



9

září 1967 - ročník 13

ODBORNÝ ČASOPIS PRO PRACOVNÍKY V KVASNÝCH PRŮMYSLECH

Klíčivost sladovnického ječmene

JAROSLAV KASTNER, Obchodní sladovny, n. p., Prostějov

663.421

Ještě před nedávnem [5] se klíčivostí sladovnického ječmene rozumělo procento obilek ve vzorku, které vyklíčily za podmínek některé z běžných metod (*Schönenfeld, Aubry, Schönenjahn* aj.) za 6 dní a klíčivou energií procento obilek ve vzorku, které za těchž podmínek vyklíčily za 3 dny.

Tyto definice ustoupily pod tlakem nových poznatků definicím novým [3, 41], podle kterých je klíčivost (germinative capacity, pourcentage de grains vivants, Keimfähigkeit) totožná se životností a rozumí se jí procento všech živých obilek ve vzorku, lhůtějno zda v době stanovení za přirozených podmínek klíčí či ne, a klíčivou energií (germinative energy, énergie germinative, Keimenergie) se rozumí procento obilek ve vzorku, které v době stanovení vyklíčí za přirozených podmínek za 3 dny.

Odpovídá to skutečnosti, že sklizeň ječmene a jeho plná klíčivá energie se nekryjí. I zcela zdravé ječmeny se 100 % živých obilek (klíčivost=100 %) neklíčí bezprostředně po sklizni za normálních podmínek klíčení plně (jejich klíčivá energie je nižší než jejich klíčivost). Musí napřed prodělat dobu tak zvaného posklizňového dozrávání, která v našich podmínkách trvá podle odrůdy a ročníku 3 až 6 týdnů, během kterých klíčivá energie ječmene postupně stoupá až je rovná klíčivosti.

Podle Analytica EBC [41] se klíčivost stanoví buď rychlou metodou barvicí s 2,3,5-trifenyl-tetrazolium-chloridem nebo lépe a rychleji) s 2-p-jodofenyl-3-p-nitrofenyl-5-fenyl-tetrazolium - chloridem [2, 25] anebo pomalejší, ale přesnější, metodou třídenního máčení ječmene v 0,75% roztoku peroxidu vodíku [36, 41]. Klíčivá energie se stanoví třídenním klíčením ječmene podle *Schönenfelda* nebo *Aubryho* [25].

Stanovení klíčivosti barvením [2]

Obilky rozříznout po délce přes klíček, 100 pálek ze 100 obilek vložit do zkumavky, překrýt je asi

10 ml 0,3% (obj.) roztoku 2-p-jodofenyl-3-p-nitrofenyl-5-fenyl-tetrazolium-chloridu, 3 až 4krát ze zkumavky vysát a znova do ní vpustit vzduch, roztok vylít, obilky rozprostřít na vlhký filtrační papír a spočítat zbarvené klíčky. Jasné nachově zbarvené celé klíčky = živé; nejméně štítek, střelka a aspoň trochu tkáně mezi štítkem a střelkou zbarveno = klíčky sice poškozené, ale obilky schopné uspokojivého klíčení; klíčky obarvené méně než předešlé nebo vůbec nezbarvené = mrtvé obilky. Výsledkem stanovení je součet prvních dvou skupin.

Stanovení klíčivosti peroxidem vodíku [36, 41]

500 obilek ječmene máčet po 48 hodin při 18 až 21 °C ve 200 ml čerstvě připraveného 0,75% roztoku peroxidu vodíku (5 ml 30% roztoku peroxidu vodíku doplnit vodou na 200 ml). Po 48 hodinách roztok peroxidu vyměnit za čerstvý a po dalších 24 hodinách spočítat vyklíčené obilky. Jestliže vyklíčilo více než 95 % obilek, uvede se výsledek jako: „klíčivost (H_2O_2) nejméně 95 %“.

Jestliže vyklíčilo méně než 95 % obilek nebo žádá-li se větší přesnost, sloupnout u nevyklíčených obilek pluchu kolem klíčku, jemnou hnědou pokožku pod pluchou odstranit třením prsty a obilky s obnaženými klíčky dát ještě na 24 hodin klíčit na vlhkém filtračním papíře. Počet obilek, dodatečně vyklíčených, přičíst k obilkám, vyklíčeným v peroxidu.

Stanovení klíčivé energie podle Aubryho [25]

Na filtrační papír, rozprostřený na skleněné desce z Aubryho klíčidla, rozložit 500 obilek ječmene, ty přikrýt dalším filtračním papírem a všechno důkladně zvlhčit vodou. Přebytečnou vodu nechat odtéci, desku s obilkami mezi vlhkými filtračními papíry vložit do Aubryho klíčidla a v něm je udržovat vlhké (podle potřeby občas postříkat vodou)

při 17 až 20 °C. Po 72 hodinách spočítat vykličené obilky.

Stanovení klíčivé energie podle Schönfelda [25]

500 obilek vložit do nálevky průměru 8,5 cm, opatřené na výtoku ze stonku hadičkou s tlačkou a v hrdle stonku rozšířenou tyčinkou (aby obilky nemohly propadnout). Máčet je při teplotě místnosti 2 hodiny ve vápenné vodě, pak 1 hodinu v čisté vodě, vodu vypustit, hadičku na hadičce nechat povolenou a obilky pokrýt dvěma vrstvami mokrého filtračního papíru a skleněným víčkem. Po 2 hodinách znova máčet 1 hodinu ve vodě. Druhého a třetího dne máčet vždy ráno a po dalších 3 až 4 hodinách znova po 1 hodinu ve vodě. Po 72 hodinách od vložení obilek do nálevky spočítat vykličené obilky.

Stanovení podle Aubryho a podle Schönfelda se také někdy provádí jako pětidenní. V tom případě se obilky, které po 72 hodinách nevykličily, vloží zpět do Aubryho klíčidla nebo do nálevky Schönfelsova klíčidla a ponechají se tam do 120 hodin celkové doby klíčení; u Schönfeldovy metody se denně po 30 minut máčeji. Počet vykličených obilek se připočte k počtu obilek, vykličených za 72 hodin. Doporučuje se uvádět výsledek jako: „klíčivá energie po pěti dnech“. Je to hodnota, označovaná někdy jako klíčivá mohutnost nebo klíčivá síla (germinative power, pouvoir germinatif, Keimkraft). V žádném případě nevyjadřuje klíčivost ani klíčivou energii.

Barvení klíčků solemi tetrazoliových sloučenin spočívá v jejich reakci s oxidovatelnými sloučeninami, obsaženými v klíčku. Tuto reakci katalyzují enzymy dehydrogenázy, které jsou v živém klíčku normálně přítomny. Přitom se tetrazolium redukuje na jasně červený formazan. Barvicí metody jsou rychlé a u zdravých ječmenů dávají uspokojivé výsledky. U ječmenů s oslabenou klíčivostí jsou jejich výsledky méně spolehlivé [2, 13]. Zejména krátce po sušení ječmenů, při kterém byla teplota právě dostatečná, aby zabila klíčky avšak ještě nepoškodila látky, na kterých barvicí reakce závisí, tyto metody selhávají a není možné je zde použít [2, 24]. K této okolnosti se příliš často nepřihlíží a právě zde je třeba hledat příčinu mnoha nedorozumění a sporů.

Stanovení s peroxidem vodíku je zatím nejlepší a nejpřesnější metodou stanovení klíčivosti. U některých vzorků však peroxid vodíku potlačuje růst kořínek, který je vnějším viditelným znakem klíčení. Proto doporučuje Henderson [15] pracovat s 0,37% roztokem peroxidu vodíku na místě předepsaného 0,75%. Pak prý ani není třeba loupat obilky, nevykličí jen ty skutečně mrtvé.

Podle Schilda a Weiha [34] je mezi výsledky Schönfeldovy a Aubryho metody malá shoda, zejména u ječmenů s nízkou klíčivou energií. Pawłowski a Schild [25] dávají z důvodu organizace práce v laboratoři přednost Aubryho metody. Z těchže důvodů a pro údajně větší přesnost jí dávají přednost i jiní pracovníci [6, 12, 34]. Urion a Chapon však považují výsledky Schönfeldovy me-

tody za bližší skutečnosti v provozu sladovny, ačkoli i oni ji považují za příliš pracnou [38].

Mezi výsledky stanovení klíčivosti a zejména mezi výsledky stanovení klíčivé energie, provedenými v různých laboratořích, jsou často dosti značné rozdíly. Ty jsou způsobeny jednak různorodostí ječmene, jednak použitím různých metod nebo odchylkami v jejich provedení.

Nestejnrorodost ječmene ovlivní stanovení tím více, čím méně obilek se pro stanovení použije. Zejména při stanovení klíčivosti barvicí metodou (vitaskopem) se dělá příliš často zásadní chyba, že se stanovení provede jen s 50 obilkami (a navíc jen jednou). U ječmene, který obsahuje ve skutečnosti jen 2 % mrtvých obilek (má klíčivost 98 %), se mohou takto zjistit hodnoty od 89 do 100 % jak ukazuje tabulka 1, vypočtená na podkladě statistické teorie binomického rozdělení [35]. Přitom ještě se mohou v pěti případech ze sta získat hodnoty i mimo tyto meze. Uvedená tabulka názorně ukazuje, že čím větší počet obilek se pro stanovení použije, tím je rozptyl získaných hodnot menší a přesnost stanovení větší.

Meze rozptylu, uvedené v tabulce 1, platí ovšem jen při naprostu přesné práci bez chyb a jsou podmíněny přirozenou nestejnrorodostí odebraných vzorků. Naprostá přesná, bezchybná práce ovšem není dosažitelná. Vždy se musí počítat s mnoha činiteli, které snižují spolehlivost získaného výsledku. Aby se spolehlivost zvýšila, musí se provést několik souběžných stanovení a jako výslednou hodnotu brát aritmetický průměr \bar{x} ze získaných hodnot, který pak zastupuje skutečnou nám neznámou hodnotu. Ta leží někde v intervalu, jehož velikost lze vypočítat podle vzorce [7]

$$i = \pm K_n \cdot R \quad (1)$$

kde

- i je interval spolehlivosti, tj. rozpětí, ve kterém skutečná hodnota leží;
- R — varianční rozpětí, tj. rozdíl mezi získanými hodnotami při stanovení dvojmo nebo rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší získanou hodnotou při vícero souběžných stanoveních;
- K — koeficient pro dané n , tj. pro počet souběžných stanovení, platný pro 95% pravděpodobnost; vyhledá se v tabulce 2.

Výsledek stanovení dvojmo, při kterém bylo zjištěno 95 a 97 % vykličených obilek, by se měl psát

$$\bar{x} \pm K_n \cdot R \quad (2)$$

to je

$$96,0 \pm 6,4 \cdot 2 = 96,0 \pm 12,8\%$$

Skutečná hodnota leží s 95% pravděpodobností v intervalu 83,2 až 100,0 %.

Má-li se zvýšit přesnost stanovení, musí se dělat souběžných stanovení více. Pro $n=3$ by pak platilo pro zjištěné hodnoty 95, 93 a 97 %, tedy pro stejný aritmetický průměr $\bar{x}=96,0$ a pro stejně varianční rozpětí $R=2$

$$96,0 \pm 1,3 \cdot 2 = 96,0 \pm 2,6.$$

Interval spolehlivosti se zmenší na 93,4 až 98,6 %. Pro 4 souběžná stanovení by byl odpovídající interval 94,6 až 97,4 % atd.; stále by se zužoval.

Prakticky však je stanovení trojmo postačující a mělo by se vždy používat při stanovení klíčivosti

snadno splní, když se obilky kladou do misky v řádách v pořadí po 7—12—15—16—16—15—12—7 obilkách [16]. Dodržuje-li se tato sestava, není ani třeba 100 obilek předem odpočítávat. Na papír se mají klást obilky hřbetem dolů [32].

Tato metoda se pro svou jednoduchost, přesně stanovené podmínky a pro svou spolehlivost [42] rychle rozšířila. Zejména také proto, že ve spojení s obměnou, při které se zvlhčují filtrační papíry 8,00 ml destilované vody při jinak stejném provedení [10], umožňuje zjistit a ohodnotit další vlastnost ječmenů, kterou autoři nazvali citlivost na vodu (water sensitivity, sensibilité à l'eau, Wasserempfindlichkeit). Zjistili totiž, že se stoupající dávkou vody klíčivá energie u některých ječmenů opět klesá s vrcholu při 4,00 ml a prokázali, že jde o velmi důležitou vlastnost ječmene, až dosud neznámou [9, 26, 27, 28], jejíž význam potvrdili i další pracovníci [12, 18, 20, 21, 32].

Kretschmer [19] definuje citlivost na vodu jako rozdíl mezi stanoveními klíčivé energie podle *Esseryho* a spol. se 4,00 ml a s 8,00 ml destilované vody a hodnotí ji:

Rozdíl do 10 % = ječmeny, velmi málo citlivé na vodu,

od 10 do 25 % = ječmeny, málo citlivé na vodu,

od 25 do 45 % = ječmeny, uspokojivě citlivé na vodu,

přes 45 % = ječmeny, velmi citlivé na vodu.

Obr. 2 a 3 ukazují názorně typické průběhy klíčení na Petriho miskách se 4,00 ml a s 8,00 ml destilované vody u ječmene velmi málo citlivého a u ječmene velmi citlivého na vodu [16].

Citlivost na vodu má význam ve spojitosti s máčením ječmene v provoze sladovny. Dá se předpokládat, že ječmeny velmi citlivé na vodu budou mít sklon utopit se při máčení a že se proto musí namáčet opatrně a s bohatými vzdušnými přestávkami.

Postupem doby, jak ječmen při správném uložení a ošetření dozrává, citlivost na vodu ubývá až do celá zmizí.

Metoda stanovení klíčivé energie podle *Esseryho* a spol. byla podle návrhu *Matějovského* [23] poněkud pozměněna převzata do československé státní

normy 46 10 11 [43]. Zde však se jí používá současně ke stanovení klíčivosti i klíčivé energie.

Stanovení klíčivosti a klíčivé energie ječmene podle ČSN 46 10 11 [39,43]

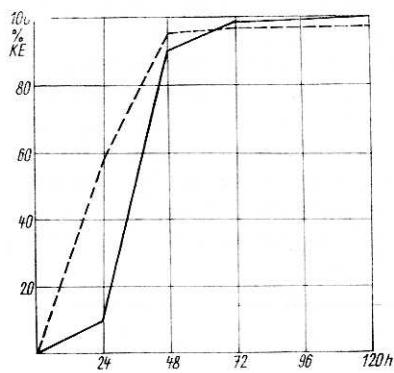
Na dno Petriho misky průměru 15 cm vložit 3 vrstvy filtračního papíru velikosti 9×10 cm nebo 3 kruhové výsekly filtračního papíru průměru 13 cm, papíry stejnoměrně zvlhčit 9,6 ml destilované vody z odměrného válečku a rozložit na ně stejnoměrně 100 obilek břišní stranou (rýhou) dolů. Misku přikrýt víčkem, vložit do tmy a udržovat při 20 °C. Denně odstranit vyklíčené obilky a zaznamenat počet obilek, vyklíčených za 72 hodin (klíčivá energie) a za 120 hodin (klíčivost).

Definice a metoda stanovení klíčivosti zde zcela odpovídají mezinárodně uznávané definici EBC. Je to návrat ke staré definici, ničím nezdůvodněný a nemající také žádného oprávnění. U ječmenů, které nebudou plně vyzrálé, nemohou hodnoty klíčivosti podle této metody souhlasit s metodou barvici nebo s metodou s peroxidem vodíku.

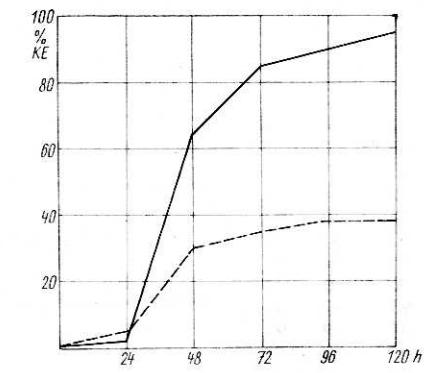
Názory na to, je-li pro sladovnu důležitější znát klíčivost nebo klíčivou energii ječmene se poněkud různí. Jedni autoři zdůrazňují prvořadý význam klíčivosti [5, 33, 40], druzí opět klíčivé energie [17]. Ve skutečnosti je nezbytné úplné i rychlé klíčení. Při nákupu ječmene je důležité znát klíčivost, která by podle *Hartonga* [14] neměla být nižší než 97 %. Není-li tato podmínka splněna, jsou podle něho všechny ostatní rozbory zbytečné. Klíčivá energie je opět důležitá při rozhodování o tom, který ječmen se má právě sladovat. Má být pokud možno blízká nebo rovná klíčivosti, ne nižší než 95 % [40].

Není také bez významu či spíše má základní význam jak rychle klíčení postupuje. V tomto směru jsou směrodatné jen hodnoty klíčivé energie za 72 hodin, hodnoty za 120 hodin tu mnoho neřeknou. Na obr. 4 je zakresleno, jak postupovalo klíčení dvou ječmenů, které oba měly 100 % klíčivé energie za 72 hodin. Je jasné, že přednost bude mít ječmen, který vyklíčil co nejvíce hned prvního dne.

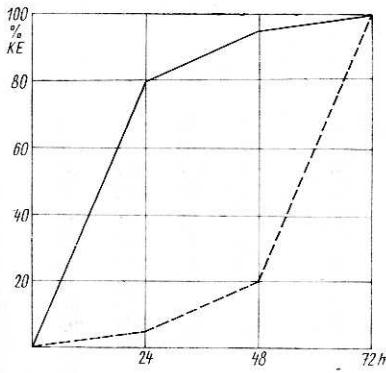
Účelně lze dynamiku klíčení vyjádřit Firlayovým vzorcem [11].



Obr. 2. Klíčivá energie a citlivost na vodu ječmene velmi málo citlivého na vodu



Obr. 3. Klíčivá energie a citlivost na vodu ječmene velmi citlivého na vodu



Obr. 4. Postup klíčení ječmene rychle klíčícího ($G = 450$) a ječmene pomalu klíčícího ($G = 120$)

— klíčivá energie;
— citlivost na vodu

— ječmen rychle klíčící;
— ječmen pomalu klíčící

