

SPECTROSCOPIC MARKERS OF BARLEY COMPONENTS.

Eva Budilová, Andriy Synytsya, František Kvasnička, Jana Čopíková, Kateřina Vaculová

ABSTRACT

In this work FT-IR (400–4000 cm^{-1}) spectra of milled barley grains were measured and used for qualitative identification of main chemical constituents: proteins, starch, arabinoxylans and β -glucans. Characteristic IR bands of these hydrocolloids were found and assigned to specific bond and group vibrations. Peaks of starch at 930, 859, 765, 710, 608, 576, 529, 478 and 440 cm^{-1} were well pronounced in the spectra of all the samples, while the peaks of cereal glucans were not so evident. Vibration bands of methyl and amide groups were indicated the presence of proteins. Specific bands of lipids and phenolic acids were also found.

Keywords: barley, hydrocolloids, FTIR

ÚVOD

Ječmen (*Hordeum vulgare*, L.) se řadí mezi nejstarší zemědělské plodiny a k celosvětově hospodářsky nejvýznamnějším rostlinám (Baik a Ullich, 2008). Ještě nedávno se většina vypěstovaného ječmene v ČR spotřebovala ke krmným účelům, nyní se v rámci vize českého zemědělství po roce 2010 (Šír a kol., 2010) řeší otázka krmných obilovin především ve vztahu k soběstačnosti v oblasti produkce masa. Toto souvisí s hlavním záměrem ve výrobě obilovin, kterým je zlepšení relace mezi potravinářským a krmným obilím tak, aby byla vždy ve prospěch potravinářského obilí, s cílem exportovat část kvalitní produkce obilovin převyšující domácí spotřebu do zahraničí. V případě ječmene jarního je výrazem "potravinářské využití" míněno především využití produkce zrna k výrobě sladu pro pivovarský průmysl. Přímé potravinářské využití ječmene v pekárnictví a dalších zpracovatelských směrech (např. k výrobě ječných krup, náhražek kávy, apod.) je velmi nízké (do 5% produkce), nicméně i zde se rýsují nové perspektivy.

Tvorba nových odrůd ječmene pro rozdílné konečné směry využití je tedy spojena s chemickým složením zrna. Hydrokoloidy v zrně ječmene představují především bílkoviny a polysacharidy. Škrob je hlavní složkou endospermu zrn ječmene a je uložen ve 2–30 μm krystalických, vejčitých zrnech. Obsah škrobu v zrně sladovnického ječmene činí průměrně 62–65 % (Lekeš et al., 1985). Škrob v zrně ječmene je tvořen dvěma polysacharidy – lineární amylosou (20–25 %) a větveným amylopektingem (70–75 %). Existují však odrůdy, které obsahují škroby s vysokým (> 35 %) nebo naopak nízkým (1–10 %) podílem amylosy (Patron et al., 2002). Ze stavebních polysacharidů buněčných stěn jsou v zrně ječmene zastoupeny celulóza (3,5 – 7,0 %) a řada hemicelulos, zejména arabinoxylany a (1→3,1→4)- β -d-glukany, které napomáhají vázání vody a udržování rovnováhy buněčného obsahu. Hemicelulosa jsou lokalizovány hlavně v buněčných stěnách endospermu (70–75 % β -d-glukanů a 20–25% arabinoxylanů) (Lekeš et al., 1985; Fincher a Stone, 1986). Buněčné stěny aleuronu jsou složeny v průměru ze 26 % β -d-glukanů, 67 % arabinoxylanů a 2 % celulózy (Bacic a Stone, 1981).

Obsah β -d-glukanů v zrně ječmene (obvykle 2 až 10 %) závisí na genotypu: pro potravinářské účely jsou vhodné odrůdy bezpluchého ječmene s vyšším obsahem tohoto polysacharidu (>5 %) a stravitelné vlákniny (Taketa et al., 2004; Bhatta, 1992) a ječmen sladovnický naopak by měl obsahovat méně β -d-glukanů (max. 1,5 – 2 %). Hledají se takové odrůdy a hybridy ječmene, které budou mít optimální zastoupení neškrobových polysacharidů vzhledem k dalšímu využití. Šlechtění odrůd ječmene s nízkým obsahem neškrobových polysacharidů je součástí strategie tvorby odrůd pro sladovnické účely. Vzhledem k jejich nepříznivému vlivu při výrobě piva je obsah β -d-glukanů ve sladidě limitním ukazatelem při posuzování sladovnických odrůd ječmene. Závislost mezi obsahem jednotlivých hemicelulos v zrně ječmene nebyla stanovena jednoznačně. Egi et al. (2004b) udávají, že mezi obsahem β -d-glukanů a arabinoxylanů nebyla stanovena závislost a obsah posledních klesal s nárůstem obsahu škrobu a byl vyšší ve vztahu k hmotnosti zrna. Naopak Holtekjolen et al. (2006) zjistili u početného souboru odrůd ječmene, že obsah β -d-glukanů je s arabinoxylany v negativním vztahu a dále pozorovali pozitivní korelaci s obsahem bílkovin.

Pro zjišťování obsahu jednotlivých složek ječmene lze využít řadu analytických postupů, které jsou složité a zdoluhavé. Mnohem jednodušší a rychlejší je použití nedestruktivních spektroskopických metod, zejména infračervené spektroskopie (FT-IR). Tato metoda je zajímavá z hlediska analýzy a hodnocení kvality potravin a surovin (Sun, 2009; Thygesen et al., 2003; Van de Voort, 1992) a je používána pro strukturní analýzu cereálních polysacharidů (Robert et al., 2005; Kačuráková, Wilson, 2001). Tato práce je věnována využití spektroskopických markerů chemických složek ječmene pro hodnocení kvality a třídění vzorků ječmene různého genetického původu.

MATERIÁL A METODIKA

Pro spektroskopickou analýzu byl použit soubor vzorků zrna ječmene jarního ze sklizně 2008 a 2009 pěstovaného v lokalitě Kroměříž. Soubor byl sestavený z různých odrůd, genetických zdrojů a nových linií ječmene s odlišným genetickým původem a chemickým složením. Vzorky zrn ječmene byly rozemlety pomocí odstředivého mlýna Retsch ZM 200 a dále zjemněny kulovým laboratorním mlýnkem MM 301 na velikost částic okolo 20 μm . Takto namleté vzorky byly použity pro měření FT-IR spekter na FT-IR

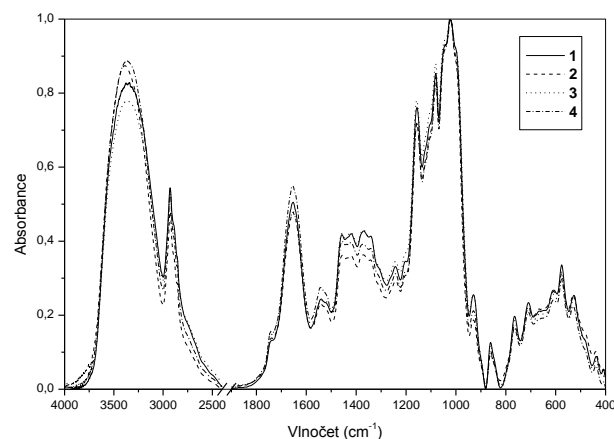
spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) v KBr tabletě v rozsahu vlnočtů 400–4000 cm^{-1} s rozlišením 2 cm^{-1} a počtem skenů 64. Po upravení základní linie spektra byly exportovány do programu Origin 6.1 (Microcal Software, USA) ve formátu CSV a vytvořeny grafy. Byly vypočteny 2. derivace podle algoritmu Savitsky-Golay, program Omnic 7.3 (ThermoScientific, USA). Pro měření FT-IR spekter byly použity standardy cereálních hydrokoloidů: pšeničný škrob a pšeničný lepek (SOLTEX P6, Amylon a. s., Havlíčkův Brod), ječný β -D-glukan a pšeničný arabinoxylan (Megazyme, Irsko). Škrob byl stanoven polarimetrickou metodou podle Ewerse (ČSN EN ISO 10520, 1999). Cereální β -D-glukany byly stanoveny pomocí metody založené na vzniku komplexu s fluorescenčním barvivem Fluorochrom Calcofluor White M2R New. K měření fluorescence a kvantifikaci byla použita technika průtokové injekční analýzy (Jørgensen a Astrup 1988; Jørgensen 1988; Navarro et al., 1995). Stanovení arabinoxylanů bylo provedeno pomocí fotometrické metody podle Douglase (Douglas, 1981).

VÝSLEDKY A DISKUZE

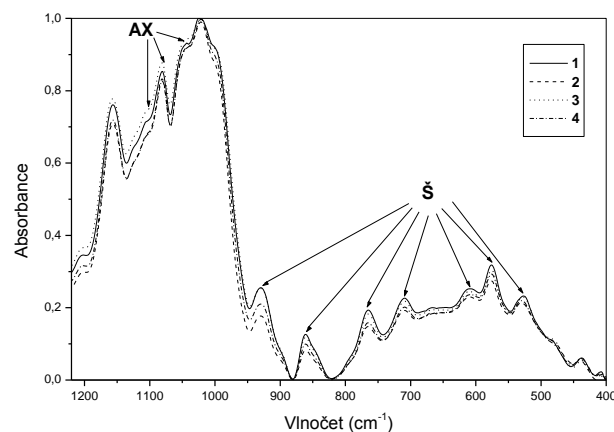
Pro analýzu FT-IR spekter byly zvoleny vzorky rozemletých zrn ječmene s nejvyšším obsahem základních složek, jako jsou škrob, β -glukany, arabinoxylany a bílkoviny jako dusíkaté látky (obrázek č. 1). Hodnoty základních složek těchto vzorků označených jako č. 1 až 4 jsou znázorněny v Tabulce 1 (tučně – největší hodnota). Spektra jsou navzájem velmi podobná, což potvrzuje že rozdíly v základním složení vzorků jsou v rozmezí jednoho botanického druhu. Na základě interpretací IČ pásů byly identifikované jednotlivé složky. Vzorky obsahovaly poměrně velké množství škrobu, čímž lze vysvětlit zvýraznění charakteristických IČ pásů tohoto polysacharidu při 930, 859, 765, 710, 608, 576, 529, 478 a 440 cm^{-1} (obrázek č. 2, označené písmenem Š). Tyto pásy jsou však nejvýraznější u vzorku č. 1 s největším obsahem škrobu. Píky dalších složek byly méně výrazné, což komplikovalo jejich určení. Pomocí 2. derivace spekter byly zjištěny polohy těch pásů (ramen), které se navzájem překrývaly. Na obrázku č. 2 je také vidět, že spektrum vzorku č. 3 má výraznější pásy arabinoxylanů (označené AX). V další spektrální oblasti (1200–1500 cm^{-1}) byly nalezena ramena o vlnočtech 1438 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} a 1308 cm^{-1} přiřazené vibracím methylových skupin. (obrázek č. 3). Další rameno o vlnočtu 1285 cm^{-1} patří vibraci amidu III. IČ píky o vlnočtech 1655 cm^{-1} a 1543 cm^{-1} byly přiřazeny vibracím amidu I a II (obrázek č. 4). Všechny tyto pásy ukazují na přítomnost bílkovin a jsou znatelná hlavně u vzorku č. 4, který měl nejvyšší obsah dusíkatých látek. Pás o vlnočtu 1740 cm^{-1} byl přiřazen valenční vibraci C=O esterů a ukazuje na přítomnost tuků. Rameno nebo pík o vlnočtu kolem 1519 cm^{-1} přiřazený valenční vibraci C=C vazeb potvrzuje přítomnost aromatických kyselin zejména kyseliny ferulové vyskytujících se v arabinoxylanech. Tento pás byl nejvýraznější u vzorku ječmene č. 3 s nejvyšším obsahem těchto polysacharidů.

Tabulka 1 Hodnoty obsahu základních složek (hm. %) vzorků ječmene 1 - 4

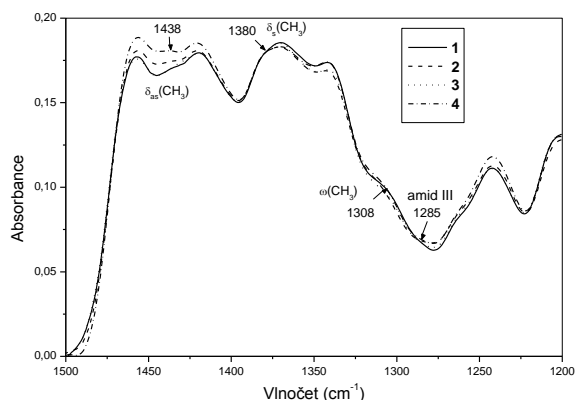
Vzorek	škrob	β -glukany	arabinoxylany	N-látky
1	67,7	5,3	3,75	11,0
2	58,4	10,9	4,98	15,3
3	60,5	4,5	8,23	10,2
4	59,0	9,0	4,61	15,4



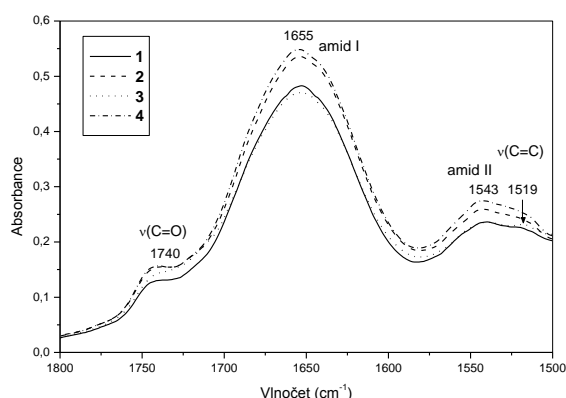
Obrázek 1 FT-IR spektra vzorků ječmenů 1–4 s nejvyšším obsahem hydrokoloidů (bílkovin a polysacharidů).



Obrázek 2 FT-IR spektra vzorků zrn ječmene 1–4: oblast 400–1200 cm^{-1} s vyznačením charakteristických píků arabinoxylanů (AX) a škrobu (Š).



Obrázek 3 FT-IR spektra vzorků zrn ječmene 1–4: oblast 1200–1500 cm⁻¹.



Obrázek 4 FT-IR spektra vzorků zrn ječmene 1–4: oblast C=O a C=C valenčních vibrací (1500–1800 cm⁻¹).

ZÁVĚR

Na základě interpretace FT-IR spekter a přiřazení charakteristických vlnočtů byly identifikovány látky obsažené v zrnech ječmene: bílkoviny, polysacharidy (škrob, β-glukany, arabinoxylany), lipidy a fenolové kyseliny. Vibrační spektra rozemletých zrn ječmene jsou velmi citlivá na rozdíly v chemickém složení způsobenými genetickou odlišností. Lze tak vytřídit genetické formy ječmene s optimálním zastoupením technologicky významných hydrokoloidů, které hrají významnou roli ve výsledné kvalitě sladů, cereálního výrobku a krmné hodnotě ječmene.

Práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství České republiky (projekt č. QH91053).

LITERATURA

BACIC, A., STONE, B., 1981. Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley. In *Australian Journal of Plant Physiology*, roč. 8, 1981, s. 475–495.

BAIK, B.-K., ULLRICH, S. E., 2008. Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. In *Journal of Cereal Science*, roč. 48, s. 233–242.

BHATTY, R. S., 1992. β-Glucan content and viscosities of barleys and their roller-milled flour and bran products. In *Cereal Chemistry*, roč. 69, s. 469–471.

DOUGLAS, S. G., 2001. A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour. In *Food Chemistry*, roč. 7, s. 139–145.

EGI, A., SPEERS, R. A., SCHWARZ, P. B., 2004. Arabinoxylans and their behavior during malting and brewing. In *MBA Technical Quarterly*, roč. 41, s. 248–267.

FINCHER, G. B., STONE, B. A., 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. In *Advanced Cereal Science and Technology*, roč. 8, s. 207–295. Y. Pomeranz, ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.

HOLTEKJOLEN, A. K., UHLEN, A. K., BRATHEN, E., SAHLSTROM, S., KNUTSEN, S. H. (2006): Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. In *Food Chemistry*, roč. 94, s. 348–358.

JØRGENSEN, K.G., 1988. Quantification of high molecular weight (1→3)(1→4)-β-D-glucan using Calcofluor complex formation and flow injection analysis. I. Analytical principle and its standardization. In *Carlsberg Research Communication*, roč. 53, s. 277–285.

JØRGENSEN, K.G., AASTRUP S., 1988. Quantification of high molecular weight (1→3)(1→4)-β-D-glucan using Calcofluor complex formation and flow injection analysis. II. Determination of total β-glucan content of barley and malt. In *Carlsberg Research Communication*, roč. 53, s. 287–296.

KAČURÁKOVÁ, M., WILSON, R. H., 2001. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. In *Carbohydrate Polymers*, roč. 44, 2001, s. 291–303.

LEKEŠ, J. ET AL., 1985. Ječmen. Státní zemědělské nakladatelství – Praha, s. 182 – 185.

NAVARRO, A., MANZANARES, P., CARBONELL, J. V., SENDRA J. M., 1995. Determination of (1→3),(1→4)-β-D-glucanase activity by a calcofluor-flow injection analysis method. In *Journal of Cereal Sciences*, roč. 22, s. 275–284.

PATRON, N. J., SMITH, A. M., FAHY, B. F., HYLTON, CH. M., NALDRETT, M. J., ROSSNAGEL, B. G., DENYER, K., 2002. The altered pattern of amylose accumulation in the endosperm of low-amylose barley cultivars is attributable to a single mutant allele of granule-bound starch synthase I with a deletion in the 5-Non-Coding region, In *Plant Physiology*, roč. 130, s. 190–198.

ROBERT, P., MARQUIS, M. L., BARRON, C. C., GUILLON, F., SAULNIER, L. 2005. FT-IR investigation of cell wall polysaccharides assignment from cereal grains. Arabinoxylan infrared assignment. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 53, s. 7014–7018.

ŠÍR, J. A KOL., 2010. Víze českého zemědělství po roce 2010. Ministerstvo zemědělství ČR, 27.5.2010, s.1–67.

SUN, D.-W., ed., 2009. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Elsevier Inc., 2009, s. 1-448.

TAKETA, S., KIKUCHI, S., AWAYAMA, T., YAMAMOTO, S., ICHII, M., KAWASAKI, S. 2004. Monophyletic origin of naked barley inferred from molecular analyses of a marker closely linked to the naked caryopsis gene (*nud*). In *Theoretical and Applied Genetics*, roč. 108, 2004, s. 1236–1242.

THYGESEN, L. G., LØKKEY, M. M., MICKLANDER, E., ENGELSEN, S. B., 2003. Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. In *Trends in Food Science & Technology*, roč. 14, s. 50-57.

VAN DE VOORT, F. R., 1992. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. In *Food Research International*, roč. 25, č. 5, s. 397-403.

Kontaktní adresa:

Ing. Eva Budilová, Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika. Tel.: +420 220 443 116, E-mail: lhதாகoe@vscht.cz

Mgr. Andriy Synytsya, PhD. Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika. Tel.: +420 220 443 116, E-mail: sinicaa@vscht.cz

Doc. František Kvasnička, CSc., Ústav konzervace potravin a technologie masa, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika. Tel.: +420 220 445 117, E-mail: kvasnicf@vscht.cz

Prof. Ing. Jana Čopíková, CSc., Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika. Tel.: +420 220 443 114, E-mail: copikovj@vscht.cz

Ing. Kateřina Vaculová, CSc., Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Česká republika. Tel.: +420 573 317 112, E-mail: vaculova.katerina@vukrom.cz