [4].



Obrázok 1 Obilka, jej schematické zobrazenie, priečny rez a pozdĺžny rez [4]

1 – pluchy, 2 – oplodie (2.1 – epidermis, 2.2 – hypotermis, 2.3 – mezokarp, 2.4 – endokarp), 3 – osemenie (3.1 – osemenie, 3.2 – hyalinná vrstva), 4 – aleuronová vrstva, 5 – endosperm (5.1 – subaleuronová vrstva, 5.2 – škrobový endosperm), 6 – vrstva stlačených buniek, 7 – štítok, 8 – zárodok, 9 – cievny zväzok, 10 – štetinka [4].

Plod je zložený z troch základných častí:

- **Obalové vrstvy** – Hlavnou funkciou obalových vrstiev je ochrana pred nežiadúcimi vonkajšími vplyvmi. Patrí sem **oplodie** a **osemenie**. Sú tvorené vrstvami buniek a chránia zrno pred vyschnutím. Oplodie je tvorené celulózou, ktorá má funkciu nerozpustného materiálu a osemenie nesie farbivá, ktoré určujú celkový vzhľad zrna. Obalové vrstvy sú zdrojom minerálnych látok ako aj vlákniны a pri mletí sa používajú ako otruby [4].
- **Endosperm** – Je živné pletivo všetkých krytosemenných rastlín a má najväčšie percentuálne zastúpenie v zrne. Je tvorený:

- *Vonkajšia časť* – aleuronová vrstva je tvorená bunkami s vysokým obsahom bielkovín. Je zdrojom hydrolytických enzýmov a minerálnych látok.
- *Vnútoraná časť* – škrobový endosperm je tvorený prevažne zásobným polysacharidom – *škrobom*. Je tvorený škrobovými zrnami, ktoré môžu byť veľké alebo malé v závislosti na obsah amylózy. Veľké majú percentuálne vyššie zastúpenie amylózy ako malé. Steny endospermu sú bohaté na zdroj β – glukozu, ktoré majú významné účinky pri liečení civilizačných ochorení [4].

Medzi obalovými vrstvami a endospermom sa nachádza špeciálna vrstva nazývaná **aleuronová vrstva**, ktorá je bohatá na bielkoviny, cukry a minerálne látky. Vzniká počas dozrievania obilky. Bunky nachádzajúce sa medzi obalovými vrstvami a endospermom obsahujú vakuoly, ktoré pri dozrievaní obilky vysychajú a tvoria aleuronovú vrstvu. Bunky v aleuronovej vrstve počas klíčenia obilky respirujú a sú metabolicky aktívne, ale nedelia sa [4] [3].

- **Zárodok** – Tvorí základ pre potencionálnu budúcu rastlinu. Je umiestnený v dolnej časti zrna a je chránený oplodím a osemením. Zárodok prilieha k endospermu a je zložený z dvoch častí. Prvá časť tvorí základ pre budúce listy a je chránená blanitou pošvou. Druhá časť zas tvorí základ pre zárodočné koreničky, ktoré sú tiež chránené blanitou pošvou. Pri spracovaní zrna na múku sa odstraňuje, lebo znižuje senzorycké vlastnosti produktu, v dôsledku oxidačných a enzymatických zmien. Zárodok obsahuje mále množstvo škrobu, ale nemusí ho obsahovať vôbec. Je bohatý na dusíkaté látky, lipidy, cukry, minerály a vitamíny skupiny B [1] [4].



Obrázok 2 Jačmeň [33]

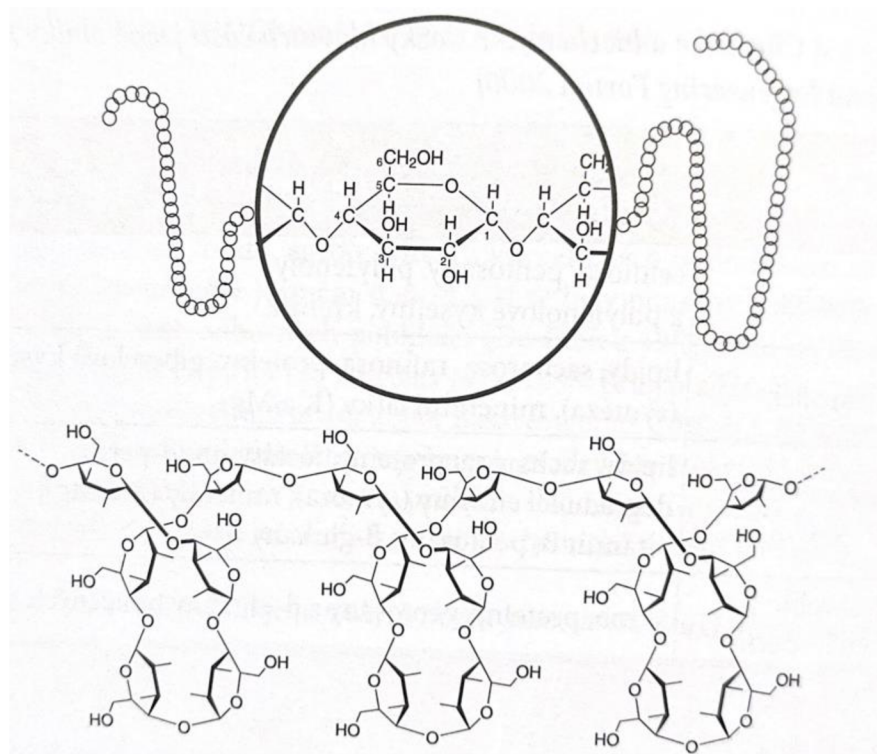
2.2 Chemické zloženie jačmeňa

Jačmeň je zložený z 80 - 90 % z organických a anorganických látok, ktorých zastúpenie je ovplyvnené odrodou, klimatickými podmienkami či samotnou pôdou. Najväčšie percentuálne zastúpenie tvoria sacharidy, nasledujú bielkoviny, lipidy, minerály a vitamíny [4] [5].

2.2.1 Sacharidy

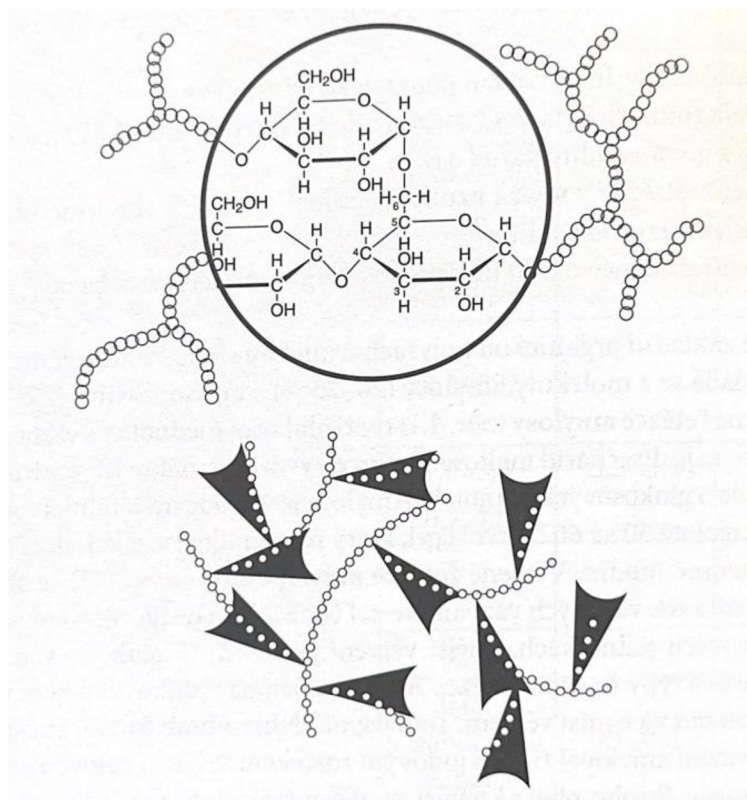
V jačmennom zrne sa nachádzajú rôzne druhy sacharidov od jednoduchých až po zložené. Vznikajú v zrne procesom fotosyntézy, kde dochádza k absorpcii oxidu uhličitého a jeho redukciou na glukózu a kyslík. Pre fotosyntézu je charakteristická premena svetelnej energie, prijímanej zeleným farbivom chlorofylom, na chemickú. Najväčšie zastúpenie má zásobný polysacharid **škrob**, ktorý tvorí 60 - 65 % z celkového množstva sušiny zrna. Je zdrojom energie pre organizmy, ale aj pre novovzniknuté rastliny zo zárodku. Tvoria ho dve zložky, amyloza (25 %) a amylopektín (75 %). Množstvo jednotlivých zložiek je do značnej miery ovplyvnený šľachtením a stupňom dozretia zrn [3] [4] [5].

- *Amylóza* je tvorená glukózovými zvyškami pospájanými α -1,4 glykosidickou väzbou a základnou zložkou je disacharid maltóza. Reťazce sú dlhé, lineárne a tvoria šróbovicu. Vo vode dochádza k jeho rozpusteniu a k tvorbe soli.



Obrázok 3 Štruktúra amylozy [4]

- *Amylopektín* je tvorený tiež glukózovými zvyškami pospájanými väzbami α -1,4 a α -1,6. Reťazce sú omnoho viac vetvené ako pri amyloze. S horúcou vodou vytvára maz, ktorého tvorba je ovplyvnená samotnou štruktúrou amylopektínu.



Obrázok 4 Štruktúra amylopektínu [4]

Okrem škrobu sa v zrne nachádzajú aj monosacharidy, ktoré sú v stopových množstvách v endosperme (glukóza, fruktóza a maltóza) alebo v klíčku (sacharóza a rafinósa) [4] [5].

2.2.2 Bielkoviny

Sú dusikaté látky, ktoré sú zložené z jednotlivých monomérov – aminokyselín. Majú veľký nutričný, krmný a technologický význam. Podľa miesta výskytu ich môžeme rozdeliť na lepkové (aleuronová vrstva), rezervné (endosperm) a histologické (membrány buniek v endosperme). Jačmenné bielkoviny sa delia do štyroch základných skupín – albumíny, globulíny, prolamíny a glutelíny. Albumíny a globulíny sú bielkoviny s dobrou rozpustnosťou, globulíny a glutelíny sú bielkoviny lepkové. Sú zložené z gliadinu a gluteninu. Tieto látky sú schopné tvoriť s vodou gél a tvoria elastickú štruktúru v ceste. Lepkové bielkoviny môžu spôsobovať vážne zdravotné poruchy napr. celiakiu [4] [5].

Produkty štiepenia bielkovín jačmeňa počas klíčenia tvoria širokú škálu makropeptidov, polypeptidov až aminokyselín, ktoré majú dôležitý technologický význam pri výrobe piva a sladu. V závislosti na ich fyzikálno-chemických vlastnostiach prispievajú k plnosti chuti piva, penivosti a stabilite peny [4].

Popis jednotlivých bielkovín jačmeňa:

- **Albumíny** – sú bielkoviny, ktoré sú dobre rozpustné vo vode a v soľných roztokoch. V jačmeni bol identifikovaný proteín v pivnej pene nazývaný *Lipid Transfer Protein (LTP)*. Má dôležitú úlohu pri rmutovaní, kde na seba viaže lipidy, ktoré môžu negatívne vplývať na penivosť piva.

- **Globulíny** – sú rovnako ako albumíny rozpustné vo vode a v soľných roztokoch. Vyskytujú sa v štyroch formách: α -globulín, β -globulín, γ -globulín a δ -globulín. Najväčší technologický význam sa pripisuje β -globulínu, ktorý sa podieľa na nebiologickom zákale piva.
- **Prolamíny** – sú bielkoviny, ktoré sú nerozpustné vo vode a v soľných roztokoch. Sú dobre rozpustné v etanole či iných alkoholoch. Základným prolamínom jačmeňa je **hordein**, ktorého významné formy sú δ - a ε -hordein. Podieľajú sa na tvorbe koloidného zákalu.
- **Glutelíny** – nazývajú sa aj gélové proteíny s hydrofóbnym charakterom. Sú rozpustné len v alkalických roztokoch a zhoršujú proces cedenia pri výrobe piva [4].

2.2.2.1 Enzýmy

Z chemického hľadiska sú to makromolekulárne zlúčeniny bielkovinovej povahy schopné katalyzovať chemické reakcie. Nachádzajú sa v jačmeni v jeho aktívnej aj latentnej forme. Sú dôležité biokatalyzátory, ktoré zabezpečujú hlavné metabolické procesy vo vegetatívnej fáze, ale aj po žatve a pri uskladňovaní. Majú dôležitú úlohu pri rozlúštení zrna, pri výrobe sladu a tvorbe jeho charakteristických vlastností. Rozdeľujem ich do šiestich skupín [4] [35]:

1. *oxidoreduktázy*
2. *transferázy*
3. *hydrolázy*
4. *lyázy*
5. *izomerázy*
6. *ligázy*

Ich výskyt v jednotlivých častiach jačmeňa je rôzny. V **zárodku** sa nachádzajú všetky skupiny enzýmov, ale hlavne oxidoreduktázy, transferázy a hydrolázy. Z hydroláz majú hlavné zastúpenie amylázy, peptidázy, lipázy a fosfatázy. Naopak v **aleuróenovej vrstve** sa nachádzajú oxidoreduktázy, transaminázy, lipázy, fytázy, α -amylázy, exo- a endopeptidázy. V **endosperme** majú zastúpenie β -amylázy, endopeptidázy a fytázy. Všetky kategórie enzýmov majú dôležitú úlohu pri výrobe sladu a piva. **Oxidoreduktázy** a **transferázy** sú spojené s procesmi dozrievania, skladovania a klíčenia jačmeňa. Rovnako sa podieľajú na metabolizme sacharidov, dusíkatých látok a lipidov. **Hydrolázy** majú dôležitú úlohu pri rozlúštení zrna a klíčení. **Lyázy** a **izomerázy** sa podieľajú na metabolizme lipidov, polyfenolov, uhlíku a dusíku. **Ligázy** sú spojené s biosyntézou škrobu, aminokyselín a bielkovín [35].

2.2.3 Lipidy

Nachádzajú sa hlavne v zárodku a v aleuróenovej vrstve. Sú významnými látkami pri klíčení a pri metabolických procesoch. Sú tvorené masťnými kyselinami ako napr. kyselinou linoleovou a olejovou. Tvoria 1,5 % – 3 % z celkového obsahu zrna. Jačmenné lipidy obsahujú najviac neutrálnych lipidov ako napríklad: triacylglyceroly, glykolipidy a fosfolipidy. Z technologického hľadiska majú v jačmeni pozitívny, ale aj negatívny vplyv na výrobu piva a sladu. Pozitívny vplyv majú na metabolizmus pivovarských kvasiniek, na udržiavania funkcie

a rast membrán. Pôsobia inhibične pri tvorbe chuťovo významných esterov. Negatívny vplyv majú na stabilitu pívnej peny a na chuť piva [4] [5].

2.2.4 Vitamíny a minerálne látky

Vitamíny sa nachádzajú hlavne v tkanivách zárodku a aleurónovej vrstve. Sú súčasťou komplexov, ktoré fungujú ako kofaktory intermediálneho metabolizmu. Hlavné zastúpenie majú nielen vitamíny rozpustné vo vode ako napr. vitamíny B – komplexu a C ale aj rozpustné v tukoch napr. E a A. Sú dôležité na množenie kvasiniek pri fermentácii piva, ktoré podporujú ľudské zdravie. V neposlednej rade sú v rastline zastúpené minerálne látky, ako napr. fosfor, síra, horčík, vápnik, sodík a železo. Najviac minerálnych látok sa nachádza v klíčku a v obalových častiach zrna [4] [5].

2.3 Využitie jačmeňa

Využitie jačmeňa sa historicky menilo. V minulosti ho ľudia využívali na výrobu jačmenného chleba, ako krmovinu a liečivú rastlinu s protizápalovými a antiseptickými účinkami. V dnešnej dobe sa jačmeň v potravinárskom priemysle používa menej. Je však dôležitou surovinou pri výrobe whisky, sladu a piva. Na začiatku pivovarského priemyslu a výroby sladu bola majoritnou surovinou pšenica, ktorú časom vystriedal jačmeň. Okrem potravinárskeho priemyslu našiel v dnešnej dobe využitie ako krmovina. Vo farmaceutickom priemysle sa používa na výrobu doplnkov stravy s vysokým obsahom minerálnych látok, bielkovín, enzýmov a β – glukanov [1] [3].

2.3.1 Využitie pri výrobe sladu a piva

Výroba **sladu** sa historicky spája s rozvojom výroby **piva**. Na výrobu sladu sa používa *sladovnícky jačmeň* a iba malé percento výroby tvorí slad vyrobený zo pšenice. Vyrobený slad sa využíva hlavne v pivovarskom priemysle. Získavajú sa z neho výtázky, ktoré našli využitie v textilnom ale aj vo farmaceutickom priemysle. Na základe rôznych odrôd jačmeňa a prípravy poznáme rôzne druhy sladu. Môžeme ich rozdeliť do štyroch základných kategórií:

1. Svetlý slad plzenského typu
2. Viedenský slad
3. Tmavé mníchovské (bavorské) slady
4. Špeciálne slady (karamelové, farebné, kyslé atď.) [2] [4]

Základné suroviny na výrobu sladu sú voda a jačmeň. Pri výrobe piva sa k vode a jačmeňu pridáva chmeľ, chmeľové výrobky, náhrady sladu a pivovarské kvasinky. **Odrody sladovníckeho jačmeňa**, ktoré boli doporučené na rok 2022 Výzkumným ústavom pivovarským a sladařským pre výrobu Českého piva sú [2] [6]:

- *Bojos*
- *Francin*
- *Laudis 550*
- *LG Ester*
- *LG Stamgast*
- *Malz*
- *Manta* [6]

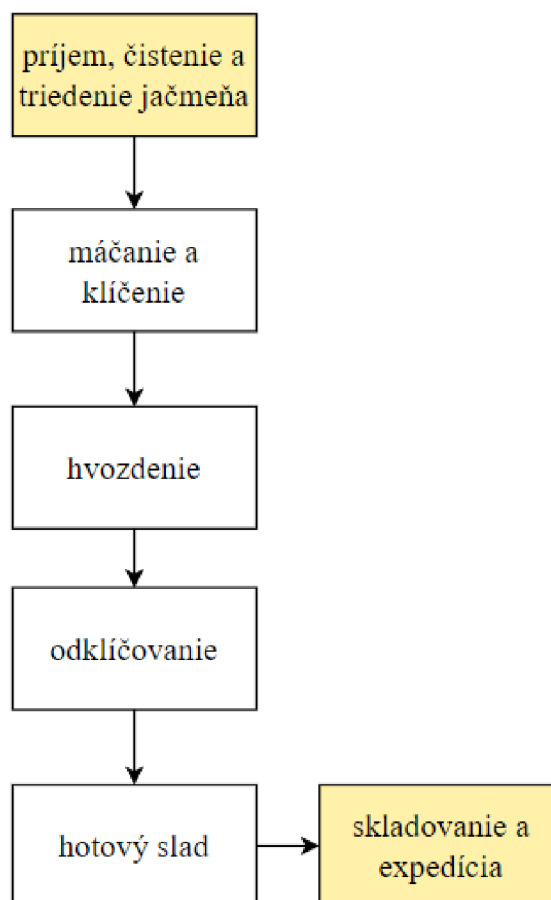
2.3.1.1 Výroba sladu

Celková produkcia sladu vychádza z tradičných postupov, ktoré sa osvedčili už v minulosti. Zároveň sa modifikuje v závislosti na moderných poznatkoch vedy a výskumu, ktoré umožňujú zefektívniť celý výrobný proces a minimalizovať straty, ktoré sa pri výrobe vyskytli. Podstatou výroby sladu je zaktivovať potrebné enzýmy, aromatické látky a farbivá, ktoré sú dôležitou súčasťou výroby piva, ktorému dodávajú potrebnú chuť, vôňu a farbu. Výber jačmeňa na výrobu sladu závisí na viacerých kvalitatívnych parametroch. Princíp sladovania je založený na vytvorení optimálnych podmienok na klíčenie jačmeňa, aktivácii a tvorbe technologicky dôležitých enzýmov. Pri procese výroby sladu sa musia čiastočne alebo úplne degradovať komplexné zlúčeniny (škrob, bielkoviny a nukleové kyseliny) hydrolytickými enzýmami, ktoré

vznikli pri sladovaní, na jednoduché zložky (cukry, aminokyseliny a nukleotidy) [4] [5] [7]. Sladovanie delíme na základe spôsobu a techniky skladovania na:

- *Periodické humnové*
- *Pneumatické bubnové*
- *Skriňové*
- *Polokontinuálne (posuvné hromady)*
- *Kontinuálne (pásovú, tunelové a šachtové)* [2]

Samotnú výrobu sladu môžeme rozdeliť na šesť základných krokov. Schematický popis celého procesu výroby je uvedený na obrázku 5 (Obrázok 5).



Obrázok 5 Schéma výroby sladu [4]

○ **Príjem jačmeňa**

Príjem jačmeňa sa prevádza na prijímacích rampách za pomoci rôznych dopravných prostriedkov. Z každej dodávky jačmeňa sa odoberá reprezentatívna vzorka na analýzu, kde sa sledujú parametre ako obsah vody, bielkovín, nečistôt, kličivosť, napadnutie škodcami či mikrobiálna kontaminácia. Každá prijímacia rampa obsahuje mostnú alebo automatickú váhu a prijímacie koše. Na prepravu jačmeňa, zeleného jačmeňa a už hotového sladu sa používajú

dopravníky, ktoré rozdeľujeme na *mechanické (vertikálne, horizontálne)* a *pneumatické (sacie systémy, systémy dopravy tlakovým vzduchom)* [2] [4].

○ Čistenie a triedenie

Čistenie a triedenie jačmeňa slúži na odstránenie prachu, nečistôt, roztriedenie podľa veľkosti a akosti. Tieto úpravy sú kľúčové pre následné skladovanie, dopravu či výrobu sladu. Čistenie je v sladovniach zabezpečené rôznymi zariadeniami, ktoré zaisťujú odstránenie hrubých a jemných nečistôt, kovového a nekovového charakteru. Patria sem magnety, odklasovače či triery. Základné čistenie prebieha v aspirátoroch, následne oddelenie buriny a zrn iných obilnín sa uskutočňuje na triéru. V triediacich zariadeniach sa potom zrná rozdelia podľa veľkosti. Priestory, kde dochádza k čisteniu a triedeniu sa musia odprašovať pomocou filtrov či cyklón. Vyčistený a vytriedený jačmeň sa skladuje v silách, ktoré obsahujú pneumatické dopravníky a ventilátory. V starších a malých sladovniach sa ešte stále jačmeň uskladňuje na hromadách v dobre vetraných povalách. Hlavné straty, ktoré pri uskladnení môžu nastať sú zapríčinené intenzívnym dýchaním, pri ktorom zrno spotrebováva časť svojich dusíkatých organických látok za tvorby oxidu uhličitého. V prípade, že nie je regulovaný obsah oxidu uhličitého prevzdušňovaním alebo odsávaním, prechádza dýchanie na kvasenie. Produkty kvasenia sú toxické pre samotné zrno a môžu spôsobiť zhoršenú klíčivosť alebo usmrtiť zárodok úplne [2] [4] [7].

○ Máčanie

Celková výroba sladu je založená na celej rade vegetatívnych, štruktúrnych, fyzikálnych, chemických, biochemických a hlavne enzymatických zmien. Preto proces máčania je počiatočný a veľmi dôležitý úsek výroby sladu, ktorý zabezpečuje príjem vody a následnú aktiváciu enzýmov potrebných pre výrobu sladu. Prijímanie vody zrnom je závislé na genetických vlastnostiach odrody, fyziologických, štruktúrnych, chemických a biochemických vlastnostiach, obsahu solí, tvrdosti a teplote vody. Proces začína nasýpaním zrn do vody v nádovniku, ktorý môže byť valcovitý alebo štvorhranný so spádovým kónickým dnom. V minulosti sa používalo prevažne máčanie, ktoré prebiehalo dlhšiu dobu pod vodou a bol minimalizovaný čas na vzduchu. Tento spôsob poskytuje vysokú kvalitu sladu, ale len u jačmeňa, ktorý je fyziologicky zdravý, dôkladne dozretý a odležaný. Výťažnosť sladu je vyššia, lebo sú minimalizované straty pri dýchaní. Rovnako sú aj náklady nižšie, lebo sa nemusí odvádzať oxid uhličitý. V dnešnej dobe sa však preferuje skôr vzdušné máčanie, ktoré môžeme rozdeliť na základe výsledného obsahu vody do troch kategórií [2] [4] [7]:

1. **30 % obsah vody** – proces zahrňuje 2 – 6 hodín pod vodou v závislosti na jej teplote a stave zrna, nasleduje prestávka na vzduchu 14 – 20 hodín.
2. **38 – 40 % obsah vody** – zrno je pod vodou 6 – 10 hodín v závislosti na podmienkach sladovne. Potom sa zrno musí nechať preschnúť a počas tohto procesu sa z nádovníku musí odsávať oxid uhličitý.
3. **42 – 44 % obsah vody** – jačmeň je pod vodou 4 – 6 hodín a po vypustení vody sa 2 – 4 hodiny nechá odkvapkávať. Takto pripravené zrno sa máča v pneumatických klíčičdlách [2].

○ Klíčenie

Cieľom klíčenia jačmeňa je aktivácia a syntéza enzýmov a samotné **rozlúštenie zrna**. Dochádza tu k vývoju zárodku, ktorý je spojený s rastom koreňov, výhonkov a samotnou modifikáciou endospermu. Celý tento proces by mal prebiehať s minimálnymi stratami a nákladmi. Syntéza nových hormónov je iniciovaná fytohormónami, ktoré sú zložené z kyseliny gibberelovej a ďalších látok. Tieto látky sa dostávajú cez endosperm do aleurónovej vrstvy, kde dochádza k vzniku voľných aminokyselín a nových enzýmov (β – glukanáza, α – amyláza a proteázy). Tento proces sa označuje ako modifikácia zrna. Dochádza pri ňom k transformácii tvrdého endospermu na mäkký. Tvorba nových enzýmov je spojená s dostatočným množstvom metabolickej energie, ktorá sa získava oxidáciou zásobných látok. β – amyláza a α – amyláza patria medzi najdôležitejšie enzýmy sladu, ktoré v procese rmutovania sú schopné odbúravať škrob. Degradácia proteínov pri klíčení jačmeňa zabezpečuje komplex proteolytických endo- a exo- enzýmov. Ich štiepenie môžeme rozdeliť do dvoch fáz. V prvej fáze dochádza k štiepeniu bielkovín v štitku a v aleurónovej vrstve. V druhej časti dochádza k degradácii bunčných stien škrobových zŕn v endosperme a hydrolýze rezervných proteínov (hordeíny a glutelíny). Zariadenia na klíčenie jačmeňa môžeme rozdeliť na klasické a moderné. Do klasických patria humná, priestranné vzdušné miestnosti, ktoré majú podlahu z hladkého betónu alebo kachličiek. Medzi moderné klíčiace techniky zaraďujeme bubnové, skriňové a vežové. Najviac sa však používajú Saladinové skrine alebo polokontinuálne hromady [2] [7].

○ **Hvozdenie**

Cieľom hvozdenia je zníženie obsahu vody v zelenom slade pod hodnotu 4 % a zabezpečenie stability produktu pri skladovaní. Rovnako aj zastavenie vegetačných procesov, redukovanie časti enzýmových aktivít a vytvorenie chuťových, farebných a oxidačno – redukčných látok. Hvozdenie – sušenie prebieha na tzv. hvozdoch, kde vrstvou zeleného sladu prechádza vzduch s príslušnou teplotou pre danú fázu. Hvozdenie nie je len sušenie sladu, ale dochádza tu k viacerým reakciám, ktoré majú vplyv na výslednú senzorku sladu. Na začiatku sa zelený slad šetrne suší v nadbytku vzduchu pri teplote 20 – 60 °C, kde dochádza k dobiehaniu fyziologických a biochemických procesov. V druhej fáze sa slabým prúdom teplého vzduchu hvozdí svetlý slad pri teplote 60 – 80 °C a tmavý pri teplote 60 – 105 °C. V tejto časti sa tvorí senzorka aktivita a oxido – redukčné látky z Maillardovej reakcie a karamelizácia sacharidových zlúčenín. Pri prvých spomínaných reakciách dochádza k štiepeniu produktov sacharidov a bielkovín, hlavne monosacharidov a aminokyselín. Pri karamelizácii vznikajú bezdusíkaté farebné aromatické látky zo sacharidových zložiek pri termickom štiepení sacharidov enzýmovou oxidáciou [2] [4] [7].

Tento proces prípravy sladu môžeme rozdeliť z hľadiska chemických a biochemických zmien na tri fázy:

1. **Rastová fáza** – obsah vody je nad 20 % a teplota do 40 °C, zrno je schopné ďalej klíčiť.
2. **Enzýmová fáza** – pokles percentuálneho obsahu vody pod 20 %, teplota sa nachádza v rozmedzí hodnôt 40 – 60 °C. Dochádza k zastaveniu vegetačných procesov, ale enzýmové reakcie pokračujú.
3. **Chemická fáza** – obsah vody poklesne pod 10 % a teplota je nad 60 °C. Pri tejto fáze dochádza k zastaveniu enzýmových reakcií a tvorbe reakcií, ktoré sa podieľajú na tvorbe farebných a chuťových látok [2] [4].

○ **Odklíčovanie**

Po hvozdení a následnom ochladení sladu prebieha odklíčovanie. Tento proces zaradujeme do záverečných úprav prípravy sladu a mal by sa uskutočniť čo najskôr, lebo koreňky sa ťažko oddeľujú od sladu. V tomto kroku dochádza, ako samotný názov napovedá, k odstraňovaniu klíčku. Ich odstránenie je nevyhnutné, pretože sú hygroskopické (viažu vodu). Preto by sa slad ťažko skladoval a ich prítomnosť by zhoršovala analytické aj senzorké vlastnosti sladu a následne piva. Sekundárny produkt z výroby sladu z tohto kroku je sladový kvet, ktorý tvoria suché koreňky a klíčky usušeného sladu. Je používaný ako krmovina, vo fermentačnom a farmaceutickom priemysle vďaka jeho biologicky aktívnym látkam. Sladový kvet je bohatým zdrojom vlákniny, organických kyselín, cholínu, adenínu, vitamínov a iných látok [4].

○ **Finálne úpravy a skladovanie**

Medzi finálne fázy výroby sladu zaradujeme čistenie, leštenie a skladovanie sladu. Pri čistení sa zbavuje zvyšku sladového kvetu, prachu, rozdrvených zŕn a prípadne sa odstránia poškodené sladové zrná. Na tento proces sa používajú prístroje ako aspirátory a sitá, rovnako ako pri triedení. Pri leštení sa dodáva lesk a pekný výsledný vzhľad sladu. Používajú sa rôzne

kefy alebo iné špeciálne leštiace zariadenia. Slad sa nespracováva hneď po hvozdení, pretože je krehký a pri spracovaní sa drobí. Preto sa musí nechať odležať, aby sa jeho vlhkosť zvýšila na 4 – 5 %. Výnimkou sú slady, ktoré sa v pivovare melú za vlhka. Mierne zvýšenie vlhkosti nemá negatívny vplyv na jeho kvalitu. Čo však môže znížiť jeho kvalitu je obsah vody 10 – 12 %. Tým dochádza k problému pri šrotovaní a v následnej chuti a vôni samotného sladu až piva. Skladovanie prebieha buď na povalách, v drevených alebo oceľových skriniach a silách [4].

2.3.1.2 Výroba piva

Pivo je jemne alkoholický fermentový nápoj, ktorý poskytuje nutričné obohatenie v strave človeka. Vzniká riadeným kvasením cukrového roztoku povareného s chmeľom alebo chmeľovým výrobkom a kvasením vybraných kmeňov pivovarských kvasiniek. Zdroj sacharidov pre výrobu piva je škrob, ktorý sa nachádza v slade [10] [13] [16].

Jeho výroba má dlhú históriu, ktorá siaha do mladšej doby kamennej, do Babylonu, kde sa našli prvé archeologické nálezy o nápoji podobnom pivu. Za kolísku piva sa však považuje Mezopotámia, kde už v 7. tisícročí p. n. l. pestovali obilie. Postup výroby piva sa prenášal z generácie na generáciu. Do 12. storočia sa pivo pripravovalo v domácnostiach primitívnym spôsobom. Varilo sa zo pšenice v jednoduchých nádobách a kvasilo v pivných hrncoch v komorách. Od 12. storočia sa nie len výroba piva, ale aj mnoho iných domácich činností stali obživou podnikavých mešťanov. Táto skutočnosť prispela k rozvoju priemyslu [8] [11].

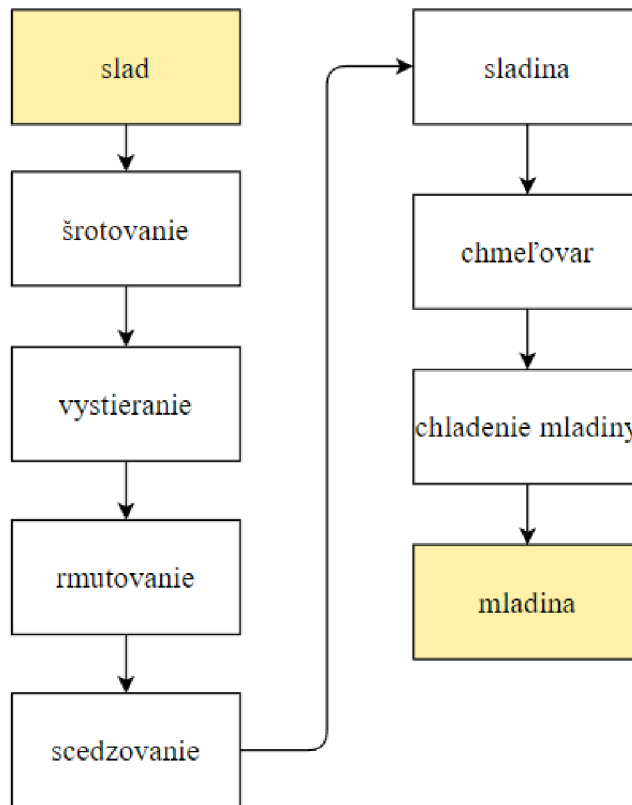
Prvý pivovar bol založený v Českej republike v roku 993 v kláštore v Prahe. Chránené označenie „České pivo“ bolo uznané v októbri 2008 Európskou úniou. Je charakteristické svojou technológiou, surovinami a lokalitou výroby. V dnešnej dobe je výrazným trendom zakladanie remeselných pivovarov, ktoré sa zameriavajú na vlastnú výrobu piva. Dôležitým faktorom dopytu po tomto type pív je jeho sensorický profil (farba, chuť), ktoré ho odlišujú od priemyselne vyrábaných pív. Celý proces pozostáva zo súboru krokov, ktoré sa rozdeľujú na tri časti. Prvý úsek sa zaoberá výrobou mladiny, druhý kvasením a tretí filtráciou, pasterizáciou, stabilizáciou a stáčaním [10] [15] [16].

○ Výroba mladiny

Mladina sa vyrába zo sladu, vody, chmeľu či chmeľových výrobkov. Celková príprava závisí na druhu pripravovaného piva a celý proces sa rozdeľuje do jednotlivých bodov, ktoré popisuje schéma na obrázku 6 (Obrázok 6) [10]:

- **Šrotovanie** – špeciálny druh mletia, pri ktorom dochádza k vymletiu endospermu sladových zŕn, ale zároveň k zachovaniu celistvosti obalových pluch. Rozrušenie zrna je dôležité na uvoľnenie látok, ktoré sa nachádzajú v slade, a na urýchlenie ich rozpúšťania. Mletie môže byť suché, mokré alebo kondicionované.
- **Vystieranie** – dokonalé zmiešanie šrotu s nálevom varnej vody vo vystieracej nádobe, ktorá obsahuje miešadlo, aby šrot nesedimentoval na dno. Celá zmes musí byť dokonale zhomogenizovaná. Nerozmiešané hrudky šrotu by pri rmutovaní necukrili a zväčšili by straty na extraktu.

- **Rmutovanie** – dej pri výrobe piva, pri ktorom dochádza k enzymatickému štiepeniu makromolekúl na príslušné monoméry. Najdôležitejším procesom je rozklad škrobu na skvasiteľné sacharidy a dextríny. Rozhodujúca je činnosť preteolytických, amlolytických, kyselinotvorných a oxidačno – redukčných enzýmov. Existujú dva druhy rmutovania:
 - *infúzne* – prebieha vždy v jednej nádobe a používa sa pre výrobu vrchne kvasených pív. Rozlišujeme *jednoduchú infúziu* a *stupňovitú*. Jednoduchá je charakteristická tým, že teplota sa počas procesu nemení a pohybuje sa v rozmedzí 60 – 70 °C. Pri stupňovitej infúzii sa produkt z vystierania zohrieva postupne na požadované teploty. Najprv dochádza k ohrevu na 45 °C po dobu 40 min. Následne sa teplota zvýši na cca 63 °C (20 minút), 72 °C (30 minút) a na záver na 77 °C.
 - *dekokčné* – dochádza k prečerpávaniu časti rmutu z vystieracej nádoby do nádoby s ohrevom, kde dochádza k ohrevu na požadovanú teplotu a nakoniec sa zahreje až na teplotu varu. Prítomné enzýmy sa počas varu deaktivujú, ale dochádza k vzniku senzorycky významných látok. Následne sa masa vráti naspäť do vystieracej nádoby k zvyšnej časti rmutu, ktorá neprešla varom. Tento druh rmutovania sa používa pre výrobu spodne kvasených českých pív [2] [14].
- **Scedzovanie** – fyzikálny proces, pri ktorom dochádza k oddeleniu pevného podielu (mláta) od tekutého (sladiny). Tradične sa používajú kade na cedenie, ale môžu ich nahradiť aj filtre. Scedzovanie prebieha v dvoch krokoch, kde prvým je oddelenie roztoku sladú tzv. predka, ktorý vznikol pri rmutovaní. Následne dochádza k vysladeniu, čo znamená opakované premytie mláta horúcou vodou. Predok a zriedená sladina sa následne zhromažďujú v mladinovej panvici [2] [14].
- **Chmeľovar** – v tomto výrobnom kroku dochádza k varu sladiny získanej scedzovaním s chmeľom v mladinovej panvici. V Českej republike sa používa chmeľ *Žatecký poloraný červeňák*. Počas varu dochádza k odpareniu prebytočnej vody, inaktivácii enzýmov a sterilizácii mladiny. V priebehu chmeľovaru dochádza k zložitým chemickým premenám. Jednou z množstva reakcií je Maillardová reakcia, termická degradácia mastných kyselín, odstránenie dimetylsulfátu a isomerizácia α – horkých kyselín na iso – α – horké kyseliny. Chmeľ sa počas varenia pridáva v troch krokoch. Aromatické odrody sa pridávajú až na záver v dôsledku zachovania ich senzoryckých vlastností. Po varení dochádza k separácii hrubých a jemných kalov. Následne sa celá zmes vychladí a pripravená mladina pokračuje do procesu kvasenia [2] [14].



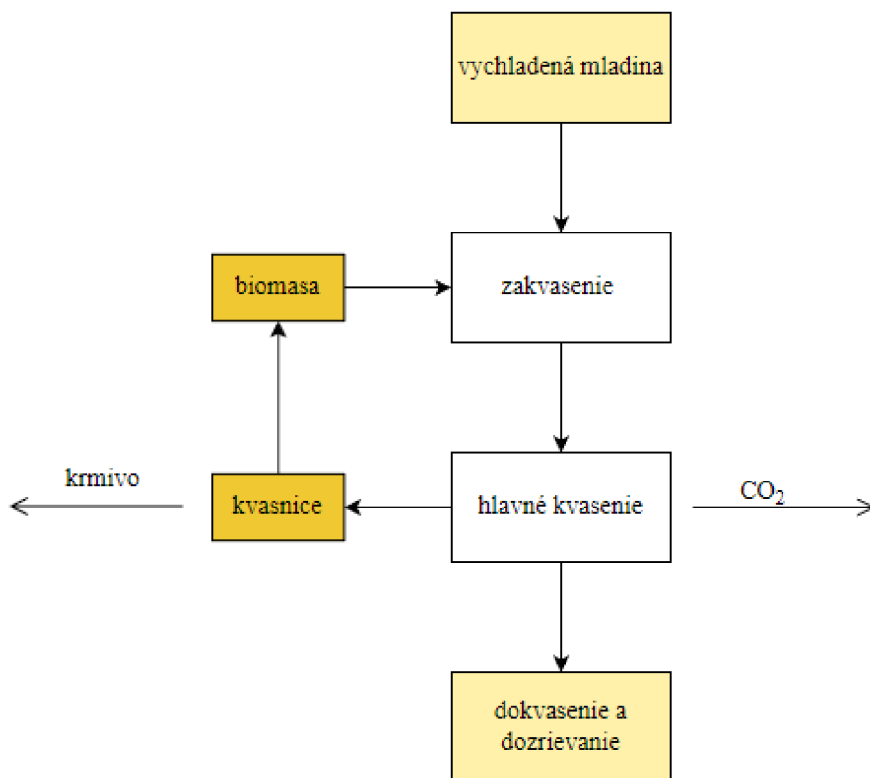
Obrázok 6 Schéma prípravy mladiny [4]

o Kvasenie

Vychladená mladina obsahuje veľké množstvo sacharidov, aminokyselín, vitamínov a minerálnych kyselín. Je veľmi náchylná na kontamináciu, preto je nutné ju rýchlo zakvasiť. Cieľom hlavného kvasenia je primárne premena skvasiteľných sacharidov na etanol a oxid uhličitý [2] [14].

V pivovarstve sa používajú dva základné druhy kvasiniek. Pre vrchne kvasené piva sa používajú *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré sú hydrofilné a počas procesu kvasenia vzlianjú na hladinu, kde tvoria pivnú deku. U spodne kvasených pív sa využívajú *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*. Majú hydrofóbny charakter a pri kvasení flokulujú na dno kvasnej nádoby. Hlavnými rozdielmi medzi jednotlivými kvasinkami sú zloženie bunkovej steny a rôzne prevádzkové teploty. Pri *Saccharomyces cerevisiae* je optimálna kvasná teplota 18 – 24 °C a pri *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* 6 – 12 °C. Kvasinky sa pridávajú do mladiny vo forme kvasnej biomasy, ktorá sa získava z laboratórnej a prevádzkovej propagácie, počas ktorej sa kvasinky opakovane pomnožia v postupne sa zvyšujúcich objemoch sterilnej mladiny. Celkový proces kvasenia sa rozdeľuje na **hlavné kvasenie** a **dokvasovanie**. **Hlavné kvasenie** prebieha v otvorených nádobách (spilkách) alebo v cylindrokónických tankoch CKT, ktoré fungujú za zníženého aj zvýšeného tlaku. Okrem tvorby etanolu sa v tomto kroku tvoria významné sensorické látky, ktoré prispievajú k výslednému charakteru piva. Patria k nim vyššie alkoholy, estery, aldehydy, glycerol atď. Podľa vzhľadu povrchu kvasiacej mladiny sa proces rozdeľuje na: zaprašovanie a odrážanie, nízke biele krúžky, vysoké hnedé krúžky

a prepadanie deky. Tmavá pena sa zbiera z hladiny a následne je mladé pivo prečerpávané do ležiackeho tanku, kde prebieha *dokvasovanie* pri nízkych teplotách 2 – 3 °C počas 1 – 10 týždňov. V tomto štádiu výroby piva dochádza k spotrebovaniu zbytku skvasiteľných sacharidov. Ďalej prebieha množstvo fyzikálno – chemických procesov, pri ktorých dochádza k vyčisteniu piva a tvorbe senzorickeho profilu piva [2] [14].

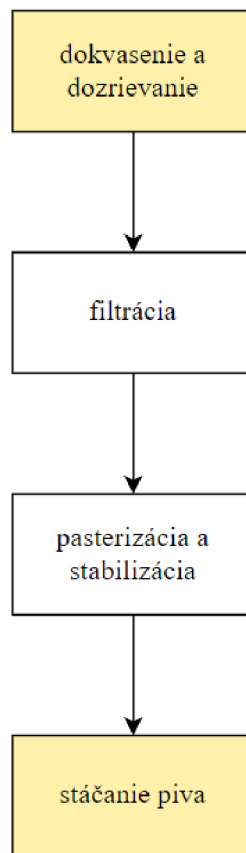


Obrázok 7 Schéma kvasenia mladiny [4]

o Závěrečné úpravy

Po procese dokvasenia sa pivo považuje z hľadiska organoleptických vlastností za hotové. Nasledujú záverečné úpravy, ktoré zvýšia trvanlivosť a stabilitu výrobku. Prvým z procesov je **filtrácia**, ktorá slúži na odstránenie mikroorganizmov, ktoré zostali v pive neusadené. Používajú sa doskové a kremelinové filtre. V dnešnej dobe sa používajú membránové filtre, ktoré nahrádzajú pasterizáciu. V tomto kroku sa pivo ešte dočirí a dostane svoju špecifickú farbu. Niektorí spotrebitelia však vyhľadávajú nefiltrované piva, kvôli špecifickému zákalu. Ďalším krokom záverečných úprav je tepelná úprava piva – **pasterizácia**, ktorá zvyšuje jeho trvanlivosť. Môže prebiehať dvoma spôsobmi – tunelovým alebo prietokovým. Pri tunelovej pasterizácii sa fľašky naplnia, uzavru a následne prechádzajú priestorom, kde sú sprchované najprv horúcou vodou (61 – 65 °C) po dobu 15 – 20 minút a následne studenou. Pri prietokovej pasterizácii sa pivo pasterizuje pred plnením do obalov pri teplote 70 – 74 °C po dobu 15 – 20 sekúnd. Aj táto záverečná úprava však ovplyvňuje negatívne chuť piva a preto množstvo spotrebiteľov preferuje nepasterizované pivo. Pre distribúciu výsledného produktu je nutné pivo stočiť, čím nezabráňime čiastočnej oxidácii. Pre zaistenie senzorickej stability po stočení

existujú určité zásady, ktoré sa musia dodržiavať. V Českej republike existuje päť základných spôsobov distribúcie piva (cisterny, sudy, fľašky sklenené, plechovky a PET fľašky) [2] [14].



Obrázok 8 Záverečné úpravy výroby piva [4]

2.3.2 České pivo

Pojem České pivo je chránené zemepisné označenie schválené Európskou úniou. Pivovary, ktoré sa nachádzajú na území Českej republiky môžu vyrábať pivo s týmto označením. Musia však dodržiavať základné požiadavky spojené s jeho výrobou, ktoré sú pravidelne kontrolované príslušnými orgánmi. Chránené označenie je však spojené s jednou konkrétnou značkou, nie s pivovarom. Toto označenie pri exporte do zahraničia zaručuje kvalitu a špecifický chuťový profil piva. Označenie na jednotlivých obaloch má tiež svoje normy a pravidlá. Musí byť na obaloch viditeľné v stanovených farbách ako je zobrazené na obrázku (Obrázok 9) alebo v čiernobielym prevedení [14].

Charakteristické technologické požiadavky pre České pivo (NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1014/2008) sú napríklad:

- Pivo musí byť vyrobené v Českej republike.
- Musí byť vyrobené len zo základných surovín (slad, voda, chmeľ).
- Použitá voda musí byť mäkká až stredne tvrdá z lokálnych zdrojov.

- Dokvasovanie nesmie prebiehať v rovnakých nádobách ako hlavné kvasenie.
- Musí byť použitý dekokčný spôsob rmutovania aspoň v jednom povarenom rmute.
- Požiadavky na slad sa líšia od typu piva. Všeobecne však platí, že slady musia byť vyrobené aspoň z 80 hm % zo schválených odrôd jačmeňa.
- Minimálna doba chmeľovaru musí byť 60 minút.
- Maximálna teplota hlavného kvasenia musí byť 14 °C.
- Pri výrobe sa musia používať kvasinky spodného kvasenia atď. [34].



Obrázok 9 Označenie České pivo [32]

2.3.3 Zdravotne významné látky v slade a pive

Pivo je známe svojimi pozitívnymi účinkami na ľudský organizmus, vďaka obsahu bioaktívnych molekúl. Niektoré štúdie sa zaoberajú jeho využitím v dermatológii, pri liečbe atopických ekzémov, kožných infekcií či pigmentových porúch. Okrem blahodarných účinkov obsahuje pivo látky, ktoré škodia zdraviu. Nachádzajú sa v prírodných alebo pridaných látkach, ktoré sa pridávajú cielene pri výrobe piva. Neprirodzenou zložkou potravín sú látky cudzorodé. Medzi najškodlivejšie látky patria *N* – **nitrosaminy**, ktoré vznikajú pri hvozdení reakciou oxidu dusíku s aminoslúčeninami sladu za vzniku nitroaminov. Najvýznamnejším predstaviteľom je *N* – **nitrosodimethylamin (NDMA)**. **Ťažké kovy** a ďalšie prvky sú ďalšími cudzorodými látkami. Dostávajú sa do piva zo základných surovín a ich obsah sa redukuje počas kvasenia reakciou so sulfánom a tvorbou organických komplexotvorných zlúčenín. Medzi ďalšie škodlivé látky patria **mykotoxíny**, ktoré sú produkty sekundárneho metabolizmu mikroskopických vláknitých húb. V jačmeni a v slade boli nájdené deoxynivalenol, zearalenon a ďalšie. Látka, ktorá má negatívny vplyv pre ľudí trpiacich celiakiou je **lepok**. Spôsobuje alergický zápal sliznice tenkého čreva, ktorý sa prejavuje kŕčmi, plynatosťou atď. [9] [16].

2.4 Lepok

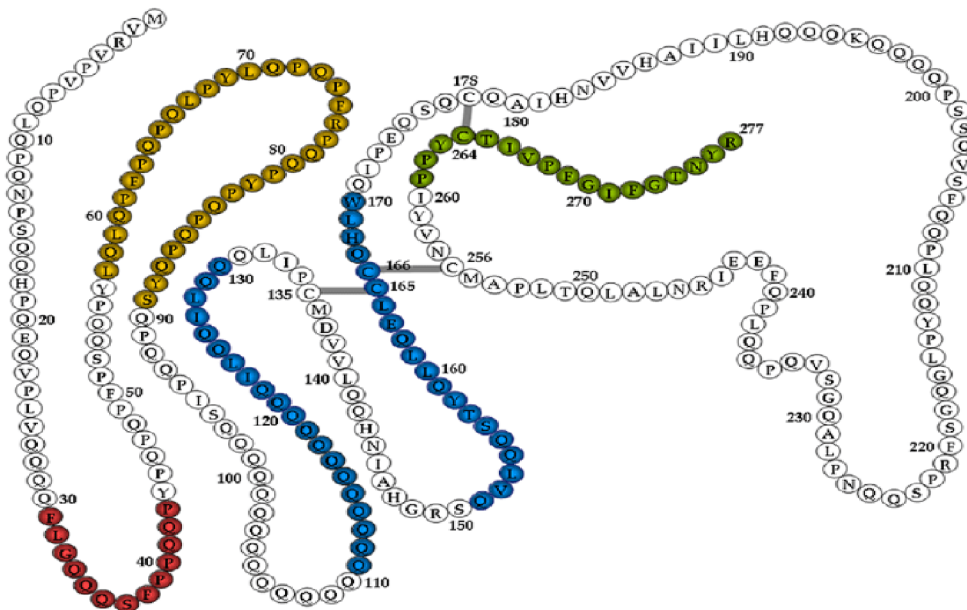
Je vo vode nerozpustná bielkovina, ktorá sa nachádza v endosperme pšenice, jačmeňa a ovsá. Spôsobuje množstvo imunopatologických ochorení, medzi ktoré patrí aj celiakia, z ktorej sa môže vyvinúť lymfóm. Okrem intolerancie spôsobuje lepok rôzne alergie a gluténovú senzitivitu (NCGS). Napriek tomu má veľký význam v potravinárskom priemysle pri výrobe cesta a ako aditívum. Je schopný viazať vodu, oxid uhličitý, je tepelné odolný a vytvára trojrozmernú plastickú štruktúru. Medzi základné vlastnosti patrí ťažnosť, pružnosť a schopnosť bobtnania. *Glutenin* a *gliadin – prolamin* sú základnými zložkami, ktoré tvoria lepok v pomere 3:2. Najväčšie zastúpenie má v pšenici a najmenej v ovse. Obsah lepku v jačmenných bielkovinách je asi 75 %, 50 % tvorí prolamin a 25 % glutenín [18] [19] [24].

Glutenín

Je polymérna bielkovina, ktorá sa delí na nízkomolekulárny a vysokomolekulárny glutenín. Zatiaľ nebola preukázaná spojitosť glutenínu s výskytom celiakie. Má zásobnú a ochrannú funkciu v semenách obilnín. Zastáva dôležitú úlohu pri klíčení a celkovom prežití rastliny [18].

Gliadin

Gliadin je monoména bielkovina, ktorá sa nazýva u jačmeňa *hordein* a u raže *sekalín*. Prolamíny u lepkových obilnín sú viac zdraviu škodlivé ako prolamíny u nebielkovinových obilnín. Je tvorená aminokyselinami prolínom a glutaminom. Delí sa do základných štyroch skupín α , β , γ a ω – gliadiny. Prolín sa viaže postrannými reťazcami na α -aminoskupiny aminokyselín na gluténovom reťazci. Vytvárajú sa silné väzby, ktoré sú vysoko odolné voči hydrolytickému enzymatickému štiepeniu v tráviacom trakte človeka. Toxické oligomery sú tvorené krátkymi reťazcami aminokyselín, ktoré vytvárajú ω – gliadiny, ktoré vznikajú pri nedostatočnom štiepení lepku pri trávení. Gliadinový peptid, ktorý vyvoláva u celiatikov imunitnú odpoveď organizmu je na α 2-gliadinovom fragmente – gliadin 33-mer. Je zložený z 33 aminokyselín a môžeme ho pozorovať na obrázku (Obrázok 10), kde je vyznačený zelenou farbou. Červenou je vyznačený cytotoxický aktívny gliadin 13-mer a modrou sú označené peptidy zvyšujúce priepustnosť čriev, čo má za následok častú stolicu, nadúvanie či kožné ochorenia [18] [20].



Obrázok 10 Štruktúra gliadinového peptidu [29]

2.4.1 Celiakia

Celiakia je autoimunitné ochorenie, ktoré postihuje 1 % populácie západnej Európy. Spôsobuje morfológické a funkčné zmeny tenkého čreva. Imunogénne lepkové peptidy dlhšie ako osem aminokyselín, bohaté na prolín a glutamín, spúšťajúce celiakiu sú len čiastočne natrávené v gastrointestinálnom trakte a po resorpcii sa viažu na antigény HLA-DQ2 alebo HLA-DQ8, ktoré stimulujú T bunky. U pacientov s celiakiou nastupuje autoimunitná odpoveď len niekoľko dní, respektíve hodín po požití lepku. To má za následok zmenšenie povrchu črevných klkov, čo vedie k zníženej resorpcii vitamínov a minerálov. To má za následok napr. závažné príznaky nedostatku živín, anémiu, bolesť svalov a kostí, či osteoporózu. Dochádza tiež k porušeniu trávenia niektorých cukrov. Imunogénny glutén sa nachádza v pšenici, raži a jačmeni. Toto ochorenie sa môže prejaviť v akomkoľvek veku, ale primárne u ľudí s genetickou predispozíciou. Medzi základné prejavy patrí plynatosť, zápcha, nevoľnosť a v dôsledku nevstrebávania živín aj redukcia hmotnosti. Ľudia trpiaci intoleranciou, alergiou alebo precitlivosťou na lepok sú vystavení väčšiemu riziku výskytu ochorení ako napr. anémia či osteoporóza. Po konzumácii lepkových potravín je organizmus vystavený množstvu imunogénnych peptidov, a preto je základnou liečbou celiakie dodržiavanie „bezlepkovej diéty“. V dnešnej dobe existuje už množstvo alternatív, ktoré sú vhodné pre celiatikov, medzi ktoré patrí aj bezlepkové pivo [21] [22] [30] [36].

Existujú dve kategórie označenia potravín na základe obsahu lepku, ktoré definovala Európska komisia (EU) č.828/2014:

- **Bezlepkové** – sú potraviny, ktorých obsah lepku nie je vyšší ako 20 mg/kg.
- **S veľmi nízkym obsahom lepku** – obsah gluténu v predávaných potravinách je maximálne 100 mg/kg [28].

2.4.2 Bezlepkové pivo

Tradične vyrábané pívá, ktoré sú vyrábané z jačmeňa, pšenice a raže s obsahom lepku väčším ako 20 mg/kg nie sú vhodné pre ľudí, ktorí trpia celiakiou a inými ochoreniami spojenými s lepkom. Preto bol nevyhnutný rozvoj bezlepkového piva, na ktorého výrobu existujú zatiaľ niekoľko technologických postupov. Jedným zo spôsobov je eliminácia a degradácia príslušných bielkovín počas výroby piva. Hlavne v dôsledku intenzívnej proteolýzy počas rmutovania, varenia a čírenia. V tomto prípade sa používajú syntetické enzýmy transglutaminázy (TG alebo mTG) alebo prolyl endopeptidázy (PEP). Transglutaminázy zosieťuje oligopeptidy na proteíny s vysokou molekulovou hmotnosťou, ktoré sú následne odfiltrované. Prolyl endopeptidázy odbúrávajú lepok na prolínovej strane. Enzymatické metódy používané na degradáciu lepku zvyšujú náklady na výrobu piva a majú technické nedostatky. Jedným z negatív je celková nestabilita piva a peny. Okrem enzymatických metód na zníženie lepku pod hladinu 20 mg/kg bola zavedená technologická modifikácia varenie konvenčného sladu z jačmeňa za pomoci riadenej hydrodynamickej kavitácie [50]. Ďalšou možnosťou je použitie alternatívnych obilnín a pseudoobilnín. Majú však nižšiu výťažnosť extraktu mladiny a pôsobia negatívne na výslednú chuť piva. Výhodou alternatívnych surovín je, že sú prirodzene bezlepkové, vykazujú antioxidačný potenciál a antikarcinogénnu aktivitu. Sladovanie alternatívnych zŕn zahŕňa rovnaké kroky ako pri jačmeni. Sú to technologické procesy máčanie, klíčenie a hvozdenie. Na optimalizovanie chuti a stability peny je vhodné použiť kombináciu zŕn, ktoré obsahuje viac rozpustných bielkovín ako napr. ovos, quinoa alebo proso [49]. Ako alternatíva sa používa silikagél vo fermentačnej fáze procesu varenia piva na selektívne odstránenie bielkovín a tým pádom aj lepku. Bezlepkové pivo sa môže pripravovať aj z odrôd jačmeňa, ktoré majú nižší obsah lepku, ktorý sa ešte pri procese výroby sladu a piva znižuje až na požadovanú legislatívnu hodnotu pre bezlepkové pivo. Spôsob výroby je založený na enzymatickej degradácii lepkových bielkovín za použitia enzýmov (transglutamináza, prolyl-endopeptidáza). Nevýhodou je, že dochádza k celkovému nárastu výrobných nákladov. Negatívom pri výrobe bezlepkového piva je aj celkové prispôsobenie sladovne a výsledná cena piva [17] [24] [37].

2.5 Analýza bielkovín

2.5.1 Dôkazové stanovenia bielkovín

Prítomnosť bielkovín vo vzorku môžeme dokázať dvoma spôsobmi, a to *zrážacími a farebnými reakciami*.

Zrážacie reakcie môžeme rozdeliť do dvoch skupín:

- *Reverzibilné reakcie* – Sú to vratné reakcie, pri ktorých nedochádza k zmenám v molekule bielkoviny. Môžeme ich rozpustiť v pôvodnom rozpúšťadle.
- *Ireverzibilné reakcie* – Sú to nevratné reakcie, pre ktorých dochádza k zmenám v štruktúre bielkoviny a tým pádom ju nemôžeme opätovne rozpustiť v pôvodnom rozpúšťadle.

Patria sem reakcie napríklad so sulfosalicylovou kyselinou, s Esbachovým činidlom alebo chloridom ortuťnatým [23].

Farebné reakcie sú špecifické v tom, že reagujú aminokyseliny bielkovín s príslušnými činidlami. Môžeme sem zaradiť reakcie s ninhydridom, Millonovú, Voisenetovú či xantoproteínovú reakciu [23].

2.5.2 Stanovenie bielkovín

Bielkoviny môžeme stanovovať dvoma spôsobmi, buď vo zmesi s inými potravinami alebo ako čistý proteínový preparát. V praxi má väčšie využitie stanovovanie bielkovín v zmesi. Ide o rýchlejšiu metódu, ktorá zabezpečuje minimalizovanie chýb, ktoré by pri stanovení mohli nastať. Druhá metóda si vyžaduje viac času a špeciálne zariadenia, ktoré nám umožnia stanovenie čistého preparátu. Môžeme stanovovať **hrubé bielkoviny**, stanovenie celkového obsahu dusíku alebo *čisté bielkoviny*, ktoré v sebe nezahŕňujú prítomnosť dusíkatých látok nebielkovinového pôvodu. Metódy, ktorými môžeme stanoviť hrubé bielkoviny sú napr. metóda podľa Kjeldahla, Comwaye, Steineggerová či Winklerová. Stanovenie **čistých bielkovín** sa najčastejšie používa v potravinárskom priemysle. Proces stanovenia v sebe zahŕňa vyžrážanie bielkoviny pomocou určitých látok ako napr. síranom meďnatým. Čistá bielkovina je následne podrobená oddeleniu a mineralizácii. Celkový obsah sa následne stanoví metódou podľa Kjeldahla, ktorá stanovuje množstvo prítomného dusíku. Celkový obsah dusíkatých látok sa tiež môže stanoviť pomocou metódy NIRS, ktorá je založená na absorpcii blízkej infračervenej energie [23] [42].

2.5.3 Stanovenie lepkových bielkovín metódou ELISA

Stanovenie lepkových bielkovín v potravinárskom priemysle má veľký význam z hľadiska bezpečnosti konzumácie potravín pre ľudí trpiacich ochoreniami súvisiacimi s lepkom. Na kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie v potravinách sa používajú imunochemické metódy. Jednou z nich je ELISA test. Patrí medzi analytické metódy, ktoré sa vo všeobecnosti využívajú na kvantitatívne stanovenie antigénov intrigujúcimi so špecifickými protilátkami. Táto metóda sa využíva na stanovenie prolaminov – gliadinov v potravinách, ktorú rozdeľujeme na kompetitívnu a sendvičovú [25] [26]. Výsledky obsahu lepku stanovené metódou ELISA by

mohli slúžiť ako porovnávacie hodnoty pre vývoj metodiky stanovenia lepku rýchlou metódou FT-NIR.

Kompetitívna metóda – je založená na enzýmovej imunoanalýze na kvantitatívne stanovenie prolaminových peptidových fragmentov napr. u pšenice, raže a fermentovaných výrobkov označených ako „bezlepkové“. Princíp testu spočíva v antigén – protilátkovej reakcii. Používajú jamky potiahnuté gliadinom, ktoré sú umiestené na doštičke. Na jednotlivé miesta sa pipetujú štandardy resp. vzorky. Voľné gliadiny sa kompetitívne viažu na väzobné miesto [26].

Sendvičová metóda – je analýza, ktorá vychádza zo špecifickej protilátky a jej interakcie s toxickou sekvenciou aminokyselín prolaminu. Používa sa na stanovenie nie len cereálnych potravín ale aj korenín, džúsov, syrov atď. Táto metóda nie je presná pri fermentovanom a hydrolyzovanom lepku. Rovnako ako pri kompetitívnej metóde, tak aj pri sendvičovej je test založený na antigén – protilátkovej reakcii. Rozdiel spočíva v jamkách ELISA testu, ktoré v tomto prípade nie sú potiahnuté gliadinom, ale R-5 protilátkami. Po napipetovaní štandardov a vzoriek dochádza k vzniku antigén – protilátkového komplexu [27].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie a laboratórne vybavenie

3.1.1 Chemikálie, roztoky, materiály

- Odtučnené sušené mlieko (NUTRIHOUSE, ČR)
- Kokteilmový roztok (R-Biopharm, Nemecko)
- Etanol 96 % (Fagron, ČR)
- Deionizovaná voda
- ELISA kit RIDASCREEN® Gliadin (R-Biopharm, Nemecko)

3.1.2 Prístroje a zariadenia

- Laboratórny mlynček
- Laboratórna trepačka
- Laboratórna odstredivka
- Centrifugačné skúmavky 15ml
- Mikroskúmavky eppendorf 1,5 ml
- Laboratórny ultrazvuk
- Zariadenie pre výrobu deiónizovanej vody
- Analytické váhy
- Vodný kúpeľ
- Kadičky 150 ml
- Odmerná banka 200 ml
- Odmerný valec 50 ml a 100 ml
- Laboratórna pipeta nastaviteľná 20 – 200 µl a 100 – 1000 µl
- 8 kanálová mikropipeta 20 – 200 µl
- Striekačkové filtre s veľkosťou pórov 40 µm
- Chladnička
- Spektrofotometer na mikrotitračné platničky (450 nm)
- PC so softwarom RIDASOFT® Win.NET
- ELIZA prístroj RIDA ABSORBANCE 96

3.2 Použité vzorky

Na sledovanie obsahu lepku v jačmeňoch pre výrobu Českého piva, bolo poskytnutých výskumným ústavom VÚPS v Brně 7 odrôd jačmeňa z jarnej žatvy z roku 2022. Z každej odrody boli vybrané 2 vzorky a výsledný počet vzoriek bol 14. Charakteristika jednotlivých odrôd sa nachádza v tabuľke číslo 1 (Tabuľka 1) a oblasť pestovania v tabuľke číslo 2 (Tabuľka 2).

Tabuľka 1 Zoznam použitých odrôd pri meraní a ich charakteristika

	Odrody	Charakteristika
1	Bojos	Dlhodobo najviac pestovaná odroda na území ČR, ktorá bola registrovaná v roku 2005. Stredne vysoká rastlina so stredne veľkým zrnom.
2	Francin	Je stredne vysoká až vysoká rastlina so strednou odolnosťou proti ochoreniu poliehania jačmeňa a menej odolná proti abiotickej nekrotickej škvrnitosti. Odroda bola registrovaná v roku 2014.
3	Laudis 550	Patrí medzi odrody s výberovou sladovníckou akosťou. Je menej odolná proti abiotickej nekrotickej škvrnitosti a ochoreniam, ktoré napádajú listy. Bola registrovaná v roku 2013.
4	LG Ester	Priemerne vysoká rastlina, ktorá je menej odolná proti poliehanu. Zrno je stredne veľké až veľké s vysokým podielom predného zrna.
5	LG Stamgast	Stredne vysoká rastlina s dobrou odolnosťou proti poliehanu a hnedému hrdzaveniu jačmeňa. Odroda bola registrovaná v roku 2021.
6	Malz	Je odroda s výberovou akosťou a patrí medzi odrody, ktoré sú preferované sladovníkmi. Rastlina je stredne vysoká a odolná voči ochoreniam. Bola registrovaná v roku 2002.
7	Manta	Rovnako ako odroda Laudis 550 patrí Manta k odrodám s výberovou akosťou. Rastlina je stredne vysoká s malým podielom predného zrna.

Tabuľka 2 Oblasť pestovania jednotlivých odrôd

	Odroda	Oblasť pestovania	
		Mesto	Kraj
1	Bojos-1	Olomouc	Olomoucký
2	Bojos-2		
3	Francin-1	Opava	Moravskoslezský
4	Francin-2		
5	Laudis 550-1	Olomouc	Olomoucký
6	Laudis 550-2	Kolín	Středočeský
7	LG Ester-1	Brutál	Moravskoslezský
8	LG Ester-2	Hradec Králové	Královéhradecký
9	LG Stamgast-1	Šumperk	Olomoucký
10	LG Stamgast-2	Olomouc	Olomoucký
11	Malz-1	Opava	Moravskoslezský
12	Malz-2	Přerov	Olomoucký
13	Manta-1	Opava	Moravskoslezský
14	Manta-2	Olomouc	Olomoucký

3.3 Analýza lepku

3.3.1 Príprava vzoriek

Do 15 ml centrifugačných skúmaviek bolo navážených 0,25 g zhomogenizovaného vzorku, 0,25 g odtučneného sušeného mlieka a 2,5 ml kokteilového roztoku. Centrifugačné skúmavky boli uzavreté a dobre premiešané, aby nezostali na dne žiadne suché zvyšky vzorku. Všetky pripravené vzorky sa inkubovali 40 minút pri 50 °C a následne sa nechali vychladnúť po dobu 1 – 3 minút. Bol namiešaný 80 % etanol do 200 ml odmernej banky z 96 % koncentrátu. Do každej centrifugačnej skúmavky sa následne pridalo 7,5 ml 80 % etanolu a celý objem sa dôkladne premiešal. V ďalšom kroku sa nechali všetky vzorky miešať pri laboratórnej teplote na laboratórnej trepačke 1 hodinu. Po skončení boli vzorky scentrifugované pri 4500 ot./min 10 minút. Výsledný supernatant sa preliat do čistých 15 ml centrifugačných skúmaviek. Do 1,5 ml mikroskúmaviek boli jednotlivé vzorky nariadenia 20 000 krát. V prvom kroku riedenia bol používaný päťnásobný koncentrát riediaceho pufru, ktorý musel byť nariadený v pomere 1:5 (15 ml koncentrátu : 60 ml demineralizovanej vody). V ďalších krokoch riedenia sa používala miesto riediaceho pufru zmes kokteilového roztoku, etanolu 80 % a pufru (1:3:46). Finálne nariadené vzorky boli analyzované do 30 minút.

3.3.2 Stanovenie lepku ELISA kitom

Meranie lepku v pripravených vzorkách prebiehalo na mikrotitračnej doštičke, ktorá obsahovala špecifické R5 protilátky. Do jednotlivých jamiek boli napipetované štandardné roztoky a vzorky jačmeňov, ktoré sa nanášali na doštičku duplicitne. Výsledná hodnota obsahu lepku je priemer dvoch meraní. Následne prebehlo naviazanie prítomného gliadinu na špecifické protilátky a vzniku antigén - protilátkového komplexu. Po 30 minútovej inkubácii boli jamky vymyté premývacím pufrom a vysušené vyklepnutím tekutiny o filtračný papier. Do jamiek sa napipetoval enzýmový konjugát, v dôsledku čoho vznikol protilátka-antigén-protilátkový komplex. Doštička sa nechala inkubovať 30 minút. Po inkubácii bol napipetovaný premývací pufr do jamiek a tým sa odstránil nenaviazaný enzýmový konjugát. Doštička sa opätovne vysušila vyklepnutím o filtračný papier. Jedným z posledných krokov bolo pridanie roztokov substrátu a chromogénu, ktoré sa nechali v jamkách pôsobiť 30 minút v tme. Počas tohto procesu naviazaný enzýmový konjugát zmenil bezfarebný chromogén na modrý produkt. Posledným krokom bolo pridanie zastavovacieho roztoku, čo spôsobilo zmenu farby na žltú. Vzorky boli následne zmerané fotometricky pri vlnovej dĺžke 450 nm.

Zhomogenizované, navážené, vyextrahované a centrifugované vzorky sú zobrazené v prílohe číslo 2 (Príloha č. 2). ELISA set použitý pri analýze lepku v jačmeňoch doporučených pre výrobu Českého piva je zobrazený v prílohe číslo 3 (Príloha č. 3). Vzor mikrotitračnej doštičky pred pridaním stop roztoku je zobrazený v prílohe číslo 4 (Príloha č. 4). Na vyhodnotenie výsledkov bol použitý software RIDA SOFT Win.NET. V laboratóriu výskumného ústavu VÚPS v Brně bol stanovený lepok metódou ELISA v sendvičovom prevedení.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obsah lepku v testovaných vzorkách, ktoré boli stanovené sendvičovou imunoanalýzou ELISA, sú uvedené v tabuľke číslo 3 (Tabuľka 3). Táto analýza patrí medzi najpoužívanejšie metódy, ktorá našla využitie pri analýze širokého spektra potravín. Medzi jej výhody patrí rýchle stanovenie vzoriek a pomerne presné výsledky. Hodnoty celkového obsahu dusíkatých látok v jednotlivých odrodách poskytnuté výskumným ústavom VÚPS v Brně sa nachádzajú v tabuľke číslo 3 (Tabuľka 3). Stanovenie bolo uskutočnené pomocou metódy NIRS, ktorá je založená na absorpcii blízkej infračervenej energie. Ako referenčná analýza k NIRS bola použitá metóda podľa Kjeldahla, ktorá je založená na prevedení dusíku na amónne ióny, vytesnení amoniaku pomocou nadbytku hydroxidu sodného, destilácií do predlohy s kyselinou boritou a jej následný prebytok titrovaný kyselinou chlorovodíkovou [23] [42].

Tabuľka 3 Namerané hodnoty lepku v jednotlivých odrodách jačmeňa a k nim príslušné obsahy celkových dusíkatých látok

	Vzorky	Lepok [mg/kg]	Lepok [g/kg]	Celkový obsah dusíkatých látok [g/kg]
1	Bojos-1	3,254	65,07	125
2	Bojos-2	3,869	77,37	142
3	Francin-1	2,704	54,07	123
4	Francin-2	2,839	56,77	126
5	Laudis 550-1	2,074	41,47	114
6	Laudis 550-2	3,634	72,67	135
7	LG Ester-1	3,089	61,77	114
8	LG Ester-2	2,919	58,37	117
9	LG Stangast-1	2,614	52,27	115
10	LG Stangast-2	3,054	61,07	100
11	Malz-1	2,944	58,87	120
12	Malz-2	4,284	85,67	128
13	Manta-1	3,359	67,17	112
14	Manta-2	1,974	39,47	99

4.1 Validácia metódy

V rámci validácie metódy bola vypočítaná rozšírená neistota stanovenia obsahu lepku z opakovanej analýzy vzorku Manta-2 a slepého vzorku. Použitá odroda bola vybratá v dôsledku nameranej najnižšej hodnoty lepku z pomedzi všetkých vzoriek. Výsledné hodnoty sa nachádzajú v tabuľke číslo 4 (Tabuľka 4). Detekčný limit (LOD) pre set RIDASCREEN Gliadin je definovaný výrobcom na 0,5 mg/kg gliadínu alebo 1 mg/kg gluténu v závislosti na použitej matici. Limit kvantifikácie (LOQ) je charakterizovaný na 2,5 mg/kg gliadínu alebo 5 mg/kg gluténu [27].

Tabuľka 4 Hodnoty lepku z merania opakovateľnosti výsledkov

	Odroda	Lepok [mg/kg]	Lepok [g/kg]
1	Slepá vzorka	0,16	3,17
2	Manta-2	1,81	36,27
3		2,68	53,67
4		2,09	41,87
5		1,95	38,97
6		2,19	43,87
7		1,47	29,47

Hodnota nameraného lepku v blanku bola následne odpočítaná od všetkých vzoriek. Tento krok pri prepočte bol zaradený do výpočtu v dôsledku toho, že v slepom vzorku sa nenachádzala žiadna navážka jačmeňa, tým pádom za ideálnych podmienok mal byť obsah lepku v blanku nulový.

4.1.1 Výpočet neistôt merania

Z analýzy opakovateľnosti výsledkov bola stanovená neistota merania vyjadrená ako výberová smerodajná odchýlka. Dáta, ktoré boli použité pri výpočte sa nachádzajú v tabuľke 5 (Tabuľka 5).

Tabuľka 5 Hodnoty použité na výpočet neistôt merania

	Lepok [g/kg]	(x-xi)²
1	36,27	19,51
2	53,67	168,57
3	41,87	1,40
4	38,97	2,95
5	43,87	10,13
6	29,47	125,81
Priemer x_i	40,68	–
Súčet	–	328,37

Namerané hodnoty boli otestované Grubbsovým testom pre prípadné vylúčenie odľahlých hodnôt.

Výpočet výberovej smerodajnej odchýlky:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{328,368}{6 - 1}} = 8,0$$

Výpočet rozšírenej neistoty:

$$U_A = k_s \cdot S_r = 2 \cdot 8 = 16,0$$

Uvedená rozšířená neistota merania je súčiniteľom štandardnej neistoty merania a koeficientu rozšírenia $k = 2$, čo pre normálne rozšírenie odpovedá pravdepodobnosti pokrytia približne 95 %.

Výpočet relatívnej neistoty:

$$u = \frac{U_A \cdot 100}{x_i} = \frac{16,0 \cdot 100}{40,68} = 39,0 \%$$

Relatívna rozšířená neistota metódy ELISA pre stanovenie lepku bola 39%.

4.2 Výpočty a vyhodnotenie

Výsledky merania lepku v jednotlivých odrodách jačmeňa doporučených na výrobu Českého piva vyhodnotil software RIDA SOFT Win z pripravenej kalibračnej krivky. Jednotlivé hodnoty boli vynásobené faktorom riedenia, prepočítané na g/kg a bola od nich odpočítaná hodnota lepku v slepom vzorku. Výsledné hodnoty po prepočtoch sa nachádzajú v tabuľke 6 (Tabuľka 6). Nižšie sa nachádza vzor výpočtu výsledných hodnôt.

$$x = \frac{x(\text{mg/kg}) \cdot F_r}{1000} = \frac{1,974 \cdot 20000}{1000} - 3,17 = 36,31 \text{ g/kg}$$

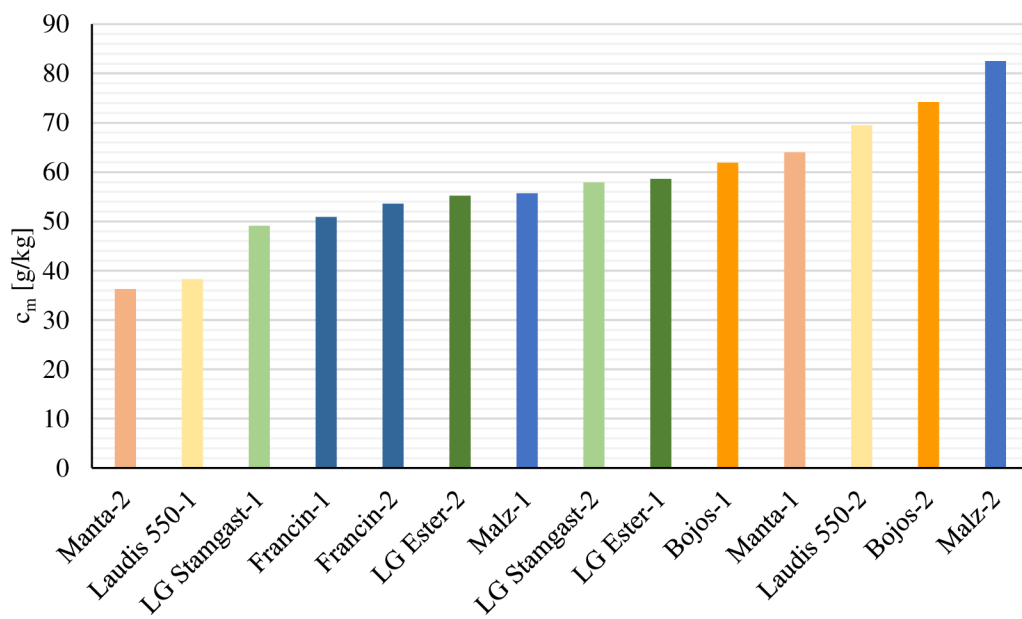
V prílohe číslo 1 (Príloha č. 1) sa nachádza kalibračná krivka, ktorá bola vytvorená softwarom RIDA SOFT Win.NET pri meraní obsahu lepku pomocou testu ELISA v sendvičovom prevedení.

Tabuľka 6 Výsledné hodnoty lepku po prepočte

	Odroda	c_m [g/kg]
1	Bojos-1	61,9
2	Bojos-2	74,2
3	Francin-1	50,9
4	Francin-2	53,6
5	Laudis 550-1	38,3
6	Laudis 550-2	69,5
7	LG Ester-1	58,6
8	LG Ester-2	55,2
9	LG Stamgast-1	49,1
10	LG Stamgast-2	57,9
11	Malz-1	55,7
12	Malz-2	82,5
13	Manta-1	64,0
14	Manta-2	36,3

4.3 Porovnanie množstva lepku v jednotlivých odrodách

Na analýzu odrôd jačmeňa vhodných pre výrobu Českého piva bol použitý set RIDASCREEN gliadin. Jedná sa o sendvičový typ testu imunoanalýzy ELISA, ktorý je založený na tvorbe protilátka-antigén-protilátkového komplexu. Použitá mikrotitračná doštička je pokrytá špecifickými R5 protilátkami, na ktoré sa viažu proteíny gliadínu. Premytím a následným pridaním enzýmového konjugátu dochádza k vzniku vyššie spomínaného komplexu. Po pridaní chromogénu, substrátu a stop roztoku prebehlo stanovenie gliadínu ako miera gluténu vo vzorkách pomocou softwaru RIDASOFT®Win.NET. Obsah gliadínu obyčajne zastupuje 50 % prítomných proteínov lepku (CODEX STAN 118-1979) [41].



Graf 1 Namerané hodnoty lepku v jačmeňoch doporučených na výrobu Českého piva

Najvyššia koncentrácia lepku bola stanovená vo vzorku Malz-2 (82,5 g/kg) a najnižšia vo vzorku Manta-2 (36,3 g/kg). V štúdiu Kerpesa et al., ktorá sa zameriavala na analýzu gluténovo-špecifickej peptidázovej aktivity jačmeňa ovplyvnenou klíčivosťou, stanovovali okrem enzymatickej aktivity aj obsah lepku. Na analýzu používali metódu RP-HPLC. Hodnota gluténu v surovom jačmeni bola stanovená na $32,3 \pm 2,3$ g/kg. Tento výsledok sa pohybuje v rovnakom rozmedzí ako nami namerané obsahy lepku vo vzorkách Manta-2 a Laudis 550-1. V tejto štúdiu merali obsah gluténu aj v slade, na ktorého stanovenie bol vyvinutý špeciálny druh setu. ELISA v kompetitívnom prevedení je kit vhodný na meranie vzoriek, v ktorých prebehol proces fermentovania alebo sú enzymaticky aktívnejšie. Do tejto kategórie patrí aj slad a pivo [38]. V závislosti na nízky enzymatický profil jačmeňa, bolo pre naše meranie vhodnejšie použiť imunoanalýzu ELISA v sendvičovom prevedení.

V štúdiu Dostalek et al. používali rovnaký set aký bol použitý v našom meraní. Pomocou setu RIDASCREEN gliadin, bol stanovený lepok v jačmeni v rozsahu 18,8–45,0g/kg [40]. V tomto intervale sa nachádzajú z našich nameraných hodnôt vzorky Manta-2 a Laudis 550-1.

Všetky ostatné namerané výsledky analyzovaných vzoriek sú vyššie v porovnaní so štúdiami Kerpesa et al. a Dostalek et al.

Kanerva et al. sa vo svojej práci zamerali na meranie lepku v kontaminovanom ovse jačmeňom pomocou ELISA setu. Preukázali závislosť zvyšujúceho obsahu hordeínu na skresľovaní výsledkov. Rovnako bol preukázaný negatívny vplyv extrakcie pomocou etanolu a dlhý čas skladovania zhomogenizovaných vzoriek. Dospeli k záveru, že ELISA set neberie do úvahy rozdiely medzi skupinami obilného prolamínu a to je jeho hlavným problémom. Rovnako boli preukázané lepšie výsledky pre meranie obsahu hordeínu, keď sa použil vhodnejší štandard [45]. Huang et al. sa vo svojej štúdií zamerali na meranie lepku pomocou štyroch ELISA testov. Preukázal, že kit RIDASCREEN gliadin môže poskytovať nadhodnotené výsledky [39]. Dias – Amigo et al. sa vo svojej štúdií zamerali na špecifikáciu a presnosť metódy ELISA. Rovnako bola potvrdená nepresnosť merania obsahu lepku v jačmeni pomocou ELISA setu [46]. Všetky vyššie spomínané skutočnosti mohli spôsobiť, že niektoré naše výsledky dosahovali vyššie hodnoty než vyššie diskutované práce.

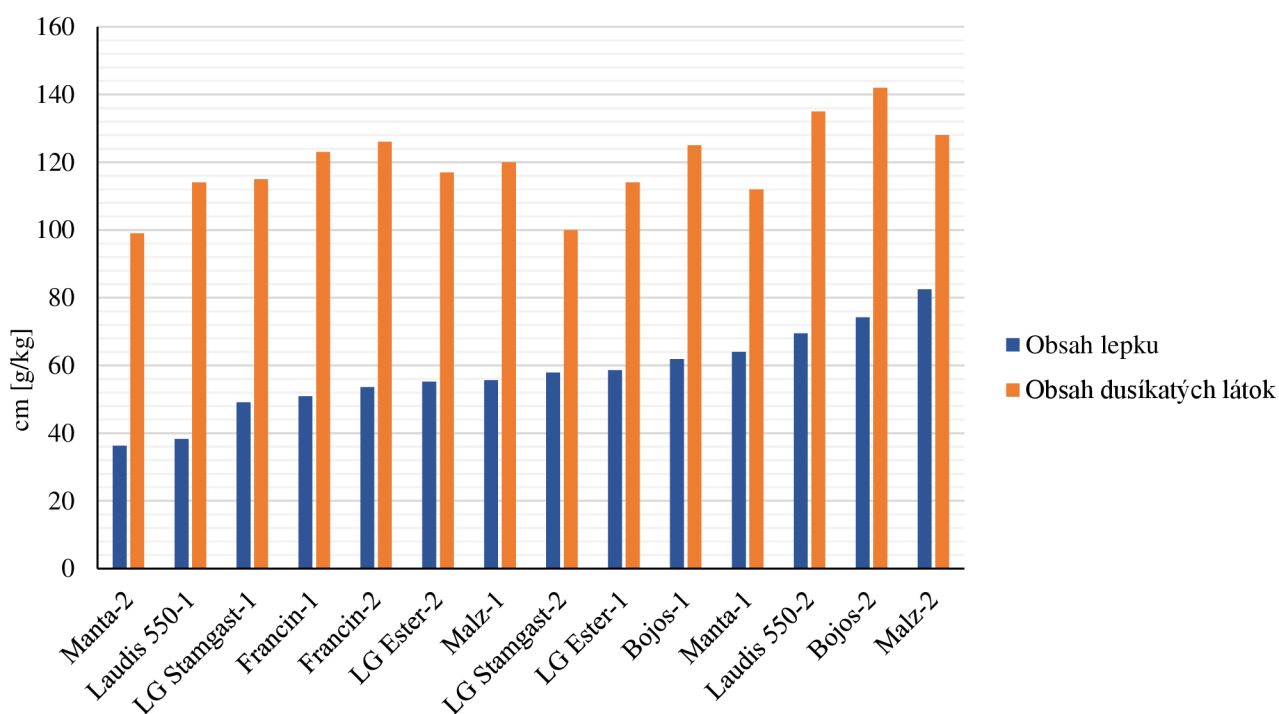
Stanovenie lepku v jačmeni je dôležitým ukazovateľom pri pozorovaní jeho redukcie pri výrobe sladu a následne piva, do ktorého lepok prechádza. Tento transport je nebezpečný pre ľudí trpiacich celiakiou, ale aj pre ľudí, ktorí majú zvýšenú citlivosť na obsah lepku v potravinách. Pernica et al. sa vo svojej práci zamerali na monitorovanie obsahu gluténu v českých komerčne predávaných pivách pomocou ELISA testu v kompetitívnom prevedení. Bol preukázaný prechod lepku do piva, kde sa jeho výsledná hodnota pohybuje v rozmedzí 10 mg/l až 3380 mg/l [44]. Preto je dôležité pri výrobe bezpečného piva z lepkových surovín sledovať jeho obsah vo vstupných surovinách a v jednotlivých medziproduktoch výroby.

Na redukciu lepku pri výrobe piva sa používajú rôzne enzymatické procesy peptidáz, ktoré podľa nových štúdií účinne redukujú obsah lepku pod hodnotu 20 mg/kg. Hranica < 20 mg/kg je legislatívne určená hranica pre potraviny, ktoré sa môžu definovať ako bezpečkové [28]. Okrem enzymatických procesov hrajú dôležitú úlohu pri redukcii gluténu aj proces sladovania či varenia piva, pri ktorých dochádza k jeho čiastočnej degradácii [24]. Fernandez et al. pri meraní obsahu gluténu v rôznych druhoch piva zistili skutočnosť, že set RIDASCREEN Gliadin Competitive poskytuje tiež vyššie hodnoty v porovnaní s inými setmi. Bola tiež zistená závislosť medzi obsahom lepku a druhom kvasenia, ktorý má vplyv na jeho degradáciu. Obsah lepku nameraného v tejto štúdií sa pohyboval v rozsahu 62,7-3120 mg/kg v závislosti na použité druhy a značky lepkových komerčne predávaných pív [47]. Pernica et al. vo svojej práci zistili, že niektoré piva označené ako bezpečkové, obsahovali vyšší podiel lepku, ako udáva legislatíva pre bezpečkové potraviny. Z merania lepku v českých komerčne predávaných pivách vyplýva, že 1 % pív označených ako bezpečkové obsahujú viac ako 20 mg/kg gluténu. Toto zistenie poukazuje na zvýšenú opatrnosť hlavne pre spotrebiteľov, ktorí trpia celiakiou. Pozitívnym zistením z tohto merania je skutočnosť, že 15,4 % radlerov, 55,8 % nealkoholických pív, 71,4 až 75,5 % ležiakov bolo označených ako potraviny s veľmi nízkym obsahom lepku, ktorý udáva legislatíva v rozmedzí 21-100 mg/l [44].

Na optimalizovanie obsahu lepku v pivách vyrábaných z lepkových surovín je zameraná pozornosť na používanie odrôd, ktoré by vykazovali menší obsah gluténu, ktorý by sa v procese výroby sladu a piva znižoval až na legislatívnu úroveň a to pod 20 mg/kg. Z nášho merania vyplýva negatívna závislosť medzi obsahom lepku a odrodou jačmeňa. Celkový obsah gluténu

v obilninách je závislý na podmienkach prostredia, ktoré pôsobia na rast rastliny a dozrievanie zrna. Všetky negatívne aj pozitívne výsledky z meraní posúvajú rozvoj a šľachtenie nových odrôd ďalej, aby vyvinuli nový druh jačmeňa, ktorý by obsahovala menej lepku. Vyšľachtenie menej imunogénneho sladovníckeho jačmeňa nie je fikciou ale realitou, ktorá bola potvrdená v štúdií Isabely Camino et al. [48].

4.4 Porovnanie výsledkov obsahov lepku a dusíkatých látok



Graf 2 Porovnanie obsahu lepku s celkovým obsahom dusíkatých látok

Celkový obsah dusíkatých látok nameraných pomocou metódy NIRS výskumným ústavom VÚPS v Brně bol stanovený v rozsahu 99–142 g/kg. Tieto hodnoty jednotlivých vzoriek nám slúžili na zrovnanie s nameranými dátami lepku. Z tohto porovnávaní je zrejmé, že s vzrastajúcim obsahom dusíkatých látok nedochádza k nárastu obsahu lepku v závislosti na odrode. Rovnako aj zo samotného merania lepku pomocou imunoanalýzy ELISA vyplýva negatívna závislosť medzi odrodami a obsahom lepku. Z dát je zrejмый veľký rozsah medzi výsledkami nameraných pri rovnakej odrode. Napríklad pri odrode Manta môžeme vidieť nekonzistentnosť výsledkov vzorku jedna a dva, medzi ktorými je rozdiel 27,7 g/kg. Rovnakú nesúmernosť výsledkov môžeme tiež pozorovať pri odrode Laudis - 550, kde druhá vzorka mala o 31,2 g/kg vyššiu hodnotu ako prvá.

5 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo zistiť obsah lepku v rôznych odrodách jačmeňa doporučeného na výrobu Českého piva a zistiť závislosť medzi obsahom lepku, odrodou jačmeňa a obsahom dusíkatých látok.

Pre tieto účely bolo vybratých 7 odrôd jačmeňa z jarnej žatvy z roku 2022 po dvoch vzorkách, ktoré boli poskytnuté výskumným ústavom VÚPS v Brně a rovnako aj celková analýza sa uskutočnila v priestoroch výskumného ústavu.

V experimentálnej časti práce bol nameraný obsah lepku pomocou testu RIDASCREEN Gliadin. Jedná sa o sendvičový typ imunoanalýzy ELISA, ktorý je založený na tvorbe protilátka-antigén-protilátkového komplexu. Tento druh analýzy bol vybraný v dôsledku širokého používania nielen v potravinárskom priemysle. Mikrotitračná doštička použitá pri meraní bola pokrytá špecifickými R5 protilátkami, na ktoré sa naviazali proteíny gliadínu. Po pridaní roztokov chromogénu, substrátu a stop roztoku prebehlo stanovenie gliadínu ako miera gluténu vo vzorkách pomocou softwaru RIDASOFT® Win.NET. Výsledný obsah gluténu sa rovná dvojnásobku gliadínu (CODEX STAN 118-1979) [41]. Namerané výsledky sú zaznamenané v tabuľke 3 (Tabuľka 3). Prepočítané hodnoty nameraného lepku v závislosti na riedenie a obsah lepku v slepom vzorku sa nachádzajú v tabuľke 6 (Tabuľka 6). Výsledky obsahu lepku stanovené metódou ELISA by mohli slúžiť ako porovnávacie hodnoty pre vývoj metodiky stanovenia lepku rýchlou metódou FT-NIR.

Vybraté vzorky vykazovali širokú škálu koncentrácií nie len medzi rôznymi ale aj medzi rovnakými odrodami. Z tejto skutočnosti vyplýva, že obsah lepku nezávisí na odrode. Veľké rozpätie hodnôt je výrazné najmä u odrôd Manta, Laudis-550 a Malz. Najnižšie nameraný výsledok bol vo vzorku Manta-2 (36,3 g/kg) a najvyššia zas v Malz-2 (82,5 g/kg). Viacero štúdií preukázalo, že kit RIDASCREEN Gliadin môže poskytovať nadhodnotené výsledky meraných vzoriek obsahu lepku v jačmeni.

Z dát obsahu dusíkatých látok, ktoré boli poskytnuté výskumným ústavom VÚPS v Brně vyplýva, že najnižší obsah dusíkatých látok má odroda Manta-2 (99 g/kg) a najvyšší Bojos (142 g/kg). Celkové obsahy dusíkatých látok v jačmeňoch boli namerané pomocou analýzy NIRS, ku ktorej je referenčná analýza metóda podľa Kjeldahla. V závislosti na porovnaní výsledkov obsahu lepku a celkového obsahu dusíkatých látok je zrejmé, že obsah lepku sa nezvyšuje priamoúmerne so zvyšujúcim sa obsahom dusíkatých látok.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] ZIMOLKA, Josef. *Ječmen - formy a užitkové směry v České republice*. Praha: Profi Press, 2006. ISBN 80-86726-18-5.
- [2] PETR, Jiří a František LOUDA. *Produkce potravinářských surovin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-7080-332-0.
- [3] PŘÍHODA, Josef, Pavel SKŘIVAN a Marie HRUŠKOVÁ. *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. Praha: VŠCHT, 2003. ISBN 80-7080-530-7.
- [4] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [5] TAUFEROVÁ, Alexandra, Michaela PETRÁŠOVÁ, Jana POKORNÁ, Bohuslava TREMLOVÁ a Pavel BARTL. *Rostlinná produkce*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-716-9.
- [6] Seznam doporučených odrůd 2022: Pšenice ozimná, pšenice jarní, jačmen jarní, jačmen ozimný, tritikale ozimé, oves setý. Brno: Agrární komora České republiky, 2022. ISBN 978-80-7401-213-6.
- [7] RANI, Heena a Rachana D. BHARDWAJ. Quality attributes for barley malt: “The backbone of beer”. *Journal of Food Science* [online]. 2021, 86(8), 3322-3340 [cit. 2022-10-22]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.15858
- [8] BASAŘOVÁ, Gabriela a Ivo HLAVÁČEK. *České pivo*. 2. vyd. Praha: Nuga, 1999. ISBN 80-85903-10-5.
- [9] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [10] BARTH, Roger. *The chemistry of beer: the science in the suds*. Hoboken: Wiley, c2013. ISBN 978-1-118-67497-0.
- [11] ALBANESE, Lorenzo, Rosaria CIRIMINNA, Francesco MENEGUZZO a Mario PAGLIARO. Gluten reduction in beer by hydrodynamic cavitation assisted brewing of barley malts. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2017, 82, 342-353 [cit. 2022-10-24]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2017.04.060
- [12] FACHVERLAG, Hans Carl. *Analytica – Microbiologica – EBC: European Brewery Convention: EBC Analytica – Microbiologica*. 2. Norinberg, 2005. ISBN 3-418-00780-5.
- [13] CHLÁDEK, Ladislav. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007. Řemesla, tradice, technika. ISBN 978-80-247-1616-9.
- [14] KINČL, Tomáš. *Praxe výroby piva nejen v malých pivovarech*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2022. ISBN 978-80-7592-122-2.

- [15] BŘEZINOVÁ, Monika. Beer Industry in the Czech Republic: Reasons for Founding a Craft Brewery. *Sustainability* [online]. 2021, 13(17) [cit. 2022-11-11]. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su13179680
- [16] MERINAS-AMO, Tania, Rocío MERINAS-AMO, Victoria GARCÍA-ZORRILLA, et al. Toxicological Studies of Czech Beers and Their Constituents. *Foods* [online]. 2019, 8(8) [cit. 2022-11-11]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods8080328
- [17] YANG, Dongsheng a Xuan GAO. Progress of the use of alternatives to malt in the production of gluten-free beer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2022, 62(10), 2820-2835 [cit. 2022-11-12]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1859458
- [18] HOFFMANOVÁ, Iva. *Celiakie*. Praha: Mladá fronta, 2019. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-5414-0.
- [19] CZAJA-BULSA, Grażyna. Non coeliac gluten sensitivity – A new disease with gluten intolerance. *Clinical Nutrition* [online]. 2015, 34(2), 189-194 [cit. 2022-04-09]. ISSN 02615614. Dostupné z: doi:10.1016/j.clnu.2014.08.012
- [20] FUCHS, Martin. *Potravinová alergie a intolerance*. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3757-0.
- [21] RODRIGO, Luis. Celiac disease. *World journal of gastroenterology: WJG* [online]. Gastroenterology Service, University Hospital Central Asturias, Oviedo, Spain, 2006, 12(41), 6585-6593 [cit. 2022-03-20]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v12.i41.6585
- [22] GUERDRUM, Lindsay J a Charles W BAMFORTH. Levels of gliadin in commercial beers. *Food chemistry* [online]. OXFORD: Elsevier, 2011, 129(4), 1783-1784 [cit. 2022-03-20]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.021
- [23] HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001. ISBN 80-86494-02-0.
- [24] KERPES, Roland, Susann FISCHER a Thomas BECKER. The production of gluten-free beer: Degradation of hordeins during malting and brewing and the application of modern process technology focusing on endogenous malt peptidases. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2017, 67, 129-138 [cit. 2022-11-12]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2017.07.004
- [25] LACORN, Markus, Tina DUBOIS, Thomas WEISS, Lisa ZIMMERMANN, Teresa-Maria SCHINABECK, Simone LOOS-THEISEN a Katharina SCHERF. Determination of Gliadin as a Measure of Gluten in Food by R5 Sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin Matrix Extension: Collaborative Study 2012.01. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 2022, 105(2), 442-455 [cit. 2022-11-17]. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.1093/jaoacint/qsab148
- [26] RIDASCREEN® Gliadin competitive, R-Bio-pharm, AG. Dostupné z: <https://food.r-biopharm.com/products/ridascreen-gliadin-competitive/>

[27] RIDASCREEN Gliadin, R-Bio-pharm, AG. Dostupné z: <https://food.r-biopharm.com/products/ridascreen-gliadin/>

[28] Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 828/2014 ze dne 30. července 2014 o požadavcích na poskytování informací o nepřítomnosti či sníženém obsahu lepku v potravinách spotřebitelům. In: Úřední věstník. L 228/5 17.11.2022, Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0828&from=DA>

[29] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.

[30] DAHAL-KOIRALA, Shiva, Ralf S. NEUMANN, Jørgen JAHNSEN, Knut E.A. LUNDIN a Ludvig M. SOLLID. On the immune response to barley in celiac disease: Biased and public T-cell receptor usage to a barley unique and immunodominant gluten epitope. *European Journal of Immunology* [online]. 2020, **50**(2), 256-269 [cit. 2022-11-17]. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201948253

[31] WATSON, H.G., A.I. DECLOEDT, D. VANDERPUTTEN a A. VAN LANDSCHOOT. Variation in gluten protein and peptide concentrations in Belgian barley malt beers. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2018, **124**(2), 148-157 [cit. 2022-11-17]. ISSN 00469750. Dostupné z: doi:10.1002/jib.487

[32] Chráněné zeměpisné označení České pivo. In: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský [online]. [cit. 2022-11-17]. Dostupné z: <https://beerresearch.cz/chrane-zemepisne-oznaceni-chzo-ceske-pivo/>

[33] THOMÉ, O.W.: Flora von deutschland, Österreich und der Schweiz. In wort und bild für Schule und Haus, 2003. <http://www.biolib.de/>

[34] Nařízení Komise (ES) č. 1014/2008 ze dne 16. října 2008 o zápisu určitých názvů do Rejstříku chráněných označení původu a chráněných zeměpisných označení (České pivo (CHZO), Cebreiro (CHOP)). In: Úřední věstník. L 276/27 03.02.2023, Dostupné z: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:276:0027:0028:CS:PDF>

[35] HAVLOVÁ, Pavla. Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu: (studijní zpráva). Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1999. Studijní informace. ISBN 80-7271-040-0.

[36] SCHERF, Katharina Anne, Peter KOEHLER a Herbert WIESER. Gluten and wheat sensitivities – An overview. *Journal of Cereal Science* [online]. 2016, **67**, 2-11 [cit. 2023-02-25]. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2015.07.008

[37] AKEROYD, Michiel, Sylvie VAN ZANDYCKE, Joost DEN HARTOG, Jozé MUTSAERS, Luppo EDENS, Marco VAN DEN BERG a Chantal CHRISTIS. AN-PEP, Proline-Specific Endopeptidase, Degrades All Known Immunostimulatory Gluten Peptides in Beer Made from Barley Malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2018, 74(2), 91-99 [cit. 2023-02-25]. ISSN 0361-0470. Dostupné z: doi:10.1094/ASBCJ-2016-2300-01

[38] KERPEŠ, Roland, Verena KNORR, Susanne PROCOPIO, Peter KOEHLER a Thomas BECKER. Gluten-specific peptidase activity of barley as affected by germination and its impact on gluten degradation. *Journal of Cereal Science* [online]. 2016, 68, 93-99 [cit. 2023-03-24]. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2016.01.004

[39] HUANG, Xin, Hanna AHOLA, Matthew DALY, Chiara NITRIDE, EN Clare MILLS a Tuula SONTAG-STROHM. Quantification of Barley Contaminants in Gluten-Free Oats by Four Gluten ELISA Kits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2022, 70(7), 2366-2373 [cit. 2023-03-24]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.1c07715

[40] DOSTÁLEK, P., I. HOCHÉL, E. MÉNDEZ, A. HERNANDO a D. GABROVSKÁ. Immunochemical determination of gluten in malts and beers. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2006, 23(11), 1074-1078 [cit. 2023-03-24]. ISSN 0265-203X. Dostupné z: doi:10.1080/02652030600740637

[41] BELGIUM. GUIDANCE ON GLUTEN-FREE LABELLING: Based on STANDARD FOR FOODS FOR SPECIAL DIETARY USE FOR PERSONS INTOLERANT TO GLUTEN CODEX STAN 118-1979. In: . Dostupné také z: <https://www.isdi.org/wp-content/uploads/2018/12/ISDI-Gluten-Free-07-final.pdf>

[42] DENAULT, André Y., Mohamed SHAABAN-ALI, Alexis COURNOYER, Aymen BENKREIRA a Tanya MAILHOT. Near-Infrared Spectroscopy. In: *Neuromonitoring Techniques* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 179-233 [cit. 2023-04-09]. ISBN 9780128099155. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809915-5.00007-3

[43] RALLABHANDI, Prasad, Girdhari M. SHARMA, Marion PEREIRA a Kristina M. WILLIAMS. Immunological Characterization of the Gluten Fractions and Their Hydrolysates from Wheat, Rye and Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, 63(6), 1825-1832 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf505716p

[44] PERNICA, Marek, Rastislav BOŠKO, Zdeněk SVOBODA, Karolína BENEŠOVÁ a Sylvie BĚLÁKOVÁ. Monitoring of gluten in Czech commercial beers. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2020, 38(4), 255-258 [cit. 2023-04-09]. ISSN 12121800. Dostupné z: doi:10.17221/61/2020-CJFS

[45] KANERVA, Päivi M., Tuula S. SONTAG-STROHM, Päivi H. RYÖPPY, Pirjo ALHO-LEHTO a Hannu O. SALOVAARA. Analysis of barley contamination in oats using R5 and ω -gliadin antibodies. *Journal of Cereal Science* [online]. 2006, 44(3), 347-352 [cit. 2023-04-14]. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2006.08.005

- [46] DIAZ-AMIGO, Carmen a Bert POPPING. Accuracy of ELISA Detection Methods for Gluten and Reference Materials: A Realistic Assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, 61(24), 5681-5688 [cit. 2023-04-15]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf3046736
- [47] FERNÁNDEZ-GIL, María del Pilar, Edurne SIMON, Anna GIBERT, Jonatan MIRANDA, Esther ROGER ALCOBA, Olaia MARTÍNEZ, Elisenda VILCHEZ CEREZO a María Ángeles BUSTAMANTE. Gluten Assessment in Beers: Comparison by Different Commercial ELISA Kits and Evaluation of NIR Analysis as a Complementary Technique. *Foods* [online]. 2021, 10(6) [cit. 2023-04-15]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10061170
- [48] COMINO, Isabel, Ana REAL, Javier GIL-HUMANES, et al. Significant differences in coeliac immunotoxicity of barley varieties. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2012, 56(11), 1697-1707 [cit. 2023-04-14]. ISSN 16134125. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.201200358
- [49] YANG, Dongsheng a Xuan GAO. Progress of the use of alternatives to malt in the production of gluten-free beer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2022, 62(10), 2820-2835 [cit. 2023-04-30]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1859458
- [50] GUMIENNA, Małgorzata a Barbara GÓRNA. Gluten hypersensitivities and their impact on the production of gluten-free beer. *European Food Research and Technology* [online]. 2020, 246(11), 2147-2160 [cit. 2023-04-30]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-020-03579-9

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

PET – polyethylentereftalát

CKT – cylindrokónické tanky

ELISA – enzýmová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)

NIRS – blízka infračervená spektroskopia

VÚPS – Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.

8 ZOZNAM PRÍLOH

Príloha č. 1 Kalibračná krivka vytvorená softwarom RIDA SOFT Win.NET

Príloha č. 2 Vyextrahované a scentrifugované vzorky

Príloha č. 3 ELISA set na meranie lepku

Príloha č. 4 Mikrotitračná doštička pred pridaním STOP roztoku

Príloha č. 5 Mikrotitračná doštička po pridaní STOP roztoku

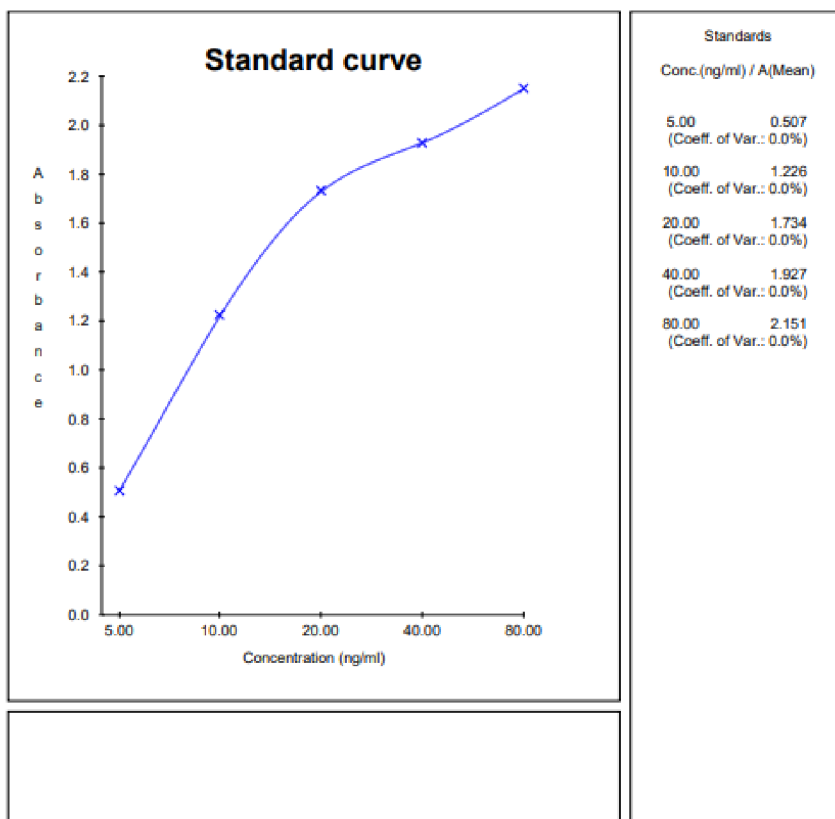
Príloha č. 1 Kalibračná krivka vytvorená softwarom RIDA SOFT Win.NET

Glúdin

17. Mar. 2023, 12:48:25, Spline, 450/630 nm, Ser.No: 4129.11070242, Version: 1.107.0.242

Plate Values

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.115	0.001	2.157	0.000	0.000	1.169	0.000	0.000	1.077	0.000	1.344	0.001
B	0.507	0.000	2.191	0.000	0.000	0.965	0.000	0.000	1.094	0.000	1.349	0.001
C	1.927	0.000	1.192	0.000	0.000	0.884	0.000	0.000	1.017	0.000	1.219	0.001
D	1.226	0.000	1.128	0.000	0.000	0.834	0.000	0.000	1.003	0.000	1.144	0.000
E	1.734	0.000	1.255	0.000	0.000	1.193	0.000	0.000	1.112	0.000	0.867	0.000
F	2.151	0.000	1.302	0.000	0.000	1.279	0.000	0.000	1.122	0.000	0.789	0.000
G	2.890	0.000	1.007	0.000	0.000	1.083	0.000	0.000	1.213	0.000	0.487	0.000
H	3.088	0.000	1.058	0.000	0.000	1.167	0.000	0.000	0.968	0.000	0.512	0.000



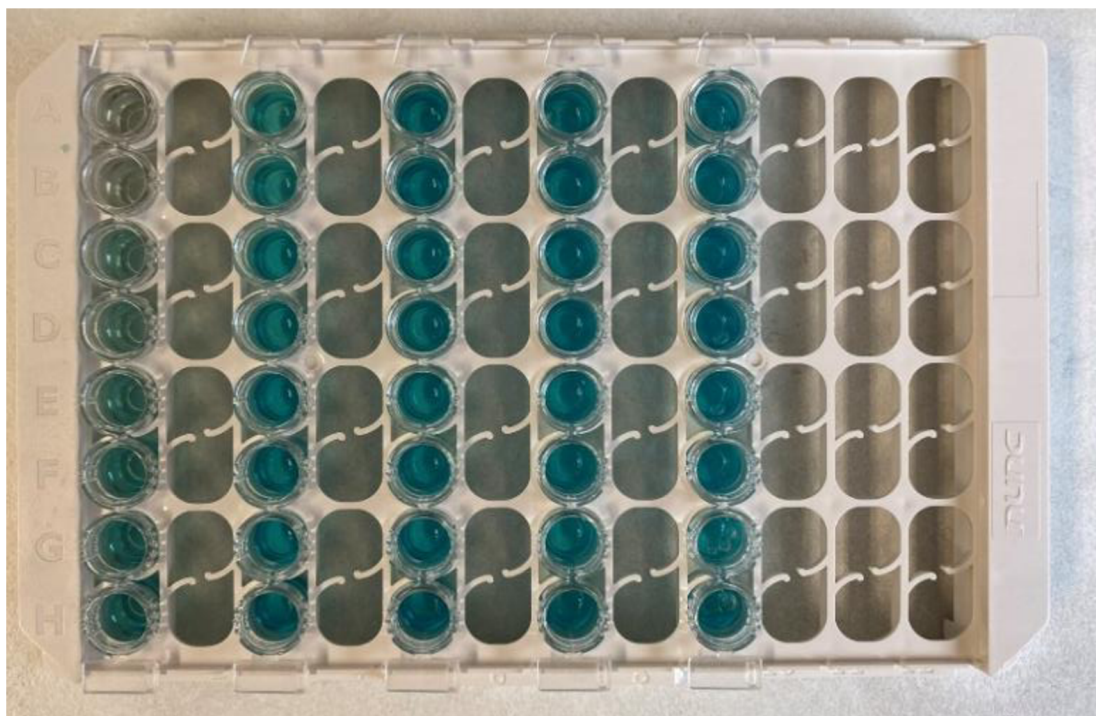
Priloha č. 2 Vyextrahované a scentrifugované vzorky



Priloha č. 3 ELISA set na meranie lepku



Príloha č. 4 Mikrotitračná doštička pred pridaním STOP roztoku



Príloha č. 5 Mikrotitračná doštička po pridaní STOP roztoku

