

**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 ZMĚN OBSAHU PROTEINŮ LEPKU V  
PRŮBĚHU TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA**

CHANGES OF GLUTEN PROTEINS DURING BEER PROCESSING

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Otília Porubiaková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

**BRNO 2018**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1205/2017  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Otília Porubiaková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Sledování změn obsahu proteinů lepku v průběhu technologie výroby piva

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na původ a obsah lepkových proteinů v pivu a surovinách
- 2) optimalizace metod stanovení lepkových proteinů pomocí elektromigračních a imunochemických metod
- 3) sledování lepkových proteinů ve vybraných fázích procesu výroby piva
- 4) vyhodnocení a diskuse výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 25.5.2018

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

-----  
Bc. Otília Porubiaková  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Cieľom práce bolo sledovanie zmien v obsahu lepkových bielkovín v biotechnologickom procese výroby piva. Analyzované vzorky boli odoberané pri výrobnom procese pšeničného a jačmenného piva pomocou metódy elektroforézy a imunoanalýzy, a výsledky analýz boli porovnávané s komerčnými českými pivami.

Teoretická časť obsahuje popis a zloženie lepkových bielkovín, technológiu výroby sladu a piva a zmeny nastávajúce pri tomto procese, a v neposlednom rade metódy, ktorými je možné lepkové bielkoviny analyzovať.

Experimentálna časť obsahuje postupy pre laboratórnu výrobu jačmenného a pšeničného piva a postupy pre analýzy lepkových bielkovín. K identifikácií jednotlivých frakcií lepkových bielkovín boli použité metódy kyslej a SDS elektroforézy a pre kvantitatívne stanovenie bola použitá enzýmová imunoanalýza, ktorá bola vyhodnotená spektrofotometricky.

Identifikácia frakcií gluténu pomocou elektroforetických metód sa ukázala ako málo špecifická pre vzorky s nižším obsahom lepkových bielkovín a pre vzorky jačmenné. Bol dokázaný pokles koncentrácie gliadínov a glutenínov v procese výroby piva, pričom významná zmena koncentrácie bola zaznamenaná pri vysladzovaní, kedy sa obsah oproti vstupnej surovine znížil o cca 98 %, a pri kvasení, kedy došlo k poklesu koncentrácie pod 10 mg/kg. Táto hodnota je z legislatívy prijateľná pre produkty označené ako „bezlepkové“.

## **Kľúčové slová**

Gliadín, glutenín, pivo, celiakia, ELISA, elektroforéza

## **ABSTRACT**

The aim of thesis was monitoring of changes in the content of gluten proteins in the biotechnological process of beer production. During the production process of wheat and barley beer, the samples were collected and analysed using the electrophoresis and immunoassay method. The results of the analyses were compared with commercial Czech beers.

The theoretical part contains description and composition of gluten proteins, malt and beer technology, the changes that occur in this process, and methods of gluten proteins analysis.

The experimental part contains procedures for laboratory production of barley and wheat beer and analyses of gluten proteins. To identify the individual gluteal protein fraction acid and SDS electrophoresis methods were used. For quantification, enzyme immunoassay was used and evaluated spectrophotometrically.

The identification of the gluten's fractions by electrophoretic methods has been shown to be less specific for samples with lower content of gluten proteins and for barley specimens. A decrease in the concentration of gliadins and glutenins in the beer production process was demonstrated. A significant change was found during wort production with 98% decrease of gluten content compared to the feedstock and during the fermentation, when the gluten concentration dropped below 10 mg/kg. This value is acceptable from the legislation for products labelled „gluten-free“.

### **Key words**

Gliadin, glutenin, beer, celiac disease, ELISA, electrophoresis

PORUBIAKOVÁ, O. *Sledování změn obsahu proteinů lepku v průběhu technologie výroby piva*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 59 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

## **PREHLÁSENIE**

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

.....  
podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

Rada by som poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc., PhDr. Miroslavovi Hrstkovi, Ph.D. a Ing. Jaromírovi Pořízkovi, Ph.D. za odborné vedenie, ochotu, cenné rady a čas, ktorý mi venovali pri vypracovaní tejto práce.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická časť</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Lepkové bielkoviny</b>	<b>10</b>
2.1.1	Glutén	10
2.1.1.1	Gliadíny	10
2.1.1.2	Gluteníny	11
2.1.2	Disulfidické väzby	12
<b>2.2</b>	<b>Charakteristika piva</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Základné suroviny pre výrobu piva</b>	<b>13</b>
2.3.1	Obilniny	13
2.3.1.1	Morfologická charakteristika zrna	13
2.3.1.2	Obsah živín v zrne obilnín	14
2.3.1.3	Požiadavky na obilniny pre výrobu sladú a piva	15
2.3.2	Voda	15
2.3.3	Chmeľ	16
2.3.4	Pivovarské kvasinky	16
2.3.5	Pomocné suroviny	16
<b>2.4</b>	<b>Gliadín v procese výroby sladú</b>	<b>16</b>
2.4.1	Výroba sladú	16
2.4.2	Aktivita proteolytických enzýmov v priebehu sladovania	17
<b>2.5</b>	<b>Gliadín v procese výroby piva</b>	<b>18</b>
2.5.1	Výroba piva	18
2.5.1.1	Výroba mladiny	19
2.5.1.2	Kvasenie	20
2.5.1.3	Záverečné úpravy výsledného piva	21
<b>2.6</b>	<b>Metódy stanovenia lepkových bielkovín v pive</b>	<b>22</b>
2.6.1	Imunologické metódy	22
2.6.1.1	ELISA	22
2.6.1.2	„Dipstick“ test	24
2.6.1.3	Biosenzory	25
2.6.1.4	Western blotting	25
2.6.2	Ďalšie metódy	25
2.6.2.1	Elektroforetické metódy	25
2.6.2.2	Chromatografické metódy	25
2.6.2.3	Hmotnostná spektrometria	26
2.6.2.4	Polymérová reťazová reakcia	26
<b>3</b>	<b>Cieľ práce</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Praktická časť</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál</b>	<b>28</b>
4.1.1	Chemikálie, roztoky	28
4.1.2	Materiál	29
4.1.3	Prístroje a zariadenia	29
<b>4.2</b>	<b>Laboratórna výroba piva</b>	<b>29</b>
4.2.1	Výroba jačmenného piva	29
4.2.2	Výroba pšeničného piva	30
<b>4.3</b>	<b>Stanovenie obsahu gliadínu pomocou metódy A – PAGE</b>	<b>30</b>
4.3.1	Príprava roztokov pre elektroforézu A - PAGE	30
4.3.2	Príprava polyakrylamidového gélu pre elektroforézu A – PAGE	31
4.3.3	Príprava vzoriek pre elektroforézu A – PAGE	31

4.3.4	Elektroforéza A – PAGE .....	31
4.3.5	Fixácia a vizualizácia gliadínu po elektroforéze A – PAGE.....	31
<b>4.4</b>	<b>Stanovenie obsahu glutenínu pomocou metódy SDS – PAGE .....</b>	<b>32</b>
4.4.1	Príprava roztokov pre elektroforézu SDS – PAGE .....	32
4.4.2	Príprava vzoriek pre elektroforézu SDS – PAGE .....	32
4.4.3	Príprava gélu pre elektroforézu SDS – PAGE.....	33
4.4.4	Elektroforéza SDS – PAGE.....	33
4.4.5	Vizualizácia glutenínov po elektroforéze SDS – PAGE.....	33
4.4.5.1	Farbenie pomocou Coomassie blue.....	33
4.4.5.2	Farbenie striebrom .....	33
<b>4.5</b>	<b>Enzýmová imunoanalýza – kompetitívna ELISA .....</b>	<b>34</b>
4.5.1	Príprava vzoriek .....	34
4.5.2	Stanovenie gliadínu ELISA kitom .....	34
4.5.3	Výpočet a stanovenie .....	34
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskusia .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Elektroforéza.....</b>	<b>35</b>
5.1.1	Pšeničné pivo.....	35
5.1.1.1	Pivo pripravené v laboratórnych podmienkach z mäkkej vody.....	35
5.1.1.2	Príprava piva s použitím tvrdej vody.....	39
5.1.2	Jačmenné pivo .....	42
5.1.2.1	Jačmenné pivo vyrobené z mäkkej vody.....	43
5.1.2.2	Jačmenné pivo pripravené z tvrdej vody .....	44
5.1.3	Komerčné pivá.....	46
<b>5.2</b>	<b>ELISA.....</b>	<b>48</b>
<b>5.3</b>	<b>Diskusia .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Záver .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Zoznam použitej literatúry.....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Zoznam použitých skratiek a symbolov .....</b>	<b>59</b>

# 1 Úvod

Potravinové alergie a intolerancie hrajú veľmi významnú úlohu v patogenéze ľudských chorôb. Sú spôsobené reakciou imunitného systému na antigény základných zložiek potravín [1].

Alergické reakcie sú vyvolávané alergénom, špecifickým proteínom určitej potraviny. V ľudskom tele sa následne proti týmto špecifickým bielkovinám vytvárajú protilátky typu IgE (imunoglobulín E). Reakcia na alergén býva rýchla a prejavy bývajú rôzne. Vďaka tejto rýchlej reakcii je pomerne ľahké odhaliť alergiu na určitú potravinu [2]. Čo sa týka neznášanlivostí potravín, tak ich odhalenie býva oveľa zložitejšie vďaka rôznorodosti príznakov ako je bolesť hlavy, brucha, nafukovanie, psychické, respiračné či kožné problémy alebo únava. V tomto prípade telo produkuje protilátky typu IgG (imunoglobulín G) [2; 3].

Najznámejšou a najčastejšou intoleranciou dnešnej doby je celiakia. Je to dedičné autoimunitné ochorenie spôsobené neznášanlivosťou lepku (gluténu) [2]. Ľudia postihnutí touto intoleranciou si príjmom potraviny, ktorá obsahuje lepok, pôsobia poškodenie črevných klkov a steny tenkého čreva, čím sa zníži absorpčný povrch, dochádza k poruche resorpcie živín a tým k poruche ich transportu do systémovej cirkulácie. Aktuálne celiakia postihuje asi 1% svetovej populácie. Prejavuje sa typickými gastrointestinálnymi problémami ako je zápcha, hnačka, poruchy trávenia, strata telesnej hmotnosti, únava, podráždenosť, depresie alebo úzkosť. Môže sa prejavovať aj atypickými príznakmi ako je anémia alebo osteoporóza, alebo môže prebiehať v tichosti bez príznakov [3; 4].

V súčasnosti je jedinou možnou liečbou dodržiavanie celoživotnej bezlepkovej diéty. Vďaka vynechaniu lepku zo stravy u postihnutého pacienta nevzniká charakteristické poškodenie čreva a vstrebávanie živín sa normalizuje. Medzi potraviny nevhodné pre celiakov sa radia výrobky z pšenice, jačmeňa, ovsu, žita a raže [5; 6]. Podľa Codex Alimentarius Commission, zrevidovaného v roku 2008, sú za bezlepkové potraviny označené tie, v ktorých obsah bielkovín z pšenice, jačmeňa, raže alebo akýchkoľvek hybridných druhov je menší než 20 ppm ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) [6].

Lepok, ako zložitá zmes proteínov, ktorá sa vyskytuje v širokom rozsahu v surovom ale aj v spracovanom stave, je výživným zdrojom bielkovín a vďaka svojim fyzikálno-chemickým vlastnostiam ovplyvňuje tvar a štruktúru potravinových výrobkov, napríklad chleba. Skladá sa zo zložiek prevažne prolamínov a glutenínov z pšenice, jačmeňa, ovsu a raže [6]. Prolamíny sú bielkoviny rozpustné v alkohole a sú bohaté na prolín a glutamín. Gluteníny sú bielkoviny rozpustné z zriedených roztokoch kyselín a zásad. Podľa zrna, z ktorého pochádzajú, sa označujú ako gliadín, hordeín, sekalín a avenín [6; 7].

Existuje mnoho metód, ktoré sa používajú k analýze obilných proteínov. Najjednoduchšie sa tieto metódy dajú rozlíšiť na molekulárno-biologické a imunologické metódy [8]. Za najrýchlejšie a zároveň najefektívnejšie metódy sa v súčasnosti považujú imunologické reakcie. Imunologické reakcie (imunoanalýzy) patria medzi metódy klinickej diagnostiky a výskumu, ktoré slúžia ku kvantifikácii molekúl v biologických tekutinách. Ich prednosťou je vysoká citlivosť a presnosť, ktoré dovoľujú stanovovať látky obsiahnuté v koncentráciách  $10^{-9}$  mol/l až  $10^{-15}$  mol/l, a to aj bez predchádzajúcej úpravy vzoriek [9]. Enzymová imunoanalýza (ELISA) bola vyhodnotená ako najpoužívanejšia a najvhodnejšia metóda pre kvantitatívne stanovovanie lepku v potravinách. Je to analýza založená na interakcii antigénu a protilátky. Praktikuje sa na rôznych testovacích sadách, ktoré sa používajú pre rôzne stanovenia. Je to jedna z najnovších metód detekcie alergénnych proteínov, ako je napríklad gliadín [10; 11].

Ďalšími metódami, ktoré sú používané k detekcii lepkových bielkovín sú biosenzory, „dipstick“ testy, ktoré sú založené na princípe imunoanalýz, elektroforetické,



chromatografické metódy, hmotnostná spektrometria a polymerázová reťazová reakcia (PCR)  
[10].

## 2 Teoretická časť

### 2.1 Lepkové bielkoviny

Lepkové proteíny patria k najzložitejším sieťam bielkovín v prírode vďaka rôznym zložkám a rôznym rozmerom, vďaka variabilite spôsobenej genotypom, rastovými podmienkami a technologickými procesmi.

Lepok je géloom z obilných bielkovín, ktorý vzniká hnetením a skladá sa z dvoch základných frakcií bielkovín, gliadínu a glutenínu, ktoré sa súhrnne nazývajú gluténom [12]. Za imunitnú reakciu organizmu sú zodpovedné bielkoviny z prolaminovej frakcie rastlín podčeľadi Triticeae (zrno pšenice, jačmeňa, ovsu a žita) [13].

Na základe rozpustnosti bielkovín v rôznych rozpúšťadlách sa bielkoviny obilnín delia na albumíny, ktoré sú rozpustné vo vode; globulíny, rozpustné v roztokoch solí; gliadíny, rozpustné v 70% etanole a gluteníny, ktoré sú rozpustné v zriedených roztokoch kyselín a zásad (delenie podľa Osborna) [14]. Gliadíny a gluteníny majú v zrne zásobnú funkciu, nachádzajú sa v endosperme, zúčastňujú sa kľúčiacich procesov a procesov pri vývoji rastlín [13].

#### 2.1.1 Glutén

Glutén je definovaný ako lepkavá viskoelastická hmota, ktorá sa získava premytím cesta za účelom odstránenia škrobových granúl. V závislosti na dôkladnosti premytia sušina obsahuje 75-85% bielkovín a 5-10% lipidov, zvyšný obsah tvoria škrob a neškrobové sacharidy. Glutén obsahuje stovky bielkovinových frakcií prítomných vo forme monomérov (gliadíny) alebo viazané disulfidickými väzbami medzi reťazcami (gluteníny) [15]. Každá frakcia je jedinečná z hľadiska jej aminokyselinovej kompozície, ktorá je charakterizovaná vysokým obsahom prolaminu a glutamínu a nízkym obsahom aminokyselín s nabitými bočnými skupinami.

Napriek tomu, že cysteín patrí medzi vedľajšie aminokyseliny gluténových bielkovín, je veľmi dôležitý pre štruktúru a funkčnosť lepku [16; 17]. Väčšina cysteínov je prítomná v oxidovanom stave a tvoria buď medzireťazcové disulfidické väzby v proteíne, alebo medzireťazcové disulfidické väzby medzi proteínmi. Tieto väzby sú hlavným cieľom všetkých redoxných reakcií, ku ktorým dochádza počas dozrievania jadra, počas frézovania, prípravy cesta a pečenia [17]. Ďalšími kovalentnými väzbami sú krížové väzby tyrozín-tyrozín medzi gluténovými bielkovinami [18] a väzby tyrozín-dehydroferulové kyseliny medzi gluténovými bielkovinami a arabinoxylánmi, neškrobovými polysacharidmi v zrne [19]. Kovalentná štruktúra gluténovej siete je prekrytá nekovalentnými väzbami, ako sú vodíkové mostíky, iónové alebo hydrofóbne väzby [20].

##### 2.1.1.1 Gliadíny

Väčšina gliadínov je v zrne prítomná vo forme monomérov, a podľa mobility pri nízkom pH sa základnou gélovou elektroforézou delia na  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\omega$ -gliadíny (poradie klesajúcej mobility). Na základe modernejších metód je možné gliadíny rozdeliť na viac ako sto frakcií, ktoré sú zoskupené do piatich základných skupín:  $\omega$ 5-,  $\omega$ 1,2-,  $\alpha/\beta$ - a  $\gamma$ -gliadíny [20]. V každej skupine sa nachádzajú malé štruktúrne rozdiely, a to vďaka substitúciám, deléciám a inzerciami jednotlivých aminokyselinových zvyškov.

$\omega$ - gliadíny sú charakterizované najväčším obsahom glutamínu, prolínu a fenylalanínu, ktoré spolu tvoria asi 80% celkového zloženia.  $\omega$ 5- gliadíny majú vyššiu molekulovú hmotnosť (50 000 g/mol) ako  $\omega$ 1,2- gliadíny (40 000 g/mol). Väčšine  $\omega$ -gliadínov chýba cysteín, takže nie je možný vznik disulfidické väzieb.

$\alpha/\beta$ - a  $\gamma$ -gliadíny majú prekrývajúce sa molekulové hmotnosti (28 000-35 000 g/mol) a pomerne nízky obsah aminokyselín glutamínu a prolínu v porovnaní s  $\omega$ -gliadínmi.

Navzájom sa výrazne líšia obsahom niektorých aminokyselín, ako je napríklad tyrozín [16]. Každý z oboch typov má dve zreteľne odlišiteľné N- a C-terminálne domény. N-terminálna doména pozostáva prevažne z opakujúcich sa sekvencií bohatých na glutamín, prolín, fenylalanín a tyrozín, a je jedinečná pre každý typ (Obrázok 1). Opakovateľné jednotky  $\alpha/\beta$ -gliadínov sú dodekapeptidy, ktoré sa zvyčajne opakujú päťkrát a dajú sa modifikovať náhradou jednotlivých zvyškov. Typickú jednotku  $\gamma$ -gliadínov predstavuje QPQQPFP, ktorá sa opakuje až 16-krát a je prekladaná ďalšími zvyškami. V rámci C-terminálnych domén sú  $\alpha/\beta$ - a  $\gamma$ -gliadíny homologne. predstavujú sekvencie, ktoré sú neopakovateľné, obsahujú menej glutamínu a prolínu než N-terminálna doména a majú bežné zloženie. S niekoľkými výnimkami obsahujú  $\alpha/\beta$ -gliadíny šesť a  $\gamma$ -gliadíny osem cysteínov, ktoré sa nachádzajú v C-terminálnej doméne [16]. Neopakujúca sa C-terminálna doména obsahuje značné podiely  $\alpha$ -helixu a  $\beta$ -skladaného listu [21].

Napriek tomu, že obsah jednotlivých frakcií gliadínov je závislý na druhu obilniny (genotyp) a rastových podmienkach, je možné označiť  $\alpha/\beta$ - a  $\gamma$ -gliadíny za najzastúpenejšie zložky, zatiaľ čo  $\omega$ - gliadíny sa vyskytujú v oveľa nižších pomeroch [22]. V Tabuľka 1 je charakterizovaný percentuálny obsah týchto frakcií v zrne vzhľadom na celkový obsah bielkovín a percentuálny obsah jednotlivých významných aminokyselín.

Tabuľka 1: Charakteristika glutenových frakcií [22]

(\*obsah v zrne, vzhľadom na celkový obsah proteínov)

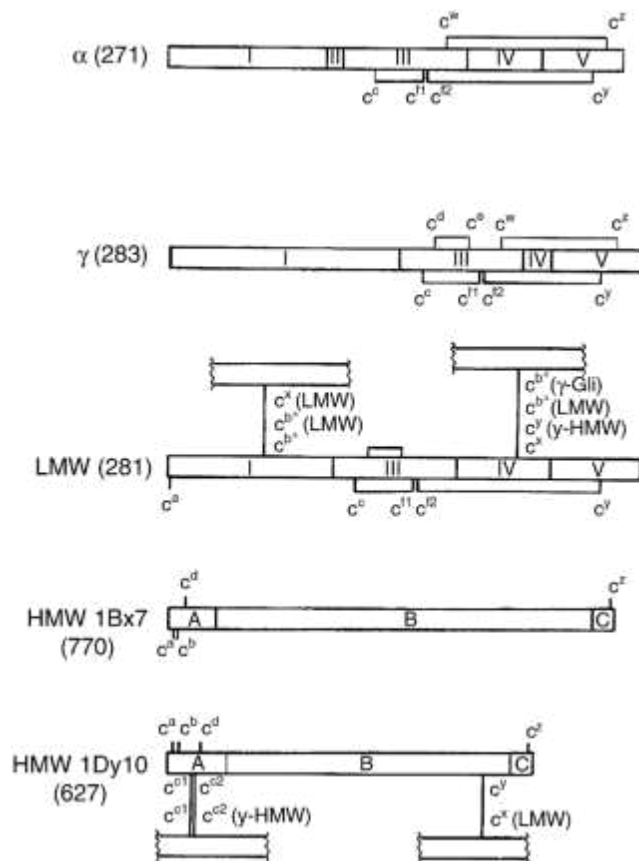
Typ	MWx 10E-3	Obsah* [%]	Gln [%]	Pro [%]	Phe [%]	Tyr [%]	Gly [%]
$\omega$ 5- gliadíny	49-55	3-6	56	20	9	1	1
$\omega$ 1,2-gliadíny	39-44	4-7	44	26	8	1	1
$\alpha/\beta$ gliadíny	28-35	28-33	37	16	4	3	2
$\gamma$ -gliadíny	31-35	23-31	35	17	5	1	3

Menšia časť gliadínov obsahuje nepárny počet cysteínov, a to v dôsledku bodových mutácií. Tie sú viazané navzájom alebo s glutenínmi. Vyskytujú sa v oligoméroch rozpustných v alkohole gliadínových frakcií alebo v polyméroch nerozpustných v alkohole glutenínu. Táto forma gliadínov pôsobí ako terminátor polymerizácie glutenínu (viz. kapitola 2.1.2) [23; 24]. Oligoména frakcia sa nazýva gliadín s vysokou molekulovou hmotnosťou, agregovaný gliadín alebo gliadín rozpustný v etanole [24]. Obsahuje podjednotky  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ -gliadíny a nízkomolekulárne gliadíny, ktoré sú spojené medzireťazcovými disulfidickými väzbami, s molekulovou hmotnosťou od 100 000 do 500 000 g/mol [23].

### 2.1.1.2 Gluteníny

Glutenínová frakcia obsahuje agregované proteíny viazané medzireťazcovými disulfidickými väzbami. Majú rôznu veľkosť, a to od 500 000 do viac ako 10 miliónov g/mol [20]. Ako hlavný determinant vlastností cesta sa používa rozdelenie glutenínov na základe molekulovej hmotnosti.

Po redukcií disulfidických väzieb vykazujú vzniknuté glutenínové podjednotky rozpustnosť v roztokoch alkoholov, podobne ako gliadíny. Prevažujúcim typom sú LMW (nízka molekulárna hmotnosť) glutenínové podjednotky, ktorých podiel predstavuje 20% z celkových gluténových proteínov [22]. Obsahujú dve rozdielne domény ako gliadíny, kde N-terminálna doména pozostáva z opakujúcich sa jednotiek bohatých na glutamín a prolín, ako je QQQPPFS a C-koncová doména je homologická s  $\alpha/\beta$ -gliadínmi. Obsahuje osem cysteínov [16] a šesť zvyškov homologických s  $\alpha/\beta$ - a  $\gamma$ -gliadínmi. Dodatočné dva cysteínové zvyšky nie sú schopné vytvoriť disulfidickú väzbu, pravdepodobne zo sterických dôvodov, čo vedie k tvorbe disulfidických väzieb medzi rôznymi gluténovými proteínmi.



Obrázok 1: Schématické znázornenie štruktúry glutenínových podjednotiek v porovnaní s gliadínovými frakciami [16]

HMW (vysoká molekulová hmotnosť) glutenínové podjednotky patria k minoritným zložkám (10%). Nomenklatúra je založená na kódovacom genóme (A, B, D), typu ( $x$ ,  $y$ ) a pohyblivosti v SDS-PAGE. Skladajú sa z troch štruktúrnych domén (Obrázok 1). Nerepetitívna N-terminálna doména (A) obsahuje asi 80-105 zvyškov, ďalšou doménou je centrálna doména (B), ktorá obsahuje 480-700 zvyškov a C-koncová doména (C), ktorá obsahuje 42 zvyškov [21]. Domény A a C sú charakterizované častým výskytom nabitých zvyškov a prítomnosťou väčšiny alebo všetkých cysteínov. Doména B obsahuje opakujúce sa hexapeptidy ako hlavný reťazec s vloženými tripeptidmi. Najdôležitejší rozdiel medzi  $x$  a  $y$  typmi spočíva v doménach A a B. Napríklad  $y$  typ susedných cysteínov v doméne A a typické opakujúce sa jednotky sú menej často opakované a častejšie modifikované v doméne B typu  $y$ . Typ  $x$ , okrem podjednotky  $Dx5$  má štyri cysteíny, tri v doméne A, a jednu v doméne C [21]. Dva zvyšky domény A sú viazané disulfidickými väzbami a ďalšie dva zvyšky sú viazané medzireťazcovo. Podjednotka  $Dx5$  má na začiatku domény B ďalší cysteín. Typ  $y$  má päť cysteínov v doméne A a jednu v každej z domén B a C. Štúdie opakujúcej sa domény B naznačujú prítomnosť  $\beta$ -reverzných závitov [21]. Prekrývajú sa a vytvárajú voľnú špirálu, o ktorej sa predpokladá, že je zodpovedná za pružnosť lepku. Neopakovateľné domény A a C majú globulárne štruktúry obsahujúce  $\alpha$ -helixy [22; 25].

### 2.1.2 Disulfidické väzby

Disulfidické väzby zohrávajú dôležitú úlohu pri určovaní štruktúry a vlastností gluténových proteínov. Monoméne  $\alpha/\beta$ - a  $\gamma$ -gliadíny obsahujú tri a štyri medzireťazcové disulfidické väzby, zatiaľ čo polymérne LMW a HMW gluteníny obsahujú aj intra- aj interreťazcové väzby [21].

Disulfidická štruktúra natívnych glutenínov nie je stabilná, ale prechádza kontinuálnou zmenou z dozrievajúceho zrna na konečný produkt [17; 21]. Tvorba disulfidov začína ihneď po syntéze proteínov v endoplazmatickom retikule ako integrálna súčasť skladania proteínov [26]. Aby sa mohli zúčastniť tvorby rastúceho polyméru, potrebujú najmenej dva cysteíny, ktoré vytvárajú medzireťazcové disulfidické väzby. HMW a LMW gluteníny spĺňajú túto požiadavku a slúžia ako „predlžovače reťazca“.

Základ HMW glutenínov je tvorený spojením od hlavy k päte. Rozvetvenie môže nastať vďaka prítomnosti aspoň štyroch rôznych cysteínov. LMW gluteníny tvoria lineárne polyméry prostredníctvom cysteínov N-terminálnej a C-terminálnej domény. Zistilo sa, že terminátory polymerizácie sú glutatión alebo gliadín s nepárnym počtom cysteínov [20].

Prvoradý význam disulfidických väzieb je možné preukázať pridaním redukčného, blokujúceho alebo oxidačného činidla [17].

## 2.2 Charakteristika piva

Pivo je penivý slabo alkoholický nápoj sytený oxidom uhličitým vznikajúcim pri kvasení. Vyrába sa z obilných sladov, vody a chmeľu za spoluúčasti pivovarských kvasiniek [27; 28].

Z chemického hľadiska je pivo koloidný roztok, ktorého zloženie sa mení s ohľadom na vstupné suroviny. V závislosti na extrakte pôvodnej mladiny a na stupni prekvasenia obsahuje výsledný produkt 2 – 6% extraktívnych látok. Medzi tieto látky patria hlavne sacharidy, ako dextríny, monosacharidy a oligosacharidy, maltóza, maltotrióza alebo pentóza. Asi 6 – 9% extraktu tvoria dusíkaté látky, ďalšími súčasťami sú polyfenolové látky, chmeľové horké látky, farbivá a vitamíny [7; 28].

Zo zdravotného hľadiska má pivo antioxidačné, antimutagénne, antikarcinogénne, antimikrobiálne a ďalšie pozitívne účinky [11; 29].

## 2.3 Základné suroviny pre výrobu piva

### 2.3.1 Obilniny

České pivo sa vyrába prevažne z jačmeňa. Pre sladovníctvo sú vhodné dvojradové odrody (*Hordeum distichum*) jarného jačmeňa [27].

Priemerné zloženie jačmenného zrna odpovedá: 64% škrobu, 10% bielkovín, 2,5% minerálnych látok. Zvyšné percentá tvoria hemicelulózy, celulózy a lipidy [30]. Zo sladovníckeho hľadiska sú najdôležitejšími zložkami jačmeňa sacharidy, dusíkaté látky, polyfenolové látky a enzýmy. Hlavný podiel sacharidovej zložky tvorí škrob, ktorého stavba v zrne je nejednotná a odlišuje sa uložením v zrne. Hlavná časť bielkovín sa podieľa na tvorbe bunkového substrátu, ďalšia časť spĺňa funkciu biologických katalyzátorov a hormóny bielkovinového charakteru ovplyvňujú zmeny látok a rast buniek. Polyfenoly sú uložené v obalových vrstvách zrna. Jačmeň vo svojej aktívnej alebo latentnej forme obsahuje mnoho enzýmov a ich stimulátorov [27; 28].

#### 2.3.1.1 Morfológická charakteristika zrna

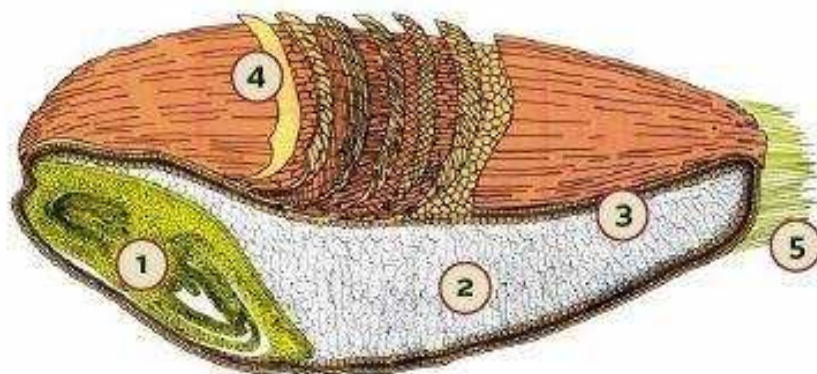
Morfológická stavba zrn všetkých obilnín je podobná. Zrna rôznych obilnín sa líšia predovšetkým tvarom, veľkosťou a podielom jednotlivých vrstiev. Každá obilka sa skladá z endospermu, klíčku a obalových vrstiev [28].

Obalové vrstvy sa skladajú z vonkajšieho oplodia a vnútorného osemenia, ktoré spolu zrastajú. Obsahujú prevažne vlákninu, pričom jej vyšší obsah sa objavuje u jačmeňa a ovsá, ktoré majú, na rozdiel od ostatných zrn, viac vyvinuté oplodie [29].

Endosperm zaberá 84-86% hmotnosti zrna a obsahuje veľké množstvo škrobu a bielkovín. Zaisťuje výživu zárodka obilky a predstavuje hlavný zdroj energie a bielkovín pri výžive

a kŕmení. Medzi endospermom a obalovými vrstvami sa nachádzajú aleuronové bunky. Tie tvoria vrstvu, ktorá obsahuje bielkoviny, minerálne látky, tuky a vitamíny [7; 29].

Klíček predstavuje tú najmenšiu časť obilky a slúži ako zárodok obilky. Od endospermu je oddelený štítkom, ktorý obsahuje až 33% bielkovín a živín. Prierez obilným zrnom je naznačený na Obrázok 2 [29].



Obrázok 2: Prierez obilným zrnom (1-klíček, 2-endosperm, 3-aleuronová vrstva, 4-obalové vrstvy, 5-chlpy) [29]

### 2.3.1.2 Obsah živín v zrne obilnín

Obilniny obsahujú v určitých pomeroch sacharidy, bielkoviny, lipidy. Ich obsah závisí na type zrna. Okrem týchto základných zložiek sú obilniny bohatým zdrojom vitamínov, hlavne vitamínov skupiny B, ktorých obsah je závislý na stupni vymletia. V minoritnom množstve sa v obilninách nachádzajú tiež niektoré minerálne látky a biologicky významné látky ako je kyselina fytová, cholín, kyselina para-aminobenzoová a iné [11; 28].

Čo sa týka sacharidov, obilniny obsahujú hlavne monosacharidy a oligosacharidy zastúpené v zrnách v malých koncentráciách. Medzi zásobné polysacharidy patrí škrob, medzi stavebné patrí celulóza, hemicelulóza, lignín a iné. Sacharidy tvoria z hľadiska ľudskej výživy podstatný zdroj vlákniny [11].

Zrelé obilné zrná obsahujú v závislosti na druhu a odrode asi 9-13 % bielkovín v sušine. Základnými stavebnými jednotkami bielkovín sú aminokyseliny. Najčastejšie vyskytujúcou sa aminokyselinou v obilninách je kyselina glutamová, ktorá je v zrne prítomná vo forme glutamínu. Druhou najzastúpenejšou aminokyselinou je prolín, ktorý zabezpečuje vytváranie pružnej priestorovej bielkovinovej štruktúry pšeničného cesta [11; 29]. Prolín je zodpovedný za relatívnu rezistenciu voči proteolýze v gastrointestinálnom trakte, a to z dôvodu nedostatočnej postprolínovej štiepiacej aktivity. Prolaminové bielkoviny sú známe tým, že sú schopné stimulovať T-bunky a vrodené imunitné reakcie [18]. Obsah bielkovinových frakcií u vybraných obilnín je zobrazený v Tabuľka 2 [11].

Tabuľka 2: Zastúpenie bielkovinových frakcií u vybraných obilnín [17]

	albumíny	globulíny	gliadín	glutelín
<i>Pšenica</i>	leukosín 14,7 %	edestín 7,0 %	gliadín 32,6 %	glutenín 45,7 %
<i>Žito</i>	44,4%	10,2 %	sekalín 20,9 %	sekalínín 24,5 %
<i>Jačmeň</i>	12,1 %	8,4 %	hordeín 25,0 %	horednín 54,5 %

Ryža	10,8 %	9,7 %	oryzín 2,2 %	oryzenín 77,3 %
Kukurica	4,0 %	2,8 %	zeín 47,9 %	zeanín 45,3 %

Obsah lipidov v zrnách obilnín je pomerne malý, menší ako 5%. Obsah lipidov sa zvyšuje v klíčiach zrnách [29].

### 2.3.1.3 Požiadavky na obilniny pre výrobu sladu a piva

U sladovníckych obilnín sa okrem základných charakteristík ako je výnos, odolnosť a náročnosť posudzuje chemické zloženie a vhodnosť pre výrobu sladu. Vlastnosti jačmeňa sa delia do viacerých skupín. Z fyziologického hľadiska sa posudzuje klíčivosť a klíčivá energia, ktoré udávajú percentuálny podiel zŕn schopných klíčiť za daných podmienok. K mechanickým znakom patria napríklad objemová alebo absolútna hmotnosť. Prísne sledovaný je podiel cudzích a biologicky poškodených zŕn, plesnivých, či nahnedlých obiliek, ktoré môžu spôsobovať tzv. gushing (samovoľné penenie piva) [31; 32]. Pri chemickom rozbere je sledovaný predovšetkým obsah vody, škrobu, celkových extrakčných látok a bielkovín. Základné požiadavky na sladovnícky jačmeň a následné rozdelenie do tried akosti sú zobrazené v *Tabuľka 3* [29].

*Tabuľka 3 : Požiadavky na sladovnícky jačmeň [28]*

Ukazovateľ	I. trieda akosti	II. trieda akosti
Vlhkosť	max. 20,0 %	max. 20,0 %
podiel zrna nad sitom 2,5 mm	min. 85,0 %	min. 65,0 %
nečistoty nad sitom 2,2 mm a 2,5 mm	max. 0,5 %	nestanovuje sa
prepad sitom 2,2 mm	max. 2,0 %	nestanovuje sa
klíčivosť	min. 95,0 %	min. 92,0 %
dusíkaté látky	max. 11,0 %	nestanovuje sa
farba	svetložltá až žltá	svetložltá až žltá
plocha	jemná, jemne zvrásčená	menej vyrovnaná
objemová hmotnosť	min. 639 g/l	-

### 2.3.2 Voda

V sladovníckom a pivovarníckom priemysle je voda veľmi dôležitou surovinou, pretože priamo ovplyvňuje kvalitu výsledného produktu. Voda, použitá pri výrobe sladu a následnej výrobe piva, musí zodpovedať štandardom pre jednotlivé operácie a zariadenia [29].

Podľa účelu použitia sa voda delí do troch skupín:

1. varná voda, ktorá sa používa na prípravu piva. Tá musí spĺňať požiadavky pre pitnú vodu,
2. sterilizačná voda a voda na umývanie, ktoré musia byť zbavené mikroorganizmov,
3. prevádzková voda, ktorá podlieha taktiež legislatíve [29].

Procesy, ktoré prebiehajú pri výrobe piva sú zásadne ovplyvnené hodnotou pH [36]. Dôležité je poukázať na účinok niektorých iónov ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  a iné), ktoré reakciou s fosforečnanmi v slade spôsobujú zníženie pH. Následkom je zvýšenie kyslosti rmutu, sladiny a mladiny. Preto je nutné dbať na kontrolu týchto látok v použitej vode. Podobne negatívne ovplyvňujú varný proces ióny disociované z tvrdej vody, ako sú hydrogénuhličitanové a uhličitanové ióny. Naopak pozitívne na činnosť enzýmov pôsobia horečnaté a vápenaté ióny [29; 31].

### 2.3.3 Chmeľ

Chmeľ a z neho vyrobené prípravky sú aj napriek tomu, že sa v tomto priemysle používajú v najmenšom množstve, nezastupiteľnou surovinou. Tá dodáva pivu typickú horkú chuť, arómu a ovplyvňuje ďalšie kvalitatívne parametre [29].

Najdôležitejšími zložkami chmeľu sú živice, silice a polyfenoly [31]. Živice sú zdrojom horkej chuti, silice sú zodpovedné za charakteristickú arómu a polyfenoly majú antioxidantné účinky a výrazne ovplyvňujú senzorickú stabilitu výsledného piva [29; 31].

V českých pivovaroch sa najčastejšie používa chmeľ vo forme granulí, menej časté je používanie napríklad lisovaného chmeľu [29].

### 2.3.4 Pivovarské kvasinky

Kvasinky sú jednobunkové organizmy, z ktorých rod *Saccharomyces cerevisiae*/*Saccharomyces pastorianus* sa používa na zakvasenie mladiny pri výrobe piva. Kvasinky sú v pivovarníctve využívané preto, že sú schopné premeniť zkvasiteľné cukry mladiny na alkohol a oxid uhličitý procesom anaeróbného kvasenia [33].

Podľa typu použitých kvasiniek sa kvasenie rozdeľuje do dvoch skupín, a to je horné a spodné kvasenie. Rozdielom je teplota, ktorá je optimálna pre rast kvasiniek (horné kvasenie – 15-25°C, spodné kvasenie – 5-10°C) [29; 33].

### 2.3.5 Pomocné suroviny

Okrem základných surovín, ktoré boli spomenuté, sa pri výrobe piva používa mnoho ďalších pomocných surovín, ako sú enzýmové prípravky, sladidlá, farbivá prípravky, prípravky znižujúce alebo zvyšujúce penivosť piva, stabilizačné prípravky a iné [33].

## 2.4 Gliadín v procese výroby sladu

Slad sa vyrába riadeným procesom máčania, klíčenia a sušenia, pri ktorom v zrne vznikajú aromatické látky, farebné látky a enzýmy potrebné k výrobe piva [34].

Výrobný postup zahŕňa 5 technologických procesov: čistenie a triedenie jačmeňa, namáčanie, klíčenie, sušenie zeleného sladu, odklíčenie a leštenie. Po týchto procesoch sa následne vyrobený slad uskladňuje pri optimálnych podmienkach a je pripravený na ďalšie spracovanie [30; 34].

### 2.4.1 Výroba sladu

Sladovne nakupujú a dovážajú jačmeň z poľnohospodárskych nákupných stredísk. Každá dodávka musí byť analyzovaná. Rozborom jačmeňa sa zisťuje príslušnosť triede akosti podľa TN (obsah vody, bielkovín, klíčivosť, podiel zrna nad sitom 2,5 mm, farba, plocha, podiel nečistôt, napadnutie škodcami a iné, zobrazené v Tabuľke 2) [35]. Jačmeň sa upraví, ak obsahuje väčšie množstvo vody ako je 20%, tak sa pred procesom usuší. Pri tejto úprave je dôležité dbať aby teplota sušenia neprekročila 40°C, čo by mohlo spôsobiť poškodenie klíčivosti a enzýmovú činnosť. Ďalšou technologickou úpravou je odstránenie nečistôt, prímiesí a prachu [36].

Cieľom namáčania jačmeňa je zvýšenie obsahu vegetačnej vody v zrne z pôvodných 10-15% na 42-48%, ktorá je potrebná na klíčenie a priebeh enzymatických reakcií. Tento proces trvá približne 24-48 hodín v závislosti na použitej technológii. Príjmom vody dochádza k napučeniu koloidov protoplazmy, rozpúšťaniu niektorých živín, odplaveniu nečistôt a látok, ktoré by mohli významne zhoršiť kvalitu a vlastnosti piva [37]. Dostatok vody zabezpečuje taktiež vhodné podmienky pre následné klíčenie, vznikajú biochemické reakcie, aktivujú sa enzýmy a vyvoláva sa ich tvorba [35; 38].



Hlavným účelom klíčenia je aktivácia enzymatického potenciálu, syntéza nových enzýmov a docielenie požadovaného vývinu zárodkov listov a koreňov s využitím zásobných látok v zrne. Aktivita vyššia ako optimálna je nežiadúca, keďže znižuje obsah extraktu vo finálnom produkte. Na konci klíčenia sa získava produkt zvaný zelený slad [39]. Syntéza nových enzýmov je iniciovaná prítomnosťou fytohormónov, Najprv vzniká  $\beta$ -glukanáza a potom  $\alpha$ -amyláza, ktorá je najdôležitejším enzýmom sladu a neskôr jej prostredníctvom sú odbúravané škroby v procese rmutovania. Tieto enzýmy, neaktivované, nemajú preukázaný vplyv na štruktúru gliadínu [13; 40]. Pôsobením enzýmov pri klíčení dochádza k chemickým zmenám zásobných látok, ktoré sú viditeľné na obilkách. Dochádza k morfológickým zmenám ako je rast obiliek, vývin koreňov a stonky, ďalej ku zmenám histologickým, ako je mäknutie endospermu a zmenám metabolickým, takže dochádza ku štiepeniu vysokomolekulárnych látok, ako sú bielkoviny a škrob, na jednoduchšie zlúčeniny [30].

Hvozdenie je proces zníženia obsahu vody v naklíčenom zrne na 4% pri svetlých a na 2% pri tmavých druhoch sladov. To spôsobí deaktiváciu enzýmov a zastavenie klíčenia. Táto fáza je veľmi dôležitá z dôvodu tvorby chuťových, farebných a oxidoredukčných látok, ktoré tvoria sladový charakter [40]. Pri výrobe svetlého sladu sa používa rýchle zníženie obsahu vody v zelenom slade na 10-12%. Proces prebieha pri teplote 55°C a následne sa teplota pozvoľna zvyšuje a slad sa dosúša pri teplote až 85°C. To zabezpečuje obmedzenie nadmerného vzniku farebných a aromatických zlúčenín a prispieva k maximálnemu uchovaniu enzymovej aktivity a krehkosti sladu [40; 25]. Výroba tmavého sladu sa odlišuje použitím teploty. Obsah vody v slade sa zníži na 30% pri 45°C. Potom sa teplota postupne zvyšuje až na 105°C a tým dochádza k podporeniu vzniku melanoidínov, látok, ktoré dodávajú sladu charakteristické sensorické vlastnosti. Pri teplote 105°C a nízkej vlhkosti podliehajú redukujúce cukry a štiepne produkty bielkovín Maillardovej reakcii, čím vznikajú už spomínané melanoidíny [35]. Hvozdenie sa od klasického sušenia odlišuje postupným zvyšovaním teploty, čím sa zamedzuje nepriaznivým výsledkom, ako je strata sensorických vlastností a enzýmov [40].

Z hvozdu sa usušený slad transportuje do odklíčkovačky, kde dochádza k odstráneniu sladového kvetu a zároveň k ochladzovaniu produktu [13]. Sladový kvet sa pre obsah väčšieho množstva dusíkatých látok s veľkou výživnou hodnotou používa ako veľmi výživné bielkovinové krmivo v poľnohospodárstve [13; 39].

#### **2.4.2 Aktivita proteolýtických enzýmov v priebehu sladovania**

Bielkoviny obsiahnuté v zrne sú v priebehu sladovania v stabilnej forme a enzýmy sú prítomné len v malom množstve. Po máčaní a klíčení dochádza k syntéze a aktivácii enzýmov. Tie štiepia zásobné makromolekulárne látky na nízkomolekulárne produkty [30]. Tento proces sa nazýva rozlúštenie zrna, jedná sa predovšetkým o rozrušenie bunecných stien, rozštiepenie škrobových zrn a bielkovín. Pri klíčení dochádza k znižovaniu obsahu škrobu, zároveň k zvyšovaniu obsahu sacharidov, nerozpustné vysokomolekulárne proteíny sa premieňajú na rozpustné nízkomolekulárne produkty, čím sa celkové množstvo bielkovín mení [34].

Zo sladovníckeho hľadiska sú najdôležitejšie enzýmy, ktorých pôsobenie sa prejavuje rôzne v jednotlivých fázach vývoja zrna a v celom procese výroby. Pre sladovníctvo najvýznamnejšími sú enzýmy z triedy hydroláz, ktoré sa rozdeľujú a cytolytické, proteolytické enzýmy, fosfatázy a amylázy, ďalej oxidoreduktázy, transferázy, lyázy, izomerázy a ligázy. Práve hydrolázy majú pri výrobách najvýznamnejšiu úlohu a to hlavne pri varnom procese, ostatné enzýmy sa uplatňujú pri kvasení. Predstavitelia jednotlivých enzýmov sú uvedení v Tabuľka 4 [34; 41].

Tabuľka 4: Jednotlivé triedy enzýmov [34]

Predstavitelia tried enzýmov:	
oxidoreduktáza	lipoxygenáza, superoxididmutáza, kataláza, peroxidáza, polyfenoloxidáza
transferázy	transglukosidázy
hydrolázy	esterázy, karbohydrázy, hemicelulázy štiepiace $\beta$ -glukány a pentozány, xylanázy štiepiace peptidové väzby
lyázy	aldoláza, karboxydismutáza
izomerázy	ribuláza-5fosfát-epimeráza
ligázy	acetyl-CoA-karboxyláza

Degradáciu zásobných proteínov v kľúčiacom zrne zaisťuje mohutný komplex proteolýtických enzýmov. Prebieha v troch fázach:

Začiatočná hydrolýza špecifických bielkovín (predovšetkým hydrolýza globulínov) je katalyzovaná endopeptidázami prítomnými v embryu. Je to základná fáza pre tvorbu aminokyselín, ktoré sú následne použité pre syntézu bielkovín. V nasledujúcej fáze dochádza k syntéze endopeptidáz, ktoré sú vylučované do endospermu za cieľom degradácie hlavných zásobných proteínov, gliadínov a glutenínov, na peptidy a aminokyseliny. Vzniknuté peptidy sú v tretej fáze štiepené exopeptidázami [41]. Aktivita proteáz počas klíčenia zrna sa asi 5 až 6 krát zvýši [42] a pri hvozdení sa zníži [43]. Rozpustné peptidy produkované proteázami slúžia ako substrát pre karboxypeptidázy, ktoré ich degradujú na aminokyseliny. Následne sa proteázy podieľajú na degradácii bunkových stien škrobových zŕn a hydrolyzujú rezervné bielkoviny lokalizované v endosperme.

Endopeptidázová aktivita je tvorená podielom najmenej piatich enzýmov, sú to dva sulfhydrylové enzýmy, ktoré tvoria 90%, a zvyšok predstavujú tri enzýmy s aktivitou, ktorá je závislá na prítomnosti kovových iónov [30]. Optimálne podmienky pre pôsobenie endopeptidáz je medzi 45-50°C. Optimálne podmienky závisia na molekulovej hmotnosti štiepených zlúčenín [42].

Za najdôležitejšie endoproteázy v slade sú označené cysteínové proteázy, ktoré sú zodpovedné za uvoľnenie aminokyselín z gliadínov a glutenínov pri klíčení. Exopeptidázy odštiepujú z vonkajších koncov molekúl jednoduché aminokyseliny. Pri sušení a nízkych teplotách sa tieto enzýmy inaktivujú. Karboxypeptidázami sa nazývajú enzýmy, ktoré odštiepujú aminokyseliny z karboxylového konca proteínov, a sú najviac stabilnými enzýmami [34]. Je dokázaná súvislosť medzi obsahom dusíku v zrne a aktivitou endopeptidáz (Kolbachové číslo udáva pomer rozpusteného dusíka v sladine k celkovému obsahu dusíka v slade). Čím je Kolbachové číslo sladu nižšie, tým nižšiu aktivitu endopeptidáz slad vykazuje [43].

Pri sledovaní vývoja endopeptidáz sa zistilo, že ich aktivita sa zvyšuje až na konci tretieho dňa klíčenia, po štvrtom dni výrazne klesá a znova po šiestom dni dochádza k nárastu aktivity. To vedie k záveru, že po štvrtom dni klíčenia dochádza k syntéze špecifického inhibítora, ktorý tvorí s endopeptidázami reverzibilný komplex. V tomto komplexe môže byť aktivita enzýmu inhibovaná celkovo alebo čiastočne [44].

## 2.5 Gliadín v procese výroby piva

### 2.5.1 Výroba piva

Technologický proces výroby piva je možné rozdeliť do troch úsekov, ktoré zahrňujú množstvo biochemických a chemicko-inžinierskych operácií, a to:

1. výroba mladiny,
2. kvasenie mladiny,
3. záverečné úpravy výsledného produktu [34].

### 2.5.1.1 Výroba mladiny

Cieľom tejto operácie je previesť do roztoku extraktívne látky sladu a chmeľu v optimálnej miere a zložení, a tým zabezpečiť dostatok živín pre metabolizmus kvasiniek a primerané senzorické vlastnosti finálneho piva [29]. Jednotlivé úseky výroby tvoria šrotovanie, vystieranie a rmutovanie, sciedzanie, chmeľovar a chladenie mladiny. V klasickej varni pivovaru sa nachádzajú: vystieracia kaďa, rmutovacia panva, sciedzacia kaďa a mladinová panva [7]. V súčasnosti sa spájajú do jednotného počítačom riadeného bloku, aby sa znížila spotreba energie a obsluha zariadenia [39].

Šrotovanie je mechanický proces, pri ktorom dochádza k dezintegrácii sladového zrna. Cieľom je rozomlieť endosperm bez poškodenia celistvosti obalových vrstiev zrna. Endosperm sladu musí byť jemne rozomletý, pretože sa z neho získava základný podiel extraktu mladiny [34]. Obaly ostávajú celistvé, pretože slúžia ako prirodzená filtračná vrstva. Okrem toho obsahujú aj radu polyfenolových horkých a farebných látok, ktoré by mohli prejsť do mladiny a nepriaznivo ovplyvniť senzorické vlastnosti a koloidnú stabilitu piva [33].

Vystieranie predstavuje dôkladné premiešanie sladového šrotu s vodou. Pomer vody a šrotu sa volí tak, aby sacharizácia predku mala asi 13-18% hm [39]. Na začiatku sa vystieracia nádoba naplní vodou len z časti, a zo zásobníka sa potom pridáva sladový šrot a zvyšok vody. Zavedená vodná sprcha zabraňuje rozprašovaniu šrotu tým, že ho dostatočne navlhčí. Pre celý proces je neodmysliteľné miešadlo, ktorého úlohou je dobre premiešať sladový šrot s vodou, aby sa zabránilo tvoreniu neprevlhčených zhlukov. Nemej dôležitá je teplota vystierania, používa sa 37°C, ktorá je považovaná za najpriaznivejšiu teplotu pre zvýšenie kyslosti vystierky (kyselinotvorná teplota) [33].

Cieľom všetkých rmutovacích postupov je rozštiepenie a prevedenie optimálneho podielu extraktu surovín do roztoku. Iba malá časť sladového extraktu je priamo rozpustná (15-17%), zvyšok je teda nutné previesť do rozpustnej formy, čo sa uskutočňuje prostredníctvom sladových enzýmov [45]. Tieto enzýmy štiepia vysokomolekulárne látky v slade a zároveň neprerušujú biochemické deje, ktoré začali už pri namáčaní a klíčení jačmeňa. Najdôležitejšími operáciami v tomto procese sú štiepenie škrobu a vhodného podielu bielkovín; a ďalších látok na ich nízkomolekulárne a rozpustné zložky. Tieto procesy sú zabezpečené sladovými enzýmami ako sú amylolytické, proteolytické, cytolytické, kyselinotvorné, oxidačno-redukčné a lipolytické [46].

Škrob musí byť degradovaný na zkvasiteľné cukry, ako glukóza, maltóza a maltotrióza a na dextríny (nezkvasiteľné). To sa deje v troch etapách:

- napučanie a zmazovatenie škrobu,
- stekutenie škrobu ( $\alpha$  – amyláza, 65-70°C, pH=4,6),
- scukornatenie škrobu- komplex amyláz degraduje sladový škrob na rôzne podiely jednotlivých cukrov vo výslednej sladine [36].

Pri tomto procese prechádzajú do roztoku rozpustné dusíkaté látky, ktoré sú štiepené proteolytickými enzýmami. Nepochádza k úplnému štiepeniu gliadínu, len k jeho naštiepeniu na kratšie úseky pôsobením enzýmu  $\alpha$  – amyláza. Štiepenie dusíkatých látok musí byť kontrolované, pretože sú zodpovedné za penivosť, fixáciu a plnosť oxidu uhličitého v pive, ale ich nadmerná koncentrácia má negatívny vplyv na stabilitu piva [36; 34].

Proces rmutovania prebieha vo viacerých etapách, v ktorých dôležitými teplotami sú:

- 35-38°C kyselinotvorná teplota.
- 45-55°C peptonizačná teplota,
- 60-65°C nižšia cukrotvorná teplota,

- 70-75°C vyššia cukrotvorná teplota,
- 78°C najvyššia cukrotvorná, odmutovacia teplota [7].

Rmutovanie rozoznávame infúzne a dekokčné. Infúzne rmutovanie zabezpečuje rozpúšťanie a štiepenie extraktu sladu s dlhodobejším účinkom enzýmov, bez mechanického zásahu (povarenie sladu). Dekokčné rmutovanie je založené na postupnom spúšťaní rmutov v menších množstvách z vystieracej nádoby do panvy, kde a scukornujú a varia [46]. Podľa počtu čiastkových rmutov rozoznávame postupy na jeden, dva až tri rmuty. Konečná časť rmutovania (scukornatenie) sa reguluje pomocou vypúšťania alebo zaradením nádrží pri teplote 62 až 65°C. Kontrola rmutovania spočíva v sledovaní objemov, teplôt a scukornatenia rmutu podľa farebnej reakcie s jódom [47].

Sciedzanie je termín, označujúci proces filtrácie špecificky pre odmutované podiely, a to pevný (mláto) a vodný podiel s obsahom extraktívnych látok (mladina). Prebieha v dvoch etapách, sťahovanie predku (zisk hlavného podielu extraktu) a vylúhovanie mláta (zisk zvyšku) [31]. Rmut sa odčerpáva na rozdeľovaciu miskú, aby sa zabezpečilo rovnomerné rozdelenie mláta na jalovom dne. Tým sa vytvorí filtračná vrstva, ktorá je premiešavaná krúživým pohybom zariadenia (kypridla) za cieľom znížiť odpor filtračného koláča, a zároveň slúži na vytlačenie mláta k otvoru na jeho odčerpanie na konci procesu sciedzania. Pri rýchlom otváraní a zatváraní sciedzacích kohútov sa odstraňujú kalové častice obsiahnuté vo filtračnom koláči. Kalová sladina sa vracia do kade kým sa nevyčíri [45].

V chmeľovare dochádza k niekoľkým fyzikálno-chemickým zmenám, ktoré majú nasledovne dopad na zloženie mladiny a tým aj na charakter výsledného produktu. K spomínaným zmenám patrí skoncentrovanie mladiny, sterilizácia, koagulácia vysokomolekulárnych látok a prevod horkých látok chmeľu do roztoku [48]. Keďže je pri vysladzovaní sladina nariadená vodou, prvým krokom je odparenie asi 10% vody. To sa praktikuje varom, pri ktorom je sladina ako sterilizovaná, tak sa inaktivujú zvyškové enzýmy a dochádza ku koagulácii bielkovín, ktoré priamo ovplyvňujú stabilitu piva a jeho organoleptické vlastnosti [34]. Chmeľ sa pridáva do mladiny z dôvodu dosiahnutia charakteristickej horkosti a arómy piva [7]. V chmeľovare prebiehajú izomeračné reakcie  $\alpha$  – horkých kyselín a Maillardove reakcie, pri ktorých sa tvoria farebné a aromatické látky. Chmeľovar sa zastavuje chladením v špeciálnych chladičoch, a to na teplotu 4-7°C, ktorá je kvasnou teplotou [7; 34].

### 2.5.1.2 Kvasenie

Kvasenie prebieha v dvoch krokoch, je to hlavné kvasenie, ktoré sa odohráva na spilkách a dokvášanie, v ležiackych pivniciach [39].

Zaužívané sú dva druhy kvasenia: spodné kvasenie (*Saccharomyces cerevisiae*) pri 24°C, vrchné kvasenie (*Saccharomyces pastorianus/ carlsbergensis*) pri 6-12°C [36].

Rozdiel medzi týmito druhmi kvasenia je hlavne stavba bunkovej steny, ktorá je zodpovedná za usádzanie kvasiniek pre spodné kvasenie na dno nádoby (po ukončení kvasenia), a u vrchných kvasiniek je zodpovedná za stúpanie kvasiniek na hladinu mladiny pomocou oxidu uhličitého. Pre Európu je typické použitie spodných kvasiniek spodného kvasenia [39].

Hlavné kvasenie je charakteristické napúšťaním mladiny do otvorených kvasných nádob, ktorá sa zakváša čistou kultúrou pivovarských kvasiniek. Najdôležitejšími reakciami hlavného kvasenia je premena zkvasiteľných sacharidov mladiny (glukózy, maltózy, maltotriózy) na ethanol a oxid uhličitý anaeróbnym kvasením a súčasne dochádza k tvorbe vhodných organoleptických vlastností [39]. Priebeh kvasenia na závislý na zložení mladiny, na type použitých kvasiniek, na dávke kvasiniek, na teplote kvasenia, na tlaku, na objeme, na tvare nádoby a podobne [49].

V priebehu hlavného kvasenia sa rozlišuje niekoľko fáz:

Mladina je chladená na teplotu 6-9°C na prietokových chladičoch. Až po tomto procese môže byť transportovaná do kvasných kadí, pričom je prevzdušňovaná prívodom sterilného vzduchu. Ideálne je dosiahnutie rovnomerného rozptýlenia vzduchu v mladine, inak by mohlo dochádzať k nekontrolovanému rozmnožovaniu kvasiniek alebo k tvorbe vedľajších produktov (diacetylov) [39].

Po asi 12 hodinách od zakvasenia dochádza k zaprašovaniu. Je to fáza charakteristická tvorbou bielej peny na povrchu kvasiacej mladiny. Biela pena s postupom fermentácie hustne a je vytlačovaná do stredu kvasnej nádoby. Cieľom zaprašovania je rovnomerná distribúcia kvasiniek do celého objemu ochladenej mladiny a zvýšenie obsahu rozpusteného kyslíku, aby boli zaistené optimálne podmienky pre rast a delenie kvasiniek [31; 50].

Ďalším štádiom je tvorba nízkych bielych krúžkov, ku ktorému dochádza obvykle po dvoch až troch dňoch od zakvasenia, a zároveň je to doba maximálnej produkciu oxidu uhličitého. Na povrchu fermentačnej nádoby sa tvoria typické biele krúžky peny.

Počas tretieho až štvrtého dňa dochádza k tvorbe vysokých hnedých krúžkov, klesá pH na 4,6 – 4,4 a intenzita kvasenia je na maxime. Do vrchnej nahnedlej peny sú vynášané odumreté kvasinky a kaly. Táto fáza je doprevádzaná intenzívnym nárastom teploty, čo musí byť korigované chladením. Teplota kvasenia musí byť udržiavaná na 8-12°C [39].

V ďalšom štádiu, ktoré sa nazýva prepádanie sa znižuje intenzita kvasenia. Na konci tohoto štádia ostáva na povrchu mladiny len tmavá vrstva peny, tzv. deka. Deku obsahuje vylúčené látky, odumreté kvasinky a kontaminanty. Táto vrstva je odoberaná, a tým je skvasená mladina zbavená nežiadúcich látok, ktoré by mohli ovplyvniť vlastnosti piva [39].

Na konci hlavného kvasenia použité kvasinky sedimentujú na dno nádoby a po odčerpaní piva sa zbierajú, prepierajú a znovu sú použité na ďalšie zakvášanie.

U piva sa určuje tzv. stupňovitosť, čo je percentuálne vyjadrenie extrahovaného cukru (množstvo zkvasiteľných látok na množstvo chmeľu) [38].

Dokvasovanie a zrenie mladého piva sa deje v uzatvorených ležiackych tankoch, kde sa pivo postupne a pomaly dokváša, čirí, zreje a sýti vznikajúcim oxidom uhličítym pri teplotách 1–3 °C. Ďalšou a modernejšou metódou dokvášania je použitie cylindrokónických tankov (CKT). V nich prebieha hlavné kvasenie a dokvášanie zároveň [34].

Doba odležania je závislá na druhu piva. Bežné piva ležia približne 3 týždne do koncentrácie mladiny 10%, pre špeciálne druhy pív sa doba odležania zvyšuje na niekoľko mesiacov [33].

### **2.5.1.3 Záverečné úpravy výsledného piva**

S dokonalo dokvaseným pivom je potrebné urobiť ešte záverečné úpravy. Aj keď sa takto dozreté pivo považuje organolepticky za hotové, upravuje sa z dôvodu vyhovieť spotrebiteľským a komerčným požiadavkám. Medzi záverečné úpravy patrí filtrácia, prípadne pasterizácia alebo stabilizácia a nakoniec stáčanie do prepravných obalov [34].

Cieľom filtrácie je odstrániť zvyšky koloidných častíc a neusadených mikroorganizmov, aby pivo dosiahlo požadovanú čírosť. Filtrácia prebieha na vláknitých, zrnitých alebo práškových filtračných materiáloch. Na výrobu filtrov sa používajú kremelina, perlit, silikagel alebo filtračné doštičky. Medzi základné typy používaných filtrov patria naplavovacie, doskové alebo sviečkové filtre s keramickými filtračnými prvkami. Najmodernejšou technologickou úpravou je membránová filtrácia, ktorá dokonalo nahradzuje pasterizáciu a tým aj negatívne pôsobenie tepla na koloidnú stabilitu a senzorické vlastnosti výsledného produktu – piva [11].

Pre zvýšenie biologickej stability piva sa používa pasterizácia. To sa používa u pív, u ktorých je treba zabezpečiť mnohomesačnú trvanlivosť. Pasterizácia je proces odstránenia zákalov piva, predovšetkým vysokomolekulárnych dusíkatých látok, polyfenolov, kovových iónov a rozpusteného kyslíku. Veľmi účinná je pasterizácia bakteriologickou filtráciou, čo je

spojené s jej vysokou cenou. Výhodnejšie je použitie prietokovej pasterizácie a plnenie do priehľadných fliaš pri teplote 70°C. Ďalšou možnosťou je použitie adsorpčných stabilizátorov (kremičitý gél pre spomínané odstránenie dusíkatých látok, alebo polyamidový prášok pre odstránenie polyfenolov, či antioxidačné činidlá (kyselina askorbová, siričitany), ktoré sa používajú pre odstránenie oxidačného vplyvu kyslíku zo vzduchu [31; 33].

## 2.6 Metódy stanovenia lepkových bielkovín v pive

Toxicita gliadínu pre osoby postihnuté jeho neznášanlivosťou je všeobecne známa, preto detekcia týchto lepkových bielkovín má významnú úlohu. Gliadín nie je eliminovateľný hydrolýzou pomocou tráviacich enzýmov ako je pepsín, trypsín alebo pankreatín. U glutenínových bielkovín nie je jednoznačne dokázaná alergénna aktivita, no u LMW glutelínu, ktorý obsahuje peptidové sekvencie podobné gliadínu, je toxicita preukázaná [10].

Potraviny, sú podľa legislatívy označenia na výrobku rozdelené do troch skupín:

- Potraviny, ktoré neobsahujú žiadne prolamíny z rastlín druhu *Triticum*, jačmeňa, raže a ovsa. Limit pre obsah gluténu je 20 mg/kg.
- Potraviny, ktorých obsah zložiek pšenice, jačmeňa, raže, ovsa, a ktoré sú považované za bezlepkové „gluten-free“. Limit pre obsah gluténu je 100 mg/kg.
- Potraviny, ktoré sú zmesou zložiek uvedených v bodoch a. a b. Limit pre obsah gluténu je 100 mg/kg [38].

Metódy, ktorými je možné detekovať lepkové bielkoviny, je možno rozdeliť do dvoch skupín, a to molekulárno-biologické a imunologické metódy [51].

Základnými požiadavkami pre detekciu lepkových bielkovín sú dostatočná citlivosť, špecifita a rýchle a jednoduché prevedenie techniky. Dostatočná citlivosť znamená, že použitá technika musí byť schopná detekovať stopové množstvá alergénu. Ideálne detekčné limity pre tento účel sú 1-100 ppm v závislosti od potraviny. Špecifita je schopnosť rozlíšiť cieľovú zložku od ostatných zložiek, a tým zabrániť krížovým reakciám a chybným výsledkom. Toxicita lepku sa v procesoch spracovania mení, preto je dôležité, aby metóda bola schopná zistiť jeho prítomnosť aj v tepelne spracovaných vzorkách [51; 52; 53].

Základnými metódami pre stanovenie prítomnosti lepkových bielkovín je frakcionácia cereálnych bielkovín na základe ich rozdielnej rozpustnosti a elektroforetická separácia bielkovín v polyakryamidových géloch (SDS-PAGE, A-PAGE). Tieto metódy sú však nedostačujúce, na dôkladnú analýzu prolamínového komplexu cereálií sa preto v súčasnosti do popredia dostávajú imunochemické metódy (ELISA) a imunobloting spojený s SDS-PAGE [54]. Tieto metódy poskytujú dôležité informácie ako pre medicínske aplikácie, tak aj pre oblasť cereálnej chémie. Poukazujú na imunoafinitu prolamínových bielkovín k sérovým protilátkam, a taktiež na vzťahy medzi štrukturálnymi vlastnosťami bielkovín a ich alergenicitou [55].

### 2.6.1 Imunologické metódy

Medzi imunologické metódy patria imunologické techniky, pri ktorých dochádza k interakciám antigénu s protilátkou. Sem sa zaraďuje ELISA, „dipstick“ test biosenzory a imunobloting spojený s SDS-PAGE [51].

#### 2.6.1.1 ELISA

Enzýmová imunoanalýza (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay) je jednou z najpoužívanejších imunologických techník. Využíva interakciu antigénu s protilátkou za tvorby imunokomplexu antigén-protilátka, ktorého stanovenie je možné naviazaním vhodného značenia (enzým). Obvykle je protilátka alebo antigén imobilizovaný na pevnom nosiči, ktorým najčastejšie bývajú steny mikrotitračnej doštičky alebo skúmavky [64]. Použité enzýmy musia spĺňať niekoľko podmienok, ako je nízka molekulová hmotnosť, vysoká

enzýmová aktivita a stabilita, musia mať schopnosť kovalentne sa viazať na protilátky alebo na antigény a ich rôzne funkčné skupiny. Medzi najpoužívanejšie enzýmy patrí chrenová peroxidáza, alkalická fosfatáza, beta-D-galaktózidáza a glukózaoxidáza [38]. Zaužívané sú dva druhy enzýmovej imunoanalýzy: kompetitívna a nekompetitívna [56].

Nekompetitívna enzýmová imunoanalýza má na pevnom nosiči zakotvenú protilátku, ktorá v prvom kroku reaguje s antigénom zo vzorku. Po určitom čase dochádza k ustáleniu rovnováhy, kedy nasleduje premytie a naviazanie ďalšej protilátky na antigén. Analyzovaná bielkovina sa detekuje enzymatickou farebnou reakciou a intenzita sfarbenia sa meria fotometricky [51]. Táto metóda sa používa prevažne na stanovovanie veľkých molekúl, ako napríklad proteínov [57].

Kompetitívna imunoanalýza môže byť priama alebo nepriama. Pri priamej ELISA je na pevnom nosiči naviadaná protilátka, ktorá reaguje súčasne s antigénom zo vzorku a so značeným antigénom. Dochádza teda k súťaži o voľné väzbové miesta na protilátke. Po ustálení rovnováhy a premytí, sa enzýmová aktivita meria fotometricky. Intenzita sfarbenia odpovedá koncentrácií naviazaného značeného antigénu, to znamená, že koncentrácia stanovovanej bielkoviny je nepriamo úmerná intenzite sfarbenia [38]. Nepriama ELISA je zložená z dvoch častí, a to kompetitívnej a nekompetitívnej. V prvej časti reakcie je antigén zakotvený na pevnom nosiči v súťaži s voľným antigénom o obmedzené množstvo voľných väzbových miest na voľnej protilátke. Po ustálení rovnováhy a premytí systému dochádza k druhému kroku, ktorý je nekompetitívny. Množstvo protilátky naviazanej na imobilizovanom antigéne sa stanovuje pomocou naviazania značenej protilátky a meria sa fotometricky [56; 57]. Kompetitívna enzýmová imunoanalýza je vhodná pre detekciu lepku v potravinách, v ktorých je možné očakávať jeho enzymatickú degradáciu (slad, pivo) [52].

ELISA je v porovnaní s ostatnými metódami rýchla a jednoduchá na prevedenie, komerčné testovacie súpravy sú komerčne dostupné. Medza detekcie sa pohybuje od 0,05 do 10 mg.kg<sup>-1</sup> [46]. Nevýhodou je nedostatočná citlivosť pri tepelne opracovaných výrobkoch [58].

Protilátky používané pre ELISU sú monoklonálne i polyklonálne, s rôznymi špecifikami a to predovšetkým k  $\omega$ -gliadínu a toxickým sekvenciám glutelínu.

Polyklonálne protilátky sú produktom viacerých aktivovaných klonov B lymfocytov, preto sú namierené proti viacerým epitopom určitého antigénu alebo zmesi antigénov. Získavajú sa imunizáciou laboratórnych zvierat antigénom alebo zmesou antigénov. Špecifita týchto protilátok značne závisí na imunizačnom protokole (tzn. v akej fáze imunitnej odpovede organizmu sa z neho protilátky získavajú) [50].

Monoklonálne protilátky sú na rozdiel od polyklonálnych produktom jedného klonu B lymfocytov a tým sú špecifické proti jednej antigénnej determinante. Fúziou normálnych B lymfocytov z imunizovaného organizmu a neoplastických myelomových buniek je možné pripraviť tzv. hybridomy, ktoré sú schopné produkcie monoklonálnych protilátok. B lymfocyt je v tomto hybridome zodpovedný za schopnosť syntetizovať monoklonálnu protilátku a myelomové bunky zabezpečujú nepretržitý rast [59; 60].

Podľa použitých protilátok je možné rozlíšiť ELISU:

1. S použitím protilátok proti  $\omega$ -gliadínu

Spomínané protilátky sú zvyčajne špecifické proti opakujúcemu sa aminokyselinovému úseku, špecifickému pre jednu bielkovinovú frakciu. To môže negatívne vplyvať na presnosť stanovenia, a to kvôli rozdielnej kompozícií obilniny štandardu a vzorku [10]. Výhodou tejto metódy je dobrá extrahovateľnosť všetkých frakcií gliadínu, a to aj po zahriatí na 75°C, no pri vyššej teplote je možné extrahovať len  $\omega$ -gliadín. To je pravdepodobne spôsobené neprítomnosťou sulfidických skupín v tejto frakcii [52].

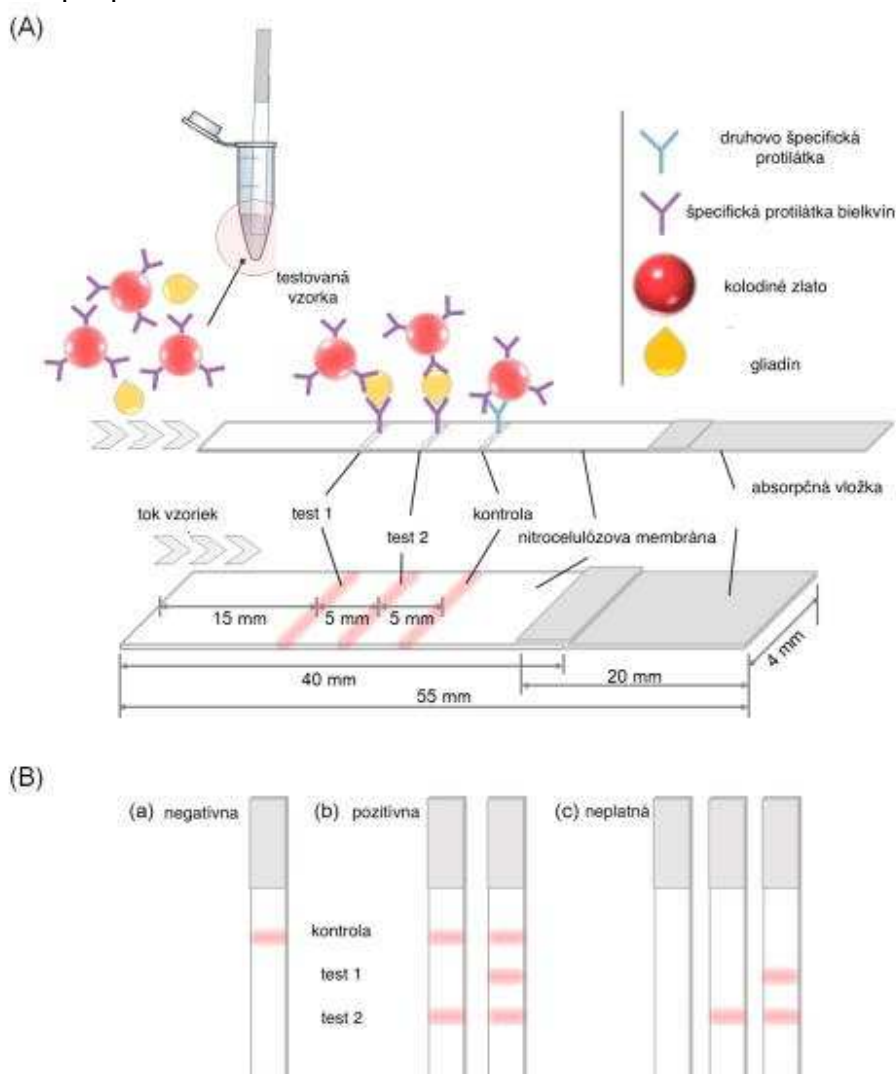
2. S použitím monoklonálnej protilátky R5

V tomto prípade je základom protilátka R5, ktorá v komerčných kitoch reaguje s ovsom a preto nie je vhodná pre detekciu kontaminácie ovsu toxickými obilninami [69]. Modifikáciu

ELISA metódy, ktorá používa monoklonálnu protilátku R5 ako kľúčové činidlo je INGEZIM GLUTEN. Výhodou použitia je schopnosť reagovať s lepkovými bielkovinami aj po tepelnom opracovaní, lepšia korelácia s celiakálne toxickými peptidmi a R5 protilátka je najšpecifickejšou protilátkou pre stanovenie toxických peptidov [61]. Sendvičová ELISA s protilátkou R5 a enzýmom chrenová peroxidáza je referenčnou metódou v Codex Alimentarius [38].

### 2.6.1.2 „Dipstick“ test

Táto metóda je v podstate zjednodušená ELISA, ktorá sa odohráva na páske z nylonu, nitrocelulózy alebo vinylidenchloridu, na ktorom je naviazaná protilátka alebo antigén [57]. Ako u ELISA metódy sa pri „dipstick“ teste rozlišujú dva formáty. Pri kompetitívnom formáte je na nosnej membráne naviazaný antigén [62]. Pri nekompetitívnom usporiadaní je na membráne naviazaná protilátka a detekčné činidlo je uložené voľne v konjugáte. Po pridaní vzorky dochádza k pohybu vzorky spolu s konjugátom cez zóny „dipstick“ testu, a ak sa vo vzorke nachádza alergén, tak v zónach dôjde k reakcii s imobilizovanými protilátkami a k vytváraniu farebného komplexu [57]. Detekčný limit pre prítomnosť gliadínov je 5-10 ppm [53]. Komerčne dostupné sady umožňujú kvalitatívnu alebo semikvantitatívnu detekciu, pomocou špeciálnych čítačiek je možná aj kvantifikácia [57]. Táto metóda je rýchla a ekonomicky efektívna, navyše nevyžaduje technickú zručnosť [57; 62]. Na Obrázok 3 je zobrazený princíp dipstick testu.



Obrázok 3: Princíp „dipstick“ testu [57]



### 2.6.1.3 Biosenzory

Tieto analytické nástroje umožňujú sledovať biošpecifické reakcie v reálnom čase. V princípe ide o imobilizáciu proteínu/DNA fragmentu na povrch snímača čipu a následnú reakciu medzi jednou alebo viacerými molekulami [53].

Imunochemické biosenzory sa skladajú z troch hlavných zložiek:

1. biologický receptor špecifický pre analyt,
2. prevodník pre konverziu do vhodného signálu,
3. snímač signálu [57].

Moderným trendom je používanie povrchovej plazmónovej rezonancie (SPR), ktorá je schopná pomocou zmien v indexe lomu v blízkosti povrchu detekovať väzby medzi molekulami [52]. Medzi prednosti biosenzorov patrí krátka doba analýzy, vysoký stupeň automatizácie a kvantitatívna detekcia pomocou indexu lomu. Na druhej strane je táto metóda veľmi drahá [53].

### 2.6.1.4 Western blotting

Táto technika sa skladá z dvoch častí. V prvom kroku je vzorka podrobená elektroforéze, v druhom kroku prenosu na membránu. Následne sa detekujú protilátky, ktoré sú naviazané na daný antigén [63].

Pomocou SDS elektroforézy sa rozdelia jednotlivé frakcie gliadínu. SDS slúži ako detergent, rozrušuje terciárnu štruktúru antigénu, slúži na predlžovanie reťazca, dáva bielkovinám záporný náboj, a k deleniu dochádza na základe dĺžky peptidového reťazca, ktorá je priamo úmerná molekulovej hmotnosti a nedochádza k deleniu na základe náboja. Po delení sa uskutoční prenos na nitrocelulóзовú membránu prostou difúziou pomocou vhodného pufru alebo pomocou jednosmerného prúdu [73]. V súčasnosti sa tento proces odohráva prostredníctvom komerčných kitov.

Takto pripravené vzorky sa inkubujú so substrátom a s prídavkom sekundárnej protilátky značenej enzýmom chrenová peroxidáza. Reakciou sekundárnej protilátky so substrátom dochádza k farebnej reakcii (farebné pružky), ktorých intenzita je meraná fotometricky a priamo úmerne odpovedá množstvu naviazanej protilátky z gliadínu [73].

## 2.6.2 Ďalšie metódy

### 2.6.2.1 Elektroforetické metódy

Elektroforéza patrí medzi elektromigračné techniky a je zároveň hlavnou technikou, ktorá sa používa pre analýzu obilných bielkovín. Využíva rozdielnej pohyblivosti nabitých častíc v elektrickom poli k ich separácií. Rýchlosť pohybu častíc je závislá na veľkosti náboja, tvare a veľkosti molekuly, na povahe nosiču, elektrolytu, na pH a podobne [56].

Princípom je prenos elektricky nabitých častíc v jednosmernom elektrickom poli, ktoré je vytvárané vkladáním jednosmerného napätia medzi elektródy. Ióny sa pohybujú v smere elektródy s opačným nábojom, teda katióny ku katóde a anióny k anóde.

Používa sa elektroforéza na polyakrylamidovom géle s dodecylsulfátom sodným (SDS-PAGE), elektroforéza v kyslom prostredí (acid-PAGE), izoelektrická fokusácia (IEF), kapilárna zónová elektroforéza (CZE) a vysokoúčinná dvojrozmerná HPLC-HPCE.

Pre separáciu v elektrickom poli sú ako nosiče najčastejšie používané polyakrylamidové gély. Vyznačujú sa dobrými mechanickými vlastnosťami, ich štruktúra je veľmi dobre reprodukovateľná, neobsahujú elektricky nabitú skupinu, majú výbornú rozlišovaciu kapacitu a sú nenáročné na prípravu [56; 64].

### 2.6.2.2 Chromatografické metódy

Chromatografia je fyzikálno-chemická separačná metóda, ktorej princípom je rozdeľovanie zložiek vzorky na základe afinity medzi dve vzájomne nemiesiteľné fázy. Jedna z fáz je

pohyblivá (mobilná) a druhá je nepohyblivá (stacionárna), ktoré sa od seba líšia niektorou zo základných fyzikálno-chemických vlastností (napríklad polaritou) [65]. K rozdeleniu jednotlivých zložiek zmesi dochádza na základe afinity k jednotlivým fázam [66].

Po chromatografickom procese sú proteíny detekované spektrofotometricky (absorpcia UV) alebo pomocou hmotnostného spektrometra (MS) [65]. Táto metóda podáva hodnotné informácie o rozdelení, vlastnostiach a zložení prolaminov, a však nie je dostatočne špecifická. Navyše je chromatografia časovo a finančne náročná [25; 26].

### **2.6.2.3 Hmotnostná spektrometria**

Hmotnostná spektrometria sa využíva najmä ako kontrola pre odhalenie falošne pozitívnych výsledkov imunoanalytických meraní, takže slúži k hodnoteniu kvality a bezpečnosti potravín [77]. V spojení MALDI-TOF umožňuje identifikovať, charakterizovať a kvantifikovať biologicky aktívne peptidy. Použitie MS v potravinárstve umožňuje presné určenie molekulovej hmotnosti proteínu a jeho sekvencie, taktiež detekciu rôznych modifikácií po spracovaní potraviny [67; 68].

### **2.6.2.4 Polymérová reťazová reakcia**

Polymérová reťazová reakcia – PCR funguje na princípe selektívnej amplifikácie určitého úseku DNA, ktorý kóduje gluténové proteíny. Veľkosť a špecificita tohto úseku je obojstranne ohraničená primermi. Jej výhodou je získanie stovky ng až jednotky  $\mu\text{g}$  DNA zo stopového množstva matrice DNA [69].

Pozostáva z 3 po sebe nasledujúcich cyklicky sa opakujúcich krokov: denaturácia, annealing a elongácia.

Denaturácia je oddelenie dvojvláknovej molekuly DNA na dve jednovláknové časti pôsobením teploty (cca  $94^{\circ}\text{C}$ ). Tento proces vedie k druhému kroku, annealingu, čiže pripojeniu primerov špecificky na komplementárnej sekvencii denaturovanej DNA (cca  $30\text{--}65^{\circ}\text{C}$ ). V poslednom kroku, pri teplote cca  $72^{\circ}\text{C}$ , sa pripája DNA polymeráza svojim 3'OH koncom komplementárne k primeru, a dochádza k elongácii (predlžovaniu) reťazca. Optimálny počet cyklov závisí na počiatkovej koncentrácii templátovej DNA. Výsledkom sú úseky DNA presne definovanej dĺžky, ktoré sa nazývajú amplikony.

PCR je schopná detekovať stopy nepoškodenej DNA vo vzorku, vykazuje vysokú citlivosť nevýhodou je pomnoženie DNA vo vzorke, postup extrakcie DNA je ťažší, a zároveň chýba kvantitatívny potenciál [69; 70].

Pre túto prácu boli použité elektroforetické a imunochemické metódy. Pre kvantitatívnu analýzu bola vyhodnotená ako najvhodnejšia metóda ELISA, ktorej medze detekcie sú dostatočné na to, aby boli schopné detekovať rôzne koncentrácie alergénnych lepkových bielkovín v procese výroby piva, v ktorom boli sledované. Elektroforetické metódy boli použité za účelom sledovať zmeny v jednotlivých frakciách gliadínov a glutenínov.

### **3 Cieľ práce**

V rámci diplomovej práce boli riešené nasledujúce ciele:

- literárna rešerš zameraná na pôvod a obsah lepkových bielkovín v pive a surovinách,
- optimalizácia metód stanovenia lepkových bielkovín pomocou elektromigračných a imunochemických metód,
- sledovanie lepkových bielkovín vo vybraných fázach procesu výroby piva,
- vyhodnotenie a diskusia výsledkov.

## 4 Praktická časť

Pre sledovanie obsahu gliadínu a glutenínu v biotechnologickom procese výroby piva boli vyrobené 2 jačmenné a 2 pšeničné piva klasickou technológiou. Počas procesu výroby boli odoberané vzorky sladiny, mladiny, mladého piva a stabilizovaného piva po 25 dňoch. Tieto vzorky boli po odobraní dôkladne zamrazené v hlbokomraziacom boxe na  $-80^{\circ}\text{C}$  a následne lyofilizované, uskladnené a pripravené k analýzám. Pre stanovenie gliadínového profilu bola použitá metóda A – PAGE (“acid PAGE“, elektrofoéza v kyslom prostredí), pre stanovenie glutenínového profilu bola použitá metóda SDS–PAGE a pre kvantitatívne stanovenie bola použitá ELISA a počítačová denzitometria (program FUJIFILM, Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.X). Pre porovnanie vyrábaných pív boli zakúpené tri druhy českých komerčných pív, ktoré boli analyzované rovnakými postupmi.

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie, roztoky

- Akrylamid (SIGMA ALDRICH)
- Bis-akrylamid (SIGMA ALDRICH)
- Močovina (LACHEMA)
- destilovaná voda
- Kyselina askorbová (LACH – NER)
- Heptahydrát síranu železnatého (LACHEMA)
- Peroxodisíran amónny (SIGMA ALDRICH)
- TEMED – N, N,N',N'-tetramethylethylendiamin (SIGMA ALDRICH)
- 2- chlorethanol (SIGMA ALDRICH)
- Pyronin Y (SIGMA ALDRICH)
- Kyselina octová – ledová (SIGMA ALDRICH)
- Glycín (SIGMA ALDRICH)
- Kyselina trichloroctová (SIGMA ALDRICH)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA ALDRICH)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA)
- TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (SIGMA ALDRICH)
- Kyselina chlorovodíková (PENTA)
- SDS – dodecylsulfát sodný (SIGMA ALDRICH)
- Brofenolová modrá (SERVA)
- Glycín (SERVA)
- DTT – dithiothreitol (SIGMA ALDRICH)
- Glycerol (SIGMA ALDRICH)
- 2 – merkaptoethanol (SIGMA ALDRICH)
- Methanol (LACH – NER)
- Kyselina octová 99,8% (LACHEMA)
- Ethanol (LACHEMA)
- Butanol (LACHEMA)
- Rybacia želatína (SIGMA ALDRICH)
- Etanol pre UV (ML CHEMICA)
- Hydroxid sodný (ML CHEMICA)
- Metanol 37% (SIGMA ALDRICH)
- Tiosíran sodný (SIGMA ALDRICH)
- Formaldehyd 37% (SIGMA ALDRICH)

- Dusičnan strieborný (SERVA)
- Uhličitan sodný bezvodý (SERVA)
- ELISA kit RIDASCREEN® Gliadin competitive (R-BIOPHARM)

#### 4.1.2 Materiál

- Jačmenný slad plzeňského typu (Sladovna Bernard)
- Pšeničný slad svetlý (Záhlinice)
- Chmeľ Sládek (IBU=70)
- Kvasinky spodného kvasenia (Saflager S-23)
- Komerčné pívá (Bernard svetlý ležiak, Bernard svetlý ležiak bezpečkový, Herold svetlý ležiak pšeničný)

#### 4.1.3 Prístroje a zariadenia

- Analytické váhy s presnosťou 0,1 a 0,000 1 g (A&D INSTRUMENTS LTD)
- Neautomatizovaný dvojvalcový ručný šrotovník
- Hrnec s termostatom Bielmeier (27 l, Bielmeier, NEM)
- Scedzovací hrniec Bielmeier (30 l, Bielmeier, NEM)
- Špirálový chladič
- Kvasná nádoba s kvasnou zátkou (8,5 l)
- Aparatúra pre vertikálnu elektroforézu s možnosťou chladenia (Owl Separation Systems, USA)
- Zdroj (Major science MP-500P)
- Laboratórna trepačka (Yellow line, SRN)
- Laboratórna odstredivka U-32R (Boeco, SRN)
- Hlubokomriaziaci box – 80°C
- pH meter
- Aparatúra pre elektroforézu Mini PROTEAN 3 (BioRad, USA)
- Zdroj Power Pac 300l (BioRad, USA)
- Centrifuga 5430R (Eppendorf)
- Vortex, Ika Vortex genius 3 (IKA, SRN)
- Termoblok (BioSan, USA)
- Zariadenie pre výrobu deiónizovanej vody
- PC s programom na vyhodnotenie gélov po elektroforéze (FUJIFILM, Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.X)
- ELISA Reader BioTek ELx808 (BioTek, SRN)

## 4.2 Laboratórna výroba piva

Vzorky piva jačmenného a pšeničného boli vyrobené z českého plzeňského sladu a pšeničného bieleho sladu, pričom boli použité 2 kg sladu na 10 l vody.

### 4.2.1 Výroba jačmenného piva

Šrotovanie jačmenného sladu prebiehalo v dvojvalcovom ručnom šrotovníku. Slad bol vystieraný pomalým nasypávaním sladového šrotu do hrnca s termostatom, nastavenom na teplotu 38 °C za pravidelného miešania. Po ukončení vystierky, ktorá trvala 20 minút, bola teplota v hrnci zvýšená na 52 °C a udržiavaná po dobu 30 minút. Pri tejto teplote dochádzalo k peptonizácii. Následne bola várka zahrievaná na teplotu 62-64 °C po dobu 30 minút, ktorá je charakterizovaná ako nižšia cukrotvorná teplota. Teplota sa ďalej zvyšovala na vyššiu cukrotvornú teplotu 72-74 °C, a táto fáza trvala 20 minút. Nakoniec bola teplota zvýšená na odmutovacia teplotu, 75-78 °C, po dobu 15 minút. Po tejto fáze bola doplnená odparená

voda a várka bola prevedená do sciedzacej nádoby. Po dokonalom scedení bola výsledná sladina prevedená naspäť do hrnca a vyhrievaná na teplotu 100 °C, pri ktorej začal chmeľovar. Chmeľ bol do vriacej sladiny pridávaný v troch dávkach podľa Tabuľka 5.

Tabuľka 5: Prídavky chmeľu v čase u chmeľovaru

Čas [min]	Chmeľ [g]
90	8,75
60	8,75
15	11,38

Výsledná mladina bola schladená na zákvasnú teplotu 15 °C. Následne bolo použité 200 ml sladiny, odobranej pri scedení, pre zaočkovanie kvasinkami spodného kvasenia (Saflager S-23). Zaočkovaná mladina bola ponechaná pri teplote 15 °C 4 až 5 dní, do ustálenia kvasenia, čoho indikátorom bola viditeľná prepadajúca sa deka. Nasledovalo stočenie do litrových sklenených fliaš, ktoré boli uskladnené pri teplote 7 – 8 °C. V tomto štádiu dochádzalo k sekundárnemu kvaseniu a zreniu mladého piva.

#### 4.2.2 Výroba pšeničného piva

Pšeničný slad bol zmiešaný s jačmenným v pomere 60:40. 2 kg takto zmiešaného sladu boli zošrotované a vystierané v 10 l vody v hrnci s termostatom na 38 °C po dobu 20 minút. Udržovanie peptonizačnej teploty trvalo 10 minút, nižšej cukrotvornej 20 minút, vyššej cukrotvornej 20 minút a odmutovacej teploty 10 minút (kap. 4.2.1). Vzniknutá sladina bola scedená a vrátená do hrnca, aby mohlo dôjsť k chmeľovaru. Chmeľovar prebiehal v 3 fázach, ale doba bola skrátená na 60 minút. Prídavky chmeľu boli pridávané v poradí v Tabuľka 6.

Tabuľka 6: Prídavky chmeľu v čase u chmeľovaru

Čas [min]	Chmeľ [g]
60	3,5
15	2,0
5	3,0

Po chmeľovare bola mladina schladená na zákvasnú teplotu 15 °C a zakvasená rovnakým spôsobom ako jačmenné pivo (kap.4.2.1). Zaočkovaná mladina bola ponechaná pri 15 °C po dobu 2-3 dní kvaseniu. Po ustálení kvasenia bolo mladé pivo stočené do litrových sklenených fliaš, ktoré boli uskladnené rovnako, a to pri 7 – 8 °C.

### 4.3 Stanovenie obsahu gliadínu pomocou metódy A – PAGE

#### 4.3.1 Príprava roztokov pre elektroforézu A - PAGE

Príprava 0,15% vodného roztoku síranu železnatého: 0,014 g heptahydrátu síranu železnatého sa rozpustilo v 5,0 ml destilovanej vody. Roztok bol pripravený vždy pred vlastným použitím čerstvý.

Príprava 10% vodného roztoku peroxodisíranu amónneho: 0,1 g peroxodisíranu amónneho sa rozpustilo v 1,0 ml destilovanej vody. Roztok bol pripravený vždy pred vlastným použitím čerstvý.

Extrakčný roztok pre gliadíny: 25 ml 2-chloretanolu a 0,05 g pyroninu G bolo kvantitatívne prevedené do odmernej banky s objemom 100 ml a doplnené destilovanou vodou po rýsku. Tento roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

Elektródový tlmivý roztok: 4,0 ml ľadovej kyseliny octovej a 0,4 g glycínu bolo kvantitatívne prevedené do odmernej banky s objemom 1 000 ml a doplnené po rysku destilovanou vodou. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C a použitý jednorazovo.

Gélový tlmivý roztok: Bol na namiešaný roztok s 20 ml ľadovej kyseliny octovej, 1,00 g glycínu a 1 000 ml destilovanej vody. Tento roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

Fixačný roztok: 100 g kyseliny trichloroctovej bolo prevedené do 1 000 ml odmernej banky a doplnené po rysku destilovanou vodou. Roztok bol uchovávaný pri teplote 20 °C.

Farbiaci roztok: 0,50 g Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,50 g Coomassie Brilliant Blue G-250 bolo kvantitatívne prevedené do odmernej banky o objeme 100 ml a doplnené po rysku etanolom. Roztok bol uchovávaný pri teplote 20 °C.

#### **4.3.2 Príprava polyakrylamidového gélu pre elektroforézu A – PAGE**

Do 60 ml tlmivého roztoku boli v nasledujúcom poradí pridané tieto komponenty: 10,00 g akrylamidu; 0,40 g bisakrylamidu; 6,00 g močoviny; 0,10 g kyseliny askorbovej a 3,4 ml roztoku síranu železnatého. Po premiešaní bola táto zmes doplnená na objem 100 ml a to gélovým tlmivým roztokom. Následne bola táto zmes temperovaná na teplotu 6 °C. Po vychladení boli do roztoku pridané 0,2 ml roztoku peroxidisíranu amónneho a 0,3 ml TEMED a zmesou bola ihneď naplnená gélová kazeta až po okraj. Do hornej časti bol umiestnený hrebeň, ktorého úlohou bolo vytvoriť miesta pre dávkovanie vzoriek. Polymerácia prebieha počas 5 minút a gél je možné použiť pre elektroforézu asi po 60 minútach.

#### **4.3.3 Príprava vzoriek pre elektroforézu A – PAGE**

Pre extrakciu gliadínov zo vzorky v pevnom skupenstve boli použité mikroskúmavky Eppendorf s objemom 1,5 ml, do ktorých bolo odvážené množstvo 50 mg vzorku. K vzorke bol pridaný extrakčný roztok pre gliadíny, a to 0,3 ml. Pre premiešanie zmesi bol použitý vortex a následne bola vzorka v uzatvorenej mikroskúmavke ponechaná cez noc v chladničke. Nasledujúci deň bola zmes odstredená na laboratórnej odstredivke pri 10 000 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Pre elektroforézu bol použitý supernatant a vyrobené extrakty boli uchovávané pri teplote -18 °C.

#### **4.3.4 Elektroforéza A – PAGE**

Po vytiahnutí hrebeňa nasledovalo premytie vzniknutých komôrok elektródovým tlmivým roztokom a naplnenie týmto roztokom aparatury pre elektroforézu A – PAGE. Nasledovalo pripojenie zdroja tak, aby elektroforetické delenie prebiehalo smerom zhora dole, a to od kladnej ku zápornej elektróde. Po zapojení prebehla tzv. pre-elektroforéza, ktorá trvala 60 minút pri konštantnom napätí 480 V. Potom boli do komôrok nadávkované pripravené vzorky s objemom 5 µl. Elektroforéza bola znova zapojená do elektrického obvodu a prebiehala za rovnakých podmienok po dobu 120 minút. S ohľadom na vložené vysoké napätie bolo potrebné elektródový tlmivý roztok počas vyvíjania elektroforegramu chladiť.

#### **4.3.5 Fixácia a vizualizácia gliadínu po elektroforéze A – PAGE**

Po skončení elektroforézy bol gél uvoľnený do destilovanej vody, prevrstvený 300 ml fixačného roztoku s 15 ml farbiaceho roztoku. Farbenie prebiehalo na laboratórnej trepačke a po dobu 24 hodín. Po ukončení farbenia bol gél premytý vodou a bolo odstránené nadbytočné farbivo. Gél bol následne uchovávaný v chladničke, pri teplote 4 °C, na skle zabalený do potravinárskej fólie, ktorá bránila vysychaniu.

## 4.4 Stanovenie obsahu glutenínu pomocou metódy SDS – PAGE

### 4.4.1 Príprava roztokov pre elektroforézu SDS – PAGE

Roztok A: 30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bolo kvantitatívne prevedené do odmernej banky s objemom 100 ml a banka bola doplnená destilovanou vodou po rysku. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

Roztok B: 18,16 g TRIS bolo rozpustené v 50 ml destilovanej vody. Po rozpustení nasledovalo upravenie pH pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej na hodnotu 8,8 a vzniknutý roztok bol prevedený do odmernej banky s objemom 100 ml. Banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou a roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

Roztok C: 18,16 g TRIS bolo rozpustené v 50 ml destilovanej vody. Po rozpustení nasledovalo upravenie pH pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej na hodnotu 6,8 a vzniknutý roztok bol prevedený do odmernej banky s objemom 100 ml. Banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.

Roztok D: 10 g SDS bolo kvantitatívne prevedené do odmernej banky s objemom 100 ml a doplnené po rysku destilovanou vodou. Roztok bol uchovávaný v tme pri laboratórnej teplote.

Roztok E: 0,1 g peroxidisíranu amónneho bolo rozpustené v 1 ml destilovanej vody. Roztok bol použitý jednorazovo.

Roztok F: 10 mg bromfenolová modrá bolo rozpustené v 1 ml destilovanej vody a bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

Elektródový pufer: 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycínu bolo kvantitatívne prevedené do odmernej banky s objemom 1 000 ml a obsah banky bol doplnený po rysku destilovanou vodou. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

50 % vodný roztok izopropanolu: izopropanol bol zmiešaný s destilovanou vodou v pomere 1:1 a uchovávaný pri laboratórnej teplote.

Roztok pre extrakciu glutenínov: 0,6057 g TRIS bolo rozpustené v 90 ml 50 % vodného roztoku izopropanolu. Po rozpustení bolo upravené pH pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej na hodnotu 7,5. Nasledovalo prídanie 1 g DTT a vzniknutý roztok bol prevedený do odmernej banky s objemom 100 ml. Banka bola 50 % vodným roztokom izopropanolu doplnená po rysku a roztok bol použitý jednorazovo.

Vzorkový pufer: Bolo zmiešané 4,9 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,3 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkptoethanolu. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

Stabilizačný roztok: Bolo zmiešané 100 ml methanolu a 400 ml destilovanej vody.

Farbiaci roztok: Bolo zmiešané 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G – 250, 450 ml methanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 450 ml vody.

Odfarbovací roztok: Bolo namiešané 250 ml methanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 650 ml destilovanej vody.

### 4.4.2 Príprava vzoriek pre elektroforézu SDS – PAGE

Do mikroskúmavky typu Eppendorf s objemom 1,5 ml bolo navážené 200 mg vzorku. K navážke bol pridaný 1 ml 50 % vodného roztoku izopropanolu a zmes bola pretrepávaná na vortexe po dobu 30 minút. Nasledovalo odstredenie pri 2 500 otáčok za minútu po dobu 15 minút. Supernatant bol odliaty a sediment bol rovnakým postupom ešte dvakrát extrahovaný 50 % vodným roztokom izopropanolu. Týmto spôsobom boli vyextrahované gliadíny a zo sedimentu sa následne extrahovali gluteníny. Sediment bol dôkladne rozmiešaný v 1 ml extrakčného roztoku pre gluteníny a zmes bola inkubovaná v termobloku pri teplote 60 °C po dobu 30 minút. Potom bola zmes odstredená pri 10 000 otáčkach za minútu po dobu 10 minút. Do čistej skúmavky bolo odpipetované 0,5 ml supernatantu do 1,5 ml skúmavky Eppendorf, a bolo pridané 0,5 ml vzorkového pufru. Hotové extrakty boli uchovávané pri teplote -18 °C.



### 4.4.3 Príprava gélu pre elektroforézu SDS – PAGE

Elektroforetické sklá boli umyté vodou a odmasťovacím prostriedkom, opláchnuté destilovanou vodou a odmastené pomocou ethanolu. K stanoveniu bol používaný 5% zaostrovací gél a 8% separačný gél.

Separučný gél bol pripravený zmiešaním 4,0 ml destilovanej vody, 3,3 ml roztoku A, 2,5 ml roztoku B, 0,1 ml roztoku D, 0,1 ml roztoku E a 0,004 ml TEMED. Roztok E a TEMED boli pridané tesne pred naliatím roztokov medzi sklá. Roztok bol prevrstvený asi 3 mm butanolu, aby sa vyrovnala hladina gélu a nedochádzalo k odparovaniu vody. Po stuhnutí separačného gélu bol butanol odstránený a gél bol premytý destilovanou vodou.

Zaostrovací gél bol pomocou automatických pipiet namiešaný z 2,1 ml destilovanej vody, 1,0 ml roztoku A, 0,38 ml roztoku C, 0,03 ml roztoku C, 0,03 ml roztoku E a 0,003 ml TEMED. Roztok E a TEMED boli znova pridané až tesne pred naliatím, a zaostrovací gél bol naliaty na vrstvu separačného géle a priestor medzi sklami bol naplnený až po okraj. Po naliatí bol medzi sklá ihneď vložený elektroforetický hrebeň. Po zatuhnutí gélu bol hrebeň odstránený až pred samotným stanovením, aby nedochádzalo k vysychaniu gélu.

### 4.4.4 Elektroforéza SDS – PAGE

Sklá s pripraveným a dokonale zatuhnutým gélom boli vytiahnuté zo stojanu a boli očistené od nadbytku gélu. Na zadné sklo bol fixom označený tvar hrebeňa, ktorý sa hneď na to odstránil. V stojane umiestnený gél sa vložil do elektroforetickej nádoby, pričom vnútorný priestor nádoby bol úplne zaplnený elektródovým roztokom a vonkajší priestor bol naplnený približne do polovice. Pomocou automatickej pipety boli do jamiek nadávkované vzorky o objeme 5 µl a aparátúra bola zapojená ku konštantnému zdroju napätia 100 V na dobu 120 minút.

### 4.4.5 Vizualizácia glutenínov po elektroforéze SDS – PAGE

#### 4.4.5.1 Farbenie pomocou Coomassie blue

Gél po elektroforéze bol uvoľnený z elektroforetických skiel do misky s destilovanou vodou. Voda v miske bola odliata a následne nahradená stabilizačným roztokom a miska bola stabilizovaná 5 minút na trepačke. Po odliatí stabilizačného roztoku bol na gél navrstvený farbivý roztok a 90 minút bol odfarbovaný na trepačke. Následne bol gél premytý odfarbovacím roztokom a 90 minút bol odfarbovaný na trepačke.

#### 4.4.5.2 Farbenie striebrom

Roztoky:

Fixačné činidlo: do 500 ml odmernej banky bolo použitých 250 ml metanolu, 60 ml ľadovej kyseliny octovej, 0,24 ml 37% formaldehydu a destilovanou vodou bol doplnený po rysku.

Premývacie činidlo: do 500 ml odmernej banky bolo použitých 100 ml metanolu a zvyšok bol doplnený po rysku destilovanou vodou.

Senzibilizačné činidlo: 63,7 mg thiosíranu sodného a 500 ml destilovanej vody.

Farbiace činidlo: do 250 ml odmernej banky bolo navážené množstvo 0,5 g dusičnanu strieborného, ku ktorému bolo pridaných 200 ml destilovanej vody. Tento roztok bol ponechaný pri 4 °C až do doby tesne pred samotným farbením, kedy k nemu bolo pridaných 0,179 ml 37% formaldehydu a banka bola po rysku doplnená destilovanou vodou.

Vyvíjacie činidlo: 30 g bezvodého uhličitanu sodného, 0,237 ml 37% formaldehydu a 2 ml senzibilizačného činidla bolo prevedené do 500 ml odmernej banky a doplnené po rysku destilovanou vodou.

Terminačné činidlo: Bolo zmiešané 440 ml destilovanej vody a 60 ml ľadovej kyseliny octovej.

Gél po elektroforéze bol zbavený skiel a uvoľnený do farbiacej nádoby. Po dobu minimálne 1,5 až 2 hodiny bol gél ponechaný vo fixačnom roztoku. Po tejto dobe bol trikrát približne po desiatich minútach premytý čistým premývacím rozpúšťadlom a následne dôkladne niekoľkokrát premytý destilovanou vodou. Po dôkladnom omytí bol gél presne na jednu minútu ponechaný v senzibilizačnom roztoku, znova dôkladne premytý a ponechaný v ochladenom farbiacom roztoku 20 minút. Gél bol znova omytý destilovanou vodou a vyvíjanie bolo započaté prevrstvením gélu vyvíjacím činidlom. Vyvíjanie bolo ukončené asi po 15 minútach pridaním terminačného činidla, keď bol výsledok farbenia uspokojujúci.

## **4.5 Enzýmová imunoanalýza – kompetitívna ELISA**

### **4.5.1 Príprava vzoriek**

Bol navážený 1 g lyofilizovaného homogénneho vzorku, a ten bol zmiešaný s 10 ml 60% roztoku etanolu, ktorý obsahoval 10% rybacej želatíny. Zmes bola 10 minút pretrepávaná na trepačke a následne bola zmes centrifugovaná 10 min pri 2 500g. Z centrifugačnej skúmavky bolo k analýze odobrané 20 $\mu$ l supernatantu, ktorý bol zriedený kitovým pufrom v pomere 1:50. K analýze bolo použitých 50  $\mu$ l takto pripraveného vzorku.

### **4.5.2 Stanovenie gliadínu ELISA kitom**

ELISA test sa uskutočňuje pomocou mikrotitračnej doštičky s jamkami, v ktorých je ukotvený antigén, v našom prípade gliadín.

Štandardy gliadínu (sú kalibrované na QQFP- peptidy) alebo roztok vzorku a značenej protilátky (anti-gliadín, monoklonálna R5- protilátka) sa pridávajú do jamiek v rovnakom čase a o objeme 50  $\mu$ l. Značené protilátky (enzýmový konjugát) sú naviazané na gliadín na doštičke, prolaminové peptidy v roztoku.

Počas 30 minútovej inkubácie sa vytvoria komplexy antigén-protilátka. V nasledujúcom kroku, ktorým je premývanie, sa prebytočný enzýmový konjugát z roztoku odstráni pomocou premývacieho činidla, a v jamkách zostane naviazaný konjugát. V ďalšom kroku sa do jamiek na doštičke pridá chromogénny substrát o objeme 100  $\mu$ l, ktorý spolu s konjugátom vytvorí modrý produkt. Tento proces prebieha 10 min v tme. Po uplynutí vopred stanoveného časového intervalu sa inkubácia zastaví pridaním stop roztoku o objeme 100  $\mu$ l, ktorý spôsobí zmenu modrej farby na žltú.

Výsledná intenzita sfarbenia sa meria spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 450 nm. Absorpcia je nepriamo úmerná koncentrácií prolaminových peptidov vo vzorku.

### **4.5.3 Výpočet a stanovenie**

Obsah gliadínu v pive v mg/l vypočíta software RIDA SOFT Win z pripravenej kalibračnej krivky.

## 5 Výsledky a diskusia

Táto práca bola zameraná na sledovanie lepkových bielkovín v biotechnologickom procese výroby piva, ktoré bolo vyrábané v laboratórnych podmienkach, v rámci diplomovej práce Bc. Lenky Burešovej. Bolo pripravené pivo jačmenné a pšeničné z mäkkej a tvrdej vody, z dôvodu sledovania vplyvu obsahu jednotlivých iónov v rôznych koncentráciách na chemické zloženie a stabilitu výsledného piva.

Obsah lepkových bielkovín stanovený v jednotlivých krokoch procesu výroby bol následne porovnávaný s komerčne zakúpenými českými pivami. Cieľom bolo predovšetkým zavedenie a optimalizácia metód pre stanovenie obsahu gliadínov a glutenínov vo vzorkách s nižšou koncentráciou týchto bielkovín. Pre analýzu obsahu lepkových bielkovín vo vzorkách laboratórne vyrábaného piva a zakúpených českých pív boli zvolené metódy elektroforetické a imunochemické. Kvantitatívne stanovenie zmeny obsahu gliadínu bolo sledované pomocou súpravy RIDASCREEN Gliadin Competitive ELISA. Pre sledovanie zmien v obsahu jednotlivých frakcií lepkových bielkovín boli použité metódy A- PAGE a SDS- PAGE. Gliadíny boli vyhodnocované metódou A- PAGE a gluteníny pomocou SDS- PAGE, pričom vzhľadom na toxicitu nízkomolekulárnych glutenínov bola sledovaná prevažne táto frakcia.

### 5.1 Elektroforéza

Bola praktikovaná A- PAGE a SDS- PAGE elektroforéza podľa postupu v kapitole 4.3 a 4.4. Do jamiek v elektroforetickom géle boli nadávkované vždy vzorky z výroby jedného piva, aby bolo možné porovnávať profily bielkovinových frakcií v rámci jednej výroby medzi sebou. Postup pre A-PAGE a SDS-PAGE bol optimalizovaný pre vzorky čistého pšeničného zrna a z tohoto dôvodu bola optimalizovaná extrakcia gliadínov a glutenínov, a taktiež množstvo dávkovaného vzorku.

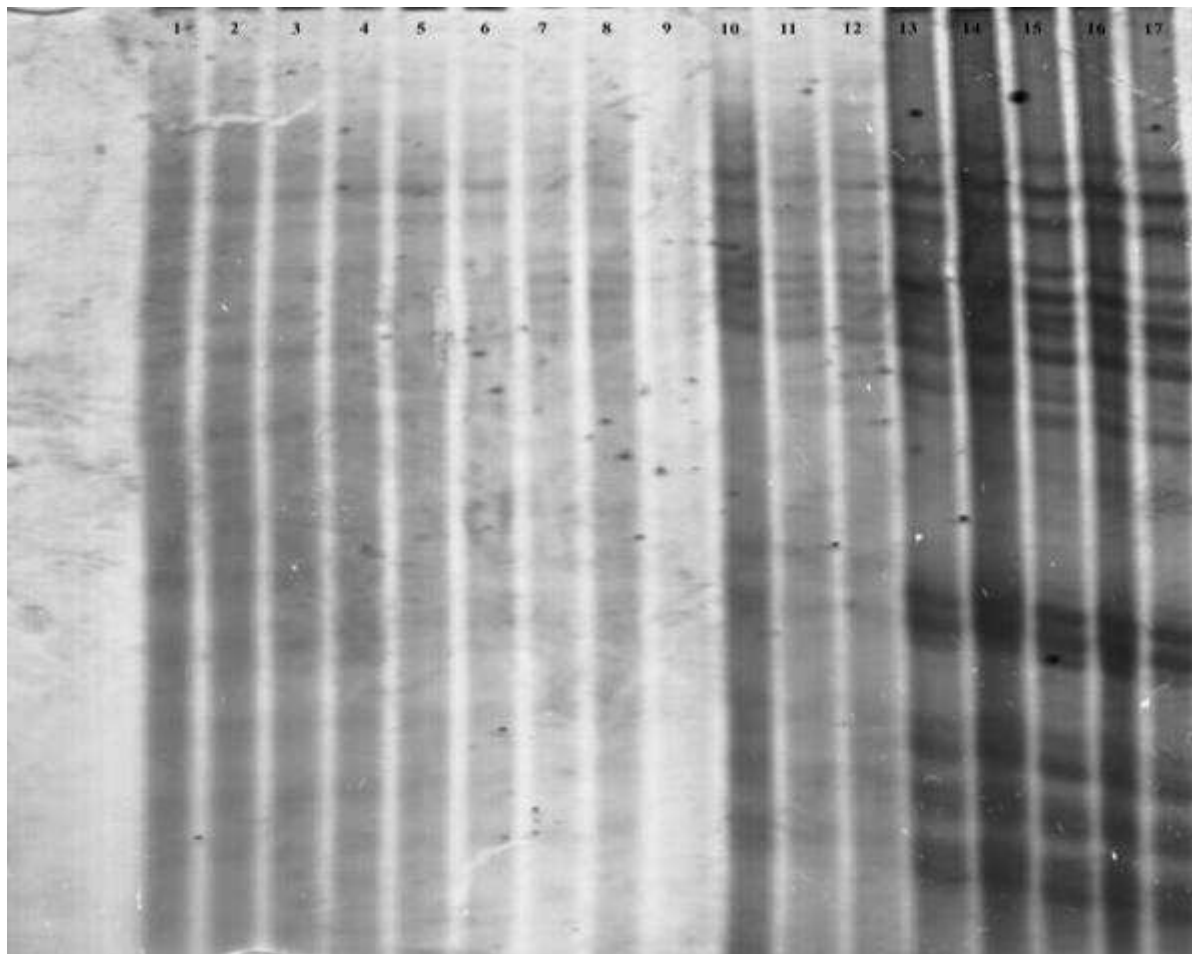
#### 5.1.1 Pšeničné pivo

V prvom rade bola pozornosť venovaná pšeničným pivám a ich analýzám, pretože obsahujú vyšší podiel lepkových bielkovín vzhľadom na vstupnú surovinu – pšenicu, vďaka čomu bola očakávaná lepšia vyhodnotiteľnosť výsledkov. Pšeničné pivo bolo vyrábané podľa postupu v kapitole 4.2.2.

##### 5.1.1.1 Pivo pripravené v laboratórnych podmienkach z mäkkej vody

Pripravené polyakrylamidové gély boli vložené do aparatury a bola spustená tzv. pre-elektroforéza po dobu 60 minút pri konštantnom napätí 480 V. Po uplynutí tejto doby boli do jamiek nadávkované vopred pripravené extrakty podľa postupu v kapitole 4.3.3 v troch opakovaníach. Elektroforéza bola následne znova zapnutá a prebiehala za rovnakých podmienok po dobu 4,5 hodiny. Po uplynutí tejto doby bol gél zbavený skiel a farbený do druhého dňa podľa postupu v kapitole 4.3.5. Po skončení farbenia bol gél omytý vodou, naskenovaný a vyhodnotený pomocou programu FUJIFILM, Science Lab 2006, ver.13.1.

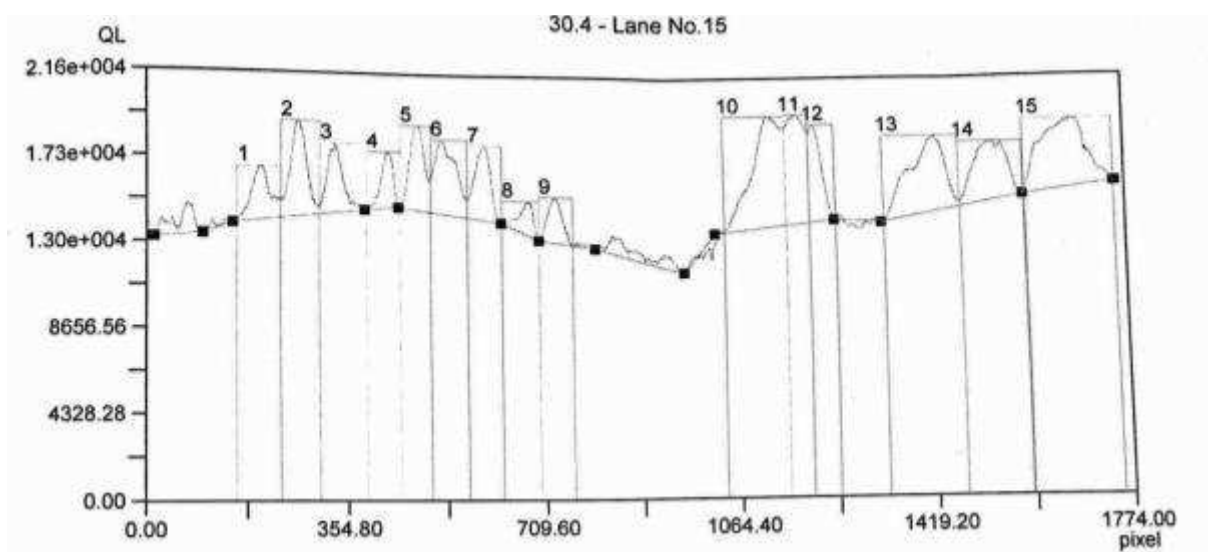
Z dôvodu lepšej rozlíšiteľnosti bola metóda extrakcie vzoriek optimalizovaná, a to rozpustením 50 mg sušiny v 0,3; 0,2 a 0,1 ml extrakčného činidla, z čoho najlepšou variantou bolo použitie 0,1 ml extrakčného činidla na 50 mg sušiny. Takisto bol upravený objem extraktu, ktorý sa dávkoval do jamiek polyakrylamidového gélu, z 10 na 15 $\mu$ l.



$\omega$ -1,2 1  
 $\omega$ -1,2 2  
 $\omega$ -1,2 3  
  
 $\omega$ -5 1  
 $\omega$ -5 2  
 $\omega$ -5 3  
 $\omega$ -5 4  
  
 $\gamma$  1,2  
 $\gamma$  3,4  
  
 $\beta$  1  
 $\beta$  2  
 $\beta$  3,4  
 $\alpha$  1  
 $\alpha$  2  
 $\alpha$  3

Obrázok 4: A-PAGE gliadinových proteínov z jednotlivých technologických krokov prípravy pšeničného piva vyrobeného za laboratórnych podmienok z mäkkej vody s popisom jednotlivých frakcií

Legenda: 17,16,15 – pšenica, 14,13,12 – pšenica s jačmeňom v pomere 60:40, 11,10,9 – sladina, 8,7,6 – mladina, 5,4,3 – mladé pivo, 2,1 – stabilizované pivo



Obrázok 5: Prevedenie gliadinových línií na píky v rámci A-PAGE pšeničného piva vareného z mäkkej vody (príklad na vzorke pšenice)

Tabulka 7: Plochy píkov jednotlivých frakcií gliadínov vzoriek z jednotlivých technologických krokov prípravy pšeničného piva vyrobeného z mäkkej vody

	pšenica	pšenica a jačmeň	sladina	mladina	mladé pivo	stabilizované pivo
$\alpha_3$	298 820,49	270 281,89	95 987,06	-	-	-
$\alpha_2$	238 877,51	443 034,55	108 595,93	-	-	-
$\alpha_1$	241 656,79	335 058,44	182 015,93	-	-	-
$\beta_{3,4}$	278 534,70	535 905,59	244 880,91	184 894,34	75 109,25	30 252,69
$\beta_2$	524 992,20	343 343,28	252 436,64	105 867,80	90 952,23	45 118,80
$\beta_1$	207 313,46	385 088,71	294 504,25	126 697,85	62 451,64	100 118,80
$\gamma_{3,4}$	89 588,41	329 379,10	148 119,90	70 102,64	-	46 912,97
$\gamma_{1,2}$	89 588,41	449 919,02	121 670,72	56 864,88	-	-
$\omega-5\ 4$	146 877,22	88 104,43	88 483,59	87 492,41	8 187,30	-
$\omega-5\ 3$	200 618,08	111 291,18	109 260,54	106 008,79	19 011,34	-
$\omega-5\ 2$	110 912,68	117 479,73	76 721,25	51 413,10	21 035,72	-
$\omega-5\ 1$	98 288,48	106 578,02	85 869,52	77 387,20	18 996,52	-
$\omega-1,2\ 3$	177 529,16	69 446,89	52 299,5	48 918,61	55 299,99	80 640,43
$\omega-1,2\ 2$	177 629,57	82 805,29	68 797,63	62 641,21	33 715,46	147 784,37
$\omega-1,2\ 1$	115 347,23	59 475,23	41 543,21	21 226,41	5 122,53	48 780,73
suma	2 996 574,38	3 727 191,35	1 877 343,87	999515,24	389881,98	407577,02
Suma [%]	80,42	100	50,37	26,82	10,46	10,72

Na Obrázok 4 sú viditeľné gliadínové profily pšeničného piva, ktoré boli vyrábané z mäkkej vody za laboratórnych podmienok. Následne boli línie jednotlivých frakcií gliadínov prevedené na píky pomocou špeciálneho programu, príklad prevedenia je uvedený na Obrázok 5 a v Tabulka 7 sú zoradené plochy píkov jednotlivých frakcií. Bola prevedená suma všetkých plôch píkov v rámci jedného odberu z výrobného procesu a percentuálne vyjadrenie vzhľadom na zmes pšenice s jačmeňom, ktorá bola použitá na výrobu pšeničného piva.

So znižujúcou sa koncentráciou gliadínov z Obrázok 4 je vidieť, že rozlíšiteľnosť klesá, ale aj napriek tomu je množstvo gliadínov dostatočné k vyhodnoteniu. Na základe Tabulka 7 je možné usudzovať pokles množstva gliadínov vo výrobnom procese, kedy pri príprave sladiny klesol obsah oproti obsahu vo vstupnej surovine o 49,63 %. Vzhľadom na to, že bola vstupná surovina zriedená zmiešaním 2 kg sladu v 10 l vody, vyplýva, že obsah gliadínov prešiel zo zrna do roztoku približne s 50 % účinnosťou. Po chmeľovare, čiže výrobe mladiny, množstvo gliadínov kleslo o ďalších 23,48 %, z čoho vyplýva že tento proces vplýva na gliadíny pri procese výroby piva významne. Po kvasení mladiny došlo k poklesu gliadínov na 10,46 %. U stabilizovaného piva, ktoré bolo analyzované po 25 dňoch od stočenia, bola výsledná suma plôch píkov o málo vyššia ako v predchádzajúcom kroku (o 0,26%), čo môže byť spôsobené chybou analýzy, kontamináciou alebo je to len znakom toho, že dokvášanie nemá významný vplyv na degradáciu lepkových bielkovín.

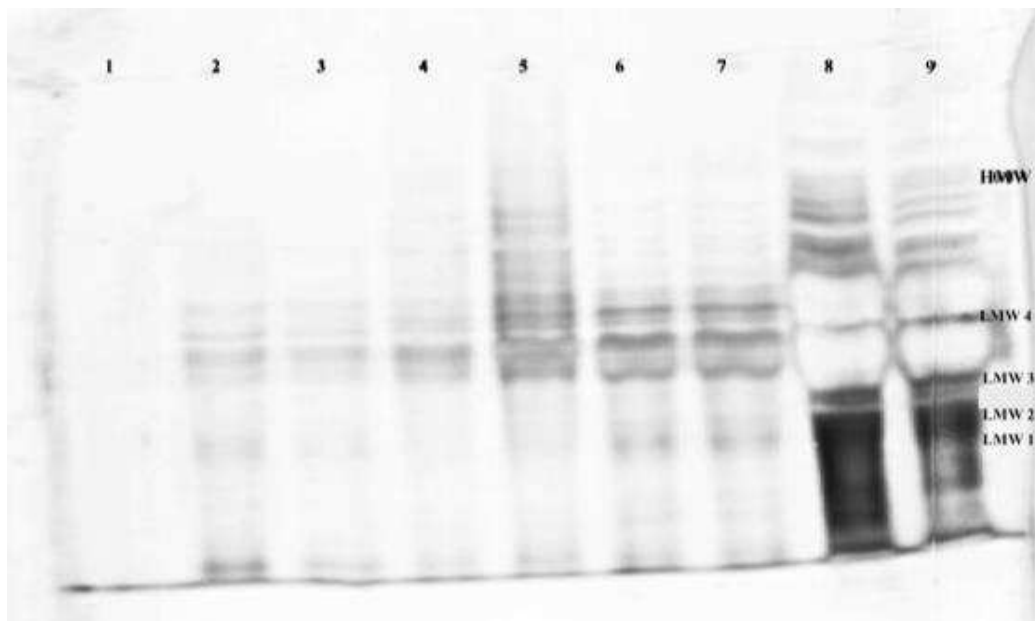
Po zatuhnutí, očistení a zavedení polyakrylamidových gélov s dodecylsulfátom sodným (SDS) do aparatury boli do jamiek v géle nadávkované vzorky, a bola spustená elektroforéza. Bolo potrebné ponechať prvých 10 minút elektroforézu prebiehať pri 50 V, z dôvodu zabránenia prehriatia sa elektrodového pufu, a potom po dobu 100 – 120 minút pri 100 V. Po prebehnutí daného času, boli polyakrylamidové gély uvoľnené od skiel do destilovanej vody a farbené pomocou Commassie blue podľa kapitoly 4.4.5.1 a zároveň farbené pomocou

striebra podľa kapitoly 4.4.5.2. Ako u A-PAGE boli po dofarbení gély naskenované a vyhodnotené špeciálnym programom.

Pri vyhodnocovaní elektroforetických gélov po SDS-PAGE bolo pre nedostatočnú rozlíšiteľnosť jednotlivých frakcií nutné optimalizovať použitú techniku. Optimalizovaný bol hlavne proces farbenia s použitím Commassie blue, u ktorého i po optimalizácii extrakcie jednotlivých testovaných vzoriek nebolo možno jasne rozlíšiť jednotlivé frakcie. Z tohoto dôvodu bolo ďalej optimalizované farbenie striebrom. Porovnanie citlivostí medzi jednotlivými druhmi farbenia je zobrazený na Obrázok 6. Na základe týchto vedomostí bolo pre vyhodnotenie použité len farbenie pomocou striebra.

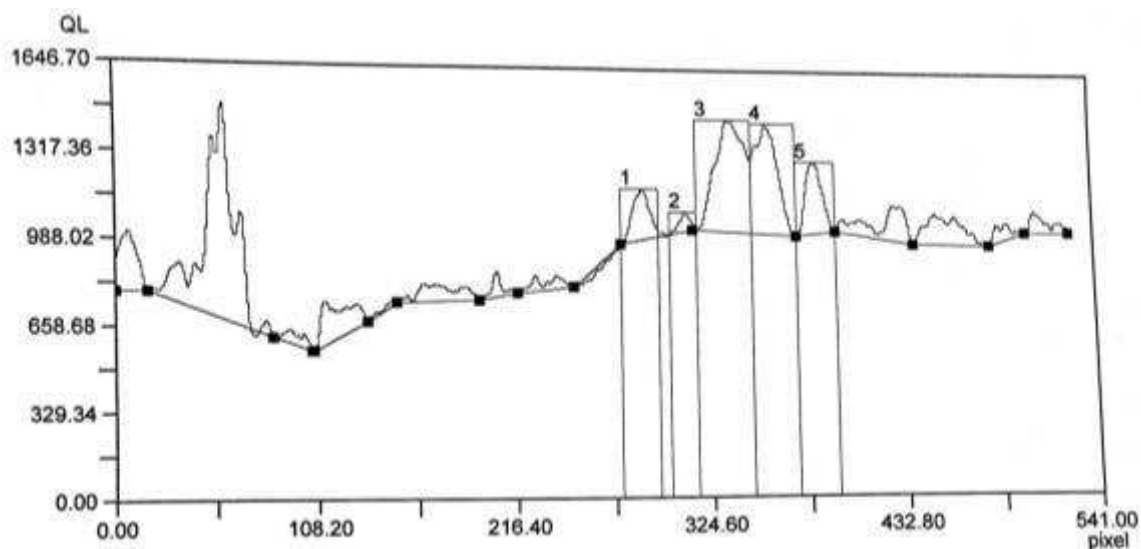


Obrázok 6: Porovnanie výsledkov farbenia striebrom (v ľavo) a Commassie blue (vpravo) vzoriek pšeničného piva



Obrázok 7: SDS – PAGE gluteninových proteínov z jednotlivých technologických krokov prípravy pšeničného piva vyrobeného za laboratórnych podmienok z mäkkej vody s popisom jednotlivých frakcií, farbeného pomocou striebra,

Legenda: 10 – pšenica, 9 – pšenica s jačmeňom, 8 – sladina, 7 – sladina, 6 – mladina, 5 – mladina, 4 – mladé pivo, 3 – mladé pivo, 2 – stabilizované pivo, 1 – stabilizované pivo



Obrázok 8: Prevedenie línií na píky v rámci SDS – PAGE gluteninových proteínov pšeničného piva z mäkkej vody pomocou farbenia striebrom (príklad na vzorke pšenice)

Tabuľka 8: Plochy píkov nízkomolekulárnych glutenínov –zo vzoriek piva vyrobeného z mäkkej vody

Vzorka	LMW 1	LMW 2	LMW 3	LMW 4	suma	suma [%]
pšenica	-	92 688,91	127 779,64	68 188,85	288657,4	55,67
pšenica v kombinácii s jačmeňom 60:40	-	175 148,55	145 282,21	198 050,18	518480,94	100
sladina	53 412,23	97 003,695	97 511,505	82 724,83	330652,26	63,77
mladina	-	90 821,39	75 405,04	58 329,68	224556,11	43,31
mladé pivo	20 748,995	49 621,83	10 528,81	7 691,31	67841,95	13,08
stabilizované pivo	-	2 156,75	11 602,24	1 073,64	14832,63	2,86

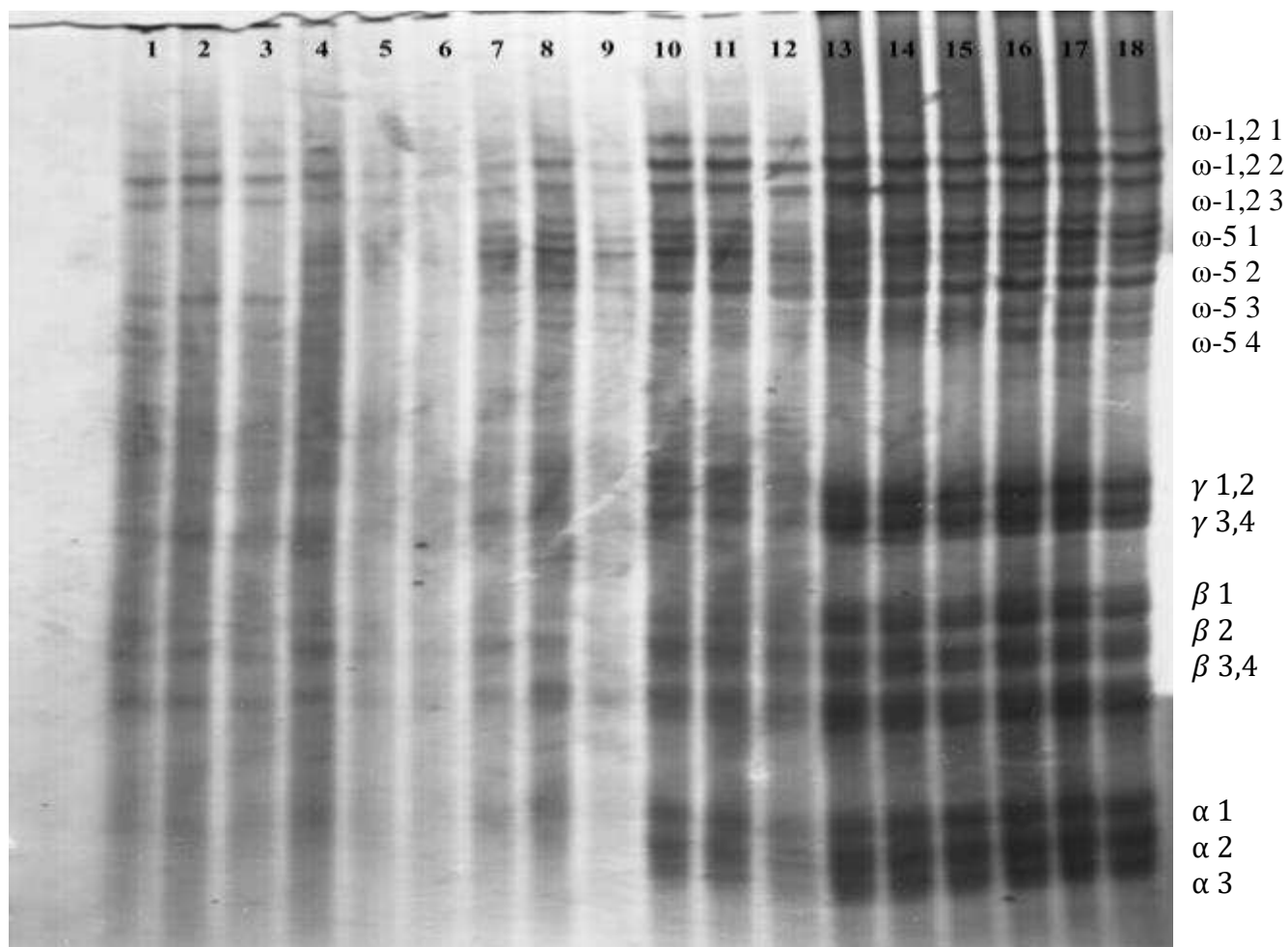
Sledované gluteníny s nižšou molekulovou hmotnosťou boli prítomné v 4 frakciách, zobrazených na

Obrázok 7. Na Obrázok 8 je príklad prevedenia gluteninových frakcií z polyakrylamidového gélu na plochy píkov, ktorých hodnoty sú k nahliadnutiu v Tabuľka 8. Ako v predchádzajúcom prípade boli jednotlivé plochy píkov z frakcií spočítané pre celkový prehľad obsahu glutenínov s nižšou molekulovou hmotnosťou, pričom ako 100% zdroj glutenínov bola použitá vzorka zmesi pšenice a jačmeňa 60:40.

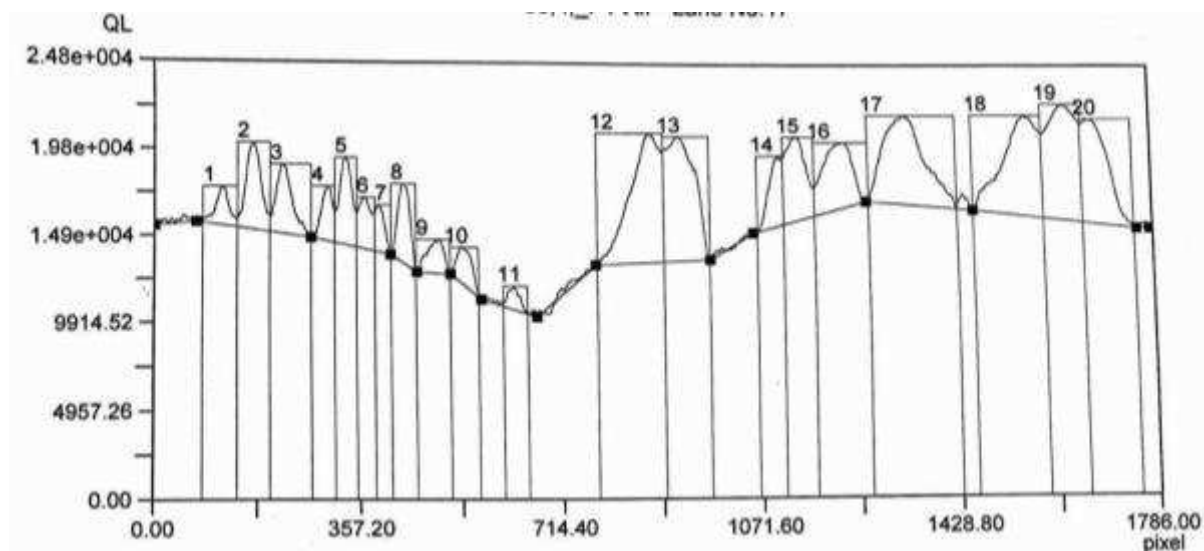
Pri príprave pšeničného piva z mäkkej vody nastal najväčší pokles obsahu glutenínov pri rmutovaní, a to o 36,23 %, po chmeľovare bol zaznamenaný rozdiel o ďalších 20,46 %. Druhou fázou výroby piva, ktorá najviac ovplyvňuje množstvo glutenínov s nízkou molekulovou hmotnosťou je kvasenie, pri ktorom klesol obsah na 13,08 %. Poslednou fázou je stabilizácia, ktorá spôsobila, ďalší pokles a to o cca 10 %.

#### 5.1.1.2 Príprava piva s použitím tvrdej vody

Ďalej bol v práci stanovovaný profil gliadínov a nízkomolekulárnych glutenínov pšeničného piva pripravovaného z tvrdej vody. Rovnako ako u mäkkej vody boli prevedené elektroforézy A- PAGE a SDS- PAGE podľa kapitol 4.3 a 4.4.



Obrázok 9: A - PAGE gliadínových proteínov z jednotlivých technologických krokov prípravy pšeničného piva vyrobeného za laboratórnych podmienok z tvrdej vody  
 Legenda: 18,17,16 – pšenica, 15,14,13 – pšenica s jačmeňom v kombinácií 60:40, 12,11,10 – sladina, 9,8,7 – mladina, 6,5,4 – mladé pivo, 3,2,1 – stabilizované pivo



Obrázok 10: Prevedenie línií na píky v rámci A – PAGE gliadínových proteínov pšeničného piva z tvrdej vody (príklad vzorky pšenice)

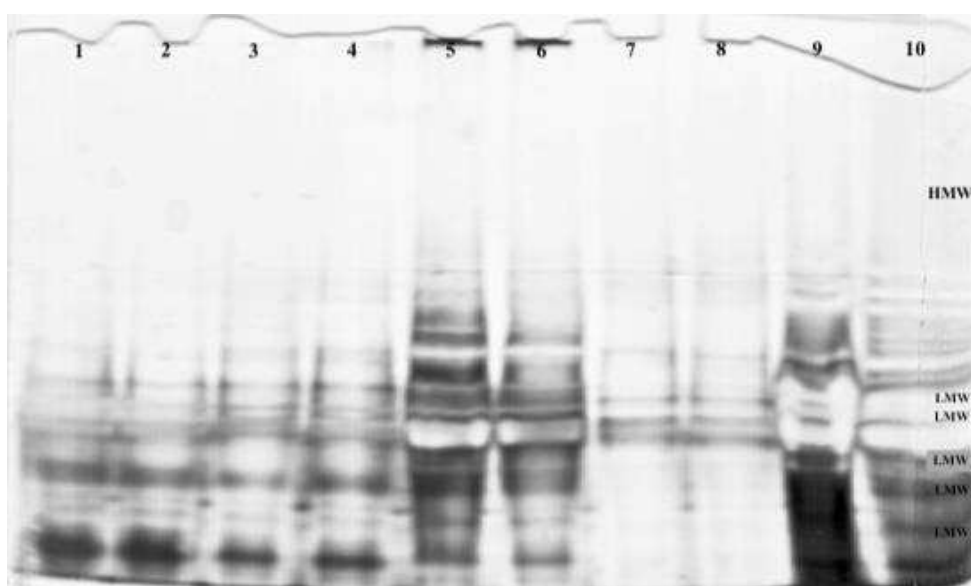


Tabuľka 9: Plochy píkov jednotlivých frakcií gliadínov vzoriek pšeničného piva pripraveného z tvrdej vody

	pšenica	pšenica a jačmeň	sladina	mladina	mladé pivo	stabilizované pivo
$\alpha 3$	323 068,33	270 281,89	165 987,06	-	-	-
$\alpha 2$	404 569,22	443 034,55	208 595,93	-	-	-
$\alpha 1$	387 163,36	335 058,44	322 015,93	-	-	-
$\beta 3,4$	468 871,88	535 905,59	344 880,91	184 894,34	75 109,25	30 252,69
$\beta 2$	267 266,28	343 343,28	252 436,64	105 867,80	90 952,23	85 056,31
$\beta 1$	259 841,86	385 088,71	294 504,25	126 697,85	62 451,64	100 118,80
$\gamma 3,4$	319 289,17	329 379,10	148 119,90	83 799,75	-	-
$\gamma 1,2$	319 289,17	449 919,02	121 670,72	88 790,19	-	-
$\omega$ -5 4	56 231,02	189 553,53	110 483,59	52 697,15	8 187,30	-
$\omega$ -5 3	99 588,63	144 401,37	139 260,54	62 122,07	19 011,34	-
$\omega$ -5 2	137 361,74	128 847,02	106 721,25	77 333,72	21 035,72	-
$\omega$ -5 1	81 150,72	122 600,46	85 869,52	33 507,51	18 996,52	-
$\omega$ -1,2 3	134 371,61	106 320,93	92 299,50	56 133,58	55 299,99	80 640,43
$\omega$ -1,2 2	100 036,31	147 314,63	108 797,63	62 591,11	33 715,46	14 784,37
$\omega$ -1,2 1	57 766,45	87 843,03	66 543,21	19 695,12	5 122,53	4 780,73
Suma	3 415 865,75	4 018 891,55	2 568 186,58	954130,19	389881,98	315633,33
Suma [%]	85	100	63,90	23,74	9,7	7,85

Na Obrázok 9 je vyobrazený elektroforetický akrylamidový gél po A- PAGE elektroforéze pšeničného pív pripravovaného z tvrdej vody. Na Obrázok 10 sú prevedené jednotlivé frakcie na píky, z ktorých plôch je vytvorená (príklad vzorky pšenice)

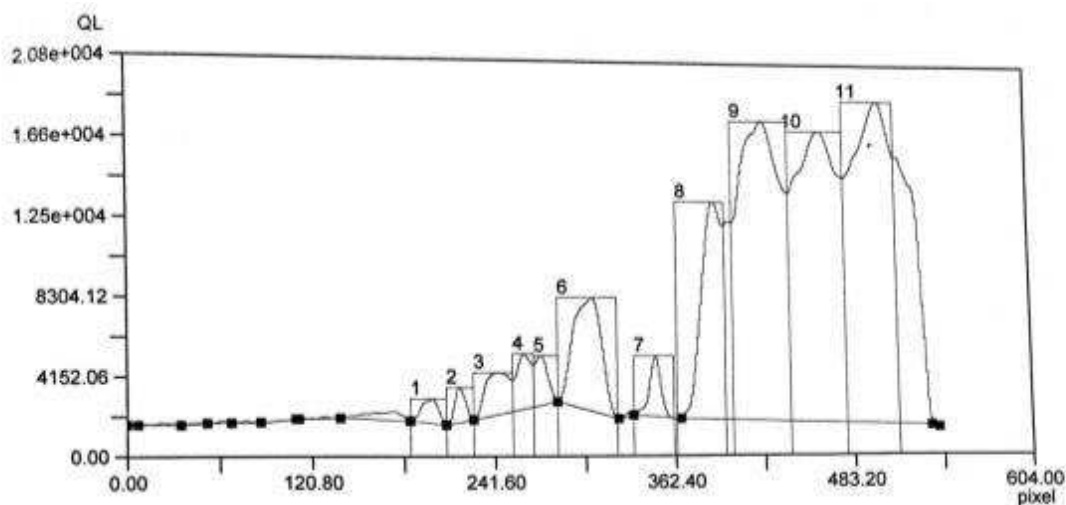
Tabuľka 9. Z tejto tabuľky je možné vyvodit', že znova k poklesu gliadínov došlo pri rmutovaní (63,90 %), výrobe mladiny (23,74 %), pri kvasení (9,70 %) a pri stabilizovaní (7,85 %), pričom k najvýznamnejším poklesom došlo pri rmutovaní a kvasení.



Obrázok 11: SDS – PAGE gluteniových proteínov z jednotlivých technologických krokov prípravy pšeničného piva vyrobeného za laboratórnych podmienok z tvrdej vody s popisom frakcií, farbeného

pomocou striebra

Legenda: 10 – pšenica, 9 – pšenica s jačmeňom v kombinácii 60:40, 8,7 – sladina, 6,5 – mladina, 4,3 – mladé pivo, 2,1 – stabilizované pivo



Obrázok 12: Prevedenie línií na píky v rámci SDS – PAGE gluteninových proteínov pšeničného piva z tvrdej vody farbeného pomocou striebra (príklad vzorky pšenice)

Tabuľka 10: Plochy píkov nízkomolekulárnych gluteninových frakcií zo vzoriek pšeničného piva vyrobeného z tvrdej vody

Vzorka	LMW 1	LMW 2	LMW 3	LMW 4	LMW 5	Suma	Suma [%]
pšenica	9648,15	231 523,73	120 812,45	189 581,54	207 602,23	759 168,10	104,04
pšenica v kombinácii s jačmeňom 60:40	9016,86	26506,94	203812,58	247 551,84	242 767,84	729656,06	100
sladina	66300,45	35374,59	28866,98	149442,215	167417,16	447401,395	61,32
mladina	128292,73	90 821,39	0,00	108 725,82	98 436,64	426 276,58	58,42
mladé pivo	19615,94	6 456,35	7 691,31	3 948,76	129 743,64	167 456,00	22,95
stabilizované pivo	25470,99	5 895,22	7 184,97	5 814,00	4 079,48	48 444,66	6,64

Na

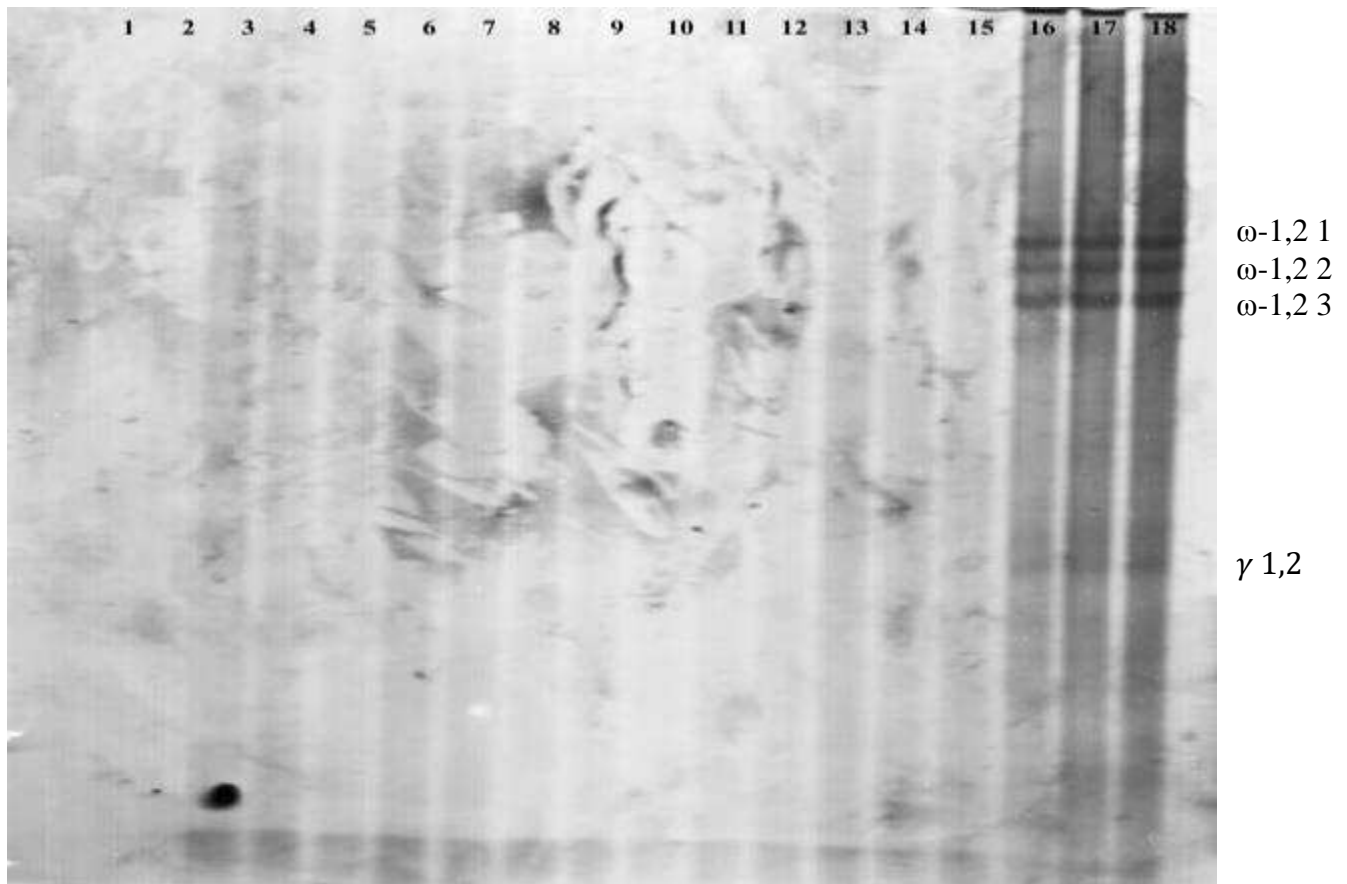
Obrázok 11 je vyobrazený gél po SDS- PAGE elektroforéze, po ktorej bol farbený striebrom. Po prevedení profilu na píky (Obrázok 12) boli zistené plochy píkov prevedené do tabuľky Tabuľka 10. Sledované gluteníny s nižšou molekulovou hmotnosťou boli v tomto prípade zaznamenané v 5 frakciách. Výrazný pokles množstva bol zaznamenaný pri vysladzovaní (pokles o 38,68 % oproti vstupnej surovine), po chmeľovare (pokles o 41,58 % oproti vstupnej surovine) a po kvasení (o 77,05 % oproti vstupnej surovine).

### 5.1.2 Jačmenné pivo

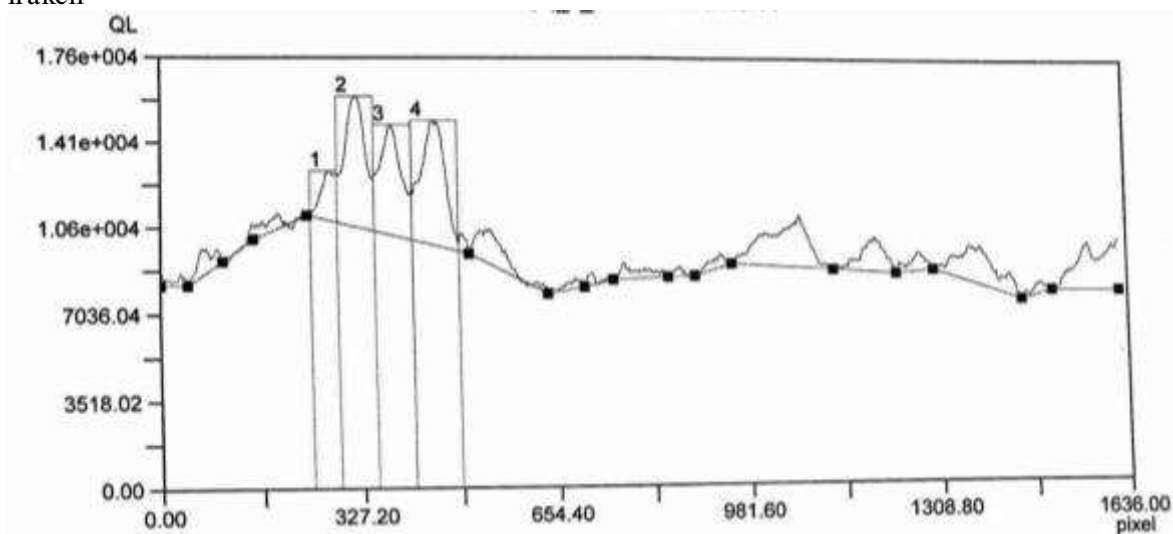
V laboratórnych podmienkach bolo pripravené obdobne ako pšeničné aj jačmenné pivo podľa postupu v kapitole 4.2.1. Jačmeň obsahuje na rozdiel od pšenice menej lepkových bielkovín (pšenica 32,6 %, jačmeň 25,0 %), preto boli predpokladané komplikácie so stanovením a bola potrebná ďalšia optimalizácia.

### 5.1.2.1 Jačmenné pivo vyrobené z mäkkej vody

Na elektroforetické gély boli nadávkované vzorky z výroby jačmenného piva, a boli podrobené elektroforéze A- PAGE a SDS-PAGE podľa rovnakého postupu ako u predošlých stanovení (kapitola 4.3 a 4.4). V prvom kroku boli použité vzorky z výroby jačmenného piva, ktoré sa pripravovalo z mäkkej vody.

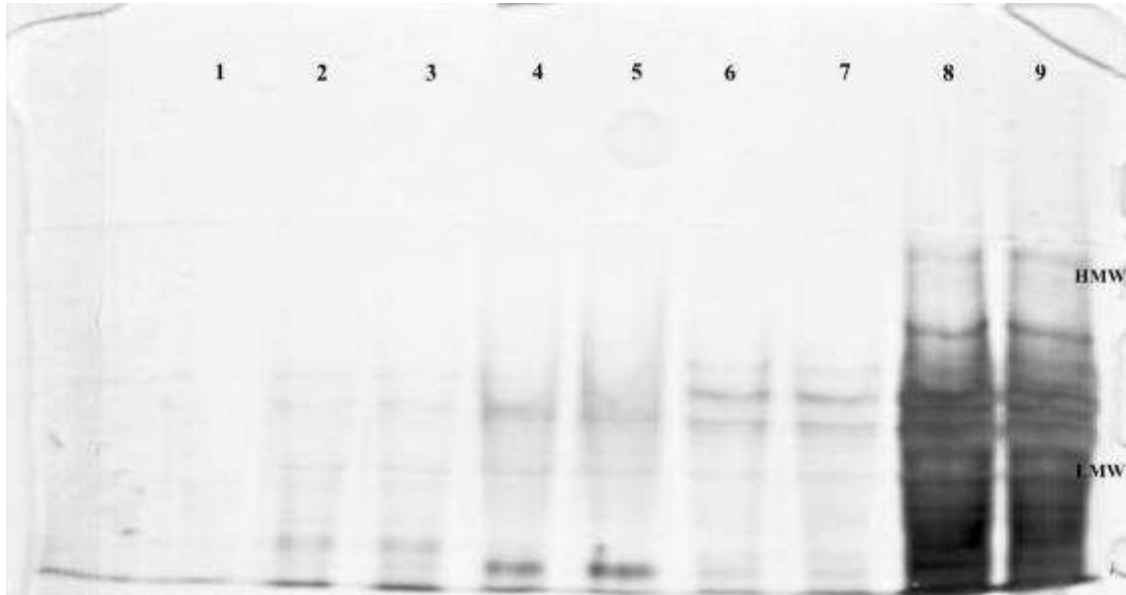


Obrázok 13: A-PAGE gliadinových bielkovín z jednotlivých technologických krokov prípravy jačmenného piva vyrobeného za laboratórnych podmienok z mäkkej vody s popisom jednotlivých frakcií



Obrázok 14: Prevedenie línií gliadinových frakcií v rámci A-PAGE z jačmenného piva z mäkkej vody (príklad vzorka jačmeňa)

Na Obrázok 13 je zobrazený gél po A-PAGE elektroforéze jačmenného piva vyrobeného z mäkkej vody. Aj napriek snahám optimalizovať metódu dostatočne, aby viedla k hodnotiteľným výsledkom, bolo možné identifikovať iba niekoľko frakcií gliadínov u jačmeňa. Optimalizácia bola prevedená na extrakcii vzoriek. Lyofilizáty boli extrahované v rôznych navážkach (50 – 100 mg) do rôznych objemov extrakčného činidla (0,3 – 0,1 ml). Zároveň bol študovaný vplyv množstva nadávkovaného extraktu do jamiek v polyakrylamidovom géle. Z tohoto dôvodu sa nepodarilo vyhodnotiť línie gliadínových frakcií.



Obrázok 15: SDS – PAGE gluteninových proteínov z jednotlivých technologických krokov prípravy jačmenného piva vyrobeného za laboratórnych podmienok z mäkkej vody s popisom jednotlivých frakcií, farbeného pomocou striebra

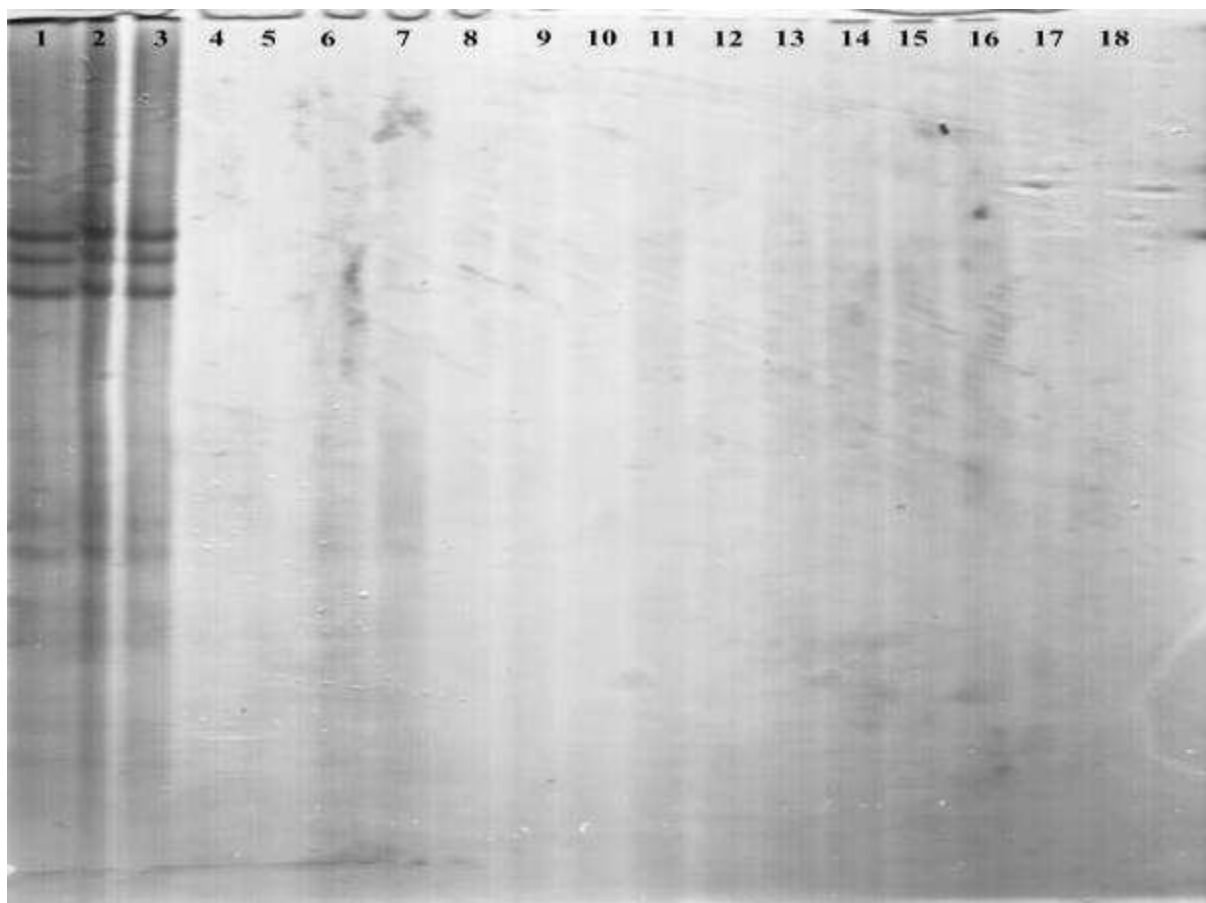
Legenda: 10,9 – jačmeň, 8,7 – sladina, 6,5 – mladina, 4,3 – mladé pivo, 2,1 – stabilizované pivo

Na Obrázok 15 sú zobrazené glutenínové profily jačmenného piva vyrobeného z mäkkej vody. Aj napriek optimalizácií a použitiu špecifickejšieho a citlivejšieho farbenia, nebolo možné vyhodnotiť množstvo obsiahnuté v jednotlivých frakciách.

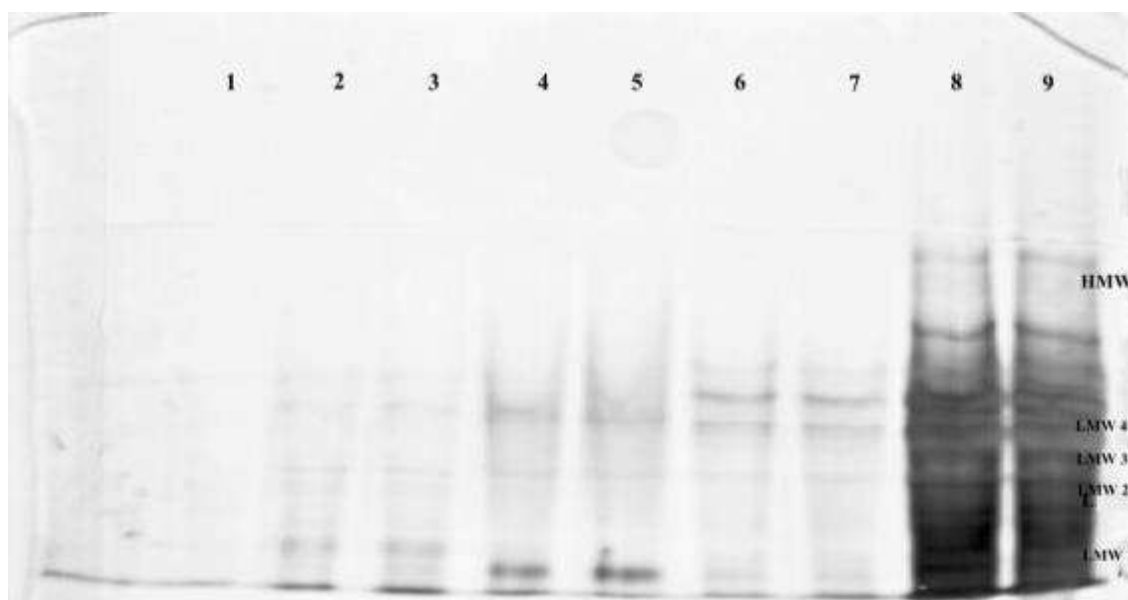
### 5.1.2.2 Jačmenné pivo pripravené z tvrdej vody

Obdobne ako u mäkkej vody boli do jamiek v polyakrylamidovom géle nadávkované vzorky z výroby jačmenného piva, v tomto prípade vyrobeného z tvrdej vody.

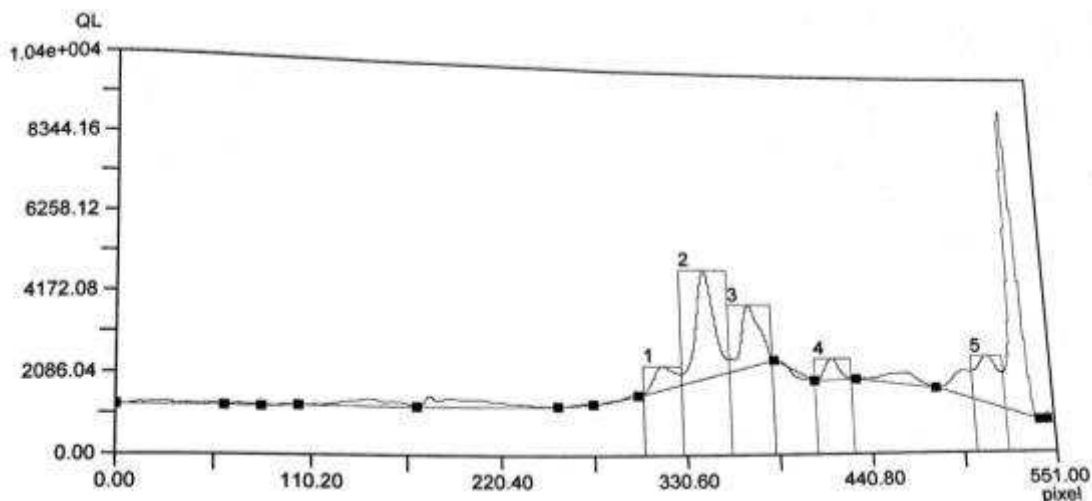
Na Obrázok 15 je zobrazený elektroforetický gél po A-PAGE elektroforéze jačmenného piva vyrobeného z tvrdej vody. Na prvý pohľad je jasné, že jačmenné zrno je ťažko rozpoznateľné a vzorky s nižšou koncentráciou nie sú viditeľné.



Obrázok 16: A – PAGE gliadínových proteínov z jednotlivých technologických krokov prípravy jačmenného piva vyrobeného za laboratórnych podmienok z tvrdej vody  
 Legenda: 1,2,3 – jačmeň, 4,5,6 – sladina, 7,8,9 – mladina, 10,11,12 – mladé pivo, 13,14,15 – stabilizované pivo



Obrázok 17: SDS – PAGE glutenínových proteínov z jednotlivých technologických krokov prípravy jačmenného piva vyrobeného za laboratórnych podmienok z tvrdej vody s popisom jednotlivých frakcií, farbeného pomocou striebra  
 Legenda: 9,8 – jačmeň, 7,6 – sladina, 5,4 – mladina, 3,2 – mladé pivo, 1 – stabilizované pivo



Obrázok 18: Prevedenie línií na píky v rámci SDS – PAGE gluteninových proteínov jačmenného piva z tvrdej vody (príklad vzorky jačmeňa)

Tabuľka 11: Plochy píkov nízkomolekulárnych gluteninových frakcií zo vzoriek jačmenného piva vyrobeného z tvrdej vody

Vzorka	LMW 1	LMW 2	LMW 3	LMW 4	Suma	Suma [%]
jačmeň	-	29 414,55	31 750,56	47 808,40	108973,51	100
sladina	22 130,185	5 015,51	19 160,595	25 156,92	71463,21	65,58
mladina	11 002,43	5 919,72	17 403,56	21 066,75	44390,03	40,73
mladé pivo	10 318,575	3 967,87	5 220,45	5 220,46	14408,78	13,22
stabilizované pivo	-	-	-	-	-	-

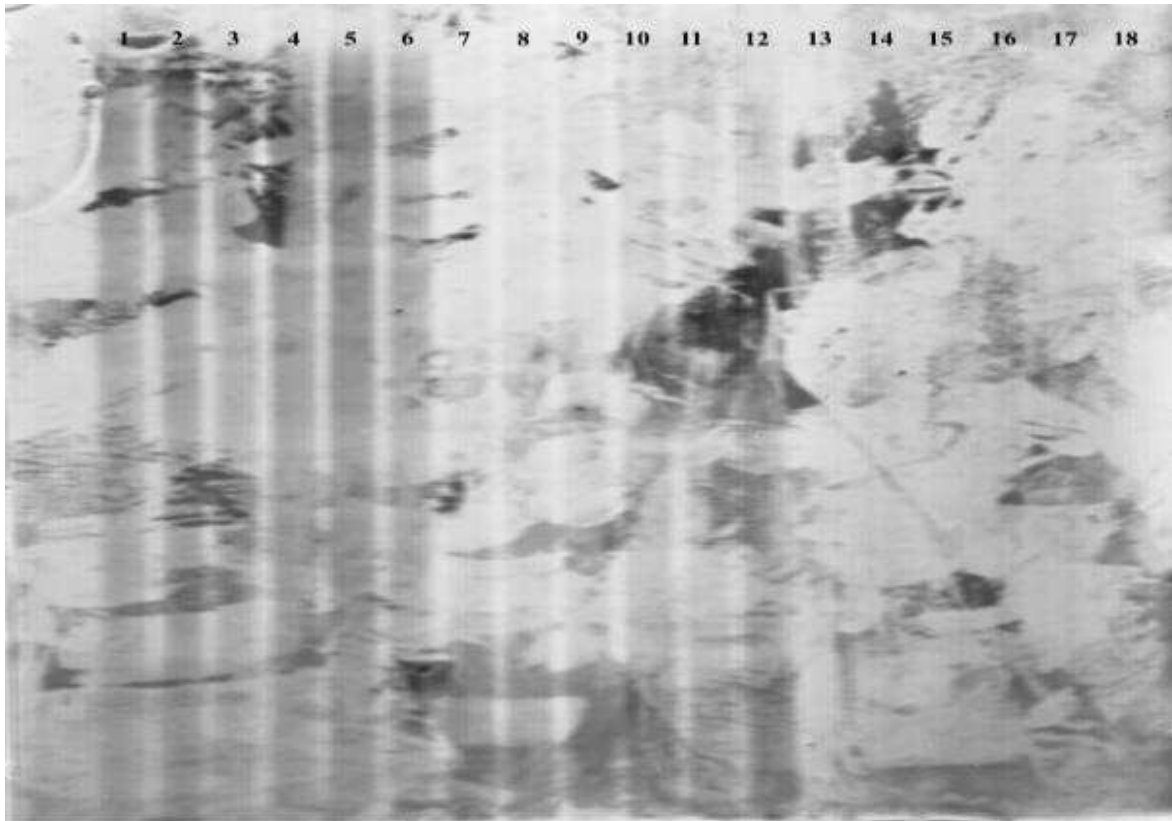
Gél po SDS-PAGE elektroforéze s obsahom vzoriek jačmenného piva vyrobeného z tvrdej vody je na Obrázok 17. Vzorky z výrobného procesu boli nadávkované v opakovaní po dvoch. Glutenínový profil nízkomolekulárnych glutenínov bol prevedený na píky (Obrázok 18). Plochy píkov boli následne prevedené do Tabuľka 11. Sledované gluteníny s nižšou molekulovou hmotnosťou boli v tomto prípade detekované a vyhodnotené aj u jačmenného piva. Vzhľadom na to, že ako 100 % zdroj glutenínov s nižšou molekulovou hmotnosťou bolo brané zrna jačmeňa, tak sa pri vysladzovaní množstvo glutenínov znížilo o 34,42 % obsahu, pri výrobe mladiny klesol znova o 24,85 % a po kvasení predstavovali gluteníny s nižšou molekulovou hmotnosťou 13,22 % oproti pôvodnému množstvu. U stabilizovaného piva nebolo možné rozlíšiť jednotlivé línie, a tým ani určiť množstvo a pokles obsahu týchto bielkovín.

### 5.1.3 Komerčné piva

V neposlednom rade boli porovnávané obsahy lepkových bielkovín v troch komerčných českých pivách: Bernard (svetlý ležiak 12°), Bernard bezlepkový(svetlý ležiak), Herold (pšeničný svetlý ležiak 12°). Vzorky boli analyzované rovnakým spôsobom a to podľa kapitoly 4.3 a 4.4.

Pre kyslú elektroforézu vzoriek komerčných pív boli do jamiek v géle nadávkované vzorky v objeme 15 µl v poradí svetlý ležiak bezlepkový extrahovaný z 300 mg lyofilizátu trikrát, svetlý ležiak bezlepkový extrahovaný zo 400 mg lyofilizátu trikrát, svetlý ležiak z 300 mg

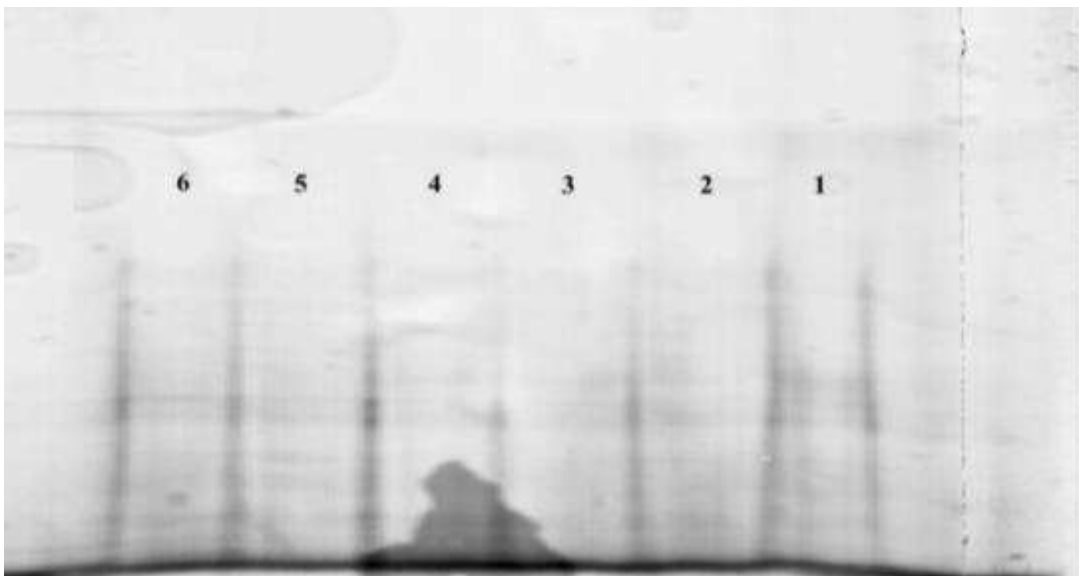
sušiny trikrát, svetlý ležiak zo 400 mg sušiny trikrát, pšeničný svetlý ležiak z 300 mg sušiny trikrát a pšeničný svetlý ležiak zo 400 mg sušiny tiež trikrát, ako je vidieť na Obrázok 19.



Obrázok 19: A-PAGE komerčne zakúpených pív typu svetlý ležiak

Legenda: 1,2,3 – svetlý ležiak bezlepkový extrahovaný z 300 mg sušiny, 4,5,6 – svetlý ležiak bezlepkový extrahovaný zo 400 mg sušiny, 7,8,9 – svetlý ležiak z 300 mg sušiny, 10,11,12 – svetlý ležiak zo 400 mg sušiny, 13,14,15 – pšeničný svetlý ležiak z 300 mg sušiny, 16,17,18 – pšeničný svetlý ležiak zo 400 mg sušiny

Z Obrázok 19 je jasné, že aj po skoncentrovaní vzoriek maximálnym spôsobom nie je možné rozlíšiť jednotlivé frakcie glutenínov.



Obrázok 20: SDS-PAGE komerčne zakúpených pív typu svetlý ležiak

Legenda: 1 – svetlý ležiak bezlepkový extrahovaný z 300 mg sušiny, 2 – svetlý ležiak bezlepkový extrahovaný zo 400 mg sušiny, 3 – svetlý ležiak z 300 mg sušiny, 4 – svetlý ležiak zo 400 mg sušiny, 5 – pšeničný svetlý ležiak z 300 mg sušiny, 6 – pšeničný svetlý ležiak zo 400 mg sušiny

Na Obrázok 20 je výsledný polyakrylamidový gél po SDS elektroforéze. Tak ako gél po kyslej elektroforéze ho nie je možné vyhodnotiť.

Vysvetlením môže byť, že koncentrácia je nedostatočná, aby mohla byť rozdelená touto metódou.

## 5.2 ELISA

Ďalším krokom bolo podrobenie vzoriek z vyrobených jačmenných, pšeničných pív a komerčne zakúpených pív ELISA analýze, podľa postupu v kapitole 4.5. Touto metódou bola kvantitatívne stanovená koncentrácia gliadínov/hordeínov v predložených vzorkách. Pre analýzu bola použitá súprava RIDASCREEN Gliadin Competitive, čiže nepriama kompetitívna imunoanalýza, pri ktorej monoklonálna protilátka detekuje frakcie gliadínu.

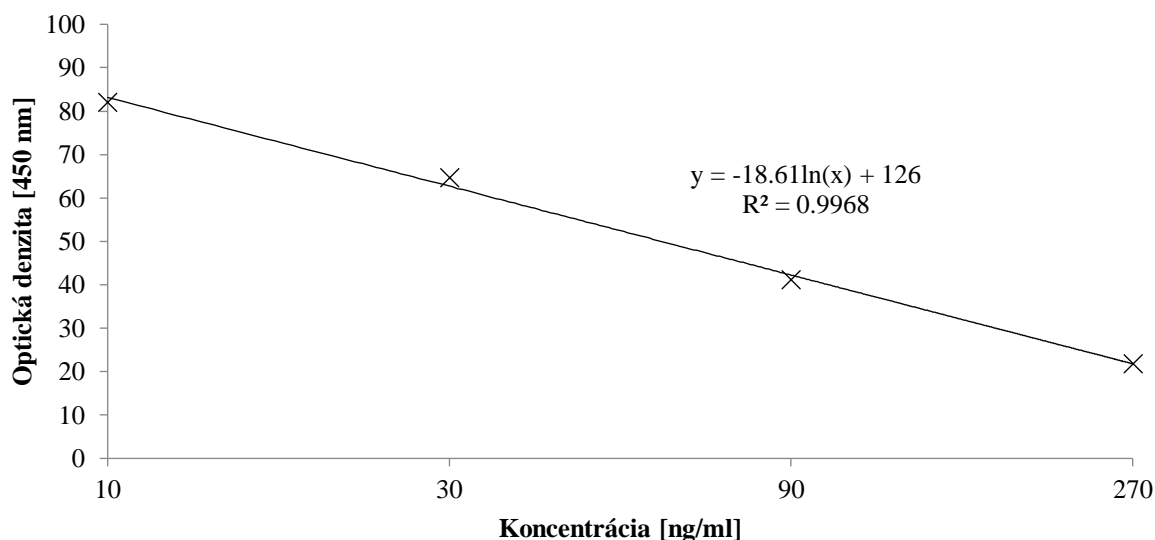
Na mikrotitračnú doštičku boli nadávkované štandardy a extrakty pripravené podľa postupu v kapitole 4.5.1 v objeme 50 µl dvojito. V rovnakom množstve bol jamiiek pridaný zriedený konjugát protilátky a enzýmu a po opatrnom pretrepaní bola zmes inkubovaná 30 minút pri laboratórnej teplote. Po uplynutí doby bola mikrotitračná doštička premytá, bol pridaný chromogén v objeme 100 µl do každej jamky a znova sa zmes inkubovala pri laboratórnej teplote v tme po dobu 10 minút. PO uplynutí aj tejto doby inkubácie bol pridaný stop roztok v množstve 100 µl a do 10 minút bola farebná zmena meraná na prístroji ELISA reader pri vlnovej dĺžke 450 nm. Výsledkom merania bola tabuľka absorbancií ako v Tabuľka 12

Tabuľka 12: Absorbancie jednotlivých vzoriek v jamkách v mikrotitračnej doštičke namerané pomocou prístroja ELISA reader

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	2,624	0,76	2,451	0,056	2,389	1,59	0,193	1,769	9,757	12,699	1,42	0,034
<b>B</b>	2,134	2,065	2,562	0,056	2,908	1,6	0,246	0,174	9,608	0,49	1,671	0,035
<b>C</b>	1,721	1,583	2,479	0,062	0,054	1,534	0,27	0,156	3,678	0,548	0,03	0,034
<b>D</b>	1,076	1,162	2,398	0,101	0,074	1,69	0,247	0,144	0,053	0,459	0,038	0,043
<b>E</b>	0,564	0,573	2,299	2,551	0,074	1,874	1,598	0,325	0,059	10,523	0,032	0,035
<b>F</b>	0,03	0,033	2,444	2,489	0,068	1,524	1,624	0,367	0,053	10,422	0,03	0,035
<b>G</b>	0,033	0,03	0,064	2,505	0,103	0,458	1,588	0,332	12,678	10,59	0,03	0,036
<b>H</b>	0,03	0,03	0,058	2,4	0,066	0,31	2,18	0,287	12,73	1,975	0,031	0,034

Pomocou kalibračnej krivky boli vypočítané koncentrácie gliadínu jednotlivých vzoriek (Obrázok 21).





Obrázok 21: Kalibračná krivka ELISA

Tabuľka 13: Výsledky analýzy pšeničných vzoriek pomocou metódy ELISA

Názov	Charakteristika	Obsah gliadínu [mg/kg]	Obsah gliadínu [%]
Pšenica	zrno	2 464,253	100
Pšeničné pivo	sladina	48,619	1,97
Pšeničné pivo	mladina	47,976	1,95
Pšeničné pivo	mladé pivo	> 5,000	> 0,20
Pšeničné pivo	stabilizované pivo	> 5,000	> 0,20

V Tabuľka 13 sú vypísané výsledné koncentrácie stanovené kvantitatívnou metódou ELISA v jednotkách mg/kg. Koncentrácie pre pivo varené z tvrdej a mäkkej vody boli spriemerované za cieľom dosiahnutia čo najkomplexnejšieho výsledku. Ďalej tabuľka obsahuje percentuálnu zmenu obsahu lepkových bielkovín vzťahnutých na čisté pšeničné zrno, ktoré bolo považované za 100% zdroj gliadínu.

Tabuľka 14: Výsledky analýzy jačmenných vzoriek metódou ELISA

Názov	Charakteristika	Obsah gliadínu [mg/kg]	Obsah gliadínu [%]
Jačmeň	zrno	1 490,114	100
Jačmenné pivo	sladina	30,827	2,07
Jačmenné pivo	mladina	29,782	1,99
Jačmenné pivo	mladé pivo	5,128	0,34
Jačmenné pivo	stabilizované pivo	> 5,000	> 0,34

Výsledky analýzy ELISA pre jačmenné pivo sú zobrazené v Tabuľka 14. Rovnako ako u predchádzajúcej tabuľky, táto tabuľka obsahuje okrem koncentrácie lepkových bielkovín, v mg/kg, aj percentuálne zmeny v ich obsahu, ktoré boli vzťahované na jačmenné zrno ako 100% zdroj gliadínov (hordeínov).

V mladých aj stabilizovaných pivách vyrobených laboratórne z pšeničného aj jačmenného sladu bol obsah lepkových proteínov nižší než je stanovený limit 10 mg/kg.

Tabuľka 15: Výsledky analýzy komerčných pív metódou ELISA

Názov	Charakteristika	Obsah gliadínu [mg/kg]	Obsah gliadínu [%]
Bernard (jačmenný)	svetlý ležiak	9,681	0,65
Bernard (jačmenný)	bezlepkový ležiak	32,760	2,20
Herold (pšeničný)	svetlý ležiak	203,926	8,28

V Tabuľka 15 sú k nahliadnutiu hodnoty gliadínov/hordeínov komerčných českých pív, ktoré boli analyzované rovnakým spôsobom ako piva vyrobené za laboratórnych podmienok. Z výsledkov je zrejmé, že u komerčných pív sa dá očakávať vyššia hladina gluténovej frakcie proteínov.

### 5.3 Diskusia

Pomocou gélovej SDS a kyslej elektroforézy boli proteíny v analyzovaných vzorkách separované na základe ich molekulových hmotností. Následne boli analyzované metódou ELISA pre ich kvantifikáciu.

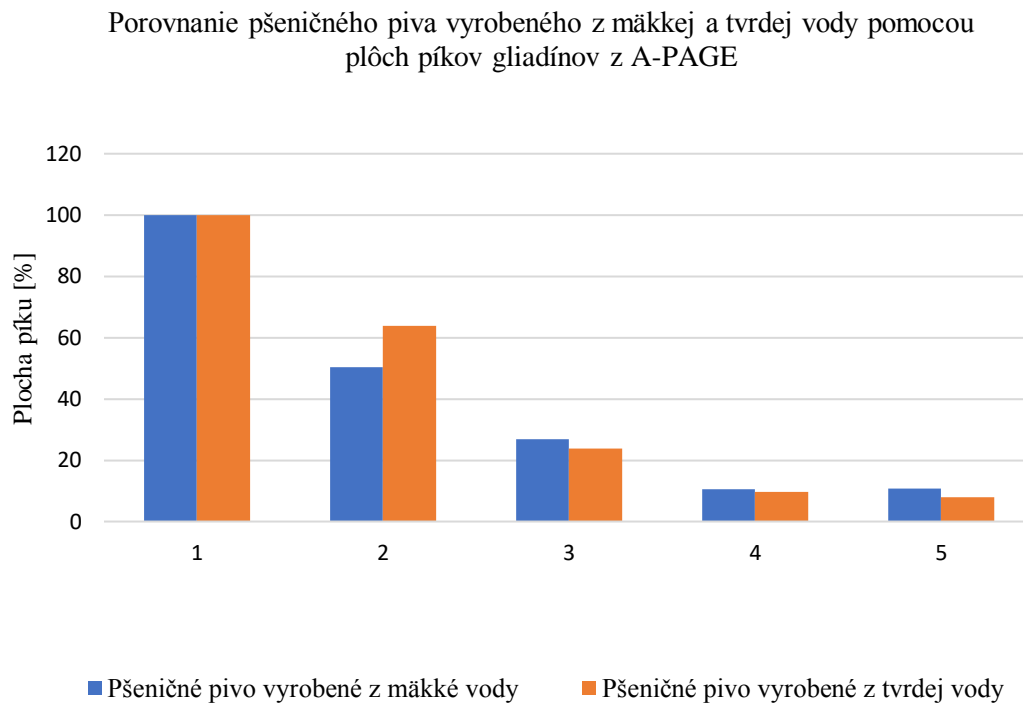
V študovaných stupňoch biotechnologického procesu boli zaznamenané významné zmeny v proteínovom zložení, pričom najvýraznejšie zmeny boli uskutočnené v priebehu rmutovania a kvasenia. Pri rmutovaní dochádza k extrakcií látok zo zrna do roztoku za zvyšovania teploty. Pôsobením práve teploty a enzýmov zo sladu, hlavne proteolytických enzýmov, dochádza k degradácií veľkého množstva proteínov. K tomuto dochádza pri teplote 45–55 °C, ktorá sa nazýva peptonizačná teplota. Po tomto procese nasleduje oddelenie pevnej fázy od roztoku pomocou scedenia. Roztok sa v ďalšom kroku privedie k varu a pridáva sa chmeľ, za cieľom extrahovať do roztoku čo najvhodnejšie látky ovplyvňujúce senzorické vlastnosti výsledného produktu. Po chmeľovare musí byť mladina dostatočne ochladená, a to na teplotu zakvasenia. Táto teplota sa líši v závislosti od použitých kvasiniek. Pri chladení dochádza samozrejme k vyzrážaniu proteínov, čo vedie k ďalšiemu poklesu ich koncentrácie. Po zakvasení dochádza k zníženiu pH z 5,2 – 5,7 na 4,3 – 4,7. Zakvasenie vedie k naštartovaniu metabolizmu kvasiniek, ktoré odbúravajú ako sacharidy, tak proteíny na jednoduchšie látky, alebo ich časti používajú pre tvorbu vlastných enzýmov alebo produktov metabolizmu. Tým sa vysvetľuje aj druhý najväčší pokles obsahu lepkových bielkovín, ktoré boli detekované v tejto fáze výroby. Pri stabilizovaní dochádza k samovoľnému dokvaseniu a dozrievaniu ktorý nemá vysoko významný vplyv na obsah gliadínov a toxických glutenínov vo výslednom produkte.

V kapitole 5.1 boli analyzované lepkové bielkoviny elektroforézou A-PAGE a SDS-PAGE, pričom odoberané vzorky boli odoberané z výrobného procesu pšeničného a jačmenného piva a analyzované boli aj tri komerčné české piva.

Pšeničné piva boli analyzované v kapitole 5.1.1. Boli porovnávané plochy píkovej jednotlivých frakcií gliadínov/glutenínov s nižšou molekulovou hmotnosťou medzi sebou a zároveň medzi pivami varenými z mäkkej a tvrdej vody. Výsledné plochy v percentách boli vztiahnuté na kombináciu pšeničného a jačmenného sladu v pomere 60:40, ktorá bola braná ako 100 % zdroj spomenutých lepkových bielkovín. Rozdiely v obsahu gliadínov pri varení v mäkkej a tvrdej vode sú vyobrazené na Obrázok 22. Typ použitej vody výrazne neovplyvňuje degradáciu gliadínov, na ich rozpad výrazne vplýva rmutovanie a kvasenie, pričom má klesajúci charakter.

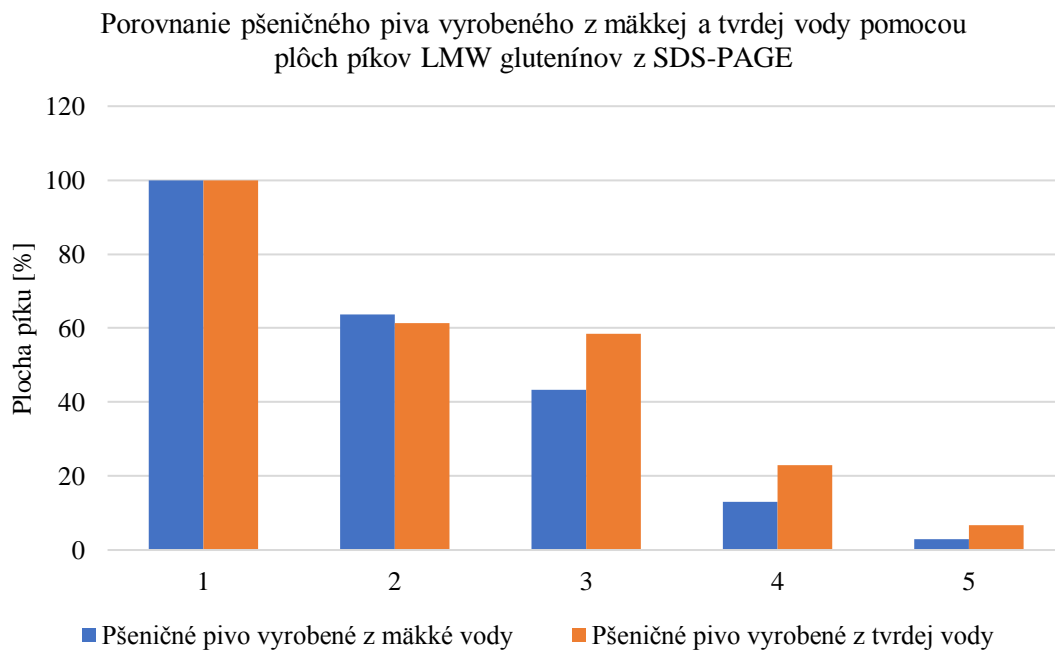
Na Obrázok 23 sú porovnávané plochy píkovej vzoriek, ktoré boli odoberané pri procese výroby pšeničného piva z mäkkej a tvrdej vody a vyhodnotené po SDS-PAGE. Obsahy glutenínov s nižšou molekulovou hmotnosťou nie sú výrazne závislé na druhu použitej vody,

ale podobne ako gliadíny na procese rmutovania a kvasenia, a majú rovnako klesajúci charakter.



Obrázok 22: Graf porovnania pšeničných pív vyrobených z mäkkej a tvrdej vody pomocou plôch píkov gliadínových frakcií z A-PAGE

Legenda: 1 – pšenica, 2 – sladina, 3 – mladina, 4 – mladé pivo, 5 - stabilizované pivo



Obrázok 23: Graf porovnania pšeničných pív vyrobených z mäkkej a tvrdej vody pomocou plôch píkov LMW glutenínov z SDS-PAGE

Legenda: 1 – pšenica, 2 – sladina, 3 – mladina, 4 – mladé pivo, 5 - stabilizované pivo

Jačmenné pívá a české pívá zakúpené k porovnávacím účelom analyzované rovnakým postupom ako pšeničné pívá sa nepodarilo vyhodnotiť, z dôvodu, že nanosená koncentrácia pre elektroforézy bola príliš nízka.

Druhou použitou metódou bola ELISA, pomocou ktorej boli analyzované extrakty pšeničných, jačmenných a komerčných pív v kapitole 4.5, ku ktorým bola pridávaná z dôvodu vyčistenia rybacia želatína. Výsledky boli zaznamenané do tabuliek Tabuľka 13 a Tabuľka 14 v tejto kapitole. Týmto bol potvrdený predpoklad, že k najvýraznejším zmenám pri biotechnologickom procese výroby piva dochádzalo pri rmutovaní, a to vyššie spomenutými vplyvmi teplôt na aktivitu enzýmov a pri kvasení.

Pomocou enzýmovej imunoanalýzy boli sledované aj koncentrácie komerčných českých pív, ktoré boli vybrané tak, aby čo najviac odpovedali charakterom laboratórne vyrábaných pív. U jačmenného svetlého ležiaka bola zistená koncentrácia 9,681 mg/kg, u pšeničného svetlého ležiaka 203,926 mg/kg a u jačmenného svetlého ležiaka bezlepkového 32,760 mg/kg. Najvyššiu koncentráciu lepkových bielkovín dosahuje pšeničný svetlý ležiak, čo je samozrejme vzhľadom na obsah lepkových bielkovín vo vstupnej surovine. Prekvapivo bezlepkový svetlý ležiak obsahoval 32,760 mg/kg gliadínu, čo je nad legislatívnym limitom 20 mg/kg [74]. Potraviny obsahujúce lepkové bielkoviny vo vyššej koncentrácii nemôžu byť považované a označované za bezlepkové.

Pre výrobu bezlepkového piva sa používajú slady s nižším obsahom lepkových bielkovín, ako je ovos, proso, ryža, amarant, quinoa alebo pohanka, ako absolútna náhrada jačmenného sladu. Na základe vybranej suroviny je potrebné upraviť sladovnícky a pivovarský proces vzhľadom na obsah enzýmov, koncentráciu a teplotu mazovania škrobu a ďalšie podmienky výroby, ale aj napriek tomu je výsledný produkt odlišný svojimi organoleptickými vlastnosťami od tradičného českého piva. Vhodnou úpravou alternatívnych sladov môže byť alkalické máčanie, v roztoku hydroxidu sodného, ktoré zlepšuje skvasiteľnosť, rozpustnosť vo vode a znižuje mikrobiálne riziko pri skladovaní [71].

Vhodnejšou možnosťou je použitie náhrad jačmenného sladu, používajú sa škrobnaté alebo cukorné náhrady, v 10 – 30% sypania [72].

Pri výrobe bezlepkového piva z jačmeňa sa používa špeciálne vyšľachtený jačmeň s nízkym obsahom dusíkatých látok, ktorý vyžaduje spolu účinok podporných proteolytických enzýmov, zhodné s enzýmom prirodzene sa vyskytujúcim v jačmeni, prolín-špecifická peptidáza, ktorý je schopný štiepiť toxické sekvencie prolamínov [72].

Aj napriek tomu, že znižovanie obsahu lepkových bielkovín je v súčasnosti veľmi bežné a obľúbené, tak výsledok v podobe zníženia, prevažne gliadínov, vo výslednom výrobku je kolísavé a nejednoznačné [73; 71]. Toto môže mať svoj podiel na výslednej koncentrácii gliadínov v stanovovanom bezlepkovom svetlom ležiaku.

## 6 Záver

Komplikovanosť stanovenia lepkových bielkovín spočíva predovšetkým v nejednoznačne definovanom analyte, ktorý sa vo vzorkách vyskytuje v heterogénnej forme, ktorá obsahuje proteíny, peptidy a rôzne nízkomolekulárne štepy. Heterogenita sa môže zvyšovať v prípade, že počas výroby potraviny dochádza k teplotným, enzýmovým alebo iným zmenám. Navyše zastúpenie proteínov značne závisí na podmienkach kultivácie daných obilnín.

Pre analýzu proteínov obilnín boli použité rôzne metódy, založené na princípe elektroforézy, kvapalinovej chromatografie a špeciálnych imunochemických stanovení. Pre stanovenie vyšších koncentrácií prolamínov boli v tejto práci použité metódy založené na princípe elektroforézy, ktorých rozlišovacia schopnosť má svoje obmedzenia. Ako najvhodnejšia metóda pre analýzu nízkych koncentrácií prolamínov bola stanovená metóda ELISA, ktorá je ale vysoko závislá na kvalite použitej protilátky, teda na jej špecifite a afinite ku konkrétnym frakciám gliadínu a hordeínu.

V experimentálnej časti boli zavádzané a optimalizované elektromigračné a imunochemické metódy stanovenia lepkových bielkovín pre vzorky z laboratórnej výroby pšeničného a jačmenného piva. Z elektromigračných metód boli použité kyslá a SDS elektroforéza, ktoré umožňujú rozdelenie jednotlivých frakcií gliadínov/ hordenínov a glutenínov na základe molekulovej hmotnosti pri priechode jednosmerného napätia polyakrylamidovým gélom. Tieto metódy boli preukázané ako účinné pre separáciu pšeničných lepkových bielkovín, ale pre vzorky z výroby jačmenného piva boli nedostatočné, prípadne je potrebná ďalšia optimalizácia týchto metód.

V rámci diplomovej práce kolegyně Bc. Lenky Burešovej bolo pripravované pivo z mäkkej a tvrdej vody podľa legislatívy, a to z dôvodu sledovania vplyvu určitých iónov a ich koncentrácií na výslednú stabilitu a zloženie produktu. Z týchto výrob boli odoberané vzorky pre analýzu v tejto diplomovej práci. Pre kvantitatívnu analýzu bola použitá súprava RIDASCREEN Gliadin Competitive, nepriama kompetitívna imunoanalýza, ktorá univerzálne využíva značenú protilátku pri stanovení antigénu, gliadínu.

Sledovaním obsahu lepkových bielkovín vo vybraných fázach biotechnologického procesu výroby piva bolo zistené, že k najväčším stratám lepkových bielkovín dochádza pri rmutovaní, ako zriedením vstupnej suroviny so značným množstvom vody, tak aj vplyvom teplôt na proteázy. V tomto kroku boli zaznamenané zmeny koncentrácie metódou ELISA až o cca 98 %. Druhým významným krokom je kvasenie, pri ktorom dochádza k poklesu takmer pod medzu detekcie metódy ELISA. Pri kvasení sú zvyškové bielkoviny napríklad spotrebované kvasinkami na metabolické procesy.

Aj napriek tomu, že znižovanie obsahu lepkových bielkovín je v súčasnosti veľmi bežné a obľúbené, tak obsah gliadínov a glutenínov vo výslednom výrobku býva kolísavý a použité úpravy majú nejednoznačné výsledky. Toto môže mať za následok príliš vysokú koncentráciu lepkových proteínov i v pivách označovaných ako bezlepkové. S ohľadom na vysoký výskyt celiakie v populácii a súčasne obľúbenosť piva je treba do budúcnosti vyvíjať účinné postupy, ktoré spoľahlivo povedú k zníženiu obsahu gluténu v pivách tak, aby označenie „bezlepkové pivo“ odpovedalo hygienickej norme i skutočnosti a nespôsobovalo zdravotné problémy konzumentom.

## 7 Zoznam použitej literatúry

- [1] VELÍŠEK, . Chemie potravin 3. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-03-8.
- [2] NOUZA, M. a A- NOUZOVÁ. Pokroky v klinické imunologii. Imunologie [online]. Praha: Centrum klinické imunologie, 2002 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <http://www.imunologie.cz/Intolerance.pdf>
- [3] FASANO, A. a C. CATASSI. Celiac disease. The new England journal of medicine [online]. 2012, **367**(25), 2419-2426 [cit. 2018-03-09]. DOI: 10.1056/NEJMcp1113994. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMcp1113994>
- [4] SAPONE, A., J.C. BAI, J. DOLNISEK a P.H. GREEN. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. Elsevier [online]. 2014, **34**(2), 1-5 [cit. 2018-03-09]. DOI: 10.1016/j.clnu.2014.08.012. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/265170812\\_Non\\_Coeliac\\_Gluten\\_Sensitivity\\_-\\_A\\_New\\_Disease\\_with\\_Gluten\\_Intolerance](https://www.researchgate.net/publication/265170812_Non_Coeliac_Gluten_Sensitivity_-_A_New_Disease_with_Gluten_Intolerance)
- [5] GRÍČ, P. a O. MENGEROVÁ. *CELIAKIE: Bezlepková diéta a rady lekáre*. 1.vyd. Čestice: Medica Publishing, 2008. ISBN 978-80-85936-6-9.
- [6] BAI, J. WGO practice guidelines: Celiac disease. World gastroenterology organisation [online]. 2007, **47**(2), 1-18 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <https://de.scribd.com/doc/315583701/WGO-Celiac-Disease>
- [7] KADLEC, P. Technologie potravin 2. 2.vyd. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 978-80-7080-510-7.
- [8] POMS, R.E. Methods for allergen analysis in food. Food Addit. Contam. [online]. 2004, **21**(1), 1-31 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030310001620423>
- [9] JENSSEN, F. Detection wheat gluten in food. Detecting allergens in food. 1.vyd. Woodhead publishing, 2006, s. 244-272. ISBN 978-0-8493-2574-8.
- [10] HULÍN, P., P. DOSTÁLEK a I. HOCHÉL. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. Chemické listy [online]. 2008, **102**(1), 327-337 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008\\_05\\_327-337.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_05_327-337.pdf)
- [11] DOSTÁLEK, , DVOŘÁK a HULÍN. Alergeny v pivu. *Kvasný průmysl* [online]. 2010, **56**(2), 105-108 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <https://www.kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/2010/02/10.pdf>
- [12] GUNDALINI, S. a I. POLANCO. Nonceliacic gluten sensitivity or wheat intolerance syndrome?. Journal of pediatric [online]. 2014, **166**(1), 805-811 [cit. 2018-03-09]. DOI: 10.1016/j.jpeds.2014.12.039. ISSN 0022-3476. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25662287>
- [13] BASAŘOVÁ, G., J. ŠAVEL, P. BASAŘ a T. LEJSEK. *Sladařství: Teorie a praxe výroby piva*. 1. Praha: VŠCHT Praha, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [14] OSBORNE, T.B. The proteins of the wheat kernel. Cernegie Inst. 1907, **1**(84), 1-119.
- [15] WRIGLEY, C.W. a J.A. BIETZ. Proteins and aminoacids. Pomeranz. 1998, **1**(1), 159-275.
- [16] GROSCH, W. a H. WEISER. Redox reaction on wheat dough as affected by ascorbic acid. Cereal Sci. 1999, **29**(1), 1-16.
- [17] WEISER, H. The use of redox agents. Cauvain. Cambridge: Woodhead publishing, 2003, **29**(2), 424-446.

- [18] TILLEY, K.A., R.E. BENJAMIN, K.E. BAGOROGOZA, B.M. OKOT KOTBER, O. PRAKASH a H. KWEN. Tyrosine cross-links: molecular basis of gluten structure and function. *Food chemistry*. 2001, **49**(1), 2627-2632.
- [19] PIBER, M. a P. KOEHLER. Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *Food chemistry*. 2005, **53**(1), 5276-5284.
- [20] WEISER, H., W. BUSHUK a F. MACRITCHIE. The polymeric glutenins. Wingley: Gliadin and glutenin: The unique balance of wheat quality. 2006, **24**(2), 213-240.
- [21] SHEWRY, P.R., N.G. HALFORD a A.S. TATHAM. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Cereal Sci.* 1997, **25**(1), 207-227.
- [22] WEISER, H. a R. KIEFFER. Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *Cereal Sci.* 2001, **34**(1), 19-27.
- [23] SHEWRY, P.R., B.J. MIFLIN, E.J.-L. LEW a D.D. KASARDA. The preparation and characterization of an aggregated gliadin fraction from wheat. *Exp. Bot.* 1983, **34**(1), 1403-1410.
- [24] HUEBNER, F.R. a J.A. BIETZ. Improved chromatographic separation and characterization of ethanol-soluble wheat proteins. *Cereal Chem.* 1993, **70**(1), 506-511.
- [25] WEISER, H. a G. ZIMMERMANN. Importance of amounts and proportions of high molecular weight subunits of glutenin for wheat quality. *Eur. Food Res. Technol.* 2000, **210**(1), 324-330.
- [26] KASARDA, D.D. Glutenin polymers: The in vitro to in vivo transition. *Cereal food world*. 1999, **44**(1), 566-571.
- [27] BASAŘOVÁ, G. *Sladařství*. 1.vyd. Praha: Havlíček Brian team, 2015. ISBN 978-80-8109-47-2.
- [28] DRDÁK, M. *Základy potravinářských technologií*. 1.vyd.-. Bratislava: malé centrum, 1996. ISBN 80-96-0641-1.
- [29] PŘÍHODA, J., P. SKŘIVÁN a M. HRUŠKOVÁ. *Cereální chemie a technologie I.: Cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. 1.vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2004. ISBN 80-7080-530-7.
- [30] BASAŘOVÁ, G., V. PSOTA, J. SAVEL et al. *Sladařství: Teorie a praxe výroby sladu*. 1.vyd. Praha: Havlíček Brian team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [31] PELIKÁN, M. a L. SÁKOVÁ. *Jakost a zpracování rostlinných produktů*. 1.vyd. České Budějovice: Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, 2001. ISBN 80-7040-502-3.
- [32] HRABĚ, J., F. BUŇKA a I. HOZA. *Technologie výroby potravin rostlinného původu*. 1.vyd. Zlín: Academia centrum, 2008. ISBN 978-80-7318-520-6.
- [33] Pivo, vitaminy a další důležité látky pro výživu a zdraví člověka. [www.beers.cz](http://www.beers.cz) [online]. Praha: VÚPS, 2004 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <http://www.beers.cz/dokumenty/7.pdf>
- [34] PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby sladu a piva*. 1.vyd. Praha: VÚSP, 2000. ISBN 80-902658-6-3.
- [35] CEJPEK, K. Vonné a chuťové složky sladu. *Chemické listy*. 2014, **108**(1), 426-435.
- [36] BASAŘOVÁ, G. *Pivovarství*. 1.vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [37] PALMER, H. *Barley and malt*. 2.vyd. Florida: CRC Press, 2006. ISBN 978-08247-2657-7.

- [38] SOCHA, P., A. RAŽDÍKOVÁ a D. URMINSKÁ. Optimalizácia stanovení a prítomnosti celiakálne aktívnych bielkovín v cereáliách a pseudocereáliách. *Potravinárstvo*. 2010, **4**(1), 497-508. ISSN 1337-0960.
- [39] ŠAVEL, J. *Technologie výroby piva*. 1.vyd. Brno: MZLU, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [40] QUIDO, F.L. a M.M. MOREIRA. *Malting*. 1.vyd. Florida: CRC Press, 2013. ISBN 978-1-4398-8702-8.
- [41] ROSS GUERIN, J. Endopeptidases in Barley seed and their action during germination [online]. Australia, 1993 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/21658/2/02whole.pdf>. Ph.D. Thesis. Dept. of Plant Science.
- [42] HAVLOVÁ, P. *Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu*. 2.vyd. Brno: VÚPS, 1999. ISBN 80-7271-040-.
- [43] JONES, B.L., R. WROBEL, L. MARINAC a N. YANG. Electrophoresis separation and characterozation of barley and green malt endoproteinases. 1.vyd. Oslo: EBS 24th congress, 1993. ISBN 0-19-963466-1.
- [44] MIKOLA, J. a E.M. SUOLINNA. Purification and properies of a trypsin inhibitor from barley. *Eur. J. Biochem.* 1969, **9**(1), 655-660.
- [45] EATON, B. *An overview of brewing*. 2.vyd. Florida: CRC Press, 2006. ISBN 978-0-8247-2657-7.
- [46] ENGE, J., P. ŠEMÍK, J. KORBEL a M. SEKORA. Technologické aspekty infuzníc a dekokčních způsobů rmutování. *Kvasný průmysl* [online]. 2005, **51**(1), 158-165 [cit. 2018-03-09]. ISSN 0023-5830. Dostupné z: <https://www.kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/2005/05/01.pdf>
- [47] LEIPER, K.A. a M. MIEDL. *Brewhouse technology*. 2.vyd. Florida: CRC Press, 2006. ISBN 978-0-8247-2657-7.
- [48] BARNES, C. *Brewing process control*. 2.vyd. Florida: CRC Press, 2006. ISBN 978-0-8247-2657-7.
- [49] WILLAERT, R. *Biochemistry and fermentation of beer*. 2.vyd. Florida: CRC Press, 2005. ISBN 978-0-8293-2657-6.
- [50] MUNROE, a H. JAMES. *Fermentation*. 2.vyd. Florida: CRC Press, 2002. ISBN 987-0-8247-2657-7.
- [51] HENGEL, A. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, **389**(1), 111-118.
- [52] JONSSON, F. *Detecting wheat gluten in food*. 2006. ISBN 978-0-8493-2574-8.
- [53] POMS, R. a E. ANKLAM. Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *Journal of aoac international*. 2004, **6**(87), 1391-1397.
- [54] BATAIS, F., F. PINEAU, Y. POPINEAU, C. APARICIO, G. KANNY, L. GUERIN a D.A. VAUTRIN. Food allergy to wheat: identification of immunglobulin E and immunoglobulin G - binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical and experimental allergy*. 2003, **33**(7), 962-970.
- [55] WAGA, J. a J. ZIENTARSKI. Isolation and purification of individual gliadin proteins by preparative acid polyacrylamide gel electrophoresis (A-PAGE) for allergenic research. *Polisch journal of food and nutrition sciences*. 2007, **57**(1), 91-98.
- [56] PALENČÁROVÁ, E. a Z. GÁLLOVÁ. Detekcia celiakálne aktívnych bielkovín elektroforetickou a imunochemickou metódou. *Potravinárstvo*. 2010, **4**(), 485-490.



- [57] SCHUBERT-ULLRICH, P., J. RUDOLF, P. ANSARI, P. GALLER, M. FÜHRER, A. MOLINELLI a S. BAUMGARTNER. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, **395**(1), 69-81.
- [58] OLEXOVÁ, L., L. DOVIČOVIČOVÁ, M. ŠVEC, P. SIEKEL a T. KUČHTA. Detection of gluten-containing cereals in flours and "gluten-free" bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control.* 2006, **17**(3), 234-237.
- [59] ABBAS, A.K. a A.H. LICHTMAN. *Cellular and molecular immunology*. 1.vyd. Philadelphia: Saunders Company, 1997. ISBN 0-7216-4024-9.
- [60] AMBROSIUS, H. a H. LUPPA. *Immunohistochemie*. 2.vyd. Berlin: Springer Verlag, 1987. ISBN 3-05-500316-0.
- [61] RANZ, I., A. VENTEO, C. VELA a A. SANZ. Immunoenzymatic assay for gluten detection using monoclonal antibody R5. [www.biognosisltd.co.uk](http://www.biognosisltd.co.uk) [online]. Niigata: Seiken, 2006 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <http://www.biognosisltd.co.uk/Products/Gluten/Proceeding%20of%20INGENASA%2018th%20PWG%20meeting.pdf>
- [62] KRŠKA, R., E. WELZIG a S. BAUMGARTNER. Immunoanalytical detection of allergic proteins in food. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, **378**(1), 176.
- [63] BARTÚNKOVÁ, J. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing, 2005. ISBN 80-247-0691-1.
- [64] KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1.vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2006. ISBN 80-7080-586-2.
- [65] LACORN, M. a U. IMMER. Standardization in allergen determination. *Accred Qual Assur.* 2009, **15**(4), 207-216.
- [66] CHOVANCOVÁ, M. Plynová chromatografie. [www.nutralsession.wz.cz](http://www.nutralsession.wz.cz) [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2006 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <http://www.nutralsession.wz.cz/chemia/anal/plynovachromatografie.pdf>
- [67] CONTRERAS, M., I. LOPEZ-EXPOSIZO, B. HERNANDEZ-LEDESMA, M. RAMOS a I. RECIO. Application of mass spectrometry to the characterization and quantification of food-derived bioactive peptides. *Journal of AOAC International* [online]. 2008, **91**(14), 981-994 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <http://www.highbeam.com/doc/1G1-183367447.html>
- [68] CAMAFEITA, E., P. ALFONSO, T. MOTHES a E. MÉNDEZ. Matrix - assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: the first non-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples. *Journal of Mass Spectrometry.* 1998, **32**(9), 940-947.
- [69] PIKNOVÁ, L., B. BRETNÁ a T. KUČHTA. Detection of gluten-containing cereals in food by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food and Nutrition Research.* 2008, **3**(47), 114-119.
- [70] WEBER, D., CH. CLÉROUX a P. GODEFROY. Emerging analytical methods to determine gluten markers in processed foods. *Anal. Bioanal. Chemistry.* 2009, **395**(1), 111-117.
- [71] TAYLOR, J. *Fermented foods. Beverages from Sorghum and Millet*. 2. Sorghum: Academic press, 2003, s. 2352-2359. ISBN 978-0-12-227055-0.
- [72] HAGER, A., J.P. TAYLOR, D.M. WATERS a E.K. ARENDT. Gluten free beer - A review. *Trends in Food Science and Technology.* 2014, **36**(1), 44-54. ISSN 0924-2244.
- [73] PELEMBE, L.A.M., J. DEWAR a J.R.N. TAYLOR. Effects of germination moisture

and time on pearl millet malt quality. *Journal of the institute of brewing*. 2004, **110**(1), 320-325. ISSN 2050-0416.

- [74] Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. *Praha: Ministerstvo zemědělství*, 2012 [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/codex-alimentarius-zakladni-informace.aspx>

## 8 Zoznam použitých skratiek a symbolov

IgE	Imunoglobulín E
IgG	Imunoglobulín G
MW	molekulárna hmotnosť (molecular weight)
GMP	gluténinový makropolymer
Gln	glutamín
Pro	prolín
Phe	fenylalanín
Tyr	tyrozín
Gly	glycín
% hm.	hmotnostné percento
Da	dalton
kDa	kilodalton
ELISA	enzýmová imunoanalýza
CKT	cylindrokónický tank
RP-HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach
LMW	nízkomolekulárna hmotnosť
HMW	vysokomolekulárna hmotnosť
ppm	(pars per milion) jedna milióntina (1%=10 000 ppm)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovom géle s dodecylsulfátom sodným
A-PAGE	elektroforéza v kyslom prostredí
IEF	izoelektrická fokusácia
CZE	kapilárna zónová elektroforéza
HPLC-HPCE	vysokoúčinná dvojrozmerná elektroforéza spojená s kvapalinovou chromatografiou
UV	ultrafialové svetlo
MS	hmotnostná spektrometria
PCR	polymérová reťazová reakcia
HAMA	Human – Anti – Mouse – Antibodies
TEMED	N, N,N',N'-tetramethylethyldiamin
SPR	povrchová plazmónová resonancia
IBU	international bitterness unit (medzinárodná jednotka horkosti)