

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Aminokyseliny v ječmeni a sladu

Bakalářská práce

Autor práce: David Srp, DiS.

Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Aminokyseliny v ječmeni a sladu" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7. dubna 2017

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Matyáši Orsákovi, Ph.D. za patřičné vedení
Bakalářské práce.

Aminokyseliny v ječmeni a sladu

Souhrn. Tato práce popisuje aminokyseliny v ječmeni a sladu. Bakalářská práce je v celém svém rozsahu napsaná formou rešerše, která klade důraz na pochopení souvislostí mezi aminokyselinami, jejich obsahem v ječmenu a sladu a následně v pивě. Definuje základní pojmy dusíkatých látek. Zabývá se bílkovinami a aminokyselinami.

Práce se zabývá ječmenem a rozebírá jeho potřeby živin pro kvalitní výnos a metodu osevního postupu ječmene. Dále množstvím dusíkatých látek během procesu dozrávání a skladování ječmene. Práce klade důraz na enzymy v ječmeni a sladu, které zastávají důležitou roli při změnách hodnot dusíkatých látek (aminokyselin). Tyto hodnoty se mění během celého procesu od růstu rostliny jarního ječmene, úpravy sladu, až po výrobu piva.

Nejmenší podobou dusíkatých látek jsou aminokyseliny, které mají pozitivní i negativní vliv na využití ječmene, popřípadě sladu v potravinářském průmyslu. Množství aminokyselin ve sladu se odvíjí od počátečního množství aminokyselin a od kvality samotného ječmene. Předpoklad pro vhodný obsah aminokyselin se již získává během růstu jarního ječmene a kvalitou pěstitelské půdy. Některé aminokyseliny, například methionin, mají roli při tvorbě těkavých látek, které negativně ovlivňují sensorické vlastnosti výrobků. Řada aminokyselin je asimilována kvasinkami jak svrchního, tak spodního typu. Tím dochází k přirozenému snížení obsahu aminokyselin v pивě. Jednotlivé množství aminokyselin musí být v rovnováze, aby nedocházelo ke vzniku negativních sensorických vad v pивě.

N-látky se stanovují různými metodami. Stanovení aminokyselin lze provést titračně - formolovou titrací nebo spektrofotometrickými metodami, které řadíme k základním metodám.

Klíčová slova: aminokyseliny, sирné aminokyseliny, kvasinky, N-látky.

Amino acids in barley and malt

Summary. This bachelor's thesis describes amino acids in barley and malt. This thesis is written in a form of a research, which places emphasis on the importance of understanding the relation between amino acids, their content in barley and malt and afterwards in beer. It defines basic terms of nitrogenous substances and deals with proteins and amino acids.

This thesis focuses on barley and its need of nutrients for a high-quality yield, on the method of the sowing procedure of barley and also on the amount of nitrogenous substances during the process of ripening and storage of barley. It lays stress on enzymes in barley and malt, which play an important role during the changes of values in nitrogenous substances (amino acids). These values change throughout the whole process, beginning from the growth of a spring barley, through modification of malt to beer production.

The smallest form of nitrogenous substances are amino acids, which pose both positive and negative impact on the use of barley, alternatively malt in food (processing) industry. The amount of amino acids in malt depends on the initial amount of amino acids and on the quality of the barley itself. Prerequisite for a suitable content of amino acids is obtained during the growth of a spring barley and by the quality of the cultivated land. Some of the amino acids, for example methionine, play a role during the production of volatile substances which negatively affect some of the sensory properties of the products. Number of amino acids is assimilated by yeast of both, upper and lower type. This leads to a natural reduction of amino acids content in beer. Individual amount of amino acids must be balanced, so that there is no negative sensory defect in the beer.

N-substances are defined by various methods. Defining amino acids can be performed by titration – formol titration or spectrophotometric methods, which are classified as the basic methods.

Keywords: amino acids, sulphurous amino acids, yeast, N-substances.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce	2
3. Dusíkaté látky.....	3
3.1. Aminokyseliny.....	4
3.2. Bílkoviny	7
4. Potravinářský průmysl a ječmen.....	9
5. Ječmen.....	11
5.1. Podmínky pěstování sladovnického ječmene v České republice	11
5.2. Zařazení v osevním postupu	13
5.3. Posklizňová úprava a skladování	14
5.4. Jakostní parametry ječmene a sladu.....	15
5.5. Enzymy	18
5.6. Enzymy v ječmeni a ve sladu.....	21
6. Slad.....	27
6.1. Druhy sladů.....	28
6.2. Dusíkaté látky ve sladu	29
7. Aminokyseliny v ječmeni, sladu a jejich význam	30
7.1. Methionin ve sladu.....	33
7.2. Význam aminokyselin.....	34
8. Metody stanovení	41
9. Závěr	42
10. Seznam použité literatury	43

1. Úvod

Toto téma práce jsem si vybral pro její zajímavost a obsáhlost. Jsem si jistý, že nabyté vědomosti do budoucna využiji. Dále bych se rád věnoval problematice aminokyselin v pivovarnictví. Práci s názvem Aminokyseliny v ječmeni a sladu jsem si vybral pro její aktuálnost. Zkušenosti jsem nasbíral během odborných konzultací.

Cílem práce je popsat aminokyseliny v ječmeni, sladu a seznámit se základním dělením dusíkatých látek. V práci je kladen důraz na ovlivnění aminokyselin v potravinářském průmyslu se zaměřením na průmysl pivovarnický.

Práce je psána formou rešerše, která zachycuje problematiku aminokyselin napříč výzkumnými články. Práce je rozdělena na tři části. První část práce se zabývá charakteristikou dusíkatých látek, tedy bílkovin a aminokyselin. Druhá část této práce popisuje potravinářský a zemědělský průmysl a zabývá se ječmenem a sladem. Třetí část se zabývá metodami stanovení a popisem chemicko-fyzikálních metod vhodných ke stanovení aminokyselin v ječmeni a sladu.

2. Cíl práce

Formou rešerše zpracovat obsah aminokyselin v ječmeni a sladu a v následném výrobku, kterým je pivo. Je kladen důraz na zjištění faktorů, které množství aminokyselin ovlivňuje, jak v ječmeni, tak následně ve sladu. Zjistit, jak se množství aminokyselin během změn teplot mění. Cílem je i popis rozdílů v asimilaci aminokyselin kvasinkami odlišného typu. Je kladen důraz na popsání aktuální vhodné metodiky pro stanovení obsahu jednotlivých aminokyselin.

3. Dusíkaté látky

Jedná se o významnou složku organických látek v ječmeni a sladu. Obsah dusíkatých látek se liší a je dán vlivem vnějšího prostředí. Vnějším prostředím pro dusíkaté látky je závislost na odrůdě, složení půdy, hnojení, předplodina, klimatické podmínky a délka vegetace. Obsah dusíkatých látek nám určuje míru vhodnosti zrna pro sladovnický účel. Ječmen využívaný pro sladařství má mít obsah dusíkatých látek vyjádřen pomocí obsahu bílkovin. Výsledný obsah bílkovin má být pro použití v rozmezí od 10 % až do 11,5 %.

Tvorba bílkovin v ječmeni je založena na příjmu amoniaku a obsahu organických kyselin. Organické kyseliny vznikají pomocí štěpení sacharidů ve formě meziproductů této reakce. Syntéza bílkovin a aminokyselin probíhá v systému enzymových reakcí. V tomto systému se podílí svou mírou ATP, ribonukleové kyseliny a ribozom (Kosař, 2000).

ATP. Adenosintrifosfát patří do skupiny adenosinfosfátových koenzymů. Tyto koenzymy mají roli v energetickém metabolismu buňky. Koenzymy umožňují přenos chemické energie získané z rozkladu živin. ATP je sloučenina, která má vysoký potenciál pro přenos fosfátové skupiny.

Ribonukleové kyseliny. RNA vznikají syntézou z DNA v jádře a následně putují do cytoplasmy. Rozlišujeme tři typy RNA – transferovou, mediátorovou a ribozomální. Transferová RNA přenáší aminokyseliny do ribozomu, kde probíhá syntéza bílkovin. Ribozomální RNA je nerozpustná forma ribonukleových kyselin a jedná se o nejpočetnější kyselinu v buňce (Hruban a Majzlík, 2002).

Ribozom. Jedná se o složitý nukleoproteinový útvar. Dělí se na malou a velkou podjednotku. Během chemického procesu, tedy zahájení translace, se obě podjednotky spojují v jedno. V ribozomu dochází k připojování aminokyselin do peptidového řetězce (Kočárek, 2008).

Dusíkaté látky se dají rozdělit na dvě základní skupiny. První skupinu tvoří dusíkaté látky typu bílkovin a jejich štěpných produktů. Do této skupiny se řadí aminokyseliny,

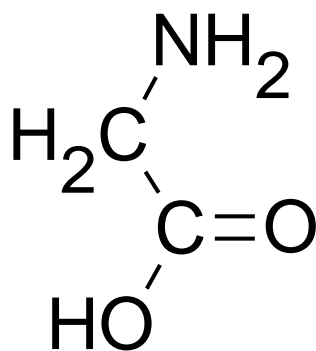
peptidy, peptony, albumosy a proteiny. Druhá skupina dusíkatých látek je typu dusíkaté látky nebílkovinné povahy. V této skupině se nachází dusíkaté báze, fosfatidové složky, amidy a amonné soli. Dále se do této skupiny přiřazují látky tvořící meziprodukty výstavby a štěpení bílkovin. Těmito látkami jsou albumosy, peptony, polypeptidy a aminokyseliny (Kosař, 2000).

3.1. Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou substituční deriváty karboxylových kyselin, které obsahují vedle karboxylu také aminoskupinu. Mají dvě funkční skupiny, jedna je kyselá, neboli karboxyl a druhá bazická zvaná aminoskupina mezi kterými dochází k acidobazické reakci. Aminoskupina se může vyskytovat ve více polohách vůči skupině karboxylové, ale nejčastěji se vyskytuje v poloze α . V poloze α se vyskytují většinou přírodní aminokyseliny. Aminokyselina má dvojitý výskyt. Může se nacházet volně nebo se nachází ve stavu vzájemného spojení. Tedy ve stavu, kdy vytváří stavební jednotky peptidů a bílkovin (Vondrážka, 2002).

Nejjednodušší aminokyselinou je aminooctová kyselina. Tato kyselina se též nazývá jako glycin nebo glykokol. Od této aminokyseliny se pomocí substituce α -vodíkového atomu odvozují i další aminokyseliny.

Obrázek č. 1 – Aminooctová kyselina.



Uhlíkový atom je chirální a aminokyseliny mohou existovat ve dvou formách enantiomerie. Tyto formy označujeme jako L- a D- formu. Nejvýznamnější aminokyseliny jsou stavební složky rostlinné a živočišné bílkoviny a mají enantiomerii ve formě L-. Výjimkou je aminoctová kyselina. Těchto L- aminokyselin je celkem 20 a nazýváme je jako kódované aminokyseliny. Vznikají v těsné souvislosti s genetickým kódem daného organismu. Rostliny si všechny aminokyseliny vytváří samy oproti živočišným organismům, kteří si některé aminokyseliny nedokážou připravit a jsou odkázány na jejich příjem přes potravu. Tyto aminokyseliny se nazývají esenciální (Pacák, 2007).

Rozdělení. Aminokyseliny se dělí do tří skupin – na aminokyseliny neutrální, kyselé a bazické. Neutrální aminokyseliny jsou glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, tyrosin, dihydrotyrosin, tyroxin, tryptofan, prolin, hydroxyprolin, serin, threonin, methionin, cystein a cystin. Kyselé aminokyseliny jsou zastoupeny asparagovou a glutamovou kyselinou. Bazické aminokyseliny jsou lysin, arginin, histidin (Cram and Hammond, 1964; Pacák, 2007).

Jednotlivé aminokyseliny lze rozdělit do čtyř skupin. První skupinou jsou aminokyseliny s nepolárním zbytkem R a tvoří ji aminokyseliny s uhlovodíkovým postranním řetězcem. Zde se řadí glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin a fenylalanin. Druhou skupinou jsou aminokyseliny s neionizovanými a polárně působícími skupinami ve vedlejším řetězci. Třetí skupinu představují kyselé aminokyseliny obsahující druhou karboxylovou skupinu ve zbytku R. Čtvrtou skupinou jsou bazické aminokyseliny, které obsahují další bazickou skupinu (Cram and Hammond, 1964).

Struktura. Jedná se o nejjednodušší dusíkatou sloučeninu. Je známo kolem 130 aminokyselin, z toho 18 až 20 se vyskytuje v bílkovinách. Bílkoviny, kromě zbytků aminokyselin, obsahují i jiné látky. *„Architektura molekul bílkovin i jejich základní vlastnosti jsou však určovány druhem přítomných aminokyselinových zbytků pořadím, ve kterém jsou pospojovány v polypeptidových řetězcích, a prostorovými vztahy jednoho aminokyselinového zbytku ke druhému.“* (Vondrážka, 2002).

Ke zkrácenému zápisu struktury peptidů a bílkovin využíváme pro aminokyseliny třípísmenné symboly. Ty tvoří většinou první tři písmena triviálního názvu aminokyseliny a značí její plnou strukturu. Pro další popisování se používají valenční čárky.

Funkce. Mnoho aminokyselin má specifickou funkci. Některé mají funkci přenašeče specifických skupin nebo jsou i latentní zásobou aminoskupin pro organismus. U některých dosud není známá jejich úloha. Zejména u rostlin se setkáváme s řadou různých aminokyselin, kde jejich biologická funkce není ještě objasněna (Vondrážka, 2002).

Vlastnosti. Pro formování konformace je na prvním místě důležitá fyzikální vlastnost postranního řetězce aminokyseliny. Na druhém místě je samotná chemická povaha. Fyzikální vlastností je míněná velikost, polarita a acidobazický charakter. Přibližně polovina aminokyselin, které jsou kódované, mají zcela nepolární formu postranního řetězce. Jedná se o alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin a fenylalanin. Do této skupiny řadíme i omezeně tryptofan a methionin. Tyto dvě aminokyseliny jsou ve vodě méně rozpustné než předešlé jmenované. Jejich postranní řetězec má uplatnění v interakcích bílkovin, zejména hydrofobních. Další aminokyseliny se mohou rozdělit do dvou skupin. Na skupinu, ve které polární postranní řetězec aminokyseliny nemá elektrický náboj při výskytu neutrálního prostředí a díky tomu smí postranní řetězec vytvářet vodíkové vazby. Jedná se o aminokyselinu serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin a v neposlední řadě o glutamin. Následně můžeme popsat skupinu aminokyselin, která má elektrický náboj přímo na postranním řetězci. Tyto aminokyseliny jsou součástí elektrostatických interakcí. Do těchto skupin řadíme bazické aminokyseliny histidin, lysin a arginin. Nedílnou součástí skupiny jsou aminodikarboxylové kyseliny, asparagová a glutamová. Aminokyseliny mají optické vlastnosti. Tyto vlastnosti se projevují u aromatických kruhů aminokyselin tryptofan, tyrosin a fenylalanin. Optické vlastnosti těchto aminokyselin se využívají při stanovení dané aminokyseliny nebo při určování koncentrace peptidů a bílkovin. Podmínkou je, že peptid nebo bílkovina musí alespoň jednu aminokyselinu obsahovat (Vondrážka, 2002).

3.2. Bílkoviny

Bílkoviny jsou sloučeniny, bez nichž by život v dnešní podobě neexistoval. Vyskytují se v různých podílech v každé buňce živého organismu. Chemicky jsou blízké peptidům, liší se však větší relativní molekulovou hmotností. Jednotka relativní molekulové hmotnosti se pohybuje obvykle v deseti až sta tisíc. Hydrolyzou bílkovin vznikají L-aminokyseliny. Počet aminokyselin, které se podílejí na výstavbě molekul bílkovin, je ohraničen dvaceti aminokyselinami, přes tento počet se více nepodílí. Všechny molekuly téže bílkoviny jsou zcela identické a mají shodnou relativní molekulovou hmotnost. Bílkoviny lze dělit na dva typy, ve vodě rozpustné a nerozpustné. Mezi bílkoviny patří enzymy biokatalyzátory (Pacák, 2007).

Bílkoviny, které v přírodě existují, jsou zastoupeny malým počtem. Odhaduje se, že se v přírodě vyskytují v množství 10^6 . Jedná se o bílkoviny, u kterých má jejich polypeptidový řetězec schopnost se svinout do své specifické terciární struktury. Díky této specifčnosti bílkoviny provádí biologické funkce (Vondrážka, 2002).

Struktura bílkovin. U bílkovin se rozeznávají čtyři typy struktury, a to primární, sekundární, terciární a kvarterní. Primární struktura je přesné uspořádání aminokyselinových zbytků v makromolekule. Sekundární struktura je prostorové uspořádání bílkovinného řetězce. Výsledkem uspořádání je vznik vodíkových vazeb. Tyto vazby vznikají mezi protilehlými skupinkami N-H a C=O. Terciární struktura je celkové prostorové uspořádání makromolekuly bílkoviny. Dochází k přitahování nebo odpuzování různých polárních a nepolárních skupin. Tímto procesem vzniká prostorové uspořádání a dochází k zprohýbání makromolekuly. Kvarterní struktura popisuje molekulu skládající se z několika strukturních podjednotek. Podjednotka se skládá z polypeptidového řetězce. Tyto řetězce nejsou spojeny kovalentní vazbou. Kvarterní struktura udává vzájemnou polohu těchto podjednotek (Pacák, 2007).

Polypeptidový řetězec. Jedná se o základní strukturní prvek všech bílkovin. Bílkoviny mají peptidickou vazbu, která se označuje i jako amidová. Pomocí této vazby jsou spojeny aminokyselinové zbytky v polymerní řetězec. Tento poznatek byl již objeven roku 1902. Z chemického hlediska se tedy jedná o polyamidy, které vznikají několikanásobnou intermolekulovou kondenzací jednotlivých aminokyselin. Budování polypeptidového řetězce má přísná pravidla. Jedná se o lineárně nevětvenou strukturu, kterou tvoří řada zbytků různých L-aminokyselin spojených α -peptidovou vazbou. Vazba vzniká kondenzací α -karboxylu aminokyseliny a α -aminoskupiny následující aminokyseliny. Následně vzniká na jednom konci řetězce volná α -aminoskupina a na druhém volný karboxyl. Polypeptidická struktura řetězce udává sled aminokyselinových zbytků. Některé bílkoviny jsou tvořeny jedním, dvěma, vzácně i více polypeptidovými řetězci, které jsou pevně kovalentně spojeny (Vondrážka, 2002).

Rozdělení bílkovin. Bílkoviny se rozdělují na dvě skupiny. Jednou skupinou jsou proteiny jednoduché, kde se vyskytují pouze aminokyselinové zbytky. Druhá skupina obsahuje bílkoviny složené neboli konjugované, kde je přítomna i jiná nebílkovinná složka. Jedná se o lipoproteiny, které obsahují lipidy. Dále glykoproteiny obsahující sacharid, fosfoprotein obsahující kyselinu fosforečnou, metaloproteiny, kde se nachází iont kovu, nukleoproteiny obsahující nukleové kyseliny. Bílkoviny lze dělit do dvou skupin podle jejich tvaru, a to na skleroproteiny a sferoproteiny (Pacák, 2007).

Peptidy. Existuje řada sloučenin od jednotlivých aminokyselin až po bílkoviny. Peptidy dělíme dle počtu spojených aminokyselinových zbytků na dipeptidy, tripeptidy a další. Jedná se o sloučeniny polypeptidového charakteru obsahující do 50 aminokyselinových zbytků. Nad více než 50 aminokyselinových zbytků už řadíme k bílkovinám. Peptidy plynule navazují na bílkoviny. Jejich vlastností je, že se dají hydrolyzovat kyselé, alkalicky i enzymaticky. Hydrolyza probíhá za vzniku jednotlivých aminokyselin (Pacák, 2007).

4. Potravinářský průmysl a ječmen

Linky pivovarů a sladoven. Jedná se o výrobky, kategorie alkoholické nápoje. Pivo je vyrobeno z ječného sladu, chmele a vody s použitím čisté kultury pivních kvasinek. Dále obsahuje látky nezkvasitelné, malé množství látek obtížně zkvasitelných, alkohol a oxid uhličitý. Nápoj působí povzbudivě, hořké chmelové látky podporují trávení. Přítomnost oxidu uhličitého volného i vázaného působí pocit osvěžení. Slad se u nás vyrábí z ječmene, jeho zrno obsahuje hlavně škrob a bílkoviny. V původním stavu se zrno nedá zpracovat pro výrobu piva. Složky v něm obsažené jsou ve formě vodou nerozpustné. Výroba sladu dříve probíhala v 9 měsíčním intervalu s následnou pauzou. Momentální technologie umožňuje celoroční provoz, tedy celoroční výrobu sladu. Využívá se technologie strojního chlazení. Příjem ječmene do sladoven trvá přibližně 1 měsíc v roce (Zvoníček a Ječmen, 1984).

Pekařské zvláštnosti ječmene. Významné odlišnosti složek zrna ječmene omezuje možnost použití v tradiční pekárenské podobě. Ječmen obsahuje nižší podíl makromolekulárních bílkovin. Zároveň odlišné vlastnosti bílkovin neumožňují vytvoření dostatečně pevné a pružné bílkovinné struktury těsta. Tato struktura není dosažena při použití pouze ječné mouky. Není tedy dosaženo klenutého výrobku s normální výškou, jako u výrobku z mouky pšeničné. Ječmen je odlišný i při svém mletí na mouku. Nevyužívá se pšeničného mlýnu, který není přizpůsoben na mletí ječné mouky. Ovšem se využívá mlýnu na žitnou mouku. S ječmenem má obdobné vlastnosti, jen je poupravený v nastavení chodu.

Ječmen se v potravinářství využívá zejména pro svůj pozitivní vliv na snižování krevního cholesterolu. Ječná vláknina má příznivý vliv na trávicí systém. Účinnou složkou vlákniny je vláknina rozpustná. Tato složka je rozmístěna v zrnu rovnoměrněji oproti složce nerozpustné. Účinnou složkou rozpustné vlákniny je beta-glukan. Při odstranění povrchových vrstev zrna ječmene, v rozsahu 10 %, zůstává poměr beta-glukanů v množství 80 % z celého zrna. Při odstranění 25 % povrchových vrstev zrna zůstává

množství beta-glukanů v přibližných jednotkách, jako je jejich průměr v celém zrna (Smrž, 2012).

Ječmen v těstovinách. Těstoviny vyrobené z ječné mouky jsou ve stavu sušeném. Jsou oblíbené pro své výborné sensorické vlastnosti a poměrně dlouhé době trvanlivosti. Ta je dána relativně nízkou vlhkostí, která se pohybuje v rozmezí 13 %. Jsou vhodné zejména díky požadavku na zdravou výživu. Ječné těstoviny mají nízkou kalorickou hodnotu. Dále jsou díky svému složení lehce stravitelné. Na 100 g výrobku obsahují 75 % sacharidů, 11,5 % bílkovin a vláknina je zastoupena ve 3 %. Ve výrobku je obsaženo mnoho vitamínů, jako je thiamin, niacin a riboflavin. Nachází se tu minerální látky, zejména železo, hořčík, sodík, vápník a zinek. Sodík je zde zastoupen v příliš pozitivním čísle a to 0,3 %.

Ječmen v mlékárenském průmyslu. Mlékárenský průmysl využívá ječmen pro svou pozitivní vlastnost – obsah vlákniny. Tímto zvyšuje množství vlákniny ve svých jogurtech za pomoci ječné perly. Vlivem zvýšení obsahu vlákniny je i cíl zrychlit výrobní postup jogurtů až o 25 %. Ječné perly tvoří v jogurtu minimálně 20 % z obsahu.

Ječmen je přidáván i do tavených sýrů, které si u nás vybudovaly značnou tradici a sílu na trhu. Toho docílily díky dlouhé trvanlivosti a širokému sortimentu, který zahrnuje pomazánky, plátky, tuby, omáčky, dezerty a neomezená možnost aplikace ochucujících složek. Tavený sýr patří mezi významný zdroj živočišné bílkoviny a minerálních látek. Významným představitelem minerálních látek je zastoupení vápníku. Kombinace s ječmenem má vlastnosti taveného sýru prohloubit. Hlavní složkou má být množství rozpustné vlákniny a její beta-glukan. Tuto složku totiž samotný tavený sýr nabídnout nemůže. Ječmen se do taveného sýra dostává pomocí ochucených ječných perliček. Tyto perličky přináší obohacení jak o vlákninu, tak i možnost podpořit kreativitu taveného sýra. Tavený sýr s ječnými perličkami vyniká sýrovou chutí. Ta je charakteristicky ovlivněna právě perličkami, které jsou příjemné na skus. Tavený sýr si zachovává příjemnou roztíratelnost a novou vlastností je viditelnost kousků ječných perliček. Ječná perlička neovlivňuje dobu trvanlivosti sýru (Smrž, 2012).

5. Ječmen

Po pšenici se jedná o nejdůležitější obilovinu v České republice. Jarní ječmen se pěstuje ve všech výrobních podmínkách. Vysoké sladovnické hodnoty ječmene dosahuje za určitých půdních a klimatických podmínek. Tyto podmínky vymezují oblasti pěstování. Určují nám možnost úspěšného pěstování kvalitního sladovnického ječmene. V České republice se nachází několik kvalitních oblastí pro pěstování sladovnického ječmene. V Čechách se nachází dvě oblasti, jedná se o oblast Polabské nížiny a Středočeské pahorkatiny. Na Moravě se nachází také dvě oblasti pěstování, jedná se o centrální území Hané a celou střední Moravu (Kosař, 1997).

5.1. Podmínky pěstování sladovnického ječmene v České republice

Jarní ječmen má schopnost vytvořit vysoký výnos zrna na hektar. Tento výnos je podmíněn ještě poměrně krátkým vegetačním obdobím, které je 95 až 120 dnů. Jarní ječmen je poměrně nenáročnou plodinou na klimatické podmínky. Tedy je málo náročný na teplotu a vláhu. Sladovnický ječmen není vhodné pěstovat na určitých pozemcích, které vykazují odchylky. Jedná se o pozemky s vysokým stupněm utužení ornice a pozemky s nevyrovnaným vláhovým režimem půdy. Dále se sem řadí pozemky, které se nachází na území s výskytem časté mlhy a rosy. Nedoporučuje se pěstovat na pozemcích, kde se nachází vysoký stupeň zaplevelení. Plevellem pro jarní ječmen je pýr plazivý, oves hluchý, pcháč oset a chundelka metlice. Jarní ječmen je náročný na kvalitu půdy. Jedná se o jednu z nejnáročnějších obilovin na kvalitu půdy. Tato náročnost je způsobena díky kořenovému systému. Kořenový systém ječmene má jemnější a mělké kořeny, dále intenzivní potřebu živin a vody. Tato intenzivní potřeba je způsobena krátkým vegetačním obdobím (Kosař, 1997).

U ječmene rozlišujeme dvě hlavní období. Jedná se o vegetativní a generativní období při vývoji rostliny. Vegetativní období je zastoupeno klíčením, vzcházením a odnožováním. Generativní období je zastoupeno sloupkováním, metáním, tvorbou zrna a zráním zrna (Klem a kol., 2011).

Při pěstování je jarní ječmen výrazně ovlivněn kvalitou půdy. Významným faktorem je kyselost půdy. V České republice rozlišujeme dvě oblasti pěstování, a to oblast řepařskou a bramborářskou. Oblast řepařská má pH půdy v rozmezí 6,2 až 7,2. Oblast bramborářská má pH půdy v rozmezí 5,8 až 6,2. Pokud je pH půdy významně kyselé, má tato kyselost negativní vliv. Negativní vliv je projev růstu jarního ječmene, kyselost má vliv i na kvalitu sladovnickou. Kyselost půdy má vliv na snížení účinnosti živin, které jsou vstřebávány z půdy a může ovlivnit i potlačení tvorby kořenového systému (Kosař, 1997).

Jarní ječmen je náročnou plodinou na množství živin. Půda by měla mít určitou hodnotu zásob na makroprvky. Jedná se o fosfor, který má být v rozmezí 80-100 mg/kg půdy. Draslík má mít hodnotu 201-261 g/kg a hořčík 160-230 mg/kg půdy. Množství zásob draslíku v půdě má vliv na jarní ječmen. Tímto vlivem je míněné navyšování obsahu hrubých bílkovin v sušině samotného zrna. Proto se jedná o důležitou hodnotu, kterou je dobré znát z pohledu agrochemické hodnoty půdy. Hodnoty makroprvků v půdě jsou důležité pro výběr pozemku a způsob pěstování jarního ječmene (Klem a kol., 2011).

Zrání zrna. U ječmene se rozlišují tři hlavní zralosti. Mléčnou zralost charakterizuje tvorba obilky. První obilky dosahují konečné velikosti a obsah zrna je vodnatý. Mléčná zralost se rozděluje na tři části na raně, středně a pozdně mléčnou zralost. Středně mléčná zralost se vyznačuje mlékovitým obsahem zrna, všechny zrna mají konečnou velikost. Vosková zralost se charakterizuje obilkou, která je měkká a tvárná. Její součástí je žlutá zralost, která se vyznačuje obsahem obilky, která je pružná a pevná. Třetí zralostí je plná zralost. Obilka je tvrdá a obtížně dělitelná (Klem a kol., 2011).

5.2. Zařazení v osevním postupu

Jedná se o prvek, který má vliv na kvalitu sladovnického ječmene. Pokud pěstujeme ječmen v oblasti řepařské a bramborářské. Doporučuje se pěstovat ječmen po okopaninách. Okopanina by měla být hnojena chlévským hnojem. Nejlépe by měla být použita cukrovka, nebo odrůda pozdních brambor. Okopanina zanechává v půdě jak lepší strukturu, tak množství zastoupení makroprvků. Z tohoto hlediska je patrné, že ječmen není plodinou dobrou. Současným problémem pěstování ječmene v osevním postupu dochází k úbytku ploch pro okopaniny, a tím se snižuje plocha pro pěstování jarního ječmene. Tedy snižuje se jen plocha vhodná pro pěstování. Dochází i k přednosti jiných plodin v osevním postupu před ječmenem. Díky tomu dochází k vysévání ječmene po obilninách. Tento jev probíhá i přesto, že z polních pokusů vyplývá snížení kvality zrna a celkově jeho výnosu v tomto zařazení do osevního postupu (Kosař, 1997).

Výživa a hnojení ječmene. Nejdůležitější vlastností u ječmene jarního je vyrovnanost půdních poměrů. Týká se to obsahu a poměru živin, půdní struktury a poměru vlhkosti. Úroveň hnojení v osevním postupu posuzujeme podle půdní reakce. Důležitým ukazatelem k úrovni hnojení je i obsah makroprvků, které jsou zastoupeny obsahem fosforu, draslíku a hořčíku. Jakost sladovnického ječmene je ovlivněna pomocí výživy a hnojení dusíkem. Pro vhodné stanovení dávky dusíku je nutné znát aktuální obsah anorganického dusíku v půdě. Hnojení dusíkem má své specifické vlastnosti. Přihnojení tímto prvkem se provádí v období před setím až nejpozději do období třetí fáze listu. Pokud je dusík přidán po tomto období, dochází k negativnímu ovlivnění sladovnické kvality (Kosař, 1997).

Dodání organické hmoty do půdy. Vlivem omezení chovu hospodářských zvířat dochází k problematice transportu organické hmoty do půdy a snižuje se hnojená plocha. Vlivem této problematiky přichází nutnost využívat náhradní zdroje organické hmoty. Nejčastějším zdrojem organické hmoty je tedy zaorávka slámy pocházející z obilnin. Aby nedocházelo k negativnímu ovlivnění růstu pěstovaného jarního ječmene, musí dojít k dokonalému rozprostření řezanky slámy po ploše pozemku, kde se ječmen pěstuje. Z důvodu nutnosti urychlit rozklad řezanky slámy dochází k aplikaci dusíkatého

anorganického hnoje v dávce 10 kg na tunu slámy. Dusíkaté hnojivo se aplikuje na řezanku. Další možností zdroje organické hmoty je řepný chrást nebo zelené hnojení. Oba zdroje jsou zapraveny do půdy na podzim a průběh rozkladu organické hmoty je závislý na teplotách během zimy. Problém pro sladovnický ječmen nastává v období, kdy půda během zimy zamrzá a následné jaro je suché. Dochází k opětovnému uvolňování anorganického dusíku pomocí mineralizace, která probíhá v druhé polovině vegetace. Tento proces negativně ovlivňuje obsah dusíkatých látek v zrně (Kosař, 1997).

Vliv aplikace N a S. Síra patří k esenciálním živinám, které jsou důležité pro vývoj a růst rostliny. Síra se podílí na rostlinném metabolismu. Vliv aplikace N a S má schopnost ovlivňovat množství N-látek, obsah škrobu a kvalitu bílkovin. Pokud se během hnojení přidávají zvýšené koncentrace N a S, zvyšuje se během vegetace obsah škrobu a bílkovin v zrně. Vyšší dávky anorganického dusíku zvyšují obsah N v zrně o průměrných 0,12 %. Pokud se dusíkaté hnojivo kombinuje s hnojivem anorganické síry, dochází během vegetace k vyššímu navýšení obsahu N o 0,24 %. Vyšší obsah síry podporuje příjem a využití dusíku v zrně. Důkazem tohoto faktu je zjištění středně silné závislosti mezi obsahem N a S v zrně. I když se zvyšuje obsah N v zrně, nemá zvýšené hnojení S vliv na obsah sirných aminokyselin. Sirné aminokyseliny nebyly výrazně ovlivněny, to se neprojevuje na obsahu v zrně (Hřivna a kol., 2011).

5.3. Posklizňová úprava a skladování

Cílem je dosáhnout minima ztrát na hmotnosti a snížení škod na jakosti. Během skladování je kladen důraz na zvýšení hodnoty klíčivé energie a klíčivé rychlosti. Sklizený objem ječmene je různorodý. Obsahuje zrno různé velikosti a dále je obsažen různorodý podíl nečistot a příměsí. Zrno díky klimatickým podmínkám může mít různý obsah vlhkosti. Vyšší až vysokou vlhkost řešíme urychlenou posklizňovou úpravou, využíváme přesušení. Pokud se zrno zanechá příliš vlhké, může dojít k zapaření zrna. Tím dojde k následnému nevratnému poškození technologické jakosti. Sklizený ječmen je nutné zbavit nečistot, tedy kamínků a hlíny. Následně dochází k odstranění příměsí,

tedy slámy, půlek zrn a kulatých příměsí. Další úpravou je třídící síto, kde dochází k třídění zrna ječmene podle jeho velikosti.

Sušení zrna se provádí tak, aby nedošlo vlivem teplého vzduchu k náhřevu a následného přehřátí zrna. Při přehřátí dochází k tepelné denaturaci bílkovin a poškozuje se klíčivost zrna (Kosař, 1997).

Skladování zrna. Využívá se tři technologických postupů. Skladování zrna probíhá v suchém, zchlazeném stavu a pomocí aktivního větrání. Skladování zrna v suchém stavu je založené na tom, že zrna obsahuje do 14 % vody. Tento jev omezuje veškeré fyziologické a biochemické procesy. Skladování zrna ve zchlazeném stavu je pro sladovnícký ječmen nevhodný způsob. Dochází k možnosti negativně ovlivnit enzymatickou aktivitu, která je důležitá pro následnou technologickou výrobu sladu. Tímto skladováním se výrazně prodlužuje posklizňové dozrávání. Skladování pomocí aktivního větrání je způsob, při kterém se využívá vzduchu, který má svůj rosný bod nižší než je bod zrna (Kosař, 1997).

Kontrola zrna. Kontrola zrna probíhá z důvodu neustálých fyzikálních a fyziologických změn. Ukazatel kontroly, který hodnotí stav sladovníckého ječmene je teplota, vlhkost, lesk a barva zrna. Pro sladovnícký ječmen je důležitý ukazatel i klíčivost a klíčivá energie (Kosař, 1997).

5.4. Jakostní parametry ječmene a sladu

Do první poloviny dvacátého století byl slad po stránce mechanických znaků sledován jen pomocí stanovení obsahu vody v zrně, množství extraktu, doby zcukření a stékání, čirosti, dále byla sledovaná vůně a barva sladiny. Ostatní hodnoty sladu se zahrnovaly do skrytých vlastností sladu. Skryté vlastnosti sladu nebyly sledované. Postupně se začala provádět analýza, která zahrnuje zkoumání enzymatické aktivity, obsah a poměr důležitých látek obsažených v zrně (Kosař, 1997).

Znaky, které se sledují u ječmene lze rozdělit do čtyř kategorií. Na vnější, mechanicky zjistitelné, chemické a fyzikální znaky. Vnější znaky jsou zastoupeny prvky, které jsou přímo spojené se zrnem. Jedná se o vzhled a barvu, tvar, vůni, čistotu, botanickou podobnost, vzhled a jemnost pluch zrna. U mechanicky zjistitelných znaků hodnotíme váhu hektolitrovou a 1000 zrn, velikost a vyrovnanost obilek, ráz endospermu, lehká zrna a specifickou váhu ječmene. U chemických znaků se hodnotí obsah vody, škrobu, extraktu, bílkovin tuku. Hodnotí se i kvalita pluch, množství popela a kyseliny fosforečné, dalším znakem je kyselost a stupeň šíření. Fyzikální znaky jsou dvojího typu, jedná se o klíčivost a následně klíčivou energii (Ducháček, 1927).

Mechanické znaky. Do určité míry ovlivňují obsah bílkovin. Mechanické znaky charakterizují vyrovnanost a plnost zrn. Je kladen nárok na sladovnický ječmen, aby neobsahoval žádný odpad. Tedy zrna zaschlá a nevyvinutá. Tato zrna propadají sítem o průměru 2,2 mm, vhodné zrno by mělo mít znak o velikosti 2,5 mm. Menší zrna zhoršují kvalitu pro slad. Poruchy klíčení dochází u zrn menších a poškozených, které rychleji přijímají množství vody (Kosař, 1997).

Fyzikálně-chemické znaky. Do těchto znaků se řadí obsah vody, extraktivnost sladu, vůně a barva sladu. Do znaků se řadí i další speciální rozborů, jako je diastatická mohutnost, která popisuje aktivitu amylolytických enzymů. Hartongovo číslo popisuje enzymatickou aktivitu sladu. (Kunze, 2010).

Bílkoviny. Jedná se o významný znak jakosti. Hodnotíme obsah dusíkatých látek. Optimální hodnotou dusíkatých látek v zrně je 10,8 %. Aby došlo k výrobě kvalitního sladu u ječmene, neměl by být překročen obsah N-látek nad 11,5 %. Vyskytují se výjimečně požadavky, kde se předpokládá jejich obsah 11 až 11,2 %. Během procesu se počítá se ztrátou obsahu N-látek maximálně o hodnotu 0,5 %. Pokud se pomocí přírodních podmínek, v daném ročníku sklizně ječmene, zvýší obsah N-látek v zrně, klade se hlavně důraz na množství škrobu v zrně pro sladovnictví, tak se přijímá zrno s vyšším obsahem N-látek. Obsah N-látek v zrně pod 10 % je pro sladovnictví nevhodné. Vysoký obsah bílkovin zhoršuje většinu znaků kvality. Znakem kvality, který je ovlivněn bílkovinou, je například extraktivnost. Extraktivnost klesá o 0,8 až o 1 %. Každé zvýšení

bílkovin o 1 % zvyšuje rozdíl podílu extraktu mezi moučkou a šrotem o 0,3 až 0,5 % (Kosař, 1997).

Množství bílkovin ovlivňuje několik proměnných. Jedná se především o druh ječmene, podmínky hnojení, vlastnosti půdy a roční počasí. Množství bílkovin ovlivňuje zpracování ječmene. Náročnější zpracování vzniká pro ječmen s vyšším obsahem bílkovin. Ječmen s vyšším obsahem bílkovin se ovšem hodí pro zpracování na tmavé slady, pro výrobu tmavých piv. Pro hodnocení obsahu bílkovin se využívá analytické metody stanovení dusíku podle Kjeldahla (Ducháček, 1927).

V plně vyzrálém a normálním zrně je téměř všude obsažen dusík ve formě vysokomolekulárních bílkovin. Výjimku zastoupení tvoří lecitin. Během vývoje zrna je možné chromatografickou metodou zjistit až 20 aminových kyselin. Poměr mezi obsahem glycidních a dusíkatých látek je vázán. Platí, že čím více glycidních látek se vytváří v zrně, tím méně se tvoří dusíkatých látek. V ječném zrně jsou dusíkaté látky látkami zásobními. V normálním a plně vyvinutém zrně se dusíkaté látky nachází ve formě komplexních bílkovin. Tyto bílkoviny jsou doprovázeny nepatrným množstvím štěpných dusíkatých látek (Skládal, 1959).

Dusíkaté látky se dělí na dvě hlavní skupiny. Na přirozené bílkoviny a dusíkaté látky přechodné. Přirozené bílkoviny jsou velmi komplexní látky. Dusíkaté látky přechodné jsou svojí povahou přechodné látky mezi přirozenými bílkovinami a kyselinami aminovými. Dusíkaté látky přechodné se rozdělují na albumózy, peptony, polypeptidy, kyseliny aminové (Skládal, 1959).

V dozrání zrna po sklizni dochází ke změnám nevratným. V šestém týdnu po sklizni dochází k poklesu obsahu hrubého proteinu a zároveň se zvyšuje hodnota Kolbachova čísla. Počasí během vegetace a lokalita pěstování ovlivňuje přímou úměrou obsah hrubého proteinu. Vyšší obsah hrubých bílkovin se nachází u ječmene, který se pěstuje v lokalitách s chladnějším podnebím (Lišková et al., 2011).

Biosyntéza aminokyselin. V rostlině se vyskytuje přes 100 aminokyselin. Většina z nich se nachází ve volném stavu. Dochází k syntéze všech aminokyselin vyskytujících se v přírodě. Syntéza probíhá různými způsoby. Podstatou všech způsobů je zapojení amoniaku do molekuly organické kyseliny, zabudovává se ve formě aminoskupiny. Jedná se o přímou aminaci oxokyselin, transaminaci, dekarboxylaci dikarboxylových aminokyselin a cyklizaci. Reakce se realizují v přítomnosti příslušných enzymů. Pomocí reakcí se syntetizují základní aminokyseliny. Většina syntéz probíhá v kořenech rostliny. V nadzemních orgánech dochází k syntéze ostatních aminokyselin (Šebánek, 1983).

5.5. Enzymy

Enzymologie je věda zabývající se enzymy a má dlouhou historii. Většina znalostí o povaze a funkci enzymů pochází již z druhé poloviny dvacátého století. Důsledkem byl rozvoj moderní techniky separace a analýzy. To umožňovalo enzymy běžně izolovat a následně charakterizovat. Je registrováno přibližně 2500 enzymů (Havlová, 1999).

Enzymy tvoří nepočtenější skupinu a též nejvýznamnější skupinu biokatalyzátorů. Z chemického hlediska se jedná svým složením o bílkoviny. Ty jsou dvojího typu, a to jednoduché nebo složené. Složené bílkoviny též můžeme nazývat jako konjugované. Bílkoviny, které jsou jednoduché a tvoří enzymy, jsou složeny pouze z jediné složky – aminokyselin. K těmto enzymům patří enzymy ze skupiny štěpící bílkoviny. Říká se jim proteolytické. Do této skupiny řadíme pepsin a trypsin. Bílkoviny, které jsou složené, se nachází u většiny enzymů. Tyto enzymy obsahují další složku v nebílkovinné podobě tvořenou kofaktory, které mají katalytický účinek. Enzymy mohou nést i další látky, které nesouvisí s katalytickou funkcí enzymu. Jedná se o látky, jako jsou například sacharidy vyskytující se u glykoproteinových enzymů (Kotal, 1989).

Kofaktory jsou nebílkovinnou složkou enzymu. Jedná se především o kovové ionty, jako jsou Zn^{2+} a Mg^{2+} . Dále jím může být organická molekula typu NAD^+ . Může se stát, že kofaktorem enzymu jsou najednou obě složky jak tedy kovový iont, tak organická molekula. Enzym, který má svou katalytickou schopnost závislou na přítomnosti

kovového iontu, se nazývá metaloenzym. Kofaktor s organickou molekulou na enzymu lze pojmenovat, jako koenzym nebo prostetickou skupinu. Tyto dva názvy se od sebe odlišují způsobem vazby na bílkovinnou složku enzymů. Koenzym s molekulou daného enzymu je jen přechodně spojen. Působí jako jeden ze dvou substrátů. Prostetická skupina je stále spojena s molekulou daného enzymu pomocí kovalentní vazby (Havlová, 1999).

Z fyzikálního hlediska enzym působí obdobně jako katalyzátor a je používán v chemické výrobě. Urychluje průběh reakce, ale neovlivňuje její výtěžek. Enzym jako katalyzátor snižuje aktivační energii. Tímto snížením umožňuje přechod soustavy z jednoho stavu energie do druhého. Enzym od chemického katalyzátoru je účinnější, specifitější. Funguje i za nízké teploty, tlaku a střední hodnoty pH (Kotal, 1989).

„Enzymy můžeme definovat jako specifické bílkoviny vznikající v živých buňkách, které katalyzují průběh biologických reakcí snížením aktivační energie, a to jak uvnitř v organismech, tak i mimo ně.“ (Kotal, 1989).

Struktura enzymů. Struktura enzymů je geneticky determinována. Pořadí aminokyselin v peptidovém řetězci, tedy v jeho primární struktuře ovlivňuje i charakter vyšších struktur. Jedná se o strukturu sekundární, terciární a popřípadě kvartérní. U jednoduchých enzymů se ovlivňují pořadím aminokyselin i ostatní vlastnosti. Jedná se především o specifitu a stabilitu. Enzymy, které se skládají ze složených bílkovin, se označují jako holoenzymy. Holoenzym se skládá ze dvou částí. První částí je bílkovina neboli apoenzym. Druhá část je složena z nebílkovinných složek zvaných koenzymy. Koenzym je ve většině případů ve formě derivátu vitamínu. Tyto deriváty jsou obvykle na bílkovinnou složku pevně vázány. Příkladem jsou flavinové koenzymy. Vyskytují se však i deriváty, které jsou vůči bílkovinné složce disociovatelné. Jedná se například o pyridinové koenzymy. *„Mechanismus účinku enzymů záleží ve vzniku přechodného komplexu mezi enzymem a substrátem, to jest látkou, která má být přeměněna.“* (Kotal, 1989).

Funkce aminokyselinových zbytků. Funkce při vazbě substrátu v aktivním místě enzymu. Aminokyselinové zbytky, které se podílejí na vytvoření aktivního centra, se mohou jednotlivě odlišovat na úrovni primární struktury, avšak budou prostorově velmi blízké. Dle definice Koshlanda se rozlišují tři typy aminokyselinových zbytků. Prvním typem je kontaktní zbytek. Zprostředkovává vazbu substrátu a ovlivňuje jeho specifitu. Druhým typem je zbytek určující specifitnost. Ten se může podílet i na katalytickém ději. Třetím typem aminokyselinových zbytků je katalytický zbytek a přímo se podílí na změnách kovalentní vazby v průběhu enzymové reakce (Kotal, 1989).

Specifita enzymů. Specifita enzymů je jedna z velmi významných vlastností enzymů jako biokatalyzátorů. Rozlišují se různé druhy specifity. Substrátová specifita je určena vlastnostmi vazebného centra enzymu. Tyto vlastnosti určují schopnost rozeznat odpovídající substrát. Dále existuje absolutní specifita, kde enzym působí pouze na jediný substrát, u kterého katalyzuje reakci určitého typu. Při skupinové specifitě enzym katalyzuje určitý typ reakce u celé skupiny substrátů jistého typu. Relativní skupinová specifita znamená, že enzym přednostně katalyzuje reakci jedné skupiny substrátů. Enzym je schopen při snížené aktivitě katalyzovat přeměnu i jiných skupin substrátů. Strukturální specifita, při které enzym reaguje s jedním optickým antipodem. Poslední specifitou je účinková, která spočívá v tom, že enzym katalyzuje jen jednu z různých možností přeměny substrátů. Enzym je specifický k typu katalyzované reakce. Příkladem je hydrolýza, k přenosu vodíku nebo určité skupiny (Kotal, 1989).

Rozdělení enzymů. Enzymy jsou rozděleny do šesti tříd – oxidoreduktas (EC 1.), transferas (EC 2.), hydrolas (EC 3.), lyas (EC 4.), isomeras (EC 5.) a ligas (EC 6.). Třída je vytvořena podle typu katalyzované reakce. Samotný enzym je klasifikován a pojmenován dle povahy chemické reakce, kterou daný enzym katalyzuje. Oxidoreduktasy jsou první třídou enzymů. Tvoří třídu enzymů, které katalyzují intermolekulární oxidačně-redukční reakce a realizují děj pomocí přenosu atomů vodíku nebo elektronů. Další možností realizace děje je vestavěním atomu kyslíku do substrátu. Oxidoreduktasy mají své zástupce v řadě dehydrogenasy (EC 1.1.1.), oxidasy (EC 1.1.3.) a oxigenasy (EC 1.14.18.). Transferasy jsou druhou třídou enzymů. Často se označují jako kinasy. Jsou to enzymy, které přenášejí skupinu atomů mezi jednotlivými molekulami. Jedná se o

skupiny atomů, jako je methylová nebo glykosylová skupina. Transferasy se účastní mnoha biosyntetických dějů. Hydrolasy jsou třetí třídou enzymů. Jedná se o enzymy, které katalyzují reakce, kde dochází ke štěpení hydrolyzovatelných vazeb. Nutností reakce je účast vody. Čtvrtou třídou jsou enzymy lyasy. Katalyzují štěpení nebo vznik vazeb skupiny C-C, C=O, C-N. Reakce se neúčastní voda. Lyasy zajišťují eliminaci skupin, při kterých vzniká dvojná vazba. Pátou skupinou jsou isomerasy. Tyto enzymy způsobují stechiometrické změny uvnitř molekul. Probíhají intramolekulární oxidačně redukční reakce a dále i přenos skupin. Jedná se o třídu skupin, která má nejmenší počet zástupců. Ligasy jsou šestou a poslední třídou enzymů. Triviálně jsou nazývané jako synthetasy. Jsou to enzymy katalyzující syntézu energeticky náročných vazeb. Do těchto vazeb se řadí C-C, C=O, C-N. Při reakci dochází k současnému rozkladu látky, která uvolňuje energii. Tvorba energeticky náročných vazeb je spojena s hydrolyzou ATP (Havlová, 1999).

5.6. Enzymy v ječmeni a ve sladu

Technologický proces výroby sladu je závislý na činnosti celého spektra enzymů. Tyto enzymy působí při klíčení ječmene, přípravě sladiny až do finální výroby piva při kvašení mladiny. Enzymových reakcí se tedy užívá při celém výrobním cyklu. Enzymy zajišťují hlavní metabolismus zrna, metabolismus v průběhu vegetace a dále zajišťují život zrna při posklizňovém uskladnění. Spolupůsobí při rozluštění zrna během jeho klíčení a tvorbě charakteristických vlastností sladu.

Ječmen obsahuje velké množství enzymů ve dvou formách, aktivní nebo latentní. Ječmen obsahuje i velké množství prekurzorů enzymů, enzymové stimulanty a jejich inhibitory (Havlová, 1999).

Úloha enzymů v ječmeni a ve sladu. Obilka je svou podstatou komplex složený ze sacharidů a proteinů. Má vysokou hodnotu sušiny, která dosahuje 80 až 88 % a je tvořena organickými i anorganickými látkami. Obilka ječmene obsahuje v rozmezí 12 až 20 %

vody. Sladovnický ječmen obsahuje ve své posklizňové zralosti množství enzymů, jak v aktivní, tak i v latentní formě. Dále obsahuje velké množství prekurzorů enzymů.

Enzymy se v jednotlivých částech zrna vyskytují v různých mírách. Zárodek a štítek zrna obsahuje veškeré enzymy zrna. Jedná se zejména o enzymy tříd transferas, oxidoreduktas a hydrolas. Z třídy hydrolas se jedná zejména o enzymy amylasy (EC 3.2.1.), peptidasy (EC 3.4.1.), lipasy (EC 3.1.1.) a fosfatasy (EC 3.1.3.). Aleuronová vrstva zrna obsahuje exopeptidasy (EC 3.4.11.) a endopeptidasy (EC 3.4.11.). Dále tu jsou obsažené enzymy transaminasy (EC 2.6.1.), oxidoreduktasy, lipasy (EC 3.1.1.3.) a α -amylasy (EC 3.2.1.1.). V subaleuronové vrstvě se v zrně nachází především beta-amylasa (EC 3.2.1.2.). Ve vlastním endospermu zrna se nachází beta-amylasa, endopeptidasa a malým množstvím je zde zastoupena fytasa (EC 3.1.3.26.); (Havlová, 1999).

Aktivitu enzymů ve sladu lze ovlivnit čtyřmi způsoby. Prvním způsobem ovlivnění je změna podmínek v jednotlivých fázích technologického procesu výroby sladu. Druhou možností je vlastní výběr vhodné odrůdy. Třetí možností je využití alternativ pro snížení nebo zvýšení aktivity enzymů dle parametrů. Jedná se o využití odleženého sladu a přírodních antioxidantních činidel sladu. Čtvrtým způsobem ovlivnění je vzájemná kombinace všech výše zmíněných (Kunze, 1989).

Mechanismus proteosyntézy. Jednotlivé aminokyseliny, které mohou tvořit bílkovinu, se musí nejdříve aktivovat. Aktivace volných aminokyselin je za pomoci ATP. Poté jsou schopné vlastní proteosyntézy. Aktivace aminokyselin je za přítomnosti enzymu aminoacyl-syntetázy. Enzym zůstává napojen na vytvořený komplex až do přenesení komplexu na t-RNA. Obou kroků se účastní jeden enzym a je specifický pro každou aminokyselinu. Komplex aminoacyl-t-RNA putuje do ribozómu, kde probíhá vytváření řetězce polypeptidu. Syntéza peptidických vazeb je zajištěna peptidyltransferázou (EC 2.3.2.12.). Tento enzym vytváří peptidické vazby mezi karboxylovou skupinou a aminoskupinou (Šebánek, 1983).

Působení enzymů daných tříd. Působení daných enzymů se projevuje v jednotlivých fázích vývoje ječného zrna. Enzymy působí i dále v celém sladařsko-pivovarském procesu různou mírou důležitosti. Významnou roli při dozrávání, skladování a klíčení ječmene hrají oxidoreduktasy. Tyto enzymy se účastní role při metabolismu sacharidů, dusíkatých a lipidických látek. Mají svou roli i při redoxním procesu v dýchacím řetězci. Oxidoreduktasy se podílejí na změnách polyfenolů, tedy ovlivňují barvu sladu. Transferasy jsou enzymy, které jsou důležité při dozrávání ječmene. Nedílnou součástí jsou i při období posklizňového klidu a při klíčení ječmene. Působí při metabolismu dusíkatých látek ječného zrna. Enzymy třídy hydrolas mají význam v technologii sladování. Význam je jak při klíčení zrna, tak v dalších procesech. Lyasy ječmene a sladu se podílejí na metabolismu uhlíku. Metabolismus uhlíku se nachází při biosyntéze škrobu a cyklech, jako je hexosový, pentosový a Krebsův cyklus. Lyasy se podílejí na metabolismu dusíku při biosyntéze aminokyselin a bílkovin. Isomerasy (EC 5.2.1.) nacházející se v zrně mají obdobné uplatnění jako předešlé lyasy. Ligasy, které se nacházejí jak v zrně ječmene, tak sladu jsou důležitými při biosyntéze bílkovin a aminokyselin. Jejich význam je především v procesu růstu při klíčení zrna a jeho tvorbě kořínků a stélky (Havlová, 1999).

Enzymy, které jsou nejdůležitější pro sladařské odvětví, jsou hydrolasy. Můžeme je ještě rozdělit na čtyři skupiny. Tedy na skupiny, kam patří cytolytické a proteolytické enzymy, fosfatasy, amylasy. Dalšími významnými třídami jsou oxidoreduktasy, transferasy, lyasy, isomerasy a ligasy (Havlová, 1999).

Proteolytické enzymy. Jedná se o enzymy třídy hydrolas a proteas. Tyto enzymy katalyzují štěpení bílkovin. Jsou nejdůležitější a také nejdéle známé hydrolytické enzymy. V systematickém názvosloví se řadí do skupiny C-N hydrolas. Katalyzují štěpení peptidické vazby a štěpí vazbu C-N. Řada enzymů má i další aktivity, jako esterovou, koagulační a transpeptidasovou. Proteolytické enzymy se od sebe vzájemně liší původem, lokalizací a svými fyziologickými funkcemi. Enzymy se dělí na dvě skupiny podle místa štěpení v molekule proteinu. Dělí se tedy na endopeptidasy a exopeptidasy (Havlová, 1999).

Během klíčení, které probíhá při skladování, dochází k odbourávání 35 až 40 % bílkovin. Vznikají nízkomolekulární bílkoviny a aminokyseliny. Větší část vysokomolekulárních bílkovin vypadne během technologického procesu a nízkomolekulární bílkoviny jsou nutné pro dosažení optimálního růstu kvasinek. Během technologického procesu, jmenovitě rmutování, je nutné zajistit dostatečné množství aminokyselin. Při nedostatku dochází k problémům během kvašení. Opatřením může být dodávané množství mikrobiálně získaných proteas (Kunze, 1989).

Exopeptidasy. Jedná se o enzymy, které štěpí peptidický řetězec od konce. Enzymy odštěpují vždy koncovou aminokyselinu. Exopeptidasy působí na menší celky, oligopeptidy a polypeptidy. Tyto enzymy lze ještě dělit na dvě kategorie: na karboxypeptidasy (EC 3.4.15.) a aminopeptidasy (EC 3.4.11.). Karboxypeptidasy působí od C-konce. Reakce probíhá na karboxylovém konci peptidového řetězce. Aminopeptidasy působí od N-konce peptidů. Žádná z exopeptidas neštěpí dipeptidy. Toto štěpení katalyzuje dipeptidasa (EC 3.4.13.21.). Dipeptidasy jsou specifické pro jednotlivé aminokyselinové zbytky. Exopeptidasy se v ječném zrně vyskytují v místech růstu nových částí zrna. Tedy enzymy se nachází v klíčku, následně v koříncích a střeľce. Do těchto tří částí difundují dusíkaté látky z endospermu (Havlova, 1999).

Endopeptidasy. Tyto enzymy štěpí bílkoviny na určitých místech ve středu řetězce. Enzymy působí převážně na bílkoviny a vyšší polypeptidy. Na rozdíl od většiny ostatních enzymů není přísná specifita vůči určitému substrátu. Substrátem je míněna určitá bílkovina. Tyto enzymy mají ovšem specifitu vůči určitým strukturním znakům peptidového řetězce. V peptidovém řetězci díky tomu dochází ke štěpení jen na daných úsecích. Reakce probíhá před, nebo za určitým aminokyselinovým zbytkem (Havlová, 1999).

Ječný slad obsahuje větší množství endopeptidas. Většina těchto enzymů nosí v aktivním centru zbytek cysteinu. Řadí se k sulfhydrylovým proteasám. Technologicky se endopeptidasy podílejí na rozluštění sladu. Optimální podmínkou pro činnost endopeptidas je pH 5 až 5,2, teplota rmutování 50-60 °C. Inaktivace enzymů probíhá při teplotě odpovídající 70 až 80 °C. Při klíčení ječmene se aktivita proteolytických enzymů mnohonásobně zvyšuje. Jejich účinek je podpořen vyšší vláhou klíčícího zrna, dále nižší teplotou klíčení, která by optimálně měla být při 12 °C. Podpůrnou součástí je i doba klíčení, čím delší, tím je hlubší rozluštění bílkovin. Se stoupajícím obsahem bílkovin ve sladu stoupá koncentrace dusíkatých látek, které jsou rozpustné (Havlová, 1999).

Rozluštění bílkovin. Má vliv na jakost piva. Nejsilněji se projevuje na pěnivosti piva. Obsah bílkovin v ječném zrně nad obsah 11 % zvyšuje pěnivost. Ovšem i nižší obsah, kolem 9,5 % a méně má vliv opačný, pěnivost snižuje. Důležitou hodnotou je podíl vysokomolekulárních štěpných produktů bílkovin a glykoproteinů s vysokou viskozitou. Tento podíl podporuje pěnivost. Stupeň rozluštění bílkovin má i dopad na chlebnatost nebo plnost chuti piva. Pokud je dosaženo dalekosáhlého rozluštění bílkovin, vzniká prázdná chuť piva. Nedostatečné proteolytické rozluštění ovlivňuje filtrovatelnost piva. Rozluštění má vliv i na barvu sladu (Havlová, 1999).

Rozluštění je látková přeměna, kde dochází k rozštěpení vysokomolekulárních látek na jejich štěpné produkty. Nejdříve dochází k rozrušení buněčných stěn a následně bílkovinných řetězců. Rozluštění probíhá i u škrobových zrn (Kunze, 2010).

Proteolysa. Předpokladem je optimální složení dusíkatých látek v mladině. V praxi se využívá odhad z analýzy kongresní mladiny. Tato analýza zahrnuje stanovení volného aminodusíku podle hodnoty rozdílu extraktu v moučce sladu a z určení aktivity proteolytických enzymů. Nejrozšířenější postup stanovení aktivity proteolytických enzymů je metoda založena na přírůstku absorbance reakčního roztoku v ultrafialové oblasti světla. Metoda probíhá při vlnové délce 280 nm. Vznikají peptidy, které jsou rozpustné i v přítomnosti kyseliny trichloroctové. Metoda zaznamenala řadu modifikací pro viditelnou oblast spektra. Tuto možnost umožnil přídavek fenolového činidla. V běžné praxi se ovšem nepoužívá ke každodenní analýze. Jedná se o metody, které jsou stále komplikované z hlediska technického provedení, především o různorodost použitých substrátů. Na využití proteolytických enzymů a jejich inhibitorů lze využít elektroforetické metody. Tyto metody jsou rychlé a méně komplikované z hlediska technického provedení (Havlová, 1999).

6. Slad

Slad se vyrábí pomocí umělého klíčení ječmene. Lze využít i jiných obilovin než ječmene. Přerušením stádia klíčení v technologickém stádiu se získá slad syrový. Postupem hvozdnění vzniká slad. Klíčením zrna se vytváří enzymy, které jsou schopny štěpit škrob, bílkoviny, celulosu a další důležité látky v zrně. U sladu rozlišujeme tři typy znaků: vnější, mechanické a chemické. Znaky vnější zahrnují čistotu, vůni, barvu a chuť. Mechanické znaky jsou váha hektolitrová a 1000 zrn, jakost řezu zrna, vývin strelky a zkouška na plovoucí zrna. Chemické znaky jsou vlhkost, extrakt, maltosový kvocient, obsah sacharosy, výsledek konečného prokvašení, míra povrchového napětí, obsah dusíku, kyselost a diastatická mohutnost (Ducháček, 1927; Kunze, 2010).

Obsah dusíku lze rozdělit na tři skupiny. Na celkový dusík ve sladu, rozpustný a srazitelný dusík a následně na srazitelný rozpustný dusík. Veškerá stanovení se dají vyjádřit v procentech celkového dusíku. Podíl celkového dusíku je u světlých sladů v obsahu 29 až 33 % a u tmavých sladů v obsahu 24 až 30 % (Ducháček, 1927).

Dělení dusíkatých látek. Veškeré rozpustné dusíkaté látky, rozpustné dusíkaté látky srazitelné varem a trvale rozpustné dusíkaté látky. Stanoví se ve studeném vodním výluhu. Využívají se analytické metody podle Dinklapeho. Existuje metoda, která rozděluje bílkoviny na frakce. Jedná se o metodu podle Lundina. Metoda rozděluje rozpustné bílkoviny na tři frakce. Frakce A zahrnuje bílkoviny, které jsou srazitelné taninem. Jedná se o vysokomolekulární bílkoviny srazitelné varem. Příkladem takových bílkovin je leukosin, edestin a albumózy. Frakce B je dána rozdílem vysokomolekulárních a středně molekulárních bílkovin. Tyto bílkoviny jsou srazitelné taninem a kyselinou fosfomolybdenovou. Frakce C zahrnuje nejnižší polypeptidy, amidy a aminokyseliny. Jedná se o podíl dusíkatých látek, které se nedají vysrážet činidlem taninem nebo kyselinou fosfomolybdenovou. Další metodou, která rozděluje dusíkaté látky na frakce je metoda podle Bishopa. Jedná se o dělení na pět frakcí. Albuminy srazitelné při teplotě 82 °C. Dusík bílkovinný srazitelný síranem měďnatým a dusík nebílkovinný nesrazitelný síranem měďnatým. Globuliny stanovené z rozdílu mezi

obsahem celkového rozpustného dusíku a albuminu. Hordein představující podíl rozpustný v 70 % alkoholu. Glutelin nerozpustný v žádném rozpouštědle (Vančura, 1966).

Stanovení obsahu dusíku rozpuštěného ve sladině je metodou, která určuje celkové množství rozpuštěných dusíkatých látek. Provádí se pomocí laboratorní analýzy s využitím laboratorní sladiny. Součástí metody je stanovení Kolbachova čísla. Kolbachovo číslo vyjadřuje množství rozpuštěného dusíku ve sladině v procentech celkového množství dusíku ve sladu a uvádí se jako číslo bez jednotky (Vančura, 1966).

6.1. Druhy sladů

Jednotlivé vlastnosti sladů jsou typické pro různé druhy sladů a získávají se úpravou technologie. Jedná se především o máčení a klíčení ječmene. Díky těmto operacím se reguluje biosyntéza a aktivita sladových enzymů. To působí na určitou složku extraktu, redoxní potenciál a aciditu sladu. Barevné a aromatické sloučeniny se regulují pomocí postupu hvozdění. Kvalitu sladu výrazně ovlivňuje odrůda ječmene a jeho kvalita (Basařová, 2010).

Karamelové slady. Jsou děleny na čtyři skupiny, a to světlý karamel, karamel střední, karamel normální a karamel porterový. Světlý karamel se připravuje mírným pražením při 120 °C. Barva pluch i endospermu je světlá. Barva sladiny vykazuje hodnotu 3,5 až 6,0 jednotek EBC (Evropská jednotka barvy piva). Karamel střední se praží při teplotě 130 až 150 °C. Barva sladu je v jednotkách 20 až 40 EBC. Endosperm je v řezu sklovitý a jeho barva je žlutá až hnědá. Pluchy jsou tmavé. Karamel normální je nejčastější slad ve skupině karamelových sladů. Praží se při teplotě 150 až 170 °C. Endosperm je sklovitého typu od žluté až načervenalé barvy. Pluchy jsou zahnědlé až hnědé barvy. Barva se pohybuje v rozmezí 50 až 70 jednotek EBC. Karamel porterový se praží při teplotě 180 °C. Endosperm je sklovitý, červené až černé barvy, Barva se pohybuje v rozmezí 100 až 120 jednotek EBC (Basařová, 2010).

Další slady. Slady jsou různého typu, pro různé použití a své vlastnosti. Jedná se o slady barvicí, které slouží pro dosažení tmavé barvy u silně tmavých piv. Dalším typem jsou nakuřované, melanoidinové, diastatické a proteolytické slady, slady zvyšující redoxní kapacitu piva, krátké slady, tritikalové a čirokové slady (Basařová, 2010).

6.2. Dusíkaté látky ve sladu

Jedná se o rozmanitý komplex sloučenin. Zahrnuje nerozpustné vysokomolekulární složky, polypeptidy rozdílné struktury a jednoduché aminokyseliny. Látky podle svých fyzikálně-chemických vlastností mají ve výrobě piva pozitivní i negativní význam. Ve 100 g sladu se nachází 3,5 g rozpustných bílkovin. 60 % rozpustných bílkovin se nachází ve sladu a odpovídá 2,1 g. 40 % rozpustných bílkovin, které se uvolní do roztoku během procesu výroby piva, odpovídá 1,4 g (Basařová, 2010).

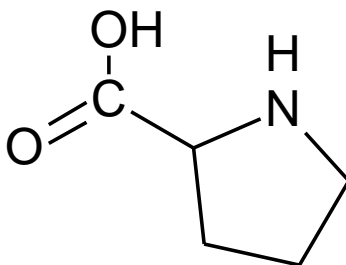
Nízkomolekulární dusíkaté látky jsou aminokyseliny a amidy. Bílkoviny sladu jsou tvořeny 21 běžnými aminokyselinami. Jedná se o alanin, leucin, izoleucin, lysin, arginin, metionin, asparagová kyselina, fenylalanin, asparagin, cystein, cystin, glutamová kyselina, glycin, prolin, serin, threonin, histidin, tryptofan, hydroxyprolin a valin. Nejvíce zastoupenou aminokyselinou ve sladu je prolin. Množství aminokyselin je závislé na odrůdě ječmene a jeho vlastnostech a na technologickém postupu sladování. Existuje degradace vysokomolekulárních bílkovin na nízkomolekulární složky. Během technologie sladování se vytváří rozdíly v citlivosti na degradaci díky odlišnostem jednotlivých odrůd ječmene (Basařová, 2015).

7. Aminokyseliny v ječmeni, sladu a jejich význam

Při pivovarské technologii je kladen důraz, aby kvasinky měly optimální a dostatečný růst kvasinek. To platí pro všechny fáze kvašení, tak aby byla zefektivněna výroba a maximální kvalita piva. Toho se docílí, pokud kvasinky mají po celou dobu adekvátní dostatek potřebných živin a aminokyselin (Gómez and Edney, 2011).

Pro dokonalé prokvašení je optimální celkové množství 1000 mg aminokyselin na 1 litr roztoku. Jednotlivé aminokyseliny jsou absorbovány kvasinkami ve sladu. Nejrychleji jsou vstřebávány aminokyseliny methioninového typu. Pomaleji je absorbována aminokyselina glutamin. Aminokyselina prolin je dostatečným zdrojem N i během období, kdy už došlo k vyčerpání zbylých aminokyselin v roztoku (Gómez and Edney, 2011).

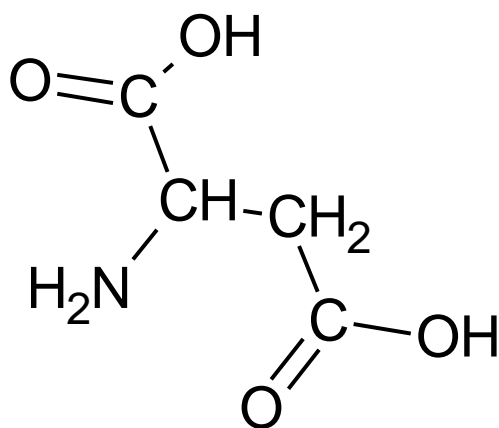
Obrázek č. 2 – Prolin.



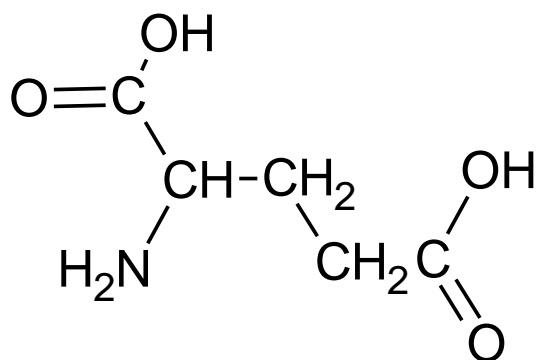
Některé aminokyseliny obsahují thiolovou skupinu –SH. Je známo, že obsah thiolové skupiny v pivu souvisí s obsahem sulfidů a oxidační stabilitou piva. Thiolová skupina je v přímém vztahu s oxidační stabilitou piva. Thioly zjistitelné analýzou nelze jednoznačně přiřadit k obsahu bílkovin, protože jsou obsažené i v menších molekulách (Lund and Andersen, 2011).

Mladý ječmen. Mladý ječmen obsahuje všech 20 esenciálních aminokyselin. Aminokyseliny jsou zabudovány do struktur bílkovin. Tyto struktury bílkovin mají nízkou molekulovou hmotnost. Díky jejich nízké molekulové hmotnosti jsou pro organismus snadno využitelné a nezatěžují ho. Aminokyseliny jsou zastoupeny ve svém příznivém poměru. Stanovení aminokyselin v mladém ječmeni probíhá pomocí stanovení aminokyselin v sušině z horní části rostliny. Horní částí rostliny je stéblo. Aminokyseliny, které vykazují množství nad 1 mg v 1 g sušiny jsou zmíněné v tabulce. Ostatní zástupci aminokyselin jsou v nepatrném množství a zanedbatelné. Tyto aminokyseliny přechází ze stébela do vytvářených obilek pomocí transportu asimilátu. Mladý ječmen je stádium ječmene před mléčnou zralostí (Dallen, 2010).

Obrázek č. 3 – Asparagová kyselina.



Obrázek č. 4 – Glutamová kyselina.



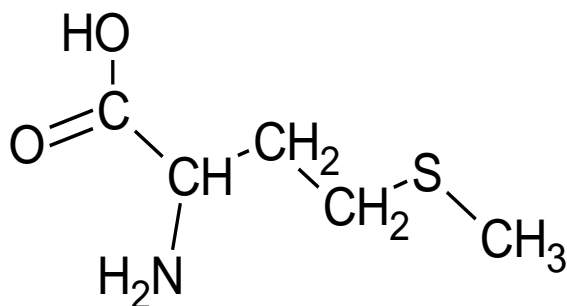
Tabulka č. 1 – Obsah aminokyselin ve stéble mladého ječmene (Dallen, 2010).

Aminokyseliny	množství mg v 1 g sušiny mladého ječmene
Cystein	2
Fenylalanin	11
Glycin	12
Histidin	4,5
Isoleucin	9
Asparagová kyselina	22
Glutamová kyselina	24
Leucin	29
Lysin	8
Methionin	4
Prolin	9
Serin	24
Tryptofan	1
Tyrosin	5
Valin	13

7.1. Methionin ve sladu

Jedná se o sirnou aminokyselinu, která je přirozenou součástí ječmene, sladu a piva. Jsou to prekurzory těkavých sirných látek. Těkavé látky mají vliv na sensorickou jakost piva a ovlivňují negativně i chuť piva. Tato vlastnost je ovlivněna již při nízké koncentraci. Hlavním meziproduktem vzniku těkavých látek je S-methylmethionin, který vzniká v cyklu sirných aminokyselin z methioninu. S-methylmethionin je během hvozdní degradován. Sloučenina je degradována při teplotě nad 60 °C. Degradace závisí na vlhkosti a teplotě zrna (Mikulíková a kol., 2009).

Obrázek č. 5 – Methionin.



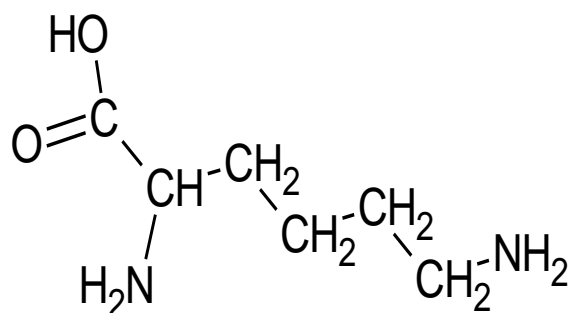
Stanovení methioninu. Stanovení sirných aminokyselin je náročná analytická operace. Je nutné zvolit metodu s dostatečnou správností a přesností, která musí splňovat podmínky na dostatečnou rychlost a experimentální akceptovatelnost. Z dnešních metod těmto podmínkám odpovídá plynová chromatografie. Sirné aminokyseliny je nutné derivatizovat. Dochází k transformaci sirných aminokyselin na vhodné produkty, které mají žádané vlastnosti. Během plynové chromatografie je nutné zajistit zablokování funkčních skupin –OH, -SH, -NH₂ a zvýšit těkavost aminokyselin. K derivatizaci lze využít celkem tři metod. Vlastní stanovení methioninu se provádí na plynovém chromatografu s plamenofotometrickým detektorem, který je selektivní pro síru. Extrakčním činidlem pro extrakci methioninu ve volném stavu je optimální použití směsi methanol a voda v poměru 1:4. Chromatografické stanovení vykazuje obsah methioninu v množství 23,0 až 36,0 mg v 1 g sladu (Mikulíková a kol., 2009).

7.2. Význam aminokyselin

Kvasinky mají schopnost utilizace aminokyselin a dalších organických dusíkatých látek. Spotřeba aminokyselin přibližně 70 % kvasinky kryjí asimilací a zbytek je kryt deaminací. Deaminace probíhá podle Ehrlichovy reakce za vzniku vyšších alkoholů. Během kvašení se jednotlivé aminokyseliny asimilují v daném pořadí. Regulace vstupu aminokyselin probíhá pomocí permeázového systému. Nejrychleji čerpanou aminokyselinou pro funkčnost kvasinky je asparagin, glutamin, serin a threonin. Aminokyseliny zastupují fyziologickou úlohu. Asparagin se snadno převádí na asparagovou kyselinu. Tato kyselina je potřebná pro pyrimidinový a purinový komplex. Ze serinu vzniká glutamin a glycin (Bendová a Kurzová, 1970).

Existují rozdíly mezi kvasinkami ve schopnosti asimilovat jednotlivé aminokyseliny. Kvasinka během procesu musí projít třemi stádii – deaminací aminokyseliny pro uvolnění amoniaku, syntézou všech aminokyselin požadovaných pro proteosyntézu a integrací aminokyselin do struktury bílkovin. Kvasinky neasimilují lysin (Bendová a Kurzová, 1970).

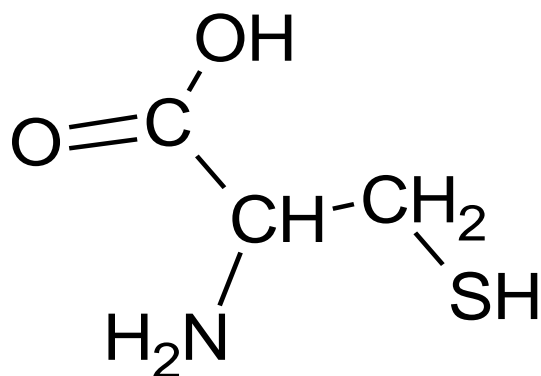
Obrázek č. 6 – Lysin.



Tabulka č. 2 – Aminokyseliny rozdělené podle rychlosti asimilace spodními kvasinkami (Jones and Pierce, 1964; Čížková et al., 2005).

Aminokyseliny	Rychlost asimilace
glutamová kyselina, asparagová kyselina, lysin, serin, treonin, arginin	rychle asimilovatelné
histidin, izoleucin, leucin, methionin, valin	pomaleji asimilovatelné
alanin, NH ₃ , glycin, fenylalanin, tryptophan, tyrosin, prolin	pomalou asimilovatelné

Obrázek č. 7 – Cystein.



Tabulka č. 3 – Aminokyseliny rozdělené podle rychlosti asimilace svrchními kvasinkami (Jones and Pierce, 1964; Čížková et al., 2005).

Aminokyseliny	Rychlost asimilace
Glutamová kyselina, asparagová kyselina, glutamin, asparagin, serin, treonin, lysin, arginin	kvasinky je asimilují v prvních hodinách fermentace
valin, methionin, leucin, izoleucin, histidin	kvasinky je asimilují pomaleji
glycin, fenyloalanin, tyrosin, tryptophan, alanin	kvasinky je asimilují prakticky všechny, ale až jsou vyčerpány aminokyseliny, výše vyjmenované
Prolin	za normálních podmínek kvašení není pivovarskými kvasinkami asimilován

Aminokyseliny lze rozdělit podle jejich množství v mladině do tří skupin, na relativně vysoké, relativně nízké a extrémně nízké. Do skupiny relativně vysoké se řadí aminokyseliny, jako serin, asparagin, glutamin, lysin, threonin, leucin, arginin, izoleucin, amoniak, asparagová kyselina, alanin, valin, fenyloalanin, tyrosin a prolin. Do skupiny relativně nízké se řadí aminokyseliny, jako methionin, tryptophan, histidin, glutamová kyselina a glycin. Do skupiny s extrémně nízkým obsahem aminokyselin se řadí cystein a cystin (Yoshida, 1934; Basařová a Janoušek, 2000).

Obsah aminokyselin při výrobě piva. Aminokyseliny a další dusíkaté látky mají vliv na charakteristiku chuti, tvorbu pěny a výživu kvasnic. Také jsou příčinou tvorby zákalů piva a ovlivňují jeho trvanlivost. Během sladování stoupá množství aminokyselin. Horního maxima je dosaženo mezi druhým a čtvrtým dnem sladování. Následně dochází ke snižování množství aminokyselin v důsledku klíčení ječmene. Během rmutování se množství aminokyselin nemění a hodnoty zůstávají konstantní. Specifickou aminokyselinou je prolin, který není za normálních podmínek asimilován pivovarskými kvasinkami. Existuje vztah mezi množstvím aminokyselin v mladině a jejich zkvasitelností. Obsah volných aminokyselin v mladině má mít průměrnou hodnotu nad 14 mg ve 100 ml mladiny. Systém asimilace není ekonomicky hospodárný (Bendová a Kurzová, 1972).

Množství aminokyselin v mladině odpovídá původnímu obsahu v ječmeni a je závislé i na podmínkách sladování a méně závislé na způsobu rmutování. Množství aminokyselin je nezávislé na enzymatických reakcích během rmutování. Není jednoznačně prokazatelný pozitivní účinek mezi peptonizační teplotou v rozmezí 40 až 50 °C a zvýšením jednotlivých aminokyselin v mladině. Při teplotách do 50 °C probíhá štěpení enzymem peptidáza, kterým vzniká určité množství aminokyselin. Při vyšší teplotě nad 50 °C je prakticky vyloučená aktivita peptidázy (Basařová, 1972).

Aminokyseliny mají nezastupitelný význam při kvašení a samotném pomnožení kvasnic. Hrají roli při metabolismu dusíkatých látek, sacharidů, lipidů a sirných sloučenin. Využití aminokyselin je závislé na aktivitě enzymů. Během těchto reakcí dochází k tvorbě ethanolu, esterů, vyšších alkoholů a mastných kyselin. Při nedostatku aminokyselin dochází k pomalému a nízkému prokvašení a senzorycké vlastnosti piva mohou být narušeny (Basařová a Janoušek, 2000).

Aminokyseliny leucin, valin, izoleucin a alanin mají vliv na složení karbonylových sloučenin v pivě. Při nedostatku těchto aminokyselin se vytváří vedlejší produkty propylalkohol, butylalkohol, izobutylalkohol, izoamylalkohol, acetoin a diacetyl. Zvýšené množství valinu potlačuje tvorbu diacetylu. Zvýšené množství izoleucinu stimuluje tvorbu diacetylu. Diacetyl má negativní vliv na sensorické vlastnosti piva (Basařová, 1972).

Tabulka č. 4 - Změny množství aminokyselin při rmutování (Basařová a Černá, 1972; Kunze, 2010).

Aminokyselina mg/100 ml	Vystírka 62 °C	1. rmut	2. rmut	Předek	Horká mladina	Studená mladina
Lysin	8,98	6,67	16,63	9,58	9,51	10,75
Histidin	5,98	6,11	12,60	5,88	8,33	5,78
Arginin	16,36	22,42	31,66	14,81	14,85	14,74
Cysteová kyselina	-	-	-	-	-	-
Asparagová kyselina	5,16	5,94	6,99	7,48	4,78	5,32
Threonin	-	-	-	-	-	-
Serin	20,87	19,31	19,15	22,04	11,87	11,40
Glutamová kyselina	7,90	8,33	5,93	10,68	6,94	7,34
Prolin	55,87	49,39	51,90	55,11	35,70	28,81
Glycin	1,96	2,57	3,68	3,23	2,23	5,34
Alanin	6,92	7,66	5,94	9,11	6,73	7,78
Cystin	-	-	-	-	-	-
Valin	9,70	10,65	11,88	13,91	8,72	10,23
Methionin	2,38	4,85	5,60	4,18	3,70	3,91
Leucin	5,54	7,43	8,38	7,58	5,70	5,90
Tyrosin	8,53	10,37	12,57	13,20	9,10	9,99
Isoleucin	5,79	7,45	8,15	16,15	5,85	7,46
Fenylalanin	10,57	9,77	15,88	20,19	7,87	12,78

Stará chuť piva. Na tvorbě sensoricky nežádoucích aldehydů, které vytváří pojem stará chuť se podílí aminokyseliny v reakcích, kde vznikají aldehydy. Jedná se o čtyři chemické reakce. Maillardovy reakce pentos a hexos s aminokyselinami a dalšími dusíkatými látkami za vzniku melanoidinů. Steckerovo odbourávání aminokyselin za vzniku aldehydů, které mají o jeden uhlík kratší řetězec než původní aminokyselina.

Aldolová kondenzace a oxidační degradace aldehydů, kde aminokyseliny působí jako bazické katalyzátory. Oxidace polyfenolů a kondenzace s aminokyselinami (Basařová a Janoušek, 2000).

Základními reakcemi, které vytváří jednotlivé složky staré chuti z aminokyselin, je reakce alaninu za vzniku acetaldehydu. Dále se jedná o reakce leucinu na 3-methylbutanal, valinu na 2-methylpropanal, methioninu na methanal a fenylalaninu na fenylacetaldehyd (Basařová a Janoušek, 2000).

Cizorodé látky. Jedná se o látky, které se dostávají do výrobku pomocí sladu nebo vznikají během výrobního postupu. Mezi cizorodé látky se řadí i zbytkové množství technických pomocných látek (dezinfekční a čisticí prostředky). Hlavní skupinou cizorodých látek jsou dusičnany, biogenní aminy, těkavé N-nitrosaminy a N-nitrosloúčeniny (Kellner, 1998).

Dusičnany mají v pivě přístupnou hodnotu 50 mg NO_3^- na litr. Ovšem z doporučení vyplývá hodnota 25 mg NO_3^- na litr. Slad je zanedbatelný zdroj dusičnanů.

Biogenní aminy jsou látky s bazickým charakterem. Tyto látky se přirozeně vyskytují v přírodě. Látky jsou biologicky aktivní. Biogenní aminy jsou nežádoucím produktem konečného rozkladu bílkovin. Tento rozklad probíhá za pomoci katalýzy mikrobiálními enzymy. Rozklad probíhá ve směru od bílkovin přes peptidy k aminokyselinám. Biogenní aminy vznikají mikrobiální dekarboxylací odpovídajících aminokyselin. Biogenní aminy jsou zastoupeny 40 sloučeninami. Nejvýznamnější sloučeninou je histamin a tyramin. Přítomnost biogenních aminů ve vysokých koncentracích působí toxicky. Toxicita probíhá na úrovni centrálního nervového systému a vaskulárního systému. Biogenní aminy se rozdělují na dvě skupiny. První skupinou jsou aminy pocházející ze sladu (agmatin, spermin, spermidin). Druhou skupinou jsou aminy, které vznikají během výroby piva (histamin, tyramin); (Olšovská et al., 2014).

N-nitrosaminy jsou významnými sloučeninami pro své karcinogenní a mutagenní vlastnosti. Tyto látky se dělí na těkavé a netěkavé. Z těkavých N-nitrosaminů je nejvýznamnější N-nitrosodimethylamin (NDMA). Hlavním zdrojem NDMA představuje slad. V Evropě je limit pro NDMA v sladu v rozmezí 2,0 – 2,5 µg na kg. N-nitrosaminy vznikají při reakcích sladových aminů s oxidy dusíku. Oxid dusíku je složkou sušícího vzduchu (Olšovská et al., 2014).

Dalšími N-nitrosaminy jsou N-nitrosodiethylamin (NDEA), N-nitrosodipropylamin (NDPA), N-nitrosodibutylamin (NDBA), N-nitrosopropylrolidin (NPYR), N-nitrosopiperidin (NPIP) a N-nitrosomorfolin (NMOR); (Kellner, 1998).

N-nitrosloučeniny jsou látky s nitroskupinou, která je vázaná na N v jakékoliv molekule. N-nitrosloučeniny (ATNC) jsou těkavé i netěkavé látky. Netěkavých ATNC je kolem 90%. Netěkavé ATNC jsou mírněji karcinogenní než těkavé ATNC, ale dokážou se snadno chemicky přeměnit na těkavé ATNC. ATNC vznikají až při výrobě piva. Vznikají z části při výrobě mladiny, ale hlavní částí jejich vzniku je při hlavním kvašení (Kellner, 1998).

Aminokyseliny v procesu kvašení a dokvašování piva. Aminokyseliny tvoří 40 až 45 % dusíkatých látek, které jsou spotřebovány kvasinkami během procesu kvašení. Mají využití pro syntézu bílkovin kvasinkami a jako substrát pro tvorbu vedlejších metabolitů a zastupují nenahraditelnou roli při tvorbě základních složek extraktu mladiny (Čížková et al., 2005).

8. Metody stanovení

Základní metody, které poskytují informace o aminokyselinách, jsou založené na fyzikální chemii. Jedná se o formolovou titraci a spektrofotometrické postupy. Spektrofotometrické postupy jsou takové reakce, které využívají reakci s ninhydrinem nebo s 2,4,6 – trinitrobenzensulfonovou kyselinou (Čížková et al., 2005).

Orientační stanovení na množství aminokyselin a jeho spektra udávají stanovení na principu papírové chromatografie a chromatografie tenkovrstvé. Stanovení, které se dají využít pro stanovení aminokyselin, jsou v současnosti založené na postupech chromatografie. Jedná se o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, plynovou chromatografii, gelovou permeační chromatografii a chromatografii na reverzní fázi (Čížková et al., 2005).

Stanovení aminokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jedná se o HPLC, která se provádí v 75 % případů stanovení aminokyselin. Využívá se v systému reverzní fáze. Je to princip, který je založen na odlišnostech polarity. Stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je na bázi polárního rozpouštědla. Pro stacionární fázi se využívá silikagelu s kovalentně navázaným alkylovým řetězcem. Mobilní fáze je tvořena směsí vody a méně polárního rozpouštědla. Rozpouštědlo musí být s vodou mísitelné a jedná se především o methanol, acetonitril a tetrahydrofuran. Aminokyseliny se před vlastním stanovením musí převést na vhodné deriváty. Tento proces se rozděluje na dva základní postupy. Prvním je předkolonová derivatizace. Jedná se o derivatizaci před vlastní chromatografickou separací. Druhým je postkolonová derivatizace. Je to derivatizace aminokyselin, která se provádí až po vlastní separaci na koloně. Derivatizace umožňuje snadnější detekci aminokyselin. Metoda HPLC představuje metodu jednoduchou, rychlou a přesnou. Průměrná doba stanovení se pohybuje kolem 36 minut. Metoda dokáže stanovit následující spektrum aminokyselin. Jedná se o kyselinu asparagovou, serin, kyselinu glutamovou, glycin, histidin, arginin, threonin, alanin, prolin, cystein, tyrosin, valin, methionin, lysin, izoleucin, leucin a fenylalanin (Čížková et al., 2005).

9. Závěr

Zrno ječmene obsahuje kromě malého množství volných aminokyselin ještě další dusíkaté sloučeniny. Konkrétně peptidy a hlavně bílkoviny. Všechny tyto látky řadíme pod označení N-látky (dusíkaté látky).

Ječmen, a z něj vyrobený slad, patří mezi důležité a nepostradatelné suroviny pro výrobu piva. Pro sladařské účely se pěstuje sladovnický ječmen přesným agrotechnickým postupem (odlišným od krmného ječmene). Ječmen pro výrobu sladu musí vykazovat přesné parametry (např. obsah N-látek, klíčivost, vlhkost, čistota, atd.).

N-látky patří mezi hlavní limitující faktory u zrna pro výrobu sladu, u samotného sladu a i finálního výrobku – piva. N-látky jsou hlavními prekurzory sloučenin, které mají přímý vliv na sensorické vlastnosti piva - chuť, vůně, pěnivost. Mezi velmi důležité aminokyseliny z tohoto hlediska patří aminokyselina methionin, ze kterého vznikají sirné těkavé produkty, které negativně ovlivňují sensorické vlastnosti piva. Další negativní produkty vznikající z aminokyselin jsou aldehydy.

Nejen celkový obsah N-látek, ale také vzájemný poměr jednotlivých aminokyselin je velmi důležitý. Nevhodný poměr totiž způsobuje odlišnou metabolickou přeměnu vlivem kvasinek. Kvasinky jsou hlavními spotřebiteli aminokyselin při svém růstu. Rychlost asimilace jednotlivých aminokyselin kvasinkami je odlišná a dle rychlosti asimilace dělíme aminokyseliny do 4 skupin. Kvasinky spotřebovávají v průměru 40 až 45 % z původního obsahu aminokyselin.

N-látky se stanovují různými metodami. Stanovení aminokyselin lze provést titračně - formolovou titrací nebo spektrofotometrickými metodami, které řadíme k základním metodám. V současné době se ale preferuje jejich stanovení pomocí separačních technik, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Tato metoda se využívá v systému reverzní fáze. Aminokyseliny před vlastním stanovením je nutné převést na vhodné deriváty (derivatizace aminokyselin).

10. Seznam použité literatury

Basařová, G. 1972. Význam a změny obsahu aminokyselin při výrobě piva. Kvasný Průmysl. 18 (3). 55-58.

Basařová, G. 2010. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. 1. vyd. Vydavatelství VŠCHT. Praha. 863 s. IBSN: 978-80-7080-734-7.

Basařová, G. 2015. Sladařství: teorie a praxe výroby sladu. 1. vyd. Havlíček Brain Team. Praha. 626 s. IBSN: 978-80-87109-47-2.

Basařová, G., Černá, I. 1972. Praktické poznatky o významu sledování obsahu aminokyselin a aminodusíku při výrobě piva. Kvasný Průmysl. 18 (7). 145-149.

Basařová, G., Janoušek, J. 2000. Význam aminokyselin v technologii a kvalitě piva. Kvasný Průmysl. 46 (11). 314-318.

Bendová, O., Kurzová, V. 1970. Význam růstových faktorů a aminokyselin pro pivovarské kvasinky a jejich typizaci. Kvasný Průmysl. 16 (7-8). 161-164.

Cram, D. J., Hammond, G. S. 1964. Organic chemistry, 1st ed. McGraw-Hill, Inc. New York. p. 889.

Čížková, H., Hofra, P., Kolouchová, I., Dostálek, P. 2005. The importance of amino acids in brewing industry and new methods of their determination. Kvasný Průmysl. 51 (2). 47-51.

Dallen, M. 2010. Zelené potraviny, když jídlo je naším lékem. Ratio Bona spol. s r.o. Praha. IBSN: 978-80-254-4590-7.

Ducháček, F. 1927. Rozbory sladařské. Chemická sekce. Brno. 75 s.

Gómez, B. G., Edney, M. J. 2011. A High-Maltose Broth Method for Studying the Effects of Amino Acids on Fermentability. J. Am. Soc. Brew. Chem. 69 (3). 127-132.

Havlová, P. 1999. Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu. 1. vyd. Ústav zemědělských a potravinářských informací. Praha. 43 s. IBSN: 80-7271-040-0.

Hruban, V., Majzlík, V. 2002. Obecná genetika. ČZU v Praze- Praha. 316 s. IBSN: 978-80-213-0600-4.

Hřivna, L., Radoch, T., Gregor, T., Šottníková, V., Cerkal, R., Ryant, P., Prokeš, J. 2011. Vliv aplikace N a S na chemické složení zrna ječmene a sladu. *Kvasný Průmysl*. 57 (7-8). 223-230.

Jones, M., Pierce, J. S. 1964. *J. Inst. of Brew.* 70 (307).

Karlson, P. 1964. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 4nd ed. Georg Thieme. Stuttgart. p. 444.

Klem, K., Hřivna, L., Ryant, P., Miša, P. 2011. Využití diagnostických metod pro rozhodovací procesy v pěstební technologii jarního ječmene. Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž. ISBN: 978-80-904597-0-3.

Kellner, V. 1998. Cizorodé látky v pivovarnictví České republiky a Slovenska současnými očima. *Kvasný Průmysl*. 44 (10). 278-279.

Kočárek, E. 2008. *Genetika*. Nakladatelství Scientia spol. s r.o. Praha. ISBN: 978-80-86960-36-4.

Kosař, K. 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. 11. vyd. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. Praha. ISBN: 80-902658-6-3.

Kosař, K. 1997. *Kvalita sladovnického ječmene a technologie jeho pěstování*. ÚZPI. Praha.

Kotal, V. 1989. *Enzymy v zemědělství*. Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR. Praha. 99 s. ISBN: 80-209-0022-5.

Kunze, W. 1989. *Technologie Brauer und Mälzer*. 6.nd ed. VEB Fachbuchverlag. Leipzig. p. 488. ISBN: 3-343-00536-3.

Kunze, W. 2010. *Technology brewing and malting*. 4.nd ed. VLB. Berlin. p. 1057. ISBN: 978-3-921690-64-2.

Lišková, M., Frančáková, H., Mareček, J. 2011. Changes of crude protein content in malting barley influenced by post-harvest ripening. *Journal of Central European Agriculture*, 12(1). 92-102.

- Lund, M. N., Andersen, M. L. 2011. Detection of Thiol Groups in Beer and Their Correlation with Oxidative Stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 69(3). 163-169.
- Mikulíková, R., Svoboda, Z., Benešová, K., Běláková S. 2009. Determination of methionine in malt. 55 (11-12). 310-314.
- Olšovská, L., Matoulková, D., Čejka, P., Jurková, M. 2014. Beer And Health. *Kvasný Průmysl.* 60 (7-8). 174-181.
- Pacák, J. 2007. Jak porozumět organické chemii. Nakladatelství Karolinum. Praha. ISBN: 978-80-246-1354-3.
- Smrž, F. 2012. 2012 Renaissance ječmene, publikace české technologické platformy pro potraviny. Potravinářská komora České republiky. Praha. ISBN: 978-80-905096-0-3.
- Skládal, V. 1959. Sladovnický ječmen. 1. vyd. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.
- Šebánek, J. 1983. Fyziologie rostlin. 1. vyd. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 560 s.
- Vančura, M. 1966. Pivovarsko-sladařská analytika. 1. vyd. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 123 s.
- Vondrážka, Z. 2002. Biochemie. Academia. Český Těšín. ISBN: 80-200-0441-6.
- Yoshida, T. 1938. Rept. Res. Lab. Kirin Brewery. Co. Ltd. 1 (11). 78-86.
- Zvoníček, J., Ječmen, J. 1984. Výrobní linky potravinářské. ČVUT. Praha.