



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ OBSAHU ENZYMŮ V PŠENIČNÉM SLADU

ENZYME CONTENT MONITORING IN WHEAT MALT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Hana Šubertová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ivo Hartman, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1231/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Hana Šubertová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Ivo Hartman, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Sledování obsahu enzymů v pšeničném sladu

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše k zadanému tématu
2. Metodika sladování vzorků pšenice a stanovení aktivity enzymů
3. Analýza vzorků pšeničného sladu
4. Vyhodnocení výsledků, diskuse, závěr

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Hana Šubertová
student(ka)

Ing. Ivo Hartman, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo vyhodnocení vlivu technologie sladování na obsah hydrolytických enzymů α -amylasy a β -amylasy. Dalším cílem byl výběr odrůdy pšenice s nejvyšší aktivitou enzymů α -amylasy a β -amylasy.

Bylo hodnoceno několik technologických postupů sladování (délka sladování 5 až 8 dní, teplota sladování 12, 15, 18 °C, stupeň domočení ječmene 43, 45, 47 %, hvozdění při 80 a 50 °C). Pro sladování byla použita ozimá pšenice odrůdy Arkeos. Po získání vzorků sladu, byla stanovena aktivita enzymů α , β -amylasy a provedeno statistické vyhodnocení vlivu různých technologií sladování na aktivitu enzymů. Aktivita α -amylasy byla stanovena setem Ceralpha method a β -amylasa setem Betamyl-3 method od společnosti Megazyme.

Jako nejvhodnější byla zvolena technologie sedmidenního sladování, se stupněm domočení 45 %, teplotou klíčení 18 °C a teplotou sušení 50 °C. Tento technologický postup byl použit při sladování souboru 48 odrůd pšenice ze třech pokusných lokalit (Jaroměřice nad Rokytnou, Chrlice, Věrovany), ze sklizně 2016. Nejvyšší obsah enzymu α -amylasy měly odrůdy Rumor, která měla průměrný obsah α -amylasy 277 U/g, Bonanza – 255 U/g a Izzy – 254 U/g. Největší obsah enzymů β -amylasy měly odrůdy Matchball – 37,9 U/g , Fakir – 35,6 U/g, a Bernstein – 35,3 U/g.

ABSTRACT

The aim Master thesis was to evaluate the influence of malting technology on the content of hydrolytic enzymes α -amylase and β -amylase. Another aspect of this thesis was to select a wheat variety with the highest activity of enzymes α -amylase and β -amylase.

The first part of the practical part of my work is shown measuring enzyme malt model varieties of wheat set (*Triticum aestivum*), where individual samples differ technological processing of malting and the second part is focused on the application of efficient malting conditions on other varieties from different locations in the Czech Republic in 2016 .

All malt samples were analysed to α -amylase and β -amylase activity by assay Ceralpha method and Betamyl-3 method made by Megazyme company. After measuring the first part, the most effective malting condition was evaluated, such as a 7 day malting time, a 45% water content, a germination temperature of 18 ° C, and a drying temperature of 50 ° C. In the second part, the varieties are so malted and the highest content of enzyme α -amylase was Rumor, it had average content α -amylase 277 U/g, Bonanza – 255 U/g and Izzy –254 U/g. The biggest content of enzymes β -amylase had varieties Matchball – 37,9 U/g , Fakir – 35,6 U/g, and Bernstein – 35,3 U/g.

KLÍČOVÁ SLOVA

Slad, pšeničný slad, aktivita enzymů, α -amylasa, β -amylasa, pšenice setá

KEYWORDS

Malt, wheat malt, activity enzymes, α -amylase, β -amylase, malting, wheat set

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE TÉTO PRÁCE

ŠUBERTOVÁ, H. *Sledování obsahu enzymů v pšeničném sladu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 85 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Ivo Hartman, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a, že všechny literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT. Naměřená data jsou majetkem Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. a jejich další využití podléhá souhlasu této instituce.

V Brně dne

V Brně dne

Autor: Hana Šubertová

Podpis autora:

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych srdečně poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Ivo Hartmanovi, Ph.D. za odborné vedení, připomínky, pomoc, také za vstřícný a tolerantní přístup, které mi poskytl při vypracovávání mé diplomové práce a za možnost podílet se na zajímavém projektu.

Pak bych chtěla poděkovat ostatním pracovníkům Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského a.s., kteří vždy byli ochotní mi pomoci

Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za hlídání všech termínů a formalit nutných ke splnění podmínek pro dokončení diplomové práce.

Tato diplomová práce vznikla při řešení projektu TE02000177 Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků.

OBSAH

Abstrakt	3
Abstract.....	3
Klíčová slova	3
Keywords.....	3
Bibliografická citace této práce	4
Prohlášení	4
Poděkování	4
Obsah	5
1 Úvod.....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Technologie sladování	8
2.1.1 Historie výroby sladu.....	8
2.1.2 Samotná výroba sladu.....	10
2.1.3 Voda používaná na sladování	11
2.1.4 Příjem, čištění, třídění a skladování zrna.....	13
2.1.5 Máčení zrna	15
2.1.6 Klíčení zrna.....	17
2.1.7 Hvozďení zeleného sladu	20
2.1.8 Úprava sladu	23
2.1.9 Hodnocení jakosti sladu.....	25
2.1.10 Druhy sladu	26
2.2 Enzymy	30
2.2.1 Enzymy obecně.....	30
2.2.2 Třídy enzymů.....	31
2.2.3 Úloha enzymů ve sladu.....	32
2.2.4 Hydrolasy.....	32
2.2.5 Amylasy.....	33
2.2.6 Škrob jako substrát působení enzymů amylas	34
2.2.7 Obecné podmínky aktivace enzymů	35
2.3 Slad jako krmivo pro zvířata.....	36
2.4 Principy použitých metod	36
2.4.1 Stanovení α -amylasy	36
2.4.2 Stanovení β -amylasy.....	37

3	Experimentální část	38
3.1	Technologie sladování	38
3.2	Stanovení vybraných metod speciální analýzy	38
3.2.1	Stanovení α -amylasy	38
3.2.2	Stanovení β -amylasy.....	40
3.3	Vyhodnocení naměřených dat.....	42
4	Výsledky a diskuse.....	43
4.1	Optimalizace technologie sladování	43
4.1.1	Stanovení α -amylasy	44
4.1.2	Stanovení β -amylasy.....	51
4.2	Stanovení aktivity enzymů u různých odrůd.....	59
5	Závěr.....	63
6	Použité informační zdroje	64
	Seznam tabulek.....	68
	Seznam grafů	68
	Seznam obrázků.....	69
	Seznam použitých zkratk	69
	Seznam příloh.....	70
	Přílohy	71

1 ÚVOD

Slad je potravinářská surovina, která se získává ve sladovnách procesem zvaným sladování, což je proces, během něhož se obilné zrno máčí, díky tomu začne klíčit a následně se suší a hvozdí či praží. Během sladování dojde ke sledu reakcí, jednou z nich je enzymatické rozštěpení polysacharidů, především škrobu na jednodušší cukry (až monosacharidy). Obilku je možné sladovat různými způsoby, vždy záleží na výsledných požadovaných vlastnostech sladu.

Cílem sladování je aktivace a tvorba hydrolytických typů enzymů. Všechny kroky sladování jsou regulovány. Obecně lze říct, že slad je sladší, díky jednodušším sacharidům lépe zkvasitelný, křehčí, lépe stravitelný než zrno v původním stavu. Během sladování také dojde k tvorbě aromatických organolepticky žádoucích látek, přičemž jejich obsah závisí na daném typu sladu. [3]

Slad má významné využití v potravinářském průmyslu. Používá se jako surovina pro výrobu piva, whisky nebo dalších typů alkoholu. Dále se přidává do různých druhů limonád, sladová mouka se používá v pekařství a cukrárenství. Díky svým vlastnostem se využívá i v krmných směsích pro zvířata, ale jeho potenciál zatím není plně využit.

Nejpoužívanější a nejběžnější surovina pro výrobu sladu je ječmen, a v mnohem menší míře se používá pšenice. V zásadě lze použít jako surovinu pro výrobu sladu i další netradiční rostliny obsahující škrob, jako jsou obiloviny (např. žito, oves, žitovec (tritikále), rýže), alternativní plodiny (např. proso, špalda), pseudocereálie (např. pohanka, quinoa, amaranth) luskoviny (např. hrách, čočka, fazol, sója). [1]

Cílem práce bylo nalezení optimálního technologického procesu sladování pšenice tak, aby výsledný slad vykazoval vysokou aktivitu enzymů (α -amyláza, β -amyláza). Tento nalezený technologický postup poté aplikovat u vybraného souboru odrůd jarní a ozimé pšenice z různých stanovišť. Výsledkem bylo doporučení, které odrůdy jsou nejvhodnější pro využití na výrobu sladu s vysokou enzymatickou aktivitou. Slad bude využíván jako komponenta do krmných směsí pro zvířata. Práce byla prováděna ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a.s., pracoviště Brno.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Součástí této kapitoly je popis výroby sladu v minulosti a v současnosti. Následuje popis jednotlivých fází sladování. Dále je zde rozebrán rozdíl mezi pšeničným a ječným sladem,

Následující část se věnuje hydrolytickým enzymům, především amylolytickým α -amylase a β -amylase, a také jejich substrátu škrobu.

Dále kapitola pokračuje informacemi o vlivu technologických podmínek na sladování. Sledované parametry, které se měnily, byly délka sladování, stupeň domočení a teploty klíčení a sušení.

Poté je rozebrána kapitola o sladu a jeho využití při výživě zvířat.

V poslední kapitole teoretické části jsou vysvětleny principy použitých metod. Což byly v rámci specifické analýzy metody stanovení α -amylasy a stanovení β -amylasy.

2.1 Technologie sladování

2.1.1 Historie výroby sladu

Historie výroby sladu se vyvíjela s historickou výrobou piva. Tato činnost patří k jednomu z nejstarších cílevědomých výrob potravin, které lidstvo znalo. Za kolébku piva se považuje starověká Mezopotámie, dále další starobylé národy jako Sumerové, Babyloňané a Asyřané. Záznam o tom, že pivo bylo známo v tak dávných dobách, dodává překladatel chetitského písma Bedřich Hrozný. Obzvláště vášnivými pijáky piva byli starověcí Germáni, kteří dělali pivo ze všeho, co kvasilo. V té době mělo pivo podobu ječmenné omáčky podobné vínu. [1] [2] [5]

Nejdříve probíhala příprava kvasných nápojů v každé domácnosti z různých škrobnatých surovin a jako dochucovadlo sloužil chmel, a další rostliny. Postupně převládala výroba piva z praženého obilí, hlavně ječmene a pšenice. Není jasné, kdy a kde se začal vyrábět slad stejný jako známe dnes, tedy obilí, které se namočilo, naklíčilo a usušilo, či upražilo. Nejspíš takto upravené zrna někdo okusil náhodou a zjistil, že se snadněji rozmělní mezi zuby a má nasládlou chuť a liší se od zrna v původním stavu. Tím, že zrna sladu jsou chuťově sladší a křehčí, jsou vhodnější na výrobu kvašených nápojů. Teprve v roce 1516 na území střední Evropy vydal německý panovník Wilhelm IV. von Bayern zákoník o čistotě piva. Ten umožňoval vyrábět pivo pouze z ječného sladu, vody a chmele. [1] [5]

V českých zemích byl rozvoj vaření piva ovlivněn díky privilegiím, jako várečné a mílové právo. Což znamenalo, že města mohla vařit pivo a tato práva dostala od šlechty nebo církve. Várečné právo byla možnost právovárečného domu ve městě vařit pivo a mílové právo zajišťovalo zničení konkurence, protože do vzdálenosti tehdejší míle (7–12 km) do města s várečným právem se nesmělo dovážet pivo a slad odjinud. Tato privilegia byla jedním z důvodů rozmachu pivovarství a sladařství na našem území.

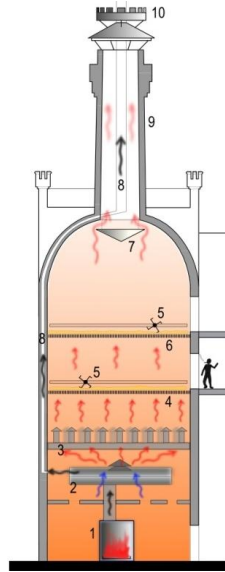
Už ve středověku se pivo a suroviny na jeho výrobu, jako je slad a chmel vyvážely za hranice českých zemí. V této době bylo běžné, že každý pivovar měl svou sladovnu, která kvůli častým požárům byla umístěna mimo město. Pivovarnictví bylo výsadou mužů. Většinou se rodinné receptury dědily po generacích z otce na syna. Výrobci byli čím dál bohatší a začali se různě sdružovat, vytvářely se cechy, které ochraňovaly měšťany, kteří mohli slad a pivo vyrábět, a kontrolovaly kvalitu výroby. [2] [4] [5]

Přibližně do poloviny 19. století nebyly k dispozici objektivní pomůcky a metody pro technologický postup a kontrolu kvality surovin. Do té doby vše záviselo na praktických zkušenostech sládků a jejich pomocníků. Teplota a další parametry se odhadovaly pocitově. Dále bylo známo, že zrna nesmí být napadeny "sněti", tedy plísněmi, a před sladováním se musí zrno proprat a před tím odležet. U nás se jako surovina na slad obvykle používaly světlé jarní dvouřadé odrůdy ječmene, pro světlejší pluchu a "ryšavé" odrůdy pšenice, pro větší sílu a lepší chuť. [1] [2] [6]

Původní sladovny vypadaly tak, že se obilka máčela ve dřevěných korytech, až nabobtnala, a pak se zrna umístila na hlíněné podlahy v dobře větraných prostorách, později nazývané humna, kde za občasného přehazování se nechala zrna naklíčit. Zrno se sladovalo pouze v zimě, a sušilo se dýmem z kamen na kouřovém hvozdu – valachu, kde se položila dřevěná líska s naklíčeným zrním. Pro výrobu tmavých sladů se část sladu upražila. Takto připravený slad se nechal 2–3 měsíce zrát, než se dál zpracoval pro výrobu piva. Dalším vylepšením byla náhrada dřevěných lísek za drátěné a později ocelové, a vylepšení topeniště a valachu na hvozdu. [1] [5] [6] [7]

Od druhé poloviny 19. století se díky rozmachu vědy objasnily děje při výrobě sladu, a tím bylo možné proces optimalizovat a zefektivnit. Také rozvoj enzymologie přinesl nové poznatky týkající se zjištění existence sladových enzymů, jako amylolytické enzymy štěpící škrob, cytolytické enzymy štěpící neškrobové polysacharidy a proteolytické enzymy degradující bílkoviny. V této době došlo k vypracování kontrolních metod, jako stanovení dusíku Kjeldahlovou metodou, diastatická mohutnost, příprava kongresní sladiny, stanovení pH, či posouzení barvy. [1] [2] [3] [6]

Další vylepšení bylo vyvinutí nových hvozdu, které spočívaly v tom, že se nesušilo přímým dýmem, ale teplým vzduchem ohřívaným v kaloriferech, (tepelných výměnících). Hvozdy měly dvě až tři lísky. (viz *Obrázek 1*) Zdokonalily se též náduvníky s perforovaným věncem pro dobré proudění vzduchu na máčení ječmene, jež se umísťovaly nad humna, a vypouštěly ječmen samospádem. Začala se používat zařízení jako mechanické pračky, zařízení pro čištění zrna, odkličovadla na slad, obraceče sladu atd. Začal se používat pneumatický způsob sladování v bubnech (typ Galland) nebo ve skříních (typ Saladin). Tento postup usnadnil a urychlil proces výroby sladu.



Obrázek 1: Dvoulískový hvozď. 1 - topeniště, 2 - výměník tepla - kalorifer, 3 - usměrnění tahu topného vzduchu, 4 - dolní líska, 5 - mechanická obrabečka sladu, 6 - horní líska, 7 - regulátor tahu puklice, 8 - kouřovod, 9 - hvozďový komín, 10 - klobouk pana starého. (zdroj - fabriky.cz)

Díky modernizaci došlo postupně k zefektivnění výroby. Sladování probíhá rychleji, levněji a ekologičtěji. Mezi novodobé zlepšení patří odsávání oxidu uhličitého, možnosti opakovaného použití máčecí vody, vyvinuly se nové typy pneumatického sladování

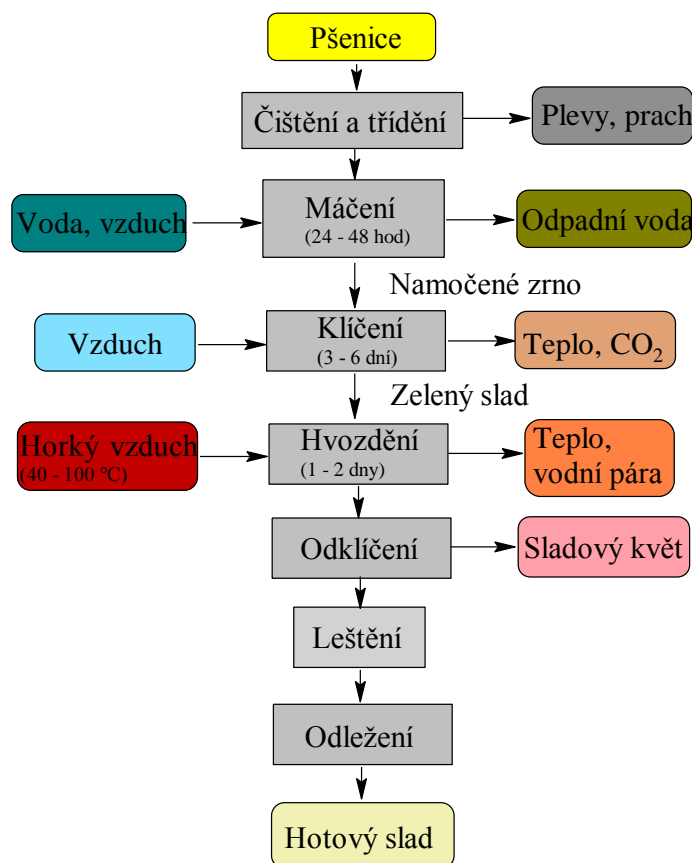
Zdokonalily se rovněž laboratorní kontrolní metody. Díky rozvoji gelových elektroforéz a chromatografií je možné sledovat nové vlastnosti a látky, např. genetickou a odrůdovou čistotu, organolepticky nežádoucí dimethylsulfid (DMS), popř. jej odstranit.[1] [2] [3] [6] [8]

V rámci vylepšení technologie se objevila optimální kombinace anaerobních a aerobních podmínek při máčení a klíčení pro získání optimálního pH sladin a mladin důležitých pro uplatnění aktivity enzymů.

Sladařský a pivovarský průmysl v současnosti využívá nejnovější poznatky z biochemie, genetiky, bioinženýrství pro optimalizaci výroby a zvýšení kvality výrobků, včetně opakovatelnosti. Zároveň je snaha o ekonomičtější a ekologičtější provoz. [4] [6]

2.1.2 Samotná výroba sladu

Pro zřehlednění této výroby jsou hlavní kroky sladování znázorněny na obrázku 2. Proces sladování je zde znázorněn jako blokové schéma. V našem případě je pšenice vstupní materiál, a šedé svíslé kolonky ukazují po sobě jdoucí procesy a barevné kolonky faktory a suroviny, které se do procesů zapojily, nebo vyloučily.



Obrázek 2: Blokové schéma sladování - vytvořeno v programu ChemSketch

2.1.3 Voda používaná na sladování

Voda, která se používá pro máčení zrna při výrobě sladu velmi výrazně ovlivňuje kvalitu sladu. Proto je důležitý výběr vody a jejích vlastností, vhodných ke sladování. Při výrobě 1 tuny sladu se spotřebuje přibližně 3-10 m³ vody. Voda používaná ke sladování musí mít kvalitu pitné vody. Přesto je její spotřeba obrovská a technologové se snaží o její snížení. Ke sladování se používá voda máčecí, provozní, mycí a sterilační. [1] [3] [9]

Máčecí voda – K máčení zrna ve sladovně se obecně hodí každá čistá voda s odpovídající teplotou pro máčení. Zároveň nesmí obsahovat suspendované a rozpuštěné organické látky, a nesmí voda zapáchat. Rovněž by neměla obsahovat sloučeniny železa a manganu, protože se vylučují hydroxidy vzniklých oxidací na povrchu zrna, které získá skvrnitý vzhled a pivo "rezavou" barvu. Také je nepřípustné, aby tato voda obsahovala velké množství mikroorganismů a látek toxických pro zárodek, které by se mohly upotřebit jako živiny. Za běžných podmínek mikrobiologická čistota je zanedbatelná, protože obilky samy obsahují více mikroorganismů než voda. [1] [3]

Mycí a sterilační voda – musí být mikrobiologicky prostá, bez chemických kontaminantů a nesmí zapáchat. Vodu pro sterilaci a výplachy je žádoucí chlorovat. [10]

Provozní voda – záleží na standardech kladených pro jednotlivé operace a zařízení. Např. se může jednat o specifickou chemickou úpravu vápennou vodou, která se používá jako částečná dezinfekce, či upraví se voda na požadované chemické složení a požadovanou mikrobiální čistotu. [2]

Recyklovaná voda - Podařilo se snížit spotřebu vody opakovatelným použitím. Do odpadu se vypouští pouze prací voda a další vodu je možné upravit např. filtrací, úpravou pH, odstraněním hořkých látek a polyfenolů pomocí iontoměničových metod, nebo vyvločkováním a znovu ji přidat do výrobního procesu.[9] [10]

2.1.3.1 Zdroje vod a úprava sladařské vody

V době domácího pivovarnictví se používala voda z blízkosti obydlí a téměř se neupravovala díky tehdejší čistotě vody. Čistota vody se postupně zhoršovala a empiricky bylo zjištěno, že filtrace zbaví vodu mechanických nečistot a převaření mikroorganismů. [3] [10]

V současnosti má většinou každá sladovna i pivovar vlastní zdroj vody, kterou si upravuje dle potřebných požadavků, nebo jsou podniky napojeny na centrální vodovod, odkud vychází pitná voda, která sice splňuje veškeré požadavky, ale je příliš drahá. Jako vlastní zdroj slouží podzemní či pramenité vody a v případě nouze povrchové vody, ale jejich úprava je nejvíce náročná. [1] [2]

Některé oblasti bojují s nedostatkem vody, proto se zavádí maximální snaha o šetření a recyklaci, tedy znovupoužití vody a co nejefektivnější úpravu. Hlavní kroky úpravy vody jsou: čiření, filtrace, odkyselování, odstranění solí železa a manganu, denitrifikace dezinfekce a měkčení. Čiření se provádí buď mechanicky v usazovacích (Dorův usazovák) při odstranění větších a těžších částic, nebo chemicky pomocí čířidel (síran hlinitý, chlorid železitý). U jemných a koloidních kalických částic dojde k tvorbě vloček. Filtrace se provádí na pískových filtrech či rychlofiltrech s automatickou regenerací. Odkyselování, též odstraňování volného oxidu uhličitého, se provádí buď rozprašováním vody, nebo filtrací vody přes mramor za vzniku hydrogenuhličitanu vápenatého (metoda není vhodná pro varnou vodu). Odželezování a odmanganování se provádí chemicky oxidací s následným odfiltrováním nerozpustných hydroxidů na pískovém filtru, nebo filtrací přes náplň Fermago. Denitrifikace se provádí různými postupy, např. na iontoměničích, elektrochemicky aj. V posledních době je tato úprava vody stále aktuálnější. Dezinfekce či sterilace vody se provádí třemi způsoby: působením chloru a jeho odstraněním v dechlorátorech, jako katalyzátor se využívá stříbrných solí, ozonizací a ozařováním vody UV-paprsky. Měkčení vody se provádí demineralizací na iontoměničích nebo reverzní osmózou. [1] [3] [9] [10] [11]

2.1.3.2 Obsah rozpuštěných solí

V praxi se jedná o klíčovou vlastnost, a voda je podle ní posuzována. Tvrdost vody je dána celkovým obsahem hořečnatých a vápenatých solí. Ty pak se slučují do hydrogenuhličitanů, které za tepla tvoří málo rozpustné uhličitany a soli silných kyselin jako sírany, chloridy, a dusičnany, které jsou za tepla stálé. Tvrdost vody se dělí na přechodnou, kde povařením vody zmizí a způsobují ji hydrogenuhličitany, a stálou tvrdost, zůstává ve vodě a je způsobena solemi silných kyselin. V sladařství se rozlišuje podíl způsobený oxidem hořečnatým a podíl způsobený oxidem vápenatým. Tvrdost vody je v různých zemích různě definována. V ČR je běžná koncentrace udávána v mmol.l⁻¹ nebo německých stupních °D, někdy označovány jako °n. Pro sladování se hodí spíš měkčí až středně tvrdá voda. Různé tvrdosti vody jsou vyjádřeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: přehled druhů celkové tvrdosti vody podle součtu obsahu hořečnatých a vápenatých solí [2]

Druh vody	mmol.l ⁻¹	°D
měkká	<1,3	< 7
středně tvrdá	1,3 - 2,5	7.14
tvrdá	2,5 - 3,8	14 - 21,3
velmi tvrdá	> 3,8	> 21,3

Tvrdost vody je limitní faktor pro výrobu určitých druhů pív. Např. pro světlý slad plzeňského typu se hodí voda s tvrdostí 1,61 °D, pro mnichovský slad voda o tvrdosti 14,8 °D a pro výrobu tmavých sladů a svrchně kvašených pív je vhodná velmi tvrdá voda.[2] [3] [12] [13]

Nejdůležitější kationty obsaženy v přírodních vodách jsou: Oxoniový kation - H_3O^+ - zvyšuje aciditu vody; sodný a draselný kation - Na^+ a K^+ - ve větší míře s chloridem vyvolá slanou chuť a jako hydrogenuhličitan a uhličitan nepříznivě zvyšují pH mladiny a rmutu; amonný kation - NH_4^+ - zaznamenává organickou kontaminaci, vápenatý a hořečnatý kation - Mg^{2+} a Ca^{2+} - způsobí tvrdost vody (viz výše), ovlivňují pH, v kombinaci s chloridem a uhličitanem tlumí přibarvování rmutů stimulují některé sladové enzymy, např. ty, které stabilizují α -amylasu; manganaté kationty - Mn^{2+} - působí jako kofaktory enzymů a mají pozitivní vliv na proteolytické rozluštění sladu, ve velké dávce jsou toxické; železnaté a železité kationty - Fe^{2+} a Fe^{3+} - železnaté kationty se snadno oxidují na železité a vylučují se v roztoku v podobě rzi, čímž se zhorší kvalita sladu, je pak tmavší, zpomalí se zcukření rmutu, sníží se plnost chuti a hořkost piva, a v koncentracích pod 0,1 mg.l⁻¹ pozitivně působí na dýchací řetězec; hlinité kationty - Al^{3+} - jsou toxické pro zárodek obilky a do výrobního procesu se mohou dostat jako rezidua herbicidů nebo ze zařízení; a měďnaté kationty - Cu^{2+} - mají podobné účinky, jako kationty železa, ale jsou toxickejší pro kvasinky. [6] [10] [14]

Nejdůležitější anionty obsaženy v přírodních vodách jsou: hydroxidy - OH^- - zvedají pH; chloridy - Cl^- - podporují působení sladových amylas, způsobují korozi ocelových zařízení, zvyšují plnost chuti piva; hydrogenuhličitan - HCO_3^- - způsobují přechodnou tvrdost vody; uhličitan - CO_3^{2-} - zvyšují kyselost vody, tedy snižují pH; dusičnany - NO_3^- - maximální povolená koncentrace v ČR v pivu i vodě je 50 mg.l⁻¹ a do vody se dostávají nejčastěji jako rezidua hnojiv používaná v zemědělství snadno se přemění na dusitany - NO_2^- - zaznamenávají čerstvé znečištění vody a její mikrobiální čistotu. Jejich maximální přípustná koncentrace ve vodě je 0,1 mg.l⁻¹ jsou to meziproducty proteolytických reakcí a s polyfenoly tvoří červená barviva, která zhoršují chuť piva; sírany - SO_4^{2-} - při kvašení ze síranů vzniká oxid siřičitý, který je antioxidant, při vyšších koncentracích zhoršují chuť sladu a piva; fosforečnany - PO_4^{3-} - slučují se s hořčíkem a vápníkem a ovlivňují pH; a křemičitany - SiO_3^{2-} - maximální přípustná koncentrace je 30 mg.l⁻¹, při vyšších hodnotách se tvoří zákal. [6] [10] [14]

2.1.4 Příjem, čištění, třídění a skladování zrna

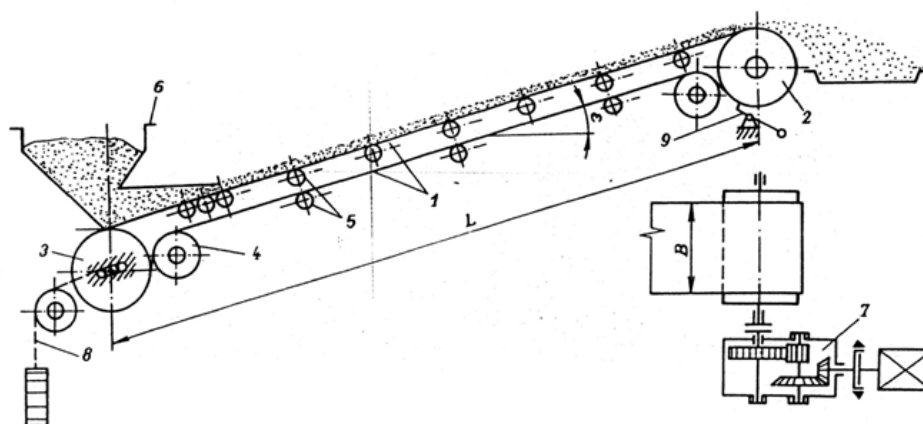
Aby se dalo dále se zrnem pracovat, je nutné jej ve sladovně mít v požadované kvalitě. Většinou si sladovny předem dohodnou v kupní smlouvě, kde uvedou specifikaci jako čistota a stupeň vytřídění zrna, odrůda, požadované analytické vlastnosti, jako je množství proteinů, přirozená vláha, klíčivost atd. a dodavatel - zemědělec zboží dodá. Přesto je většina sladoven

vybavena i pro přímý výkup netříděného ječmene, pro případ, že žně budou muset být rychlé, nebo budou deštivé. [1] [4]

2.1.4.1 Příjem obilí ve sladovně

Příjem se provádí na přijímací rampě sladovny různými dopravními cestami jako jsou pytle, kontejnery, či cisterny přímo z aut, vagonů, či lodí. Z každé dodávky se odebírají vzorky k analýze, která musí být rychlá pro případnou reklamaci. Pokud je vše v pořádku, může se použít pro zpracování nebo se uskladnit. Limitujícími ukazateli jsou obsah vody, obsah bílkovin, klíčivost, podíl zrna nad sítím 2,5 mm, podíl zlomků, nečistot, napadení škůdci, případně mikrobiální kontaminace. [3] [6] [11] [15]

Zároveň musí být zvládnuta doprava a přesun ječmene (pšenice), zeleného sladu a hotového sladu z různých míst na místo určení. Správná volba vhodného dopravního zařízení, které pracuje přesně, je jednoduché na údržbu a má levný provoz, je velmi důležitá. Doprava musí být navržena co nejefektivněji. Tzn. snaha o co nejnižší počet doprav, co nejkratší trasy, a nejlepší typ dopravníku. Dopravníky se dělí na mechanické a pneumatické. Mechanické dopravníky se snadno opravují, protože mají jednodušší konstrukci, jdou rozlišit podle uspořádání na horizontální (žlabové dopravníky, šneky, pásy (viz Obrázek 3), třasadla a vibrátory) a vertikální (elevátory – kolébkové nebo korečkové a slouží k zvedání, skluzu, tobogany a shozy). Pneumatická doprava spočívá v proudění vzduchu určitou rychlostí, který strhává částice a unáší je ve směru proudění. Tyto dopravníky se dělí na sací systémy – podtlakové a systémy dopravy tlakovým vzduchem – přetlakové. [2] [3] [10] [13] [15]



Obrázek 3: Pásový dopravník - 1 - dopravní pás; 2 - hnací buben, 3 - napínací buben, 4 - vodící buben, 5 - podpěrné válečky, 6 - násypka, 7 - poháněcí stanice, 8 - napínák (zdroj vyuka.odbornaterminologie.cz)

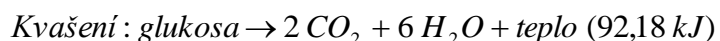
2.1.4.2 Čištění, třídění a odprašování zrna

Pro kvalitní sladování a dobré rozluštění a nízké sladovací ztráty je zapotřebí, aby obilky byly odrůdově, velikostně i fyziologicky jednotné. To je důvod provádění čištění a třídění zrna. Netříděný a nečištěný ječmen obsahuje kamínky, kovové částice, prach, písek, cizí zrna, zbytky klasů, kousky slámy, úlomky zrn a plevy. K základnímu vybavení čistící třídící stanice sladoven patří dopravní zařízení jako je **automatická registrační váha**, **aspirátor**, který profukuje vrstvu obilí a odstraňuje prach, lehké součásti, hrubé i lehké přimíseniny, **triér**, který odstraní kulatá zrna plevelu a úlomky zrn, **třídíče**, které separují zrna na sítích nebo jako systém válců dle velikosti a oddělují zadinu (malá zrna nevhodná ke sladování), **magnet (odlučovač magnetických částic)**, který zachytí kovové přimíseniny jako dráty od přepravních pytlů, hřebíky, **odklasňovač**, který se aplikuje, jestliže zrna nebylo dokonale

vymláčeno a v zrnech se vyskytují zbytky klasu, **přečišťovací triér** a jímače prachu (cyklóny, proudové filtry). [3] [15] [16] [17]

2.1.4.3 Skladování zrna

Po příjmu třídění a čištění se obilka uskladní buď na půdách, nebo v silech. Obilka jako zdroj energie pro přežití používá rezervní zásobní polysacharidy, především škrob. Podle možností získává energii buď aerobně, hlavní metabolická dráha, pokud má kyslík - dýcháním, kde dochází k vyloučení oxidu uhličitého a tepla, nebo pokud nemá v prostředí kyslík či má hodně tepla, pak dochází k anaerobnímu kvašení. (viz rovnice níže). [13] [18]



Kvašení zde probíhá jako stresová dráha, a probíhá asi 100x rychleji, než buněčné dýchání. Je potřeba odvádět oxid uhličitý odvětráváním, protože jinak dojde při jeho hromadění k intramolekulárnímu dýchání, jeho produkty jsou velmi škodlivé a působí toxicky na zárodek zrna. Je snaha navodit co nejnižší intenzitu dýchání, aby došlo k co nejnižším ztrátám prodýcháním bezdusíkatých organických látek. Proto jsou důležité optimální skladovací podmínky. Limitní faktory pro správné skladování jsou vlhkost a teplota skladovaného zrna, proto se musí zvolit jejich optimální poměr. Horší je vyšší vlhkost než vyšší teplota. Ideální podmínka uskladnění je vlhkost prostředí do 15 %, teplota do 20 °C a dostatek kyslíku. S delší skladovací dobou se ztráty zmenšují. V prvním čtvrtletí skladování ztráty představují 0,8–1,15 %, v druhém čtvrtletí 0,6–1,0 %, v třetím čtvrtletí 0,2–0,4 % a ve čtvrtém čtvrtletí 0,2–0,4 %. Celkové ztráty tedy činí 1,9–3,4 %. Nejlepší zralosti zrna se docílí, když se začne zpracovávat v lednu až březnu v následujícím roce po žních. [1] [3] [6] [11] [19]

Skladované zrna je živý organismus, jehož fyziologické procesy jsou utlumeny. Během skladování se nachází ve stadiu základního klidu, tzv. dormance. Což je stav, kdy se zabrání obilce v klíčení. Špatná klíčivost čerstvě sklizeného ječmene je způsobena přítomností inhibitorů klíčení tzv. dorminů. Teprve po jejich odbourání oxidací dormance zaniká, uvolňuje se činnost stimulatorů (giberelinů) a zrna se je schopné klíčit. Je možné rozlišit primární, sekundární a aleuronovou dormanci. Primární je vyvolána geneticky a zabraňuje vyklíčit semenu před nepříznivými podmínkami, jako jsou mrazy, protože by rostlina nepřežila. [2] [13] [20] [21]

Sekundární dormance je vyvolaná a spojena se sníženou citlivostí obilek k vodě. Ovlivňují ji podmínky v době vegetace, jako je tvorba a zrání obilky, i po sklizni skladovací a klíčící podmínky. A aleuronová dormance je stav, kdy se redukuje uvolňování enzymů u zrn, které již nevykazují primární dormanci. Kontrola primární dormance se stanoví podílem nevyklíčených zrn k vyklíčeným při dané teplotě. [2] [20]

2.1.5 Máčení zrna

Máčení je první, velmi důležitý úsek výroby sladu. Aby se nastartovaly veškeré enzymové reakce, které probíhají během klíčení zrna a došlo k žádoucím fyziologickým, chemickým a biochemickým změnám, je nutné, aby začalo zrna bobtnat, tedy aby se zvýšil obsah vody. [3] [8] [20] [22]

Máčení je proces, který trvá 24–48 hodin a zvedne obsah vody v zrna na 42–50 %. Běžně se provádí v náduvnících, které mají kapacitu 5 až 10 tun a jsou to válcové či čtyřhranné nádoby s kónickým dnem o úhlu 45 °, aby zrna mohlo samovolně vytékat ven. Dnes se

náduvníky vyrábí kovové, většinou z legované či nerezové oceli. Máčírny se stavějí přepouštěcí dvoudenní, nad náduvníkem je umístěn koš, ve kterém je část vytríděného zrna z třídičky. Existují dva hlavní způsoby máčení. Náduvník se naplní první máčecí vodou a pak se do něj vysype zvážené množství obilí, nebo se zrní v náduvníku sprchuje shora máčecí vodou. [3] [8] [22]

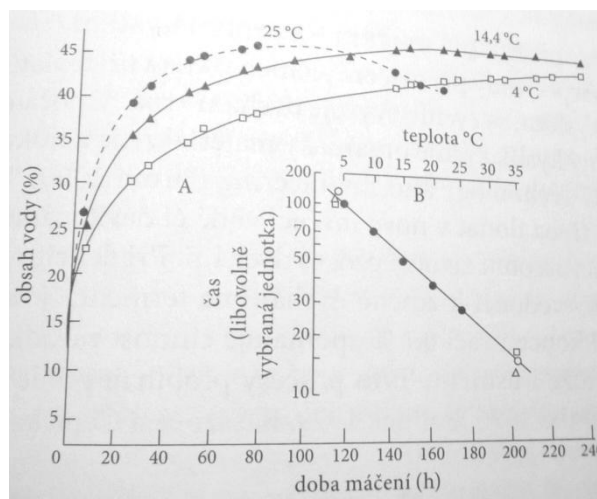
Obsah vody odpovídá potřebám odrůdy, ročníkovým vlastnostem, technologickým parametrům na sladování, velikosti zrna a dalším aspektům. Velmi také záleží na máčecí vodě (tvrdost, alkalita, obsah solí, teplota, hydrostatický tlak), přísunu kyslíku a odvodu oxidu uhličitého, pH a sladovacím zařízení. Díky tomu dojde k dobrému cytolytickému i proteolytickému rozluštění, což vede k homogenizaci strukturálních změn a aktivaci enzymů nutných ke klíčení a amylolytických enzymů štěpící škrob na jednodušší zkvasitelné cukry. Také je nutné zajistit dostatečné provzdušnění, aby nedošlo k umrtvení zrna. Provzdušňování probíhá tlakovým vzduchem. [8] [15] [19] [21] [23]

Během prvního máčení, které trvá přibližně 4 - 6 hodin se zároveň zrno vypere a odstraní nečistoty. Látky zhoršující chuť budoucího piva, jako jsou barevné a hořké látky, kyselina křemičitá, se vylouží a odplaví první máčecí vodou. Po určité době se zrno přečerpá do dalšího náduvníku, kde se nechá 14–24 hodin na suchu, teplota vzduchu je 1–17 °C a každou druhou hodinu se odsává oxid uhličitý. Po této vzdušné přestávce se následuje další zatopení druhou máčecí vodou o teplotě 12–15 °C po dobu 2–4 hodiny. Voda už není tolik znečištěná a je možné ji opětovně použít. Následuje přečerpání do třetího náduvníku a druhá vzdušná přestávka, která trvá 14–24 hodin při teplotě 18–22 °C, opět se odsává oxid uhličitý. Poslední, třetí máčecí voda má teplotu 12–18 °C a trvá 1–3 hodiny do konečného stupně domočení. [13] [15] [23] [25]

2.1.5.1 Příjem vody zrnem

Aby zrno přežilo, musí mít původní obsah minimálně 8–12 % vody. Aby zrno mohlo začít klíčit, musí se stupeň domočení zvýšit alespoň na 30 %. Pokud se vlhkost fyziologicky vyvrálé obilky zvýší na 35–38 %, pak nejrychleji klíčí a záleží na druhu sladu, který je potřeba vyrobit – světlý slad má mít 40–45 % vody a tmavý – 45–50 % vody. [1] [8] [15] [24]

Fyziologicky nevyvrálý ječmen přijímá vodu hůř než vyvrálý. Máčené zrno přijímá nejdříve vodu rychle a hodně, později přírůstek vody klesá. Křivka máčení (viz *Obrázek 4*) má asi do 40 % průběh prudce rostoucí a pak růst se zpomalí. Křivka se chová jako asymptota rovnoběžná s osou x. Zpomalení růstu časově odpovídá ukončení pronikání vody kapilárami pluchy. Další voda pronikající semipermeabilním osením do endospermu zrna způsobuje bobtnání škrobu a koloidů. Dochází k zvětšování objemu obilky. Rozdílná rychlost přijímání vody závisí na vnějších i vnitřních faktorech – hlavně odrůda, velikost obilky, povaha endospermu. Např. ječmen pěstovaný v suchých oblastech rychleji "nasaje" vodu než ječmen pěstovaný ve vlhkých oblastech. Stejně i moučnatá zrna vážou vodu lépe, než sklovitá. U vnějších faktorů je důležitá teplota máčecích vod a technika máčení (optimalizace poměru dob máčení a vzdušných pauz), zajištění dostatku kyslíku, protože dýchání zvyšuje příjem vody. Zároveň nedostatečná aerace snižuje extraktivnost sladu a tím též sladovací výtěžek. Během správného buněčného dýchání vzniká jako meziprodukt kyselina octová, která jde indikovat v máčecí vodě. Pro urychlení máčení se přidávají alkalické hydroxidy. Zároveň se musí dostatkem kyslíku zabránit přemočení zrna, protože to způsobuje velké nevratné poškození. [8] [12] [16] [21] [23] [26]

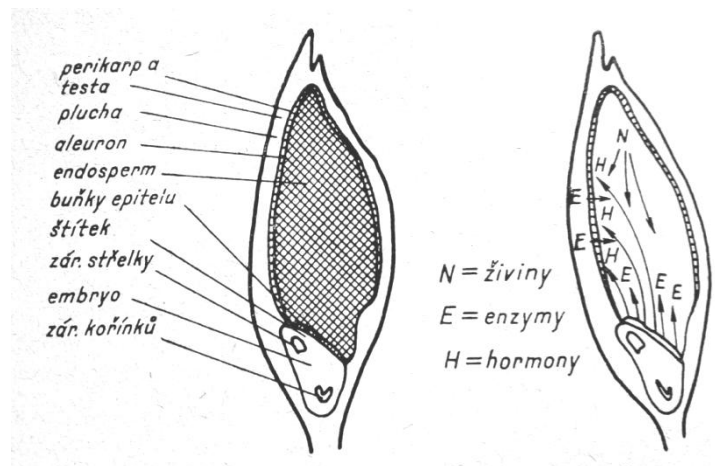


Obrázek 4: A - máčecí křivka - závislost příjmu vody na teplotě máčecí vody ; B - závislost doby máčení na teplotě pro dosažení požadovaného stupně domočení dvouřadých ječmenů (zdroj Basařová 2015)

2.1.6 Klíčení zrna

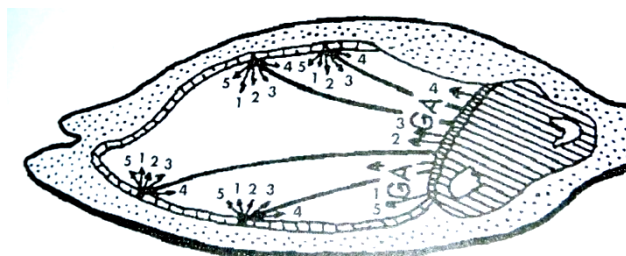
Klíčení je hlavní krok sladování a trvá 3–7 dní. Cílem klíčení je aktivace a syntéza širokého spektra enzymů, růstové změny a snaha o maximální rozluštění při minimálních nákladech a ztrátách. Pro dobré klíčení jsou důležité faktory, jako dobrá fyziologická vyzrálость či chemické složení zrna. Obsah bílkovin a celkového dusíku jsou parametry, které hodnotí kvalitu přijímaného ječmene či pšenice. Například pokud zrna mají vysokou hladinu dusíkatých látek způsobenou suchem, nedochází k vysokému rozluštění, a zrna jsou tvrdá a sklovitá. Jestliže obilka obsahuje nadbytek dusíku z nadměrného hnojení, pak zrna jsou sice moučné a měkká, ale sladovací výtěžek je nízký, dochází k velkým ztrátám a zvyšuje se cena. Jak vypadá rozluštění je popsáno na *Obrázku 5*. [1] [8] [23] [26]

Další důležitá technologická vlastnost ovlivňující sladování zrna je obsah vody – stupeň domočení. Jestliže hromada zrn bude klíčit na humnech, pak je potřeba mít vyšší stupeň domočení než u pneumatického způsobu sladování. Je potřeba najít optimální poměr mezi celkovým stupněm domočení, teplotou klíčení a délkou klíčení. Tyto tři faktory účinně řídí kvalitu vyráběného sladu a vzájemnou kombinací je možné získat požadovanou jakost sladu. Např. při zvýšení stupně domočení o 2 %, konstantní teplotě klíčení je možné snížit dobu klíčení o 1 den a vyrobit stejně jakostní slad. Ideální teplota klíčení pro běžný slad plzeňského typu je 12 °C a postupně roste až na 16 °C, a doba klíčení je 4–7 dní. Všechny faktory se mohou lišit, protože vždy záleží na vyráběném sladu i na vstupní surovině, ze které se slad vyrábí. [8] [14] [27] [28]



Obrázek 5: Složení zrna a představa o rozluštění (zdroj Lhotský 1971)

Hlavní část zrna tvoří endosperm složený převážně z buněk obsahujících škrobová zrna. Při aktivaci a syntéze enzymů je v zrně kromě α -amylasy přítomná v malém množství většina enzymů. Zvýšení aktivity či syntéza nových enzymů, je způsobena fytohormony, které se skládají z gibberelové kyseliny a dalších chemicky podobných látek, a ty putují endospermem do aleuronové vrstvy. Zde probíhá tvorba nových volných aminokyselin a enzymů. Nejprve vzniká β -glukanasa (u pšenice jí moc nevniká), poté α -amylasa a proteasy. Enzym β -amylasa se netvoří v aleuronové vrstvě, ale v endospermu. Následuje rozluštění, tedy rozrušují se buněčné stěny v endospermu působením enzymů cytas – cytolytických enzymů. Buněčné stěny endospermu jsou tvořené molekulami hemicelulos a bílkovin. Takže ostatní enzymy mají snadnější přístup k obsahu buněk a zároveň dochází ke štěpení makromolekul na jednodušší struktury. Viz Obrázek 6. [1] [8] [13] [27] [30] [31]



Obrázek 6: Tvorba enzymů v klíčovém zrně ječmene: 1 - endo- β -glukanasy, 2 - amylasy, 3 - proteasy, 4 - fosfatasy, 5 - amylasy, GA - gibberelliny (zdroj Basařová a Čepička 1986)

Během klíčení se musí hlídat délka stříelky, což u ječmene je klíček pod pluchou, a pšenice nemá pluchu, takže jde lépe vidět. Ideálně u světlého plzeňského sladu by stříelka neměla ještě vyrašit a měla dosáhnout přibližně tří čtvrtin obilky a zrna by mělo mít koříněk. Jednotlivé fáze klíčovího zrna mají své vlastní názvy. V tomto stádiu vzniká meziprodukt sladování – zelený slad. [29]

Při klíčení se spotřebovává energie zrna dýcháním. Aby byly ztráty co nejnižší, je potřeba celý děj včas ukončit. Zároveň se získává nová metabolická energie enzymatickým štěpením polysacharidů. Amylasy jsou zcela určitě nejvýznamnější enzymy sladu, protože odbourávají škroby na zkvasitelné cukry a tvoří slad – sladké zrna. Nejvíce α -amylasy se tvoří během 2. až 4. dne klíčení. Správné proteolytické rozluštění je podmínkou k aktivaci α -amylasy. Pokud nedošlo k správnému rozluštění, aktivuje se méně α -amylasy a dojde ke špatnému zcukření rmutu. Kdežto β -amylasy jsou v malé míře přítomné v zrně ječmene, či pšenice

a v 1. den klíčení dochází ke ztrátám, protože tvorba tohoto enzymu je spojená s dýcháním. Z toho je zřejmé, že musí dobře fungovat odvětrávání hned první den klíčení. Druhý a třetí den klíčení se aktivita β -amylasy výrazně zvýší. [8] [10] [11] [28]

Vzhledem k tomu, že dýchání i nárůst enzymové aktivity probíhají současně, pak z toho vyplývá, že dostatečná přítomnost kyslíku během máčení a na počátku klíčení je důležitá k tvorbě sladů o vysokém obsahu enzymů. Zároveň dochází také ke ztrátám nízkomolekulárních produktů štěpení na výživu zárodku a tvorbu nových buněk střílky a kořínku. [8]

Čím déle se nechá zrna klíčit, tím vyšší výtěžnost amylolytických enzymů, především α -amylasy bude. Tohoto faktu se využívá např. při výrobě lihovarských sladů. Množství amylas vzniklé během klíčení závisí na mnoha faktorech, jako je odrůda, klimatické podmínky v daném roce, množství přítomného kyslíku či obsahu vody. Bylo zjištěno, že vyšší stupeň domočení v zeleném sladu podporuje tvorbu amylas. Další faktory ovlivňující růst aktivity amylas jsou vyšší teploty při máčení a klíčení, ale ty mají nevýhodu snížení celkového množství enzymů. Správný sladař musí optimalizovat proces dýchání, vnitřní přeměnu zrna a výstavbu nových buněk, aby vyrobil slad, který bude pokud možno co nejkvalitnější, bude mít nejvíce enzymů, největší výtěžek a výroba bude nejlevnější. [8] [13] [14] [30]

2.1.6.1 Klasické a moderní sladovací postupy klíčení

Jak už bylo zmíněno výše, klíčení probíhá dvěma způsoby – na humnech nebo pneumaticky. Namočený ječmen na požadovaný stupeň domočení je převeden z nádurníků do prostředí, ve kterém dochází k řízenému klíčení zrna. Starší, tradičnější způsob sladování je na humnech. Humna jsou dobře větrané velké sklepní prostory s téměř konstantní teplotou a vysokou relativní vlhkostí vzduchu, která zamezuje vysychání zrna. Obilky se rozprostírají na podlaze v nízkých vrstvách a při tlumeném světle a teplotě ne vyšší než 15° C zde klíčí. Oschlá hromada se ihned obrací. Je důležité vrstvu zrn pravidelně, alespoň 2x denně převracet, aby se provzdušnila a také nedocházelo k prorůstání klíčících zrn. Navíc se takto reguluje teplota a zrna se nepřehřívají a odvádí se hromadící se oxid uhličitý. V současnosti se k obracení sladu na humnech používají k tomu určené různé "traktorky" a obracecí vozíky – maltomobily. Nevýhodou klíčení na humnech je závislost na okolní teplotě, takže se sladuje většinou v zimě, kdy nejsou mrazy. [13] [19] [23] [28] [32]

Aktuálně používanější a modernější způsob klíčení je pneumatické klíčení, které probíhá v bubnových nebo skříňových klíčidlech. Bubnová klíčidla se používala v minulosti a v současné době nejsou v ČR využívána. Mezi skříňová klíčidla patří Saladinova skříň, posuvná hromada, systém Lausmann a kruhové klíčidlo. Nejběžnějším typem skříňového klíčidla je Saladinova skříň. Jedná se o betonové žlaby s dvojitým dnem, přičemž druhé dno je pórovitý rošt, a mezi dny je uloženo dmýhací zařízení, které zespodu provzdušňuje klíčící hromadu. Pro správné klíčení je nezbytné, aby zrna nevyschla. V Saladinových skříních dochází ke zkrápění a obracení současně, čímž se zamezí udušení a přemočení zrna. Pro pneumatický způsob je charakteristické klíčení ve vysoké vrstvě, která se prohání proudem uměle vlhčeného a ochlazeného vzduchu. Tento proud vlastně slouží jako jediná regulace teploty, vlhkosti a aerace. Nevýhodou klíčení ve vysoké vrstvě je tlak na obilky vespod, který zpomaluje klíčení a při omezené dýchací možnosti zpomalení tvorby kořínků. Zároveň u tohoto způsobu klíčení jsou nižší ztráty, než u humnového klíčení. [19] [23] [28] [30]

Po dostatečném naklíčení, kdy výsledným produktem je zelený slad, se prování nastírání, tedy doprava sladu na lísky hvozdů. Hvozd má k dispozici sběrný kanál, a šnekový dopravník přesunul slad do hvozdů. [23]

2.1.6.2 Průběh klíčení z hlediska teploty

Pokud se vezme v úvahu teplotní průběh klíčení, pak se dá rozlišit klíčení při konstantní teplotě, při vzestupné, při sestupné a při vzestupně-sestupné teplotě. Při konstantním klíčení je teplota neměnná a může být nízká, např. když se zpracovávají porostlé ječmeny, střední, nebo vysoká, když má zrno vysoký obsah proteinů. U klíčení při vzestupné teplotě dochází k růstu asi o 1 °C za den. Tento způsob technologie odpovídá přirozenému klíčení na humnech a je téměř energeticky nenáročný. Při klíčení při sestupné teplotě dochází k poklesu od druhého dne při současném růstu stupně domočení zrna. Naproti tomu klíčení při vzestupně-sestupné teplotě je metoda sladování, při níž se využívá nejdříve zvýšení teploty k rychlejšímu nástupu klíčení, a pak, ve druhé polovině klíčení se postupně ochlazuje klíčící hromada, a tím se sníží ztráty. Z hlediska hodnot teploty při klíčení rozeznáváme: klíčení studené – do 12 °C, klíčení při střední teplotě – 14 až 18 °C a teplé klíčení do 22 °C. [8] [30]

2.1.6.3 Fyzikální a chemické zásahy do fyziologického procesu klíčení

Cílem těchto zásahů je zefektivnění a urychlení klíčení a zmenšení sladovacích ztrát. A zkoušejí se uplatnit různé metody zásahů. Některé experimenty jsou výhodné, a u jiných se sníží ztráty na úkor zvýšení jiných látek, které jsou nežádoucí. Prvním způsobem klíčení je omezování růstu a dýchání během dolušťovací fáze. Využívá se válečkování zeleného sladu za nízké teploty, a ztráty se sníží tím, že obilka dýchá vracený vzduch, který je bohatší na oxid uhličitý. Díky menšímu dostatku kyslíku se ztráty sníží až o 3 %. Další zasahující metodou klíčení je použití látek, které omezují růst zrna. Tento proces se provádí rosením zředěné kyseliny dusičné na hromady a tím se omezí růst kořínků a sníží se dýchání. Dojde k výšší výtěžku, snížení ztrát a k rychlejšímu rozluštění. Nevýhodou této metody je vzrůst dusičnanů přítomných v zrně a tím nepříznivý vliv na zdraví a výslednou kvalitu piva. Dalším typem zásahu je použití aktivátorů růstu. Prakticky se zkrápí hromada kyselinou gibberelovou a tím se dá zkrátit délka klíčení o čtvrtinu, zvýší se sladovací výtěžek asi o 2 %, ale prudce stoupne obsah dusičnanů, takže se tato metoda nepoužívá. [8] [11] [16]

2.1.7 Hvozdění zeleného sladu

Po naklíčení se zelený slad (viz *Obrázek 7*) musí zpracovat, protože má vysoký obsah vody a ještě neobsahuje látky, které jsou pro hotový slad charakteristické. Následuje hvozdění, což je proces, který trvá 1 až 2 dny a během něj se zrno vysuší a zastaví klíčení. Vzniká hotový slad, který se dá už uskladnit. Cílem hvozdění je snížení obsahu vody ve sladu pod 4 %, zastavení vegetačních pochodů při zachování požadované aktivity enzymů a vytvoření žádoucích organoleptických látek, které utvářejí charakter sladu. Jedná se o chuťové, barevné, aromatické a oxidoredukční látky, které vznikají štěpením karamelizací a Maillardovou reakcí sacharidů. Na postupu hvozdění jsou nepřímo závislé vlastnosti piva, jestliže je určují enzymové reakce při rmutování. [1] [6] [13] [30] [33]



Obrázek 7: Zelený slad před hvozděním (zdroj depositphotos.com)

Hvozdění probíhá ve dvou fázích. Nejdříve se zelený slad šetrně suší v nadbytku proudu vlažného vzduchu při teplotě v intervalu 20–60 °C. Druhá fáze probíhá slabším, ale teplejším proudem při teplotě v rozsahu 60–105 °C, přičemž teplota hvozdění se volí podle vyráběného typu sladu. Klasické sušení by sice bylo rychlejší, a nejspíš i levnější, ale nebylo by možné přimět zrno k tomu, aby získalo výše zmíněné požadované organoleptické vlastnosti. [3] [13]

Co se týče biochemických a chemických dějů při hvozdění, má na ně rozhodující vliv teplota a obsah vody. Probíhají tři hlavní fáze: růstová, enzymová a chemická. V první, růstové fázi, se obsah vody pohybuje nad 20 %, teplota hvozdění do 40 °C. Zelený slad dále může klíčit, tedy pokračuje růst kořínků a střílky. Nízké počáteční teploty podporují enzymové hydrolýzy. Podmínky růstu obilek při hvozdění nejsou zcela přesně určeny, předpokládá se ale, že hranice možnosti růstu končí při vlhkosti 20–25 % a teplotě 30–38 °C. Růst zrna je velmi rozličný a záleží na typu vyráběného sladu. Například zrna u sladu plzeňského typu nerostou příliš, protože dojde k rychlému vysušení zeleného sladu v nízké vrstvě za silného tahu vzduchu. Naproti tomu tmavý slad bavorského typu se nastírá do vyšší vrstvy, a při malém tahu vzduchu se voda v zrně déle drží, což je důvod pokračování růstu a dološtění sladu. U světlých sladů je prioritou omezit metabolické změny na minimum. Tím se omezí průběh enzymových hydrolýz, a zároveň se enzymy ochrání před inaktivací. Ale u tmavých sladů je důležité intenzivnější zbarvení a aroma. Proto se metabolické procesy podporují, i když je to na úkor aktivity enzymů, která je vždycky nižší, než u světlých sladů. [6] [8] [11] [35] [38]

U enzymové fáze dojde k zastavení vegetačních dějů, včetně úplného zastavení růstu, a dojde ustrnutí syntetických reakcí provádějící životní proces. Zároveň ale pokračuje sled enzymových reakcí, především hydrolýzy. Teplota hvozdění se pohybuje v rozmezí 40–70 °C, a obsah vody je nižší než 20 %. Zároveň dochází ke štěpení bílkovin a škrobu, přičemž produkty jsou aminokyseliny a jednoduché cukry. [8] [38]

Během poslední chemické fáze – dotahování, probíhá tvorba chuťových, barevných a aromatických produktů – melanoidinů. Chemické reakce probíhají za teploty nad 60 °C a obilka má menší vlhkost než 10 %. Slad nabývá žádoucí barvu a vůni podle výše působící teploty a doby jejího působení. [8] [10]

Dalším důležitým faktorem je stupeň domočení. Vysoké teploty mezi 70 a 80 °C způsobují tím vyšší ztrátu enzymů, čím větší obsah vody zrno má. Většina enzymů se částečně inaktivuje až při dotahovací teplotě a k dramatickým změnám nedojde do 100 °C. Například aktivita endopeptidas roste do 50 °C, ale pak s rostoucí teplotou je téměř konstantní. Exopeptidasy nejdříve prudce rostou, ale na konci hvozdění je jejich aktivita téměř stejná, jako u zeleného sladu. Endo- β -glukanasy a lipasy se v průběhu hvozdění málo poškozují, kdežto fosfatasy se zničí až polovina. Polyfenoloxidas a peroxidasy jsou výrazně

inaktivovány při teplotách nad 80 °C. Nejmenší poškození zaznamenává termostabilnější α -amylasa. Během předsoušení stoupne její aktivita až o 30 %, ale během dotahování, se vrátí na původní hladinu, jako v zeleném sladu. Enzym β -amylasa je termolabilnější a inaktivuje se ve větší míře, než α -amylasa. V hotovém sladu je o 40 % β -amylasy méně, než ve sladu zeleném. Poměr α -amylasy a β -amylasy ve sladu přímo ovlivňuje složení mladiny. Z tohoto odstavce vyplývá, že hvozdění má enormní vliv na aktivitu všech enzymů obsažených v zeleném sladu. [8] [14] [16] [22] [34]

Hvozdění má velký vliv nejen na enzymy, ale i další dusíkaté látky. Především u vysokomolekulárních struktur se mění jejich disperzita, koagulují určité části molekuly, což ovlivní výslednou chuť, pěnivost a stabilitu piva. [13] [14]

Vlhkost zrna při sušení se dá charakterizovat jako volná, vázaná a kritická. Volná nebo-li nevázaná vlhkost znamená, že tekutá složka se nachází na povrchu obilky a je vázaná sorpčními silami, přičemž má stejný parciální tlak, jako vodní pára v tomto prostředí. Takže nevázaná vlhkost je snadno odstranitelná z povrchu. Naproti tomu vázaná vlhkost je voda obsažena ve vnitřních kapilárách zrna, na kterou působí kapilární, chemické a adsorpční síly. Vázaná voda má nižší parciální tlak, než okolní vodní pára a dá se odstranit snížením parciálního tlaku vodní páry na stejnou hodnotu, jakou má vázaná vlhkost a to působením vakua nebo zvýšením teploty okolního vzduchu. Kritická vlhkost nastává při sušení, když je v materiálu přítomná pouze kapilárně, vázaná voda. Tímto bodem dochází k rozdělení fází s konstantní sušící rychlosti od fáze s klesající sušící rychlosti.

Jak už bylo zmíněno výše, hvozdění se provádí proto, že vznikají melanoidiny. Tyto látky tvoří kvalitu a charakter výsledného sladu. Aby došlo k jejich tvorbě, musí proběhnout hluboké rozštěpení škrobu a bílkovin. Naštěpené produkty reagují dvěma způsoby. Dochází buď k Maillardové reakci, nebo karamelizaci. [1] [15] [36]

Maillardova reakce je reakce mezi redukcujícími sacharidy, jako je glukosa, maltosa, arabinosa a xylosa, a aminosloučeninami – hlavně aminokyselinami za vzniku škály produktů Maillardové reakce. Probíhají ve třech fázích: v první fázi dojde ke tvorbě glykosylaminů, ze kterých v druhé fázi vzniknou buď Amadoriho nebo Heynsovým přesmykem hnědé aminodeoxycukry a nastává dehydratace, fragmentace sacharidů a Streckerova degradace aminokyselin. V poslední fázi Maillardovy reakce dochází k tvorbě heterocyklických sloučenin. [1] [35] [36]

Produkty jsou aromatického původu a vykazují určitou vůni a chuť, barvu a redoxní vlastnosti. Mohou působit toxicky, antioxidačně, jako barvivo, či dochucovadlo. Jedná se o reakci neenzymového hnědnutí. K těmto reakcím dochází při tepelných změnách potravin, jako je pražení, sušení, smažení, pečení a vaření. Produkty Maillardovy reakce se souhrnně nazývají melanoidiny, reduktony, melaniny. Většinou jde o látky s vyšší molekulovou relativní hmotností (více než 1000), v počátku reakce vznikají bezbarvé premelanoidiny, v konečné fázi velmi tmavé melanioidiny. S rostoucí teplotou pražení, či sušení jsou produkty Maillardovy reakce čím dál tmavší a jejich vůně se mění z lehké např. oříškové na intenzivní - např. kakaová. Různé typy sladů obsahují rozdílná množství a druh produktů Maillardovy reakce. [25] [35] [36]

Druhý typ chemické reakce, která vzniká při hvozdění, je rovněž reakce neenzymového hnědnutí – karamelizace. Při této reakci dochází k termolýze cukerného skeletu a vznikají těkavé a netěkavé látky. Netěkavé látky kondenzují a vznikají hnědé karamely. Jedná se

o bezdusíkaté aromatické látky, jejichž vznik je závislý na teplotě. Hnědá barva je výsledkem tří skupin polymerů: karamelanu, který má 24 uhlíků ve skeletu, karamelenu – 36 uhlíků a karamelinů – 125 uhlíků. Stupeň karamelizace je závislý na pH. Nejméně cukry karamelizují při neutrálním pH a nejvíce při velmi zásaditém nebo kyselém. [25] [35] [37]

Produkty obou reakcí kromě organoleptických vlastností mají také redoxní vlastnosti, které zlepšují koloidní stabilitu piva a svým zbarvením vytvářejí typickou barvu sladu následného piva. [8]

2.1.7.1 Technologie hvozdní – klasické a moderní postupy

Proces hvozdní probíhá ve hvozdech, což jsou vysoké budovy s komínem. Dále každý hvozdní obsahuje topeniště, kalorifery, rekuperátory tepla, lísky, větrací systém a regulační prvky hvozdní. Kdysi se používaly dvoulískové hvozdy, v současnosti jsou běžnější jednolískové hvozdy vysokovýkonné s ekonomickým provozem nebo hvozdy tandemové. Zelený slad se nastírá šnekovým dopravníkem ve vrstvě 20–40 cm na lísku, což je prostor s perforovaným ocelovým dnem, kterým ze spodu proudí sušící vzduch. Tloušťka vrstvy na lísce musí být stejná, aby docházelo k jednotnému hvozdní. [2] [8]

Hvozdy je možné rozlišit podle mnoha kritérií: podle uspořádání lísek dělí se hvozdy na horizontální a vertikální. Když se vezme v úvahu počet lísek, dají se rozlišit hvozdy na jednolískové, dvoulískové a trojlískové. Podle zatížení lísek se hvozdy dělí na běžné, normální a vysokovýkonné, podle způsobu a druhu ohřevu se rozdělují na hvozdy s přímým nebo nepřímým ohřevem; na hvozdy plynové, parní, horkovodní. Hvozdy podle plynulosti procesu se rozlišují na periodicky pracující, semikontinuální či kontinuální, které bývají pásové a šachtové hvozdy. [1] [13] [28]

Jestliže výroba sladu plzeňského typu probíhá na tradičních dvoulískových hvozdech, pak zelený slad se nejdříve nastře na horní lísku, kde dochází k 12hodinovému sušení, v první polovině při 40 °C a pak při 60 °C, obsah vody klesne pod 10 % a slad se přesouvá na spodní lísku, kde je celkem 12 hodin a začíná se sušit na 60 °C, po 3–4 hodinách se teplota zvýší na 70 °C a poslední v části se slad dotahuje při 80 °C. Jedná se o systém hvozdní 2x12 hodin. V současnosti jsou více využívané moderní jednolískové vysokovýkonné hvozdy, a slad plzeňského typu se vyrábí systémem 1x18 až 1x22 hodin. Hvozdní probíhá podobně, jako u dvoulískového hvozdu, až na to, že nastírací vrstva je vyšší - v rozmezí 50–120 cm, takže je nutné intenzivnější větrání. Tímto způsobem hvozdní se dosáhne většího rozluštění a zmenší se vyložená manuální práce, protože se slad nastírá pouze jednou. [8] [14] [15] [38]

Slad bavorského typu se hvozdní systémem 2x24 hodin. Hvozdní na horní lísce probíhá podobně, jako u sladu plzeňského typu. Až dosáhne 60 °C a vlhkost pod 10 %, nastře se na spodní lísky a se zvýší teplota na 70 °C a vláhla klesne na 5 %. Nakonec se dotahuje při 100–105 °C. Na konci hvozdní slad obsahuje pouze 3–4 % vody. Odhvozdný slad se sklápí do košů a dopravuje k odkličovače, kde se zbavuje kořínků – sladového květu. [8] [15]

2.1.8 Úprava sladu

Aby se slad mohl uskladnit nebo dále zpracovat, musí se provést konečné úpravy, jako je ochlazení, odkličování, přečištění a zvažení. [1]

2.1.8.1 Ochlazení sladu

Jakmile skončí hvozdní, slad je pořád horký, má dotahovací teplotu, a může mít klidně i přes 100 °C, pokud je to tmavý slad. Musí dojít k co nejrychlejšímu ochlazení, aby se

zastavily hvozdící pochody, jako inaktivace enzymů a tmavnutí zrna. Zchlazení probíhá buď na hvozdu nebo v odkličovacím zařízení. Další vliv na ochlazení sladu má délka dopravníku z hvozdu do odkličovacího zařízení [1] [23]

U moderních jednolískových vysokokapacitních hvozdů se slad chladí silným proudem chladného vratného vzduchu. U dvoulískových hvozdů díky zastaralé technologii není možné slad tak efektivně chladit, jako u jednolískových vysokovýkonných hvozdů. Dá se ochladit pouze množství ve sběrném koši. A proto ochlazení probíhá ve dvou fázích. Nejprve se teplota odhvozděného sladu sníží ve sběrném koši na 35 °C a v druhé fázi se během odkličování zrno dochladí na pokojovou teplotu, tedy 20–25 °C. [1] [15] [23]

2.1.8.2 Odkličování sladu

Částečně nebo zcela vychlazený slad se na odkličovače zbaví kořínků a střílky – sladového květu (viz *Obrázek 8*), které by analyticky a organolepticky znehodnocovaly slad a budoucí pivo. Oddělení sladového květu je velmi důležité z toho důvodu, že odhvozděné klíčky jsou hygroskopické, tedy pohlcují vzdušnou vlhkost a slad by se nedal uskladnit. Proto musí odkličování proběhnout rychle, jinak by se klíčky špatně oddělovaly. [2] [11] [15]

Sladový květ je nejcennější odpad, který vzniká při sladování. Protože díky vysokému obsahu biologicky aktivních látek, je vyhledávaná surovina, která se dá dále použít v droždárnách, k přípravě léčiv a výživných krmiv. Množství sladového květu závisí na době klíčení – jak moc se nechalo zrno narůst. U sladu plzeňského typu tvoří asi 3–5 % z celkového objemu obilky a u sladu bavorského typu až 5,5 %. Složení sladového květu je závislé na technologickém zpracování a použité odrůdě. Obecně je možné říct, že rychlejší růst kořínků a střílky, který nastal díky vyšší hvozdící teplotě a stupni domočení, má menší celkový obsah dusíkatých látek. Sladový květ obsahuje 7–10 % vody, 24–34 % dusíkatých látek, 35–47 % bezdusíkatého extraktu, 1,5–2,3 % tuku, 8,5–12 % vlákniny 6–7,5 % popele. Kromě těchto látek je usušený sladový květ bohatý zdrojem škály aminokyselin vyskytující se v zrna, organických kyselin, vitamínů A₁, A₂, B₁, B₂, B₆, C, D a E. a dalších hodnotných látek. [11] [14] [15] [23] [39]



Obrázek 8: Sladový květ (vlastní foto)

Pro odkličování se používají bubnová lištová, šneková a pneumatická odkličovací zařízení. Bubnová lištová odkličovačla tvoří na pevně uložený válec, ve kterém je na hřídeli pomalu se otáčející perforovaná růžice, a v ní je upevněn systém rychleji otáčejících lišt - odkličovacích perutí. Rychlosti perutí a růžice se musí seřídit tak, aby se sladový květ nerozměňoval o stěny perforovaného válce. K odkličování dochází pohybem lišt a sladový květ propadává otvory

v perforovaném bubnu na šnekovnici, a je odváděn do pytlů nebo sběrných košů. U šnekové odkličovačky se kořínky a střelka oddělují speciálně upraveným šnekem s perutěmi, přičemž obě součástky rotují vzájemně proti sobě a otíráním se zrno zbaví sladového květu, který propadá do spodního koryta s výpustí. Pneumatické odkličování probíhá tak, že slad po hvozdné putuje sérií pneumatických dopravníků s doplňkovým čistícím a odprašovacím zařízením. Oddělení klíčků nastává ve dvou separátorech se zabudovaným ventilátorem. V prvním dochází k tření obilek vzájemně o sebe, přičemž se rozdělí těžší zrno sladu a lehký sladový květ, který je přefoukaný do druhého separátoru a oddělí se od sladového květu prach. [1] [11] [15] [19]

2.1.8.3 Čištění (polírování) sladu

Hotový slad se před naskladněním nebo vyvážením čistí, či leští. Cílem polírování je zvýšení výtěžku a čistoty hotového sladu a dodat zrnům atraktivnější vzhled. Tento proces se provádí proto, aby se slad zbavil zbytků sladového květu, prachu a rozdrčených nebo slabších zrn. Hotový slad má poté lepší chuť a vzhled. K přečištění se používají různé aspirátory, kartáčové polírky, kde obilky jsou na pásu mezi dvěma kartáči, a leštičky. Celkové ztráty po čištění jsou přibližně 0,5–1,5 %. [1] [11]

2.1.8.4 Skladování sladu

Hotový odkličený slad putuje na uskladnění, kde se nechá v klidu odležet minimálně měsíc. Pouze výjimečně se začne zpracovávat čerstvý slad, a to tehdy když je nutné mletí za vlhka a slad se kondiciuje. Kdyby se používal pro výrobu piva čerstvý slad, pak by díky nízké vlhkosti a křehkým pluchám nastal problém při scezování sladiny. Skladováním se zvedne vlhkost asi na 4–5 %, čímž se zrno stane více pružnější, a tím dokáže zrno držet pohromadě a nedrolí se. [1] [11]

Skladování sladu probíhá na sladových půdách (sýpkách), dřevěných nebo ocelových skříních a v silech. Sladové půdy jsou rozsáhlé prostory se zděnou obvodovou konstrukcí, vnitřní dřevěnou nebo ocelovou nosnou kostrou se zdobnými sloupy a malými okny navazující přímo na hvozď. Tento způsob skladování patří k nejstarším, a používají jej malé pivovary, které chtějí vyrábět pivo tradičně. Je důležité zajištění dobrého větrání, aby se nehromadila vysoká vlhkost a slad nezačal plesnivět, a zamezení přístupu škůdců a ptáků. Skladování ve skříních je výhodné, protože zabírá méně místa, a výška vrstvy sladu se pohybuje okolo 3 až 6 m. Vysoké skříně se musí vyztužit, protože takové množství sladu má vysoký statický tlak. Nejmodernějším a v současnosti nepoužívanějším způsobem uskladnění sladu je skladování v silech. Jedná se o obvykle železobetonové nebo ocelové stavby, které seskládají z více prostorových částí se samostatnými kónusy a jsou opatřeny automatickými regulacemi teploty, vlhkosti a dalších kritérií, jako plnění, vyprazdňování a čištění. Výhodou je, že se dá na malé ploše uskladnit vysoká vrstva sladu. Výška sila může být až 110 m, a skladovací kapacita 300–500 tun, takže pokud je silo plné, slad téměř nemůže zvlhnout. [1] [3] [11] [15] [30]

Špatně odhvozdný, odkličený slad, či slad obsahující prach by se mohl sám vznítit a vyvolat požár. Při porovnání oceli a železobetonu má železobeton výhodu nízkou tepelnou vodivost a tím lepší odolnost proti požárům, jejich stavba je však pomalá a drahá. [3]

2.1.9 Hodnocení jakosti sladu

Na tom, jak je slad kvalitní, závisí i kvalita výsledného produktu, tedy piva. Proto se provádí hodnocení jakosti sladu. To spočívá v provedení senzorického, mechanického

a fyzikálního, biochemického a chemického rozboru. Většinu zkoumaných parametrů je možné zjistit z kongresní sladiny, připravené kongresním způsobem rmutování jemné sladové moučky. Metody základních i doporučených kritérií jsou zpracované v dané literatuře (Analytica EBC, nebo Pivovarsko-sladařská analytika aj.). [1] [46] [47] [48] [49]

Senzorické a subjektivní posouzení sladu znamená hodnocení vůně, barvy, lesku, čistoty, tvaru a velikosti zrna, délky stříčky a napadení škůdci. Informace z mechanického a fyzikálního rozboru jsou důležité pro zpracovatelnost sladu, optimální využití extraktu a průběh výroby piva. Mechanické posouzení zahrnuje třídění sladu, objemovou hmotnost (tj. hmotnost 1 hektolitrů zrna) a hmotnost tisíce zrn. Dalším kritériem mechanického posouzení je vzhled endospermu, kde je nutné zjistit poměr moučnatých a sklovitých zrn a křehkost zrn. Pak tady patří i rozdíl v extraktu v jemném a hrubém mletí, stanovení pH a viskozity. Chemický rozbor je nutný pro získání chemických, biochemických a kvalitativních ukazatelů sladu. Chemická analýza sladu zahrnuje stanovení obsahu vody, obsahu škrobu i neškrobových polysacharidů, dusíkatých látek, lipidů, polyfenolů a dalších sloučenin obsažených ve sladu. Některé analýzy se provádějí automaticky, jiné dle požadavků zadavatele. [1] [24] [45] [46] [47]

2.1.10 Druhy sladu

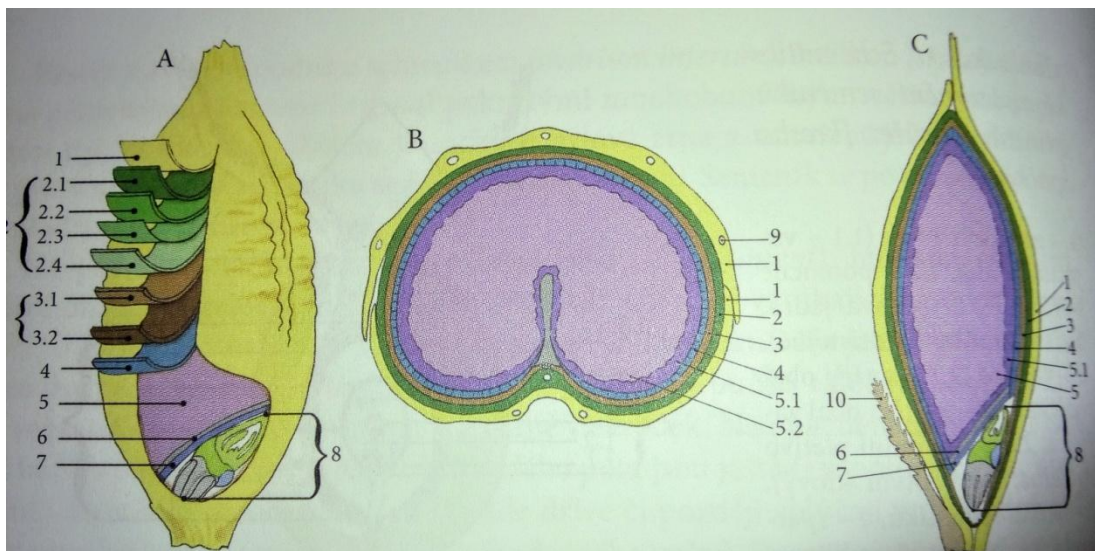
Slady je možné dělit podle barvy nebo druhu či použité obilniny. Slady podle barvy se dělí na světlé, tmavé a mezitypy, podle druhu na slad plzeňský, bavorský, vídeňský a skupinu speciálních. Podle použité obilniny se nejčastěji vyrábí ječný a pšeničný slad. Jednotlivé druhy sladů s charakteristickými vlastnostmi se získávají různou úpravou technologických podmínek při sladování. V celosvětové produkci převažují slady ječné a v menší míře pšeničné. Pro nepivovarské účely se vyrábějí slady kukuřičné, jáhelné, rýžové, ovesné a jiné.

Nejvíce vyráběný slad je světlý slad plzeňského typu pro světlá piva a tmavé slady bavorského typu pro piva tmavá. Typy speciálních sladů se používají k zvýraznění určitých vlastností základních typů piva, jako je barva a chuť, či pro tvorbu speciálních a netradičních piv. Pro výrobu piva se používá převážně slad z jarního ječmene. [1] [4] [13] [14] [17]

2.1.10.1 Surovina pro výrobu sladu – sladovnícký ječmen

Pro výrobu ječného sladu se používá kulturně pěstovaný ječmen setý (*Hordeum vulgare L.*), který musí mít určité vlastnosti. Ječmen je jednoletá rostlina z čeledi lipnicovitých, vysoká 40–110 cm a vyskytuje se v mnoha odrůdách, které se podle doby pěstování dělí na jarní nebo ozim. Stonek tvoří duté stéblo s kolénky a má dlouhé objímavé listy. Květenství je dvouřadý nebo víceřadý (čtyřřadý a šestiřadý) klas asi s 5–15 cm dlouhými osinami. Květ a později plod – obilka, jsou chráněny pluchou. Anatomie ječné obilky je popsána na *Obrázku 9*. [3] [17] [30] [55]

Ječné zrnko se skládá především ze sacharidů (75–84 %) hlavně ze škrobu (55–71 %) a β -glukanů (1–4 %), dále z bílkovin (8–14 %), v menší míře z tuků (cca 1,9–3 %) a dalších látek. Důležitý je i obsah vitaminů (zejména skupiny B a E, kyselina pantotenová, listová a biotin) a minerálních látek (přibližně 2 %), zvláště křemičitanů, vápníku a fosforu, železo a selen. Dále jsou zde obsaženy i inhibitory enzymů a dalších důležitých látek. [1] [8] [30] [34]



Obrázek 9: Anatomie ječné obilky: Část A - schematické znázornění anatomických struktur; B - příčný řez; C - podélný řez; 1 - plucha, 2 - oplodí (2.1 - epidermis, 2.2 - hypodermis, 2.3 - mezokarp, 2.4 - endokarp), 3 - osemení (3.1 - osemení, 3.2 - hyalinní vrstva), 4 - aleuronová vrstva, 5 - endosperm (5.1 - subaleuronová vrstva, 5.2 - škrobový endosperm), 6 - vrstva stlačených buněk, 7 - štítek, 8 - zárodek, 9 - cévní svazek, 10 - štětička (zdroj překresleno Špačkovou podle Briggse)

Pro sladovnické účely se používají převážně odrůdy ječmene jarního dvouřadého. Hlavními oblastmi pěstování sladovnického ječmene jsou Haná, Lounsko, Žatecko a Polabí. Důležité znaky pro ječmen určený k sladování a později i slad jsou odrůdová i mikrobiální čistota (žádná plíseň), kvalita vytřídění, barva pluchy (slámově žlutá), vlhkost, klíčivost, obsah dusíkatých látek v sušině, obsah polysacharidů. Další parametr je tvar a neporušenost zrna, kde ideální je neporušené kratší a baculatější zrno, protože se lépe luští. Barva ječmene je slámově žlutá, rovnoměrná a s lesklými povrchovými částmi. Vůně má být čistá a čerstvá, ne zatuchlá. Zrno by mělo být moučné, ne sklovité. S tímto parametrem souvisí také hustota, kde nižší hustota znamená menší sklovitost. Zároveň důležitá je tvrdost zrna, která závisí na odrůdě a vegetačních podmínkách, přičemž velká tvrdost znamená špatné rozluštění. [1] [8] [27] [30] [43] [45]

2.1.10.2 Slad plzeňského typu

V současnosti se vyrábí plzeňský slad nejvíce v celosvětovém měřítku. Slouží k výrobě světlého piva typu ležák, konzumních piv, lehkých piv a speciálních piv s různou koncentrací mladiny. Tento slad je charakteristický nižší barvou po povaření, nižší hodnotou barvy kongresní sladiny, přiměřeným proteolytickým i cytologickým rozluštěním, dostatečnou aktivitou amylolytických enzymů, které zajistí perfektní zcukření. Pokud se tento slad používá na výrobu méně prokvašených piv, jedná se tedy o česká tradiční piva, pak se vybírá slad s nižším Kolbachovým číslem v rozmezí 31–41 %, vyšší barvou, optimem neoxidovaných polyfenolových sloučenin, a sníženou aktivitou lipoxygenas. [1] [4] [24] [43]

2.1.10.3 Slad vídeňského typu

Vídeňský slad je přechodným typem mezi plzeňským a bavorským sladem a oproti světlému sladu má asi 2× vyšší barvu a výraznější aroma. Používá se při výrobě tmavých a speciálních piv. V současnosti se moc nevyrábí. Během sladování ječmen klíčí déle a jinak se hvozdí. [1]

2.1.10.4 Slad bavorského typu

Když se mluví o bavorském nebo mnichovském sladu, pak se jedná o slad, který má tmavou barvu, (barva kongresní sladiny dosahuje 11–17 jednotek EBC, takže má vyšší koncentraci produktů Maillardovy reakce), výrazné aroma, vyšší obsah bílkovin, lepší proteolytické rozluštění, nižší extraktivnost a nižší aktivitu enzymů než plzeňský slad. Dotahovací teploty jsou okolo 100–105 °C. Používá se k výrobě tmavých piv. [1] [14] [43]

2.1.10.5 Pšeničný slad

Pšeničné slady se používají se pro výrobu pšeničných piv, speciálních piv, jako je typ Lambic atd. Pšeničný slad zajišťuje určité variace chuťových vjemů, podporuje pěnovost. V současnosti se pšenice pro sladařské účely na území ČR zdaleka nezpracovává tolik, jako v minulých stoletích, kdy převažovala výroba bílých svrchně kvašených piv. Větší "boom" má pšeničný slad v Belgii a Německu. [1] [5] [43]

Pšeničné slady se vyrábějí z pšenice seté (*Triticum aestivum*). Jedná se o jednoletou někdy dvouletou rostlinu z čeledi lipnicovité, která dorůstá výšky 40–110 cm. Stonek tvoří duté stéblo s kolénky, drsné čárkované listy mají ouška a prodloužené jazýčky, květenství je čtyřhranný lichoklas bez osin dlouhý 4–16 cm s dvouřadým nebo čtyřřadým květem. Klásky jsou husté a ploché. Pleva má vejčitý tvar. Plod jsou nahé objemné obilky dlouhé cca 8 mm a široké 4 mm oválného tvaru na průřezu oblé s podélnou rýhou. Pšeničná obilka obsahuje přibližně 50–70 % škrobu, asi 13 % vody, 1,6–2,0 % hrubé vlákniny 8–13 % bílkovin, 1,5–3 % tuku, 1–2 % popele, vitamíny skupiny B a E a v malém množství také β -karoten. Pšenice patří k nejrozšířeněji pěstovaným obilninám v Evropě a pěstuje se na teplých půdách bohatých na živiny a vláhu. Má mnoho odrůd, které se pěstují jako jarní nebo ozimové. [55] [56]

Pšeničné slady se vyrábějí obdobně jako slady z ječmene, ale klíčí kratší dobu a suší se při nižších nebo stejných teplotách, jako slad plzeňského typu. Tmavé pšeničné slady se dotahují při 100 až 110 °C. Barva sladiny u světlých sladů je 3–4 j. EBC a u tmavých 15–17 j. EBC. Taky zde záleží na kvalitě pšenice a obsahu škrobu a bílkovin. U pšeničného škrobu je důležitý poměr amylosy a amylopektinu. Obsah bílkovin ovlivní hodnotu Kolbachova čísla a proteolytické aktivity. Během proteolytického rozluštění probíhá štěpení bílkovin podobně, jako u ječmene. Specifické složení pšeničného sladu se projeví i na vzhledu a povaze piva. Např. poměr lepku a polyfenolů způsobuje zákal, který je charakteristický pro pšeničná piva. Nevýhoda je, že pšenice zhoršuje průběh zcezení, filtrovatelnost a koloidní stabilitu při výrobě piva. [1] [13] [22] [44]

Kritéria pšeničných sladů se hodnotí velmi podobně jako u ječných sladů. V rámci složení zrna se stanovuje obsah vody, proteolytické rozluštění (obsah celkových a rozpustných dusíkatých látek a Kolbachovo číslo) amylolytické rozluštění (obsah škrobu, aktivita α - a β -amylasy), cytolytické rozluštění (friabilita – křehost). Dalším zkoumaným kritériem je extrakt sladu získaný kongresním způsobem rmutování, a jeho analýzy, která zahrnuje stanovení viskozity, čirosti sladiny (nefelometricky i vizuálně), barvy sladiny např. kolorimetricky či kyselosti sladiny. V současnosti se vyhodnocují naměřené výsledky porovnáním s databázemi, které se vytvořily v mikrosladovnách (viz *Obrázek 10*), které slouží pro různé sladovací experimenty. Slady pro tuto práci byly připravené v mikrosladovně, což je nerezová plně automatizovaná skříň s lískami z perforovaného dna, kde probíhalo pneumatické sladování, přičemž možný objem vzorků je 1 - 20 kg. [1] [24] [46] [47]



Obrázek 10: Sladování v boxech mikroskladovny. (vlastní foto)

2.1.10.6 Speciální slady

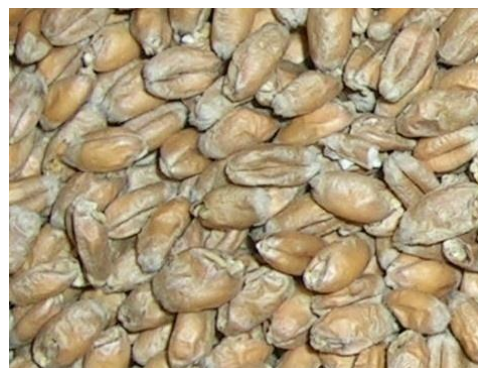
Speciální slady jsou vhodné k výrobě speciálních piv, tmavých piv nebo k úpravě a zlepšení vlastností u světlých piv, jako jsou sensorické vlastnosti či pěnivost. Mají různou enzymovou aktivitu, redoxní kapacitu, kyselost, barvu a vůni. Můžeme rozlišit následující speciální slady: **diastatické** (díky vyššímu obsahu dusíkatých látek se používají při zpracování enzymově chudých sladů, nebo při sladových náhražkách), **karamelové** (obsahují vysoký obsah aromatických a barevných látek), **barvicí** (používají se při výrobě silně tmavých piv, připravují se z hotových navlhčených sladů upražených při 225 °C patří zde např. čokoládový slad), **melanoidní** (používají se při výrobě tmavých piv a vysoká barva se docílí intenzivnějším průběhem Maillardovy reakce), **nakuřované** (slady - vyrábějí se pro přípravu whisky skotského typu ve specializovaných sladovnách z ječného sladu sušeného přímými spaliny rašeliny), **kyselé – proteolytické** (používají se pokud je potřeba okyselit pivo), **bezlepkové, krátké** (klíčí kratší dobu a "vyvažují" přelustěné slady), slady zvyšující redoxní kapacitu (oddalují stárnutí chuti piva při skladování, vyrábějí se zintenzivněním Maillardovy reakce, takže její produkty působí redoxně), aj. [1] [19] [43]

2.1.10.7 Rozdíl mezi pšeničným a ječným sladem

Jak už bylo výše zmíněno, slad v našich končinách se vyrábí především z ječmene. Tato práce pojednává o pšeničných sladech (viz *Obrázek 11-B*), a proto je tato kapitola zaměřená na porovnání rozdílu mezi slady. Jako modelový ječný slad byl použitý slad plzeňského typu (*Obrázek 11-A*). Pšeničný slad oproti ječnému obsahuje o 4–5 % více extraktu, má vyšší obsah dusíkatých a polysacharidových látek, což podporuje pomnožení kvasnic. Dále pšenice nemá pluchu, její obilky jsou nahé. Rozdíl je také ve stupni domočení. Pšenice snáze přijímá vodu, na počátku máčení 37–38 %, na konci až 48 % vody. Pšenice se hůř sladuje, než ječmen, má nižší teplotu klíčení a na konci vzroste na 17–20 °C. Další změny jsou patrné z *Tabulky 2*.



A - Ječný slad (světlý)



B - Pšeničný slad (světlý)

Obrázek 11: Ječný a pšeničný slad (zdroj svet-piva.cz)

Tabulka 2: Porovnání parametrů ječného plzeňského a pšeničného světlého sladu

Parametr	Ječmen	Pšenice
Obsah vody [%]	3,0–5,8	4,8–8
Extrakt v sušině [%]	78–83	81–86
pH sladiny	5,5–6,0	5,8–6,5
Viskozita sladiny [mPa.s]	1,4–1,8	1,5–2,2
Hustota sladiny	1,10–1,18	1,0–1,07
Čiřost sladiny	Do 5	Do 5
Barva kongresní sladiny [j. EBC]	2,7–4,2	3,5–8,0
Rozdíl extraktu v jemném a hrubém mletí	1,1–2,9	1–2,0
Doba zcukření [min]	5–15	7,5–22,5
Friabilita [%]	75–90	-
Diastatická mohutnost [j. W.K.]	150–300	250–450
Celkový obsah bílkovin [%]	9,5–11,5	11–17
Kolbachovo číslo [%]	35–45	30–37

2.2 Enzymy

2.2.1 Enzymy obecně

Živý organismus je místo obrovské biologické aktivity, kterému se říká metabolismus. Jeho průběh zajišťují metabolické dráhy, což je sled chemických a fyzikálních reakcí, které musí proběhnout rychle a za normálních, fyziologických podmínek. Kdyby se tyto reakce měly připravit mimo buňku, pak by probíhaly za velmi drsných podmínek, jako je extrémní teplota, pH a tlak. V živé buňce není možné nastolit takové podmínky, aniž by buňka přežila, a proto se pro uskutečnění nutných reakcí životního procesu používají enzymy, které slouží jako biokatalyzátory. Každá katalýza spočívá ve snížení aktivační energie a tím umožnění průběhu dané reakce. Enzym katalyzuje chemický děj tak, že sám se reverzibilně naváže na substrát a přemění jej na produkt. Biokatalyzátor je mnohokrát účinnější, než chemický katalyzátor. Rychlost enzymové reakce je 10^8 až 10^{14} krát vyšší než nekatalyzovaná reakce. Enzym charakterizuje aktivita, rychlost, selektivita, specifita, a regulovatelnost. [8] [25] [40] [41]

Aktivita enzymu se určuje změřením rychlosti enzymaticky katalyzované reakce, kde rychlost je definována jako změna látkového množství substrátu nebo produktu za čas.

Aktivitu daného enzymu je možné vyjádřit třemi způsoby, a to v kataltech, v mezinárodních jednotkách, nebo jako molekulární aktivita. Jeden katal $[\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}]$ odpovídá množství enzymu, které přemění 1 mol substrátu na produkt za 1 sekundu. Mezinárodní jednotka (International Unit) – IU $[\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}]$ odpovídá množství enzymu, které přemění při 30 °C za vhodných podmínek 1 μmol substrátu na produkt za 1 minutu. Molekulární aktivita $[\text{s}^{-1}]$ představuje počet molekul substrátu, které přemění 1 molekula enzymu za 1 sekundu. [8] [25] [40]

Specifita enzymů je dána unikátním uspořádáním vazebného místa v aktivním centru enzymu. Aktivní centrum je místo probíhající reakce a vazebné místo je místo, kde se váže substrát. Specifita enzymů je velmi vysoká a rozlišují se 2 typy: substrátová specifita, kdy enzym katalyzuje pouze konkrétní substrát, a specifita účinku, kdy dochází k přeměně stejného substrátu různými enzymy na odlišné produkty. [8] [25] [40]

Regulovat se dají ty enzymy, které se podílejí na reakcích metabolické dráhy omezující rychlost, protože rychlost vícekrokové reakce odpovídá rychlosti nejpomalejšího kroku reakce. Způsobu regulace enzymů je např. genová exprese, allosterie, aktivace a deaktivace enzymu, změna koncentrace reagentů či vlastností okolního prostředí. [8] [25]

Enzymy jsou z chemického hlediska bílkoviny, takže mají primární až kvartérní strukturu a dají se rozdělit na jednoduché a složené. Jednoduché enzymy tvoří pouze protein, a složené enzymy – holoenzymy tvoří kromě bílkoviny i složka nebílkovinné povahy – kofaktor. Podle způsobu vazby kofaktoru k enzymové části – apoenzymu, která je sama inaktivní, se rozlišují druhy kofaktorů: prostetická skupina a koenzym. Prostetická skupina se váže na apoenzym pevnou vazbou a kofaktor volně disociuje. [25] [41]

Podle mezinárodní klasifikace enzymů (Enzyme Classification - EC) se enzymy dělí do šesti základních tříd, které obsahují další podtřídy. Názvosloví enzymů se používá systematické, které je odvozeno podle názvu substrátu nebo katalyzované reakce a má koncovku -asa a obsahuje čtyřmístný kód, pod kterým je zařazený v EC. Každý enzym má své pojmenování a je takto jasně definovaný. Další typ názvosloví, který se používá je doporučené, což je běžně používaný nebo dřívější triviální název. [25]

2.2.2 Třídy enzymů

1. Oxidoreduktasy – katalyzují redoxní děje, přenášejí kyslík, vodík, elektrony. Patří sem dehydrogenasy, oxidasy, oxygenasy, hydroxylasy, hydroperoxidasy, polyfenolofydasy, lipoxygenasy aj. Ve sladovnictví jsou důležité mimo jiné během dozrávání, skladování a klíčení zrna.

2. Transferasy – katalyzují přenos funkční skupiny z jednoho substrátu na druhý. Patří zde aminotransferasy, transglykosylasy, transmethylasy či glutamyltransferasa. V sladařství jsou nezbytné při dozrávání ječmene a pšenice v posklizňovém klidu a při klíčení.

3. Hydrolasy – katalyzují hydrolýzu substrátu, tzn. probíhá hydrolytické štěpení substrátu za účasti vody. Patří sem peptidasy, proteasy, lipasy, glykosidasy, nukleasy, fosfatasy a další. Při skladování mají nezastupitelnou úlohu ať při klíčení, rozluštění nebo v dalších procesech výroby piva.

4. Lyasy – katalyzují štěpení a vznik vazeb C-C C-O a C-N bez účasti vody a zajišťují eliminaci skupin za vzniku dvojnásobné vazby. Patří zde dekarboxylasy či aldolasy. Zajišťují životní funkce ve sladu, protože se podílejí na syntézách uhlíku, jako je citrátový cyklus, β -

oxidace mastných kyselin, syntéza škrobu, dusíku, jako syntéza aminokyselin a bílkovin, a dalších látek

5. Isomerasy – katalyzují isomerační reakce. Dělí se na několik skupin, např. cis-trans izomerasy, epimerasy, mutasy, racemasy. U sladování se uplatňují podobně, jako lyasy.

6. Ligasy – katalyzují tvorbu vazby (např. C-O, C-C, C-S, C-N) mezi molekulami substrátu, říká se jí syntethasy a berou energii ze současného štěpení ATP. U ječmene či pšenice jsou nezbytné při syntéze škrobu, aminokyselin a bílkovin. [3] [8] [25] [40] [41] [42]

2.2.3 Úloha enzymů ve sladu

Výroba sladu a piva je zcela závislá na enzymových reakcích, které probíhají ve všech fázích sladování, působí na rozluštění a tvorbě typických vlastností sladu. Ječmen i pšenice obsahují velké množství enzymů, jejich prekurzorů, enzymových stimulátorů nebo inhibitorů. Dalo by se říct, že obilka je proteinovo-sacharidový komplex. Přibližně 80–88 % zrna tvoří sušina a zbytek, tedy 12–20 %, voda. V různých částech zrna je různé množství enzymů. V zárodku je škála všech enzymů hlavně tranferasy, oxidoreduktasy a hydrolasy a z nich amylasy, peptidasy a lipasy. V aleuronové vrstvě se vyskytují exo a endo-peptidasy, transaminasy, oxidoreduktasy, lipasy, fytasa a α -amylasa. V subaleuronové vrstvě je obsažena hlavně β -amylasa. A v endospermu se nachází β -amylasa, fytasa a endopeptidasa. [3] [8] [42]

2.2.4 Hydrolasy

Jak už bylo zmíněno výše, hydrolasy jsou enzymy umožňující štěpení chemických vazeb různých látek (např.: C-O, C-C, C-N,...) na dvě či více jednodušších látek za účasti molekul vody. Jsou to převážně jednoduché proteiny často synteticky připravované pro průmyslové účely. Obecně se jedná o nejdůležitější enzymy vůbec. Ze sladařského pohledu mají nejvyšší prioritu hydrolasy a oxidoreduktasy. Hydrolasy, které nejvíce zajímají sladaře jsou glykosidasy – amylasy, fosfatasy cytolytické, lipolytické a proteasy.[3] [25] [40] [42]

Glykosidasy podle EC mají označení 3.2, je podskupina enzymů, které katalyzují hydrolýzu O- nebo S-glykosidické vazby, které se nacházejí v sacharidech. Díky rozmanité stereochemické struktuře sacharidů i polysacharidů musí být rozličné i příslušné enzymy. Glykosidasy využívají 2 mechanismy účinku katalýzy, kde první je založený na inverzi a druhý na zachování anomerní konfigurace, což je důvod, a proč vznikají dva stereoizomery. Dělí se na oligosacharidasy, polysacharasy a hemicelulasy. [3] [25] [40]

Oligosacharidasy štěpí disacharidy až hexasacharidy na monosacharidy. V obilí je obsažena např. sacharasa štěpící sacharosu na glukosu a fruktosu, nebo maltasa, která štěpí maltosu na dvě glukosy. [3]

Hemicelulasy ječmene někdy nazývané cytasy mají významný vliv ve sladařství, protože se přímo podílejí na rozluštění sladu. V obilce se vyskytují dva hlavní typy – cytolastický a cytolytický. Cytoklastické hemicelulasy se vyskytují už v nenaklíčeném zrna a štěpí hemicelulosový substrát na dextriny, a zástupcem této skupiny je především endo- β -glukonasa a má podobnou funkci, jako α -amylasa. Naproti tomu cytolytické hemicelulasy se syntetizují až během klíčení a štěpí vzniklé dextriny až na redukující cukry. Hlavním zástupcem této skupiny je endo- β -glukonasa. Do skupiny hemicelulas patří také enzymy celulasa, lichenasa, karoubinasa. manasa a xylanasa [3] [25] [41]

Polysacharidasy jsou enzymy štěpící polysacharidy na jednodušší struktury, především mono až oligosacharidy. Dřívější název pro tuto skupinu enzymů byl diastasa. Podskupinou polysacharidas jsou amylolytické enzymy, které jsou popsány v kapitole níže. [3]

2.2.5 Amylasy

Jedná se o enzymy štěpící škrob (lat. *amylum* = škrob) a další polysacharidy, ve kterých se vyskytují O-glykosidové vazby α -1,4, vč. glykogeny. Tyto enzymy mají nezastupitelné průmyslové využití, jsou nejdéle známé a popsané, přesto jejich mechanismus účinku není dosud uspokojivě vysvětlený. Z amylolytických enzymů jsou nejdůležitější α -amylasa, která se vytvoří až při klíčení sladu a β -amylasa, která je přítomná už v rostlině obilniny. Hydrolytické štěpení škrobu zahrnuje ztekucení, dextrinaci a zcukření. Je možné, že činnost amylas doplňuje maltasa a trans-glukosidasy. [3] [8] [42]

2.2.5.1 α -amylasa

Enzym α -amylasa má označení EC 3.2.1.1 a uplatňuje se v obilných výrobcích. Úroveň α -amylasy v zrnech velmi ovlivňuje průmyslové využití. V pivovarském průmyslu je úroveň α -amylasy sladu klíčovým parametrem jeho kvality. Tento enzym patří mezi endoenzymy, protože katalyzuje nepravidelně α -1,4-glykosidické vazby uvnitř řetězců polysacharidů, včetně amylosy i amylopektinu, kromě vnějších vazeb a vazeb následujících po větvení v amylopektinu. První štěpné produkty jsou oligosacharidy se 6–7 jednotkami glukosy, které se při delším působení α -amylasy štěpí dále na maltotriosu, maltosu a glukosu. Aby α -amylasa mohla štěpit amylopektin, potřebuje přítomnost dalších dvou enzymů – hraniční dextrinasy a R-enzymu, které přerušují vazby α -1,6. Maltosu pak rozštěpí enzym maltasa na 2 glukosy. [42]

Působení α -amylasy na škrob způsobí ztekucení, což vede k rychlému poklesu viskozity. Při reakci škrobového mazu s jodem dochází ke snížení intenzity modré barvy během působení α -amylasy. Aktivace α -amylasy se děje v přítomnosti vápenatých, zinečnatých nebo chloridových iontech. Jako inhibitory α -amylasy slouží sírany, železnaté, chromité nebo měďnaté kationty. Optimální pH α -amylázy je v rozmezí 5–7,2, a inaktivuje se při vyšší kyselosti. Její teplotní optimum je při 65–70 °C a inaktivace nastává při 80 °C. Hodnoty pH a teploty jsou vzájemně závislé. Sladová α -amylasa má molekulovou hmotnost okolo 59 000 a tvarově se jedná o globulární enzym, který je rozpustný v solných roztocích. [3] [15] [42]

V zrně v původním stavu se α -amylasa nenachází. Její syntéza nastává v malém množství během máčení, převážně během klíčení působením auxinů a giberelinů. Z nukleových kyselin se na tvorbě α -amylasy podílí více RNA, než DNA. Přesto jsou vlastnosti a obsah tohoto enzymů závislé na odrůdě a podmínkách pěstování včetně klimatických podmínek. [3] [8] [42]

2.2.5.2 β -amylasa

β -amylasa má označení EC 3.2.1.2 a hraje ústřední úlohu při úplné degradaci škrobu na zkvasitelné cukry během klíčení nebo sladování obilných zrn. Enzym β -amylasa působí jako exoenzym, tedy hydrolyzuje α -1,4-glykosidické vazby polysacharidů tak, že odštěpuje maltosové jednotky od neredukujícího konce řetězce polysacharidu za vzniku β -maltosy. Při hydrolyze nastává Waldenův zvrát, kde dochází k přeměně z α -formy na β -formu. [3] [46]

Tento enzym hydrolyzuje amylosu téměř zcela na glukosu a maltosu. Ještě vzniká maltotriosa, která se naštěpí opět na maltosu a glukosu. Naproti tomu amylopektin β -amylasa nehydrolyzuje tak dobře jako amylozu a štěpí jej jen asi z poloviny, protože štěpení končí

před místem větvení. Pokračování hydrolýzy pokračuje v přítomnosti α -amylasy nebo enzymům štěpící vazbu 1,6, tedy hraniční dextrinasy nebo R-enzymu. [46]

Na rozdíl od α -amylasy se β -amylasa nachází v malém množství v zrna v původním stavu a při sladování její aktivita prudce vzroste. Optimální teplota se pohybuje v intervalu od 60 do 60 °C a pH 5,0–5,6. Hodnota aktivity tohoto enzymu závisí na obsahu dusíku v obilce, na odrůdě a klimatických podmínkách. β -amylasa patří mezi albuminy a je rozpustná ve vodě a solných roztocích. Tento enzym je tvořený několika složkami a vyskytuje se v obilce ve dvou fyziologických formách. A to v latentní formě, která je rozpustná ve vodě v přítomnosti reduktonů např. cysteinu nebo volná forma, která je běžně rozpustná ve vodě a solných roztocích. Molekulová hmotnost β -amylasy je asi 54 000. [3] [15] [46] [52]

2.2.5.3 Působení α -amylasy i β -amylasy současně

Při současném působení obou enzymů dochází k hlubší, dokonalejší hydrolýze škrobu, než při působení jen jednoho z nich. Konce řetězců štěpí β -amylasa a vnitřní vazby hydrolyzuje α -amylasa. Rozdílným teplotním optimem lze posílit působení α -amylasy či β -amylasy. [46]

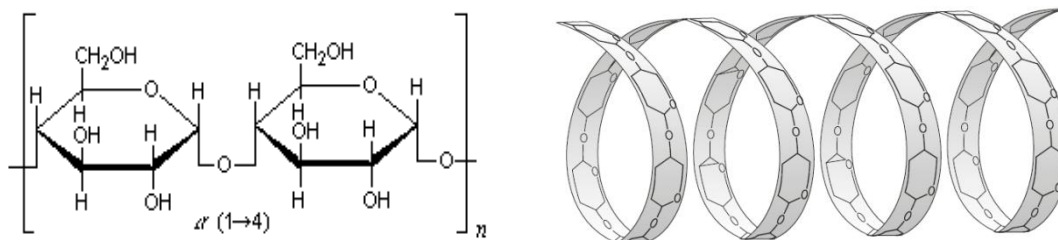
2.2.6 Škrob jako substrát působení enzymů amylas

Rostlinné škroby mají široké uplatnění v chemickém, potravinářském, farmaceutickém odvětví a dalších průmyslech, protože je škrob hydrofilní, bobtnavý, viskózní a má schopnost tvořit film. Škrob se vyskytuje v rostlinných buňkách jako hlavní zásobní polysacharid, a vyskytuje se všech částech rostliny. U semen škrob pomáhá ve fázi klíčení udržet vodní režim osiva a doplňovat potřebné živiny z hnojiva. Prakticky jej lze získat jen z malého počtu druhů rostlin. Technologicky zajímavé jsou hlízy nebo semena, přičemž existuje velký rozdíl hlízovým a semenným škrobem. Průmyslově zpracovávané plodiny, ze kterých se škrob izoluje, jsou brambory, pšenice a kukuřice. [3] [8]

Škrob se vyskytuje se ve formě granulí, nebo-li zrn v cytoplasmě rostlinných buněk. Škrobová zrna mají různé velikosti a struktury charakteristické pro daný rostlinný druh, a díky tomu také různé chemické, fyzikální a koloidní vlastnosti. Škrob v granulích obilnin je většinou monodisperzní, má tak kompaktní strukturu, že neumožňuje velký vstup vody do granule. Škrob je tvořený 2 polysacharidovými řetězci a to amylosou a amylopektinem. Různé rostliny mají rozdílné poměry amylosy a amylopektinu ve škrobovém zrna. U ječmene i pšenice převládá amylopektin, a zbytek hmotnosti granule tvoří amylosa. [3] [8] [42]

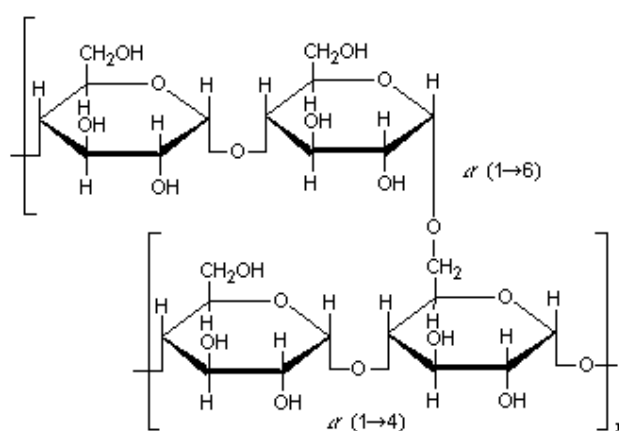
V endospermu obilky se nacházejí dvě velikosti škrobových zrn a to typ A a B. Škrobové granule typu A jsou velké, mají oválný tvar, průměr 10–40 μm , a obsahují 25 % amylosy a 75 % amylopektinu. Vyskytují se vždy volná a nejsou k ničemu vázaná. Přestože granule typu A zastupují z celkového množství škrobových zrn pouze 10–15 %, vykazují vysoký podíl celkové hmotnosti škrobu (přibližně 85–90 %). Granule typu B jsou malé, mají sférický tvar, průměr 1–10 μm a obsahují více amylopektinu, než granule typu A. Vážou se na bílkovinnou matici, ale na rozdíl od granulí typu A jsou špatně degradovatelné. Množství zrn typu B činí 80–90 %, ale jen 10–15 % podílu z celkové hmotnosti škrobu. [8] [41] [42] [57]

Co se týče samotné struktury škrobu, pak α -amylosa je lineární polymer tvořený 600–100000 glukosových jednotek přesněji α -D-glukosy, vázaných vazbami α -(1-4), jak je zřejmé z *Obrázku 12*. Předpokládá se, že řetězec není rovný, ale vytváří šroubovici spojenou vodíkovými můstky (viz *Obrázek 12*). Amylosa ve vodě je rozpustná a v přítomnosti jódu se zbarví modře. A působením β -amylasy se rozštěpí až na maltosu. [8] [25] [42]



Obrázek 12: Vzorec a prostorové uspořádání amylosy (zdroj Moštek 1975 a wikiskripta - H. Hoffmeister)

Amylopektin je rozvětvený řetězec spojený glukosovými jednotkami spojených vazbami α -1-4, a v místě větvení je vazba α -1-6, jak je patrné na *Obrázku 13*. Celková délka amylopektinu, ale přibližný počet glukosových jednotek je 3000 a k větvení dochází přibližně po 24 až 30 jednotkách. Tedy v běžné molekule amylopektinu je přítomných asi 90 α -1,6 vazeb. Relativní molekulová hmotnost amylopektinu se pohybuje mezi 100 000 až 1 000 000. [8] [25] [42]



Obrázek 13: vzorec řetězce amylopektinu (zdroj Moštek 1975)

Škrobový maz vzniká zahříváním škrobové suspenze ve vodě. Nejdříve dochází k bobtnání a pak k mazovatění škrobových granulí, kdy vznikne viskózní gel – škrobový maz. Teplota mazovatění je různá v závislosti na rostlinném druhu. U ječného sladu bývá okolo 50–70 °C a u pšeničného sladu 60–85 °C. Teplota mazovatění není konstantní ani u stejné odrůdy, protože její hodnota závisí na mnoha faktorech, jako je velikost škrobových zrn teplota a pH. Lepší nabobtnání znamená nižší teplotu, při níž zrno mazovatí, zároveň malé granule mazovatí hůře než velké, a nízké a vysoké pH podporují mazovatění. [8] [19]

2.2.7 Obecné podmínky aktivace enzymů

Jak už bylo zmíněno výše, aktivace enzymů závisí na klíčení sladu, během něhož dojde k probuzení obilky z vegetačního klidu. Mezi podmínky umožňující klíčení a tím i aktivaci enzymů patří optimální stupeň domočení, teplota a dostatek kyslíku. Při sladování je stupeň domočení vyšší, pohybuje se v rozmezí 40–48 %, aby voda vydržela až do konce klíčení, kde dochází k bobtnání koloidních látek v buňce. Dojde ke zrychlení metabolismu. Teplota zase ovlivňuje rychlost klíčení. Teplota klíčení bývá v intervalu 10–20 °C. Jestliže zrno obsahuje příliš vody, a působí na něj vyšší teploty, pak umírá. Za běžné situace je dýchání a štěpení bílkovin a sacharidů v dynamické rovnováze, která se cíleně naruší během sladování, pro maximální enzymový výtěžek a co nejnižší ztráty. Glukosa urychluje růst obilky, nikoliv však enzymů. Naopak vysoká koncentrace glukosy působí jako inhibitor aktivovaných enzymů. Aktivace amylas je při klíčení jeden z nejdůležitějších procesů.

2.3 Slad jako krmivo pro zvířata

Přestože enzymy lidstvo využívá vědomě i nevědomě po staletí v kvasných a dalších procesech, využití enzymů ve výživě zvířat je relativně nová myšlenka. První aplikace proběhla v 80. letech minulého století, kdy byl připraven preparát z odpadních enzymů z kvasného průmyslu a podán drůbeži pro lepší využitelnost ječmene. Během krátké doby se vyvinula celá škála aditiv na bázi enzymů určená pro drůbež a v menším měřítku pro prasata. [60] [61] [62]

Enzymy jsou při trávení nepostradatelné, protože jsou nezbytné při hydrolytickém štěpení molekul polysacharidů, triacylglycerolů a bílkovin, které jsou hlavní součástí potravy. Jedním z enzymů, se kterým se potrava setká v ústní dutině, je α -amylasa, která hydrolyzuje škrob za vzniku oligosacharidů. V tenkém střevě nacházíme celou řadu enzymů, jako jsou maltasa, sacharasa a laktasa. Štěpení je dokončeno v tlustém střevě. Enzymy rozloží potravu na základní jednotky, které již mohou být vstřebávány do krevního řečiště a předávány jednotlivým buňkám.[60] [62]

Význam přidaných enzymů v krmivech stoupá použitím méně kvalitních obilovin zejména pšenice a ječmene. V současnosti se výzkum aditivních enzymů v krmných směsích specializuje na působení enzymů v trávicím traktu a zvýšení termostability a oxidativní stability. Většina preparátů má základní složku rekombinantní proteiny, které jsou modifikované na potřebný substrát.[60] [61]

Jako zdroj α -amylasy se dá použít slad s vysokým obsahem amylas. Přídavek amylas do krmiva může vést k vyšší a rychlejší využitelnosti škrobu. Efekt je zejména pozorovatelný u selat po odstavu, kdy amylasy přidané do krmiva v tomto období vedou ke zlepšení využitelnosti krmiv a k vyšším přírůstkům. Využití výše uvedených enzymů snižuje variabilitu v produkci, vede k uniformní konverzi živin, přírůstkům, a zvyšuje konzistentnost využití krmiv. Enzymy pozitivně ovlivňují složení mikroflóry a snižují riziko výskytu průjmů[60]

2.4 Principy použitých metod

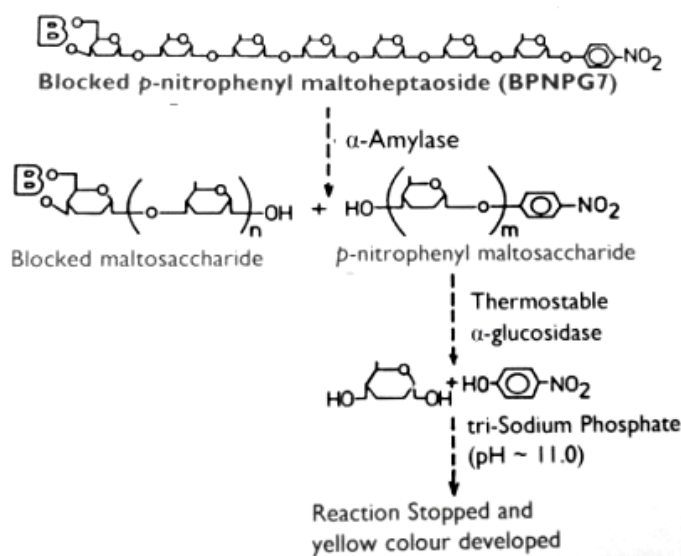
V této kapitole je popsán princip metod, které byly použité při stanovení aktivit hydrolytických enzymů α -amylasy a β -amylasy. Tyto metody se řadí do speciálních analýz sladu.

2.4.1 Stanovení α -amylasy

Aktivita α -amylas se stanovuje pomocí setu Megazyme, obsahující HR činidlo, které je univerzální pro cereální, mikrobiální i houbovou α -amylasu. Pro každý druh enzymu je nutné upravit podmínky reakce. HR činidlo je tvořené substrátem α -D-maltoheptanosidem s navázanou p-nitrofenylovou skupinou na redukujícím konci řetězce a blokující skupinou na neredukujícím konci – BPNPG7 (Blocked p-Nitrophenyl- α -D-maltoheptanoside) v přítomnosti nadbytku termostabilní α -glukosidasy. Díky této α -glukosidasy se reakce může provádět v rozmezí pH 5,2–7,0 při teplotách až do 60 °C. Blokovací skupina v HR činidla zabraňuje hydrolýze tohoto substrátu exo-působícími enzymy, jako je α -glukosidáza a β -amylasa. Metoda je zcela specifická pro endo-působící α -amylasu. [50] [52] [63]

Substrát BPNPG7 ve formě Nitrofenyl-maltosacharidů uvolněné působením α -amylasy ve vzorku je okamžitě a kvantitativně hydrolyzovaný α -amylasou v nadbytku α -glukosidasy na glukózu a volný p-nitrofenol. Takže rychlost uvolňování p-nitrofenolu přímo koreluje

s aktivitou α -amylasy. V podstatě se alikvotní část extraktu obilné mouky obsahující α -amylasu extrahuje roztokem pufru, odstředí, zředí a inkubuje se substrátovou směsí za definovaných podmínek pH, teploty a času. Reakce se ukončí přidáním slabého alkalického roztoku, přičemž dojde k tvorbě žlutého komplexu. Pro znázornění mechanismu reakce metody je níže *Obrázek 14*. Absorbance se měří při 400 nm, protože při této hodnotě p-nitrofenyl dosahuje absorpčního maxima. Aktivita amylasy je vyjádřena v jednotkách Ceralpha; 1 jednotka je definována jako množství enzymu potřebné k uvolnění 1 mikromolu p-nitrofenylu (v přítomnosti nadbytečného množství α -glukosidasy) za 1 min při 40 °C. Metoda je velmi přesná a citlivá. Nejistota měření je do 5 %. [50] [51] [52] [63]



Obrázek 14: Mechanismus účinku stanovení α -amylasy (zdroj metodika setu CERALPHA)

2.4.2 Stanovení β -amylasy

Pro stanovení obilné β -amylasy v přítomnosti α -amylasy se v současnosti používá set společnosti Megazyme obsahující činidlo Betamyl-3, který je velmi specifický, stabilní, citlivý, tedy neumožňuje hydrolýzu jinými enzymy včetně endo-působící α -amylasy. Činidlo Betamyl-3 tvoří termostabilní β -glukosidasa vysoké čistoty a trisacharid p-nitrofenyl- β -D-maltotriosid (PNP β -G3). Při hydrolýze působením β -amylasy obsažené ve vzorku se PNP β -G3 rozštěpí na maltosu a p-nitrofenyl- β -D-glukózu, přičemž p-nitrofenyl- β -D-glukosa se okamžitě štěpí na D-glukosu a volný p-nitrofenol s β -glukosidasou. Rychlost uvolňování p-nitrofenolu se tedy přímo vztahuje k rychlosti uvolňování maltosy β -amylázou. Reakce se zastaví a přidavkem roztoku Trizma s vysokým pH za vzniku žlutého barvy. Nejistota metody je do 5 %. [58] [59] [64]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Technologie sladování

Bylo navrženo několik technologických postupů sladování (délka sladování 5 až 8 dní, teplota sladování 12, 15, 18 °C, stupeň domočení ječmene 43, 45, 47 %, hvozdění při 80 a 50 °C). Pro sladování byla použita ozimá pšenice odrůdy Arkeos (obsah dusíkatých látek 13 %, obsah škrobu 66,4 %, klíčivost 97 %). Hmotnost sladovaných vzorků byla 500 g. Sladování bylo prováděno v laboratorní sladovně od firmy KVM. Laboratorní sladovna sestává ze dvou samostatných skříní. Jedna skříň slouží k máčení zrna, včetně vzdušných přestávek, druhá skříň umožňuje klíčení zrna a hvozdění zeleného sladu. Po získání vzorků sladu, byla stanovena aktivita enzymů α , β -amylasy a provedeno statistické vyhodnocení vlivu různých technologií sladování na aktivitu enzymů.

Na základě těchto výsledků, byla pro následné zkoušení odrůd zvolena technologie sedmidenního sladování, se stupněm domočení 45 %, teplotou klíčení 18 °C a teplotou sušení 50 °C. Tento technologický postup byl použit při sladování souboru 48 odrůd (viz *Příloha 5*) pšenice ze třech pokusných lokalit (Jaroměřice nad Rokytou, Chrlice, Věrovany) Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, ročník sklizně 2016

3.2 Stanovení vybraných metod speciální analýzy

3.2.1 Stanovení α -amylasy

Použité pomůcky a zařízení: Kotoučový mlýn Bühler Miag DFLU na sladové zrno, pipety, předvážky, analytické váhy, odměrné baňky, reagenční láhve, zkumavky tenkostěnné, tlustostěnné, plastové s víčkem, stojan na zkumavky, vialky, vodní lázeň, odstředivka, stopky, třepačka vortex, UV/VIS spektrofotometr se softwarem, počítačem a tiskárnou [63]

Použité chemikálie: Set Megazyme Aplha-amylase – Ceralpha method, přičemž souprava se skládá z: metody stanovení, substrátu - lyofilizovaného BPNPG7 – 54,5 mg plus termostabilní α -glukosidasy – 125 U při pH 6,0; koncentrovaného extrakčního pufru; koncentrovaného ukončujícího činidla – stopingu; kontrolního vzorku sladové mouky se známou aktivitou enzymů – 231 U, který zajišťuje prokázání opakovatelnosti. Další chemikálie na přípravu trojroztoku jsou chlorid sodný, chlorid vápenatý a azid sodný. [63]

Postup přípravy roztoků:

Substrát BPNPG7 s termostabilní α -glukosidasou (HR činidlo) Celý obsah lahvičky se rozpustí v 10 ml destilované vody. Rozdělí se po 2–3 ml do čistých vialek a nepotřebný roztok se dá do mrazáku. Substrát opakovaným pražením ztrácí stabilitu a reakce neprobíhá správně. Takto připravený substrát je stabilní nejméně 12 měsíců. [63]

Trojroztok: Naváží se s přesností na 2 desetinná místa $10,00 \pm 0,1$ g chloridu sodného, $0,2 \pm 0,01$ g chloridu vápenatého a $0,2 \pm 0,01$ g azidu sodného. Všechny tři látky se kvantitativně převedou do 1000 ml odměrné baňky, kde se doplní destilovanou vodou po rysku. Obsah baňky se dobře promíchá a přelije se do reagenční láhve o objemu 1 l. [63]

Extrakční pufr: Koncentrovaný extrakční pufr ze setu obsahuje 1M malát sodný; 1M chlorid sodný, 40mM chlorid vápenatý a 0,1% azid sodný. Roztok se připraví kvantitativním převedením 50 ml pufru, tedy celého obsahu lahvičky, do 1000ml odměrné baňky a doplní se po rysku destilovanou vodou a dobře promíchá. Je stabilní při 12 měsíců při teplotě po 0–5 °C.

Stopping: Celý obsah lahvičky – 25 ml se zředí 500 ml destilované vody. Stabilní při pokojové teplotě po dobu 3 měsíců. [63]

Vlastní stanovení:

Navází se přibližně 20 g požadovaného sladu, který se pomele ve vhodném mlýnu na sladovou moučku, promíchá se, aby vznikl reprezentativní vzorek. Pro stanovení α -amylasy se odváží $0,25 \pm 0,01$ g vzorku sladu do 50 ml plastové zkumavky s víčkem a napipetuje se 50 ml trojroztoku. Uzavřená zkumavka se dobře promíchá a obsah se nechá extrahovat 15–20 min při laboratorní teplotě. Během extrakce se 5x až 6x protřepe. Mezitím se připraví tlustostěnná zkumavka, do které se napipetuje 9,5 ml extrakčního pufru. Pak se připraví 2 tenkostěnné zkumavky, protože každý vzorek se stanovuje dvakrát, a pipetuje se do každé zkumavky 0,1 ml HR činidla. [63]

Po uplynutí lhůty extrakce vzorků sladu se provede odstředění vzorků při 7000 otáčkách po dobu 10 min. Následně se pipetuje 0,5 ml odstředěného vzorku do tlustostěnné zkumavky, ve které už je 9,5 ml extrakčního pufru, takže celkový objem roztoku je 10 ml. Obsah tlustostěnné zkumavky se promíchá na třepačce vortexu. Zkumavky se vzorkem i s HR činidlem se umístí do vodní lázně, kde se nechají temperovat minimálně 5 minut. Následně se zahájí reakce tak, že se napipetuje přesně 0,1 ml roztoku vzorku z tlustostěnné zkumavky do tenkostěnné zkumavky s HR činidlem a zkumavka se promíchá na třepačce vortexu. [63]

Reakce probíhá během inkubace při teplotě 40°C přesně 10 minut (od doby přidání vzorku sladu). Po uplynutí 10 minutové inkubační doby se reakce ukončí přidáním 1,5 ml ukončovacího činidla – stoppingem a opět se zkumavka promíchá na třepačce vortexu. Připraví se slepý vzorek – blank, a to tak, že se nejdříve pipetuje 1,5 ml ukončovacího činidla, přidá se 0,1 ml vzorku a 0,1 ml HR činidla. S každým měřením se připravuje kontrolní standard, kde místo vzorku se používá kontrolní moučka ze setu. Po vzniku žluté barvy, která se vytvořila ukončením reakce, je nutné změřit absorbanci při vlnové délce 400 nm, do 20 min. Později žlutý produkt ztrácí stabilitu, což by zkreslilo měření.

Metoda umožňuje změřit najednou maximálně 36 vzorků, a spuštění reakcí bývá v intervalu 15 s. Vzhledem k tomu, že se každý vzorek měří 2x, prakticky se změní maximálně pouze 18 vzorků vč. standardu na 1 stanovení. [63]

Během provádění reakce je nutné být obezřetný a používat ochranné pomůcky, protože každá tělní tekutina obsahuje α -amylasu, takže je možné kontaminovat vzorek. Voda musí být dokonale čistá, protože případné mikroorganismy rovněž obsahují α -amylasu. Spektrometr by měl být kalibrován standardem p-nirophenolu v 1% fosforečnanu sodném. Alikvotní podíl tohoto roztoku, pokud byl zředěn 200x v 1% fosforečnanu sodném, dává absorbanci 0,905 při 400 nm. Vzorky by se měly změřit do 20 minut po ukončení reakce. Jako standard slouží přiložený vzorek kontrolního sladu o známé aktivitě. Jestliže je absorbance standardu vyšší, než 1,2, pak by se měl vzorek zředit a změřit znovu. [63]

Výpočet aktivity α -amylasy:

Jedna jednotka aktivity je definována jako množství enzymu v přítomnosti přebytku termostabilní α -glukozidázy, potřebné k uvolnění jednoho mikromolu p-nitrofenolu z BPNPG7 za jednu minutu za definovaných testovacích podmínek a je označena jako Ceralpha Unit – označená jako CU. Níže je uveden vzorový výpočet prvního stanovení α -amylasy.

$$CU = \frac{A_{400}}{t_{ink}} \cdot \frac{V_{celk/b}}{V_{enz}} \cdot \frac{1}{A_{PNP}} \cdot \frac{V_{extr}}{m_{vz}} \cdot f_z \Rightarrow CU = \frac{A_{400}}{10} \cdot \frac{1,7}{0,1} \cdot \frac{1}{18,1} \cdot \frac{50}{0,25} \cdot 20 \Rightarrow$$

$$CU = A_{400} \cdot 376 [U \cdot g^{-1}]$$

kde A_{400} je absorbance vzorku nebo blanku při vlnové délce 400 nm; t_{ink} je čas inkubace reakce, což u vzorků sladu je 10 minut; $V_{celk/b}$ je celkový objem v buňce, který činí 1,7 ml; V_{enz} je napipetovaný součet objemů enzymu a vzorku, který je $0,1 \pm 0,005$ ml; A_{PNP} je absorbance p-nitrofenolu v 1% roztoku fosforečnanu sodného při vlnové délce 400 nm a její hodnota je 18,1; V_{extr} je extrakční objem $50 \pm 0,5$ ml trojroztoku; m_{vz} je navážka vzorku, což je $0,25 \pm 0,01$ g sladu; f_z je faktor zředění originálního extraktu; u sladu se používá f_z 20

3.2.2 Stanovení β -amylasy

Použité pomůcky a zařízení: viz pomůcky a zařízení u stanovení α -amylasy, a místo 50 ml šroubovacích plastových zkumavek se používají jednorázové 13 ml polypropylenové šroubovací zkumavky. [64]

Použité chemikálie:

Set Megazyme Beta-amylase - Betamyl-3 method, který se skládá z: metodiky analýzy; substrátu Betamyl-3 (PNP β -G3, nadbytek β -glukosidasy (50 U), stabilizátory); koncentrovaného extrakčního pufru o pH 8 (Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid, EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová a azid sodný); ředícího pufru o pH 6,2 (MES – 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina s EDTA, BSA Bovine serum albumin $CU \cdot g^{-1}$ hovězí sérový albumin a azid sodný); hydrochloridu cysteinu a kontrolního vzorku sladové moučky standardizované aktivity β -amylasy. Další chemikálie na přípravu ukončujícího činidla je Trizma báze. [64]

Postup přípravy roztoků:

Substrát Betamyl-3: Celý obsah lahvičky se rozpustí v 10 ml destilované vody a rozdělí se po 2–3 ml do čistých vialek a nepotřebný roztok se dá do mrazáku. Substrát opakovaným mražením ztrácí stabilitu a reakce neprobíhá správně. [64]

Extrakční pufr – se připraví tak, že se odpipetuje z lahvičky s 5 ml do 100 ml odměrné baňky a doplní po rysku vodou. Stabilní při pokojové teplotě 1 den.

Ředící pufr – kvantitativně se převede obsah lahvičky 3 do 500 ml odměrné baňky a doplní po rysku destilovanou vodou. Stabilní cca. 1 rok při teplotě 4 °C. β -amylasa je extrémně nestabilní, když je vysoce ředěná v pufrch, které neobsahují jiné proteiny. Proto koncentrovaná směs ředícího pufru obsahuje BSA - hovězí sérový albumin. [64]

Ukončovací činidlo (stopping) – naváží se 5 g Trizma báze, převede kvantitativně do 500 ml odměrné baňky a doplní destilovanou vodou po rysku. Roztok je stabilní asi 1 rok při pokojové teplotě. [64]

Vlastní stanovení:

Pro stanovení aktivity β -amylasy se použije navážka vzorku sladové moučky, který se již namlel pro stanovení α -amylasy. Z tohoto vzorku namletého sladu se odváží $0,5 \pm 0,01$ g vzorku sladu do jednorázové 13 ml polypropylenové šroubovací zkumavky s víčkem. Následně se pipetuje se 5 ml připraveného extrakčního pufru. Uzavřená zkumavka se dobře promíchá a obsah se nechá extrahovat 60 min při laboratorní teplotě. Během extrakce se 5x až

6x protřepe. Mezitím se připraví tlustostěnná zkumavka, do které se napipetuje 4 ml ředícího pufru. Pak se připraví 2 tenkostěnné zkumavky, protože každý vzorek se stanovuje dvakrát, a pipetuje se do každé zkumavky 0,1 ml činidla Betamyl-3. [64]

Po uplynutí lhůty extrakce vzorků sladu dojde k odstředění vzorků při 7000 otáčkách v mikropatronách v centrifuze po dobu 10 min. Následně se pipetuje 0,2 ml odstředěného vzorku do tlustostěnné zkumavky, ve které už jsou 4 ml ředícího pufru. Obsah tlustostěnné zkumavky se promíchá na třepače vortexu. Zkumavky se vzorkem i s činidlem Betamyl-3 se umístí do vodní lázně, kde se nechají temperovat minimálně 5 minut. Následně se zahájí reakce tak, že se odpipetuje přesně 0,1 ml roztoku vzorku z tlustostěnné zkumavky do tenkostěnné zkumavky s činidlem Betamyl-3 a zkumavka se promíchá na třepače vortexu. [64]

Reakce probíhá během inkubace při teplotě 40 °C přesně 10 minut (od doby přidání vzorku sladu). Po uplynutí 10 minutové inkubační doby se reakce ukončí přidáním 1,5 ml roztoku Trizma báze a opět se zkumavka promíchá na vortexu. Připraví se slepý vzorek - blank, a to tak, že se nejdříve pipetuje 1,5 ml ukončovacího činidla, přidá se 0,1 ml substrátu a 0,1 ml vzorku. S každým měřením se připravují dva kontrolní standardy, kde místo vzorku sladu se používá kontrolní moučka ze setu. První zkumavka standardu obsahuje 4 ml ředícího pufru, a druhá zkumavka obsahuje 8 ml ředícího pufru, která se používá jako případná kontrola stanovení standardu β -amylasy zředěnou metodou. [64]

Po vzniku žluté barvy, která se vytvořila ukončením reakce je nutné změřit absorbanci při vlnové délce 400 nm, do 20 min. Později žlutý produkt ztrácí stabilitu, což by zkreslilo měření. [64]

Metoda umožňuje změřit najednou maximálně 18 vzorků, a spuštění reakcí bývá v intervalu 30 s. Vzhledem k tomu, že se každý vzorek měří 2x, prakticky se změří pouze 9 vzorků vč. standardu na 1 stanovení. [64]

Jestliže hodnota absorbance slepého vzorku je vyšší než 0,3, pak by mělo být činidlo Betamyl-3 vyřazeno, protože přestalo být stabilní a měření se musí provést znovu. [64]

Výpočet aktivity β -amylasy:

Jedna jednotka aktivity je definována jako množství enzymu v přítomnosti přebytku termostabilní β -glukosidázy, potřebné k uvolnění jednoho mikromolu p-nitrofenolu z PNP β -G3 během jedné minuty za definovaných testovacích podmínek a je nazývána Jednotka betamylu-3 - Betamyl-3 Unit – označena jako BU. Níže je uvedený vzorový výpočet prvního stanovení.

$$BU = \frac{A_{400}}{t_{ink}} \cdot \frac{V_{celk/b}}{V_{enz}} \cdot \frac{1}{A_{PNP}} \cdot \frac{V_{extr}}{m_{vz}} \cdot f_z \Rightarrow BU = \frac{A_{400}}{10} \cdot \frac{1,7}{0,1} \cdot \frac{1}{18,1} \cdot \frac{5}{0,5} \cdot 21 \Rightarrow$$

$$BU = A_{400} \cdot 19,72 [U \cdot g^{-1}]$$

kde A_{400} je absorbance vzorku nebo blanku při vlnové délce 400 nm; t_{ink} je čas inkubace reakce, což u vzorků sladu je 10 minut; $V_{celk/b}$ je celkový objem v buňce, který činí 1,7 ml; V_{enz} je napipetovaný součet objemů enzymu a vzorku, který je $0,1 \pm 0,005$ ml; A_{PNP} je absorbance p-nitrofenolu v 1% roztoku Trizma báze při vlnové délce 400 nm a její hodnota je 18,1; V_{extr} je extrakční objem $5 \pm 0,05$ ml trojroztoku; m_{vz} je navážka vzorku, což je

$0,5 \pm 0,01$ g sladové moučky; f_z je faktor zřešení a u tohoto stanovení se používá 0,2 ml z původního objemu 4,2 ml, takže f_z 21.

3.3 Vyhodnocení naměřených dat

Výpočet průměrné hodnoty aktivity α -amylasy vzorku

Aritmetický průměr se počítá jako součet všech hodnot vydělených jejich počtem.

$$\alpha_p = \frac{\alpha_1 + \alpha_2}{n}$$

kde n je počet naměřených hodnot, což v našem případě je 2.

Výpočet směrodatné odchylky:

Směrodatná odchylka je statistická veličina, která se počítá jako čtverec neboli kvadratický průměr odchylek hodnot od jejich aritmetického průměru. V tomto případě byla počítána výběrová směrodatná odchylka, která se používá pro skutečný výpočet odhadu směrodatné odchylky na empiricky zjištěné řadě čísel a jedná se o odmocninu z výběrového rozptylu.

Směrodatná odchylka určuje, jak jsou hodnoty odchýleny od průměru hodnot. V tomto případě se dá mluvit také o absolutní odchylce.

$$s = \sqrt{\text{var}(A)} \Rightarrow \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\alpha_i - \alpha_p)^2}$$

kde s je směrodatná výběrová odchylka, var je rozptyl, n je počet stanovení, což je v našem případě 2.

Výpočet variačního koeficientu:

Variační koeficient – v je udáván v procentech a je také známý jako relativní odchylka. Posuzuje míru variability a posuzuje se směrodatná odchylka a aritmetický průměr.

$$v = \frac{s_\alpha}{\alpha_p} \cdot 100 [\%]$$

Veškerá data byla vypočítaná a tabulky a grafy vytvořeny v programu Microsoft Excel.

Výpočet rozptylu (variance)

Rozptyl označovaný také jako variance – s^2 posuzuje přesný parametr populace a je dán aritmetickým průměrem čtverců odchylek jednotlivých hodnot sledované proměnné od průměru celého souboru. Byl použit vzorec pro výběrový rozptyl.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\alpha_i - \alpha_p)^2}{n-1}$$

Analýza variance byla vypočtena v statistickém systému REML

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci této kapitoly jsou prezentovány a diskutovány výsledky z obou částí měření. V první části jsou prezentovány výsledky, kdy byla optimalizována a hledána nejúčinnější technologie sladování. Ve druhé části bylo provedeno vyhodnocení aktivity enzymů u souboru 48 odrůd pšenice (viz *Příloha 3 a Příloha 4*) ze třech pokusných lokalit odrůdy

4.1 Optimalizace technologie sladování

Naměřená data

Kompletní naměřená data aktivity α -amylasy včetně nejistoty měření jsou uvedeny v *Příloze 1* a veškerá naměřená data pro stanovení β -amylasy jsou uvedeny v *Příloze 2*.

V *Tabulce 3* jsou uvedeny průměrné hodnoty jednotlivých úrovní hodnocených technologických faktorů včetně směrodatné odchylky. Statistické vyhodnocení je uvedeno v *Příloze 5*

Tabulka 3: Souhrnná data optimalizace technologie sladování

Délka sladování	Aktivita α -amylasy (U/g)		Aktivita β -amylasy (U/g)	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
5D	146,5	27,4	17,4	1,6
6D	174,7	22,4	16,9	1,4
7D	178,6	25,9	18,3	0,8
8D	180,2	30,4	17,8	1,2
St. domočení				
43 %	160,5	27,9	17,4	1,2
45 %	169,1	29,7	17,8	1,4
47 %	180,4	28,8	17,7	1,6
Teplota sladování				
12 °C	163,6	29,6	17,7	1,3
15 °C	169,2	35,0	17,0	1,4
18 °C	177,2	22,2	18,1	1,3
Hvozdění				
80 °C	172,4	32,1	17,9	1,2
50 °C	167,6	27,0	17,3	1,5

S délkou sladování rostla aktivita enzymu α -amylasa, mezi 6 až 8 dnem sladování však nebyl tento rozdíl statisticky průkazný. Vyšší obsah vody v zrně pšenice (stupeň domočení) měl pozitivní vliv na aktivitu tohoto enzymu. Vyšší teplota sladování a nižší teplota sušení naklíčeného zrna měla rovněž pozitivní vliv na aktivitu enzymu α -amylasa, ale rozdíly mezi jednotlivými variantami nebyly statisticky průkazné.

Vliv délky sladování na aktivitu enzymu β -amylasa nebyl jednoznačný, nejvyššího aktivity bylo dosaženo při sedmidenním sladování. Vliv stupně domočení nebyl na aktivitu enzymu β -amylasy statisticky významný, nejvyšší aktivita byla zjištěna u stupně domočení 45 %. Vyšší teplota sladování a nižší teplota sušení měla průkazný vliv na aktivitu enzymu β -amylasa.

Základní charakterizace celkového rozsahu dat je uvedena v *Tabulce 4*, kde minimální a maximální hodnoty se od sebe liší u hodnot aktivity α -amylasy o více než dvojnásobek a u β -

amylasy je rozsah mnohem menší. Celkový průměr obsahu α -amylasy je 170 U.g⁻¹ a β -amylasy 18,1 U.g⁻¹.

Tabulka 4: Statistický souhrn naměřených dat aktivit α -amylasy i β -amylasy

Sledovaná veličina	Hodnoty α -amylasy vzorku [U/g]	Hodnoty β -amylasy vzorku [U/g]
Průměr	170	18,1
Medián	171	18,3
Minimum	103	17,7
Maximum	236	20,8

4.1.1 Stanovení α -amylasy

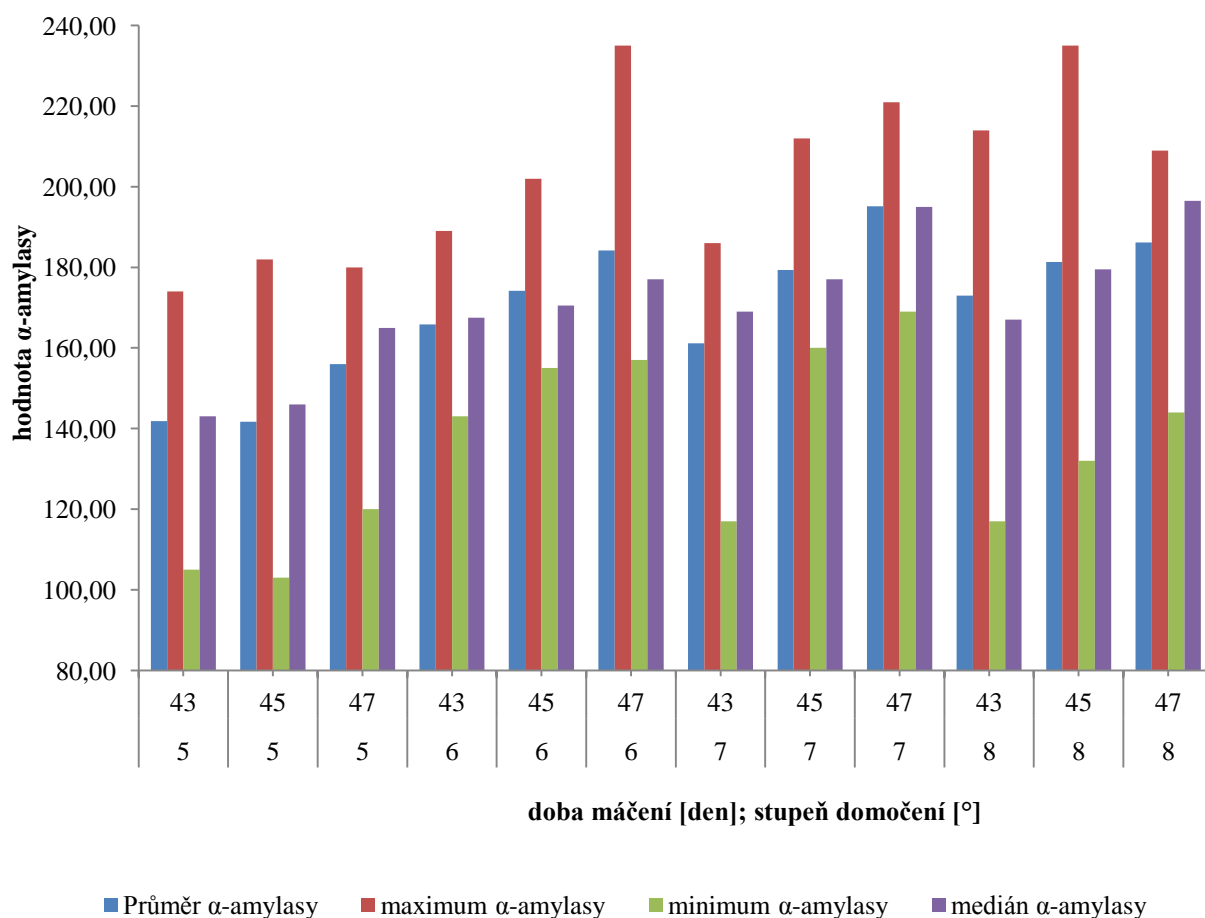
4.1.1.1 Porovnání délky sladování a stupně domočení na aktivitu α -amylasy

V Tabulce 5 a v Grafu 1 jsou znázorněny průměrné, maximální, minimální, a mediánové hodnoty aktivit α -amylasy v daném vzorku v kombinaci dvou technologických parametrů délky sladování a stupně domočení. Při pohledu na Graf 1 je patrné, že pokud se porovnají jednotlivé délky sladování, pak platí, že je během každé konkrétní délky sladování nejúčinnější stupeň domočení na 47 % a nejméně účinný stupeň domočení při 43 % vody. Zároveň je zjevné, že průměrná a mediánová hodnota roste s prodlužující délkou sladování. Tedy Po osmi dnech sladování aktivita α -amylasy měla vyšší hodnotu, než po 5 dnech sladování. Vliv délky sladování a stupně domočení na hodnotu α -amylasy je relativně velký.

Tabulka 5: Porovnání kombinace sladovacích parametrů délky sladování a stupně domočení α -amylasy

Délka sladování [den]	Stupeň domočení [%]	Průměr α -amylasy [U/g]	Maximum α -amylasy [U/g]	Minimum α -amylasy [U/g]	Medián α -amylasy [U/g]
5	43	141,83	174,00	105,00	143,00
5	45	141,67	182,00	103,00	146,00
5	47	156,00	180,00	120,00	165,00
Celkové hodnoty za 5 dnů		146,50	182,00	103,00	157,50
6	43	165,83	189,00	143,00	167,50
6	45	174,17	202,00	155,00	170,50
6	47	184,17	235,00	157,00	177,00
Celkové hodnoty za 6 dnů		174,72	235,00	143,00	170,00
7	43	161,17	186,00	117,00	169,00
7	45	179,33	212,00	160,00	177,00
7	47	195,17	221,00	169,00	195,00
Celkové hodnoty za 7 dnů		178,56	221,00	117,00	177,00
8	43	173,00	214,00	117,00	167,00
8	45	181,33	235,00	132,00	179,50
8	47	186,17	209,00	144,00	196,50
Celkové hodnoty za 8 dnů		180,17	235,00	117,00	179,50
Celk. průměr, max., min a medián		169,99	235,00	103,00	170,00

Závislost aktivity α -amylasy na době sladování a stupni domočení



Graf. 1: Závislost aktivity α -amylasy na době sladování a stupni domočení

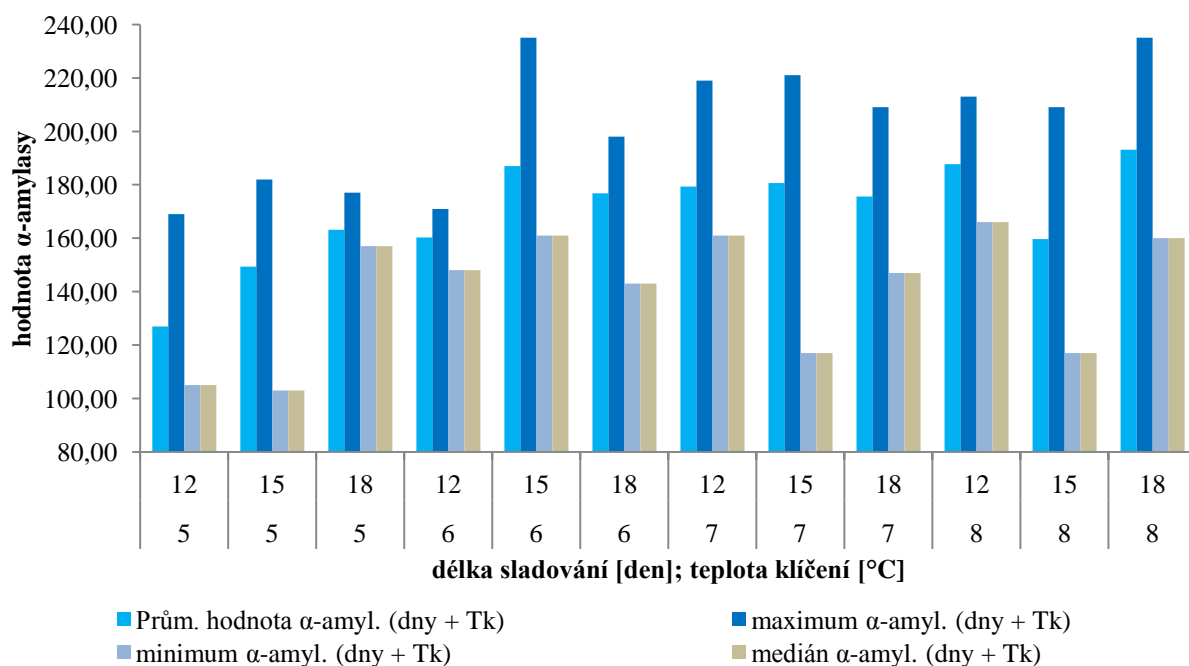
4.1.1.2 Porovnání délky sladování a teploty klíčení na aktivitu α -amylasy

Klíčení je velmi důležitá fáze sladování, protože během něj se aktivují a tvoří nové enzymy. V Tabulce 6 a Grafu 2 jsou znázorněny průměrné, maximální, minimální, a mediánové hodnoty aktivit α -amylasy v daném vzorku v kombinaci parametrů délky sladování a teploty klíčení. Z uvedených dat vyplývá při porovnání průměrných a mediánových hodnot, že čím je delší doba sladování, tím více roste aktivita α -amylasy. Alespoň pokud se sladuje 5 až 6 dnů. Zároveň lze říct, že nejnižší hodnota α -amylasy se projevila u kombinace parametrů 5 dnů sladování a 15 °C a nejvyššího maxima α -amylasy se dosáhlo při osmidenním sladování a teplotě klíčení 18 °C. Vliv kombinace délky sladování a teploty klíčení na výše aktivity α -amylasy není tak markantní, jako u kombinace faktorů délka sladování a stupeň domočení.

Tabulka 6: Porovnání kombinace sladovacích parametrů délky sladování a teploty klíčení s aktivitou α -amylasy

Délka sladování [den]	Teplota klíčení [°C]	Průměr α -amylasy [U/g]	Maximum α -amylasy [U/g]	Minimum α -amylasy [U/g]	Medián α -amylasy [U/g]
5	12	127,00	169,00	105,00	124,50
5	15	149,33	182,00	103,00	151,50
5	18	163,17	177,00	157,00	159,50
Celkové hodnoty za 5 dnů		146,89	182,00	103,00	157,50
6	12	160,33	171,00	148,00	159,00
6	15	187,00	235,00	161,00	179,50
6	18	176,83	198,00	143,00	180,00
Celkové hodnoty za 6 dnů		175,44	235,00	143,00	171,50
7	12	179,33	219,00	161,00	169,50
7	15	180,67	221,00	117,00	181,00
7	18	175,67	209,00	147,00	178,50
Celkové hodnoty za 7 dnů		178,83	222,00	117,00	177,50
8	12	187,67	213,00	166,00	185,50
8	15	159,67	209,00	117,00	156,00
8	18	193,17	235,00	160,00	190,50
Celkové hodnoty za 8 dnů		180,33	236,00	117,00	179,50
Celkový průměr, max., min a medián		170,38	236,00	103,00	170,50

Závislost α -amylasy na délce sladování a teplotě klíčení



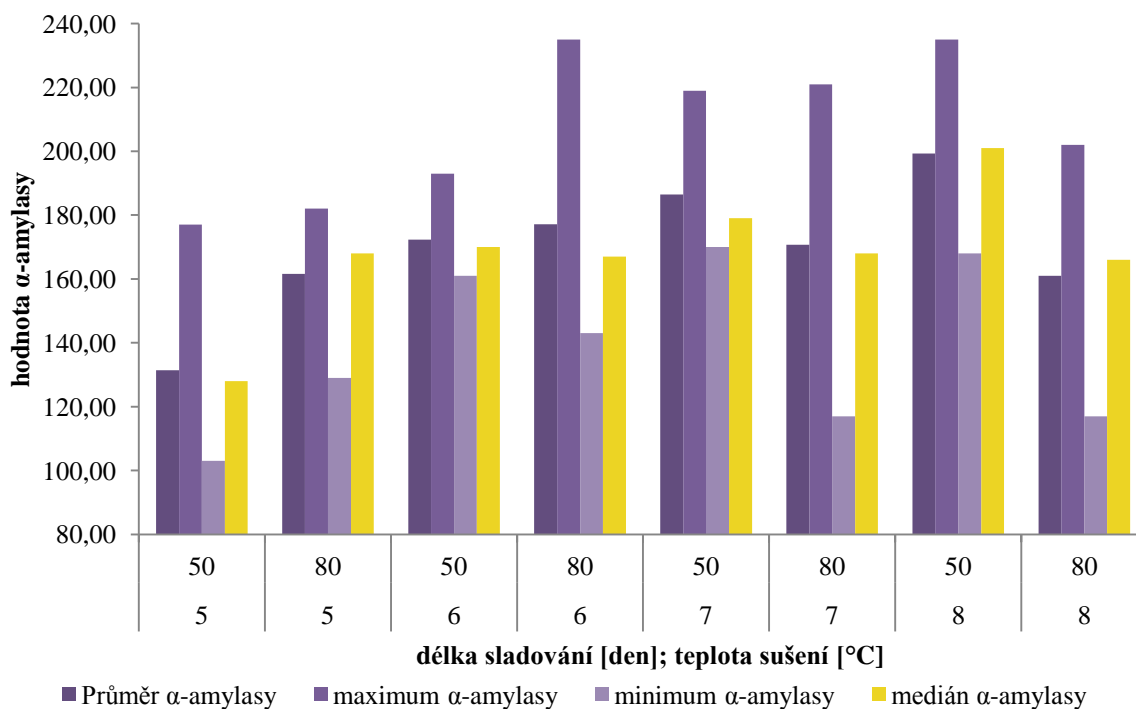
Graf 2: Závislost aktivity α -amylasy na délce sladování a teploty klíčení

4.1.1.3 Porovnání délky sladování a teploty sušení

Tabulka 7: Porovnání kombinace technologických parametrů délky sladování a teploty sušení s obsahem α -amylasy

Délka sladování [den]	Teplota sušení [°C]	Průměr α -amylasy [U/g]	Maximum α -amylasy [U/g]	Minimum α -amylasy [U/g]	Medián α -amylasy [U/g]
5	50	131,44	177,00	103,00	128,00
5	80	161,56	182,00	129,00	168,00
Celkové hodnoty za 5 dnů		146,50	182,00	104,00	157,50
6	50	172,33	193,00	161,00	170,00
6	80	177,11	235,00	143,00	167,00
Celkové hodnoty za 6 dnů		175,44	235,00	143,00	171,50
7	50	186,44	219,00	170,00	179,00
7	80	170,67	221,00	117,00	168,00
Celkové hodnoty za 7 dnů		178,83	222,00	117,00	177,50
8	50	199,33	235,00	168,00	201,00
8	80	161,00	202,00	117,00	166,00
Celkové hodnoty za 8 dnů		180,33	236,00	117,00	179,50
Celkový průměr, max., min a medián		170,38	236,00	104,00	170,50

Závislost α -amylasy na době sladování a teplotě sušení



Graf 3: Vliv doby sladování a teploty sušení na aktivity α -amylasy

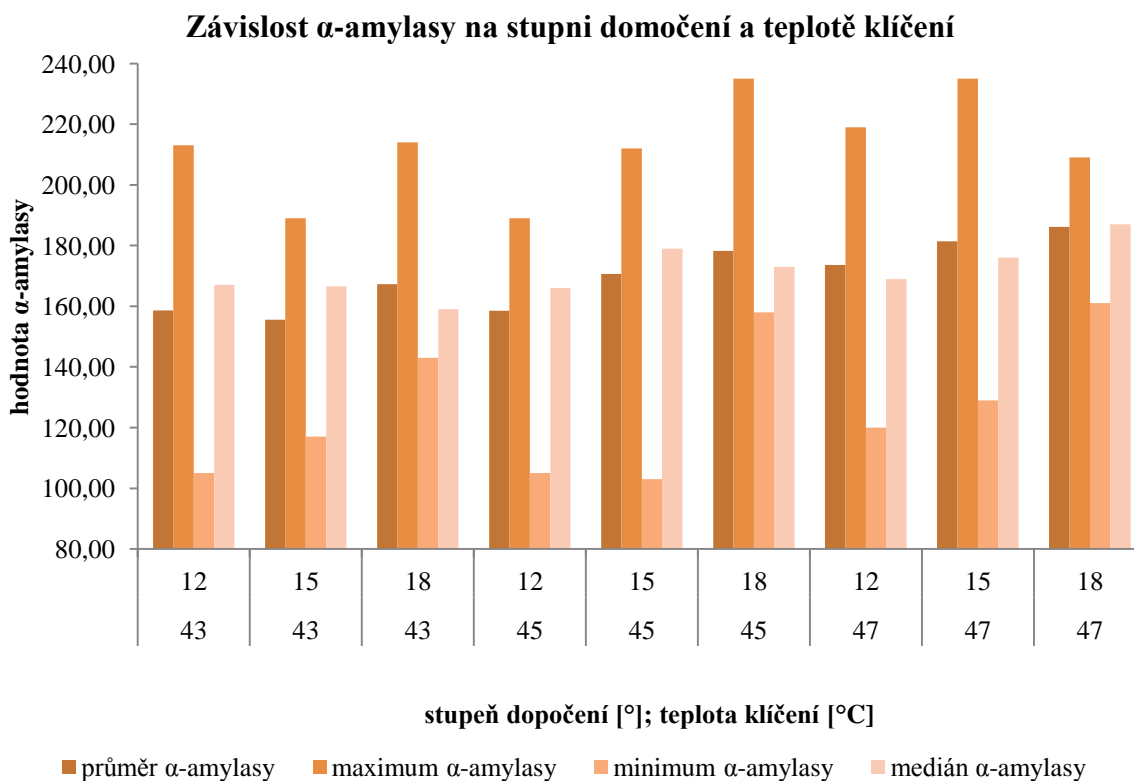
Porovnávané parametry jsou délka sladování a teplota sušení. Během sušení dochází k zastavení růstových pochodů, zachování požadované enzymové aktivity a snížení obsahu vody pod 4 %. V *tabulce 7* a v *grafu 3* je znázorněn vliv kombinace těchto dvou parametrů a průměrné, maximální, minimální a mediánové hodnoty aktivit α -amylasy. Nejvyšší aktivity bylo dosaženo při 50 °C a 7 a 8 dnech sladování.

4.1.1.4 Porovnání stupně domočení a teploty klíčení

V *Tabulce 8* a *Grafu 4* jsou zobrazeny průměrná, maximální, minimální a mediánová data, obsahu α -amylasy a ukazují kombinaci faktorů stupně domočení a teploty klíčení. Z níže uvedených výsledků vyplývá, že hodnoty α -amylasy rostou s rostoucím stupněm domočení v každé délce sladování a zároveň se zvyšuje průměrná hodnota v každé délce sladování.

Tabulka 8: Porovnání kombinace sladovacích faktorů stupně domočení a teploty klíčení a jejich vliv na aktivitu α -amylasy

Stupeň domočení [%]	Teplota klíčení [°C]	Průměr α -amylasy [U/g]	Maximum α -amylasy [U/g]	Minimum α -amylasy [U/g]	Medián α -amylasy [U/g]
43	12	158,63	213,00	105,00	167,00
43	15	155,50	189,00	117,00	166,50
43	18	167,25	214,00	143,00	159,00
Celkové hodnoty při 43 %		160,46	214,00	105,00	166,50
45	12	158,50	189,00	105,00	166,00
45	15	170,63	212,00	103,00	179,00
45	18	178,25	235,00	158,00	173,00
Celkové hodnoty při 45 %		169,13	235,00	103,00	173,00
47	12	173,63	219,00	120,00	169,00
47	15	181,38	235,00	129,00	176,00
47	18	186,13	209,00	161,00	187,00
Celkové hodnoty při 47 %		178,83	222,00	117,00	177,50
Celkový průměr, max., min a medián		170,38	236,00	104,00	170,50



Graf 4: závislost aktivity α -amylasy na teplotě klíčení a stupni domočení

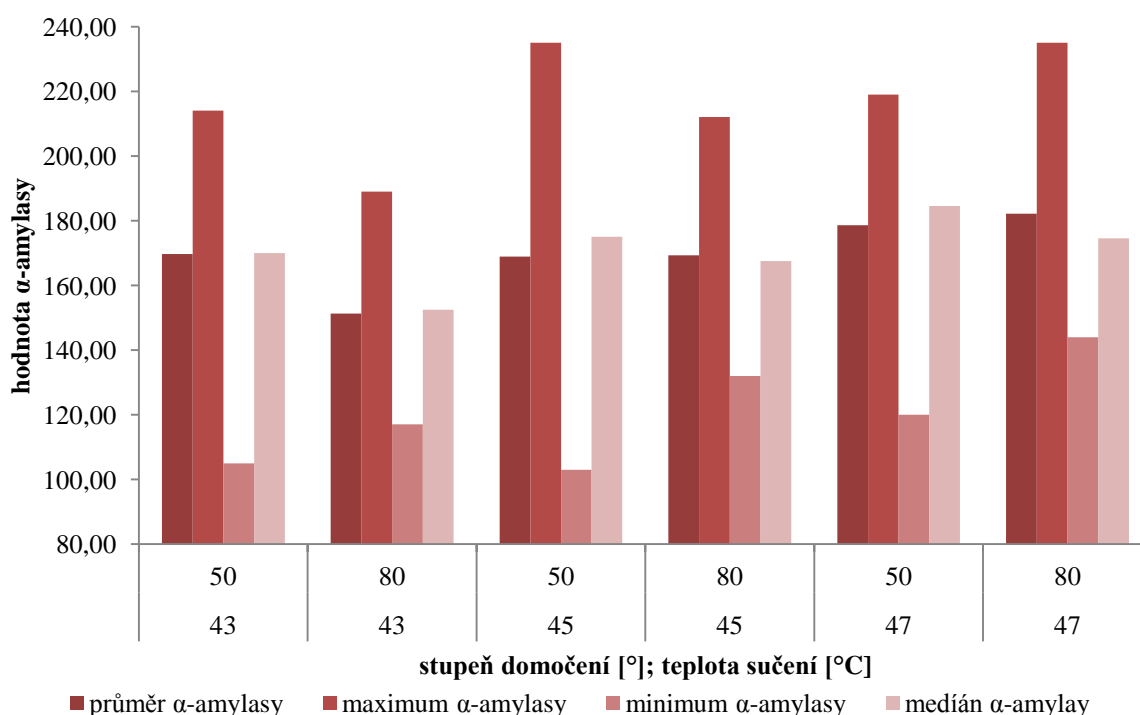
4.1.1.5 Porovnání stupně domočení a teploty sušení

V Tabulce 9 a Grafu 5 níže je uveden vliv stupně domočení a teploty sušení na výši aktivity α -amylasy. Z těchto dat vyplývá, že s rostoucím stupněm domočení roste, i hladina aktivity α -amylasy dále vyplývá, že kromě stupně domočení 43 % je výhodnější hvozdit při 80 °C.

Tabulka 9: Vliv kombinace stupně domočení a teploty sušení a výši aktivity α -amylasy

Stupeň domočení [%]	Teplota sušení [°C]	Průměr α -amylasy [U/g]	Maximum α -amylasy [U/g]	Minimum α -amylasy [U/g]	Medián α -amylasy [U/g]
43	50	169,67	214,00	105,00	170,00
43	80	151,25	189,00	117,00	152,50
Celkové hodnoty při 43 %		160,46	214,00	105,00	161,25
45	50	168,92	235,00	103,00	175,00
45	80	169,33	212,00	132,00	167,50
Celkové hodnoty při 45 %		169,13	235,00	103,00	171,25
47	50	178,58	219,00	120,00	184,50
47	80	182,17	235,00	144,00	174,50
Celkové hodnoty při 47 %		180,38	235,00	120,00	179,50
Celkový průměr, max., min a medián		170,38	236,00	104,00	170,50

Závislost α -amylasy na stupni domočení a teplotě sušení



Graf. 5: Závislost aktivity α -amylasy na kombinaci technologických podmínek stupni domočení a teplotě sušení

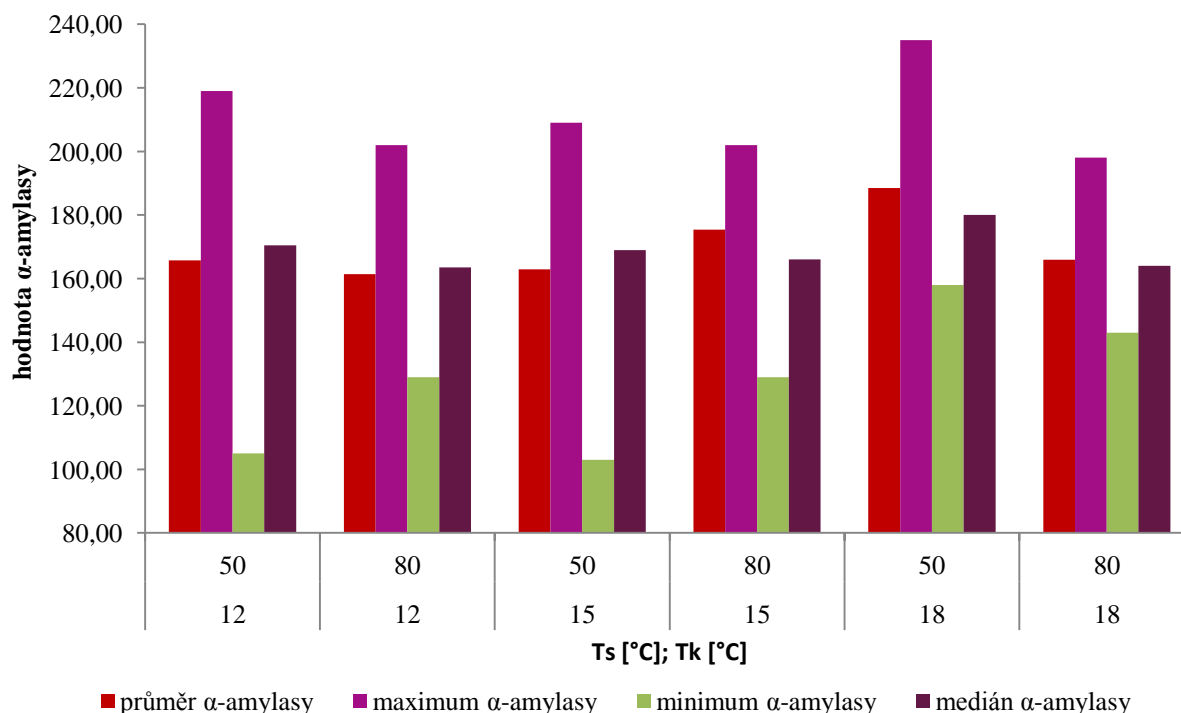
4.1.1.6 Porovnání teplot klíčení a sušení

Zde jsou porovnány mezi sebou teploty klíčení a sušení a v Tabulce 10 a Grafu 6 níže je znázorněn jejich vliv na hodnotu aktivity α -amylasy. Z naměřených dat vyplývá, že s rozdíly mezi jednotlivými kritérii téměř zanedbatelné a vzájemný vliv teplot klíčení a sušení na aktivitu α -amylasy téměř nemá vliv.

Tabulka 10: Vliv teplot sušení a klíčení na aktivitu α -amylasy

Teplota klíčení [°C]	Teplota sušení [°C]	Průměr α -amylasy [U/g]	Maximum α -amylasy [U/g]	Minimum α -amylasy [U/g]	Medián α -amylasy [U/g]
12	50	165,75	219,00	105,00	170,50
12	80	161,42	202,00	129,00	163,50
Celkové hodnoty při 43°		163,58	219,00	105,00	167,00
15	50	162,92	209,00	103,00	169,00
15	80	175,42	202,00	129,00	166,00
Celkové hodnoty při 45°		169,17	209,00	103,00	167,50
18	50	188,50	235,00	158,00	180,00
18	80	165,92	198,00	143,00	164,00
Celkové hodnoty při 47°		177,21	235,00	143,00	172,00
Celkový průměr, max., min a medián		170,38	236,00	104,00	170,50

Závislost α -amylasy na teplotách klíčení a sušení



Graf 6: Závislost aktivity α -amylasy na teplotách sušení a klíčení

4.1.2 Stanovení β -amylasy

Metoda stanovení β -amylasy je popsána v principech metod výše. Veškerá naměřená data jsou uvedena v Příloze 2 a souhrnná data jsou uvedena v Tabulce 3.

4.1.2.1 Porovnání délky sladování a stupně domočení

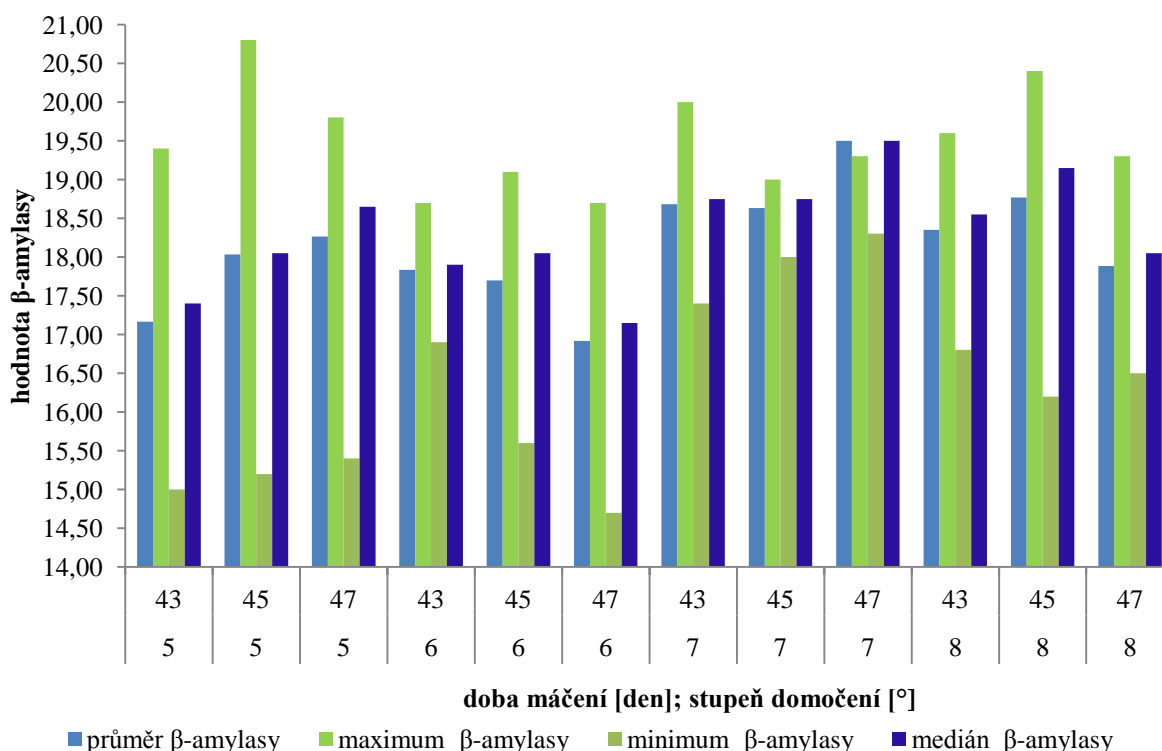
Parametry byly shodné, jako u stanovení α -amylasy, protože se jednalo o stejné vzorky. Takže celková doba sladování trvala 5, 6, 7 a 8 dnů a stupeň domočení 43, 45 a 47 %. V Tabulce 12 a v Grafu 7 jsou znázorněny průměrné, maximální, minimální, a mediánové hodnoty aktivit β -amylasy ve vzorcích se stejnou dobou máčení a stejným stupněm domočení. Průměrné hodnoty β -amylasy během každé délky sladování rostou se zvyšujícím se stupněm domočení. Zároveň se zvyšuje celková průměrná hodnota s rostoucí délkou sladování. Nejvyšší aktivita β -amylasy nastala při stupni domočení 47 °C a délce sladování 7 dnů. Obecně jde říct, že zvyšující se stupeň domočení při stejné délce sladování zvyšuje aktivitu β -amylasy. Pokud se vezme v úvahu trend délky sladování, pak je neefektivnější sladovat slad 7 dní.

Tabulka 11: vliv stupně domočení a délky sladování na aktivitu β -amylasy

Délka sladování [den]	Stupeň domočení [%]	Průměr β -amylasy [U/g]	Maximum β -amylasy [U/g]	Minimum β -amylasy [U/g]	Medián β -amylasy [U/g]
5	43	17,17	19,40	15,00	17,40
5	45	18,03	20,80	15,20	18,05
5	47	18,27	19,80	15,40	18,65

Celkové hodnoty za 5 dnů		17,82	20,80	15,00	17,95
6	43	17,83	18,70	16,90	17,90
6	45	17,70	19,10	15,60	18,05
6	47	16,92	18,70	14,70	17,15
Celkové hodnoty za 6 dnů		17,48	19,10	14,70	17,85
7	43	18,68	20,00	17,40	18,75
7	45	18,63	19,00	18,00	18,75
7	47	19,50	19,30	18,30	19,50
Celkové hodnoty za 7 dnů		18,94	20,40	17,40	18,90
8	43	18,35	19,60	16,80	18,55
8	45	18,77	20,40	16,20	19,15
8	47	17,88	19,30	16,50	18,05
Celkové hodnoty za 8 dnů		18,33	20,40	16,20	18,45
Celkový průměr, max., min a medián		18,14	20,80	14,70	170,50

Závislost β -amylasy na délce sladování a stupni domočení



Graf 7: Porovnání kombinace technologických parametrů - délka sladování a stupeň domočení na aktivitě β -amylasy

4.1.2.2 Porovnání délky sladování a teploty klíčení

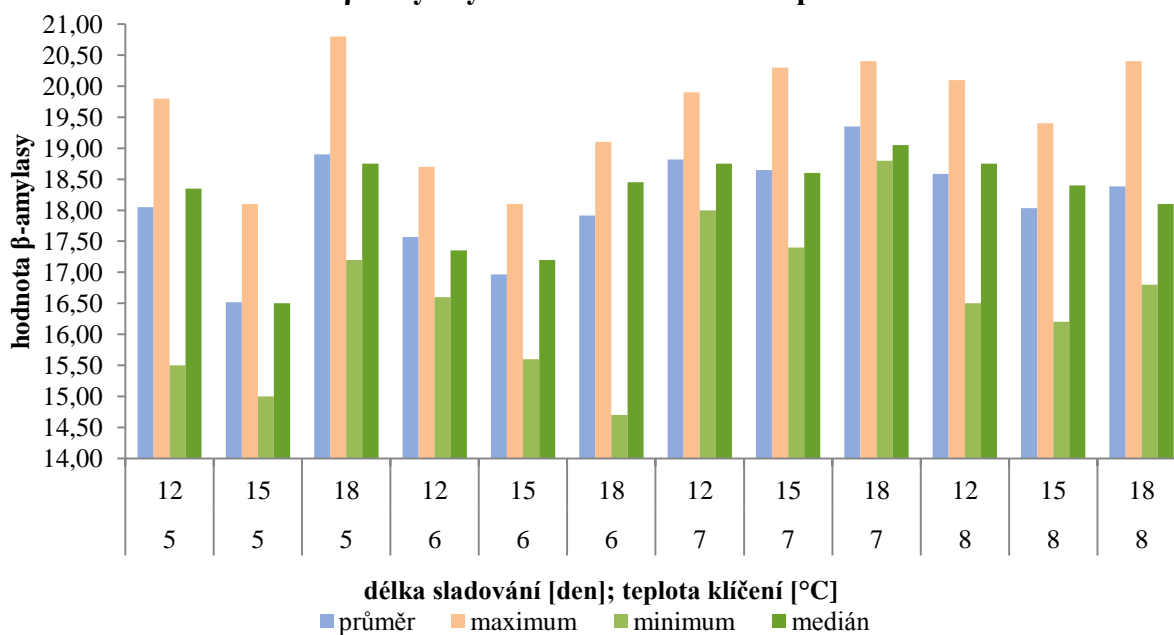
V Tabulce 13 a Grafu 8 je uvedena kombinace délky sladování a teploty klíčení a její vliv na hodnoty β -amylasy. Z uvedených dat vyplývá při porovnání průměrných a mediánových hodnot, že čím je delší doba sladování, tím více roste aktivita β -amylasy až do 7 dní

sladování. U vzorků, které se sladovaly 8 dní nastal pokles aktivity β -amylasy. Zároveň nejvyšší aktivitu dosahují β -amylasy při 18 °C.

Tabulka 12: Vliv délky sladování a teploty klíčení na β -amylasu

Délka sladování [den]	Teplota klíčení [°C]	Průměr β -amylasy [U/g]	Maximum β -amylasy [U/g]	Minimum β -amylasy [U/g]	Medián β -amylasy [U/g]
5	12	18,05	19,80	15,50	18,35
5	15	16,52	18,10	15,00	16,50
5	18	18,90	20,80	17,20	18,75
Celkové hodnoty za 5 dnů		17,82	20,80	15,00	17,95
6	12	17,57	18,70	16,60	17,35
6	15	16,97	18,10	15,60	17,20
6	18	17,92	19,10	14,70	18,45
Celkové hodnoty za 6 dnů		17,48	19,10	14,70	17,85
7	12	18,82	19,90	18,00	18,75
7	15	18,65	20,30	17,40	18,60
7	18	19,35	20,40	18,80	19,05
Celkové hodnoty za 7 dnů		18,94	20,40	17,40	18,90
8	12	18,58	20,10	16,50	18,75
8	15	18,03	19,40	16,20	18,40
8	18	18,38	20,40	16,80	18,10
Celkové hodnoty za 8 dnů		18,33	20,40	16,20	18,45
Celkový průměr, max., min a medián		18,14	20,80	14,70	18,30

Závislost β -amylasy na délce sladování a teplotě klíčení



Graf 8: závislost aktivity β -amylasy na délce sladování a teplotě klíčení

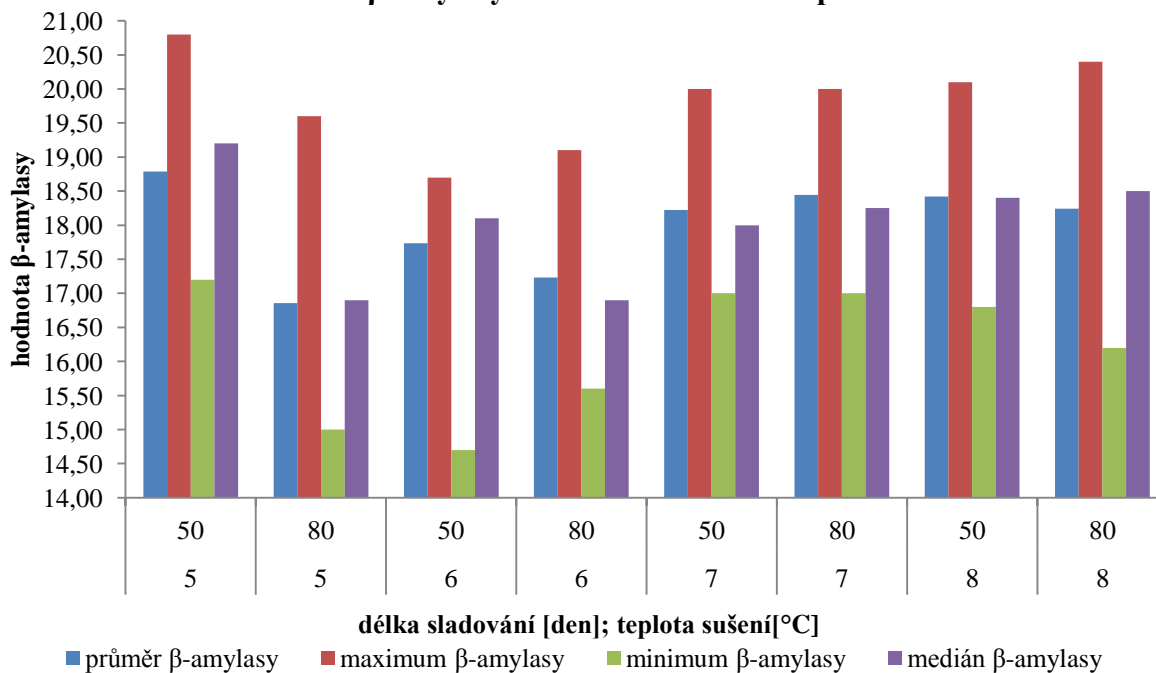
4.1.2.3 Porovnání délky sladování a teploty sušení

Porovnávané parametry jsou délka sladování a teplota sušení, která má hodnoty 50 a 80 °C. V Tabulce 13 a v Grafu 9 je znázorněn vliv kombinace těchto dvou parametrů. Průměrné hodnoty mírně rostou s prodlužující se délkou sladování. Rozdíly však nejsou statisticky průkazné.

Tabulka 13: Vliv délky sladování a teploty sušení na aktivitu β -amylasy

Délka sladování [den]	Teplota sušení [°C]	Průměr β -amylasy [U/g]	Maximum β -amylasy [U/g]	Minimum β -amylasy [U/g]	Medián β -amylasy [U/g]
5	50	18,79	20,80	17,20	19,20
5	80	16,86	19,60	15,00	16,90
Celkové hodnoty za 5 dnů		17,82	20,80	15,00	17,95
6	50	17,73	18,70	14,70	18,10
6	80	17,23	19,10	15,60	16,90
Celkové hodnoty za 6 dnů		17,48	19,10	14,70	17,85
7	50	18,22	20,00	17,00	18,00
7	80	18,44	20,00	17,00	18,25
Celkové hodnoty za 7 dnů		18,94	20,40	17,40	18,90
8	50	18,42	20,10	16,80	18,40
8	80	18,24	20,40	16,20	18,50
Celkové hodnoty za 8 dnů		18,33	20,40	16,20	18,45
Celkový průměr, max., min a medián		18,14	20,80	14,70	18,30

Závislost β -amylasy na době sladování a teplotě sušení



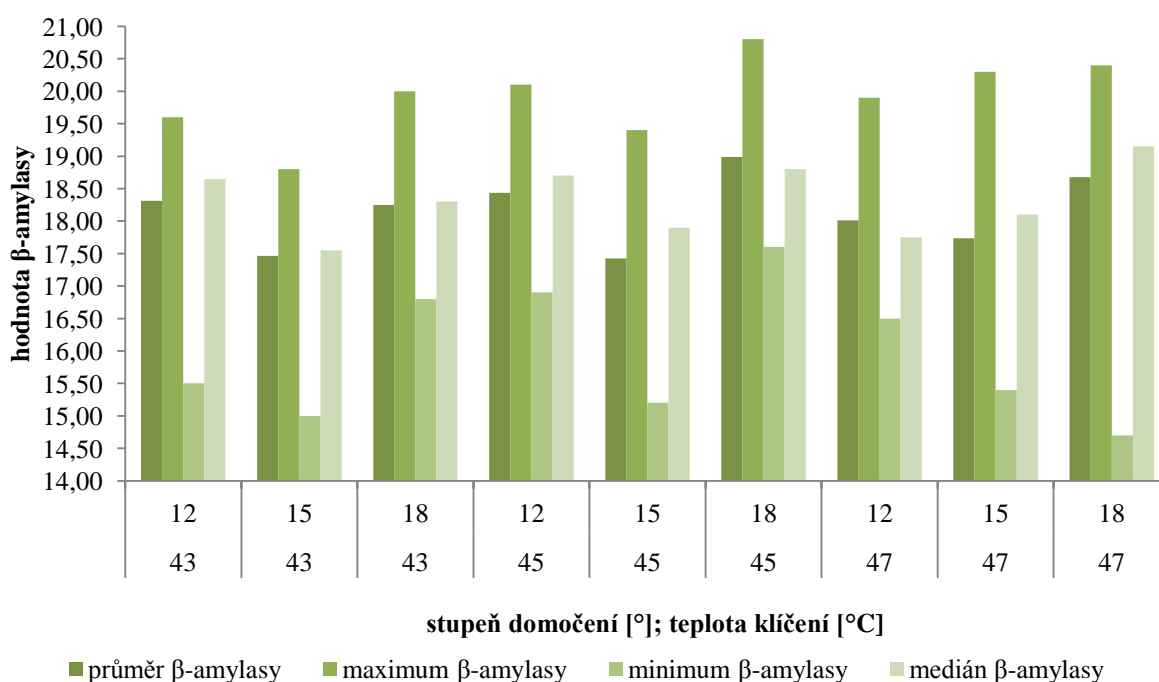
Graf 9: Vliv faktorů β -amylasy a teploty sušení na aktivitu β -amylasy

4.1.2.4 Porovnání stupně domočení a teploty klíčení

Tabulka 14: Vliv stupně domočení a teploty klíčení na aktivitu β -amylasy

Stupeň domočení [%]	Teplota klíčení [°C]	Průměr β -amylasy [U/g]	Maximum β -amylasy [U/g]	Minimum β -amylasy [U/g]	Medián β -amylasy [U/g]
43	12	18,31	19,60	15,50	18,65
43	15	17,46	18,80	15,00	17,55
43	18	18,25	20,00	16,80	18,30
Celkové hodnoty při 43%		18,01	20,00	15,00	18,30
45	12	18,44	20,10	16,90	18,70
45	15	17,43	19,40	15,20	17,90
45	18	18,99	20,80	17,60	18,80
Celkové hodnoty při 45%		18,28	20,80	15,20	18,70
47	12	18,01	19,90	16,50	17,75
47	15	17,74	20,30	15,40	18,10
47	18	18,68	20,40	14,70	19,15
Celkové hodnoty při 47%		18,14	20,40	14,70	18,10
Celkový průměr, max., min a medián		18,14	20,80	14,70	18,30

Závislost β -amylasy na stupni domočení a teplotě klíčení



Graf 10: Závislost aktivity β -amylasy na stupni domočení a teplotě klíčení

V Tabulce 14 a Grafu 10 jsou zobrazena průměrná, maximální, minimální a mediánová data, která ukazují vliv kombinace faktorů stupně domočení a teploty klíčení na výši aktivity β -amylasy. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že nejvyšší průměrové hodnoty aktivit β -amylasy dosahují při stupni domočení 45 ° a teplotě klíčení 18 °C a nejnižší při 45 °C.

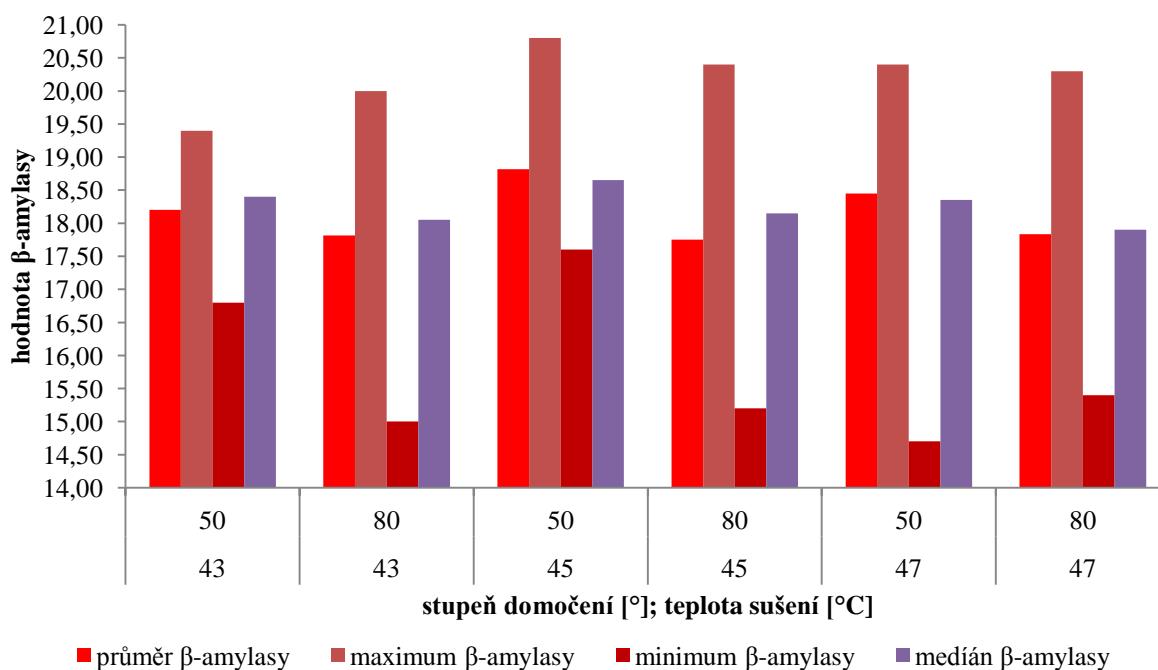
4.1.2.5 Porovnání stupně domočení a teploty sušení

V Tabulce 15 a Grafu 11 je uveden vliv stupně domočení a teploty sušení na výši aktivity β -amylasy. Z těchto dat vyplývá, že nejvyšší hodnota β -amylasy je dosažena při teplotě sušení 50 °C a stupni domočení 45 %. Nejnižší hodnota aktivity β -amylasy bylo dosaženo při 50 °C a obsahu vody 47 %.

Tabulka 15: Vliv stupně domočení a teploty sušení na aktivitu β -amylasy

Stupeň domočení [%]	Teplota sušení [°C]	Průměr β -amylasy [U/g]	Maximum β -amylasy [U/g]	Minimum β -amylasy [U/g]	Medián β -amylasy [U/g]
43	50	18,20	19,40	16,80	18,40
43	80	17,82	20,00	15,00	18,05
Celkové hodnoty při 43°		18,01	20,00	15,00	18,23
45	50	18,82	20,80	17,60	18,65
45	80	17,75	20,40	15,20	18,15
Celkové hodnoty při 45°		18,28	20,80	15,20	18,40
47	50	18,45	20,40	14,70	18,35
47	80	17,83	20,30	15,40	17,90
Celkové hodnoty při 47°		18,14	20,40	14,70	18,13
Celkový průměr, max., min a medián		18,14	20,80	14,70	18,30

Závislost β -amylasy na stupni domočení a teplotě sušení



Graf 11: Závislost aktivity β -amylasy na kombinaci parametrů stupni domočení a teplotě sušení

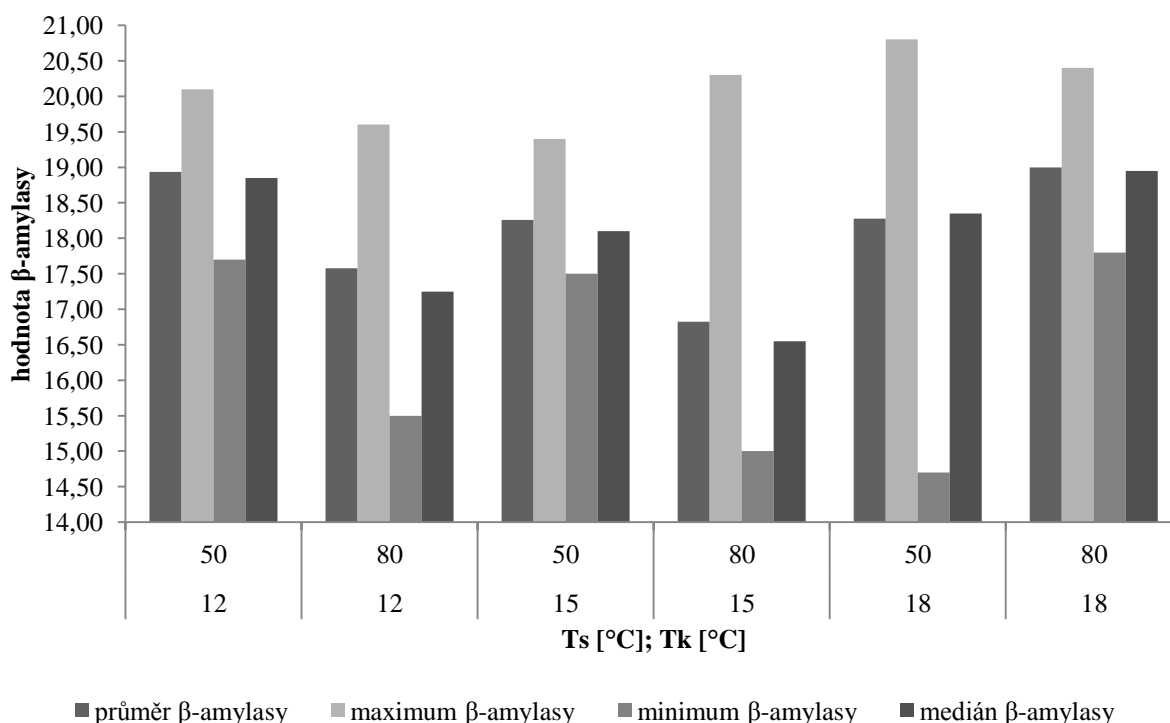
4.1.2.6 Porovnání teplot klíčení a sušení

V Tabulce 16 a Grafu 12 jsou porovnány mezi sebou parametry teplota klíčení a teplota sušení. Největšího maxima i minima aktivity β -amylasy se dosáhlo při teplotě sušení 50 °C a teplotě klíčení 18 °C. Nejvyšší průměr měly vzorky hvozděné při 80 °C a klíčené při 18 °C

Tabulka 16: Vliv kombinace technologických parametrů teplot sušení a klíčení na aktivitě β -amylasy

Stupeň domočení [%]	Teplota klíčení [°C]	Průměr β -amylasy [U/g]	Maximum β -amylasy [U/g]	Minimum β -amylasy [U/g]	Medián β -amylasy [U/g]
12	50	18,93	20,10	17,70	18,85
12	80	17,58	19,60	15,50	17,25
Celkové hodnoty při 43°		18,25	20,10	15,50	18,05
15	50	18,26	19,40	17,50	18,10
15	80	16,83	20,30	15,00	16,55
Celkové hodnoty při 45°		17,54	20,30	15,00	17,33
18	50	18,28	20,80	14,70	18,35
18	80	19,00	20,40	17,80	18,95
Celkové hodnoty při 47°		18,64	20,80	14,70	18,65
Celkový průměr, max., min a medián		18,14	20,80	14,70	18,30

Závislost β -amylasy teplotách klíčení a sušení



Graf 12: Závislost aktivity β -amylasy na teplotách klíčení a sušení

Diskuse výsledků:

Pro stanovení optimalizace technologických podmínek sladování bylo změřeno 72 vzorků pšenice. Každý vzorek měl jinou kombinaci technologických parametrů – délku sladování, stupeň domočení, teplotu klíčení a teplotu sušení. U každého vzorku se stanovila aktivita α -amylasy pomocí setu Ceralpha a β -amylasy pomocí setu Betamyl-3. Oba sety poskytuje společnost Megazyme, včetně kompletně zpracované metodiky.

Veškerá naměřená data jsou k dispozici v *Příloze 1* a v *Příloze 2*. Výsledky aktivit α -amylasy měly široké rozpětí (liší se až o dvojnásobek) a proto jsou zaokrouhleny na celá čísla, tudíž není potřebný podrobnější údaj. Naproti tomu hodnoty obsahu β -amylasy mají podstatně nižší hodnoty, tedy i menší rozsah. Což byl důvod, proč jsou uvedeny s přesností na 1 desetinné místo.

Nejistota měření metody je uvedena do 5 %, ale některé mé výsledky se od sebe liší o více, než 5 %, což mohlo být způsobeno kontaminací vzorku, protože každá tělní tekutina obsahuje α -amylasu. Nebo se paralelní hodnoty mohly lišit díky nepřesnému pipetování některého z objemů přidávaných roztoků.

S délkou sladování rostla aktivita enzymu α -amylasy, mezi 6 až 8 dnem. Vyšší obsah vody v zrna pšenice (stupeň domočení) měl pozitivní vliv na aktivitu tohoto enzymu. Vyšší teplota sladování a nižší teplota sušení naklíčeného zrna měla rovněž pozitivní vliv na aktivitu enzymu α -amylasy, ale rozdíly mezi jednotlivými variantami nebyly statisticky průkazné.

Vliv délky sladování na aktivitu enzymu β -amylasy nebyl jednoznačný, nejvyšší aktivita bylo dosaženo při sedmidenním sladování. Vliv stupně domočení nebyl na aktivitu enzymu β -amylasy statisticky významný, nejvyšší aktivita byla zjištěna u stupně domočení 45 %. Vyšší teplota sladování a nižší teplota sušení měla průkazný vliv na aktivitu enzymu β -amylasy.

Ze všech odrůd při stanovení α -amylasy vykazoval nejvyšší maximum 236 U/g vzorek, který se sladoval 8 dní, měl stupeň domočení 45 %, teplotu klíčení 18 °C, teplotu sušení 50 °C. Dále vyplývá, že průměrná aktivita α -amylasy z různých sladovacích parametrů byla stanovena na 170 U/g, medián, tedy střední hodnota, se od aritmetického průměru nepatrně lišila. Jeho hodnota činila 171 U/g. Nejmenší hodnota aktivity α -amylasy činila 104 U/g a byla naměřena u vzorku číslo 902801, přičemž celková doba sladování byla 5 dnů, stupeň domočení 45 %, teplota klíčení zrna byla 15 °C a teplota sušení 50 °C.

Konkrétní hodnota jednoho ze vzorků nelze aplikovat na celé další měření, protože není statisticky dostatečně průkazná. Proto bylo potřeba vybrat takovou metodu sladování, aby byl výtěžek enzymů co nejvyšší ve všech odrůdách za rok 2016. Bylo provedeno statistické vyhodnocení na základě průměrných hodnot (viz *Příloha 5*) a nejefektivnější technologie, kterou se sladovaly odrůdy pšenice ze sklizně roku 2016 bylo **při 7 dnech měl stupeň domočení 45 %, teplotu klíčení 18 °C, teplotu sušení 50 °C**. Takto zvolená doba sladování má navíc praktický důvod, protože odpovídá výrobnímu cyklu ve sladovnách.

Stanovení obsahu amylasy v pšeničném sladu prováděli Montanuci a spol., a zjistili, že klíčení pšenice je ideální při teplotě 25 °C, kdy při jejích stanovení vykazovala vyšší hladinu aktivity amylasy, než byla klíčení při 15, 20, 30 a 35 °C po určitou dobu až do 120 hodin klíčení. Ztráta sladu se zvyšuje úměrně teplotě a délce klíčení. Při hvozdění zeleného sladu o obsahu vlhkosti 12% a při teplotě 65 °C produkuje slad žádoucí vůni, barvu

a zachovává 75% své aktivity amylázy. Klíčení vedlo k 13,7 a 45,0% snížení hmotnosti a tvrdosti 1000 zrn, respektive k poklesu obsahu škrobu o 12% za 72 hodin. [65]

4.2 Stanovení aktivity enzymů u různých odrůd

Veškerá naměřená data jsou k dispozici v Příloze 3 a v Příloze 4. Níže uvedená Tabulka 17 znázorňuje průměrné hodnoty α -amylasy a β -amylasy jednotlivých odrůd v jednotlivých lokalitách, což byly Jaroměřice nad Rokytou, Chrlice a Věrovany. U každé lokality je průměrná, maximální, minimální a mediánová hodnota ze všech odrůd. Maximální hodnotu dosáhla α -amylasa i β -amylasa v Chrlicích a minimální hodnota α -amylasy byla dosažena v Jaroměřicích nad Rokytou a minimální hodnota β -amylasy ve Věrovanech.

Tabulka 17: Průměrné maximální, minimální a mediánové hodnoty α -amylasy a β -amylasy v jednotlivých lokalitách a rozptyl hodnot.

Lokalita	$\alpha_{\text{prům}}$ [U/g]	$\beta_{\text{prům}}$ [U/g]	α_{max} [U/g]	β_{max} [U/g]	α_{min} [U/g]	β_{min} [U/g]	α_{med} [U/g]	β_{med} [U/g]	α_{rozpt}	β_{rozpt}
Chrlice	195,3	31,0	298	43,4	123	18,4	187,5	32,2	1026,4	31,6
Jaroměřice nad Rokytou	189,0	28,9	280	37,8	111	19,4	179,0	30,1	1452,7	23,2
Věrovany	201,9	28,4	289	36,7	141	17,4	196,5	30,1	1268,3	25,2

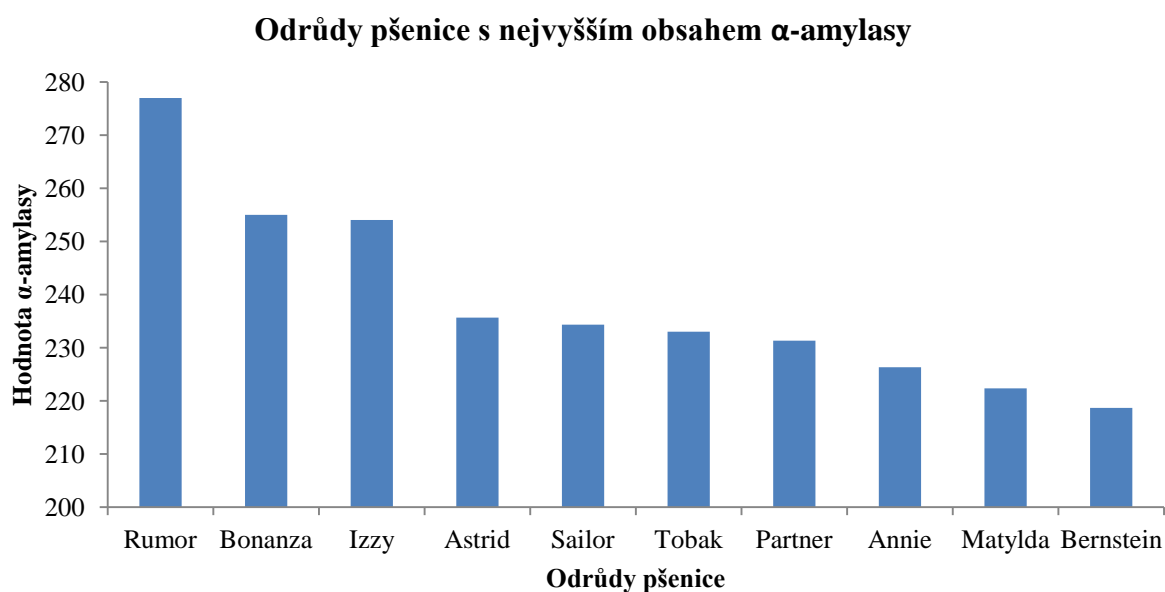
Tabulka 18 znázorňuje vyhodnocení vzorků podle odrůd. Bylo celkem hodnoceno 48 odrůd. U každé odrůdy je průměrná maximální, minimální a mediánová hodnota ze všech lokalit. V Grafu 13 jsou sestupně seřazeny průměrné hodnoty aktivity α -amylasy v dané odrůdě, přičemž největší obsah měla odrůda Rumor. Takto vyhodnocené výsledky jsou uvedeny i pro β -amylasu – viz Graf 14. Největší průměrný obsah β -amylasy měla odrůda Matchball.

Tabulka 18: Průměrné, maximální a minimální hodnoty α -amylasy a β -amylasy jednotlivých odrůd a rozptyl

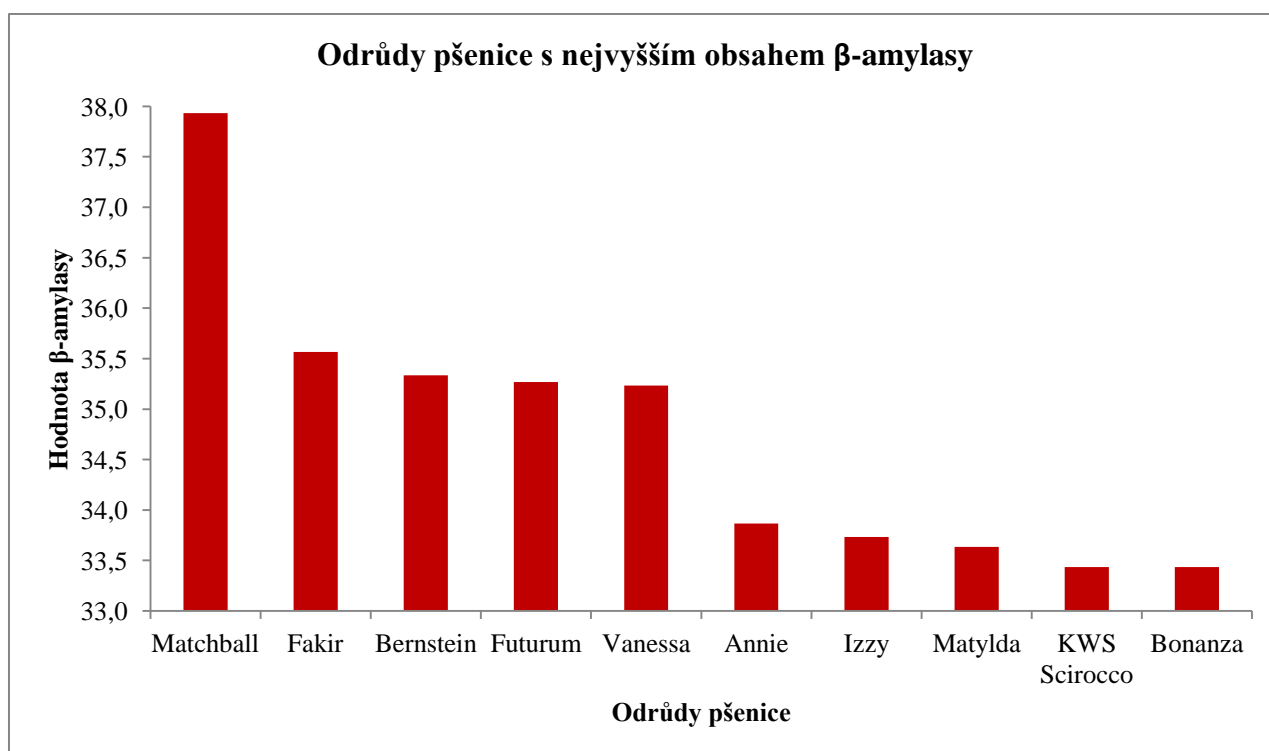
Odrůda	$\alpha_{\text{prům}}$ [U/g]	$\beta_{\text{prům}}$ [U/g]	α_{max} [U/g]	β_{max} [U/g]	α_{min} [U/g]	β_{min} [U/g]	α_{med} [U/g]	β_{med} [U/g]	α_{rozpt}	β_{rozpt}
Alicia	201	30,0	233	30,8	170	28,5	200	30,7	662,0	1,1
Alondra	204	28,6	219	29,0	196	28,2	198	28,6	108,2	0,1
Anabel	202	26,0	230	30,9	177	17,6	199	29,5	472,7	35,6
Annie	226	33,9	263	34,9	204	32,2	212	34,5	682,9	1,4
Artist	158	33,2	168	37,4	151	30,7	154	31,5	54,9	8,9
Astrid	236	31,2	240	32,5	232	30,2	235	31,0	10,9	0,9
Balitus	131	21,0	154	21,0	115	20,9	123	21,0	282,9	0,0
Bernstein	219	35,3	239	37,7	201	31,8	216	36,5	244,2	6,5
Bohemia	184	31,0	195	32,8	178	27,4	180	32,7	57,6	6,4
Bonanza	255	33,4	280	35,0	223	30,5	262	34,8	566,0	4,3
Cimrmanova raná	187	23,7	228	26,0	162	21,6	172	23,4	843,6	3,3
Cornetto	195	33,4	214	34,0	184	32,6	188	33,5	176,9	0,3
Dafne	187	32,3	216	32,5	171	31,9	173	32,4	430,9	0,1
Dagmar	216	19,9	246	21,5	177	18,3	224	20,0	828,2	1,7
Elan	180	32,8	189	34,2	172	31,0	180	33,1	48,2	1,8
Elly	217	33,2	249	35,2	187	30,5	215	34,0	642,7	4,0

Etana	184	25,2	193	26,9	178	23,0	180	25,7	44,2	2,7
Fabius	157	31,7	184	33,3	111	29,3	177	32,6	1081,6	3,0
Fakir	173	35,6	180	41,9	167	30,6	172	34,2	28,7	22,2
Faunus	172	29,6	179	33,4	169	26,2	169	29,2	22,2	8,7
Frisky	171	20,8	181	23,5	156	17,9	176	20,9	116,7	5,2
Futurum	215	35,3	243	37,8	181	31,9	221	36,1	658,7	6,1
Genius	190	30,7	211	33,7	176	27,4	183	31,1	228,7	6,7
Gordian	172	22,6	187	24,2	162	21,0	168	27,7	113,6	1,7
Hyfi	196	23,1	255	27,7	165	17,4	168	24,1	1742,0	18,2
Izzy	254	33,7	286	34,2	234	33,2	242	33,8	522,7	0,2
Julie	154	33,2	178	36,5	130	31,0	153	32,1	384,2	5,6
KWS Chamsin	174	23,8	179	25,1	164	22,3	179	24,0	50,0	1,3
KWS Mairra	167	30,2	180	32,0	147	28,6	173	29,9	201,6	2,0
KWS Ozon	166	30,6	178	32,5	149	28,7	172	29,9	156,2	2,4
KWS Scirocco	204	33,4	215	34,6	198	31,6	200	30,6	57,6	1,7
Lotte	148	33,0	172	33,7	114	31,9	159	34,1	617,6	0,6
Matchball	157	37,9	166	43,4	141	33,7	163	36,7	124,2	16,4
Matylda	222	33,6	248	36,8	176	31,0	243	33,1	1077,6	5,7
Pankratz	213	33,2	248	38,6	191	30,1	200	30,9	626,0	14,7
Partner	231	23,9	248	25,5	205	23,1	241	23,2	354,9	1,2
Patras	188	31,5	213	35,7	160	26,6	192	32,1	474,9	14,0
Quintus	210	24,0	241	31,4	183	18,4	205	22,2	571,6	29,8
Registana	195	28,1	213	28,5	182	27,7	191	28,0	169,6	0,1
Rivero	200	23,1	220	25,1	187	21,9	192	22,3	210,9	2,0
Rumor	277	28,1	298	33,2	244	22,4	289	28,7	558,0	19,6
Sailor	234	22,8	245	23,7	222	21,9	236	22,9	89,6	0,5
Seance	190	28,4	213	30,2	167	25,7	191	29,3	352,9	3,8
Tercie	176	28,2	191	30,1	163	27,2	173	27,4	134,2	1,7
Tobak	233	22,1	257	23,8	185	19,4	257	23,0	1152,0	3,7
Turandot	179	29,5	202	30,1	164	28,9	172	29,6	267,6	0,2
Vanessa	205	35,2	231	38,2	189	33,3	195	34,2	344,0	4,5
Zeppelin	171	31,1	174	34,0	169	27,4	169	31,8	5,6	7,5

Graf 13: Odrůdy pšenice s nejvyšší aktivitou α -amylasy



Graf 14: : Odrůdy pšenice s nejvyšší aktivitou β -amylasy



Diskuse výsledků:

V této části měření se podrobily 48 odrůd pšenice za rok 2016 ze tří lokalit. Celkem se tedy jednalo o 144 vzorků, které se sladovaly vybranou technologií sladování, kde celková doba sladování trvala 7 dní, obsah vody v znu činil 45 %, teplota klíčení byla 18 °C a teplota hvozdění 50 °C. Tyto vzorky se dále podrobily stanovení obsahu α -amylasy a β -amylasy. Veškerá naměřená data jsou uvedena v Příloze 3 a v Příloze 4.

Vyhodnocení bylo provedeno na základě průměrných hodnot pro jednotlivé lokality a pro jednotlivé odrůdy. Mezi 10 odrůd s nejvyšším obsahem α -amylasy patřily odrůdy Rumor, který měl průměrný obsah α -amylasy 277 U/g, Bonanza – 255 U/g, Izzy - 254 U/g, Astrid – 236 U/g, Sailor – 234 U/g, Tobak – 233 U/g, Partner – 231 U/g, Annie – 226 U/g Matylida – 222U/g a Bernstein –219.

Mezi 10 odrůd s nejvyšší aktivitou β -amylasy patřily Matchball – 37,9 U/g , Fakir – 35,6 U/g, Bernstein – 35,3 U/g; Futurum – 35,3 U/g; Vanessa – 35,2 U/g Annie – 33,9 U/g, Izzy – 33,7 ; Matylida –33,6 U/g; KWS Scirocco - 33,4 U/g a Bonanza 33,4 U/g.

McCleary, Nally a Monaghan vypracovali studii na vliv různých vzorků na aktivitu α -amylasy. Celkem bylo stanoveno 15 vzorů v 16 laboratořích. Vzorky byly bílá pšeničná mouka, bílá pšeničná mouka s přídavkem houbová α -amylasy, sladová mouka, sladová mouka s přídavkem houbové a bakteriální α -amylasy. Dle Statistiky byly zjištěny významné odchylky výsledků u pšeničné mouky a sladové mouky. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí od 1,4 do 14,4%. Nejvyšší hodnota byla získána z bílé pšeničné mouky Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSDR) byla v rozmezí od 5,0 do 16,7%. Cílem bylo, aby mouka poskytla dobrý chléb, tedy měla dostatek α -amylázy k štěpení škrobu na zkvasitelné cukry. Výhodou této metody je to, že zatím se jedná o jedinou metodu, která je vhodná pro měření α -amylasy v obilných a mikrobiálních vzorcích který používá definovaný substrát. [52]

5 ZÁVĚR

Slad je potravinářská surovina, která se získává sladováním. Cílem sladování je aktivita celé škály enzymů, především amylolytických enzymů, které štěpí škrob na jednodušší zkvasitelné cukry. Jednotlivé kroky sladování jsou máčení, klíčení, sušení či hvozdění a následná úprava. Cílem máčení je zvýšení obsahu vody v zrně, což umožní průběh požadovaných reakcí. Během klíčení se aktivuje enzymatický komplex a při hvozdění se zastaví růst zrna a přitom zůstane zachována aktivita enzymů v co největší míře. Zároveň během hvozdění získá slad požadované organoleptické vlastnosti, jako je barva vůně chuť a křehkost.

Tato diplomová práce byla provedena ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a.s., pracoviště Brno a vznikla při řešení projektu TE02000177 Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků.

Cílem bylo vypracování literární rešerše na téma způsoby a metodiky sladování a vliv technologických parametrů na aktivitu enzymů. Bylo zjištěno, že největší vliv má na aktivitu enzymů pravděpodobně délka sladování v kombinaci s teplotami klíčení a sušení. Dále je také důležitý obsah vody v zrně a další faktory, jako je odrůda sladu a klimatické podmínky.

Dalším cílem práce bylo nalezení optimálního technologického procesu sladování pšenice, tak aby výsledný slad vykazoval vysokou aktivitu enzymů α -amylasy a β -amylasy. Tato optimalizace byla první částí měření. V druhé části měření byla dalším cílem aplikace vhodné sladovací technologie na vybraný soubor odrůd jarní a ozimé pšenice z různých stanovišť ze sklizně roku 2016 a následný výběr odrůd s nejvyšší aktivitou enzymů α -amylasy a β -amylasy. Výsledkem bylo doporučení, které odrůdy jsou nejvhodnější pro využití na výrobu sladu s vysokou enzymatickou aktivitou. Slad bude využíván jako komponenta do krmných směsí pro zvířata.

Všechny vzorky byly podrobeny stanovení aktivity α -amylasy a β -amylasy, přičemž aktivita α -amylasy byla stanovena setem Ceralpha method od společnosti Megazyme a β -amylasa setem Betamyl-3 method od stejné společnosti.

V první části práce se sladovala pšenice odrůdy Arkeos, která měla obsah dusíkatých látek 13 %, obsah škrobu 66,4 % a klíčivost 97 %. Byly testovány různé technologie sladování s různou délkou klíčení, teplotou klíčení, teplotou sušení a stupněm domočení. Vzorky se sladovaly po dobu 5, 6, 7 a 8 dnů, při teplotách klíčení 12, 15, 18 °C, domáčely se na stupeň domočení 43, 45, 47 %, a hvozdily při 50 a 80 °C. Kombinatorikou všech možností se dosáhlo 72 vzorků a statistickým vyhodnocením průměrných hodnot byla vybrána vhodná metoda sladování odrůd pšenice ze sklizně 2016. Vybraná technologie sladování byla taková, že doba sladování trvala 7 dní, stupeň domočení byl 45 %, teplota klíčení 18 °C a teplota sušení 50 °C.

Druhá část měření byla zaměřena na aplikaci vybrané technologie sladování na souboru 48 odrůd pšenice ze třech pokusných lokalit ÚKZÚZ za rok 2016. Vyhodnocením průměrných hodnot enzymů bylo zjištěno, že nejvyšší obsah enzymu α -amylasy měly odrůdy Rumor, který měl průměrný obsah α -amylasy 277 U/g, Bonanza – 255 U/g a Izzy – 254 U/g. A největší aktivitu enzymu β -amylasy měly odrůdy Matchball – 37,9 U/g, Fakir – 35,6 U/g, a Bernstein – 35,3 U/g

6 POUŽITÉ INFORMAČNÍ ZDROJE

[1] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.

[2] BASAŘOVÁ, G., I. HLAVÁČEK, P. BASAŘ a J. HLAVÁČEK. *České pivo*. 3., dopl. vyd. Praha: Havlíček Brain Team, 2011. ISBN 978-80-87109-25-0.

[3] MOŠTEK, Josef. *Sladařství: Biochemie a technologie sladu*. Ed. L. Hlavatá a L. Masáková. Praha: SNTL, 1975, 480 s. Řada potravinářské literatury. ISBN 04-815-75.

[4] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.

[5] Z HÁJKŮ, Hájek, T. (THADDEAEO Tagedicio). *De cerevisia eiusque conficiendi,, ratione, natura viribus et facultatibus opusculum*. Frankfurth: Andrex Wecheli, 1585. Český překlad Nademlejnský, K.: *Staré památky pivovarství českého. O pivě a jeho výrobě, povaze silách a vlastnostech*. Pivovarské listy, 1884, 8-11,

[6] BASAŘOVÁ, Gabriela a Jaroslav ČEPIČKA. *Sladařství a pivovarství*. Praha: SNTL, 1985. ISBN (neváz.).

[7] CHODOUNSKÝ, F. *Příspěvek k dějinám českého pivovarnictví*. Praha: Alois Wiesner, nákladem výstavního výboru odboru pivovarnického, 1891.

[8] LHOTSKÝ, Alois. *Pivovarská enzymologie*. Brno: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1971. ISBN 04-828-71.

[9] ERDE VAN, P. *Water in the brewing industry , views on the EBC Symposium: European Brewery Convention: Proceedings of the 22nd Congress, Zurich, 1989*. příspěvek 12, 163-171. Oxford [England]: IRL Press, 1989, 792 s. ISBN 01-996-3128-X.

[10] MOLL, M. *Beer and Coolers*. Andover, Hampshire: Intercept, 1994, 495 s. ISBN 1-898298-2.

[11] KUNZE, Wolfgang. *Technology Brewing and Malting*. 5. revidované anglické vydání. Berlín: VLB, 2014, 960 s. ISBN 978-3-921690-77-2

[12] KRUGER/ANGER. *Kennzahlen zur Betriebskontrolle und Qualitätsbeschreibung in der Brauwirtschaft: Daten über Roh- und Hilfsstoffe, Halbfertig- und Fertigprodukte bei der Bierbereitung*. 2. rev. Hamburg: Behr, 1990. ISBN 39-256-7375-X.

[13] KOSAŘ, Karel. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80-902-6586-3.

[14] BASAŘOVÁ, Gabriela, J. ŠAVEL, P. BASAŘ a T. LEJSEK. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978-80-7080-734-7.

[15] BRIGGS, D. E, J.S. HOUGH, R. STEVENS a Tom W. YOUNG. *Malting and Brewing Science: Malt and Sweet Wort, Volume 1*. 5. vyd. Berlín: Springer, Berlin, 2009. ISBN 0412165805.

[16] HOUGH, J.S., D.E. BRIGGS, R. STEVENS a T.W. YOUNG. *Malting and Brewing Science: Volume II Hopped Wort and Beer*. Vyd. 3. Berlín: Springer, 1982. ISBN 978-146-1357-278.

- [17] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH, Michal VOLDŘICH a A KOL. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: Technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2009. ISBN 978-80-7418-060-6.
- [18] OPLETAL, L. Bohumír Šimerda. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby, 2010. ISBN 978-807-4030-673. Studie. Vuzv
- [19] EBC TECHNOLOGY AND ENGINEERING FORUM a . *Malting technology of good practice*. 3. rev. Nürnberg: Getränke-Fachverlag Hans Carl, 2000, 223 s. ISBN 34-180-0753-8.
- [20] BRADBEER, J.W. *Seed dormancy and germination*. Glasgow: Blackie Academic and profesional, 1988, 146 s. ISBN 07-514-0108-0.
- [21] BENECH-ARNOLD, R. L. *Bases of pre-harvest sprouting resistance in barley:: Physiology, molecular biology and endiromental control of dormacy in barley grain*. New York: Food Product Press, 2002, 665 s. Barley Science. ISBN 10 1560229101.
- [22] POLLOCK, James Richard Allan. *Brewing science*. New York: Academic Press, 1979, 323 s. Food science and technology. ISBN 01-256-1001-7.
- [23] Kolektiv autorů: *Technologie sladu a piva*. 1. díl, Praha: SNTL, 1953, 253 s. ISBN (neváz.)
- [24] VANČURA, Miroslav a Josef BEDNÁŘ, ed. *Pivovarsko-sladařská analytika*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1966. ISBN Pivovarsko-sladařská analytika.
- [25] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [26] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 1999, 342 s. ISBN 80-902-3912-9.
- [27] MUNCK, L., G. GIBBONS a S. AASTRUP. *Chemical and structural changes during malting*. EBC - Eur. Brew. Conv.: Proc 18 th Congress, Copenhagen 1981, příspěvek 1, 11-29, Oxford: IRL Press, 1981, 710 s. ISBN 0-94147 30-4.
- [28] PALMER, G. H. *Cereal science and technology*. 2. Aberdeen: Aberdeen University Press, 1989, 463 s. ISBN 008350640X.
- [29] HULÍN, P., P. DOSTÁLEK a HOCHÉL. *Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách* [online]. *Chemické listy*, 2008, 102(5),. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1650/1650>
- [30] BRIGGS, D.E.: *Barley*. London: Chapman and Hall, 1978. 612 s.
- [31] LEE, W. J.: Phytic acid content and phytase activity of barley malt. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 1990, 48(2) 62 - 65.
- [32] CAMPENHOUT, VAN, L., D. ISERENTANT a H. VERACHTERT. *Automated control, of barley, respiration, during germinaton*. Cannes: Eur. Brew. Conv., 1999, 882 s. ISBN 90-70143-20-8.
- [33] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2014. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2.

- [34] MCCANCE, R. a Elsie M WIDDOWSON. *McCance and Widdowson's The composition of foods*. 6th summary ed /. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004, xv, 537 p. ISBN 08-540-4428-0.
- [35] HUI, Y. H., M. VILLAMIEL, a M. DEL CASTILLO. *Food biochemistry and food processing*. Ames, Iowa: Blackwell Pub. Professional, 2006, 83 - 85. ISBN 978-0-8138-0378-4.
- [36] COGHE, Stefan, Bert GHEERAERT, Ann MICHIELS a Freddy R. DELVAUX. *Development of Maillard Reaction Related Characteristics During Malt Roasting*. Journal of the Institute of Brewing. 2006, 1993, **112**(2), 148-156. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2006.tb00244.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00244.x>
- [37] FORSTER, C., L. NARZISS, W. BACK a H. MIEDANER. *Influence of kilning technology on the formation of volatile aroma compounds in malt, wort and beer*: Eur. Brew. Conv. Proceedings of the 25th Congress, Brussels 1995, (475 - 482), Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1995, 783 s. ISBN 01-996-3614-1.
- [38] ŠEPITKA, A. Sušenie v potravinarskom priemysle. Bratislava: Alfa 1984, 260 s.
- [39] COOK, A. H., ed. *Barley and Malt: Biology, Biochemistry, Tehhnology*. New York and London: Academic Press, 1962, 240 s. ISBN 978-1-4832-2769-6.
- [40] BAYNES, J. W. a M. H- DOMINICZAK. *Medical biochemistry*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005., 695 s. ISBN 0723433410.
- [41] CAMPBELL, Mary K. a Shawn O. FARRELL. *Biochemistry*. 6th ed. United States: Thomson/Brooks/Cole, 2009. ISBN 978-049-5390-411.
- [42] HAVLOVÁ, Pavla. *Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu: (studijní zpráva)*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1999. Studijní informace. ISBN 80-727-1040-0.
- [43] HEISEL, S. E. *Providing cereals for Brewings*. C. ed. Bramforth: Woodhead, 2006, 487 s. Brewing New Technologies. ISBN 1-84569-003-6.
- [44] FALTERMAIER, A., WALTERS, D., ARENDT, E., GASTL, M.: Protein modifications and metabolic changes taking place during the malting of common wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Am. Soc. Brew. Chem. 2013, 71(3), 153-154
- [45] PSOTA, V., VEJRAŽKA, K.: Fyzikální vlastnosti ječmene a sladu. Kvasný průmysl 2006, 52(15) 148 - 150.
- [46] EBC ANALYSIS COMMITTEE. *Analytica-EBC*. Nürnberg: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 2009. ISBN 3-418-00759-7.
- [47] BASAŘOVÁ, Gabriela. Pivovarsko-sladařská analytika. 1. Praha: MERKANTA, 1992. ISBN (neváz.).
- [48] BASAŘOVÁ, Gabriela. Pivovarsko-sladařská analytika. 2. Praha: MERKANTA, 1992. ISBN (neváz.).
- [49] BASAŘOVÁ, Gabriela. Pivovarsko-sladařská analytika. 3. Praha: MERKANTA, 1992. ISBN (neváz.).

- [50] Springer, 1992. Springer laboratory. ISBN 13:978-3-642-77479-9.
- [51] MCCLEARY, B.V. a H. SHEEHAN. Measurement of Cereal alpha-Amylase:: A New Assay Procedure. In: Journal of Cereal Science. 6. Elsevier, 1987, s. 237-251. DOI: S0733-5210(87)80061-9. ISSN 0733-5210.
- [52] MCCLEARY, B.V., M MCNALLY, D MONAGHAN a D.C. MUGFORD. Measurement of alpha-amylase activity in white wheat flour, milled malt, and microbial enzyme preparations, using the Ceralpha assay: collaborative study. Journal of AOAC International [online]. United States: Arlington, VA : AOAC International, 2002, 1.4.2003, 2002(5), 25-27 [cit. 2018-03-14]. DOI: 85(5):1096-102. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374409>
- [53] Úvod do potravinářské legislativy: Komoditní vyhlášky. Web.vscht.cz [online]. 2011, 17. srpna 2011 9:35:57 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/~kocourev/files/Leg_komodity.pdf
- [54] PERKAMPUS, Heinz-Helmut. UV-VIS spectroscopy and its applications. Berlin:
- [55] TEKSL, Milan. Pěstování rostlin 1: učebnice pro střední zemědělské školy. Praha: Credit, 1996. ISBN 80-901-6457-9.
- [56] NOVÁK, Jan a Milan SKALICKÝ. Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika. Čtvrté vydání. Praha: Powerprint, 2017, 358 s. ISBN 978-80-7568-036-5.
- [57] GREGOR, W. A., Proceeding European Brewery Convention Congress. Lisabon: 1991, 37 s.
- [58] MATHEWSON, Paul R. a Bradford W. SEABOURN. A new procedure for specific determination of .beta.-amylase in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1983, **31**(6), 1322-1326. DOI: 10.1021/jf00120a043. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00120a043>
- [59] MCCLEARY, Barry V a Rachel CODD. Measurement of (1 → 3),(1 → 4)-β-D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1991, **55**(2), 303-312. DOI: 10.1002/jsfa.2740550215. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740550215>
- [60] RADA, Vojtěch a Jaroslav HAVLÍK. *Enzymy ve výživě hospodářských zvířat*. Praha: Vědecký výbor výživy zvířat, 2010. ISBN 978-80-7403-065-9.
- [61] BRUFAU, Joaquim, Maria FRANCESCH a Anna M PÉREZ-VENDRELL. The use of enzymes to improve cereal diets for animal feeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2006, **86**(11), 1705-1713 [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.1002/jsfa.2557. ISSN 0022-5142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2557>
- [62] MAROUNEK, M., S. J. VOVK a V. SKŘIVANOVÁ. Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition* [online]. 1995, **73**(03), 463- [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.1079/BJN19950048. ISSN 0007-1145. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114595000493
- [63] Metodika *Alpha-Amylase Assay procedure (Ceralpha Method): For the measurement of plant and microbial Aplpha-amylases*. Megazyme Internetal. Ireland, 2012, 19 s.

[64] Metodika *Beta-amylase: Assay procedure (Betamyl-3 method)* Megazyme International. Ireland, 2010, 11

[65] MONTANUCI, Flávia Daiana, Marcelo RIBANI, Luiz Mario DE MATOS JORGE a Regina Maria MATOS JORGE. *Effect of steeping time and temperature on malting process*. JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-MYSORE. 1995, 32(2), 98-103. DOI: 10.1111/jfpe.12519. ISBN 10.1111/jfpe.12519. ISSN 0975-8402. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfpe.12519>

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: přehled druhů celkové tvrdosti vody podle součtu obsahu hořečnatých a vápenatých solí (Basařová 2011)

Tabulka 2: Porovnání parametrů ječného plzeňského a pšeničného světlého sladu

Tabulka 3: Souhrnná data optimalizace technologie sladování

Tabulka 4: Statistický souhrn naměřených dat aktivit α -amylasy i β -amylasy

Tabulka 5: Porovnání kombinace sladovacích parametrů délky sladování a stupně domočení s hodnotou α -amylasy

Tabulka 6: Porovnání kombinace sladovacích parametrů délky sladování a teploty klíčení s aktivitou α -amylasy

Tabulka 7: Porovnání kombinace technologických parametrů délky sladování a teploty sušení s obsahem α -amylasy

Tabulka 8: Porovnání kombinace sladovacích faktorů stupně domočení a teploty klíčení a jejich vliv na aktivitu α -amylasy

Tabulka 9: Vliv kombinace stupně domočení a teploty sušení a výši aktivity α -amylasy

Tabulka 10: Vliv teplot sušení a klíčení na aktivitu α -amylasy

Tabulka 11: Vliv stupně domočení a délky sladování na aktivitu β -amylasy

Tabulka 12: Vliv délky sladování a teploty klíčení na β -amylasu

Tabulka 13: Vliv délky sladování a teploty sušení na aktivitu β -amylasy

Tabulka 14: Vliv stupně domočení a teploty klíčení na aktivitu β -amylasy

Tabulka 15: Vliv stupně domočení a teploty sušení na aktivitu β -amylasy

Tabulka 16: Vliv kombinace technologických parametrů teplot sušení a klíčení na aktivitě β -amylasy

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Závislost aktivity α -amylasy na době sladování a stupni domočení

Graf 2: Závislost aktivity α -amylasy na délce sladování a teploty klíčení

Graf 3: Vliv doby sladování a teploty sušení na aktivity α -amylasy

Graf 4: Závislost aktivity α -amylasy na teplotě klíčení a stupni domočení

Graf 5: Závislost aktivity α -amylasy na kombinaci technologických podmínek stupni domočení a teplotě sušení

Graf 6: Závislost aktivity α -amylasy na teplotách sušení a klíčení

Graf 7: Porovnání kombinace technologických parametrů - délka sladování a stupeň domočení na aktivitě β -amylasy

Graf 8: Závislost aktivity β -amylasy na délce sladování a teplotě klíčení

Graf 9: Vliv faktorů β -amylasy a teploty sušení na aktivitu β -amylasy

Graf 10: Závislost aktivity β -amylasy na stupni domočení a teplotě klíčení

Graf 11: Závislost aktivity β -amylasy na kombinaci parametrů stupni domočení a teplotě sušení

Graf 12: Závislost aktivity β -amylasy na teplotách klíčení a sušení

Graf 13: Odrůdy pšenice s nejvyšší aktivitou α -amylasy

Graf 14: Odrůdy pšenice s nejvyšší aktivitou β -amylasy

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Dvoulískový hvozd. (zdroj fabriky.cz)

Obrázek 2: Blokové schéma sladování (vytvořeno v programu ChemSketch)

Obrázek 3: Pásový dopravník (zdroj vyuka.odbornaterminologie.cz)

Obrázek 4: A - máčecí křivka - závislost příjmu vody na teplotě máčecí vody; B - závislost doby máčení na teplotě pro dosažení požadovaného stupně domočení dvouřadých ječmenů (zdroj Basařová 2015)

Obrázek 5: Složení zrna a představa o rozluštění (zdroj Lhotský 1971)

Obrázek 6: Tvorba enzymů v klíčícím zrna ječmene (zdroj Basařová a Čepička 1986)

Obrázek 7: Zelený slad před hvozdním (zdroj depositphotos.com)

Obrázek 8: Sladový květ (vlastní foto)

Obrázek 9: Anatomie ječné obilky: Část A - schematické znázornění anatomických struktur; B - příčný řez; C - podélný řez; (zdroj Basařová 2015 - překresleno Špačkovou podle Briggse)

Obrázek 10: Sladování v boxech mikrosladovny. (vlastní foto)

Obrázek 11: Ječný a pšeničný slad (zdroj svet-piva.cz)

Obrázek 12: Vzorec a prostorové uspořádání amylosy (zdroj Moštek 1975 a wikiskripta - H. Hoffmeister)

Obrázek 13: vzorec řetězce amylopektinu (zdroj Moštek 1975)

Obrázek 14: Mechanismus účinku stanovení α -amylasy (zdroj metodika setu CERALPHA)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

aj. – a jiné

BU – Betamyl Unit - Betamylová jednotka

BSA – Bovine Serum Albumin - Hovězí sérový albumin

cca – circa - přibližně

Celk. – celkový
CU – Ceraplpha unit - Ceralpha jednotka
DMS – dimethylsulfid
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
FCH – Fakulta chemická
g – gram
hl – hektrolitr
hod – hodina
Max – maximum
MES – 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
Min – minimum
min – minuta
mm – milimetr
mg – miligram
např. – například
prům. – průměr
resp. – respektive
VUT – Vysoké učení technické

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Naměřená data optimalizace technologických podmínek α -amylasy.

Příloha 2: Veškerá naměřená data β -amylasy z první části měření.

Příloha 3 Stanovení α -amylasy 2 části - odrůdy v roce 2016

Příloha 4 Stanovení β -amylasy 2 části

Příloha 5 Statistické vyhodnocení

PŘÍLOHY

Příloha 1: Naměřená data optimalizace technologických podmínek α -amylasy. Použité: \check{c}_{vz} je číslo vzorku; DS je délka sladování; St_{H_2O} je stupeň domočení; t_k -teplota klíčení; t_s -teplota sušení; A_1 je absorbance prvního vzorku; A_2 je absorbance druhého vzorku; α_1 -vypočítaná hodnota aktivity α -amylasy prvního vzorku; α_2 je vypočítaná hodnota α -amylasy druhého vzorku; α_p -průměrná hodnota α -amylasy ze dvou vzorků; s - směrodatná odchylka odchylka; v variační koeficient.

\check{c}_{vz}	DS [den]	St_{H_2O} [%]	t_k [°C]	t_s [°C]	A_1	A_2	α_1 [U/g]	α_2 [U/g]	α_p [U/g]	s	v [%]
902742	5	43	12	50	0,2696	0,2926	101,384	110,005	106	6,10	5,77
902743	5	45	12	50	0,2686	0,22944	100,988	101,693	106	6,86	6,48
902744	5	47	12	50	0,3213	0,3201	120,809	120,358	121	0,32	0,26
902761	5	43	12	80	0,3492	0,3411	131,299	128,254	130	2,15	1,66
902762	5	45	12	80	0,3694	0,3452	138,894	129,795	134	6,43	4,80
902763	5	47	12	80	0,4408	0,4605	165,741	173,148	169	5,24	3,10
902800	5	43	15	50	0,3302	0,3525	124,155	132,540	128	5,93	4,63
902801	5	45	15	50	0,2788	0,2729	104,829	102,610	104	1,57	1,51
902802	5	47	15	50	0,3391	0,3516	127,502	132,202	130	3,32	2,56
902917	5	43	15	80	0,4626	0,4642	173,938	174,539	174	0,43	0,24
902918	5	45	15	80	0,4973	0,4714	186,985	177,246	182	6,89	3,78
902919	5	47	15	80	0,4789	0,4802	180,066	180,555	180	0,35	0,19
902966	5	43	18	50	0,4263	0,4190	160,289	157,544	159	1,94	1,22
902967	5	45	18	50	0,4077	0,4332	153,295	162,883	158	6,78	4,29
902968	5	47	18	50	0,4667	0,4772	175,479	179,427	177	2,79	1,58
903017	5	43	18	80	0,4256	0,4113	160,026	154,649	157	3,80	2,42
903018	5	45	18	80	0,4484	0,4489	168,598	168,786	169	0,13	0,08
903019	5	47	18	80	0,4215	0,4390	158,484	165,064	162	4,65	2,87
902739	6	43	12	50	0,4685	0,4407	176,156	165,703	171	7,39	4,32
902740	6	45	12	50	0,4498	0,4626	169,125	173,938	172	3,40	1,98
902741	6	47	12	50	0,4290	0,4307	161,304	161,943	162	0,45	0,28
902758	6	43	12	80	0,3973	0,3921	149,385	147,430	148	1,38	0,93
902759	6	45	12	80	0,4222	0,4055	158,747	152,468	155	4,44	2,86
902760	6	47	12	80	0,4199	0,4171	157,882	156,830	157	0,74	0,47
902797	6	43	15	50	0,4472	0,4355	168,147	163,748	166	3,11	1,87
902798	6	45	15	50	0,4608	0,4778	173,261	179,653	176	4,52	2,57
902799	6	47	15	50	0,4208	0,4366	158,221	164,162	161	4,20	2,61
902914	6	43	15	80	0,5102	0,4952	191,835	186,195	189	3,99	2,11
902915	6	45	15	80	0,5496	0,5268	206,650	198,077	202	6,06	3,00
902916	6	47	15	80	0,6280	0,6223	236,128	233,985	235	1,52	0,64
902963	6	43	18	50	0,4764	0,4854	179,126	182,510	181	2,39	1,32
902964	6	45	18	50	0,4707	0,4898	176,983	184,165	181	5,08	2,81
902965	6	47	18	50	0,5142	0,5177	193,339	194,655	194	0,93	0,48
903014	6	43	18	80	0,3711	0,3920	139,534	147,392	143	5,56	3,89

903015	6	45	18	80	0,4499	0,4400	169,162	165,440	167	2,63	1,58
903016	6	47	18	80	0,5110	0,5429	192,136	204,130	198	8,48	4,28
902736	7	43	12	50	0,4534	0,4515	170,478	169,764	170	0,51	0,30
902737	7	45	12	50	0,5181	0,4873	194,806	183,225	189	8,19	4,33
902738	7	47	12	50	0,5779	0,5902	217,290	221,915	220	3,27	1,49
902755	7	43	12	80	0,4511	0,4456	169,614	167,546	169	1,46	0,87
902756	7	45	12	80	0,4316	0,4264	162,282	160,326	161	1,38	0,86
902757	7	47	12	80	0,4462	0,4538	167,771	170,629	169	2,02	1,20
902794	7	43	15	50	0,4902	0,5015	184,315	188,564	186	3,00	1,62
902795	7	45	15	50	0,4839	0,4527	181,946	170,215	176	8,30	4,71
902796	7	47	15	50	0,4472	0,4697	168,147	176,607	172	5,98	3,48
902911	7	43	15	80	0,3207	0,3260	120,583	122,576	117	1,41	1,20
902912	7	45	15	80	0,5827	0,5702	219,095	214,395	212	3,32	1,57
902913	7	47	15	80	0,5938	0,5856	223,269	220,186	222	2,18	0,98
902960	7	43	18	50	0,4855	0,4649	182,548	174,802	179	5,48	3,06
902961	7	45	18	50	0,4776	0,4742	179,578	178,299	179	0,90	0,51
902962	7	47	18	50	0,5520	0,5623	207,552	211,425	209	2,74	1,31
903011	7	43	18	80	0,3925	0,3944	147,580	148,294	148	0,51	0,34
903012	7	45	18	80	0,4287	0,4236	161,191	159,274	160	1,36	0,85
903013	7	47	18	80	0,4864	0,4787	182,886	179,991	181	2,05	1,13
902733	8	43	12	50	0,5617	0,5715	211,199	214,884	213	2,61	1,22
902734	8	45	12	50	0,4883	0,4401	183,582	165,464	174	7,23	4,16
902735	8	47	12	50	0,5015	0,5205	188,564	195,708	192	5,05	2,63
902752	8	43	12	80	0,4661	0,4194	175,241	157,684	167	12,41	7,46
902753	8	45	12	80	0,4705	0,4823	176,908	181,345	179	3,14	1,75
902754	8	47	12	80	0,5178	0,5578	194,711	209,724	202	9,84	5,21
902791	8	43	15	50	0,4350	0,4617	163,560	173,599	169	7,10	4,20
902792	8	45	15	50	0,5040	0,4974	189,504	187,022	188	1,75	0,93
902793	8	47	15	50	0,5533	0,5615	208,041	211,124	210	2,18	1,04
902908	8	43	15	80	0,3192	0,3051	120,019	114,718	117	3,75	3,20
902909	8	45	15	80	0,3544	0,3520	133,254	132,352	132	0,64	0,48
902910	8	47	15	80	0,3762	0,3931	141,451	147,806	144	4,49	3,12
902957	8	43	18	50	0,5764	0,5646	216,726	212,290	214	3,14	1,47
902958	8	45	18	50	0,6303	0,6233	236,993	234,361	236	1,86	0,79
902959	8	47	18	50	0,5376	0,5356	202,138	201,386	201	0,53	0,26
903008	8	43	18	80	0,4258	0,4267	160,101	160,439	160	0,24	0,15
903009	8	45	18	80	0,4858	0,4721	182,661	177,510	180	3,64	2,02
903010	8	47	18	80	0,4578	0,4440	172,133	166,944	169	3,67	2,17

Příloha 2: Veškerá naměřená data β -amylasy z první části měření. – Použité zkratky; DS - délka sladování; St_{H_2O} - stupeň domočení; t_k - teplota klíčení; t_s - teplota sušení; A_1 - absorbance prvního vzorku; A_2 je absorbance druhého vzorku; β_1 - vypočítaná hodnota aktivity β -amylasy prvního vzorku; β_2 - vypočítaná hodnota β -amylasy druhého vzorku; β_p - průměrná hodnota β -amylasy ze dvou vzorků; s je směrodatná odchylka a v je relativní odchylka, tedy variační koeficient

\check{c}_{vz}	DS [den]	St_{H_2O} [%]	T_k [°C]	T_s [°C]	A_1	A_2	β_1 [U/g]	β_2 [U/g]	β_p [U/g]	S	v [%]
902742	5	43	12	50	0,9318	1,0457	18,374	20,620	19,4	1,588	8,14
902743	5	45	12	50	0,9815	0,9658	19,355	19,046	19,2	0,219	1,14
902744	5	47	12	50	0,9960	1,0121	19,641	19,959	19,8	0,225	1,13
902761	5	43	12	80	0,7627	0,8044	15,040	15,863	15,5	0,581	3,75
902762	5	45	12	80	0,8541	0,8567	16,843	16,894	16,9	0,036	0,21
902763	5	47	12	80	0,8789	0,8930	17,332	17,610	17,5	0,197	1,12
902800	5	43	15	50	0,8935	0,8939	17,620	17,628	17,6	0,006	0,03
902801	5	45	15	50	0,9139	0,8960	18,022	17,669	17,8	0,250	1,40
902802	5	47	15	50	0,9021	0,9289	17,789	18,318	18,1	0,374	2,06
902917	5	43	15	80	0,7714	0,7529	15,212	14,847	15,0	0,258	1,72
902918	5	45	15	80	0,7870	0,7572	15,520	14,932	15,2	0,416	2,73
902919	5	47	15	80	0,7730	0,7883	15,244	15,545	15,4	0,213	1,39
902966	5	43	18	50	0,8760	0,8668	17,275	17,093	17,2	0,128	0,75
902967	5	45	18	50	1,0283	1,0819	20,278	21,335	20,8	0,747	3,59
902968	5	47	18	50	0,9839	0,9610	19,403	18,951	19,2	0,319	1,66
903017	5	43	18	80	0,9308	0,9218	18,355	18,178	18,3	0,125	0,69
903018	5	45	18	80	0,9052	0,9477	17,851	18,689	18,3	0,593	3,24
903019	5	47	18	80	0,9848	1,0039	19,420	19,797	19,6	0,266	1,36
902739	6	43	12	50	0,9012	0,9831	17,771	19,380	18,7	1,142	6,87
902740	6	45	12	50	0,9476	0,9244	18,687	18,229	18,5	0,324	1,75
902741	6	47	12	50	0,8743	0,9171	17,241	18,085	17,7	0,597	3,37
902758	6	43	12	80	0,8610	0,8597	16,979	16,953	17,0	0,018	0,11
902759	6	45	12	80	0,8711	0,8399	17,178	16,563	16,9	0,435	2,57
902760	6	47	12	80	0,8376	0,8501	16,517	16,764	16,6	0,174	1,05
902797	6	43	15	50	0,8668	0,9054	17,093	17,854	17,5	0,538	3,08
902798	6	45	15	50	0,9292	0,8942	18,324	17,634	18,0	0,488	2,71
902799	6	47	15	50	0,9241	0,9127	18,223	17,998	18,1	0,159	0,88
902914	6	43	15	80	0,8623	0,8471	17,005	16,705	16,9	0,212	1,25
902915	6	45	15	80	0,7672	0,8165	15,129	16,101	15,6	0,687	4,41
902916	6	47	15	80	0,7963	0,7924	15,703	15,626	15,7	0,054	0,35
902963	6	43	18	50	0,9431	0,9152	18,598	18,048	18,3	0,389	2,13
902964	6	45	18	50	0,9145	0,9183	18,034	18,109	18,1	0,053	0,29
902965	6	47	18	50	0,7435	0,7449	14,662	14,689	14,7	0,020	0,13
903014	6	43	18	80	0,9361	0,9525	18,460	18,783	18,6	0,229	1,23
903015	6	45	18	80	0,9445	0,9916	18,626	19,554	19,1	0,657	3,44
903016	6	47	18	80	0,9438	0,9512	18,612	18,758	18,7	0,103	0,55
902736	7	43	12	50	0,956	0,9207	18,868	18,156	18,5	0,503	2,72
902737	7	45	12	50	0,9766	0,9456	19,259	18,647	19,0	0,432	2,28

902738	7	47	12	50	0,9854	1,0336	19,432	20,383	19,9	0,672	3,38
902755	7	43	12	80	0,9955	0,9480	19,631	18,695	19,2	0,662	3,45
902756	7	45	12	80	0,8869	0,9433	17,490	18,602	18,0	0,786	4,37
902757	7	47	12	80	0,9557	0,9008	18,846	17,764	18,3	0,766	4,18
902794	7	43	15	50	0,9219	0,8992	18,180	17,732	18,0	0,317	1,76
902795	7	45	15	50	0,9289	0,9480	18,318	18,695	18,5	0,266	1,44
902796	7	47	15	50	0,9852	0,9416	19,428	18,568	19,0	0,608	3,20
902911	7	43	15	80	0,8747	0,8866	17,249	17,484	17,4	0,166	0,95
902912	7	45	15	80	0,9388	0,9551	18,513	18,835	18,7	0,227	1,22
902913	7	47	15	80	0,9602	1,1029	19,704	20,960	20,3	0,888	4,38
902960	7	43	18	50	0,9675	0,9570	19,079	18,872	19,0	0,146	0,77
902961	7	45	18	50	0,9453	0,9588	18,641	18,908	18,8	0,188	1,00
902962	7	47	18	50	1,0986	0,9826	21,663	19,378	20,5	1,616	7,88
903011	7	43	18	80	1,0520	0,9749	20,745	19,224	20,0	0,936	5,38
903012	7	45	18	80	0,9573	0,9452	18,878	18,639	18,8	0,169	0,90
903013	7	47	18	80	0,9721	0,9616	19,170	18,963	19,1	0,146	0,77
902733	8	43	12	50	0,9074	0,9751	17,893	19,229	18,6	0,944	5,01
902734	8	45	12	50	1,0374	0,9980	20,458	19,681	20,1	0,549	2,73
902735	8	47	12	50	0,8716	0,9359	17,198	18,456	17,8	0,896	5,03
902752	8	43	12	80	0,9893	1,0005	19,509	19,730	19,6	0,156	0,80
902753	8	45	12	80	0,9745	0,9373	19,217	18,484	18,9	0,519	2,74
902754	8	47	12	80	0,8304	0,8412	16,375	16,588	16,5	0,151	0,91
902791	8	43	15	50	0,9020	1,0033	17,787	19,786	18,8	1,431	7,52
902792	8	45	15	50	1,0050	0,9628	19,819	18,986	19,4	0,588	3,03
902793	8	47	15	50	0,9312	0,9205	18,363	18,152	18,3	0,149	0,82
902908	8	43	15	80	0,9282	0,9464	18,304	18,663	18,5	0,254	1,37
902909	8	45	15	80	0,8279	0,8110	16,326	15,993	16,2	0,236	1,45
902910	8	47	15	80	0,8397	0,8850	16,559	17,452	17,0	0,632	3,72
902957	8	43	18	50	0,8377	0,8666	16,519	17,089	16,8	0,403	2,40
902958	8	45	18	50	0,8614	0,9186	16,987	18,115	17,6	0,798	4,53
902959	8	47	18	50	0,9042	0,9637	17,831	19,004	18,4	0,830	4,51
903008	8	43	18	80	0,8970	0,9099	17,689	17,943	17,8	0,180	1,01
903009	8	45	18	80	1,0975	0,9685	21,642	19,099	20,4	1,789	8,28
903010	8	47	18	80	0,9488	1,0037	18,710	19,793	19,3	0,766	3,97

Příloha 3 Stanovení α -amylasy 2. části - odrůdy v roce 2016, kde ČV - číslo vzorku; L - lokalita (JnR - Jaroměřice nad Rokytinou; V - Věrovany a Ch - Chrlice); F- forma(o je ozim a j je jarní); A₁ - absorbance 1 vzorku; A₂ - absorbance 2. vzorku; α_1 - hodnota α -amylasy prvního vzorku; α_2 - hodnota α -amylasy druhého vzorku; α_p - hodnota α -amylasy průměrného vzorku; SO - směrodatná odchylka; v - variační koeficient a R - rozptyl

L	O	F	A ₁	A ₂	α_1 [U.g ⁻¹]	α_2 [U.g ⁻¹]	α_p [U.g ⁻¹]	SO	v [%]	R
JnR	Elan	o	0,4858	0,4736	182,661	178,074	180	3,24	1,80	10,52
JnR	Sailor	o	0,5977	0,6799	224,735	255,642	236	21,85	9,26	477,63
JnR	KWS Ozon	o	0,4509	0,4645	169,538	174,652	172	3,62	2,10	13,07
JnR	Vanessa	o	0,5242	0,5164	197,099	194,166	195	2,07	1,06	4,30
JnR	Turandot	o	0,4561	0,4615	171,494	173,524	172	1,44	0,83	2,06
JnR	Matchball	o	0,4356	0,4358	163,786	163,861	163	0,05	0,03	0,00
JnR	Fakir	o	0,4531	0,4369	170,366	164,274	167	4,31	2,58	18,55
JnR	Fabius	o	0,2997	0,2957	112,687	111,183	111	1,06	0,96	1,13
JnR	Patras	o	0,4887	0,5346	183,751	201,010	192	12,20	6,36	148,93
JnR	Tobak	o	0,6778	0,6894	254,853	259,214	257	3,08	1,20	9,51
JnR	Zeppelin	o	0,4629	0,4400	174,050	165,440	169	6,09	3,60	37,07
JnR	Etana	o	0,4704	0,4896	176,870	184,090	180	5,10	2,84	26,06
JnR	Annie	o	0,5522	0,5797	207,627	217,967	212	7,31	3,45	53,46
JnR	Artist	o	0,4095	0,4128	153,972	155,213	154	0,88	0,57	0,77
JnR	Genius	o	0,4625	0,4777	173,900	179,615	176	4,04	2,30	16,33
JnR	Rumor	o	0,6405	0,6587	240,828	247,671	244	4,84	1,98	23,41
JnR	Gordian	o	0,5099	0,4881	191,722	183,526	187	5,80	3,10	33,59
JnR	Frisky	o	0,4765	0,4899	179,164	184,202	181	3,56	1,97	12,69
JnR	Bernstein	o	0,6313	0,6405	237,369	240,828	239	2,45	1,02	5,98
JnR	Pankratz	o	0,6755	0,6476	253,988	243,498	248	7,42	2,99	55,02
JnR	Bonanza	o	0,7515	0,7382	282,564	277,563	280	3,54	1,26	12,50
JnR	Futurum	o	0,6637	0,6295	249,551	236,692	243	9,09	3,74	82,68
JnR	Partner	o	0,6591	0,6626	247,822	249,138	248	0,93	0,38	0,87
JnR	Rivero	o	0,5207	0,5023	195,783	188,865	192	4,89	2,55	23,93
JnR	Hyfi	o	0,4483	0,4463	168,561	167,809	168	0,53	0,32	0,28
JnR	Faunus	o	0,4579	0,4422	172,170	166,267	169	4,17	2,47	17,42
JnR	Bohemia	o	0,4706	0,4801	176,946	180,518	178	2,53	1,42	6,38
JnR	Julie	o	0,3613	0,3311	135,849	124,494	130	8,03	6,18	64,47
JnR	Elly	o	0,5698	0,5763	214,245	216,689	215	1,73	0,80	2,99
JnR	Matylda	o	0,4638	0,4753	174,389	178,713	176	3,06	1,74	9,35
JnR	Cimrmanova raná	o	0,4302	0,4317	161,755	162,319	162	0,40	0,25	0,16
JnR	Dagmar	o	0,4671	0,4795	175,630	180,292	177	3,30	1,86	10,87
JnR	Balitus	o	0,2993	0,3165	112,537	119,004	115	4,57	3,98	20,91
JnR	Seance	j	0,4233	0,4666	159,161	175,442	167	11,51	6,89	132,53
JnR	Tercie	j	0,4661	0,4571	175,254	171,870	173	2,39	1,38	5,73
JnR	Astrid	j	0,6325	0,6181	237,820	232,406	235	3,83	1,63	14,66
JnR	Izzy	j	0,6352	0,6096	238,835	229,210	234	6,81	2,91	46,33
JnR	Dafne	j	0,4630	0,4614	174,088	173,486	173	0,43	0,25	0,18

JnR	KWS Scirocco	j	0,5835	0,5627	219,396	211,575	215	5,53	2,57	30,58
JnR	KWS Chamsin	j	0,4439	0,4292	166,906	161,379	164	3,91	2,38	15,27
JnR	Alondra	j	0,5121	0,5445	192,550	204,732	198	8,61	4,35	74,21
JnR	Anabel	j	0,4835	0,4616	181,796	173,562	177	5,82	3,29	33,90
JnR	Quintus	j	0,6400	0,6449	240,640	242,482	241	1,30	0,54	1,70
JnR	KWS Mairra	j	0,3871	0,3958	145,550	148,821	147	2,31	1,57	5,35
JnR	Lotte	j	0,3037	0,3064	114,191	115,206	114	0,72	0,63	0,52
JnR	Registana	j	0,4972	0,5202	186,947	195,595	191	6,12	3,20	37,39
JnR	Alicia	j	0,4565	0,4531	171,644	170,366	171	0,90	0,53	0,82
JnR	Cornetto	j	0,5029	0,4767	189,090	179,239	184	6,97	3,79	48,52
V	Elan	o	0,4598	0,4601	172,885	172,998	172	0,08	0,05	0,01
V	Sailor	o	0,5915	0,5917	222,404	222,479	222	0,05	0,02	0,00
V	KWS Ozon	o	0,3976	0,3978	149,498	149,573	149	0,05	0,04	0,00
V	Vanessa	o	0,5032	0,5029	189,203	189,090	189	0,08	0,04	0,01
V	Turandot	o	0,4376	0,4371	164,538	164,350	164	0,13	0,08	0,02
V	Matchball	o	0,3770	0,3770	141,752	141,752	141	0,00	0,00	0,00
V	Fakir	o	0,4576	0,4575	172,058	172,020	172	0,03	0,02	0,00
V	Fabius	o	0,4714	0,4714	177,246	177,246	177	0,00	0,00	0,00
V	Patras	o	0,4266	0,4265	160,402	160,364	160	0,03	0,02	0,00
V	Tobak	o	0,6851	0,6850	257,598	257,560	257	0,03	0,01	0,00
V	Zeppelin	o	0,4645	0,4643	174,652	174,577	174	0,05	0,03	0,00
V	Etana	o	0,5138	0,5142	193,189	193,339	193	0,11	0,06	0,01
V	Annie	o	0,5438	0,5436	204,469	204,394	204	0,05	0,03	0,00
V	Artist	o	0,4025	0,4019	151,340	151,114	151	0,16	0,11	0,03
V	Genius	o	0,4890	0,4873	183,864	183,225	183	0,45	0,25	0,20
V	Rumor	o	0,7694	0,7694	289,294	289,294	289	0,00	0,00	0,00
V	Gordian	o	0,4389	0,4579	165,026	172,170	168	5,05	3,01	25,52
V	Frisky	o	0,4687	0,4696	176,231	176,570	176	0,24	0,14	0,06
V	Bernstein	o	0,5622	0,5892	211,387	221,539	216	7,18	3,32	51,53
V	Pankratz	o	0,5035	0,5169	189,316	194,354	191	3,56	1,87	12,69
V	Bonanza	o	0,6869	0,7069	258,274	265,794	262	5,32	2,03	28,28
V	Futurum	o	0,5954	0,5814	223,870	218,606	221	3,72	1,68	13,85
V	Partner	o	0,6368	0,6475	239,437	243,460	241	2,84	1,18	8,09
V	Rivero	o	0,5908	0,5846	222,141	219,810	220	1,65	0,75	2,72
V	Hyfi	o	0,4460	0,4359	167,696	163,898	165	2,69	1,63	7,21
V	Faunus	o	0,4775	0,4783	179,540	179,841	179	0,21	0,12	0,05
V	Bohemia	o	0,4707	0,4807	176,983	180,743	180	2,66	1,48	7,07
V	Julie	o	0,4668	0,4811	175,517	180,894	178	3,80	2,14	14,45
V	Elly	o	0,6540	0,6716	245,904	252,522	249	4,68	1,88	21,90
V	Matylda	o	0,6527	0,6704	245,415	252,070	248	4,71	1,90	22,15
V	Cimrmanova raná	o	0,6024	0,6156	226,502	231,466	228	3,51	1,54	12,32
V	Dagmar	o	0,6423	0,6674	241,505	250,942	246	6,67	2,71	44,53
V	Balitus	o	0,4120	0,4117	154,912	154,799	154	0,08	0,05	0,01
V	Seance	j	0,5671	0,5673	213,230	213,305	213	0,05	0,02	0,00

V	Tercie	j	0,5093	0,5097	191,497	191,647	191	0,11	0,06	0,01
V	Astrid	j	0,6197	0,6158	233,007	231,541	232	1,04	0,45	1,08
V	Izzy	j	0,7643	0,7582	287,377	285,083	286	1,62	0,57	2,63
V	Dafne	j	0,5763	0,5759	216,689	216,538	216	0,11	0,05	0,01
V	KWS Scirocco	j	0,5338	0,5328	200,709	200,333	200	0,27	0,13	0,07
V	KWS Chamsin	j	0,4782	0,4765	179,803	179,164	179	0,45	0,25	0,20
V	Alondra	j	0,5864	0,5821	220,486	218,870	219	1,14	0,52	1,31
V	Anabel	j	0,6130	0,6132	230,488	230,563	230	0,05	0,02	0,00
V	Quintus	j	0,5462	0,5493	205,371	206,537	205	0,82	0,40	0,68
V	KWS Mairra	j	0,4796	0,4763	180,330	179,089	180	0,88	0,49	0,77
V	Lotte	j	0,4242	0,4266	159,499	160,402	159	0,64	0,40	0,41
V	Registana	j	0,5676	0,5667	213,418	213,079	213	0,24	0,11	0,06
V	Alicia	j	0,6237	0,6181	234,511	232,406	233	1,49	0,64	2,22
V	Cornetto	j	0,5695	0,5695	214,132	214,132	214	0,00	0,00	0,00
Ch	Elan	o	0,5028	0,5070	189,053	190,632	189	1,12	0,59	1,25
Ch	Sailor	o	0,6499	0,6605	244,362	248,348	245	2,82	1,15	7,94
Ch	KWS Ozon	o	0,4744	0,4746	178,374	178,450	178	0,05	0,03	0,00
Ch	Vanessa	o	0,6180	0,6159	232,368	231,578	231	0,56	0,24	0,31
Ch	Turandot	o	0,5394	0,5394	202,814	202,814	202	0,00	0,00	0,00
Ch	Matchball	o	0,4429	0,4433	166,530	166,681	166	0,11	0,06	0,01
Ch	Fakir	o	0,4815	0,4774	181,044	179,502	180	1,09	0,61	1,19
Ch	Fabius	o	0,4926	0,4873	185,218	183,225	184	1,41	0,77	1,99
Ch	Patras	o	0,5682	0,5684	213,643	213,718	213	0,05	0,02	0,00
Ch	Tobak	o	0,4982	0,4929	187,323	185,330	185	1,41	0,76	1,99
Ch	Zeppelin	o	0,4531	0,4471	170,366	168,110	169	1,60	0,94	2,54
Ch	Etana	o	0,4756	0,4759	178,826	178,938	178	0,08	0,04	0,01
Ch	Annie	o	0,7011	0,7010	263,614	263,576	263	0,03	0,01	0,00
Ch	Artist	o	0,4491	0,4487	168,862	168,711	168	0,11	0,06	0,01
Ch	Genius	o	0,5620	0,5626	211,312	211,538	211	0,16	0,08	0,03
Ch	Rumor	o	0,7927	0,7928	298,055	298,093	298	0,03	0,01	0,00
Ch	Gordian	o	0,4544	0,4094	170,854	153,934	162	11,96	7,39	143,14
Ch	Frisky	o	0,4191	0,4160	157,582	156,416	156	0,82	0,53	0,68
Ch	Bernstein	o	0,5370	0,5333	201,912	200,521	201	0,98	0,49	0,97
Ch	Pankratz	o	0,5302	0,5345	199,355	200,972	200	1,14	0,57	1,31
Ch	Bonanza	o	0,6046	0,5856	227,330	220,186	223	5,05	2,27	25,52
Ch	Futurum	o	0,4727	0,4905	177,735	184,428	181	4,73	2,61	22,40
Ch	Partner	o	0,5598	0,5316	210,485	199,882	205	7,50	3,66	56,21
Ch	Rivero	o	0,4960	0,4991	186,496	187,662	187	0,82	0,44	0,68
Ch	Hyfi	o	0,6777	0,6795	254,815	255,492	255	0,48	0,19	0,23
Ch	Faunus	o	0,4497	0,4516	169,087	169,802	169	0,51	0,30	0,26
Ch	Bohemia	o	0,5213	0,5199	196,009	195,482	195	0,37	0,19	0,14
Ch	Julie	o	0,4094	0,4082	153,934	153,483	153	0,32	0,21	0,10
Ch	Elly	o	0,5003	0,4978	188,113	187,173	187	0,66	0,36	0,44
Ch	Matylda	o	0,6640	0,6331	249,664	238,046	243	8,22	3,38	67,49

Ch	Cimrmanova raná	o	0,4570	0,4598	171,832	172,885	172	0,74	0,43	0,55
Ch	Dagmar	o	0,5893	0,6041	221,577	227,142	224	3,93	1,76	15,48
Ch	Balitus	o	0,3283	0,3289	123,441	123,666	123	0,16	0,13	0,03
Ch	Seance	j	0,5075	0,5098	190,820	191,685	191	0,61	0,32	0,37
Ch	Tercie	j	0,4336	0,4361	163,034	163,974	163	0,66	0,41	0,44
Ch	Astrid	j	0,6409	0,6408	240,978	240,941	240	0,03	0,01	0,00
Ch	Izzy	j	0,6456	0,6546	242,746	246,130	242	2,39	0,99	5,73
Ch	Dafne	j	0,4563	0,4567	171,569	171,719	171	0,11	0,06	0,01
Ch	KWS Scirocco	j	0,5279	0,5280	198,490	198,528	198	0,03	0,01	0,00
Ch	KWS Chamsin	j	0,4777	0,4789	179,615	180,066	179	0,32	0,18	0,10
Ch	Alondra	j	0,5220	0,5225	196,272	196,460	196	0,13	0,07	0,02
Ch	Anabel	j	0,5315	0,5298	199,844	199,205	199	0,45	0,23	0,20
Ch	Quintus	j	0,4884	0,4885	183,638	183,676	183	0,03	0,01	0,00
Ch	KWS Mairra	j	0,4608	0,4503	173,261	169,313	173	2,79	1,61	7,79
Ch	Lotte	j	0,4589	0,4563	172,546	171,569	172	0,69	0,40	0,48
Ch	Registana	j	0,4864	0,4869	182,886	183,074	182	0,13	0,07	0,02
Ch	Alicia	j	0,5293	0,5374	199,017	202,062	200	2,15	1,08	4,64
Ch	Cornetto	j	0,5023	0,5024	188,865	188,902	188	0,03	0,01	0,00

Príloha 4 Stanovení β -amylasy 2 části - odrůdy v roce 2016, kde ČV - číslo vzorku; l - lokalita (JnR - Jaroměřice nad Rokytnou; V - Věrovany a Ch - Chrlice); Fje forma, (o - ozim a j - jarní); A_1 - absorbance 1 vzorku; A_2 - absorbance 2. vzorku; β_1 - hodnota β -amylasy prvního vzorku; β_2 - hodnota α -amylasy druhého vzorku; β_p - hodnota β -amylasy průměrného vzorku; SO - směrodatná odchylka; v - variační koeficient

L	O	F	A_1	A_2	β_1 [U.g ⁻¹]	β_2 [U.g ⁻¹]	β_p [U.g ⁻¹]	SO	v [%]	R
JnR	Elan	o	1,6327	1,7214	32,1968	33,9460	33,1	1,24	3,74	1,53
JnR	Sailor	o	1,1797	1,1451	23,2637	22,5814	22,9	0,48	2,10	0,23
JnR	KWS Ozon	o	1,4593	1,4521	28,7774	28,6354	28,7	0,10	0,35	0,01
JnR	Vanessa	o	1,7756	1,6977	35,0148	33,4786	34,2	1,09	3,17	1,18
JnR	Turandot	o	1,4835	1,4426	29,2546	28,4481	28,9	0,57	1,98	0,33
JnR	Matchball	o	1,7246	1,6959	34,0091	33,4431	33,7	0,40	1,19	0,16
JnR	Fakir	o	1,5746	1,5271	31,0511	30,1144	30,6	0,66	2,17	0,44
JnR	Fabius	o	1,4541	1,5176	28,6749	29,9271	29,3	0,89	3,02	0,78
JnR	Patras	o	1,3135	1,3868	25,9022	27,3477	26,6	1,02	3,84	1,04
JnR	Tobak	o	0,9727	0,9938	19,1816	19,5977	19,4	0,29	1,52	0,09
JnR	Zeppelin	o	1,4232	1,3513	28,0655	26,6476	27,4	1,00	3,66	1,01
JnR	Etana	o	1,1654	1,1690	22,9817	23,0527	23,0	0,05	0,22	0,00
JnR	Annie	o	1,6250	1,6373	32,0450	32,2876	32,2	0,17	0,53	0,03
JnR	Artist	o	1,5688	1,5457	30,9367	30,4812	30,7	0,32	1,05	0,10
JnR	Genius	o	1,4100	1,3738	27,8052	27,0913	27,4	0,50	1,84	0,25
JnR	Rumor	o	1,1620	1,1096	22,9146	21,8813	22,4	0,73	3,26	0,53
JnR	Gordian	o	1,1353	1,1642	22,3881	22,9580	22,7	0,40	1,78	0,16
JnR	Frisky	o	1,0681	1,0562	21,0629	20,8283	20,9	0,17	0,79	0,03
JnR	Bernstein	o	1,8175	1,8855	35,8411	37,1821	36,5	0,95	2,60	0,90
JnR	Pankratz	o	1,5728	1,5572	31,0156	30,7080	30,9	0,22	0,70	0,05
JnR	Bonanza	o	1,7166	1,8313	33,8514	36,1132	35,0	1,60	4,57	2,56
JnR	Futurum	o	1,9097	1,9278	37,6593	38,0162	37,8	0,25	0,67	0,06
JnR	Partner	o	1,1614	1,1784	22,9028	23,2380	23,1	0,24	1,03	0,06
JnR	Rivero	o	1,0731	1,1439	21,1615	22,5577	21,9	0,99	4,52	0,97
JnR	Hyfi	o	1,1851	1,2614	23,3702	24,8748	24,1	1,06	4,41	1,13
JnR	Faunus	o	1,4923	1,4693	29,4282	28,9746	29,2	0,32	1,10	0,10
JnR	Bohemia	o	1,7055	1,6216	33,6325	31,9780	32,8	1,17	3,57	1,37
JnR	Julie	o	1,6618	1,5905	32,7707	31,3647	32,1	0,99	3,10	0,99
JnR	Elly	o	1,6979	1,7476	33,4826	34,4627	34,0	0,69	2,04	0,48
JnR	Matylda	o	1,6726	1,6885	32,9837	33,2972	33,1	0,22	0,67	0,05
JnR	Cimrmanova raná	o	1,1669	1,2024	23,0113	23,7113	23,4	0,50	2,12	0,25
JnR	Dagmar	o	1,1299	0,9721	22,2816	19,1698	20,7	2,20	10,62	4,84
JnR	Balitus	o	1,0920	1,0410	21,5342	20,5285	21,0	0,71	3,38	0,51
JnR	Seance	j	1,5300	1,5301	30,1716	30,1736	30,2	0,00	0,00	0,00
JnR	Tercie	j	1,5044	1,5050	29,6668	29,6786	29,7	0,01	0,03	0,00
JnR	Astrid	j	1,6297	1,6492	32,1377	32,5222	32,3	0,27	0,84	0,07
JnR	Izzy	j	1,6855	1,6865	33,2381	33,2578	33,2	0,01	0,04	0,00
JnR	Dafne	j	1,6161	1,6162	31,8695	31,8715	31,9	0,00	0,00	0,00
JnR	KWS Scirocco	j	1,7449	1,7648	34,4094	34,8019	34,6	0,28	0,80	0,08

JnR	KWS Chamsin	j	1,2852	1,2851	25,3441	25,3422	25,3	0,00	0,01	0,00
JnR	Alondra	j	1,4677	1,4675	28,9430	28,9391	28,9	0,00	0,01	0,00
JnR	Anabel	j	1,5166	1,5156	29,9074	29,8876	29,9	0,01	0,05	0,00
JnR	Quintus	j	1,1245	1,1243	22,1751	22,1712	22,2	0,00	0,01	0,00
JnR	KWS Mairra	j	1,6221	1,6230	31,9878	32,0056	32,0	0,01	0,04	0,00
JnR	Lotte	j	1,6884	1,6847	33,2952	33,2223	33,3	0,05	0,16	0,00
JnR	Registana	j	1,4311	1,4121	28,2213	27,8466	28,0	0,26	0,95	0,07
JnR	Alicia	j	1,5560	1,5559	30,6843	30,6823	30,7	0,00	0,00	0,00
JnR	Cornetto	j	1,6357	1,6537	32,2560	32,6110	32,4	0,25	0,77	0,06
V	Elan	o	1,5739	1,5712	31,0373	30,9841	31,0	0,04	0,12	0,00
V	Sailor	o	1,1155	1,1039	21,9977	21,7689	21,9	0,16	0,74	0,03
V	KWS Ozon	o	1,5518	1,5497	30,6015	30,5601	30,6	0,03	0,10	0,00
V	Vanessa	o	1,6862	1,6861	33,2519	33,2499	33,3	0,00	0,00	0,00
V	Turandot	o	1,5248	1,5233	30,0691	30,0395	30,1	0,02	0,07	0,00
V	Matchball	o	1,8665	1,8562	36,8074	36,6043	36,7	0,14	0,39	0,02
V	Fakir	o	1,7276	1,7439	34,0683	34,3897	34,2	0,23	0,66	0,05
V	Fabius	o	1,6652	1,6563	32,8377	32,6622	32,7	0,12	0,38	0,02
V	Patras	o	1,6291	1,6293	32,1259	32,1298	32,1	0,00	0,01	0,00
V	Tobak	o	1,2169	1,2070	23,9973	23,8020	23,9	0,14	0,58	0,02
V	Zeppelin	o	1,6155	1,6063	31,8577	31,6762	31,8	0,13	0,40	0,02
V	Etana	o	1,3052	1,3053	25,7385	25,7405	25,7	0,00	0,01	0,00
V	Annie	o	1,7810	1,7615	35,1213	34,7368	34,9	0,27	0,78	0,07
V	Artist	o	1,5978	1,6003	31,5086	31,5579	31,5	0,03	0,11	0,00
V	Genius	o	1,5873	1,5699	31,3016	30,9584	31,1	0,24	0,78	0,06
V	Rumor	o	1,4391	1,4589	28,3791	28,7695	28,6	0,28	0,97	0,08
V	Gordian	o	1,0510	1,0806	20,7257	21,3094	21,0	0,41	1,96	0,17
V	Frisky	o	0,9208	0,8918	18,1582	17,5863	17,9	0,40	2,26	0,16
V	Bernstein	o	1,6068	1,6155	31,6861	31,8577	31,8	0,12	0,38	0,01
V	Pankratz	o	1,5412	1,5142	30,3925	29,8600	30,1	0,38	1,25	0,14
V	Bonanza	o	1,5608	1,5368	30,7790	30,3057	30,5	0,33	1,10	0,11
V	Futurum	o	1,6616	1,5688	32,7668	30,9367	31,9	1,29	4,06	1,67
V	Partner	o	1,1633	1,1876	22,9403	23,4195	23,2	0,34	1,46	0,11
V	Rivero	o	1,2198	1,0973	24,0545	21,6388	22,8	1,71	7,48	2,92
V	Hyfi	o	0,9153	0,8509	18,0497	16,7797	17,4	0,90	5,16	0,81
V	Faunus	o	1,2841	1,3760	25,3225	27,1347	26,2	1,28	4,89	1,64
V	Bohemia	o	1,4208	1,3568	28,0182	26,7561	27,4	0,89	3,26	0,80
V	Julie	o	1,5487	1,5945	30,5404	31,4435	31,0	0,64	2,06	0,41
V	Elly	o	1,5340	1,5617	30,2505	30,7967	30,5	0,39	1,27	0,15
V	Matylda	o	1,5670	1,5796	30,9012	31,1497	31,0	0,18	0,57	0,03
V	Cimrmanova raná	o	1,1009	1,0863	21,7097	21,4218	21,6	0,20	0,94	0,04
V	Dagmar	o	0,9250	0,9286	18,2410	18,3120	18,3	0,05	0,27	0,00
V	Balitus	o	1,0319	1,0942	20,3491	21,5776	21,0	0,87	4,14	0,75
V	Seance	j	1,5021	1,4652	29,6214	28,8937	29,3	0,51	1,76	0,26
V	Tercie	j	1,3902	1,3935	27,4147	27,4798	27,4	0,05	0,17	0,00

V	Astrid	j	1,5526	1,5096	30,6173	29,7693	30,2	0,60	1,99	0,36
V	Izzy	j	1,7435	1,7224	34,3818	33,9657	34,2	0,29	0,86	0,09
V	Dafne	j	1,6516	1,6303	32,5696	32,1495	32,4	0,30	0,92	0,09
V	KWS Scirocco	j	1,6935	1,7620	33,3958	34,7466	34,1	0,96	2,80	0,91
V	KWS Chamsin	j	1,1885	1,2421	23,4372	24,4942	24,0	0,75	3,12	0,56
V	Alondra	j	1,3382	1,4751	26,3893	29,0890	27,7	1,91	6,88	3,64
V	Anabel	j	0,8802	0,9039	17,3575	17,8249	17,6	0,33	1,88	0,11
V	Quintus	j	1,5924	1,5900	31,4021	31,3548	31,4	0,03	0,11	0,00
V	KWS Mairra	j	1,4910	1,5458	29,4025	30,4832	29,9	0,76	2,55	0,58
V	Lotte	j	1,6681	1,7476	32,8949	34,4627	33,7	1,11	3,29	1,23
V	Registana	j	1,3960	1,4104	27,5291	27,8131	27,7	0,20	0,73	0,04
V	Alicia	j	1,4942	1,3923	29,4656	27,4562	28,5	1,42	4,99	2,02
V	Cornetto	j	1,6984	1,6976	33,4924	33,4767	33,5	0,01	0,03	0,00
Ch	Elan	o	1,7292	1,7391	34,0998	34,2951	34,2	0,14	0,40	0,02
Ch	Sailor	o	1,2050	1,1942	23,7626	23,5496	23,7	0,15	0,64	0,02
Ch	KWS Ozon	o	1,6033	1,6903	31,6171	33,3327	32,5	1,21	3,74	1,47
Ch	Vanessa	o	1,9092	1,9675	37,6494	38,7991	38,2	0,81	2,13	0,66
Ch	Turandot	o	1,5404	1,4628	30,3767	28,8464	29,6	1,08	3,65	1,17
Ch	Matchball	o	2,1922	2,2122	43,2302	43,6246	43,4	0,28	0,64	0,08
Ch	Fakir	o	2,1115	2,1341	41,6388	42,0845	41,9	0,32	0,75	0,10
Ch	Fabius	o	1,6641	1,7149	32,8161	33,8178	33,3	0,71	2,13	0,50
Ch	Patras	o	1,7972	1,8191	35,4408	35,8727	35,7	0,31	0,86	0,09
Ch	Tobak	o	1,1641	1,1712	22,9561	23,0961	23,0	0,10	0,43	0,01
Ch	Zeppelin	o	1,7578	1,6855	34,6638	33,2381	34,0	1,01	2,97	1,02
Ch	Etana	o	1,3793	1,3503	27,1998	26,6279	26,9	0,40	1,50	0,16
Ch	Annie	o	1,7283	1,7715	34,0821	34,9340	34,5	0,60	1,75	0,36
Ch	Artist	o	1,8970	1,8918	37,4088	37,3063	37,4	0,07	0,19	0,01
Ch	Genius	o	1,7182	1,6993	33,8829	33,5102	33,7	0,26	0,78	0,07
Ch	Rumor	o	1,6892	1,6748	33,3110	33,0271	33,2	0,20	0,61	0,04
Ch	Gordian	o	1,2300	1,2294	24,2556	24,2438	24,2	0,01	0,03	0,00
Ch	Frisky	o	1,1927	1,1927	23,5200	23,5200	23,5	0,00	0,00	0,00
Ch	Bernstein	o	1,9140	1,9138	37,7441	37,7401	37,7	0,00	0,01	0,00
Ch	Pankratz	o	1,9539	1,9582	38,5309	38,6157	38,6	0,06	0,16	0,00
Ch	Bonanza	o	1,7627	1,7630	34,7604	34,7664	34,8	0,00	0,01	0,00
Ch	Futurum	o	1,8333	1,8230	36,1527	35,9496	36,1	0,14	0,40	0,02
Ch	Partner	o	1,2888	1,2988	25,4151	25,6123	25,5	0,14	0,55	0,02
Ch	Rivero	o	1,2706	1,2770	25,0562	25,1824	25,1	0,09	0,36	0,01
Ch	Hyfi	o	1,4035	1,4036	27,6770	27,6790	27,7	0,00	0,01	0,00
Ch	Faunus	o	1,6963	1,6928	33,4510	33,3820	33,4	0,05	0,15	0,00
Ch	Bohemia	o	1,6627	1,6557	32,7884	32,6504	32,7	0,10	0,30	0,01
Ch	Julie	o	1,8514	1,8512	36,5096	36,5057	36,5	0,00	0,01	0,00
Ch	Elly	o	1,7850	1,7850	35,2002	35,2002	35,2	0,00	0,00	0,00
Ch	Matylda	o	1,8594	1,8741	36,6674	36,9573	36,8	0,20	0,56	0,04
Ch	Cimmanova raná	o	1,3194	1,3196	26,0186	26,0225	26,0	0,00	0,01	0,00

Ch	Dagmar	o	1,0934	1,0857	21,5618	21,4100	21,5	0,11	0,50	0,01
Ch	Balitus	o	1,0501	1,0720	20,7080	21,1398	20,9	0,31	1,46	0,09
Ch	Seance	j	1,2941	1,3170	25,5197	25,9712	25,7	0,32	1,24	0,10
Ch	Tercie	j	1,3748	1,3788	27,1111	27,1899	27,2	0,06	0,21	0,00
Ch	Astrid	j	1,1942	1,3170	23,5496	25,9712	24,8	1,71	6,92	2,93
Ch	Izzy	j	1,6943	1,7287	33,4116	34,0900	33,8	0,48	1,42	0,23
Ch	Dafne	j	1,6295	1,6636	32,1337	32,8062	32,5	0,48	1,46	0,23
Ch	KWS Scirocco	j	1,6116	1,5909	31,7808	31,3725	31,6	0,29	0,91	0,08
Ch	KWS Chamsin	j	1,1228	1,1424	22,1416	22,5281	22,3	0,27	1,22	0,07
Ch	Alondra	j	1,4222	1,5206	28,0458	29,9862	29,0	1,37	4,73	1,88
Ch	Anabel	j	1,4936	1,4957	29,4538	29,4952	29,5	0,03	0,10	0,00
Ch	Quintus	j	0,9630	0,9044	18,9904	17,8348	18,4	0,82	4,44	0,67
Ch	KWS Mairra	j	1,4556	1,4434	28,7044	28,4638	28,6	0,17	0,60	0,03
Ch	Lotte	j	1,6021	1,6375	31,5934	32,2915	31,9	0,49	1,55	0,24
Ch	Registana	j	1,4759	1,4110	29,1047	27,8249	28,5	0,90	3,18	0,82
Ch	Alicia	j	1,6317	1,5139	32,1771	29,8541	31,0	1,64	5,30	2,70
Ch	Cornetto	j	1,7574	1,6955	34,6559	33,4353	34,0	0,86	2,54	0,75

Příloha 5 Statistické vyhodnocení

Vliv technologie skladování na obsah enzymů v pšeničném sladu

Základní číselné charakteristiky

Variable:	ALFA_AMYL	BETA_AMYL
Sample size	72	72
Average	169.986	17.6111
Variance	872.465	1.93114
Standard deviation	29.5375	1.38966
Standard error	3.48103	0.163772
Coeff. of variation	17.3764	7.89079
Minimum	103	14
Maximum	235	20
Range	132	6
Skewness	-0.185325	-0.463185
Kurtosis	0.088672	-0.186516

Analýza rozptylu

Analysis of Variance for WWSLAD.ALFA_AMYL - alfa-amyláza

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
DELKA	13519.931	3	4506.6435	6.930	0.0004 ***
DOMOCENI	4786.778	2	2393.3889	3.680	0.0308 *
TEPLOTA	2251.861	2	1125.9306	1.731	0.1854 NS
SUSENI	415.681	1	415.6806	0.639	0.4355 NS
RESIDUAL	40970.736	63	650.3291		
TOTAL	61944.986	71			

Multiple range analysis for WWSLAD.ALFA_AMYL by DELKA

Method: 95 Percent Bonferroni

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
5D	18	146.50000	X
6D	18	174.72222	X
7D	18	178.55556	X
8D	18	180.16667	X

MD(0.05) 23.1601

Multiple range analysis for WWSLAD.ALFA_AMYL by DOMOCENI

Method: 95 Percent Bonferroni

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
43ř	24	160.45833	X
45ř	24	169.12500	XX
47ř	24	180.37500	X

MD(0.05) 18.1100

Multiple range analysis for WWSLAD.ALFA_AMYL by TEPLOTA

Method: 95 Percent Bonferroni

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

12řC	24	163.58333	X
15řC	24	169.16667	X
18řC	24	177.20833	X

MD(0.05) 18.1100

Multiple range analysis for WWSLAD.ALFA_AMYL by SUSENI

Method: 95 Percent Bonferroni

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

80řC	36	167.58333	X
50řC	36	172.38889	X

MD(0.05) 12.0143

Analysis of Variance for WWSLAD.BETA_AMYL - beta-amyláza

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
DELKA	20.55556	3	6.8518519	4.583	0.0058 **
DOMOCENI	1.44444	2	0.7222222	0.483	0.6192 NS
TEPLOTA	14.19444	2	7.0972222	4.747	0.0120 *
SUSENI	6.72222	1	6.7222222	4.496	0.0379 *
RESIDUAL	94.19444	63	1.4951499		
TOTAL	137.11111	71			

Multiple range analysis for WWSLAD.BETA_AMYL by DELKA

Method: 95 Percent Bonferroni

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

6D	18	16.888889	X
5D	18	17.388889	XX
8D	18	17.833333	XX
7D	18	18.333333	X

MD(0.05) 1.11050

Multiple range analysis for WWSLAD.BETA_AMYL by DOMOCENI

Method: 95 Percent Bonferroni

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

43ř	24	17.416667	X
47ř	24	17.666667	X
45ř	24	17.750000	X

MD(0.05)		0.86835	
----------	--	---------	--

Multiple range analysis for WWSLAD.BETA_AMYL by TEPLOTA

Method: 95 Percent Bonferroni

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

15řC	24	17.041667	X
12řC	24	17.666667	XX
18řC	24	18.125000	X

MD(0.05)		0.86835	
----------	--	---------	--

Multiple range analysis for WWSLAD.BETA_AMYL by SUSENI

Method: 95 Percent Bonferroni

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

80řC	36	17.305556	X
50řC	36	17.916667	X

MD(0.05)		0.57607	
----------	--	---------	--