

## Vztah mezi $\beta$ -glukanasou, chitinasou a galaktomananem a vybranými technologickými znaky obilek jarního ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a sladu

### *The relationship between $\beta$ -glucanase, chitinase, and galactomannan and selected technological parameters of spring barley caryopses (*Hordeum vulgare* L.) and malt*

VRATISLAV PSOTA, KAROLÍNA BENEŠOVÁ, LENKA SACHAMBULA, PAVLA HAVLOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Sladařský ústav, Mostecká 7, CZ-614 00 Brno

Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Malting Institute, Mostecká 7, CZ-614 00 Brno

e-mail: psota@brno.beerresearch.cz

**Psota, V. – Benešová, K. – Sachambula, L. – Havlová, P.: Vztah mezi  $\beta$ -glukanasou, chitinasou a galaktomananem a vybranými technologickými znaky obilek jarního ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a sladu.** Kvasný Prum. 56, 2010, č. 2, s. 74–78.

V 99 vzorcích zrna ječmene a z něj vyrobeného sladu byla sledována aktivita chitinasy,  $\beta$ -glukanasy enzymů zapojených v obranné reakci rostlin vůči napadení. Dále byla pomocí testu EPS sledována přítomnost polysacharidu galaktomananu, který je přítomen v buněčných stěnách vláknitých mikromycet. V nesladovaných obilkách ječmene a následně ve sladině byl sledován obsah  $\beta$ -glukanů. Současně byl sledován potenciál gushingu sladu a úroveň PDMS ve sladině. Kontaminace sladu vláknitými mikromycetami zjištěná EPS testem byla ve velmi těsném vztahu k aktivitě chitinasy ve sladu (0,92\*\*\*) i v obilkách (0,92\*\*\*). Obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině není pravděpodobně znakem, který je zásadním způsobem ovlivněn kontaminací obilky. Naproti tomu úroveň gushingu ve sladu a obsah PDMS ve sladu jsou výrazně spjaté se znaky spojenými s kontaminací obilky vláknitými mikromycetami.

**Psota, V. – Benešová, K. – Sachambula, L. – Havlová, P.: The relationship between  $\beta$ -glucanase, chitinase, and galactomannan and selected technological parameters of spring barley caryopses (*Hordeum vulgare* L.) and malt.** Kvasný Prum. 56, 2010, No. 2, p. 74–78.

Activity of chitinase,  $\beta$ -glucanase, the enzymes participating in the defense reaction of plants against the infestation, was studied in 99 samples of barley and malt produced from it. In addition, the presence of polysaccharide galactomannan was studied using the EPS test. This polysaccharide is present in cell walls of filamentous micromycetes.  $\beta$ -glucan content was studied in non malted caryopses of barley and subsequently in wort. Simultaneously, malt gushing potential and PDMS level in wort were followed. Contamination of wort with filamentous micromycetes determined by the EPS test was in a very close relationship to activity of chitinase in malt (0.92\*\*\*) and in caryopses (0.92\*\*\*).  $\beta$ -glucan content in wort is not probably a parameter that is essentially affected by the caryopsis contamination. On the contrary, level of gushing in malt and PDMS content in malt are significantly associated with the parameters connected with the contamination of caryopsis with filamentous micromycetes.

**Psota, V. – Benešová, K. – Sachambula, L. – Havlová, P.: Die Beziehung unter  $\beta$ -Glukanasa, Chitinasa, Galaktomanan und aufgesuchten technologischen Zeichen der Grasfrucht von Sommergerstensorten (*Hordeum vulgare* L.) und Malz.** Kvasný Prum. 56, 2010, Nr. 2, S. 74–78.

Die Aktivität der Chitinasa,  $\beta$ -Glukanasa Enzymen, die in einer Abwehrreaktion der Pflanze gegen den Befall einbezogen sind, wurde in 99 Mustern Gerstenkörnes und im aus dieser Gersten hergestellten Malz verfolgt. Durch den EPS Test wurde weiterhin die Anwesenheit des Polysacharids Galaktomanan, das in den Zellwänden von faserigen Mikromyceten anwesend ist, verfolgt. In den ungemalzten Grasfrüchten und nachfolgend in der Würze wurde der  $\beta$ -Glukangehalt und auch Malzgushingspotenzial und PDMS Wert in der Würze verfolgt. Kontamination des Malzes durch die faserigen Mikromycete, ermittelte durch EPS Test, wurde in einer sehr engen Relation zur Aktivität der Chitinasa im Malz (0,92\*\*\*) und in den Grasfrüchten (0,92\*\*\*). Der  $\beta$ -Glukangehalt in der Süßwürze ist wahrscheinlich nicht der Parameter, der durch die Grasfrüchtenkontamination wesentlich beeinflusst wird. Dementgegen das Gushingspotenzial und der PDMS Gehalt im Malz sind mit den Parametern der Grasfrucht kontamination durch faserigen Mikromyceten beträchtlich verbunden.

**Klíčová slova:** ječmen, slad, glukanasa, chitinasa, EPS, gushing, PDMS

**Keywords:** barley, malt, glucanase, chitinase, EPS, gushing, PDMS

## 1 ÚVOD

Rostliny jsou během svého života ohrožovány řadou faktorů. K nejzávažnějším z nich patří patogenní vláknité mikromycety. Výskyt patogenního mikroorganismu na obilninách může negativně ovlivnit nejen kvalitativní vlastnosti obilky, ale působí i komplikace při zpracování obilovin a může negativně ovlivnit potraviny z nich vyrobené.

Kritickým obdobím pro napadení klasů vláknitými mikromycetami je doba kvetení, kdy jsou porosty k napadení nejvýmavější. V této době se musí setkat patogen a vnímavý hostitel. Rozhodující pro úspěšnou infekci klasů jsou mikroklimatické podmínky.

Napadení kvítka patogenem má často za následek odumření budoucí obilky nebo její nedostatečný vývin. Silněji poškozené obilky jsou malé a lehké a při čistění sklizeného zrna jsou odstraněny. Z napadeného kvítka patogen prorůstá přes klasové vřeteno do sousedních klásků. K šíření patogenu na další klasy a k prorůstání na obilky může docházet i později, po celou dobu, kdy jsou klasy zelené, případně i déle až do sklizně porostů. Čím dojde k infekci později, tím méně prorůstá patogen do obilky. Někdy zůstane jen na povrchu, nebo pronikne jen do osemení. Největší problém i z hlediska produkce mykotoxinů nastane, když proroste až do endo-

## 1 INTRODUCTION

Plants are endangered by numerous factors during their lifespan; pathogenic filamentous micromycetes belong to the most serious of them. The occurrence of pathogenic microorganisms on cereals can negatively affect caryopses qualitative characters, further it is also a cause of complications at cereal processing and it can have a negative impact on foodstuffs produced from them.

The flowering time when the growths are the most sensitive to the infestation, is a critical period for the infestation of ears with filamentous micromycetes. At this time pathogen and a sensitive host must meet. Microclimatic conditions are decisive for a successful infection of ears.

Infestation of a floret with the pathogen often results in dying of the future caryopsis or its insufficient development. More heavily damaged caryopses are small and light and they are removed when the harvested grain is screened. The pathogen penetrates from the infested floret through the spike rachis to adjacent spikelets. Pathogen can spread to other ears and caryopses even later, for the whole time when the ears are green or even longer, till the harvest of growths. The later the infection occurs, the less the pathogen spreads into the caryopsis. It sometimes remains only on the surface or it only pene-

spermu. Silně napadené, ale plně vyvinuté obilky jsou nápadně změnou barvy a mechanické pevnosti. Snadno se mechanicky poškodí. Při sklizni se často rozlámou, ale mohou se dostat až mezi sklizené zrno [1].

Mezi rostlinami a fytopatogeny se vytvořily v průběhu vývoje velmi složité vztahy. U patogenů se vyvinuly systémy, pomocí kterých napadají rostliny. Rostliny zase získaly schopnost účinné obrany proti infekčním agens. Průnik patogenů do buněk je ztížen řadou mechanických bariér (krycí pletiva, vosky, kutikula, buněčná stěna), avšak ani tyto struktury nejsou pro specializované patogeny nepřekonatelnou překážkou. Při kontaktu buňky s patogenem dochází k řadě změn, jejichž cílem je omezit působení infekčního organismu v rostlině. Vznikající degradační produkty jsou identifikovány receptory hostitelské rostliny. Tyto specifické metabolity jsou převážně modifikované molekuly glukózy [2] vzniklé při hydrolytických procesech a plní často funkci elicitorů, tj. látek spouštějících obranné reakce na buněčné úrovni [3].

Důsledkem napadení rostlin patogenními vláknitými mikromycetami je syntéza PR (pathogenesis related) a DR (defence related) bílkovin. Mezi dvě nejrozsáhlejší skupiny PR-bílkovin, které jsou syntetizované v průběhu patogeneze, patří 1,3- $\beta$ -D-glukanasy (Glu, E.C.3.2.1.39) a chitinasy (Chi, E.C.3.2.1.14) [4].

$\beta$ -1,3-Glukanasy hydrolyzují 1,3-D-glukosidovou vazbu v 1,3- $\beta$ -D-glukanu. V infikovaných rostlinách plní obrannou funkci, jejímž cílovým místem jsou 1,3- $\beta$ -D-glukany buněčných stěn patogenu [5]. Zvyšují permeabilitu buněčných stěn patogena, v důsledku čehož dochází k úniku elektrolytu a makromolekul z buňky a následně k jejímu odumření [6].

Chitinasa degraduje jednoduchou vazbu C-C mezi dvěma následujícími N-acetylglukosaminy chitinu na N,N'-diacetylchitobiosu a vyššími oligomery [7]. Podobně jako některé glukanasy i určité chitinasy mají antifungální účinky [8, 9]. Glukanasy a chitinasy mají synergický účinek [10].

1,3- $\beta$ -D-glukan a galaktomanan jsou polysacharidy buněčné stěny řady vláknitých mikromycet. Obou těchto látek, tj. 1,3- $\beta$ -D glukanu a galaktomananu, se využívá v humánní medicíně k diagnostice mykóz. 1,3- $\beta$ -D glukán je „panfungálním“ markerem mykotických infekcí [11]. Některé zygomycety (*Absidia*, *Mucor* spp. a *Rhizopus* spp.) [12] pravděpodobně však 1,3- $\beta$ -D-glukan neprodukují. Galaktomanan se používá pro časnou diagnostiku aspergilózy. Galaktomanan je polysacharidem vyskytujícím se i u některých dalších vláknitých hub (*Penicilium* sp., *Paecilomyces* sp., *Alternaria* sp.).

Patogenní mikroorganismy působí negativně nejen na kvalitu obilky ječmene, ale působí i komplikace v následujícím technologickém procesu výroby sladu a piva. Nejen průnik, ale již kontakt patogenního organismu s buňkou vyvolává celou řadu koordinovaných

trates to the testa. The biggest problem also considering the mycotoxin production occurs when it spreads into the endosperm. Heavily infested but fully developed caryopses are distinguished by changes in mechanical consistency and color. They can easily be damaged mechanically. They are often broken at harvest but can even get into the harvested grain [1].

Very complex relationships were formed between plants and phytopathogens during the course of development. Systems were developed by means of which pathogens attack plants. Plants in turn acquired the ability to defend themselves effectively against infectious agents. Penetration of pathogens into cells is aggravated by a number of mechanical barriers (covering tissues, waxes, cuticula, cell wall), but even these structures are not impassable obstacles for specialized pathogens. After the contact of a cell with a pathogen, many changes occur with the aim to reduce the effect of the infectious organism in a plant. The arising products of degradation are identified by the host plant receptors. These specific metabolites are mostly modified molecules of glucose [2] produced during the hydrolytic processes, they often fulfill the function of elicitors, i.e. substances triggering the defensive reactions on the cellular level [3].

Plant infestation by filamentous micromycetes results in the synthesis of pathogenesis-related (PR) and defense-related (DR) proteins. 1,3- $\beta$ -D-glucanases (Glu, E.C.3.2.1.39) and chitinases (Chi, E.C.3.2.1.14) belong to the two largest groups of PR-proteins that are synthesized during pathogenesis [4].

1,3- $\beta$ -D-glucanases hydrolyze 1,3-D-glucoside linkage in 1,3- $\beta$ -D-glucan. They play a defensive role in the infected plants, 1,3- $\beta$ -D-glucan of cell walls of the pathogen are their target [5]. 1,3- $\beta$ -D-glucanases increase permeability of the cell walls of the pathogen which results in the outflow of the electrolyte and macromolecules from the cell and subsequently, the cell dies away [6].

Chitinase degrades a single C-C bond between two N-acetyl glucosamines of chitin to N,N'-diacetylchitobiose with higher bloomers [7]. Similarly to some glucanases, also some chitinases exhibit antifungal effects [8, 9]. Glucanases and chitinases have synergistic effects [10].

1,3- $\beta$ -D glucan and galactomannan are polysaccharides of cell walls of a number of filamentous micromycetes. Both these substances, i.e. 1,3- $\beta$ -D glucan and galactomannan, are used in human medicine for the diagnostics of mycoses. 1,3- $\beta$ -D glucan is a “pan-fungal” marker of mycotic infections [11]. However, some zygomycetes (*Absidia*, *Mucor* spp., and *Rhizopus* spp.) [12] do not probably produce 1,3- $\beta$ -D-glucan. Galactomannan is used for early diagnosis of aspergillosis. Galactomannan is a polysaccharide also occurring in some other filamentous fungi (*Penicilium* spp. *Paecilomyces* spp. *Alternaria* spp.).

Tab. 1 Základní číselné charakteristiky / Table 1 Basic numeric characteristics

	$\beta$ -glukany ve sladině $\beta$ -glucans in wort	Gushing ve sladu Gushing in malt	Chitinasa v obilce Chitinase in caryopses	Chitinasa ve sladu Chitinase in malt	$\beta$ -glukanasa v obilce $\beta$ -glucanase in caryopses	$\beta$ -glukanasa ve sladu $\beta$ -glucanase in malt	EPS v obilce EPS in caryopses	EPS ve sladu EPS in malt	PDMS ve sladu PDMS in malt
	(mg.l <sup>-1</sup> )	(ml)	(U.kg <sup>-1</sup> )	(U.kg <sup>-1</sup> )	(U.kg <sup>-1</sup> )	(U.kg <sup>-1</sup> )			(mg.kg <sup>-1</sup> )
Velikost vzorku / Sample size	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Průměr / Average	404.1	12.7	90.9	98.4	269.6	384.1	3.0	1.9	7.1
Rozptyl / Variance	180059	548	740	516	1623	2340	1	2	7
Směrodatná odchylka / Standard deviation	424.3	23.4	27.2	22.7	40.3	48.4	0.7	1.3	2.7
Standardní chyba / Standard error	42.7	2.4	2.7	2.3	4.1	4.9	0.1	0.1	0.27
Variační koeficient / Variation coefficient	105.0	184.3	29.9	23.1	14.9	12.6	22.5	72.0	38.0
Minimum / Minimum	59	0	42	57	188	304	2	0	2.7
Maximum / Maximum	2484	116	124	128	384	507	4	4	14.9
Rozpětí / Range	2425	116	82	71	196	203	2	4	12.2
Šikmost / Skewness	2.4	2.0	-0.8	-0.8	0.4	0.6	0.0	-0.4	0.9
Špičatost / Kurtosis	6.5	3.8	-1.2	-1.1	0.0	-0.2	-0.7	-1.3	0.6

vnitrobuněčných procesů, jejichž cílem je omezit či zcela eliminovat jeho působení a šíření. Jen málo z těchto procesů má zcela obecný charakter [3]. Celý proces je spojen s tvorbou nových látek (primárních a sekundárních metabolitů) jak napadené rostliny, tak i patogenů [13]. Obranné reakce rostliny vyvolávají následnou tvorbu specifických látek u patogenního mikroorganismu, kterou se patogen snaží obrannou reakci rostliny překonat. Poznání detailního mechanismu těchto reakcí je neustále v popředí světového zájmu a je jim věnována stále větší pozornost [14] s cílem získat odolnější genotypy ječmene.

V předložené práci byly sledovány vztahy mezi aktivitou chitinasy, aktivitou 1,3- $\beta$ -D-glukanasy a přítomností galaktomananů (EPS) v nesladované obilce i ve sladu s vybranými technologickými znaky (obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině, gushingu sladu, PDMS ve sladu).

## 2 MATERIÁL A METODY

V letech 2005–2007 byly ze stanovišť Žabčice a Kroměříž odebrány vzorky zrna pluchatých i bezpluchých odrůd ječmene. Soubory odrůd se v jednotlivých letech lišily. Celkem bylo odebráno 99 vzorků.

Odebrané vzorky ječmene byly skladovány tradičním postupem [15]. V nesladovaných obilkách ječmene a ve vyrobeném sladu byla stanovena aktivita chitinasy [16] a 1,3- $\beta$ -D-glukanasy [17] a dále byl proveden aglutinační test EPS [18] na přítomnost extracelulárních polysacharidů (galaktomananů) produkovaných vláknitými mikromycetami.

Byla stanovena úroveň gushingu ve sladu [19] a obsah prekurzorů dimetylsulfidu ve sladině (PDMS) [20], současně byl stanoven i obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině [21].

Získané údaje byly vyhodnoceny korelační analýzou.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Rostliny se při napadení vláknitými mikromycetami brání mimo jiné produkcí enzymů chitinasy a 1,3- $\beta$ -D-glukanasy, které náleží do skupiny PR bílkovin (pathogenesis-related proteins). Tyto bílkoviny mají specifické antimikrobiální účinky. Hydrolyzují buněčnou stěnu patogenů a přitom produkují elicitory dalších obranných reakcí [22, 23].

Pluchaté obilky ječmene mohou aktivně reagovat na napadení mikromycetami pouze v období, kdy jsou plucha a pod ním ukrytý perikarp živé. Již zdravé rostliny ječmene obsahují geny pro chitinasu. Intercelulární PR a DR bílkoviny mají kanály v buněčných stěnách, které umožňují jejich transport do intercelulárního prostoru [24]. Po napadení začne rostlina ječmene chitinasu produkovat. Aktivita chitinasy zjištěná v listech ječmene infikovaných padlím travním odpovídala genovému pozadí hostitele a patogenu [25]. V době plné zralosti je ochrana obilky vůči napadení patogenními mikromycetami pasivní, založená na chemickém složení pluchy, perikarpu a testy a jejich fyzikálních vlastnostech. Při skladování může na napadení mikromycetami aktivně reagovat rostoucí zárodek, případně aleuronová vrstva, ostatní části obilky nejsou živé.

V průběhu skladování se výrazným způsobem zvýšila aktivita  $\beta$ -glukanasy. Byla přibližně o třetinu vyšší ve sladu než v obilkách (tab. 1). Mezi aktivitou  $\beta$ -glukanasy ve sladu a gushingem byl zjištěn středně silný vztah (0,55\*\*\*) (tab. 2). Tak silný vztah by mohl být dán do souvislosti s kontaminací klíčících obilke vláknitými mikromycetami [8, 9], která může být příčinou zvýšené úrovně gushingu. Je však obtížné oddělit aktivitu  $\beta$ -glukanasy způsobenou obrannou reakcí živých buněk klíčící obilky od aktivity  $\beta$ -glukanasy potřebné k modifikaci stěn buněk škrobového endospermu.

Aktivita chitinasy v nesladovaných obilkách i ve sladu byla v podstatě na stejné úrovni a vztah mezi těmito znaky byl díky tomu velice úzký. Možný vliv závěrečné fáze skladování (hvozďení) na aktivitu chitinasy nebyl studován.

Vztah mezi kontaminací nesladovaných obilke vláknitými mikromycetami zjištěný pomocí testu EPS a aktivitou chitinasy v obilkách (-0,01) a ve sladu (0,08) byl statisticky neprůkazný (tab. 2).

V případě sladu byla situace naprosto odlišná. Kontaminace sladu vláknitými mikromycetami zjištěná pomocí testu EPS byla ve velmi těsném vztahu k aktivitě chitinasy ve sladu (0,92\*\*\*) i v obilkách (0,92\*\*\*). Výsledky EPS testu mají nespojitý charakter a to poznamenalo sílu vztahu mezi aktivitou chitinasy a výsledkem EPS testu. Korelační analýzou bylo zjištěno, že průměrné hodnoty aktivity chitinasy v obilkách i ve sladu byly v podstatě totožné a díky tomu byla korelace mezi těmito dvěma znaky byla velice těsná (0,96\*\*\*) (tab. 2).

Pathogenic microorganisms affect negatively not only the quality of the barley caryopsis but they also complicate following technological process of malt and beer production. Not only penetration but already the contact of the pathogenic organism with the cell induces a number of coordinated intracellular processes with the aim to reduce or completely eliminate its effect and spreading. Only few of these processes are of completely general character [3]. The whole process is connected with the production of new substances (primary and secondary metabolites) both of the infected plant and pathogens [13]. Plant defense consequently induces production of specific substances in the pathogenic microorganism, by which the pathogen achieves to suppress the plant defense reaction. Understanding the detailed mechanism of these reactions has been in the forefront of the world-wide interest and high attention has been devoted to it [14] with the aim to obtain more resistant barley genotypes.

In the present study, the relationships between the activity of chitinase, 1,3- $\beta$ -D-glucanase and the presence of galactomannans (EPS) in a non malted caryopsis and malt, and the selected technological parameters (content of  $\beta$ -glucans in wort, malt gushing, PDMS in malt) were studied.

## 2 MATERIAL AND METHODS

In 2005–2007 samples of caryopses of hulled and hullless barley varieties were taken in the localities Žabčice and Kroměříž. Sets of the varieties differed in the individual years. Totally, 99 samples were studied.

The barley samples collected were malted using the traditional procedure [15]. In non malted barley caryopses and in produced malt, activities of chitinase [16] and 1,3- $\beta$ -D-glucanase [17] were determined, in addition, the agglutination EPS test [18] for the presence of extracellular polysaccharides (galactomannans) produced by filamentous micromycetes was performed.

The level of gushing in malt [19] and content of dimethylsulfide precursor in wort (PDMS) were determined [20], at the same time  $\beta$ -glucan content was assessed in wort [21].

The obtained data were evaluated with the correlation analysis.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

After the attack of filamentous micromycetes, plants defend themselves, inter alia, by the production of enzymes chitinase and 1,3- $\beta$ -D-glucanase that belong to the group of PR proteins. These proteins have specific antimicrobial effects. They hydrolyze pathogen cell walls and produce elicitors of other host defense reactions [22, 23].

The hulled barley caryopses can actively react to the attack of micromycetes only in the period when husks and the pericarp hidden below are alive. The healthy barley plants already contain the genes for chitinase. Intercellular PR and DR proteins have channels in cell walls that enable their transport to the intercellular space [24]. After the attack, the barley plant starts producing chitinase. Chitinase activity found in barley leaves infected with powdery mildew corresponded to the host-pathogen genetic background [25]. At the time of full ripeness, the protection of the caryopsis against the attack of pathogenic micromycetes is passive, based on the chemical composition of husks, pericarp and testa, and their physical characters. During malting, a growing germ or the aleuron layer can actively react to the attack of micromycetes, the other parts of the caryopsis are not alive.

$\beta$ -glucanase activity increased considerably during malting. It was by ca one third higher in malt than in caryopses (Tab. 1). Medium-strong relationship was determined between  $\beta$ -glucanase activity in malt and gushing (0,55\*\*) (Tab. 2). This relationship could be connected with the contamination of germinating caryopses with filamentous micromycetes [8, 9]; this could be a cause of the enhanced gushing level. However, it is difficult to distinguish the activity of  $\beta$ -glucanase caused by the defense reaction of living cells of a germinating caryopsis from the activity of  $\beta$ -glucanase needed for the modification of cell walls of the starch endosperm.

Activity of chitinase in non malted caryopses and malt was generally on the same level and due to it, the relationship between these parameters was very close. The possible impact of the final stage of malting (kilning) on the chitinase activity was not studied.

The relationship between contamination of non malted caryopses with filamentous micromycetes determined by the EPS test and chiti-

Tab. 2 Korelace mezi vybranými znaky kvality sladu a látkami vznikajícími při interakci obilky s patogenem / Table 2 Correlation between the selected malt quality parameters and substances originating at caryopsis-pathogen interaction

	$\beta$ -glukany ve sladině $\beta$ -glucans in wort	Gushing ve sladu Gushing in malt	Chitinas v obilce Chitinase in caryopses	Chitinas ve sladu Chitinase in malt	$\beta$ -glukanasa v obilce $\beta$ -glucanase in caryopses	$\beta$ -glukanasa ve sladu $\beta$ -glucanase in malt	EPS v obilce EPS in caryopses	EPS ve sladu EPS in malt	PDMS ve sladu PDMS in malt
	(mg.l <sup>-1</sup> )	(ml)	(U.kg <sup>-1</sup> )	(U.kg <sup>-1</sup> )	(U.kg <sup>-1</sup> )	(U.kg <sup>-1</sup> )			(mg.kg <sup>-1</sup> )
	s.l.	s.l.	s.l.	s.l.	s.l.	s.l.	s.l.	s.l.	s.l.
$\beta$ -glukany ve sladině / $\beta$ -glucans in wort		-0.10 NS	-0.19 NS	-0.25 *	0.50 ***	0.22 *	0.01 NS	-0.21 *	-0.32 **
Gushing ve sladu / Gushing in malt			0.35 ***	0.46 ***	0.17 NS	0.55 ***	0.47 ***	0.42 ***	0.55 ***
Chitinas v obilce / Chitinase in caryopses				0.96 ***	-0.19 NS	0.12 NS	-0.01 NS	0.92 ***	0.56 ***
Chitinas ve sladu / Chitinase in malt					-0.18 NS	0.22 *	0.08 NS	0.92 ***	0.58 ***
$\beta$ -glukanasa v obilce / $\beta$ -glucanase in caryopses						0.38 ***	0.10 NS	-0.19 NS	-0.04 NS
$\beta$ -glukanasa ve sladu / $\beta$ -glucanase in malt							0.46 ***	0.20 NS	0.35 ***
EPS v obilce / EPS in caryopses								0.13 NS	0.27 **
EPS ve sladu / EPS in malt									0.58 ***
PDMS ve sladu / PDMS in malt									

s.l. – hladina významnosti / significance level  
NS – nevýznamný / non significant

\* p – level = 0.05

\*\* p – level = 0,01

\*\*\* p – level = 0,001

Přítomnost galaktomananů (EPS test) byla vyšší u nesladovaných obilí než u sladu. To by znamenalo, že část houbových vláken je z povrchu obilky v průběhu sladování odstraněna.

Vzhledem k velkému spektru sledovaných odrůd se obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině pohyboval v širokém rozpětí (tab. 1). Korelační analýza naznačila, že má tento znak středně silný vztah pouze k aktivitě  $\beta$ -glukanasy v obilce (0,50\*\*\*), což je pochopitelné. U moderních sladovnických odrůd se požaduje nízký obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině a toho lze dosáhnout pouze vysokou aktivitou  $\beta$ -glukanasy v průběhu sladování. Se znaky spojenými s kontaminací vláknitými mikromycetami má obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině jen slabý nebo nevýznamný vztah. Obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině není pravděpodobně znakem, který je zásadním způsobem ovlivněn kontaminací obilky.

Gushing, jeden z významných kvalitativních nedostatků finálního produktu [26], jehož výskyt je spojován s kontaminací obilí vláknitými mikromycetami, je možno do jisté míry predikovat již ve sladu [27]. Gushing predikovaný ze sladu měl silnou korelaci k aktivitě  $\beta$ -glukanasy ve sladu (0,55\*\*\*), a střední korelaci k přítomnosti galaktomananů (EPS) v obilce (0,46\*\*\*), a sladu (0,42\*\*\*), a k aktivitě chitinasy ve sladu (0,46\*\*\*), a v obilce (0,35\*\*\*).

Obsah PDMS může ovlivnit negativně senzorycké vlastnosti finálního produktu. Středně silnou korelaci měl obsah PDMS k aktivitě chitinasy v obilkách (0,56\*\*\*), a ve sladu (0,58\*\*\*), k aktivitě  $\beta$ -glukanasy ve sladu (0,35\*\*\*), a k přítomnosti galaktomananů (EPS) ve sladu (0,57\*\*\*).

Úroveň gushingu ve sladu a obsah PDMS ve sladu jsou výrazně spjaté se znaky spojenými s kontaminací obilky vláknitými mikromycetami. Tomu odpovídá i vzájemná silná korelace mezi gushingem ve sladu a obsahem PDMS ve sladu (0,55\*\*\*) (tab. 2).

#### 4 ZÁVĚR

Kontaminace obilky ječmene a sladu vláknitými mikromycetami byla spojena s přítomností galaktomananu (EPS test) i zvýšenou aktivitou chitinasy. Nelze jednoznačně říci, že aktivita  $\beta$ -glukanasy byla odpovědí obilky či sladu na kontaminaci mikromycetami. Úroveň gushingu a PDMS je v úzkém vztahu ke znakům signalizujícím napadení obilky (galaktomanan, chitinas) a sladu (galaktomanan, chitinas,  $\beta$ -glukanasa).

Metabolity vznikající při interakci mezi patogenem a obilkou ovlivňují kvalitativní znaky sladu a následně finálního výrobku (gushing, PDMS). Získané výsledky jsou však ovlivněny komplexním charakterem kvalitativních znaků a spletitostí vztahů, které úroveň těchto znaků ovlivňují.

nase activity in caryopses (-0.01) and malt (0.08) was not statistically significant (Tab. 2).

Situation in malt was completely different. Contamination of malt with filamentous micromycetes determined with the EPS test was in a very close relationship to chitinase activity in malt (0.92\*\*\*), and caryopses (0.92\*\*\*). Results of the EPS test are of discrete character and it affected the strength of the relationship between chitinase activity and the result of the EPS test. The correlation analysis determined that the average values of chitinase activity in caryopses and malt were basically identical and therefore the correlation between these two parameters was very close (0.96\*\*\*) (Tab. 2).

The presence of galactomannans (EPS test) was higher in the non malted caryopses than in malt. This could mean that part of fungal fibers was removed from the surface of barley caryopsis during malting.

Considering a large spectrum of the varieties, studied  $\beta$ -glucan content in wort moved in a wide range (Tab. 1). The correlation analysis showed that this parameter had medium-strong relationship only to the  $\beta$ -glucanase activity in a caryopsis (0.50\*\*\*), which is not surprising. In modern malting varieties, low  $\beta$ -glucan content in wort is demanded and this can only be achieved by high activity of  $\beta$ -glucanase during malting. Relationship of  $\beta$ -glucan content in wort and parameters connected with contamination with filamentous micromycetes is only weak or non significant. Content of  $\beta$ -glucans in wort is not probably the parameter that is significantly affected by the caryopsis contamination.

Gushing, one of the major quality deficiencies of the final product [26], the occurrence of which is connected with contamination of caryopses with filamentous micromycetes, can already be predicted to a certain extent in malt [27]. Gushing predicted from malt had a strong correlation to the activity of  $\beta$ -glucanase in malt (0.55\*\*\*), and medium correlation to the presence of galactomannans (EPS) in a caryopsis (0.46\*\*\*), and malt (0.42\*\*\*), and activity of chitinase in malt (0.46\*\*\*), and caryopsis (0.35\*\*\*).

PDMS content can affect negatively sensory characters of the final product. Medium-strong correlation was determined between PDMS content and chitinase activity in caryopses (0.56\*\*\*), and malt (0.58\*\*\*),  $\beta$ -glucanase activity in malt (0.35\*\*\*), and the presence of galactomannans (EPS) in malt (0.57\*\*\*).

Gushing level in malt and PDMS content in malt are significantly connected with the parameters associated with the contamination of the caryopses with filamentous micromycetes. This is also confirmed by a strong correlation between gushing in malt and PDMS content in malt (0.55\*\*\*) (Tab. 2).

**Poděkování**

Prezentované výsledky byly získány a zpracovány za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci řešení Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele (identifikační kód 1M0570).

**LITERATURA / REFERENCES**

1. Chrpová, J., Šíp, V., Sýkorová, S., Sychrová, E.: Možnosti snížení rizika napadení obilnin klasovými fuzariózami. Metodika pro praxi. VÚRV Praha 2007.
2. Okinaka, Y., Mimori, K., Takeo, K., Kitamura, S., Takeuchi, Y., Ymaka, N., Yoshikawa, M.: A structural model for the mechanism of elicitor release from fungal cell walls by plant  $\beta$ -1,3-endoglucanase. *Plant Physiol.* **109**, 1995, 839–845.
3. Gloser J., Prášil I.: Fyziologie stresu. In: Procházka S. (ed.): Fyziologie rostlin. Academia, Praha 1998.
4. Madsen, L. H., Collins, N. C., Rakwalska, M., Backes, G., Sanddal, N., Krusell, L., Jensen, J., Waterman, E. H., Jahoor, A., Ayliffe, M., Langridge, P., Schulze-Lefert, P., Stougaard, J.: Barley disease resistance analogs of the NBS-LRR class – identification and mapping. *Mol. Gen. Genet. Genomics* **269**, 2003, 150–161.
5. Wessels, J. H. G., Stiesma, J. H.: Fungal cell walls: a survey. In: Encyclopedia of Plant Physiology, Plant carbohydrates II. (Eds: Tanner, W., Löwis, F. A.), NY, Springer Verlag, 1981, 352–394.
6. Hlinková, E., Bobák, M., Repka, V., Rafay, J., Kováčová, Z., Hudecová, M.: Biochemické zmeny v bunkových stenách a membránach infikovaných listov jačmeňa nesúceho rôzne gény rezistencie v období sporulácie patogénov. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia rastlín (Ed. M. Užík), Piešťany: VÚRV, 2004, 40–44.
7. Shinshi, H., Neuhaus, J. M., Ryals, J., Meins, F. Jr.: Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol Biol.* **14**, 1990, 357–368.
8. Sela-Buurlage, M. B., Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Melchers, L. S., Van Den Elzen, P. J. M., Cornelissen, B. J. C.: Only Specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and [beta]-1,3-Glucanases Exhibit Antifungal Activity. *Plant Physiol.* **101**, 1993, 857–863.
9. Hlinková, E., Bobák, M., Hudecová, M., Rafay, J., Perečko, D.: PR-proteíny- potenciálny zdroj genetickej informácie na zvýšenie rezistencie hostiteľských rastlín voči patogénom. In: Bežo, M., Kuťšová, J. (eds.) Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín. BIOS 2003, Nitra : SPU, 2003, 35–41.
10. Matusíková, J., Salay, J., Moravčíková, J., Mlynárová, L., Nap, J. P., Libantová, J.: Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta*, **222**, 2005, 1020–1027.
11. Ráčil, Z., Kocmanová, I., Wagnerová, B., Winterová, J., Mayer, J.: Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. *Klin mikrobiol inf lék* **13**, 2007, 176–183.
12. Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., Ostrosky-Zeichner, L.: Differences in beta-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. *Medical Mycology* **44**, 2006, 267–272.
13. Axcell, B., Van Nierop, S., Vundla, W.: Malt Induced Premature Yeast Flocculation, *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **37**, 2000, 501–504.
14. Bartels, D., Nelson, D.: Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant, Cell and Environment* **17**, 1994, 659–667.
15. Psota, V., Horáková, V.: Barley varieties registered in the Czech Republic in 2007. *Kvasny Prum.* **53**, 2007, 168–173.
16. Wirth, S. J., Wolf, G. A.: Micro-plate colourimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biol Biochem.* **24**, 1992, 511–519.

**4 CONCLUSION**

Contamination of barley caryopsis and malt with filamentous micromycetes was connected with the presence of galactomannan (EPS test) and increased activity of chitinase. We cannot definitely state that  $\beta$ -glucanase activity was a response of a caryopsis or malt to the micromycete contamination. Levels of gushing and PDMS are in a close relationship with the parameters signaling the infestation of a caryopsis (galactomannan, chitinase) and malt (galactomannan, chitinase,  $\beta$ -glucanase).

Metabolites arising from the pathogen-caryopsis interaction affect quality parameters of malt and subsequently the final product (gushing, PDMS). However, the acquired results are affected by the complex character of the qualitative parameters and complexity of relationships affecting the level of these parameters.

**Acknowledgements**

The present results were acquired and processed with the support of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within the solution of Research Centre for Study of Extract Compounds of Barley and Hop (identification code 1M0570).

Translated by Vladimíra Nováková

17. McCleary, B. V., Shameer, I.: Assay of malt fl-glucanase using Azo-barley glucan: an improved precipitant. *J. Inst. Brew.* **93**, 1987, 87–90.
18. Schwabe, M., Kamphuis, H., Trumner, U., Offenbacher, G., Kramer, J.: Comparison of the latex agglutination test and the ergosterol assay for the detection of moulds in foods and feedstuffs. *Food and Agricultural Immunology* **4**, 1992, 19–25.
19. Vaag, P., Riis, P., Knudsen, A. D., Pedersen, S. and Meiling, E.: A simple and rapid test for gushing tendency in brewing materials, Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Oslo, IRL Press: Oxford, 1993, pp. 155–162.
20. Dills, R. L., Kent, S. D., Checkoway, H., Kalman, D. A.: Quantification of volatile solvents in blood using static headspace analysis. *Talanta* **38**, 1991, 365–374.
21. European Brewery Convention, Analytica-EBC, Grundwerk. Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg 1998.
22. Van Loon, L. C.: Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **174**, 1985, 111–116.
23. Van Loon L. C, van Strien E. A.: The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 1999, 85–97.
24. Hlinková, E., Perečko, D., Rafay, J., Kováčová, Z., Bobák, M., Kutarňová, Z.: Exochitinázy a exo  $\beta$ -1,3-glukanázy syntetizované v primárnych listoch jačmeňa po infekcii múčnatkou v období sporulácie patogénov. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia rastlín (Ed. M. Užík), Piešťany: VÚRV, 2005, 49–52.
25. Hlinková, E., Bauerová-Hlinková, V., Bobák, M., Valková, D.: Niektoré molekulárne a biochemické vlastnosti PR-4 proteínu syntetizovaného pri interakciách hostiteľ-patogén s rôznym genetickým pozadím. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia rastlín (Eds. V. Šudyová, E. Gregová), Piešťany: VÚRV, 2008, 108–111.
26. Narziss, L., Back, W., Reincheneder, E., Simon, A., Grandl, R.: Investigation into the gushing problem. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **43**, 1990, 296–305.
27. Schwarz, B. P., Beattie, S., Casper, H. H.: Relationship between Fusarium infestation of barley and the gushing potential of malt. *J. Inst. Brew.* **102**, 1996, 93–96.

Recenzovaný článok

Do redakcie došlo: 15. 9. 2009

Prijato k publikovaniu: 8. 11. 2009