

STANOVENÍ PROLAMINŮ JEČMENE V PIVU A PIVOVARSKÝCH MATERIÁLECH

DETERMINATION OF BARLEY PROLAMINS IN BEER AND BREWING MATERIALS

PETR HULÍN¹, PAVEL DOSTÁLEK¹, IGOR HOCHEL²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 / *Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, e-mail: petr.hulin@vscht.cz*

²Ústav Biochemie a Mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 / *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6*

Hulín, P. – Dostálek, P. – Hochel, I.: Stanovení prolaminů ječmene v pivu a pивovarských materiálech. Kvasny Prum. 53, 2007, č. 9, s. 273–276.

Práce se zabývá možnostmi imunochemické detekce hordeinové frakce bílkovin ječmene a případných štěpných derivátů, respektive charakterizací monoklonálních protilátek připravených za účelem vývoje rychlého, specifického a citlivého stanovení hordeinových bílkovin v potravinářství, konkrétně v pivu.

Byla vyvinuta metoda nepřímé kompetitivní ELISA prolaminů ječmene a stanoveny pracovní koncentrace všech imunoreagencií. Dále byly testovány křížové interakce jednotlivých monoklonálních protilátek s proteiny ostatních cereálií. Detekční limit metody činil 2 ppm, přičemž lineární rozsah kalibrační křivky se pohybuje v rozmezí 1–100 ppm.

Hulín, P. – Dostálek, P. – Hochel, I.: Determination of Barley Prolamins in Beer and Brewing Materials. Kvasny Prum. 53, 2007, No. 9, p. 273–276.

The work deals with the possibilities of immunochemical detection of hordein fractions of barley proteins and possible cleavage derivatives, or more precisely by characterization of monoclonal antibodies prepared for the purpose of a rapid, specific and sensitive determination of hordein proteins in the food industry, specifically in beer.

A method of indirect competitive ELISA for barley prolamins has been developed and working concentrations of all immunoagents have been determined. Further to this, cross interactions of particular monoclonal antibodies with the proteins of the other cereals have been tested. The detection limit of the method was 2 ppm with the linear range of the calibration curve ranging from 1 to 100 ppm.

Hulín, P. – Dostálek, P. – Hochel, I.: Die Bestimmung von Gerstenprolaminen im Bier und in den Braumaterialien. Kvasny Prum. 53, 2007, Nr. 9, S. 273–276.

In diesem Artikel beschreiben die Verfasser die Möglichkeiten einer Detektion der Hordeinsfraktion von Gersteneiweißstoffen und etwaiger spaltbaren Derivate, beziehungsweise die Charakterisierung der monoklonalen Gegenstoffe, die mit dem Ziel der Entwicklung einer schnellen, spezifischen und empfindlichen Bestimmung von Hordeinseiwstoffen in der Lebensmittelindustrie, konkret im Bier vorbereitet wurden.

Weiterhin wurden eine Methode der indirekten kompetitiven ELISA Gerstenprolaminen entwickelt und die Arbeitskonzentrationen von allen Reagens festgestellt. Weiter wurden die Kreuzwechselwirkungen von einzelnen monoklonalen Gegenstoffen mit den Proteinen der anderen Zerealien getestet. Das Detektionslimit der Methode war 2 ppm, anbei der linearer Bereich der Kalibrierungskurve im Bereich 1–100 ppm lag.

Гулин, П. – Досталек, П. – Гохел, И. Определение проламинов ячменя в пиве и пивоваренных материалах. Kvasny Prum. 53, 2007, No. 9, стр. 273–276.

Статья занимается возможностями иммунохимического детектирования гордеиновой фракции белков ячменя и возможных расщепленных дериватов, или же характеристикой моноклональных антител подготовленных с целью разработать быстрое, специфическое и чувствительное определение гордеиновых белков в пищевой промышленности, именно в пиве.

Создан метод косвенной конкурентоспособной ELISA проламинов ячменя и определены рабочие концентрации всех иммунореагентов. Далее тестированы перекрестные взаимодействия отдельных антител с протеинами других cereалий. Лимит детектирования составлял 2 ppm, линейный диапазон калибровочной кривой колеблется в пределах от 1–100 ppm.

Klíčová slova: prolaminy, ječmen, pivo

Keywords: prolamins, barley, beer

1 ÚVOD

Prolaminová frakce bílkovin pšenice (gliadin), ječmene (hordein) a žita (secalin) vykazuje toxické účinky u osob s onemocněním celiakie. Toto geneticky podmíněné onemocnění, zvané též gluten sensitivní enteropatie, má za následek intoleranci pacientů vůči lepku, respektive prolaminové frakci pšenice, ječmene, žita a ovsa, která se projevuje vymizením střevních klků a mikrokloků, snížením schopnosti vstřebávání živin a celou řadou doprovodných chorob. V současné době se předpokládá výskyt celiakie v evropské populaci okolo 0,5 %.

Hordeiny jsou bílkovinnou frakcí ječmene, která se vyznačuje nerozpustností ve vodných roztocích solí a zároveň je rozpustná ve vodném roztoku ethanolu. Z hlediska aminokyselinového složení je pro tyto proteiny typický vysoký obsah glutaminu a prolinu.

Elektroforetické a chromatografické analytické metody jsou využí-

1 INTRODUCTION

The prolamin fraction of wheat proteins (gliadin), barley proteins (hordein) and rye proteins (secalin) show toxic effects to persons having coeliac disease. This genetically conditioned disease, also known as gluten-sensitive enteropathy, results in the intolerance of the patient to gluten or more precisely to the prolamin fraction of wheat, barley, rye and oats, causing disappearing of intestinal villi and micro villi and reducing the capability of absorption of nutrients, together with a number of additional diseases. Nowadays it is supposed that about 0.5 % of the population in Europe suffers from coeliac disease.

Hordeins are protein fractions of barley that can be characterized by their insolubility in aqueous solutions of salts and by their solubility in the aqueous solution of alcohol on the other hand. In terms of amino acid composition, a high content of glutamine and proline is typical for these proteins.

vány pro podrobnější frakcionaci hordeinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Pro citlivé a specifické stanovení hordeinů a jejich derivátů z hlediska jejich alergenních účinků se používají imunochemické metody. V nedávné době bylo vyvinuto velké množství ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) metod, obzvláště za účelem kvantifikace pšeničných prolaminů v potravinách. Tato stanovení bývají založena obvykle na monoklonální protilátce, jejíž vlastnosti a možnosti se pro různé práce různí [1, 2, 3]. Menší pozornost byla věnována analýze prolaminů ostatních toxických cereálií (žito, ječmen), a determinace těchto bílkovin a peptidů v pivu je probádána podstatně méně [4, 5].

Existence citlivých a rychlých analytických metod, vhodných pro stanovení těchto alergenních bílkovin, je základním předpokladem pro stanovení limitní koncentrace reziduí prolaminů v bezlepkových potravinách.

Do piva přecházejí rozpustné proteiny a peptidy sladu a kvasnic, které jsou zároveň dostatečně stabilní vůči aktivitě proteolytických enzymů, teplotě a pH prostředí v průběhu pivovarského procesu. Technologický význam těchto látek spočívá v ovlivnění tvorby a stability pěny, možnosti vzniku koloidních zákalů a podpoře plnosti chuti piva. Mezi zákalotvorné peptidy patří především hordeinové peptidy, které se vyznačují vysokým obsahem glutaminu a prolinu. Vlastnosti pивní pěny ovlivňuje protein Z, dále pak níže- i výšemolekulární deriváty hordeinů.

Analytické metody se zaměřují buď na stanovení celkových proteinů piva (metoda Bradfordové, absorbance při 280 nm, Lowryho metoda apod.), nebo na stanovení jednotlivých bílkovinných frakcí. Pro frakcionaci a následnou detekci proteinů a peptidů se využívá elektroforetických, chromatografických, případně imunochemických metod.

Cílem předkládané práce bylo vyvinout metodu enzymového imunochemického stanovení prolaminů ječmene. Pro tyto účely byly připraveny a charakterizovány monoklonální protilátky.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Extrakce prolaminové frakce

Mouka ječmene, případně jiných obilovin, byla nejprve zbavena lipidového podílu pětihodinovou extrakcí petroletherem a následně podrobena extrakci fosfátovým pufrům (0,4 M NaCl + 0,034 M K_2HPO_4 + 0,033 M $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; pH ~ 7,6) pro odstranění bílkovin albuminové a globulinové frakce. Zbýlý materiál byl poté třikrát extrahován 60% ethanolom. Získaný extrakt byl filtrován a roztok odpařen na vakuové odparce při teplotě 30 °C.

2.2 SDS-PAGE a western blot

Diskontinuální SDS-PAGE byla provedena podle postupu uvedeného v literatuře [6]. Elektroforéza byla prováděna na 4% zaostřovacím a 15% separačním gelu, při konstantním napětí 200 V na přístroji Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, USA). Pro stanovení molekulárních hmotností separovaných buněčných proteinů byly použity standardy SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range (BioRad Laboratories, USA).

Western blot byl proveden na stejném zařízení jako SDS-PAGE přenosem bílkovin z gelu na PVDF membránu po dobu 1 h za konstantního napětí 100 V a následně barvením pomocí monoklonální protilátky. Volná vazebná místa membrány byla nejdříve maskována 3% roztokem BSA v PBS (1 h), dále byla membrána inkubována se zředěným roztokem protilátky ($c \sim 10 \mu\text{g/ml}$ v 3% BSA/PBS) po dobu 2 h při pokojové teplotě, promyta 2x5 min v PBS, 2x5 min v deionizované vodě a 2x5 min v PBS. Následně byla membrána inkubována se zředěným konjugátem (SWAM, křesťanová peroxidasa, $8 \mu\text{g/ml}$ v 3% BSA-PBS) po dobu 2 h při pokojové teplotě, promyta 3° 10 min v PBS a přelita 5 ml substrátu (3 mg 3-amino-9-ethylkarbazolu, 1 ml formamidu, 4 ml 0,05 M acetaťového pufru a 7 μl H_2O_2 , konečná koncentrace ~ 0,004 %) po dobu 10 min při pokojové teplotě. Obarvená membrána byla promyta v deionizované vodě a skladována při teplotě 4 °C.

2.3 Nepřímá kompetitivní ELISA

Proteiny prolaminové frakce rozpuštěné v 60% ethanolu, a následně ředěné 0,01 M PBS pH 7,4 na koncentraci 12,5 $\mu\text{g/ml}$ byly imobilizovány na povrch mikrotitrační destičky pasivní adsorpcí přes noc při teplotě 4 °C. Povrch jamek byl třikrát promyt PBS, a poté byl syčen 1% roztokem hovězího sérového albuminu po

Electrophoretic and chromatographic analytical methods are used for finer fractionation of hordeins according to their molecular weight. For sensitive and specific determination of hordeins and their derivatives in terms of their allergenic effects, immunochemical methods are used. Recently, a great number of ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) has been developed, especially for the purpose of quantification of wheat prolamins in foods. These determinations are usually based on a monoclonal antibody, properties and possibilities of which are different for each determination [1, 2, 3]. Less attention was paid to the analysis of prolamins of the other toxic cereals (rye, barley) and the determination of these proteins in beer has been researched significantly less [4, 5].

The existence of sensitive and rapid analytical methods suitable for the determination of these allergenic proteins is the fundamental prerequisite for the determination of the limit concentration of prolamin residues in gluten-free foods.

Soluble proteins and peptides from malt and yeast are transferred into beer and they are sufficiently stable against the activity of proteolytic enzymes, temperature and pH value during the brewing process. The technological importance of the substances lies in the influence of foam formation and its stability, in the possibility of the formation of colloidal haze and in the support of beer palatibility. Haze-forming peptides are primarily represented by hordein peptides being characterized by a high content of glutamine and proline. The properties of beer foam are affected by the Z protein, low-molecular-weight as well as higher-molecular-weight hordein derivatives.

The analytical methods are aimed at the determination of total proteins of beer (the method by Bradford, absorbance at 280 nm, the method by Lowry, etc.) or at the determination of individual protein fractions. Electrophoretic, chromatographic or immunochemical methods are used for fractionation and subsequent detection of proteins and peptides.

The aim of the submitted work is to develop a method of enzymatic immunochemical determination of barley prolamins. For this purpose, monoclonal antibodies have been prepared and characterized.

2 EXPERIMENTAL PART

2.1 Extraction of prolamin fraction

First of all, the lipid fraction in barley flour or in flour of some other cereals was removed by a five-hour extraction by petrol ether, followed by extraction by phosphate buffer (0,4 M NaCl + 0.034 M K_2HPO_4 + 0.033 M $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; pH ~ 7,6) to remove the proteins of albumin and globulin fractions. Afterwards, the remaining material was extracted three times by 60 % alcohol. The obtained extract was filtered and the solution was evaporated on a vacuum evaporator at a temperature of 30 °C.

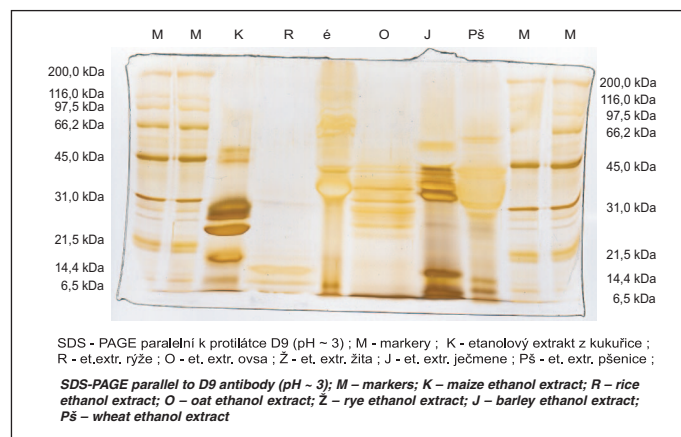
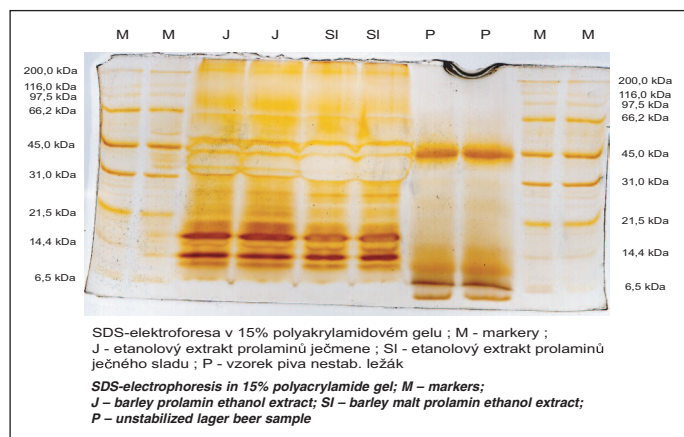
2.2 SDS-PAGE and western blot

Discontinuous SDS-PAGE was carried out according to the procedure given in literature [6]. Electrophoresis on a 4% focusing gel and a 15% separating gel at a constant voltage of 200 V on the Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad Laboratories, USA). For the determination of molecular weights of separated cell proteins, standards SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range (BioRad Laboratories, USA) were used.

Western blot was carried out on the same apparatus as the SDS-PAGE by transferring the proteins from the gel on a PVDF membrane for 1 hour under a constant voltage of 100 V, followed by colouring by a monoclonal antibody. The free bonding positions of the membrane were first masked by a 3% solution of BSA in PBS (1 hour) and the membrane was incubated with a diluted solution of the antibody ($c \sim 10 \mu\text{g/mL}$ in 3% BSA/PBS) for 2 hours at room temperature, washed 2x5 min by PBS, 2x5 minutes in deionised water and 2x5 min in PBS. Then, the membrane was incubated with a diluted conjugate (SWAM, horseradish peroxidase, $8 \mu\text{g/mL}$ in 3% BSA-PBS) for 2 hours at room temperature, then washed by PBS 3x10 min and 5 mL of substrate was poured on it (3 mg of 3-amino-9-ethyl-carbazole, 1 mL of formamide, 4 mL of 0.05 M of acetate buffer and 7 μL of H_2O_2 , final concentration ~ 0.004 %) for 10 minutes at room temperature. The coloured membrane was washed by deionised water and stored at 4 °C.

2.3 Indirect competitive ELISA

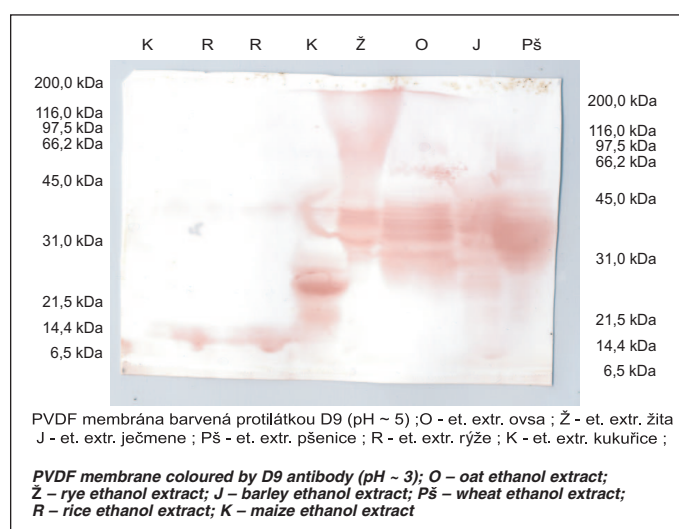
The proteins of the prolamin fraction dissolved in 60 % ethanol and then diluted by 0.01 M PBS with pH 7.4 to the concentration of



Obr. 1 / Fig. 1 SDS-PAGE ječných a sladových prolaminů a proteinů piva / SDS-PAGE of barley and malt prolamins and beer proteins

Obr. 2 / Fig. 2 SDS-PAGE prolaminů různých cereálií / SDS-PAGE of prolamins of various cereals

dobu 1 h při laboratorní teplotě. Po promytí bylo do jamek destičky aplikováno 50 μ l standardu (proteiny prolaminové frakce) a 50 μ l monoklonální protilátky o koncentraci 1,25 μ g/ml. Vzorky byly inkubovány 1 h při laboratorní teplotě. Po trojnásobném promytí jamek roztokem PBS, který obsahoval 0,05 % Tween 20 (PBST), bylo aplikováno 100 μ l prasečích IgG proti myším imunoglobulinům značených peroxidasou o koncentraci 4 μ g/ml. Obsah jamek byl inkubován 1 h při laboratorní teplotě, poté byly jamky promyty 4x PBST. Nakonec bylo aplikováno 100 μ l substrátu pro peroxidasu (5 mg OPD, 10 μ l 30% H_2O_2 , 10 μ l fosfát-citrátového pufru pH ~5,0) a po 20 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla enzymová reakce zastavena přidávkou 50 μ l 0,2 M H_2SO_4 . Absorbance byla měřena při vlnové délce 492 nm.



Obr. 3 / Fig. 3 Imunoblotting prolaminů různých cereálií / Immunoblotting of prolamins of various cereals

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Pomocí SDS-PAGE byly rozděleny frakce bílkovin piva a prolaminů sladu, ječmene a dalších obilovin (obr. 1, obr. 2). Elektroforetický záznam prolaminových bílkovin ječmene obsahoval frakce o molekulové hmotnosti v rozsahu 37–49 kDa a 16 kDa a dále minoritní podíl proteinů o molekulové hmotnosti 18, 19 a 22 kDa. SDS-PAGE vzorku piva (obr. 1) rozdělila přítomné proteiny na hlavní frakci v rozmezí molekulové hmotnosti 40–45 kDa, odpovídající nejspíše proteinu Z, a dále řadu vedlejších frakcí o nižší molekulové hmotnosti např. okolo 6 a 9 kDa (lipid transfer protein LTP2, LTP1) [5]. Intaktní prolaminové bílkoviny nebyly zaznamenány ve vizualizovatelné koncentraci, lze ovšem předpokládat možný výskyt štěpných derivátů hordeinů v nízkomolekulární oblasti pod 20 kDa.

Byly připraveny monoklonální protilátky proti ethanolovému extraktu bílkovin ječmene a studována jejich interakce s prolaminami ječmene, pšenice, žita a dalších obilovin a s bílkovinami obsaženými v pivu a v ethanolovém extraktu sladu. Monoklonální protilátky vykazují křížové interakce s prolaminovými extrakty ova, rýže a velmi slabé interakce s proteiny pohanky (obr. 3). Vzhledem k heterogenní povaze homologního i heterologního antigenu však není možné křížové interakce monoklonální protilátky kvantifikovat, je možno je charakterizovat tvarem křivky relativního nasycení v závislosti na koncentraci kompetujícího antigenu (obr. 5). Vlivem značné strukturní podobnosti repetitivních domén hordeinu, gliadinu a secalinu jsou křížové reakce v rámci této skupiny látek v zásadě ekvivalentní.

Byla vyvinuta metoda nepřímé kompetitivní ELISA prolaminů ječmene a stanoveny pracovní koncentrace všech imunoreagencií. De-

12,5 μ g/mL were immobilized overnight on the surface of a micro-titration plate by passive adsorption at 4 °C. The surface of the wells was washed by PBS three times and then it was saturated by a 1% solution of bovine serum albumin for 1 hour at laboratory temperature. After rinsing, 50 μ L of standard and 50 μ L of the monoclonal antibody with a concentration of 1,25 μ g/mL were applied into the plate wells (prolamin fraction proteins). The samples were incubated for 1 hour at laboratory temperature. After triple washing of the wells by PBS containing 0,05 % Tween 20 (PBST), 100 μ L of pig IgG were applied against mouse immunoglobulins labeled with peroxidase, concentration 4 μ g/mL.

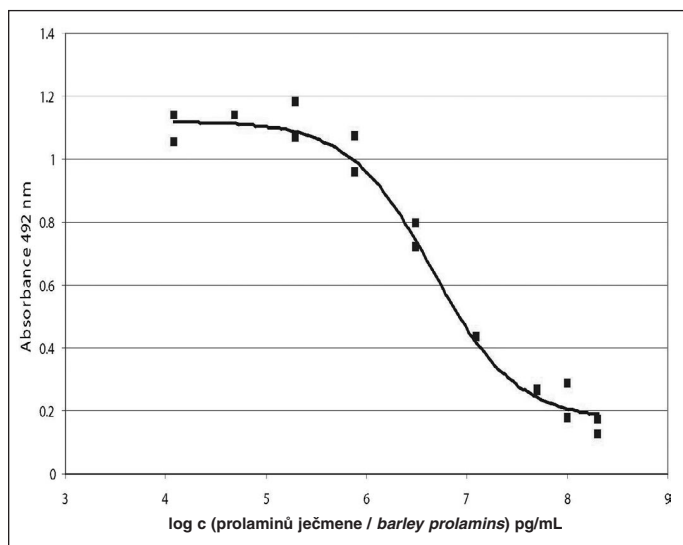
The content of the wells was incubated 1 hour at laboratory temperature, then the hollows

were washed four times by PBST. Finally, 100 μ L of substrate for peroxidase (5 mg of OPD, 10 μ L of 30% H_2O_2 , 10 mL of phosphate-citric buffer, pH ~5,0) were applied and after 20 minutes of incubation at laboratory temperature, the enzymatic reaction was stopped by adding of 50 μ L of 0,2 M H_2SO_4 . The absorbance was measured at the wave length of 492 nm.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The fractions of beer proteins as well as prolamins of malt, barley and other cereals (Fig. 1, Fig. 2) were separated by means of SDS-PAGE. An electrophoretic record of prolamin proteins of barley contained fractions with molecular weights of 18, 19 and 22 kDa. The SDS-PAGE of a beer sample (Fig. 1) divided the present proteins into the main fraction with the range of molecular weights of 40–45 kDa, in all probability corresponding to the Z protein, and into a number of secondary fractions with a lower molecular weight, e.g. 6 and 9 kDa (lipid transfer protein LTP2, LTP1). Intact prolamin proteins were not identified in a visualizable concentration, but possible occurrence of hordein cleavage derivatives in the low-molecular range under 20 kDa can be assumed.

Monoclonal antibodies were prepared against ethanol extract of barley proteins and their interactions with prolamins of barley, wheat, rye as well as other cereals and with the proteins contained in beer and the ethanol extract of malt were studied. Monoclonal antibodies show cross interactions with prolamin extracts of oat, rice and very weak interactions with buckwheat proteins (Fig. 3). But due to heterogeneous nature of the homologous and heterologous antigens it is not possible to quantify the cross interactions of the monoclonal antibody, they can be characterized by the shape of the curve of relative saturation de-



Obr. 4 / Fig. 4 Kalibrační křivka nepřímé kompetitivní ELISA prolaminů ječmene / Calibration curve of indirect competitive ELISA for barley prolamins

tekční limit metody činil 2 ppm, přičemž lineární rozsah kalibrační křivky se pohybuje v rozmezí 1–100 ppm (obr. 4). Z hlediska uspořádání imunoanalytické kvantitativní metody je kompetitivní uspořádání výhodnější pro analýzu matrice s větším podílem hydrolyzovaných a jinak degradovaných derivátů prolaminů.

4 ZÁVĚR

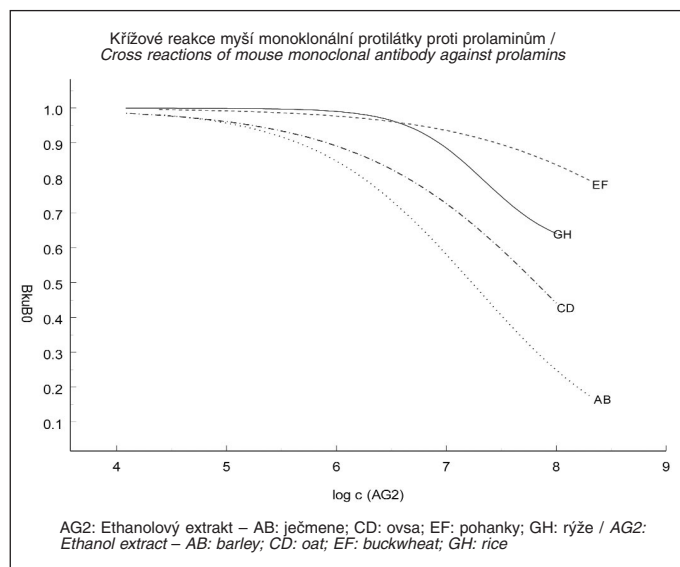
Pro frakcionaci a charakterizaci zejména pšeničných prolaminových proteinů bylo vyvinuto značné množství elektroforetických a chromatografických metod. Díky vyšší specifičnosti a citlivosti bývají často aplikovány imunochemické metody, založené na reaktivitě konkrétní protilátky. Díky lepším vlastnostem jsou v posledních letech používány převážně monoklonální protilátky, přičemž jejich finančně náročná výroba staví jejich purifikaci, charakterizaci a optimalizaci jejich reakce do role klíčových kroků sestavení imunoanalytického systému. Sestavená ELISA metoda je závislá na zvoleném formátu a její analytická schopnost je vyjádřena hodnotou detekčního limitu (2 ppm) a hranicemi lineárního rozsahu kalibrační křivky (1–100 ppm).

Poděkování

Tato práce je součástí řešení Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele 1M0570.

Literatura / Literature

1. Bermudo-Redondo, M.C., Griffin, P.B., Ellis, H.J., Ciclitira, P.J., O'Sullivan, C.K.: Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins. *Anal. Chim. Acta* **551**, 2005, 105–114.
2. Chirido, F.G., Anón, M.C., Fossati, C.A.: Optimization of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. *Food Agricult. Immunol.* **7**, 1995, 333–343.
3. Brett, G.M., Mills, E.N.C., Goodfellow, B.J.: Epitope Mapping Studies of Broad Specificity Monoclonal Antibodies to Cereal Prolamins. *J. Cereal Sci.* **29**, 1999, 117–128.
4. Dostálek, P., Hochel, I., Méndez, E., Hernando, A., Gabrovská, D.:



Obr. 5 / Fig. 5 Nepřímá kompetitivní ELISA – určení křížových reakcí / Indirect competitive ELISA – determination of cross reactions

pending on the concentration of the competing antigen (Fig. 5). Due to considerable structural similarity of the repetitive domains of hordein, gliadin and secalin, the cross reactions within this group of substances are in principle equivalent. A method of indirect competitive ELISA for barley prolamins has been developed and the working concentrations of all immunoagents have been determined. The detection limit of the method was 2 ppm, with the linear range of the calibration curve from 1 to 100 ppm (Fig. 4). In terms of the arrangement of the immunoanalytical quantitative method, the competitive arrangement is preferable for matrix analysis with a higher ratio of hydrolysed or otherwise degraded prolamins derivatives.

4 CONCLUSION

A great number of electrophoretic and chromatographic methods has been developed for the fractionation a characterization of mainly wheat prolamins proteins. Thanks to a higher particularity and sensitivity; immunochemical methods based on the reactivity of a concrete antibody are often used. Thanks to better properties, monoclonal antibodies have been primarily used in the last years, whereas their costly production puts their purification, characterization and optimisation of their reaction into the role of the key steps for establishing the immunoanalytical system. The established ELISA method is dependant on the format chosen and its analytical capability is expressed by the value of the detection limit (2 ppm) and by the limits of the linear range of the calibration curve (1–100 ppm).

Translated by Ladislav Kábrt

Acknowledgements

This study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Research Centre 1M0570),

Immunochemical determination of gluten in malts and beers. *Food Addit. Contam.* **23**, 2006, 1074–1078.

5. Kanerva, P., Sontag-Strohm, T., Lehtonen, P.: Determination of prolamins in beers by ELISA and SDS-PAGE. *J. Inst. Brew.* **111**, 2005, 61–64.
6. Laemli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 1970, 680–685.

Zpracováno podle posteru
na 33. Pivovarsko-sladařském semináři v Plzni,
18.–19. 10. 2006

Do redakce došlo 8. 3. 2007