

# Z výzkumu a praxe

## HOMOGENITA A MODIFIKACE SLADU

### I. Detekce vybarvovacím řezem

RNDr. PAVLA HAVLOVÁ, ING. JIŘÍ ŠUSTA, ING. VRATISLAV PSOTA  
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský a. s., Sladařský ústav, Brno

**Klíčová slova:** modifikace – rozluštění, homogenita, vybarvovací řezy, slad

### 1. ÚVOD

Cytolytické rozluštění sladu je z hlediska technologie výroby piva a jeho kvality považováno za jedno z nejdůležitějších kritérií jakosti [1, 2]. Zajišťuje narušení buněčných stěn zrna a podmiňuje tedy i proteolytické rozluštění a dokonalou hydrolyzu škrobu při rmutování.

Rozluštění zrna se sleduje obvykle od páteho dne klíčení a postupuje od spodní klíčkové části k vrcholu zrna a od povrchové části ke středu. Je iniciováno růstovými stimulatory typu gibberelinů uloženými v zárodečné oblasti, které difundují do subaleuronových a aleuronových vrstev, kde aktivují hydrolasy.

Rozluštění je tedy výsledkem působení komplexu hydrolas, zejména „cytosového“ komplexu [3], které rozrušují mezibuněčné stěny endospermální škrobové části zrna. Přímou pro rozluštění zrna při sladování má především význam endogenní sladová  $\beta$ -glukanasa, celulas,  $\beta$ -glukanasa lichenasového typu, karoubinasa, manosa a xylanasy. Význam působení těchto enzymů pro technologický proces sladování i přípravu mladiny je značný, neboť se účinně podílejí na průběhu rozluštění zrna a později na dokonalém využití extraktu ve varně.

Pojem „rozluštění sladu“ se podle soudobých poznatků nevztahuje jen na funkci cytosového enzymového komplexu, i když ji nelze z technologického hlediska nahradit funkcí jiných enzymových systémů, nýbrž na současné působení velké řady původních a při klíčení aktivovaných i de novo vytvořených enzymů.

Pod pojmem homogenita se rozumí partie ječmene, která obsahuje jednu odrůdu nebo odrůdy si velmi blízké, z jednoho pěstebního místa a zpracované stejnou technologií. Modifikace je synonymum pro termín rozluštění zrna. Optimální stupeň modifikace se pohybuje v rozmezí 90–95 %, přičemž stupeň homogenity sladu by při tom neměl klesnout pod krajní mez 65 %.

### 2. METODY STANOVENÍ

Stupeň rozluštění (modifikace) sladu se obvykle posuzuje komplexně podle průměrné délky stříčky, moučnatosti, hektolitrové hmotnosti, rozdílu v obsahu extraktu mezi moučkou a šrotem, Kolbachovým číslem a RE 45 °C. Ne vždy je spolehlivým orientačním vodítkem pro posouzení postupu

rozluštění zrna za daných výrobních podmínek vývin stříčky při klíčení. Slad i s přerostlou stříčkou může mít rozluštění naprosto nevyhovující, pokud ječmen klíčí v extrémních podmínkách (např. přemočení nebo teplé vedení).

Stupeň rozluštění sladu lze stanovit jednak metodami fyzikálními, založenými na měření tvrdosti či křehkosti zrna (Murbimeter, Friabilimetr), nebo metodami fyzikálně – chemickými. U těchto metod se využívá odlišné rychlosti difúze roztoku barviva do modifikovaných částí zrna.

Moučnatost [4] je důležitá vlastnost sladu, podle které se posuzuje rozluštění sladu. Zjišťuje se při běžném rozboru na řezu farinatomem a přímým odečtením zrn moučnatých, polosklivých a sklivitých. Tato jednoduchá zkouška však podléhá do jisté míry subjektivnímu posuzování. Jiný způsob spočívá v prosvícení zrna diafonoskopem (moučnatá zrna zůstávají neprůsvitná a sklivitá zrna jsou průhledná).

Křehkost sladu obdobně jako moučnatost souvisí se stupněm rozluštění endospermu. Stanovuje se různými přístroji na zjišťování tvrdosti zrna (Brabenderův mlyněk, sklerometr).

Dalším ukazatelem stupně rozluštění sladu je rozdíl v extraktu mezi moučkou a šrotem [4]. Metoda rozdílu je založena na poznatku, že v hrubém šrotu zůstává uzavřeno před enzymatickým štěpením tím více látek tvořících extrakt, čím nedokonalěji je slad rozluštěn.

Viskozita kongresní sladin je dalším ukazatelem cytolytického rozluštění sladu. Ukazuje na stupeň štěpení hemimicelulos a gumovitých látek endo- $\beta$ -glukanasami během sladování a na počátku kongresního rmutování (při 45 °C) na nízkomolekulární látky.

Nejužívanější klasická a dnes již dokonale propracovaná metodika na stanovení stupně rozluštění je vybarvo-

vací metoda, při níž se jako barviva užívá běžně dostupná methylenová modř. Princip metody je jednoduchý. Obroušená zrna zalitá v průhledné pryskyřici se vybarví roztokem methylenové modři v ethanolu. Rozluštěné části zrna se vybarví modře, nerozluštěné zůstávají bílé [5, 6, 7]. Kromě methylenové modři se na posuzování stupně rozluštění sladu používají i jiná barviva [8, 9]. Jde především o fluorescenční barviva, z nichž nejpoužívanější je calcofluor [10, 11].

Jednu z nejrozsáhlejších prací zabývající se rozvojem techniky barvení fluorescencí vypracovali Jensen a Aastrup [12]. Studie zahrnuje metody pro následující stanovení  $\alpha$ -amylasy,  $\beta$ -glukanasy, lipasy a proteasy v klíčících obilkách ječmene. Autoři načrtávají vývoj specifických fluorescenčních analýz jak pro strukturní, tak pro chemické změny během sladování, které mohou být

Modifikace a homogenita sladu										Carlsberg METHOD																																																																																																									
										Signature:																																																																																																									
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span>0</span><span>5</span><span>25</span><span>50</span><span>75</span><span>95</span><span>100 %</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> </div>																																																																																																																			
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Blok I</p> <table border="1"> <tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table> </div> <div> <p>Blok II</p> <table border="1"> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table> </div> <div> <p>Modifikační skupina</p> <table border="1"> <tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table> </div> </div>												1	2	3	4	5	6	7	8	9	10																																																																							0	1	2	3	4	5																		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10																																																																																																										
0	1	2	3	4	5																																																																																																														
<p>Výpočet</p> <table border="1"> <tr> <th>Modifikační skupina</th> <th>0</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th><math>\Sigma</math></th> </tr> <tr> <td>Zrna</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>100</td> </tr> <tr> <td><math>q</math>: Zrna, %: <math>\Sigma q = 100</math></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><math>q</math>: Koefficienty</td> <td>0</td> <td>0.125</td> <td>0.375</td> <td>0.625</td> <td>0.875</td> <td>1.000</td> <td></td> </tr> <tr> <td><math>m</math>: <math>q \times x</math>: <math>\Sigma m = M</math></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><math>a</math>: <math>m \times q</math>: <math>\Sigma a = A</math></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><math>100 - 2\sqrt{100A - M^2} = H</math></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>												Modifikační skupina	0	1	2	3	4	5	$\Sigma$	Zrna							100	$q$ : Zrna, %: $\Sigma q = 100$								$q$ : Koefficienty	0	0.125	0.375	0.625	0.875	1.000		$m$ : $q \times x$ : $\Sigma m = M$								$a$ : $m \times q$ : $\Sigma a = A$								$100 - 2\sqrt{100A - M^2} = H$																																																							
Modifikační skupina	0	1	2	3	4	5	$\Sigma$																																																																																																												
Zrna							100																																																																																																												
$q$ : Zrna, %: $\Sigma q = 100$																																																																																																																			
$q$ : Koefficienty	0	0.125	0.375	0.625	0.875	1.000																																																																																																													
$m$ : $q \times x$ : $\Sigma m = M$																																																																																																																			
$a$ : $m \times q$ : $\Sigma a = A$																																																																																																																			
$100 - 2\sqrt{100A - M^2} = H$																																																																																																																			
<p>Výsledek</p> <table border="1"> <tr> <td>Modifikace</td> <td>( M integer )</td> <td>___ %</td> </tr> <tr> <td>Homogenita</td> <td>( H integer )</td> <td>___ %</td> </tr> </table>												Modifikace	( M integer )	___ %	Homogenita	( H integer )	___ %																																																																																																		
Modifikace	( M integer )	___ %																																																																																																																	
Homogenita	( H integer )	___ %																																																																																																																	

Obr. 1 Vizuální vyhodnocení modifikace a homogenity sladu.

využity k získání nového pohledu na zpracování sladu. Inspirování prací Fulchera et al. [13, 14] použili Jensen a Aastrup na studium  $\alpha$ -amylasy barvivo Calcofluor White M 2R pro sledování odbourávání buněčných stěn během klíčení. Pro studium hydrolytických enzymů, kde se jako katalyzátor uplatňuje lipasa [15], byl při klíčení ječmene použit fluorescein dibutyrtát. Pro zjišťování proteas v klíčících obilkách byla vyvinuta fluorescenční technika založená na změně nefluoreskujícího Ala – ala – Phe – 4 – methylcoumarinyl – 7 amidu na fluoreskující cumarin [16]. Autoři v této práci ukázali, že barvení fluorescenčními barvivy může být vysoce specifické pro hlavní aktivity enzymů, což je důležité ve sladařském průmyslu.

Pro rutinní provedení bylo vyvinuto firmou Danbrew Consult komerční zařízení, nazývané Carlsberg Seed Fixation system, které se skládá z vodící masky pro zrna, malého lisu, elektricky vyhřívané vytvrzovací formy, brusky a prohlížečního zařízení. Nevýhodou tohoto systému bylo, že zatřídování vybarvených zrn do 6 skupin podle stupně rozluštění 0 (0–5 %), 1 (5–25 %), 2 (25–50 %), 3 (50–75 %), 4 (75–95 %), 5 (95–100 %) (obr. 1) probíhalo vizuálně a bylo proto zatíženo subjektivní chybou posuzovatele.

V roce 1991 na kongresu EBC v Oslo byl

poprvé prezentován nový přístroj na stanovení stupně homogenity a modifikace (firma Haffmans), který principiálně vychází z analyzátoru Danbrew, je však vybaven automatickým optickým snímáním vybarvených částí zrn.

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Na stanovení modifikace a homogenity byla použita metoda fluorescenční za použití fluorescenčního barviva Calcofluor White.

Buněčné stěny endospermu bohaté na  $\beta$ -glukan se štěpí během sladování. Tento proces je možno zviditelnit reakcí buněčných stěn právě s fluorochromem Calcofluor, který specificky reaguje s  $\beta$ -glukany. Povrch vystavený působení barviva je sledován v ultrafialovém světle. V UV světle analyzátoru rozluštěné části zrn jsou výrazně modré, nerozluštěné světlejší až bílé. Plocha modifikovaného endospermu v procentech celkové plochy endospermu je definována jako procento rozluštění zrna.

Na vyhodnocení stupně rozluštění byla použita sestava firmy Haffmans Ltd., která se skládá z vodící masky pro zrna, lisu, brusky a prohlížečního zařízení. Vyhodnocení vzorku se provádí pomocí software. Postup přípravy vzorků (broušení a barvení) je podle metodiky EBC [17].

### 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Zavedení metody na stanovení stupně rozluštění zrna umožnilo rozšíření poznatků o kvalitě dodávaného sladu.

Z nabízených metod byla použita metoda vybarvovací za použití fluorescenčního barviva Calcofluor. Původní vizuální vyhodnocování podle Carniela [17] bylo nahrazeno přístrojovou technikou. Zmodernizováním metody, především odstraněním vizuálního vyhodnocení, došlo k zřetelnému výsledkům a jejich urychlení. Výhody této přístrojové techniky spočívají také v tom, že je možné vytisknout ke každému analyzovanému vzorku doklad, který obsahuje všechny potřebné údaje (hodnotu modifikace, homogenity, grafický záznam, obr. 2). Dále tato instrumentace umožňuje vyhodnotit a vytisknout modifikaci pro jednotlivá zrna analyzovaného vzorku, zařazení jednotlivých zrn do modifikačních skupin, vytisknout kalibrační křivku s potřebnými hodnotami pro měření (faktory přístroje, prahové hodnoty bílého světla a UV světla, obr. 3). To vše může sloužit jako doklad pro případnou reklamaci.

Protože používané barvivo Calcofluor snižuje na světle svoji intenzitu, sledovali jsme, zda je možné uchovávat po určitou dobu destičky s vybarveným zrnem pro případnou reklamaci. Byly vybrány dva vzorky,

#### ANNEX-F

##### MICROFLUO

##### Calcofluor - analýza sladu

Datum : 07/08/1996

Zákazník : XXXX  
AAAA

Poznámka : 0000

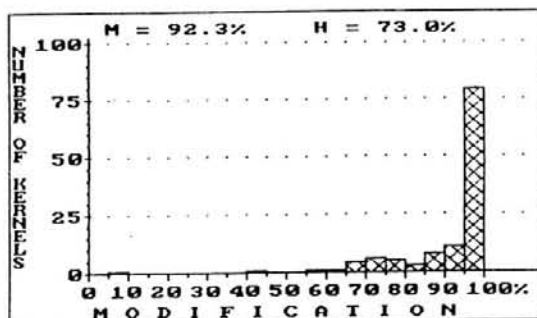
Úroveň rozlišení bílého světla : 40  
Úroveň rozlišení UV světla : 30  
Velikost vzorku : 200  
Počet analyzovaných zrn : 120  
Počet vyhodnocených zrn : 120  
Počet nehodnocených zrn : 0

CALIBRATION : VISUAL

MODIFICATION : 92.3 %

HOMOGENEITY : 73.0 %

##### Grafické znázornění



Obr. 2 Přístrojové vyhodnocení modifikace a homogenity sladu (přístroj fy Haffmans)

##### MICROFLUO

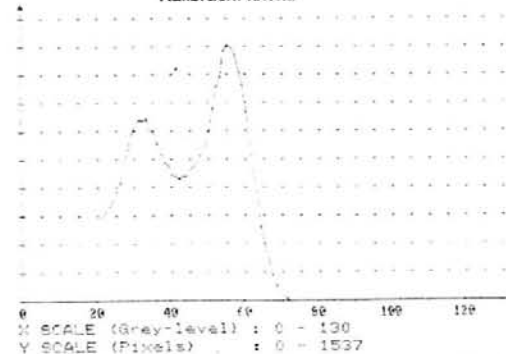
##### Kalibrační procedura - výsledek

Datum : 10/07/1997

##### Faktory

A : 4  
B : 62.0  
C : 41.6  
D : 13.80

##### Kalibrační křivka



##### Vyhodnocení nastavení přístroje

Úroveň rozlišení bílého světla : 40  
Úroveň rozlišení UV světla : 30  
Kalibrace : 100  
Standardní intenzita bílého světla : 100  
Naměřená hodnota : 100  
Standardní intenzita UV světla : 100  
Naměřená hodnota : 100  
Úroveň čemé : 100

Obr. 3 Ukázka kalibračního protokolu (přístroj fy Haffmans)

kteřé byly po dobu půl roku uchovány v temnu. Jedna destička byla skladována při laboratorní teplotě, druhá při 7 °C. V pravidelných časových intervalech byly tyto vzorky vyhodnocovány a ze získaných výsledků jsme určili směrodatnou odchylku. U vzorku uchovávaného při laboratorní teplotě činila směrodatná odchylka pro modifikaci 0,66 a pro homogenitu 3,27. Odhad směrodatné odchylky ze 30 stanovení u vzorku uchovávaného v chladu činil pro modifikaci 2,06 a pro homogenitu 3,63. Z výsledků vyplývá, že je možné uchovávat již vybarvené destičky při laboratorní teplotě v temnu, aniž dochází k výrazné změně získaných hodnot nejméně po dobu 3 měsíců. Daleko důležitější, jak se ukázalo z praxe, je správné nastavení přístroje na etalon nebo jiný zvolený standard a celková příprava vzorku k analýze.

Samotná příprava vzorku výrazně ovlivňuje výsledky. Zrna, před fixací v destičce, musí být již ve vodici masce srovnána pluchou hřbetní nebo pluškou břišní navrch. Není vhodné, aby některá zrna ležela „na boku“, protože to způsobuje potíže jednak při broušení (obilka se snáze vyrazí z destičky), jednak při vyhodnocování. Dalším důležitým momentem je postup broušení. Je nutné před začátkem broušení správně nastavit vzdálenost mezi brusným papírem a destičkou a to tak, aby všechna zrna byla

rovnoměrně zbrušena na polovinu. Nesprávným seřízením brusky dojde k nevhodnému zbrúšení (například zrna nejsou dostatečně zbrúšená nebo naopak je poškozena část destičky). Nerovnoměrné zbrúšení se pak negativně projeví v hodnotách modifikace a homogenity. Rovněž velmi důležité je při vybarvování vzorků dodržovat předepsanou dobu působení barviva i postup oplachování a sušení vzorku. Svou roli sehraje i přesné nakalibrování přístroje před vlastním vyhodnocením.

Je tedy nutné přesně dodržovat veškeré uvedené podmínky v průběhu přípravy a vyhodnocení vzorků pro zajištění správných reprodukovatelných výsledků.

## LITERATURA

- [1] ERDAL, K., GJERSTEN, G.: EBC Proc. Madrid 1967, Elsevier Publishing Co. Amsterdam, 1968, s. 295.
- [2] BAMFORTH, C., W.: Die enzymologie von  $\beta$  – glukon. EBC Kodaň, 23. – 26.5. 1981, sdělení 5.
- [3] MOŠTEK, J.: Biochemie a technologie sladu a piva, II. Sladařství (skripta VŠCHT Praha) SNTL, Praha 1970.
- [4] LHOTSKÝ, A.: Technická kontrola sladařské a pivovarské výroby, SNTL, Praha, 1957.
- [5] KRNGSTADT, H.: EBC, Interlaken 1969, s. 131.
- [6] EERDE, P.: J. Inst. Brew. **89**, 1983, s. 195.
- [7] BARTKO, A.: Záv. zpráva, VÚPS, Brno, 1985.
- [8] YAMASHITA, A.: Bulletin of Brewing Science, Vol. 13, 1967.
- [9] JENSEN, A., S., HELTVED, F.: Carlsberg Res. Commun. **48**, 1983, s. 1.
- [10] CARNIELO, M., FOUCAUT, M., A., MOLL, M.: Brauwissenschaft **35**, 1982, s. 168.
- [11] JENSEN, A., S., AASTRUP, S.: Carlsberg Res. Commun. **46**, 1981, s. 81.
- [12] JENSEN, A., S., AASTRUP, S.: Determination of malt modification. Cerevisia **3**, 1985, s. 113.
- [13] FULCHER, R., G., WONG, S., I.: Proc. Cereals for Food and Beverages. Ed. G. E. Inglett and L. Munck. Copenhagen 1981, Academic Press., s. 1.
- [14] WOOD, P., J., FULCHER, R., G.: Cereal Chem. **55**, 1978, s. 952.
- [15] GUILBAUT, G., G., HIESENMAN, H.: Anal. Chem. **41**, 1969, s. 2006.
- [16] HELTVED, F.: Ph. D. Thesis. The Technical University of Denmark, 1984.
- [17] CARNIELO, M., FOUCAUT, A., MOLL, M.: Brauwissenschaft **35**, 1982, s. 168.

Lektoroval Ing. Jiří Čulík, CSc.  
Do redakce došlo 14. 7. 1997