

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Hodnocení změn zásobních profilů zrna ječmene (*Hordeum
vulgare* L.) v průběhu procesu sladování pomocí gelové
elektroforézy

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Adéla Brabcová

Autor: Richard Binder

České Budějovice, duben 2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: Richard Binder

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Název tématu: **Hodnocení změn profilů zásobních proteinů zrna ječmene (*Hordeum vulgare* L.) v průběhu procesu sladování pomocí gelové elektroforezy**

Evaluation of storage protein profiles modifications in barley (*Hordeum vulgare* L.) grains during malting procedure using gel electrophoresis

Zásady pro vypracování:
(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

Cílem bakalářské práce (BP) bude hodnocení změn v profilech zásobních proteinů zrna ječmene v průběhu sladovacího procesu. Sladování je unikátní proces využívající přírodního fenoménu klíčení obilí. Dochází tak k syntéze řady nových proteinů, zejména hydrolytických enzymů, a rovněž při něm dochází k částečné hydrolýze zásobních látek, včetně odbourávání zásobních proteinů. Pro vlastní řešení BP bude použit slad vyrobený ze zrna dvou odrůd jarního ječmene. Slad bude získán buď přímo ze sladovny nebo bude připravena imitace sladu v laboratoři řešitelského pracoviště. Řešení BP bude probíhat dle následujícího schématu:

- 1) získání sladu ze sladovny v různých výrobních fázích (počáteční stav, po klíčení, po hvozďení) resp. příprava jeho imitace pro obdobné fáze výroby
- 2) mechanická úprava vzorků a extrakce proteinů pomocí denaturačního extrakčního pufu
- 3) analýza získaných vzorků na gelové denaturační elektroforese (SDS-PAGE) nebo na čipové elektroforese
- 4) digitalizace sušených gelů a vyhodnocení získaných dat pomocí specializovaného software
- 5) zpracování dat do tabulek, obrázků či grafů, statistické vyhodnocení získaných dat

Součástí BP bude podrobný literární přehled o dosavadním stavu řešené problematiky a výsledky budou podrobeny diskuzi.

Rozsah tabulkových a grafických prací: 5- 10 stran

Rozsah průvodní zprávy: 25-30 stran

Seznam základní odborné literatury:

Prugar J., Hraška Š. (1989): Kvalita jačmeňa. Príroda, Bratislava, 228 p.

Shewry P.R., Halford N.G. (2002): Cereal seed storage proteins: structure, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53 (370), Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue, pp 947-958.

Bak-Jensen K. S., Laugesen S., Roepstorff P., Svensson B. (2004): Two-dimensional gel electrophoresis pattern (pH 6–11) and identification of water-soluble barley seed and malt proteins by mass spectrometry. *PROTEOMICS* 4 (3): 728–742.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Konzultant: Ing. Adéla Brabcová

Datum zadání diplomové práce: 26. března 2012

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2013

L.S.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Vedoucí katedry

Ing. Karel Suchý, Ph.D.
Proděkan pověřený vedením ZF

V Českých Budějovicích dne 26. března 2012

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci „Hodnocení změn zásobních profilů zrna ječmene (*Hordeum vulgare* L.) v průběhu procesu sladování pomocí gelové elektroforézy“ jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

19. dubna 2013 v Českých Budějovicích

Poděkování

Rád bych poděkoval zejména vedoucímu této bakalářské práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D za trpělivost, vstřícnost, cenné odborné rady a připomínky, za sehnání zrna a přípravu sladu, za pomoc se statistickým vyhodnocením. Dále bych chtěl velmi poděkovat Ing. Adéle Brabcové za ochotu a pomoc při řešení laboratorního pokusu.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá hodnocením změn profilů zásobních bílkovin zrna ječmene (*Hordeum vulgare* L.) v průběhu procesu sladování pomocí gelové elektroforézy. Analýzám byly podrobeny tři odrůdy jarního ječmene. Nesladovnická odrůda Herris a sladovnické odrůdy Radegast a Sebastian. V průběhu procesu sladování dochází k proteolýze a tím pádem ke změně spekter zásobních bílkovin zrna. Tyto změny zásobních bílkovin byly zachyceny a vyhodnoceny pomocí gelové elektroforézy, technikou SDS-PAGE, na základě změn molekulových hmotností v různých fázích procesu sladování. Dále byla pozorována hmotnost tisíce semen (HTS) před a po procesu sladování. Tyto výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

Klíčová slova: *Hordeum vulgare*, ječmen, zrno, sladování, bílkoviny, elektroforéza, SDS-PAGE

Abstract

This bachelor thesis is focused on evaluation of storage protein profiles modifications in barley (*Hordeum vulgare* L.) grains during malting procedure using gel electrophoresis. It has been analyzed three varieties of spring barley. One nonmalting variety HERRIS and two malting varieties Radegast and Sebastien. There are significant proteolysis changes during the malting procedure. These changes of storage proteins were captured and evaluated by gel electrophoresis (SDS-PAGE) on the basis of changes in the molecular weight in the different phases of malting procedure. Next observation which has been done was the measurement of the thousand grain weight (TGW) before and after the malting procedure. These results have been evaluated by statistic program.

Key words: *Hordeum vulgare*, barley, grain, protein, electrophoresis, SDS-PAGE

Obsah:

1. Úvod.....	10
2. Literární rešerše.....	12
2.1. Zrno.....	12
2.1.1. Morfologie.....	12
2.1.2. Chemické složení.....	13
2.1.2.1. Sacharidy.....	13
2.1.2.2. Lipidy.....	14
2.1.2.3. Fosfáty.....	15
2.1.2.4. Polyfenoly.....	15
2.1.2.5. Dusíkaté látky.....	15
2.1.2.6. Minerální látky.....	17
2.1.3. Hodnocení jakosti.....	17
2.2. Sladování.....	18
2.2.1. Posklizňová úprava.....	18
2.2.2. Máčení.....	18
2.2.2.1. Teorie.....	19
2.2.2.2. Technologie.....	19
2.2.2.3. Zařízení.....	20
2.2.3. Klíčení.....	20
2.2.3.1. Teorie.....	21
2.2.3.2. Technologie.....	22
2.2.3.3. Zařízení.....	22
2.2.4. Hvozďení.....	23
2.2.4.1. Teorie.....	23
2.2.4.2. Technologie.....	24

2.2.4.3. Zařízení.....	25
2.2.5. Úprava odsušeného sladu.....	25
2.3. Elektroforéza.....	25
2.3.1. Rozdělení.....	26
2.3.2. Gelová elektroforéza.....	27
2.3.2.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE).....	28
3. Cíle práce.....	30
4. Materiál a metodika.....	31
4.1. Materiál pro hodnocení změn bílkovinných profilů zrna ječmene.....	31
4.1.1. Příprava sladu.....	32
4.1.2. Příprava sladu.....	32
4.1.3. Značení vzorků.....	32
4.2. Metodika hodnocení změn bílkovinných profilů zrna ječmene.....	34
4.2.1. Hmotnost tisíce semen (HTS).....	34
4.2.2. Extrakce bílkovin.....	34
4.2.3. Příprava vzorků pro SDS-PAGE.....	34
4.2.4. Elektroforetická separace (SDS-PAGE).....	35
5. Výsledky.....	36
5.1. Hmotnost tisíce semen (HTS).....	36
5.2. SDS-PAGE.....	37
5.2.1. Směsné vzorky.....	38
5.2.2. Jednozrné vzorky.....	40
6. Diskuze.....	43
7. Závěr.....	45
8. Zdroje.....	46
9. Přílohy.....	49

1. Úvod

Ječmen je zkulturněn nejméně 8 tisíc let a původem pochází z Asie. Na území Českých zemí se šířil už s Kelty, kde měl po pšenici druhé nejvýznamnější místo. Používal se na výrobu chleba a piva. Pro Čechy byl již v devátém století spolu s prosem a nahými pšenicemi nejvýznamnější plodinou. To trvá dodnes. Jeho místo v rostlinné produkci je za poslední století ze všech plodin nejstabilnější. Po pšenici přináší české rostlinné výrobě největší hrubé tržby a předstihuje řepku. Z hlediska ekonomiky, kde se spojují jeho vysoké ceny a poměrně nízké náklady, je po máku, bramborách a cukrovce plodinou s nejvyšší rentabilitou (Černý et al., 2007).

Ječmen má tři hlavní oblasti použití: sladovnictví, lidská výživa a krmivo pro hospodářská zvířata.

Pro výrobu českého sladu se pěstuje ječmen jarní dvouřadý (*Hordeum vulgare* var. *Nutans*) a jeho schválené odrůdy. Slad vyrobený z ječmene je typickou surovinou pro výrobu piva. Již 2000 let před n. l. byl používán v podobě naklíčeného ječmene v Mezopotámii a Egyptě k výrobě kvašených nápojů (Homola, Hřivna, 2009). Slad se vyrábí technologickým postupem, jehož cílem je aktivace a syntéza proteolytických, cytolytických, fytinolytických a amylolytických enzymů a jejich vzájemná proporcionalita (Basařová et al., 1993). Kvalita sladu ovlivňuje proces technologie výroby piva a má stěžejní význam i v docílení požadovaného chemického složení, organoleptických vlastností a koloidní stability tohoto nápoje.

Proces sladování lze z hlediska jednotlivých kroků rozdělit na následující tři úseky: máčení, klíčení a hvozdění.

Během sladování jsou bílkoviny využívány k výstavbě základů rostlinných těl – ke tvorbě kořínků a stříčky zrna. Proto je obsah ve sladu nižší přibližně o 0,3 % oproti obsahu bílkovin v ječmeni. Do rozpustné formy je převedeno během klíčení asi 35 až 40 % bílkovin. Působením hydrolytických enzymů (peptidas) vznikají látky s nižší až velmi nízkou molekulovou hmotností ve srovnání s původními bílkovinami (Čížková et al., 2006).

Ječmen obsahuje 80 až 88 % sušiny a 12 až 20 % vody. Sušinu tvoří organické dusíkaté a bezdusíkaté sloučeniny a anorganické látky.

Obsah dusíkatých látek je důležitou technologickou hodnotou ječmene určeného ke sladování – slad obsahuje 7 až 16 % bílkovin, přičemž 80 % proměnlivosti znaku je dáno agroekologickými podmínkami daného ročníku (Čížková et al., 2006).

2. Literární rešerše

2.1. Zrno

2.1.1. Morfologie

V České republice se pro sladovnické účely pěstuje jarní dvouřadý ječmen (*Hordeum vulgare L.*). Z jedné rostliny ječmene můžeme získat 15-30 zrn (obilek) (Kosař, Procházka et al., 2000). Obilka se skládá ze tří částí:

- Obalová vrstva:

Obalová vrstva je tvořena na hřbetní straně pluchou a na břišní straně pluškou. Dále následuje oplodí (perikarp) a osemení (testa) (Newman, Newman, 2008).

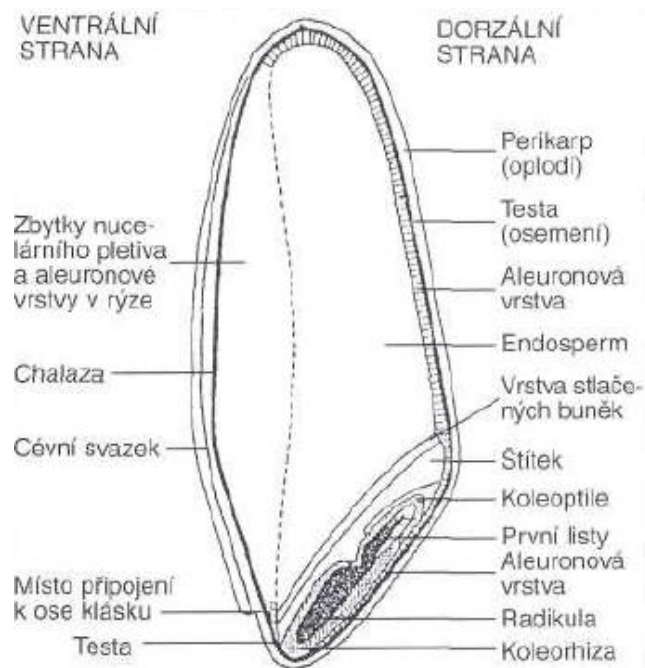
- Zárodek:

Zárodek je latentní formou, ze které po hydrataci vyroste nová rostlina. Jako limitní koncentrace pro zachování životaschopnosti se uvádí 10 % vody a 10-12 % obsahu CO₂ (Kosař, Procházka et al., 2000).

- Endosperm

Endosperm tvoří největší část obilky. Svrchní vrstva, tzv. aleuronová vrstva, umístěná hned pod osemním, je složena z hranolových buněk, uspořádaných v řadách. Tyto buňky obsahují bílkoviny, tuk a částečně i škrobová zrna. Při dosažení podmínek pro zahájení klíčení je aleuronová vrstva aktivována hormony.

Vnitřní endosperm tvoří tenkostěnné buňky, ve kterých je uložen zásobní škrob. Poměr obsahu škrobu k obsahu dusíkatých látek určuje povahu (charakter) endospermu (Kosař, Procházka et al., 2000). U obilek ječmene rozlišujeme dva různé typy endospermu: moučný a sklovitý. Rozdíly mezi nimi jsou dány úrovní kompaktnosti endospermu. Moučný endosperm má otevřenější strukturu a škrobová zrna jsou v bílkovinné matrici uložena volněji, zatímco sklovitý endosperm je charakteristický svým těsným spojením škrobových zrn, která jsou v bílkovinné matrici uložena těsněji (PSOTA V. et al., 2008).



Obr. 1: Podélný řez zralou obilkou (Kosař, Procházka et al., 2000)

2.1.2. Chemické složení

Chemické složení zrna ovlivňuje průběh výroby piva, ale především jeho základní i specifické chemické, biochemické a organoleptické vlastnosti (Basařová et al., 2010). Zrno ječmene obsahuje 80 až 88 % sušiny a 12 až 20 % vody. Sušinu tvoří organické dusíkaté a bezdusíkaté sloučeniny a anorganické látky (Hubík, 2002) viz tab.

2.1.2.1. Sacharidy

Skupinu organických látek v zrně ječmene představují především sacharidy, tvořící asi 80 % hmotnosti ječného zrna. Nejvíce zastoupenou složkou sacharidů je škrob. Škrob je rezervním polysacharidem a zásobárnou živin pro klíček v době jeho klíčení. Ve zralém zrně je škrob zastoupen výlučně v endospermu, ve formě malých a velkých škrobových zrn (Prugar, Hraška, 1989; Kosař, Procházka et al., 2000; Pelikán, Sáková, 2001).

Škrobová zrna se skládají z lineárních amylosových a větvených amylopektinových řetězců. Amylosa tvoří řetězce glukosových jednotek vázaných vazbami alfa-1,4 a základní složkou je disacharid maltosa. Amylopektin se skládá z glukosových jednotek vázaných vazbami alfa-1,4 a alfa-1,6 (Prugar, Hraška, 1989; Basařová et al., 2010).

Nízkomolekulární sacharidy jsou zastoupeny hlavně sacharosou a rafinosou, dále pak maltózou, glukosou a fruktosou, které jsou obsaženy ve stopovém množství.

V zrně ječmene se nachází dále neškrobové polysacharidy a to hlavně celulósa, hemicelulósa, lignin a gumovité látky (Basařová et al., 2010).

Obilka	
Sacharidy	
škrob [%]	60 – 65
(amylosa 17–24 % škrobu)	
(amylopektin 76–83 % škrobu)	
nízkomolekulární sacharidy	
sacharosa [%]	1 – 2
ostatní cukry [%]	1
rafinosa	0,3 – 0,5
maltosa	0,1
glukosa	0,1
fruktosa	0,1
neškrobnaté polysacharidy	
hemicelulósy:	
β-glukany [%]	3,3 – 4,9
pentosany [%]	9,0
celulósa [%]	4 – 7
Tuky [%]	3,5
Fosfáty	
fytin [%]	0,9
Polyfenoly [%]	0,1 – 0,6
Dusíkaté látky [%]	9,5 – 11,9 (7 – 18)
rozpuštěné dusíkaté látky [%]	1,9
albuminy a globuliny	3,5
hordeiny (prolaminy)	3 – 4
gluteliny	3 – 4
Minerální látky [%]	2

Tab. 1: Chemické složení obilky ječmene (Kosař, Procházka et al., 2000).

2.1.2.2. Lipidy

Jako lipidy jsou označovány tuky rozpustné v etheru a jsou zastoupeny především v aleuronové vrstvě, v pluchách a asi jedna třetina z celého množství je v klíčku (Kosař, Procházka et al., 2000). Lipidy tvoří heterogenní skupinu látek

s hydrofobními vlastnostmi a během procesu sladování působí jako zdroj energie. Mezi významné lipidy patří mastné kyseliny, acylglyceroly, fosfolipidy, lipoproteiny a lipopolysacharidy.

Největší význam pro kvalitu piva mají mastné kyseliny, které negativně ovlivňují stabilitu pěny a chuti piva (Basařová et al., 2010; Pelikán, Sáková, 2001).

2.1.2.3. Fosfáty

Fosfáty ječmene jsou asi z poloviny tvořeny fytinem. Fytin je ester kyseliny fosforečné a inositolu. Vyskytuje se v pluchách ve formě vápenato-hořečnaté soli. Fosfáty mají důležitý fyziologický význam pro klíček. Podílejí se na udržování pH při klíčení, dále udržují optimální pH v mladině a v pivu (Kosař, Procházka et al., 2000).

2.1.2.4. Polyfenoly

Polyfenoly jsou třísloučinné látky, které se nacházejí zejména v obalových částech zrna a v aleuronové vrstvě (Kosař, Procházka et al., 2000). Polyfenolické látky se dělí na jednoduché fenoly, fenolové kyseliny barevné flavonoidy, bezbarvé flavonoidy, kondenzované a další polymerní polyfenoly, kumariny a chinony (Basařová et al., 2010). Řada polyfenolů působí jako inhibitory klíčení a při máčení ječmene se částečně vyluhují (Kosař, Procházka et al., 2000; Pelikán, Sáková, 2001).

2.1.2.5. Dusíkaté látky

Dusíkaté látky lze rozdělit na dusíkaté látky nebílkovinné povahy (dusíkaté báze, složky fosfatidů, amidy a amonné soli) a na dusíkaté látky typu bílkovin a jejich štěpných produktů (aminokyseliny, peptidy a bílkoviny) (Kosař, Procházka et al., 2000).

Za optimum pro sladovnický ječmen se považuje obsah dusíkatých látek vyjádřený jako obsah bílkovin (N x 6,25) v rozmezí 10-11,5 %. Obsah bílkovin je

nejdůležitější ukazatel hodnoty sladovnického ječmene (Pelikán, Sáková, 2001). Podle molekulových hmotností, chemických a fyzikálně-chemických vlastností jsou bílkoviny ječmene heterogenní směsí protoplazmatických (albuminy a globuliny) a zásobních (prolaminy a gluteliny) složek, které dělíme většinou do čtyř skupin (Prugar, Hraška, 1989):

- Albuminy

Albuminy jsou vysokomolekulární bílkoviny rozpustné ve vodě a ve slabých roztocích solí. Jejich relativní molekulová hmotnost M_r je v průměru 70000, izoelektrický bod leží mezi 4,6 až 5,8. Z celkového obsahu bílkovin se obsah albuminu v ječmeni pohybuje od 11 do 12,1 % (Prokeš, 2000). Ječný albumin se nazývá leucosin. V průběhu sladování se silně štěpí a jeho štěpné produkty přispívají k trvanlivosti pивní pěny (Prugar, Hraška, 1989).

- Globuliny

Globuliny jsou bílkoviny nerozpustné ve vodě. Jsou rozpustné v roztocích solí. Jejich koagulace probíhá při teplotě 90 °C. Dělíme je na α -globulin, β -globulin, γ -globulin a δ -globulin. Izoelektrický bod leží v rozmezí pH 4,9 až 5,7 (Prokeš, 2000). Ječný globulin se nazývá edestin (Prugar, Hraška, 1989) a jeho celkový obsah je uváděn v hodnotách od 8,4 % do 15 %. Globuliny nejsou vysráženy ani dlouhým varem a jsou původci chladového zákalu piva (Prokeš, 2000).

- Prolaminy

Prolaminy se nacházejí převážně v aleuronové vrstvě ječmene (Prugar, Hraška, 1989). Jsou nerozpustné ve vodě a v roztocích solí, zato jsou rozpustné v 50-90 % ethanolu. Jsou značně heterogenní, tvoří až 37 % celkového obsahu bílkovin a v průběhu procesu sladování se štěpí až z 50%. Od ostatních bílkovinných frakcí se prolaminy liší vysokým obsahem glutamové kyseliny a prolinu. Základní prolamin ječmene se nazývá hordein.

Hordeiny jsou příčinou vratných i nevratných zákalů piva a jejich obsah v zrně ječmene kolísá v rozmezí 25 až 37 % (Prokeš, 2000; Prugar, Hraška, 1989). Hordeiny jsou hlavními zásobními bílkovinami ječmene, složené z polymorfní směsi

několika složek oddělitelných např. elektroforézou na polyakrylovém gelu. Jejich elektroforetický obraz je geneticky determinovaný a charakteristický pro každou odrůdu ječmene (Čížková, 2006; Prugar, Hraška, 1989).

Existují tři základní skupiny prolaminů, které jsou značeny jako S-rich (na síru bohaté), S-poor (na síru chudé) a HMW (vysokomolekulární) prolaminy (Shewry, Halford, 2002). S-rich prolaminy mají vysoký obsah glutaminu s prolinem a relativně vyšší zastoupení cysteinu. Mezi S-rich prolaminy se řadí B-hordeiny, které zaujímají 80 % celkového množství prolaminů zrna ječmene. S-poor prolaminy se vyznačují nedostatkem cysteinu a obsahují velmi malé množství metioninu a lysinu. Řadíme sem monomerní C-hordeiny. HMW prolaminy jsou známé svým bohatým obsahem lysinu, glutaminu a prolinu. Do kategorie HMW prolaminů spadají D hordeiny (Kumar, Matta, 2011).

- Gluteliny

Kvůli vlastní nerozpustnosti bílkovin ve vodě a odolnosti vůči štěpné aktivitě enzymů se gluteliny do piva vůbec nedostávají a odcházejí z pivní výroby s mlátem (Prokeš, 2000). Gluteliny jsou rozpustné v alkáliích. Byly prokázány 4 formy. Obsah glutelinů v ječmeni kolísá v rozmezí 30 až 54,5 % z celkového obsahu bílkovin. Jsou nejméně prozkoumané (Prokeš, 2000).

2.1.2.6. Minerální látky

Minerální látky jsou v zrně ječmene zastoupeny zejména P, Si, K a Mg, dále jsou pak přítomny Ca, Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Al a Mo (Prugar, Hraška, 1989). Mají důležitou funkci při klíčení, rmutování a jsou nepostradatelné i v hotovém pivu (Pelikán, Sáková, 2001).

2.1.3. Hodnocení jakosti

Nejdůležitější využití jarního ječmene v ČR je na sladovnické účely. Sladovnická jakost představuje komplexní ukazatel vyjadřující úroveň a vyrovnanost

jednotlivých sledovaných sladovnických parametrů. Sladovnická jakost je hodnocena pomocí Ukazatele sladovnické jakosti (USJ) (ÚKZUZ, 2012).

V rámci USJ jsou hodnoceny následující technologické znaky:

- Extrakt
- Relativní extrakt při 45 °C
- Kolbachovo číslo
- Diastatická mohutnost
- Dosažitelný (konečný) stupeň prokvašení
- Friabilita (křehkost)
- Beta-glukany ve sladině

Požadavky na zrno ječmene setého jako zemědělského výrobku určeného na výrobu pivovarského sladu stanovuje norma ČSN 46 1100-5 (platná od 1. 1. 2006 (ÚKZUZ, 2012).

2.2. Sladování

2.2.1. Posklizňová úprava zrna

Mezi hlavní posklizňové úpravy se zařazuje především předčištění a třídění zrna. Je nutné odstranit veškeré hrubé části, zelené zbytky, ostatní nečistoty a poté zrno dosušit a dočistit. Následuje třídění zrna na přední zrno, které se používá na přípravu sladu a na tzv. zadinu (Černý et al., 2007).

2.2.2. Máčení

Zrno ječmene se pere za účelem zbavení nečistot a prachu. Poté se máčí v nádržích (náduvnících). Cílem máčení zrna je zvýšení vlhkosti v obilce z 12 % na

45 %, aby mohlo započít klíčení (Výroba sladu, 2013). Dnes se máčení považuje za nejdůležitější úsek ve výrobě sladu, který pak rozhoduje o budoucí kvalitě sladu.

2.2.2.1. Teorie

K máčení by se měla používat čistá voda, maximální tvrdosti do 6,25 mmol.l⁻¹ (35 °N) a neutrální reakce. Nevhodné jsou vody s velkým obsahem organických látek, sloučenin Fe a Mn (Kosař, Procházka et al., 2000). Žádné jiné zvláštní požadavky na máčecí vodu nejsou, měla by však být v pitné kvalitě (Eßlinger, Narziß, 2009). Voda vniká do zrna především embryem, okolím embrya zrna, později semipermeabilním systémem blan oplodí a osemení. Příjem vody probíhá nejprve velmi rychle a s postupem času se výrazně zpomaluje, neboť začnou bobtnat škrobnaté a koloidní látky endospermu.

Příjem vody je závislý na době máčení, teplotě vody, době odležení ječmene, pohybu zrna ve vodě, velikosti zrna, odrůdě ječmene a také na ročníku (Kosař, Procházka et al., 2000). S rostoucím obsahem vody se zahajuje intenzivnější dýchání ječmene. Tento proces vyžaduje kyslík, který musí být v dostatečné míře dodáván v průběhu celého období máčení (Eßlinger, Narziß, 2009).

2.2.2.2. Technologie

V současné době se nejvíce využíváný postup vzdušného máčení a má tyto fáze:

1. namočení – na 30 % obsahu vody, tj. 2–6 h pod vodou v závislosti na teplotě vody a stavu zrna (ročníku), následuje vzdušná přestávka 14–20 h.

2. namočení – na 38–40 % obsahu vody, tj. 6–10 h pod vodou, obvykle dle provozních možností a podmínek. Následuje vzdušná přestávka, která je nezbytná k obeschnutí ječmene, a během které se v závislosti na teplotě v náduvníku a v máčírně odsává oxid uhličitý.

3. namočení – na 42– 44 % obsahu vody, tj. 4–6 h pod vodou a 2–4 h okapávání ječmene. Ječmen se za sucha vymáčí nebo se s třetí vodou vymáčí přímo do pneumatických klíčidel.

Z dalších technologií máčení se používá záplavové máčení, opakované máčení, sprchové máčení a klasické máčení. Klasické máčení je opakem moderního vzdušného máčení, neboť doby namočení ječmene pod vodou jsou dlouhé a vzdušné přestávky jsou krátké.

Celkové ztráty při máčení by neměly překročit 3 % z hmotnosti namáčeného ječmene. Podílí se na nich prach a nečistoty (asi 0,1 %), vyloužení pluch (asi 0,8 %), splavky (0,1 až 1,0 %) a dýchání ječmene během máčení (0,5 až 1,5 %) (Kosař, Procházka et al., 2000).

2.2.2.3. Zařízení

Máčení probíhá v máčírňách, tzv. náduvnících. Nejběžněji používaným typem máčírny jsou kovové cylindrokónické náduvníky, které jsou vyráběny pro maximální objem do 50 tun namočeného ječmene s hloubkou do 6 m. Jsou vybaveny zařízením pro větrání tlakovým vzduchem pod vodou a pro odsávání oxidu uhličitého (Bamforth, 2004; Kosař, Procházka et al., 2000). Dalšími typy máčírny jsou tzv. Wildův náduvník a plochý náduvník (Kosař, Procházka et al., 2000).

2.2.3. Klíčení

Klíčení probíhá na humnech, kde je sledována teplota a relativní vlhkost. Zrno ječmene klíčí ve vrstvě 7–15 cm. V průběhu klíčení se aktivují enzymy, které změní vnitřní strukturu obilky, to znamená, že se porušením buněčné stěny částečně odbourá škrob a bílkoviny se začnou štěpit na jednodušší látky (Výroba sladu, 2013).

2.2.3.1. Teorie

Cílem sladařského klíčení je aktivace enzymového systému zrna, syntéza dalších enzymů a docílení požadovaných vnitřních přeměn zrna (rozluštění zrna) podle typu vyráběného sladu a při omezené vegetaci. Klíčení je fyziologický proces, při kterém se v zárodečné části zrna vyvíjejí zárodky kořínků a listů za využití zásobních látek endospermu (Slad, 2013).

- Aktivace a syntéza enzymů

S výjimkou α -amylasy, která není v ječmeni obsažena, jsou ostatní enzymy v malém množství již v ječmeni přítomny. Nárůst aktivity, resp. syntéza nových enzymů, je iniciován prostřednictvím činnosti fytohormonů. Tyto hormony se skládají z giberelové kyseliny a dalších příbuzných látek, které putují přes endosperm do aleuronové vrstvy. Zde vznikají nové volné aminokyseliny a nové enzymy. Nejprve vzniká β -glukanasa, poté α -amylasa a proteasy. Podmínkou pro syntézu nových enzymů a k nárůstu aktivity stávajících enzymů je zajištění dostatečného množství metabolické energie. Ta je získávána oxidačním odbouráváním zásobních látek (Bamforth, 2004).

- Vnitřní přeměna zrna

Proces klíčení zahajují hemicelulasy, které štěpí β -glukany a pentosany obsažené v buněčných stěnách ječmene, podílející se na jejich stavbě a pevnosti. Výsledek působení komplexu hemicelulas se projevuje cytolytickým rozluštěním sladu. Endosperm se stává kyprým a škrob je zpřístupněn pro působení amylas (Kosař, Procházka et al., 2000; Pelikán, Sáková, 2001).

Škrob je zdrojem energie pro zárodek a působením amylas je štěpen na jednoduché cukry za tvorby energie (Pelikán, Sáková, 2001). Rezervní dusíkaté látky uložené pod aleuronovou vrstvou jsou štěpeny proteasami na rozpustné nízkomolekulární štěpné produkty, čímž se zásadně změní celkové množství bílkovin. Nízkomolekulární produkty štěpení jsou za účinku enzymů v omezeném množství spotřebovány pro výživu zárodka a pro výstavbu nových buněk-kořínků a klíčku. Se zvyšujícím se dýcháním se zvyšuje činnost embrya, které pro provádění

svých životních funkcí a výstavbu nových buněk nezbytně potřebuje trvalý přísun energie (Bamforth, 2004).

2.2.3.2. Technologie

V technologii klíčení je nejdůležitější zajistit dostatečný obsah vody v zrně (44-48 % vody), aby došlo k požadované úrovni rozluštění, dále optimální teplotu (14–18 °C) z důvodu sušení zrna a nakonec vyvážený poměr kyslíku a oxidu uhličitého, aby nedocházelo k zbytečně velkým ztrátám prodychnutím zásobních látek (Slad, 2013). Konečným produktem klíčení zrna je zelený slad, který putuje na hvozdy.

Z hlediska teplotního průběhu rozeznáváme:

Klíčení při vzestupné teplotě – začíná na 12-16 °C a může stoupnout až na 20 °C. Tato technologie odpovídá přirozenému klíčení na humně a je méně energeticky náročná. Každým dnem se teplota klíčení zvyšuje přibližně o 1 °C

Klíčení při konstantní teplotě – u tohoto typu klíčení je usnadněno dýchání ječmene, což má za následek aktivnější metabolismus a větší růst. Teplota klíčení bývá kolem 14-15 °C a zůstává neměnná.

Klíčení při klesající teplotě – teplota se od druhého dne postupně snižuje při současném zvyšování obsahu vody v zrně (Eßlinger, Narziß, 2009; Kosař, Procházka et al., 2000).

2.2.3.3. Zařízení

Proces klíčení se odehrává ve sladovnách, které rozdělujeme na klasické a moderní (Kosař, Procházka et al., 2000). Klasický způsob klíčení sladovnického ječmene se provádí na humnech, kde jsou hladké podlahy s účinným větráním v prostorných místnostech. Humnové sladování vyžaduje hodně lidské práce a to hlavně při vedení hromad. V moderních sladovnách se častěji využívá pneumatické sladování na bubnových, skříňových, šachtových nebo horizontálních klíčidlech.

Přístup kyslíku je zajištěn systémem nuceného větrání klimatizovaným vzduchem, který prochází vrstvou klíčícího ječmene. Proces klíčení je z velké míry zautomatizován (Pelikán, Sáková, 2001).

2.2.4. Hvozdění

Hvozdění je závěrečnou fází výroby sladu. Zelený slad je na hvozdě nejprve předsušen při teplotách do 60 °C, následně pak vyhřát a dotažen při teplotách od 80 do 105 °C (Kosař, Procházka et al., 2000). Cílem hvozdění je snížit obsah vody na 4-5 % (u světlých sladů), zastavit vegetační pochody, redukovat část enzymové aktivity a vytvořit chuťové, barevné a oxidoredukční látky (Slad, 2013).

2.2.4.1. Teorie

Zelený slad má vysoký obsah vody a není skladovatelný. Je třeba vhodným teplotním zásahem zastavit působení enzymů, částečně určité skupiny enzymů inaktivovat, a zajistit podmínky pro reakce vedoucí k tvorbě chuťových a barevných látek. Aby byl získán slad se všemi požadovanými vlastnostmi, musí technologický proces na hvozdech probíhat pomaleji, než by trvalo běžné sušení. Teploty se zvyšují postupně. Rozeznáváme tři fáze sušení a hvozdění sladu (Pelikán, Sáková, 2001; Slad, 2013):

- Růstová fáze:

Teploty se pohybují kolem 40 °C a obsah vody v zrně klesá na 20 %. V této fázi probíhají všechny vegetační pochody včetně růstu kořínků a stěelky.

- Enzymatická fáze:

Teplota se pohybuje mezi 40-60 °C a vlhkost zrna se snižuje pod 20 %. Dochází k zastavení vegetačních procesů, enzymatická aktivita nadále přetrvává.

- Chemická fáze:

Probíhá při teplotách nad 60 °C a obsah vody klesá pod 10 %. Dochází k zastavení enzymových reakcí. Nadále však probíhají reakce chemické, které vedou k tvorbě barevných a chuťových látek (melaniny a melanoidy) (Pelikán, Sáková, 2001; Slad, 2013).

2.2.4.2. Technologie

Hlavní zásadou pro hvozdění světlého sladu (Plzeňského typu) je omezení nadměrného vzniku barevných a aromatických sloučenin, dále pak maximální uchování enzymové aktivity a křehkosti sladu. K dosažení tohoto cíle je nutné rychlé snížení obsahu vody v zeleném sladu vysokým tahem vzduchu (na 10-12 % při teplotách do 55 °C), pozvolné vyhřátí sladu a dokonalé dotažení sladu při teplotě max. 85 °C (Kosař, Procházka et al., 2000). Podle délky hvozdění rozlišujeme dva technologické způsoby hvozdění:

- Technologie 2 x 12 h:

Zelený slad se nastírá na horní lísku hvozdu v rovnoměrné vrstvě po celé ploše lísky. Výška vrstvy nastírání je závislá na typu sladu, konstrukci hvozdu, jeho tahu a výhřevnosti, době hvozdění, naklíčení (nárůstu) zeleného sladu, teplotě a relativní vlhkosti venkovního vzduchu. Slad se během hvozdění neobrací. Za 10-11 h dojde k proslápnutí horní lísky (po ukončení předsoušení sladu), ke snížení vláhý cca na 10–12 % a slad se spustí na dolní lísku. Slad se urovná a hvozdí dalších 11 h, přičemž musí proběhnout fáze vyhřátí sladu a fáze dotahování sladu. Po skončení hvozdění se spustí slad z dolní lísky do sladových košů (Kosař, Procházka et al., 2000).

- Technologie 2 x 24 h:

Tento způsob hvozdění není typický pro slady plzeňského typu, byl však v našich sladovnách dříve rozšířen pro nesporné ekonomické přednosti. Hvozdění musí probíhat za stejných technologických zásad jako technologie hvozdění 2 x 12 h. Na horní lísce musí proběhnout rychlé předsušení nastřeného zeleného sladu (při dostatku hvozdícího vzduchu při teplotách do 55 °C). Na spodní lísce musí

proběhnout šetrné vyhřátí na dotahovací teplotu a dokonalé dotažení sladu při teplotách 80–85 °C (Kosař, Procházka et al., 2000).

2.2.4.3. Zařízení

Zelený slad se hvozdí na hvozdech. Podle počtu lísek dělíme hvozdy na jedno-, dvou- a třílískové. Dalšími typy hvozdů jsou hvozdy skříňové, kruhové a kontinuální (Pelikán, Sáková, 2001).

2.2.5. Úprava odsušeného sladu

Po odhvozdění sladu se odstraňuje sladový květ. Sladový květ představují suché kořínky a přerostlé střílky. Od zrna sladu se oddělí na odkličovače, částečně také již při hvozdění odrolením a propadem do podlísčí (Slad, 2013). Dále se slad leští, zbavuje prachu, poškozených zrn a zrna se dodává lesk. Za vhodných podmínek je možné slad skladovat až 2 roky (Pelikán, Sáková, 2001).

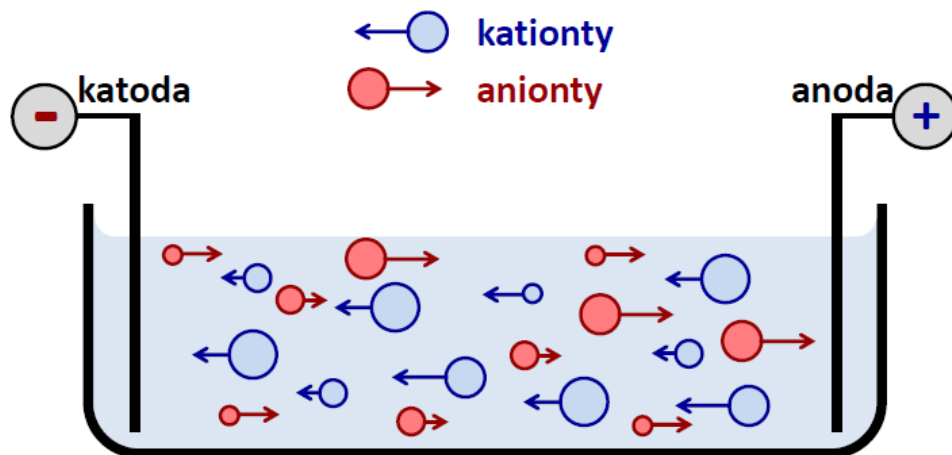
2.3. Elektroforéza

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul ve stejnosměrném elektrickém poli (Rosypal, Doškař, 1997). Kladně nabité částice (kationty) se pohybují ke katodě a záporně nabité částice (anionty) putují k anodě (viz obr. 2.).

Různé molekuly mohou být při určitém pH různě nabitě. Nabitě molekuly se pohybují v elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu závisí na velikosti a tvaru molekul. Při elektroforéze se využívá rozdílu rychlosti pohybu molekul, s tím že nejrychleji pohybující jsou malé nevětvené molekuly.

Na vhodném podkladu lze pak různé molekuly od sebe elektroforeticky oddělit a tak stanovit, zda se hledaná látka ve vzorku vyskytuje popřípadě v jakém

množství. Jednotlivé látky lze poté i izolovat (část gelu se s danou látkou oddělí) (Berger, 1996).



Obr. 2: Pohyb kladně a záporně nabitých iontů (Šiman, 2013)

2.3.1. Rozdělení

Snaha o dosažení co nejlepší separace vedla k vypracování značného množství různých technik a jejich modifikací, které můžeme shrnout do 4 základních skupin (Bílková, 1997):

- Volná elektroforéza

Volná elektroforéza neboli elektroforéza s pohyblivým rozhraním je v dnešní době považována spíše za historickou metodu, která byla nahrazena ostatními elektroforézními technikami. Slouží pouze jako hrubé rozdělení kationtů a aniontů ze směsi (Šiman, 2013). Ve volné technice se elektroforéza provádí ve vodných roztocích pufrů a částice putují směrem k elektrodě s opačnou polaritou rychlostmi, které jsou úměrné velikosti jejich náboje (Bílková, 1997).

- Zónová elektroforéza

Zónová elektroforéza je vhodná k rozdělení makromolekulárních iontů dle jejich pohyblivosti v daném prostředí (Šiman, 2013). Vzorek bývá aplikován v malém

množství na nosič, na kterém se díky působení elektrického proudu rozdělí do jednotlivých zón (Rosypal, Doškař, 1997). Jako nosič můžeme použít chromatografický papír, agarosový gel, agarový gel, acetát celulosy, škrob nebo polyakrylamidový gel (Elektroforéza, 2000). Hlavní výhodou zónové elektroforézy je jednoduchost provedení, nevýhodou pak nízké rozlišení a případné rozmývání skvrn. Nejčastějším nosičem bývá gel a nejčastější technikou gelová elektroforéza, ať už ve vodorovném či plošném uspořádání (Šiman, 2013).

- Izoelektrická fokusace

Principem izoelektrické fokusace je dělení látek podle jejich náboje v gradientu pH. Základním předpokladem je vytvoření stabilního a spojitého gradientu pH. Látky se zastaví v místě, kde se jejich izoelektrický bod rovná pH v gelu (Elektromigrační metody, 2012). Každá molekula je tedy fokusována do úzké zóny kolem svého izoelektrického bodu. Tímto způsobem je možno od sebe oddělit molekuly, jejichž izoelektrický bod se liší o 0,001 jednotky pH (Bílková, 1997). Hlavní výhodou izoelektrické fokusace tkví v přesnosti určení izoelektrického bodu amfoterních látek (Šiman, 2013).

- Kapilární elektroforéza

Jedná se o alternativní metodu separace fragmentů DNA, která má tyto výhody: minimální spotřebu vzorku (1-2 nl o koncentraci 5-50 mg/l), rychlost a snadnou vizualizaci. Separace probíhá v lineárním hydrofilním polymeru v kapiláře (vnitřní průměr 25-50 μ m, délka několik cm až 1 m) a elektroforetickém pufru podle molekulové hmotnosti. K zařízení je připojena přímá detekce měřením absorbance při 260 nm a typická analýza trvá méně než 20 minut (Elektroforetické metody, 1998).

2.3.2. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. Separace molekul je založena na gelové filtraci a na elektroforetické pohyblivosti dělených látek. Gel tvoří trojrozměrnou síť s póry,

které slouží jako molekulové síto (Voet, Voet, 1995). Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin či bílkovin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou. Polyakrylamid s agarózou vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivňovat složením roztoku a koncentrací polymeru. Agaróзовые gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od několika set bp až po zhruba 50 kb, zatímco polyakrylamidové gely se používají k separaci menších molekul (10-1000 bp) (Rosypal, Doškač, 1997).

K nejrozšířenějším elektroforetickým technikám v současnosti patří elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE), která se využívá především v analytice bílkovin. Pro analýzu prolaminů se nejběžněji používá technika elektroforézy v polyakrylovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS) (Bradová et al., 2011).

2.3.2.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE)

Polyakrylamidový gel je jedním z nejčastějších elektroforetických médií v molekulární biologii. Polyakrylamidové gely vznikají katalytickou polymerizací dvou monomerů, akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu (bis). Gel je tvořený dlouhými vlákny polymerizovaného akrylamidu, navzájem spojeného vlákny bisakrylamidu (Hulák, 2008).

Gelem prochází stejnosměrný proud o napětí asi 300 V po dobu, které je potřebné k rozdělení makromolekulárních látek do řady jednotlivých zón (30-90 min). Po rozdělení se gel z přístroje vyjme a jednotlivé zóny se vhodným způsobem zviditelní. Takto je možné získat z 0,1-0,2 mg směsi proteinů až 20 různých stripů (zón) (Voet, Voet, 1995).

Velikost pórů v gelu je dána přesným poměrem akrylamidu a bis. Čím je akrylamid koncentrovanější, tím jsou póry menší. Použitá koncentrace akrylamidu se liší podle velikosti fragmentů DNA od 3,5 % (fragmenty 1-2 kb) až po 20 % gely pro separaci malých fragmentů (fragmenty 10-100 bp) (Hulák, 2008).

Gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu se nejčastěji uplatňuje ve vertikální formě (deska je kolmá na podložku), existuje ale i horizontální varianta,

kdy je gelová deska umístěna v přístroji ve vodorovné poloze (Bílková, 1997). Technika se používá hlavně ke kvalitativní charakterizaci bílkovin v biologických přípravcích, ke kontrole čistoty a ke kvantitativnímu stanovení (Elektroforéza, 2000).

Nevýhodou PAGE je použitý akrylamid, který je karcinogenní, neurotoxický a má kumulativní účinek.

Elektroforézu na polyakrylamidové gelu lze rozdělit na nedenační (nativní) PAGE a denační (SDS-PAGE).

- Nativní PAGE

Při nativní PAGE není vzorek denaturován denačními činidly. Proteiny se oddělují podle typu a velikosti náboje a na základě tvarové odlišnosti (Hames, Rickwood, 1987).

- SDS-PAGE

Elektroforéza je prováděna v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti denačního činidla dodecylsulfátu sodného (SDS). Bílkoviny jsou denaturovány varem a následně děleny elektroforesou v přítomnosti detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS) (Voet, Voet, 1995).

SDS je anionaktivní detergent, který nese poměrně vysoký náboj, který ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin, a ty se pohybují v gelu jen na základě odlišné velikosti molekul. Následná separace je tedy závislá výhradně na molekulové hmotnosti a funguje na principu gelové filtrace.

SDS-PAGE je běžně užívána ke stanovení molekulové hmotnosti bílkovin porovnáním jejich pohyblivosti v gelu s pohyblivostí standardů o známé relativní molekulové hmotnosti (Vodrážka, 2002). Úskalím metody je rizikovost používaných chemikálií. Akrylamid a bisakrylamid jsou neurotoxické látky, se kterými je nutno pracovat vždy s co největší opatrností (Bradová et al., 2011).

3. Cíle práce

Cíle bakalářské práce byly dle zadání následující:

- Získání sladu ze sladovny v různých výrobních fázích (počáteční stav, po klíčení, po hvozdní) resp. příprava jeho imitace pro obdobné fáze výroby.
- Mechanická úprava vzorků a extrakce proteinů pomocí denaturačního extrakčního pufu.
- Analýza získaných vzorků na gelové denaturační elektroforéze (SDS-PAGE) nebo na čipové elektroforéze.
- Digitalizace sušených gelů a vyhodnocení získaných dat pomocí specializovaného software.
- Zpracování dat do tabulek, obrázků či grafů, statistické vyhodnocení získaných dat.

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál pro hodnocení změn bílkovinných profilů zrna ječmene

Byly získány tři odrůdy jarního ječmene (*Hordeum vulgare L.*) – Sebastian, Radegast a Heris.

- Sebastian

Sladovnická odrůda s výběrovou sladovnickou jakostí, preferovaná většinou sladoven. Výnos předního zrna je v obilnářské oblasti středně vysoký až vysoký, v ošetřené variantě v kukuřičné oblasti a v obou variantách v řepařské a v bramborářské oblasti středně vysoký, v neošetřené variantě v kukuřičné oblasti nízký. Rostliny jsou nízké, méně odolné proti polehání. Zrno je středně velké až malé, podíl předního zrna je středně vysoký (ÚKZÚZ, 2012).

- Radegast

Sladovnická odrůda, požadovaná mnohými sladovny. Je doporučena Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva. Výnos předního zrna v neošetřené variantě je v jednotlivých oblastech středně vysoký až vysoký, v ošetřené variantě středně vysoký až nízký. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké, středně odolné vůči polehání. Zrno je středně velké, podíl předního zrna je vysoký (ÚKZÚZ, 2012).

- Heris

Polopozdní nesladovnická odrůda, vhodná pro krmné účely. V neošetřené variantě pěstování má ve všech oblastech výnos zrna středně vysoký, v ošetřené variantě nízký. Rostliny jsou středně vysoké, středně odolné proti polehání. Zrno je velké, podíl předního zrna je vysoký. Odrůda disponuje dobrým zdravotním stavem (ÚKZÚZ, 2007).

4.1.1. Příprava sladu

Zrno bylo připravováno v laboratorních podmínkách tak, aby se získal dostatečný počet vzorků ze všech čtyř fází přípravy sladu. Prvním typem vzorku je zrno před namáčením. Dále bylo zrno 60 hodin máčeno, čímž jsme získali druhý typ vzorku – zrno po namočení. Proces máčení probíhal v šesti 10 hodinových cyklech složených z 6 hodinového máčení a 4 hodinové provzdušňovací přestávky. Následující fáze klíčení trvala 72 hodin a po jejím dokončení jsme získali třetí typ vzorku – zrno po klíčení. Čtvrtý a poslední vzorek byl odebrán po imitaci hvozdění. Tento krok probíhal v sušárně při postupném navyšování teploty na 40, 50, 60 a 80 °C.

4.1.2. Příprava vzorků

Získali jsme tři odrůdy jarního ječmene (H, R, S) ve čtyřech fázích sladovacího procesu (varianty A, B, C, D). Od každé odrůdy byl odebrán z každé ze čtyř variant směsný vzorek (ve dvou opakováních) a vzorek pro zjištění variability zrna (5 x 1 zrno z každé ze čtyř variant). Následně bylo zrno rozdrobeno kladívkem, směsný vzorek pomocí laboratorního mlýnu a materiál vložen do označených 1,5 ml eppendorf tub.

4.1.3. Značení vzorků

Směsné vzorky byly značeny třemi písmeny a číslicí. První písmeno značí odrůdu, druhé upozorňuje, že se jedná o směsný vzorek, třetí popisuje variantu zrna a číslice udává počet opakování.

HSA1, HSA2, HSB1, HSB2, HSC1, HSC2, HSD1, HSD2

RSA1, RSA2, RSB1, RSB2, RSC1, RSC2, RSD1, RSD2

SSA1, SSA2, SSB1, SSB2, SSC1, SSC2, SSD1, SSD2

Jednozrnné vzorky pro zjištění variability byly označeny dvěma písmeny a jednou číslicí. První písmeno ve zkratce udává odrůdu, druhé variantu a číslice počet opakování.

HA1, HA2, HA3, HA4, HA5

HB1, HB2, HB3, HB4, HB5

HC1, HC2, HC3, HC4, HC5

HD1,HD2, HD3, HD4, HD5

RA1, RA2, RA3, RA4, RA5

RB1, RB2, RHB3, RB4, RB5

RC1, RC2, RC3, RC4, RC5

RD1,RD2, RD3, RD4, RD5

SA1, SA2, SA3, SA4, SA5

SB1, SB2, SB3, SB4, SB5

SC1, SC2, SC3, SC4, SC5

SD1,SD2, SD3, SD4, SD5

Odrůdy: H – Heris, R – Radegast, S – Sebastian

Varianty: A – zrno před máčením, B – zrno pro máčení, C – zrno po klíčení, D – zrno po imitaci hvozdění

4.2. Metodika hodnocení změn bílkovinných profilů SDS-PAGE

4.2.1. Hmotnost tisíce semen (HTS)

Hmotnost tisíce semen (HTS) byla měřena u tří odrůd jarního ječmene (Heris, Sebastian, Radegast) ve fázích zrna a ve fázích hotového sladu. Měření bylo prováděno manuálně a ve čtyřech opakováních pro jednu odrůdu a jeden stav obilky.

4.2.2. Extrakce bílkovin

Bylo naváženo asi 50 mg vzorku a přidáno 500 μ l extrakčního pufru. Extrakce probíhala při 4°C po dobu 4 hodin, poté byla provedena centrifugace (4°C, 10 000 rpm) po dobu 15 minut. Supernatant byl přepipetován do nových 1,5 ml eppendorf tub a uchován ve zmraženém stavu.

Složení extrakčního pufru:

0,0625M Tris-HCl (pH=6,8) + 2 % SDS (dodecylsírán sodný) + 5 % BME (Merkaptoethanol)

4.2.3. Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Po vyextrahování bylo do nových 1,5 ml eppendorf tub přidáno 20 μ l směsných vzorků, 20 μ l destilované vody a 10 μ l nanášecího pufru (složení nanášecího pufru viz příloha č. 3). Jednotlivé vzorky pro kvantitativní stanovení byly neředěné a k 40 μ l vzorku se přidalo pouze 10 μ l nanášecího pufru. Vzorky se před nanesením na gel vařily tři minuty. Na elektroforézu se poté nanesla nanáška 15 μ l od každého směsného vzorku a 20 μ l nanáška od jednotlivých vzorků pro kvantitativní stanovení.

Složení pro 5 ml nanášecího pufru:

5 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8) + 2,3 g SDS + 10 ml glycerolu + 5 mg BCP

4.2.4. Elektroforetická separace (SDS-PAGE)

Analýza proteinů byla provedena na vertikální SDS-PAGE v prostředí Tris-Glycinového pufru. Gel byl připraven s diskontinuálním uspořádáním matrice (složení viz příloha č. 1). Elektroforéza probíhala při 200 V po dobu cca 4 hodin v prostředí vanového pufru. Poté se gel obarvil v Coomassie barvivu, odbarvil v odbarvovacím pufru a zafixoval (složení roztoků viz příloha č. 2). Takto upravený gel se sušil na skleněných destičkách zabalený v celofánu. Po usušení se gel převedl do digitální formy a zpracoval se pomocí digitální obrazové analýzy.

5. Výsledky

5.1. Hmotnost tisíce semen (HTS)

HTS byla měřena u tří odrůd jarního ječmene (Heris, Sebastian, Radegast) ve fázích zrna a ve fázích hotového sladu. Výsledky měření jsou zaznamenány v tabulce číslo 2.

Tab. 2: Hodnoty HTS zrna a sladu

<i>Odrůda</i>	<i>Stav obilky</i>	<i>HTS</i>
Heris	zrno	41,6
Heris	zrno	41,9
Heris	zrno	43,2
Heris	zrno	42,6
Heris	slad	38,5
Heris	slad	38,8
Heris	slad	39,6
Heris	slad	38,7
Radegast	zrno	52,1
Radegast	zrno	49,2
Radegast	zrno	51,2
Radegast	zrno	48,5
Radegast	slad	45,4
Radegast	slad	45,8
Radegast	slad	45,1
Radegast	slad	45,5
Sebastian	zrno	45,1
Sebastian	zrno	45,1
Sebastian	zrno	44,5
Sebastian	zrno	45,9
Sebastian	slad	40,4
Sebastian	slad	39,4
Sebastian	slad	38,9
Sebastian	slad	41,6

U HTS bylo provedeno statistické zpracování naměřených dat ve specializovaném softwaru STATISTICA 9 v podobě metody ANOVA (tab. 3) a Fisherova testu (tab. 4). Na základě Fisherova testu můžeme prokázat rozdíly HTS zrna a hotového sladu.

Tab. 3: Dvoufaktorová ANOVA

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	45815,08	1	45815,08	50764,63	0,000000
odrůda	223,50	2	111,75	123,82	0,000000
stav obilky	117,93	1	117,93	130,67	0,000000
odrůda*stav obilky	3,13	2	1,56	1,73	0,205184
Error	16,25	18	0,90		

Tab. 4: Test středních hodnot (Fisher LSD test)

odrůda	stav obilky	průměr	
Sebastian	zrno	45,15	b
Sebastian	slad	40,08	d
Radegast	zrno	50,25	a
Radegast	slad	45,45	b
Heris	zrno	42,33	c
Heris	slad	38,90	d

Rozdílná písmena v tabulce číslo 4 indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$. Hmotnost tisíce semen zrna je v průměru o 9,7 % vyšší než hmotnost tisíce semen hotového sladu. Nejnižší hmotností změnu zrna (8,1 %) vykazovala nesladovnická odrůda Heris, naopak nejvyšší rozdíl (11,4 %) byl zaznamenán u odrůdy Sebastian. Odrůda Radegast ztratila na hmotnosti tisíce semen během sladování 9,6 %.

5.2. SDS-PAGE

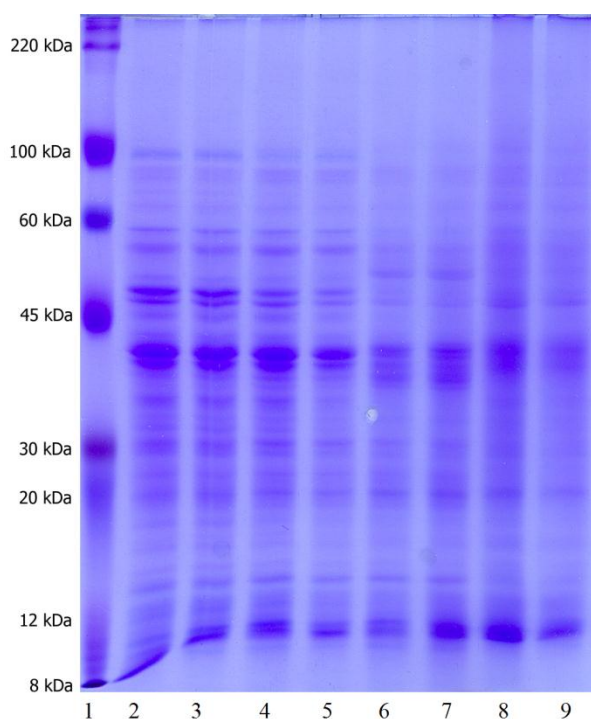
Byla provedena elektroforetická separace směsných a jednozrnných vzorků. Směsné vzorky pokrývají vnitroodrůdovou odlišnost a jsou brány jako vzorky reprezentativní. U jednozrnných vzorků byla ověřována variabilita jednotlivých zrn, čímž je myšleno zejména hodnocení variability v rámci odrůdy a jednotlivých variant.

5.2.1. Směsné vzorky

Na obrázcích číslo 3, 4, 5 je možné pozorovat změny v průběhu procesu sladování. Nejvíce jsou patrné degradace proteinových pruhů, které podle své molekulové hmotnosti odpovídají pruhům, které jsou literárně označovány jako hordeiny A, B, C a D (Kumar, 2011). Na druhou stranu po fázi máčení můžeme zpozorovat objevení nových pruhů či nárůst starých a to zejména v oblasti kolem 15 kDa, 20 kDa, 28 kDa, 31 kDa, 50 kDa a 70 kDa. Pro každou odrůdu je typické jiné umístění a intenzita pruhů.

U sladovnických odrůd Sebastian a Radegast (obr. 4, 5) můžeme pozorovat změny ve fázi zrna po hvozdění odlišné od nesladovnické odrůdy Heris viz obr. 3. V této fázi dochází u sladovnických odrůd k zintenzivnění nově vytvořených majoritních pruhů zejména v oblastech o molekulové hmotnosti asi 20 kDa a 40 kDa, zatímco u nesladovnické odrůdy v těchto oblastech pruhy spíše ztrácí na intenzitě.

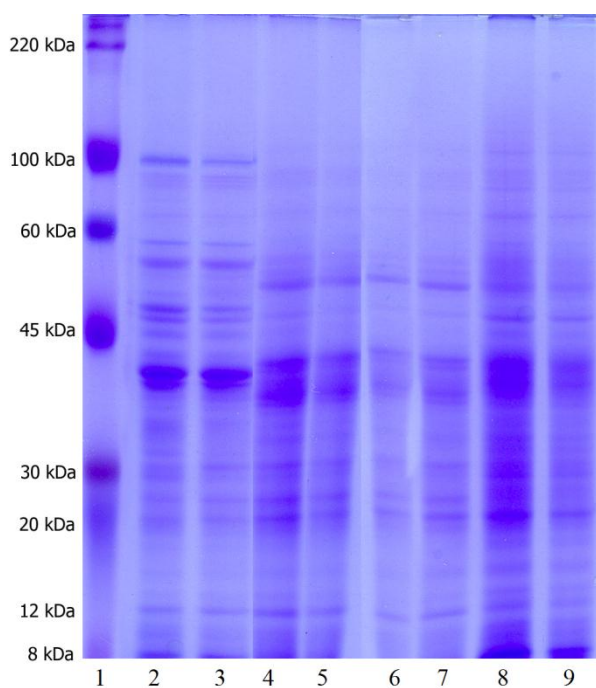
Obr. 3: Bílkovinný profil směšného vzorku nesladovnické odrůdy Heris



Legenda:

- 1 – marker
- 2, 3 – zrno před máčením
- 4, 5 – zrno po máčení
- 6, 7 – zrno po klíčení
- 8, 9 – zrno po hvozdění

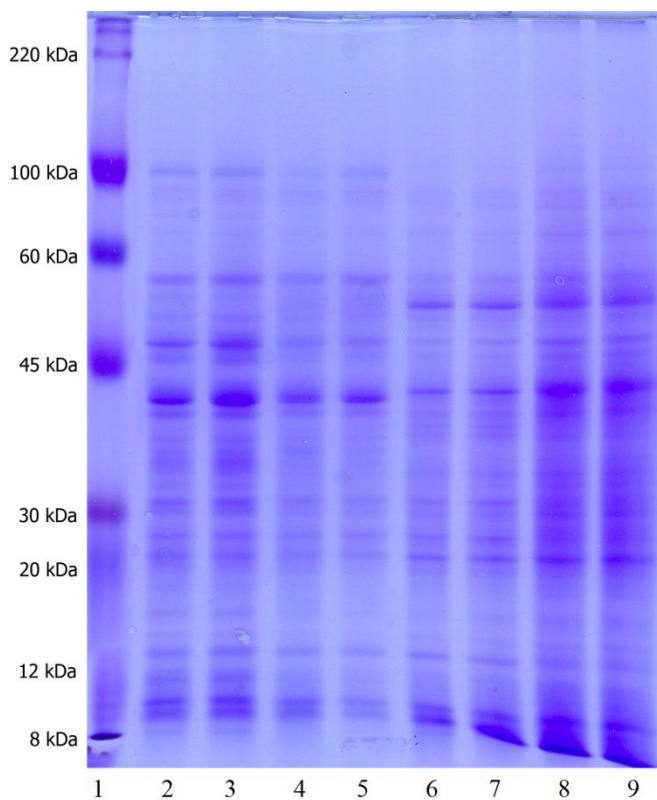
Obr. 4: Bílkovinný profil směsného vzorku sladovnické odrůdy Radegast



Legenda:

- 1 – marker
- 2, 3 – zrno před máčením
- 4, 5 – zrno po máčení
- 6, 7 – zrno po klíčení
- 8, 9 – zrno po hvozďení

Obr. 5: Bílkovinný profil směsného vzorku sladovnické odrůdy Sebastian



Legenda:

- 1 – marker
- 2, 3 – zrno před máčením
- 4, 5 – zrno po máčení
- 6, 7 – zrno po klíčení
- 8, 9 – zrno po hvozďení

5.2.2. Jednozrnné vzorky

Analýzou SDS-PAGE bylo zaznamenáno ve fázi zrna 28 pruhů u odrůdy Heris (obr. 6), 30 pruhů u odrůdy Radegast (obr. 7) a asi 29 pruhů u odrůdy Sebastian (obr. 8). Největší meziodrůdová variabilita ve fázi před máčením byla pozorovaná v oblastech 60-105 kDa a 45-60 kDa.

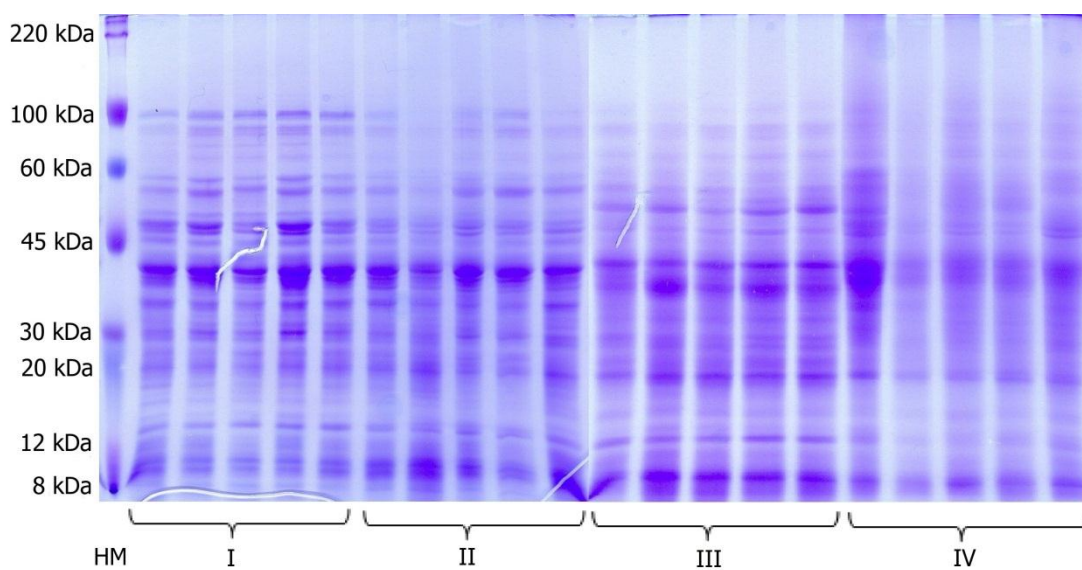
Na úrovni odrůdy byly u všech tří vzorků pozorovány změny hlavně ve fázi zrna po klíčení, kde se vytvořily nové pruhy v rozmezí molekulové hmotnosti 41-53 kDa a téměř zanikly pruhy v oblastech 40 kDa a 55 kDa, zatímco na úrovni jednotlivých variant (pětic vzorků) můžeme pozorovat změny hlavně v intenzitě pruhů, které jsou dány variabilitou zrna v rámci odrůdy. Změny v intenzitě pruhů na úrovni jednotlivých variant (pětic vzorků) jsou hlavním rozdílem mezi jednozrnnými a směsnými vzorky. U směsných vzorků variabilita v rámci jednotlivých variant nebyla pozorována.

Anomálie u vzorku zrna (varianta III, obr. 7), kde původní majoritní pruhy radikálně ztratily na intenzitě a naopak pruh v oblasti 20 kDa vykazuje intenzivní nárůst, může být vysvětlena například předčasným proteolytickým rozpadem zrna či faktem, že bylo zrno poškozeno.

Nejradikálnější změny můžeme pozorovat ve fázi zrna po klíčení, kde dochází stejně jako u směsných vzorků k tvorbě nových pruhů a zániku některých pruhů starých. Důsledkem proteolýzy dochází u odrůdy Heris (obr. 6) ve fázi hvozdění k ztrátám na intenzitě zabarvení pruhů. Pruhy se stávají špatně čitelné. U odrůd Radegast (obr. 7) a Sebastian (obr. 8) jsou pruhy také hůře čitelné, ale intenzita u nově vytvořených pruhů z fáze po klíčení spíše sílí.

V počátečních fázích zrna před a po máčení nerozlišujeme téměř žádné změny.

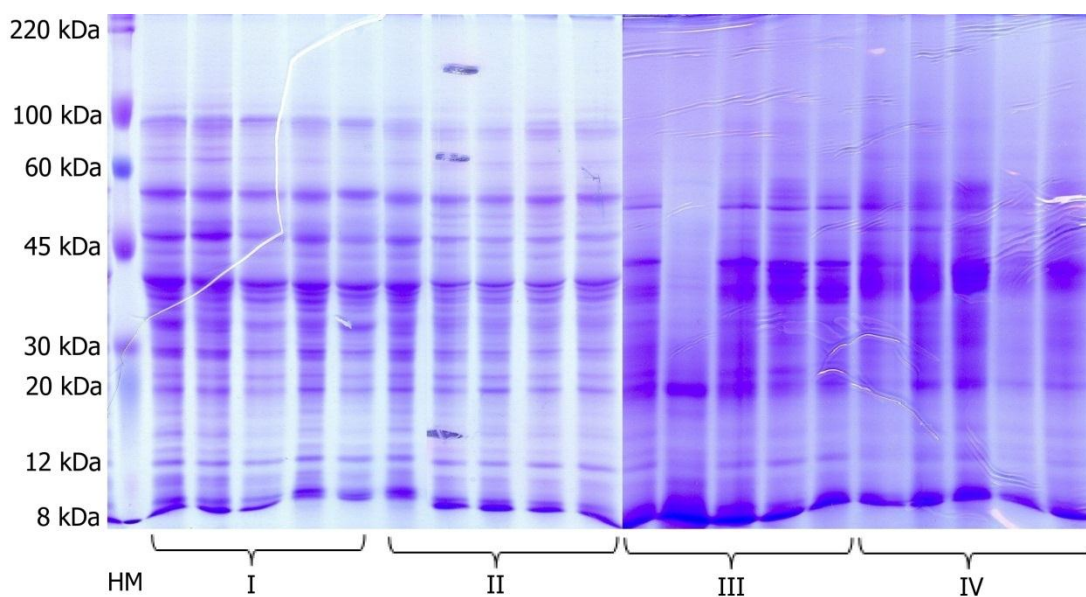
Obr. 6: Bílkovinný profil jednozrného vzorku nesladovnické odrůdy Heris



Legenda:

HM – hmotnostní marker; I – zrna před máčením; II – zrna po máčení; III – zrna po klíčení; IV – zrna po hvozdění

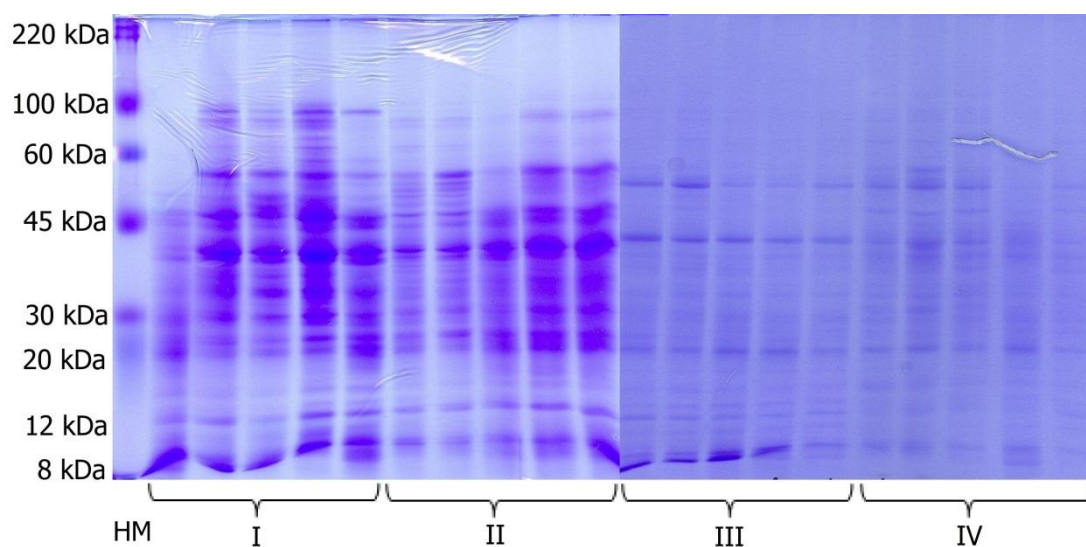
Obr. 7: Bílkovinný profil jednozrného vzorku sladovnické odrůdy Radegast



Legenda:

HM – hmotnostní marker; I – zrna před máčením; II – zrna po máčení; III – zrna po klíčení; IV – zrna po hvozdění

Obr. 8: Bílkovinný profil jednozrného vzorku sladovnické odrůdy Sebastian



Legenda:

HM – hmotnostní marker; I – zrno před máčením; II – zrno po máčení; III – zrno po klíčení; IV – zrno po hvozdění

6. Diskuze

Ač se jedná o vzorky pouze jednoletého pokusu výsledky analýzy vzorků SDS-PAGE jasně prokazují, že došlo v průběhu procesu sladování ke změnám spekter zásobních proteinů. Celus (2006) uvádí, že během sladování jsou bílkoviny ječmene degradovány na úroveň malých peptidů až aminokyselin řadou proteolytických enzymů. Tyto změny se vyznačují nízkou intenzitou zbarvení pruhů a můžeme je pozorovat na obrázcích 3-8 v konečných fázích sladování. Spektra se stávají komplexními a tudíž hůře hodnotitelnými.

Po elektroforetické separaci bílkovinných extraktů ze zrn ječmene po různé úpravě byla odhalena na gelu řada proteinových proužků v rozmezí molekulových hmotností 6–100 kDa s majoritními pruhy v oblastech o molekulových hmotnostech přibližně 8 kDa, 12 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 55 kDa a 100 kDa. Vizuální kontrola gelů potvrdila, že změny proteinového profilu je možné pozorovat již od druhé fáze sladování, nejmarkantnější změny jsou však viditelné až ve třetí a čtvrté fázi.

Dle Cumar (2011) bylo prokázáno, že hordeinové frakce o molekulové hmotnosti 49 kDa, 54 kDa, 55 kDa, 61 kDa a 65 kDa, byly degradovány relativně rychleji než hordeinové frakce o molekulové hmotnosti 36,5–47 kDa. S degradací těchto polypeptidů se nově objevují nízkomolekulární polypeptidy o molekulové hmotnosti, 15 kDa, 20 kDa, 28 kDa a 31 kDa. Tyto nově vytvořené polypeptidy následně degradují ve fázi klíčení. Na obrázcích 3-8 je patrné, že se výsledky SDS-PAGE relativně shodují (nepočítaje odrůdovou variabilitu). Cumar (2011) popisuje hordeinové skupiny následovně:

- A hordeiny v rozmezí molekulové hmotnosti 11,5-22 kDa
- B hordeiny v rozmezí molekulové hmotnosti 36,5-49 kDa
- C hordeiny v rozmezí molekulové hmotnosti 54-65 kDa
- D hordeiny o molekulové hmotnosti 105 kDa

Toto rozdělení se ve velké míře shoduje s rozdělením dle Caluse (2006) a bylo použito jako rozdělení hordeinů na základě molekulové hmotnosti v této bakalářské práci.

Mírné odlišnosti mezi odrůdami dle Bradové (2006) vycházejí ze skutečnosti, že zásobní proteiny (hordeiny) zrna ječmene jsou determinovány určitými lokusy – tzn. nejsou závislé na vnějších podmínkách (ročníku, výživě, lokalitě), jsou polymorfní a mohou tedy sloužit jako genetické bílkovinné markery pro identifikaci genotypů.

Dalším předmětem měření byla hmotnost tisíce semen (HTS) v počáteční a koncové fázi výroby sladu. Hodnoty HTS byly nižší v konečné fázi sladu u každé odrůdy přibližně o 10 %. Tato změna je dána energetickým odbouráváním škrobu v průběhu procesu sladování. Nejnižší hmotnostní změnu zrna vykazovala nesladovnická odrůda Heris, nejvyšší sladovnická odrůda Sebastian.

7. Závěr

Z výsledků experimentu se dají odvodit následující zjištění a závěry:

- Výsledky analýzy vzorků SDS-PAGE jasně potvrzují, že došlo v průběhu procesu sladování ke změnám spekter zásobních proteinů.
- Po elektroforetickém dělení ječných extraktů byla odhalena na gelu řada proteinových proužků v rozmezí molekulových hmotností 6–100 kDa s majoritními pruhy v oblastech o molekulových hmotnostech přibližně 8 kDa, 12 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 55 kDa a 100 kDa. Bílkoviny v těchto oblastech se dle literárních zdrojů označují jako hordeiny A, B, C a D. Každá odrůda se lišila v intenzitě a uspořádání pruhů.
- Vizuální kontrola gelů potvrdila, že změny proteinových profilů je možné pozorovat již od druhé fáze sladování, nejmarkantnější změny jsou však viditelné až ve fázi po klíčení a po imitaci hvozdění, kdy dochází k zániku určitých pruhů a k vytvoření pruhů nových.
- Nově vytvořené pruhy sladovnických odrůd Radegast a Sebastian z fáze po klíčení nabývají v konečné fázi (fáze po imitaci hvozdění) na intenzitě. U nesladovnické odrůdy Heris je to naopak.
- U jednozrnných vzorků můžeme pozorovat změny v intenzitě pruhů na úrovni jednotlivých variant (pětic vzorků), které jsou dány variabilitou zrna v rámci odrůdy. Tyto změny jsou hlavním rozdílem mezi výsledky jednozrnných a směsných vzorků. U směsných vzorků v důsledku homogenizace zrn nebyla variabilita v rámci jednotlivých variant pozorována.
- Hmotnost tisíce semen (HTS) zrna je asi o 10 % vyšší než HTS hotového sladu. Nejnižší rozdíl HTS zrna a hotového sladu měla nesladovnická odrůda Heris (8,1 %). U zástupců sladovnických odrůd Sebastian a Radegast se HTS v průběhu procesu sladování zmenšila o 11,4 % a 9,6 %. Hmotnostní změna byla způsobena energetickým odbouráváním škrobu.

8. Zdroje

BAMFORTH, Charles W. *Brewing New Technologies*, CRC Press, BocaRaton, 2004, ISBN 978-0-8493-9159-0.

BASAŘOVÁ, Gabriela, et al. *Pivovarsko-sladařská analytika*. 3. vyd. Praha: Merkanta s.r.o., 1993.

BASAŘOVÁ, Gabriela et al. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.

BERGER, Josef. *Buněčná a molekulární biologie*. 1. vyd. Havlíčkův Brod: Tobiáš, 1996, 167 s. ISBN 8085808420.

BÍLKOVÁ, Kateřina. *Izolace biomakromolekul*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1997, 206 s. ISBN 80-708-0288-X.

BRADOVÁ, Jana et al. *Využití gelové a čipové elektroforézy pro identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice: metodika pro praxi*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2011, 25 s. ISBN 978-80-7427-056-7.

BRADOVÁ, Jana a Světlana SÝKOROVÁ. *Optimalizace metod elektroforézy proteinů pro identifikaci odrůd ječmene (*Hordeum vulgare* L.)*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2006, 36 l. ISBN 80-865-5597-6.

CELUS, Inge, Kristof BRIJS a Jan A. DELCOUR. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of Cereal Science*. roč. 44, č. 2, s. 203-211. ISSN 07335210. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.06.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521006000762>

ČERNÝ, Ladislav, et al. *Jarní sladovnický ječmen - Pěstitelský rádce*. 1. vyd. Praha: Kurent, 2007. ISBN 978-80-87111-04-8.

ČÍŽKOVÁ, Hana et al. *Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva*. Chem. Listy, 2006, č. 100, s. 478–485, ISSN 0009-2770.

Elektroforetické metody. *Multimediální učebnice DNA diagnostiky* [online]. 1998 [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/newlook/defa7.htm>

Elektroforéza. *Český lékopis 1997* [online]. 2000 [cit. 2013-04-01]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_31.htm

Elektromigrační metody. Institute of Plant Molecular Biology [online]. [2012], 5.1.2012 [cit. 2013-04-01]. Dostupné z:

<http://www.umbr.cas.cz/~vacha/Vyuka/Metody/3hod%20Elektromigracni.pdf>

EßLINGER, H. M. a L. NARZIß. *Beer*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2009.

HAMES, B. D. a D. RICKWOOD. *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. 6. vyd. Oxford: IRL Press, 1987. ISBN 0-904147-22-3.

HOMOLA, L. a L. HŘIVNA. Effect of Malting Barley Steeping Technology on Water Content. *MendelNet'09 Agro* [online]. 2009 [cit. 2013-04-25]. Dostupné z:

http://mnet.mendelu.cz/mendelnet09agro/files/articles/tp_homola.pdf

HUBÍK, Květoslav. Agroweb. In: *Kvalita ječmene* [online]. 2002 [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: http://www.agroweb.cz/Kvalita-jecmene_s44x8505.html

HULÁK, Martin. *Molekulárne základy biológie a genetiky v rybárstve*. Vyd. 1. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, 2008, 167 s. ISBN 9788085887815.

KOSAŘ, Karel, PROCHÁZKA, Stanislav, et al. *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80-902-6586-3.

KUMAR, Y. a K. N. MATTA. *Changing protein profiles in developing and germinating barley seeds*. *Annals of Biological Research*, 2011, roč. 6, č. 2, s. 318-329, ISSN 0976-1233.

NEWMAN, Rosemary K. a C. NEWMAN. *Barley for Food and Health: Science, Technology, and Products*. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2008, xiv, 245 p. ISBN 04-701-0249-7.

PELINKÁN, Miloš a Lenka Sáková. *Jakost a zpracování rostlinných produktů*. České Budějovice: Jihočeská univerzita. Zemědělská fakulta, 2001. ISBN 80-7040-502-3.

PROKEŠ, J. *Technologický význam dusíkatých látek v ječmeni a sladu*. *Kvasny Prum.*, 2000, roč. 46, č. 10, s. 277-279, ISSN 0023-5830.

PRUGAR, Jaroslav a Štefan HRAŠKA. *Kvalita jačmeňa*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1989, 226 s. ISBN 80-070-0353-3.

PSOTA V. et al. *Vliv struktury endospermu obilky ječmene (Hordeum vulgare L.) na kvalitu sladu*. *Kvasny Prum.*, 2008, roč. 54, č. 10, s. 294-299, ISSN 0023-5830.

ROSYPAL, Stanislav a Jiří DOŠKAŘ. *Úvod do molekulární biologie*. 2. rozšíř. vyd. Brno: Rosypal, 1997, s. 560 - 839.

SHEWRY, Peter R. a Nigel G. HALFORD. *Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization*. *Journal of Experimental Botany*, 2002, roč. 53, č. 370, s. 947-958.

Slad. *Sladovna Bruntál* [online]. 2013 [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://www.sladovnabruntal.cz/slاد/>

ŠIMAN, Pavel. Elektroforéza. In: *Lékařská fakulta UK v Hradci Králové* [online]. 2013 [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/siman/Prednasky/Elfo.pdf>

ÚKZUZ. *Obilniny a luskoviny: Seznam doporučených odrůd*. Brno: Národní odrůdový úřad, 2012, ISBN 978-80-7401-059-0.

VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. přeprac. vyd., dotisk. Praha: Academia, 2002, 180, 135, 191 s. ISBN 8020006001.

VOET, Donald a Judith G VOET. *Biochemie*. 1. vyd. Přeložil Arnošt Kotyk. Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s. ISBN 8085605449.

Výroba sladu. *Bernard* [online]. 2013 [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://www.bernard.cz/cs/pivo/vyroba-sladu.shtml>

9. Přílohy

Příloha č. 1: Složení gelu SDS-PAGE

	Separáční gel (10 %)	Zaostřovací gel (3,75%)
H ₂ O	42 ml	12,15 ml
AC/BIS	26,6 ml	2,50 ml
Pufř A	10 ml	-
Pufř B	-	5 ml
SDS	800 µl	200 µl
Siřičitan sodný	60 µl	20 µl
Persiran amonn�	400 µl	150 µl
TEMED	40 1	20 1

Pufř A:

36,3 g Tris/100 ml, pH= 8,8

Pufř B:

6 g Tris/100 ml, pH= 6,8

Vanov  pufř:

144 g glycinu + 30,3 g Tris + 10 g SDS

Příloha č. 2: Složení barvicích roztoků a pufrů

Coomassie pufr:

1g Coomassie Blue + 500 ml metanolu + 100 ml k. octové + 400 ml H₂O

Odbarvovací roztok:

250 ml etanolu + 100 ml k. octové + 650 ml H₂O

Fixační roztok:

450 ml etanolu + 30 ml glycerolu + 500 ml H₂O