

## Identifikace látek vznikajících při interakci patogen – obilka a jejich vliv na kvalitu sladu

### *Identification of Substances Originating from Pathogen – Caryopsis Interaction and Their Effect on Malt Quality*

KAROLÍNA BENEŠOVÁ, RENATA MIKULÍKOVÁ, SYLVIE BĚLÁKOVÁ, ZDENĚK SVOBODA, VRATISLAV PSOTA  
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Mostecká 7, 614 00 Brno  
Research Institute of Brewing and Malting, Mostecká 7, 614 00 Brno  
Email: benesova@brno.beerresearch.cz

**Benešová, K. – Mikulíková, R. – Běláková, S. – Svoboda, Z. – Psota, V.: Identifikace látek vznikajících při interakci patogen – obilka a jejich vliv na kvalitu sladu. Kvasny Prum. 57, 2011, č. 1, p. 2–7.**

Rostliny jsou v průběhu svého života ohrožovány kromě jiných vlivů i patogenními mikroorganismy. Poznatky o negativních účincích patogenních mikroorganismů přítomných na obilce ječmene jsou v současné době neúplné a nedostatečné. Výskyt patogenního mikroorganismu na obilninách může negativně ovlivnit nejen kvalitativní vlastnosti obilky, ale působí i komplikace při následujícím zpracování. Kontakt patogenního mikroorganismu s buňkou vyvolává celou řadu koordinovaných vnitrobuněčných procesů, jejichž cílem je omezit či zcela eliminovat jeho působení a šíření. Celý proces je spojen s tvorbou nových látek (primárních a sekundárních metabolitů) jak napadené rostliny, tak i samotných patogenů. Obranné reakce rostliny vyvolávají následnou reakci (tvorbu specifických látek) u patogenního mikroorganismu, kterou se patogen snaží obrannou reakcí rostliny překonat. Pro komplexní zhodnocení kvality zrna je tedy nutné sledovat kromě nutričně cenných látek také rizikové komponenty, jako jsou právě metabolity (např. mykotoxiny a další) a stresové látky vznikající při interakci patogen-obilka, či rezidua moderních pesticidů, používaných k ochraně plodin. Přítomnost těchto metabolitů v dané surovině nelze vyloučit ani za podmínek dobré zemědělské praxe.

**Benešová, K. – Mikulíková, R. – Běláková, S. – Svoboda, Z. – Psota, V.: Identification of substances originating from pathogen – caryopsis interaction and their effect on malt quality. Kvasny Prum. 57, 2011, No. 1, p. 2–7.**

Besides other effects, plants are during their life endangered also by pathogenic microorganisms. Current information on negative effects of pathogenic microorganisms occurring on a barley caryopsis is incomplete and insufficient. The presence of pathogenic microorganism on cereals can negatively affect not only quality characters of caryopses but it can also complicate following processing. Contact of the pathogenic microorganism with a cell triggers a number of coordinated intracellular processes with the aim to mitigate or fully eliminate its action and spreading. The whole process is connected with creation of new substances (primary and secondary metabolites) of both the infested plant and pathogens. The plant defense reaction evokes a following reaction (production of specific substances) of the pathogenic microorganism by which the pathogen strives to overcome the plant defense reaction. Therefore, for the complex evaluation of grain quality it is necessary to follow not only nutritiously valuable substances but also risk components, such as metabolites (e.g. mycotoxins, etc) and stress substances originating at pathogen-caryopsis interaction and residues of modern pesticides used for plant protection. The presence of these metabolites in the given raw materials cannot be avoided neither under the conditions of good agricultural practice.

**Benešová, K. – Mikulíková, R. – Běláková, S. – Svoboda, Z. – Psota, V.: Identifikation der während der Interaktion Pathogen – Grasfrucht entstehenden Stoffe und ihren Einfluss auf die Malzqualität. Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 1, S. 2–7.**

Die Pflanzen sind im Laufe ihres Lebens neben anderen Einflüsse auch durch Pathogen Mikroorganismen bedroht. Die Erkenntnisse über negative Wirkungen von auf der Grasfrucht anwesenden Pathogen Mikroorganismen sind zurzeit ungenügend und unvollständig. Das Auftreten eines Pathogen Mikroorganismus auf den Getreidepflanzen kann nicht nur Qualitätseigenschaften der Grasfrucht negativ beeinflussen, aber auch Komplikationen während der weiteren Verarbeitung verursachen. Der Kontakt des pathogenen Mikroorganismus mit der Zelle verursacht eine ganze Reihe der koordinierten innerzellulären Prozesse mit dem Ziel eine weitere Wirkung und Ausbreitung des Pathogens zu eliminieren oder zu verhindern. Der ganze Prozess ist mit einer Bildung von neuen Stoffen (primären und sekundären Metabolite) sowohl der angegriffenen Pflanze als auch der Pathogens. Die prophylaktischen Pflanzenreaktionen verursachen eine folgende Reaktion des Pathogens, der eine spezifische Stoffe bildet, mit dem Ziel die prophylaktische Pflanzenreaktion zu inhibieren. Für eine komplexe Kornqualitätsauswertung ist nötig neben den alimentären Wertstoffen auch die Risiko Komponenten zu verfolgen, wie Metaboliten (z.B. Mykotoxine und weitere) und Stresstoffen, die während der Interaktion Pathogen – Grasfrucht entstehen, bzw. die moderne Pestiziden, die zum Pflanzenschutz eingesetzt sind. Auch unter Bedingungen der guten landwirtschaftlichen Praxis ist die Anwesenheit der Metaboliten in den Rohstoffen möglich.

**Klíčová slova:** obilka, patogen, stresové proteiny

**Key words:** caryopsis, pathogen, stress proteins

## 1 ÚVOD

Rostliny se v přírodě často musejí vyrovnávat s velmi nepříznivými podmínkami okolního prostředí. Jejich přežití v těchto podmínkách by nebylo možné bez schopnosti přizpůsobování (adaptability). Čím více a čím déle se okolní prostředí odchyluje od podmínek optimálních pro růst a vývoj rostlin, tím více trvalých změn u nich nacházíme [1]. Stav, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem nepříznivého působení, označujeme jako *stres*, nepříznivé faktory potom jako *stresové faktory* neboli *stresory*. Stresové faktory dále dělíme na biotické a abiotické. Oproti živočichům je stres u rostlin komplikovanější tím, že před působením stresorů nemají možnost přímého úniku. V přirozených podmínkách často působí více stresorů současně, například silné záření, vysoká teplota a nedostatek vláhy. To mnohem škodlivěji působí na rostlinu, než kdyby každý faktor působil sám o sobě. Reakce na stresový faktor nastává na všech funkčních úrovních organismu. Pokud stres pomine, rostlina se vrátí do původního stavu. Pokud stres trvá, rostlina se buď dokáže přizpůsobit, nebo se vyčerpává

## 1 INTRODUCTION

Plants in nature often have to cope with very unfavorable conditions of the environment. Their survival under these conditions would not be possible without their capability to adapt. The more and the longer the environment diverts from the conditions optimal for growth and plant development, the more permanent changes can be found in them [1]. The state of a plant into which the plant gets due to this unfavorable effect is denoted as *stress*, unfavorable factors as *stress factors* or *stressors*. The stress factors can be further split into biotic and abiotic. Unlike animals, stress in plants is more complicated as plants have no possibility how to escape directly from the action of stressors. Under the natural conditions, more stressors often operate simultaneously, for example strong radiation, high temperature and lack of humidity. This affects the plant more harmfully than if each factor acted separately. A reaction to a stress factor occurs at all functional levels of the organism. If stress passes, the plant gets back to its original state. If the stress persists, the plant is either able to adapt to it or it gets ex-

a postupně hyne. Stresová odpověď rostliny závisí jak na délce a intenzitě působení, případně opakování stresové události, tak i na genetických předpokladech rostliny a jejich adaptačních schopnostech.

## 2 PATOGEN

Patogen je biotický faktor, který zapříčiní onemocnění hostitele. Často je používán ve zúženém významu zahrnujícím organismy, které mohou narušit normální fyziologii mnohobuněčných organismů. Za patogeny považujeme všechny organismy včetně virů, viroidů a vláknitých mikromycet. Infekce vniká do rostlin mechanickými poraněními, ale ani pevná buněčná stěna zdravého jedince nemusí průniku patogenů vždy zabránit. V zásadě platí, že vznik choroby a výsledné poškození rostliny je závislé na vzájemných vztazích mezi patogenem, hostitelskou rostlinou a vlivem vnějších podmínek, je tedy nutná souhra tří činitelů. Ze všech patogenů mají největší význam houby (vláknité mikromycety).

## 3 HOUBY

Houby jsou prastaré organismy z karbonu či permu. Dříve byly řazeny k rostlinám, pak pro ně byla vyčleněna vlastní říše. Od zelených rostlin se liší tím, že postrádají chlorofyl a jsou proto odkázány na heterotrofní (organickou) výživu. Organické složky nacházející se vně jejich stélky houby rozkládají tak, že do svého nejbližšího okolí vylučují hydrolytické enzymy. Tyto enzymy štěpí substrát na menší podjednotky, které jsou pak absorbovány [1]. Rozmnožují a šíří se jednobuněčnými či vícebuněčnými výtrusy (sporami). Jejich tělo má jednoduchou stavbu, je složené z rozvětvených a propletených vláken (hyf) nebo může být jednobuněčné (v případě kvasinek). Hlavní strukturální složkou buněčné stěny hub je polysacharid chitin. Sestává z jednotek glukosových derivátů N-acetyl-D-glukosaminu spojených  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidickými vazbami.

Z ekologického hlediska spočívá klíčová role hub v koloběhu uhlíku – tj. schopnosti mikromycetů rozkládat celulózu a jiné odolné rostlinné polysacharidy jako hemicelulózy a lignin. Houby jsou jediné organismy, které jsou schopné rozložit lignin až na  $\text{CO}_2$ . Odbourávání a následné využití hojně se v přírodě vyskytujících  $\beta$ -glukanů, škrobu a glykogenu se uskutečňuje prostřednictvím enzymů  $\beta$ -glukanáz, amyláz (endoglukanázy) a glukoamyláz (exoglukanázy).

Současné však houby parazitující na rostlinách snižují úrodu nebo ničí potraviny a krmivo. Mnohé z nich patří k nejnebezpečnějším patogenům vůbec [1]. V neposlední řadě mají nepříjemné zdravotní dopady na zdraví zvířat a člověka formou infekčních onemocnění, mykoalergií nebo akutních či chronických otrav. Tyto mikroskopické vláknité houby (vláknité mikromycety) bývají označovány vžitým českým názvem plísně.

Mykotoxiny, sekundární toxické metabolity mikromycetů, patří mezi významné přírodní toxiny. Jsou to látky nebiokovinné povahy, toxické pro člověka a živé organismy. Důvod, proč jsou mykotoxiny produkovány, je vysvětlován tím, že jsou prostředkem vláknitých mikromycetů v boji o potravu a přežití. Mykotoxiny nejsou nezbytné při jejich rozvoji ve srovnání s aminokyselinami, mastnými a nukleovými kyselinami nebo proteiny, proto název sekundární metabolity. Zejména vykazují účinky genotoxické, mutagenní, karcinogenní, teratogenní, imunotoxické, hemoragické, neurotoxické, nefrotoxické a hepatotoxické. Jsou neodstranitelné z potravin vařením nebo zmrazením. Ke kontaminaci potravin mykotoxiny dochází nezávisle na vůli a zájmu člověka, nelze jí zamezit, předvídat ani odstranit. V současné době je známo přes 300 mykotoxinů a nadále jsou objevovány a charakterizovány další. Jejich výzkum zdaleka nebyl ukončen a nadále probíhá [např. 2-5].

## 4 OBRANNÁ REAKCE ORGANISMU NA PATOGENNÍ MIKROORGANISMY

Rostlinám chybí adaptivní imunitní systém pro ochranu proti patogenům. Vyvinuly se u nich jiné mechanismy antimikrobiální ochrany. Rezistence rostliny spočívá ve vytvoření podmínek, za kterých patogen není schopný na rostlině růst nebo se množit a rozšiřovat [6].

Mnoho rostlin včetně ječmene vykazuje mnohostrannou obrannou odpověď, pokud jsou napadeny fytopatogeny. Vlastní obranné reakce zahrnují jednak tvorbu specifických stresových proteinů a jednak syntézu a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem.

hausted and fades. The stress response of a plant depends on both on the length and intensity of the impact or repetition of the stress event and plant genetic predispositions and ability to adapt.

## 2 PATHOGEN

Pathogen is a biotic factor that causes a disease in its host. The word is often used in a narrower sense indicating the organisms that can disturb normal physiology of multicellular organisms. Pathogens are all organisms including viruses, viroids and filamentous micromycetes. Infection penetrates into plants through mechanical injuries but not even a solid cell wall of a healthy individual can always prevent penetration of pathogens. Generally, the origin of a disease and resulting plant damage depends on mutual relationships between the pathogen, host plant and the effect of the environment; it means that the interplay of three factors is necessary. The most important pathogens are fungi (filamentous micromycetes).

## 3 FUNGI

Fungi are very old organisms from the Carboniferous or Permian period. Previously they were assigned to plants and then the fungus kingdom was formed. Unlike green plants, it has not chlorophyll and thus they must rely on heterotrophic (organic) nutrition. Fungi release hydrolytic enzymes into the substrate decomposing thus organic material outside their thallus. These enzymes decompose the substrate to minor subunits which are subsequently absorbed [1]. They reproduce by unicellular or multicellular spores. Their body has a simple structure, it is constructed by branched and intertwined filaments (hyphae) or can be unicellular (such as yeasts). The main structural component of the fungal cellular wall is polysaccharide chitin. It consists of units of glucose derivatives N-acetyl-D-glucosamine joined by  $\beta(1\rightarrow4)$  glycosidic bonds.

From an ecological point of view, fungi play a key role in the carbon cycle – i.e. capability of micromycetes to decompose cellulose and other resistant plant polysaccharides such as hemicellulose and lignin. Fungi are the only organisms that degrade lignin completely to  $\text{CO}_2$ . Degradation and following use of, in nature abundantly present,  $\beta$ -glucans, starch and glycogen is realized by the activity of enzymes  $\beta$ -glucanases, amylases (endoglucanases) and glucoamylases (exoglucanases).

Simultaneously, fungi parasitizing on plants reduce crop yield or destroy food and feed. Many of them belong to the most dangerous pathogens [1]. In addition, they affect unfavorably human and animal health causing infectious diseases, mycoallergies or acute or chronic intoxication. These microscopic fibrous fungi (filamentous micromycetes) are usually referred to as moulds.

Mycotoxins, secondary toxic metabolites of micromycetes, belong to important natural toxins. These substances of a non-protein character are toxic for man and vivid organisms. Mycotoxin production is a tool of filamentous micromycetes in their struggle for surviving. Mycotoxins are not necessary for their development unlike amino acids, fatty and nucleic acids or proteins, therefore the name secondary metabolites. They exhibit genotoxic, mutagenic, carcinogenic, teratogenic, immunotoxic, hemorrhagic, neurotoxic, nephrotoxic and hepatotoxic effects. They cannot be eliminated from food by boiling or freezing. Contamination of food with mycotoxins occurs independently of man's will and interest; it cannot be avoided, predicted nor removed. Today more than 300 mycotoxins have been known and still others are being discovered and characterized. Research has not been finished and it has been further continuing [e.g. 2-5].

## 4 THE DEFENSE REACTION OF THE ORGANISM TO PATHOGENIC MICROORGANISMS

Plants do not possess an adaptive immune system for their protection against pathogens. They have developed other mechanisms of antimicrobial protection. Plant resistance is based on creating the conditions under which the pathogen is not able to grow on the plant or reproduce and spread [6].

Many plants including barley exhibit multiple defense reactions to a phytopathogenic assault. The defense reactions include both creation of specific stress proteins and synthesis and accumulation of chemically simpler compounds with pronounced antibiotic effects.

Frequently, a primary impetus for triggering the defense reaction is

Na počátku všech obranných reakcí musí ovšem být podnět k jejich spuštění, kterým obvykle bývá specifický metabolit (*elicitor*) uvolňovaný při počáteční interakci buňky s patogenem a identifikovaný vhodným receptorem hostitelské rostliny. Jako elicitory mohou sloužit jednak některé metabolity vylučované patogeny (exogenní elicitory, např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy), ale i sloučeniny, které se uvolňují z narušovaných buněčných stěn obou organismů (endogenní elicitory). K těm patří např. oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteiny uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub, či oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky [7].

Poměrně častá a překvapivě účinná reakce na průnik patogenů je řízená tvorba ochranných nektrů. V napadené buňce mohou být během několika desítek minut po kontaktu houbové hyfy s buněčnou membránou spuštěny biochemické procesy vedoucí k rychlé zkáze jak vlastní buňky, tak i houbové hyfy. Při této tzv. *hypersenzitivní reakci* dochází k náhlému zvýšení koncentrace aktivních forem kyslíku („*oxidative burst*“) a aktivaci lipáz, i když někdy je provázeno tvorbou některých dalších pro patogen toxických látek (např. polyfenolů). V důsledku pak dochází k rychlé peroxidaci a k rozpadu membránových systémů, a tím i ke smrti buňky. V další fázi dojde k odumření buněk i v blízkém okolí místa infekce. Lokalizovaná nektróza většinou dosti spolehlivě zastaví pronikání a další šíření infekce.

Další reakcí rostlin v průběhu patogenese je produkce nových proteinů, označovaných jako PR- proteiny (*Proteiny indukované patogenem, ang. pathogenesis-related proteins, PRP*). Tyto proteiny zahrnují mimořádně početnou a různorodou skupinu, která je dále dělena na podskupiny podle velikosti a podle převažujících funkcí. PR proteiny mají některé společné fyzikální a chemické vlastnosti, např. jsou selektivně extrahovatelné při nízkém pH nebo vysoce odolné vůči proteolytickým enzymům. PR proteiny deaktivují proteasy, rozkládají buněčné stěny patogenu a jeho proteiny, zasahují reprodukci, deaktivují ribozomy a omezují pronikání patogenu [8]. Řada těchto proteinů vykazuje enzymové vlastnosti, např. chitinasy a glukanas. Peroxidas a lipoxigenasy se podílí na produkci lipidových peroxidů a sekundárních metabolitů s antimikrobiální aktivitou. Mechanismus účinku řady PR proteinů není doposud zcela objasněn. Rozdělení a možnosti využití antifungálních proteinů jako zajímavé alternativy chemických fungicidních látek shrnuje práce [9].

Silné fungicidní účinky mají proteiny inaktivující ribozomy. Zvláštní skupinu obranných proteinů tvoří *thioniny*, které lze nalézt velmi rychle po kontaktu buňky s patogenem v buněčné stěně. Působí na široké spektrum patogenů, pravděpodobně vytvářením pórů v jejich membránách. Velmi rychle jsou také indukovány proteiny přenášející lipidy. Kromě přenosu lipidů do organel jsou potřebné i k tvorbě zesílené kutikuly. U několika dalších stresových proteinů indukovaných patogenem byl zjištěn silný antivirový účinek.

*Sekundární metabolity s ochrannou funkcí* jsou u některých druhů rostlin přítomny trvale, i když v menším množství než při infekci. Patří k nim nejrůznější flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy, které bývají souhrnně označovány jako *phytoncidy* či *inhibitory*.

Zvláštní skupinu specifických nízkomolekulárních obranných látek tvoří *phytoalexiny*, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začínou se vytvářet až po napadení patogenem. V současné době je známo více než 300 phytoalexinů, které po chemické stránce patří mezi velmi různorodé typy sloučenin.

Jiným typem obranných reakcí rostlin je rychlé zvýšení tvorby polysacharidu *kalosy* (1,3- $\beta$ -glukan), který pak vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa. Kalosa je velmi odolná vůči houbovým hydrolázám. Pokud je šíření infekce pomalé, dochází někdy i k tvorbě odlučovací vrstvy a celá infikovaná část rostliny odpadne.

Uvedená ochranná opatření rostlin vůči patogenům nejsou samozřejmě zcela nepřekonatelná, zejména pro některé silně virulentní kmeny hub. Jejich úspěšnost spočívá jednak v mimořádně rychlém růstu hyf (šíří se rychleji, než se stačí aktivovat obranné reakce), jednak v tvorbě specifických látek (*supresorů*), které potlačují vznik hypersenzitivní reakce, tvorbu stresových proteinů a ostatních ochranných metabolitů. Patogenní houby také disponují bohatým arzenálem buněčných jedů, jako je např. fusicoccin (diterpenglukozid houby *Fusicoccum amygdali*) způsobující hyperpolarizaci buněčných membrán silnou stimulací činnosti protonových pump [1].

a specific metabolite (*elicitor*) released at the initial interaction between a cell and a pathogen and identified by a suitable host plant receptor. Elicitors can be some metabolites released by pathogens (exogenous elicitors, such as some polysaccharides, specific enzymes and peptides) and also compounds released from disrupted cellular walls of both the organisms (endogenous elicitors), such as chitin oligomers, oligoglucans and glycoproteins released by hydrolysis of pathogenic fungi cell wall or oligogalacturonans released from a cell wall of the attacked cell [7].

A controlled formation of protective necroses is a relatively frequent and surprisingly efficient reaction to the penetration of pathogens. Within a few tens of minutes after the contact between the fungal hypha and the cell, biochemical processes leading to the rapid destruction of the cell itself and fungal hypha begin. During this so-called *hypersensitive reaction*, concentration of active oxygen forms is suddenly increased (*“oxidative burst”*) and lipase activated although sometimes it can be accompanied with production of some other and for the pathogen toxic substances (for example polyphenols). This results in rapid peroxidation and breakdown of the membrane systems and thus cell death. In the next phase, cells in the immediate vicinity of the infection die. Localized necrosis quite reliably stops penetration and further spread of the infection.

Another plant reaction during pathogenesis is a production of new proteins denoted as PR- proteins (*pathogenesis-related proteins, PRP*). These proteins include an extremely numerous and heterogeneous group which is further split into subgroups based on a size and prevailing functions. PR proteins have some common physical and chemical characters, for example they are selectively extractable at low pH or highly resistant to proteolytic enzymes. PR proteins deactivate protease, degrade cell walls of the pathogen and its proteins, affect reproduction, deactivate ribosomes and impede penetration of the pathogen [8]. Many of these proteins exhibit enzymatic characters, such as chitinase and glucanase. Peroxidase and lipoxygenase participate in the production of lipid peroxides and secondary metabolites with antimicrobial activity. The mechanism of the effect of many of PR proteins has not been fully elucidated yet. A classification and possibilities of using antifungal proteins as an interesting alternative to chemical fungicidal substances are summarized in the study by Heřmanová et al. [9].

Ribosome-inactivating proteins exert strong fungicide effects. *Thionins*, a special group of defense proteins, can be found very quickly after the contact between a cell and a pathogen in the cell wall. It affects a wide spectrum of pathogens, probably by creating pores in their membranes. Lipid-transfer proteins are very quickly induced too. Besides the transfer of lipids between organelles, they are also needed for strengthening the cuticula. Strong antiviral effect was found in some other stress proteins induced by pathogens.

*Secondary metabolites with protection functions* are in some plant species present permanently although in a lower amount than during an infection. These are various flavonoids, terpenoids, phenolic compounds and alkaloids that are summarily denoted as *phytoncides* or *inhibitors*.

*Phytoalexins*, a special group of specific low molecular weight defense substances, do not occur under normal circumstances in cells but their production starts upon pathogen attack. Today more than 300 phytoalexins have been known; chemically they belong to various types of compounds.

Another type of the plant defense reaction is a fast enhancement of production of polysaccharide *callose* (1,3- $\beta$ -glucan), which fills the cells in the vicinity of the infected area. Callose is very resistant to fungal hydrolases. If spread of the infection is slow, a separation layer may be formed and the whole infected part of the plant falls off.

Definitely, the above given protective measures of plants against pathogens are not completely unsurpassable, especially for some strongly virulent fungal species. Their success lies in extremely fast growth of hyphae (they spread more quickly than the defense reactions can be activated) and in production of specific substances (*supresors*) that suppress hypersensitive reactions, production of stress proteins and other protective metabolites. Pathogenic fungi also possess a rich arsenal of cellular poisons, such as fusicoccin (diterpen glucoside of *Fusicoccum amygdali*) causing hyperpolarization of cell membranes by a strong stimulation of the activity of proton pumps [1].

## 5 CHITINASA A GLUKANASA

Z PR proteinů jsou pro obranu rostlin proti patogenům významné *chitinasa* a 1,3- $\beta$ -*glukanasa* pro svou schopnost hydrolýzy buněčné stěny parazitů a produkce elicitorů pro další obranné reakce. Přírodním zdrojem substrátů pro tyto stresové proteiny jsou právě bu-

## 5 CHITINASE AND GLUCANASE

PR proteins, *chitinase* and 1,3- $\beta$ -*glucanase*, are important for plant protection against pathogens due to their ability to hydrolyse cell walls



něčné stěny hub. Po degradaci strukturálních polysacharidů buněčné stěny hub (chitinasu degraduje chitin a  $\beta$ -(1,3)-glukanasa laminarin) pak vzniklé fragmenty pravděpodobně spouštějí obranné reakce infikované rostliny. 1,3- $\beta$ -glukanasa také zvyšuje permeabilitu buněčných stěn patogenu, takže dochází k úniku elektrolytu a makromolekul z patogenní buňky a k jejímu odumření [10]. Každý ze stresových enzymů se vyskytuje v několika izozymických formách a jejich aktivita silně závisí na místě sekrece v buňce (apoplast, vakuola) [11]. V mnoha případech působí PR proteiny synergicky pro zabránění růstu hub, u některých patogenů byla ovšem pozorována tvorba proteinů, které inhibují rostlinné  $\beta$ -(1,3)-glukanasy. Je to evoluční adaptace patogenu na obranné mechanismy rostliny [12].

## 6 KONTAMINACE JEČMENE A SLADU

Na kořenech, listech, klasech a obilkách ječmene se vyskytuje široké spektrum fytopatogenních hub. Na obilkách se tyto mikroorganismy vyskytují po celou dobu jejich skladování i v průběhu sladování. Polní mikroflóra se nachází na rostlinách po celou dobu jejich růstu na poli. Po sklizni pak dochází ke kvalitativním i kvantitativním změnám mikroflóry a vzniklé spektrum mikroorganismů se označuje jako skladištní mikroflóra. Na její složení má vliv průběh počasí, lokalita, doba sklizně a pěstovaná odrůda. Skladištní mikroflóru ovlivňuje teplota, vlhkost zrna a doba skladování. Mikroflóra sladu závisí na podmínkách skladovacího procesu. Ječmen může být v polních podmínkách kontaminován zejména mikromycetami rodů *Fusarium* a *Alternaria*, také *Cladosporium* a *Helminthosporium* apod. Během transportu, skladování nebo zpracování může dojít ke kontaminaci mikroorganismy, hlavně *Aspergillus* a *Penicillium*. Při skladování zemědělských plodin je kritickým faktorem limitujícím růst mikromycet obsah dostupné vody. Při sladování vznikají výhodné podmínky pro růst mikroorganismů, jejich počet roste během celého máčení a klíčení. Obměna máčecí vody může sice část mikroorganismů odstranit, přesto jejich počet dosahuje vrcholu až během klíčení. Při hvozdnění dochází k poklesu mikroflóry, ale ne k jejímu vymizení. Četnost mikroorganismů je často vyšší u sladu než u sklizeného ječmene. Nejčastějšími rody mikromycet, které se vyskytují ve sladu, jsou *Aspergillus*, *Penicillium* a *Rhizopus* [13]. Kvalita sladu ovlivňuje proces výroby piva a má stěžejní význam i v docílení požadovaného chemického složení, organoleptických vlastností a koloidní stability piva.

## 7 ANALYTICKÉ STANOVENÍ VYBRANÝCH TECHNOLOGICKÝCH PARAMETRŮ A LÁTEK VZNIKAJÍCÍCH PŘI INTERAKCI PATOGEN – OBIKA

**Stanovení  $\beta$ -glukanů:**  $\beta$ -glukany jsou vysokomolekulární polysacharidy obsažené v obilkách ječmene. Endospermální buněčné stěny ječmene obsahují asi 75 %  $\beta$ -glukanů. Hladinu  $\beta$ -glukanů v ječmeni, sladu, sladidně i pivu lze stanovit metodou FIA (Flow-injection analysis) [14], jejímž principem je vstříkávání vzorku do nosného proudu tlumivého roztoku a činidla. Vysokomolekulární  $\beta$ -glukany vytvoří s barvivem Fluorochrom Calcofluor fluoreskující komplex. Intenzita fluorescence je následně analyzována fluorescenčním detektorem. Výhodou je časová nenáročnost.

**Stanovení stresových enzymů:** V literatuře je popsána řada postupů na stanovení aktivit stresových proteinů. Mezi základní metody stanovení aktivity  $\beta$ -glukanasy patří měření přírůstků redukujících sacharidů [15] a viskozimetrické metody [16-18], které jsou založeny na stanovení úbytku viskozity  $\beta$ -glukanového substrátu působením  $\beta$ -glukanasy. Rozdíly jsou jednak v použitém substrátu, jednak ve způsobu stanovení viskozity. Na jiném principu je založena metoda stanovení aktivity  $\beta$ -glukanasy radiální difúzí [18-19]. Jedná se o difúzi enzymu agarosovým gelem obsahujícím  $\beta$ -glukanový substrát a kongo červen. Toto barvivo nereaguje s  $\beta$ -glukany ani s oligosacharidy, které produkují  $\beta$ -glukany účinkem  $\beta$ -glukanasy a je tedy pro její stanovení vhodné [20]. Aktivita enzymu se pak stanovuje z velikosti odbarvené plochy. Mezi rychlé a snadno proveditelné postupy stanovení aktivity enzymů patří využití chemicky modifikovaného, rozpustného a barevně označeného substrátu (dye-labelled metoda). Azo-barley glukanový substrát je inkubován se sladovým extraktem za definovaných podmínek. Barevný substrát se enzymem depolymerizuje na fragmenty, které jsou rozpustné v přítomnosti srážecího činidla. Po odstředění směsi se měří na spektrofotometru absorbance supernatantu, která je přímo úměrná enzymové aktivitě [21-22].

of parasites and produce elicitors for other defense reactions. Cell walls of fungi are a natural source of substrates for these stress proteins. After degradation of structural polysaccharides of fungal cell walls (chitinase degrades chitin and  $\beta$ -(1,3)-glucanase laminarin), the fragments formed probably trigger the defense reactions of the infected plant. 1,3- $\beta$ -glucanase also increases permeability of pathogen cell walls allowing thus electrolyte and macromolecules leak from a pathogenic cell which subsequently dies [10]. Each of stress enzymes occurs in several isozymic forms and their activity strongly depends on a place of secretion in a cell (apoplast, vacuole) [11]. In many cases PR proteins act synergically to prevent the growth of fungi, however, in some pathogens production of proteins inhibiting plant  $\beta$ -(1,3)-glucanase was observed. It is an evolutionary adaptation of the pathogen to plant defense mechanisms [12].

## 6 CONTAMINATION OF BARLEY AND MALT

A wide spectrum of phytopathogenic fungi occurs on barley roots, leaves, ears and caryopses. On the caryopses, these microorganisms occur for the whole time of their storage and during malting. Field microflora is found on plants for the whole period of their growth on a field. After harvest, qualitative and quantitative changes in microflora occur and a spectrum of microorganisms created is denoted as a storage microflora. Its composition is affected by the weather, locality, harvest time and the variety grown. The storage microflora is affected by temperature, grain moisture and a period of storage. Malt microflora depends on malting process conditions. Under the field conditions, barley can be contaminated first of all by micromycetes of species of *Fusarium* and *Alternaria*, and also *Cladosporium* and *Helminthosporium*, etc. During transport, storage or processing contamination with microorganisms, mainly *Aspergillus* and *Penicillium* can occur. At storage of agricultural crops, a critical factor limiting the growth of micromycetes is content of available water. At malting, favorable conditions for the growth of microorganisms are formed, their number increases during the whole phase of kilning and germination. Exchange of steeping water can eliminate some microorganisms, nevertheless their number achieves the maximum only during steeping. During kilning microflora declines but it is not completely removed. Quantity of microorganisms is often higher in malt than in harvested barley. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus* are the most frequently occurring micromycete species in malt [13]. Malt quality affects the brewing process and is of a key significance for achieving required chemical composition, organoleptic characters and beer colloid stability.

## 7 ANALYTICAL DETERMINATION OF SELECTED TECHNOLOGICAL PARAMETERS AND SUBSTANCES ORIGINATING AT PATHOGEN – CARYOPSIS INTERACTION

**Determination of  $\beta$ -glucans:**  $\beta$ -glucans are high molecular weight polysaccharides contained in barley caryopses. Barley endosperm cell walls contain about 75 % of  $\beta$ -glucans.  $\beta$ -glucan level in barley, malt and beer can be determined by the FIA (Flow-Injection Analysis) method [14]. Sample is injected into a flowing carrier stream of reagent. High molecular weight  $\beta$ -glucans together with a Fluorochrom Calcofluor dye form fluorescing complexes. Subsequently, fluorescence intensity is analyzed with a fluorescent detector. The advantage is time undemandness.

**Determination of stress enzymes:** Numerous methods for the determination of stress protein activity have been described in the literature. The basic methods for the determination of  $\beta$ -glucanase activity include measurement of the accruals of reducing saccharides [15] and viscosimetric methods [16-18], which are based on the determination of the decrease in viscosity of  $\beta$ -glucan substrate caused by  $\beta$ -glucanase activity. The differences are both in the substrate used and in the determination of viscosity. The method for the determination of  $\beta$ -glucanase activity using radial diffusion is based on [18-19] the diffusion of the enzyme through an agarose gel containing  $\beta$ -glucan substrate and kongo red. This dye does not react with  $\beta$ -glucans or oligosaccharides that produce  $\beta$ -glucans due to  $\beta$ -glucanase activity therefore it is suitable for the determination [20]. Activity of the enzyme is then determined from the size of a discolored area. The dye-labelled method belongs to fast and easy assays for the determination of enzyme activity, it uses a chemically modified, soluble and dye-stained substrate. Malt extract is incubated with Azo-Barley glucan substrate under the defined conditions. The dyed substrate is depoly-

V případě chitiny lze jako substrát použít radioaktivní chitin připravený acetylací chitosanu tritiováním acetanhydridem [23]. Tato rychlá a citlivá metoda je založena na nerozpustnosti chitinu a rozpustnosti reakčního produktu diacetylchitobiosy ve vodě. Dřívější metoda využívala jako substrát koloidní chitin degradovaný obvykle streptomycetovou chitinase na disacharid diacetylchitobiosu. Při delší inkubaci se pak disacharid degradoval na produkt reagující s p-dimethylaminobenzaldehydem [24-25]. Postup s radioaktivním chitinem je snadnější a rychlejší. Navíc reacytovaný chitin je možné využít jako náhradu koloidního chitinu v dalších aplikacích (např. jako adsorbent při purifikaci chitiny). Další možností je použití chromogenního substrátu CM-chitin-Remazol-Brilant-Violet. Po inkubaci a odstředění se měří absorbance při 550 nm [26-27].

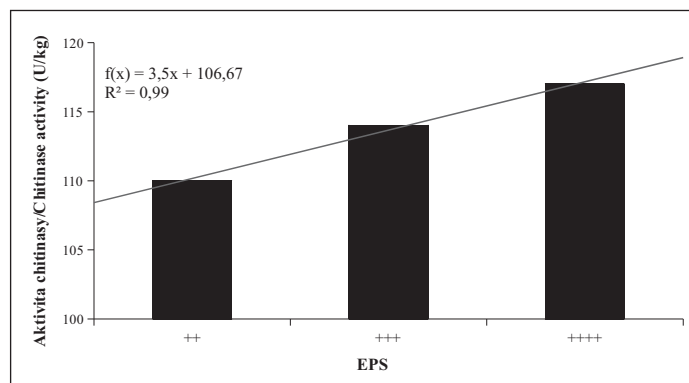
**Stanovení kontaminace mikromycetami [28]:** Kontaminaci vzorků mikromycetami lze stanovit pomocí EPS – aglutinačního testu na přítomnost extracelulárních polysacharidů (galaktomananů), které jsou vláknitými mikromycetami produkovány. Další možností stanovení kontaminace fusarií je sledování obsahu ergosterolu [29].

**Stanovení prekurzorů dimethylsulfidu:** Sirné látky vznikají ze svých prekurzorů enzymovými reakcemi při poškození rostlinných pletiv. Prekurzory těkavých sirných sloučenin jsou většinou netěkavé sirné sloučeniny, aminokyseliny cystein, cystin, methionin a jejich deriváty. Dimethylsulfid patří k významným chuťovým složkám piva, pocházejícím převážně ze sladu. K jeho tvorbě přispívají složky, které při vysokém obsahu ve sladu a chybou v technologii mohou vést ke koncentracím v pivu nad senzorický práh. Dimethylsulfid vzniká disproportionací dimethyldisulfidu, oxidací methanthiolu vzniklého z methioninu nebo rozkladem S-methylmethioninu. Koncentrace prekurzoru dimethylsulfidu (dále jen PDMS) ve vzorcích se měří pomocí techniky head space spojené s plynovou chromatografií s FPD [např. 30] nebo hmotnostně-spektrometrickou detekcí [např. 31].

## 8 VLIV LÁTEK VZNIKAJÍCÍCH PŘI INTERAKCI PATOGEN – OBIKA NA KVALITU SLADU

V průběhu let byly sledovány vztahy mezi aktivitou stresových proteinů chitiny a  $\beta$ -glukanasy a napadením houbami rodu *Fusarium* (EPS) v nesladované obilce i ve sladu s vybranými technologickými znaky (obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině a PDMS ve sladu) [32].

V průběhu sladování se výrazným způsobem zvýšila aktivita  $\beta$ -glukanasy, byla přibližně o třetinu vyšší ve sladu než v obilkách. Aktivita chitiny v nesladovaných obilkách i ve sladu byla v podstatě na stejné úrovni a vztah mezi těmito znaky byl díky tomu velice úzký. Kontaminace sladu vláknitými mikromycetami zjištěná pomocí testu EPS byla ve velmi těsném vztahu k aktivitě chitiny v obilkách i ve sladu (obr. 1). Přítomnost galaktomananů (EPS test) byla vyšší u obilky ječmene než u sladu. Obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině je pro finálního výrobce důležitým ekonomickým znakem. Vzhledem k širokému spektru sledovaných odrůd se obsah  $\beta$ -glukanů pohyboval v širokém rozpětí. Obsah PDMS měl středně silnou korelaci k aktivitě chitiny v obilkách a ve sladu, k aktivitě  $\beta$ -glukanasy ve sladu a k přítomnosti galaktomananů (EPS) ve sladu. Obsah  $\beta$ -glukanů ve sladině není pravděpodobně znakem, který by byl zásadním způsobem ovlivněn kontaminací obilky. Naproti tomu obsah PDMS ve sladu je výrazně spjat se znaky spojenými s kontaminací obilky vláknitými mikromycetami [32].



Obr. 1 Závislost aktivity chitiny na EPS ve sladu / Fig. 1 Dependence of chitinase activity on EPS

merised by malt fragments soluble in the presence of a precipitation agent. After centrifugation, supernatant absorbance is measured on a spectrophotometer, the absorbance is directly proportional to enzyme activity [21-22].

For chitinase, radioactive chitin prepared by acetylation of chitosan with tritiated acetic anhydride can be used as a substrate [23]. This fast and sensitive method is based on insolubility of chitin and solubility of the reaction product, diacetylchitobiose, in water. A previous method used as a substrate colloid chitin usually degraded by streptomyces chitinase to disaccharide diacetylchitobiose. During a longer incubation disaccharide degrades to a product reacting with p-dimethylaminobenzaldehyde [24-25]. The method using radioactive chitin is easier and faster. Furthermore, reacylated chitin can be used instead of colloid chitin in further applications (such as adsorbent at chitinase purification). Use of chromogenic substrate CM-chitin-Remazol-Brilant-Violet is also possible. After incubation and centrifugation, absorbance is measured at 550 nm [26-27].

**Determination of contamination with micromycetes [28]:** Sample contamination with micromycetes can be determined with the agglutination EPS test for the presence of extracellular polysaccharides (galactomannans), which are produced by filamentous micromycetes. Monitoring of ergosterol content is another possible method of the determination of fusarium contamination [29].

**Determination of dimethyl sulfide precursors:** Sulphur substances are formed from their precursors by enzymatic reactions upon plant tissue damage. Precursors of volatile sulphur compounds are mostly non-volatile sulphur compounds, amino acids cysteine, cystine, methionine and their derivatives. Dimethyl sulfide belongs to important beer flavor components coming prevalently from malt. Its production is supported by components, which at high content in malt and by a mistake in technology can lead to concentrations in beer above sensory threshold. Dimethyl sulfide is created by disproportionation of dimethyl disulfide, oxidation of methanthiol formed from methionine or degradation of S-methyl methionine. Concentration of dimethyl sulfide precursor (PDMS) in samples is measured with the head space technique coupled with gas chromatography with FPD [e.g. 30] or mass-spectrometric detection [e.g. 31].

## 8 THE EFFECT OF SUBSTANCES ORIGINATING FROM PATHOGEN – CARYOPSIS INTERACTION ON MALT QUALITY

Over the years the relationships between activity of stress proteins chitinase and  $\beta$ -glucanase and attack by fungi of *Fusarium* species (EPS) in a non-malted caryopsis and malt and selected technological parameters ( $\beta$ -glucan content in sweet wort and PDMS in malt) were studied [32].

During malting,  $\beta$ -glucanase activity increased markedly, it was approximately by one third higher in malt than in caryopses. Chitinase activity in non-malted caryopses and in malt was nearly on the same level and relationship between these parameters was due to it very tight. Contamination of malt with filamentous micromycetes determined with the EPS test was in a very close relationship to chitinase activity in caryopses and malt (Fig. 1). The presence of galactomannans (EPS test) was higher in barley caryopses than in malt.  $\beta$ -glucan content in sweet wort is an important economic parameter for a final producer. Considering a wide spectrum of the varieties studied,  $\beta$ -glucan content varied in a wide range. PDMS content had medium strong correlation to chitinase activity in caryopses and malt,  $\beta$ -glucanase activity in malt and the presence of galactomannans (EPS) in malt.  $\beta$ -glucan content in sweet wort is not probably a trait principally affected by caryopsis contamination. Conversely, PDMS content in malt is markedly associated with the parameters connected with contamination of caryopsis with filamentous micromycetes [32].

## 9 CONCLUSIONS

Interaction between a pathogenic microorganism and caryopsis is accompanied with a number of processes which aims at reducing or eliminating the action of the pathogen. Within this process, cells of a caryopsis and pathogene produce specific substances that can unfavorably affect grain processing and quality and health suitability of the final products. The level of a caryopsis reaction to the micromycete attack can be studied by the determination of activities of chitinase

## 9 ZÁVĚR

Interakce patogenního mikroorganismu s obilkou je provázána celou řadou procesů, jejichž cílem je omezit nebo eliminovat působení patogena. V rámci tohoto procesu produkují buňky obilky a patogena specifické látky, které mohou nepříznivě ovlivnit průběh zpracování zrna obilnin a kvalitu a zdravotní nezávadnost finálních výrobků. Stanovením aktivit enzymů chitinasy a  $\beta$ -glukanasy, kterými se snaží napadená obilka bránit, lze sledovat úroveň reakce obilky na napadení mikromycetami. Přítomnost některých skupin mikromycet je možno sledovat pomocí přítomnosti polysacharidu galaktomananu. Vztahy mezi některými znaky, např. mezi aktivitou chitinasy a výskytem galaktomananu ve sladu jsou úzké. Vzájemná interakce mezi patogenem a obilkou se částečně odráží na úrovni některých znaků charakterizujících kvalitu finálního výrobku (gushing, PDMS a další). Většinou však získané výsledky poskytují pouze hrubou představu o změnách sladovnické kvality, protože dopad interakce patogenu a obilky na technologické znaky je komplexního charakteru.

### Poděkování

Práce publikovaná v tomto článku byla finančně podporována z grantu 1M0570 – Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele.

### LITERATURA / REFERENCES

- Gloser, J., Prášil, I.: Fyziologie stresu. In: Fyziologie rostlin, Academia Praha, 1998.
- Havlová, P., Lancová, K., Váňová, M., Havel, J., Hajšlová, J.: The effect of fungicidal treatment on selected quality parameters of barley and malt. *J. Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2006, 1353–1360.
- Hégrová, B., Jedličková, B., Havlová, P., Havel, J.: Determination of deoxynivalenol levels in barley, malt and intermediate products of malting process by HPLC/MALDI-TOF MS. In: Vitamins 2008 Nutrition and Diagnostics, ISBN 978-80-7318-708-8, s. 86–87. 2008, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- Blechová, P., Havlová, P., Gajdošová, D., Havel, J.: Environmental Toxicology **21**, 2006, 403–408.
- Malíř, F., Psota, V., Roubal, T., Severa, J., Mareček, J., Hubík, K.: Plísňe a mykotoxiny v cereáliích a pivovarských surovinách, zásady způsobu odběru vzorků ke stanovení mykotoxinů. *Kvasny Prum.* **47**, 2001, 172–173.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller, T.: Antifungal Hydrolases in Pea Tissue II, Inhibition of Fungal Growth by Combination of Chitinase and  $\beta$ -(1,3)-glucanase. *Plant Physiol.* **88**, 1998, 936–942.
- Šašek, V., Prášil, K.: Houby. In: Nový přehled biologie. Scientia pedagogické nakladatelství, Praha 2003.
- Zareie, R., Melanson, D. L., Murphy, P. J.: Isolation of Fungal Cell Wall Degrading Proteins from Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Leaves Infected with *Rhynchosporium secalis*. *Molecular-Plant Microbe Interactions* **15**, 2002, 1031–1039.
- Heřmanová, V., Bárta, J., Čurn, J.: Antifungální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití. *Chem. Listy* **100**, 2006, 495–500.
- Hlinková, E., Bobák, M., Repka, V., Rafay, J., Kováčková, Z., Hudecová, M.: Biochemické změny v bunkových stenách a membránách infikovaných listů jačmeňa nesúceho rôzne geny rezistencie v období sporulácie patogénov. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia rastlín (Ed. M. Užík), Piešťany: VÚRV, 2004, 40–44.
- Rothe, G. M., Welschbillig, N., Reiss, E.: Molecular Size and net charge of pathogenesis-related proteins from barley (*hordeum vulgare* L., v. Karat) infected with *Drechslera teres* f. *terres* (sacch.). *Shoem. Electrophoresis* **19**, 1998, 745–751.
- Odjakova, M., Hadjivanova, Ch.: The Complexity of Pathogen Defense in Plant. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* **27**, 2001, 101–109.
- Doohan F. M., Brennan J., Cooke B. M.: Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 2003, 755–768.
- Trojanowicz, M.: Flow Injection Analysis. Instrumentation and Applications, World Scientific. Ltd., Singapore, 2000.
- Denault, J., Allen, W. G., Boyer, E. W., Collins, D., Krammed, D., Spradlin, J. E.: A Simple Reducing Sugar Assay for Measuring  $\beta$ -Glucanase Activity in Malt, and Various Microbial Enzyme Preparations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **36**, 1978, 18–22.
- Bamforth, C. W.: Barley  $\beta$ -glucans: their role in malting and brewing. *Brewest Digest* **57**, 1982, 22–27.
- Woodward, J. R., Fincher, G. B.: Purification and chemical properties of two 1,3:1,4- $\beta$ -glucan endohydrolases from germinating barley. *Eur. J. Biochem.* **121**, 1982, 663–669.
- Wood, P. J.: Factors affecting precipitation and spectral changes associated with complex formation between dyes and  $\beta$ -D-glucan. *Carbohydr. Res.* **102**, 1982, 283–293.
- Wood, P. J., Fulcher, R. G.: Interaction of Some Dyes with Cereal Beta-Glucans. *Cereal Chem.* **55**, 1978, 952–966.
- Wood, P. J.: Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **85**, 1980, 271–287.
- McCleary, B. V., Shamer, I.: Assay of malt  $\beta$ -glucanase using Azo Barley Glucan: an improved precipitant. *J. Inst. Brew.* **93**, 1987, 87–90.
- Gill, A. A.: A comparison of two methods of the estimation of  $\beta$ -glucanase activity in malt. *J. Inst. Brew.* **93**, 1987, 392–393.
- Molano, J., Durán, A., Cabib, E.: A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.* **83**, 1977, 648–656.
- Jeuniaux, C.: in Methods of enzymology, 1966 (Neufeld, E. F., Ginsburg, V., eds. Vol. 8, p 644–654), Academic Press, New York.
- Wu, Ch. T., Bradford, K. J.: Class I Chitinase and  $\beta$ -1,3-Glucanase Are Differentially Regulated by Wounding, Methyl Jasmonate, Ethylene, and Gibberellin in Tomato Seeds and Leaves. *Plant Physiology* **133**, 2003, 263–273.
- Wirth, S. J., Wolf, G. A.: Microplate, colourimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 1992, 511–519.
- Loscos, N., Segurel, M., Dagan, L., Sommerer, M., Marlin, T., Baumes, R.: Identification of S-methylmethionine in Petit Manseng grapes as dimethyl sulphide precursor in wine. *Analytica Chimica Acta* **621**, 2008, 24–29.
- 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.
- Jedličková, L., Gadas, D., Havlová, P., Havel, J.: Determination of Ergosterol Levels in Barley and Malt Varieties in the Czech Republic via HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 2008, 4092–4095.
- Dills, R. L., Kent, S. D., Checkoway, H., Kalman, D. A.: Quantification of volatile solvents in blood by static headspace analysis. *Talanta* **38**, 1990, 365–374.
- Mills, G. A., Walker, V.: Head space solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations. *J. Chrom. B* **753**, 2001, 259–268.
- Psota, V., Benešová, K., Sachambula, L., Havlová, P.: Vztah aktivity  $\beta$ -glukanasy, chitinasy a výskytu galaktomananu k úrovni gushingu, PDMS a obsahu beta-glukanů ve sladu a obilkách ječmene (*Hordeum vulgare* L.). *Kvasny Prum.* **56**, 2010, 74–78.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 19. 11. 2010

Přijato k publikování / Accepted for publication: 6. 12. 2010