

Stanovení důležitých ječných (*Hordeum vulgare*) proteinů pomocí separačních a hmotnostně spektrometrických metod

Determination of important barley (*Hordeum vulgare*) proteins by the separation methods and mass spectrometry

MARKÉTA LAŠTOVIČKOVÁ, JANETTE BOBÁLOVÁ

Ústav analytické chemie AV ČR v.v.i., Veveří 97, 602 00 Brno

Institute of Analytical Chemistry v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, 602 00 Brno, Veveří 97, Czech Republic

e-mail: lastovickova@iach.cz

Laštovičková, M. – Bobálová, J.: Stanovení důležitých ječných (*Hordeum vulgare*) proteinů pomocí separačních a hmotnostně spektrometrických metod. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 2, s. 79–82.

Změny v proteinovém profilu během sladování byly sledovány pomocí kombinace gelové elektroforézy (jedno- i dvoudimenzionální; 1-D, 2-D GE) a hmotnostní spektrometrie. Naše pozornost byla věnována proteomické analýze ječných proteinů, u kterých dochází během sladování k modifikacím, které mohou vést ke stabilizaci daného proteinu a v konečném důsledku až k ovlivnění vlastností piva.

Laštovičková, M. – Bobálová, J.: Determination of important barley (*Hordeum vulgare*) proteins by the separation methods and mass spectrometry. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 2, p. 79–82.

The changes of protein profile during the malting were monitored by a combination of gel electrophoresis (one-dimensional and two-dimensional; 1-D, 2-D GE) and mass spectrometry. Our attention was focused on the proteomic analysis of barley proteins, which were modified during the malting and can influence the properties of beer as a final product of malting.

Laštovičková, M. – Bobálová, J.: Die Bestimmung der wichtigen Gerstenproteine (*Hordeum vulgare*) durch die separation- und masspektrometrischen Methoden. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 2, S. 79–82.

Durch die Kombination der Gelelektrophorese (eindimensional und zweidimensional, 1 – D, 2 – D GE) und Masspektrometrie wurden die Änderungen im Proteinprofil während des Malzherstellungsprozesses verfolgt. Unsere Aufmerksamkeit wurde der proteomischen Analyse der Gerstenproteine gewidmet, bei denen während der Malzlagerung zu den Modifikationen vorkommt, die eine Stabilisation des gegebenen Proteins und folgende Beeinflussung des Biergeschmacks verursachen können.

Klíčová slova: ječmen, gelová elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, proteomika

Keywords: barley, gel electrophoresis, mass spectrometry, proteomics

1 ÚVOD

Bílkoviny (= proteiny) jsou vysokomolekulární látky složené běžně z více než sta aminokyselin, vzájemně spojených peptidovou vazbou. Pořadí aminokyselinových zbytků v polypeptidovém řetězci (bílkovině) udává tzv. primární strukturu a je určeno geneticky. Proteiny hrají důležité role nejen v přírodě, ale i v různých v odvětvích průmyslu a zemědělství. Obor, který se zabývá systematickou analýzou bílkovin z hlediska jejich identity, množství a funkcí se nazývá *proteomika* [1, 2].

Jednou ze základních a charakteristických vlastností, která definuje jak látky nízkomolekulární, tak i makromolekuly, je jejich molekulová hmotnost. *Hmotnostní spektrometrie* (mass spectrometry, MS), která je v současnosti jednou z nejdůležitějších analytických technik v proteomice, je metoda, jejímž principem je rozdělení nabitých částic (iontů) podle jejich molekulových hmotností.

Velmi účinnou metodou pro identifikaci a analýzu struktury bílkovin je postup, nazvaný *peptidové mapování*, který se skládá z několika kroků. Daná bílkovina je nejprve izolována ze směsi a potom enzymaticky štěpena na směs peptidů, které jsou detekovány MS (jsou zjištěny jejich molekulové hmotnosti). Tak vznikne tzv. peptidová mapa, která je pro danou bílkovinu charakteristická (tzv. *peptide fingerprint*) [2, 3].

Jednou z řady MS technik, která byla vyvinuta v druhé polovině osmdesátých let 20. století právě pro analýzu vysokomolekulárních látek (zejména proteinů), je *hmotnostní spektrometrie s využitím ionizace laserem v přítomnosti matrice a analyzátozem doby letu* (MALDI-TOF MS = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry). K získání signálu příslušné látky je třeba analyt smíchat s přebytkem matrice, což nejčastěji bývá slabá aromatická kyselina. Tato směs matrice a vzorku se nanese na speciální kovovou destičku. Po odpaření rozpouštědla se vytvoří krystalky, které jsou vystaveny pulsům laseru. Pokud by molekuly vzorku byly ionizovány laserem přímo, docházelo by většinou k nežádoucím štěpením molekul. Úloha matrice tedy spočívá v tom, že absorbuje většinu energie a teprve pak ji šetrně předává molekulám ana-

INTRODUCTION

Proteins are high molecular mass compounds composed commonly by more than one hundred amino acids joined together by the peptide bonds. The sequence of amino acids in a protein determines a primary structure and is encoded in the genetic code. The proteins play a principal role not only in the nature, but also in the different industries and agriculture. Proteomics is a science dealing with the systematic analysis of proteins, particularly their identity, amount and function [1, 2].

One of the basic characteristic features of both low-molecular mass analytes as well as macromolecules is their molecular mass. Mass spectrometry (MS) is one of the most important analytical techniques in proteomics. The MS principle consists from the separation of ions according to their mass to charge ratio (m/z).

Peptide mass fingerprinting (PMF), an effective analytical technique for protein identification, comprises several steps. An unknown protein is firstly isolated from a mixture and then is cleaved with enzyme to generate peptides. The masses of individual peptides can be accurately measured with a MS. MS analysis results in a peptide pattern characteristic for individual protein (*peptide mass fingerprint*) [2, 3].

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is one of the MS techniques developed in the middle to late 1980s for the analysis of molecules with large molecular weights (e.g. proteins). To obtain a signal of a sample, it is necessary to mix an analyte with a matrix compound, which is usually weak aromatic acid. The mixture of sample and matrix is loaded on a special sample plate and allowed to dry as a crystalline coating. The crystals are subjected to a short pulse of a laser. If the molecules of samples would be ionized directly by laser, the unwanted fragmentation of molecules might happen. The matrix plays a key role in this technique because it absorbs maximum of laser light energy and then gently transfers this energy to the analyte molecules. The sample is ionized by process such as hydrogen or alkali metal (K, Na) attachment. These ions have lower internal energy thus the ion fragmentation is minimized [4, 5].

lytu. Analyt je ionizován za vzniku protonovaných molekul nebo molekulových aduktů s alkalickým kovem (K, Na). Takové ionty mají výrazně nižší vnitřní energii a tedy i menší tendenci k fragmentaci [4, 5].

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) patří mezi nejstarší obilniny. Významné místo a bohatou historii má i u nás, kde je po pšenici druhou nejrozšířenější obilovinou. Ječmen má tři hlavní oblasti použití: sladonictví, lidská výživa a krmivo pro hospodářská zvířata. Navíc je používán jako důležitá modelová rostlina pro genetiky a šlechtitele [6]. Detailní analýza proteomu ječmene je důležitá pro jeho efektivní využití v zemědělství a potravinářském průmyslu. Získané poznatky pomáhají při pochopení biologických a technologických vlastností ječmene (např. odolnosti rostliny ječmene vůči suchu či chladu, vlivu na kvalitu piva apod.). Navíc bylo stanovení proteinů a glykoproteinů úspěšně použito k identifikaci ječných odrůd, jejichž přesná znalost je důležitá zejména ve sladařském průmyslu [7, 8].

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Izolace ječných proteinů

Jako výchozí materiál pro extrakci proteinů byly použity pomleté obilky ječmene z jednotlivých odběrů sbíraných po dobu celého sladování (zrno, zelený slad, slad a vzorky odebrané v průběhu sladování – první až pátý den). Vzorky ječmene (odrůda Jersey) byly získány z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského (VÚPS, Brno, ČR). Metoda mikroskladování byla založena na tradičním postupu používaném ve VÚPS [9].

Proteiny z rozemletých ječných zrn (50 mg mouky pro 1D-GE resp. 600 mg pro 2D-GE) byly extrahovány pomocí 1 ml (pro 1-D GE) resp. 3 ml (pro 2-D GE) deionizované vody.

2.2 Separace ječných proteinů

Extrakty byly podrobeny jednorozměrné gelové elektroforéze (1-D GE; gradientový 4–20 % TRIS-HCl gel (Bio-Rad), vizualizace proteinů Coomassie Brilliant blue G-250; CBB), nebo dvourozměrné gelové elektroforéze (2-D GE; 1. rozměr: IEF na IPG stripech (BioRad) s lineárním rozsahem pI 3–10; 2. rozměr: 15 % SDS gel, vizualizace proteinů CBB).

Po separaci byly změny proteinového profilu mapovány pomocí vyhodnocovacího softwaru PDQuest (BioRad). Jednotlivé skvrny vybraných ječných bílkovin byly z gelů vyříznuty (Bio-Rad ExQuest™ spot cutter) a podrobeny enzymatickému štěpení (použitý enzym: trypsin či chymotrypsin). Před vlastním měřením byly získané peptidy přečištěny na reverzní fázi C₁₈ podle protokolu výrobce (ZipTip špičky, Millipore). Odsolený roztok peptidů byl analyzován pomocí MALDI-TOF MS.

2.3 MS analýza a identifikace vybraných proteinů

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, USA). MS/MS data byla získána za použití dusíku jako kolizního plynu. Matrice 4-hydroxy- α -kyanoskořicová kyselina (10 mg/ml 0,1 % kyselina trifluoroctová/acetonitril (1:1, v/v)) byla použita při všech analýzách peptidů získaných enzymatickým štěpením. Identifikace proteinů pomocí peptidového mapování, resp. MS/MS dat byla provedena programem MASCOT (proteinová sekvenční databáze NCBI a SwissProt) dostupným na internetových stránkách www.expasy.org. Tyto databáze jsou provozovány Evropskou molekulárně-biologickou laboratorí (European Molecular Biology Laboratory, EMBL) a Švýcarským institutem pro bioinformatiku (Swiss Institute of Bioinformatics).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Rozhodujícím krokem v proteomické analýze je příprava vzorku. Pro spolehlivou identifikaci proteinů je tudíž nezbytné před MALDI-TOF MS analýzou vzorek náležitě upravit s využitím některé ze separačních technik [10].

Naše pozornost byla zaměřena na analýzu ve vodě rozpustných proteinů, které zůstávají zachovány po celou dobu sladování a dostávají se až do piva, čímž ovlivňují jeho kvalitu [6]. Získaný extrakt obsahoval stovky proteinů. Pro zjednodušení této proteinové směsi byla použita 1-D a 2-D GE. Pomocí 1-D GE jsou bílkoviny separovány podle svých molekulových hmotností. Tato metoda byla v na-

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the oldest crops. Being second most spread crop (after wheat), the barley has a rich history and prominent place even in our country. Barley varieties have three main uses: malting industry, human food and animal feed. Moreover, it serves as an important experimental and model plant for plant genetics and breeders [6]. The detailed analysis of barley proteome is important for agriculture and food industry. Obtained knowledge helps to understand biologic and technologic parameters of barley (e.g. quality of beer, resistance of barley plant to drought, cold, etc.). Moreover, the cultivar determination can be accomplished by the analysis of barley proteins and glycoproteins. It is important mainly for malting industry [7, 8].

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Extraction of Proteins from Barley Grains

Barley mature grain, grain after 1–5 days of malting and green and ready malt were used for the extraction of water-soluble proteins. Barley in different malting degrees (cultivar Jersey) was obtained from Research Institute of Brewing and Malting (RIBM, Brno, Czech Republic). Micromalting method was based on the traditional procedure used in the RIBM [9].

Proteins were extracted from barley grain (50 mg of flour for 1-D GE; 600 mg for 2-D GE, respectively) by 1 ml (for 1-D GE) or 3 ml (for 2-D GE) of deionized water.

2.2 Barley Protein Separation

Obtained extracts were subjected to one-dimensional gel electrophoresis (1-D GE; gradient gel 4–20 % TRIS-HCl gel (Bio-Rad), visualization Coomassie Brilliant blue G-250, CBB) or two-dimensional gel electrophoresis (2-D GE; 1st dimension: IPG linear strips (BioRad) pI 3–10; 2nd dimension: 15 % SDS gel, CBB staining). The changes of protein profile were monitored by analysis software PDQuest (BioRad). Selected protein bands were excised using BioRad ExQuest™ spot cutter and enzymatically in-gel digested (by trypsin or chymotrypsin). Obtained peptides were purified by ZipTip C₁₈ (Millipore) prior to MS analysis. Desalted solution of peptides was analyzed by MALDI-TOF MS.

2.3 MS analyses and identification of selected proteins

Mass spectra were acquired with Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Nitrogen was used as the collision gas for all MS/MS experiments. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA; 10 mg/mL 0.1 % trifluoroacetic acid/acetonitrile (1:1, v/v)) was used as a MALDI matrix for the analysis of peptides obtained by enzymatic digestion. Protein identification was performed by the comparison of the peptide masses and MS/MS data against the sequence databases using the MASCOT search engine (database SwissProt or NCBI) available via www.expasy.org. SwissProt is a protein sequence database running by European Molecular Biology Laboratory and Swiss Institute of Bioinformatics.

3 RESULTS AND DISCUSSION

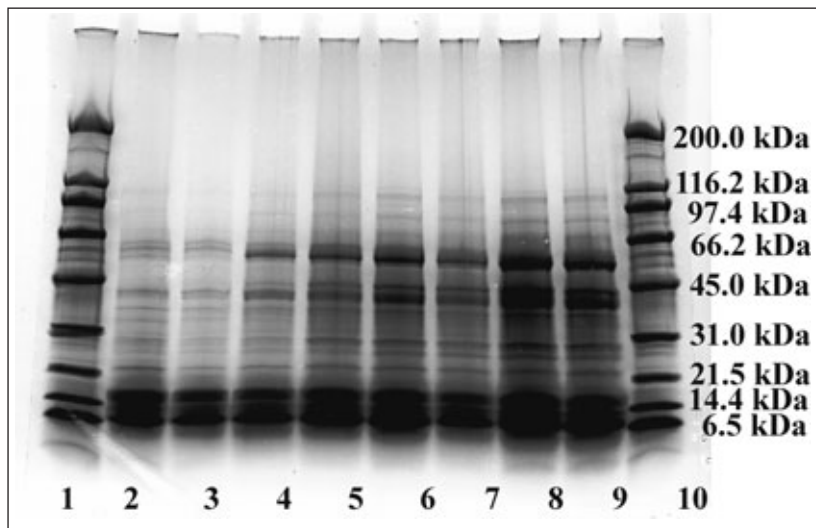
The crucial step in proteomic analysis is the sample preparation. The combination of separation techniques with MALDI-TOF MS is required for the reliable identification of proteins [10].

The attention was paid to water-soluble proteins which survive malting conditions and remain in malt and beer and influence its quality [6]. Obtained extracts contained hundreds of proteins. In order to simplify this protein mixture common separation techniques like 1-D and 2-D GE have been employed. In 1-D GE, proteins are separated according to their molecular weights. This method was used for the separation of barley proteins, but moreover complex of changes of protein profiles during the malting was characterized. Our attention was focused on the analysis of proteins that are modified during the malting, which can lead to the stabilization of protein (e.g. effects on the thermostability). Glycation (= the attachment of one or more glucose molecules to a polypeptide chain) is one of such modifications [11].

A lot of protein bands with molecular masses in the range of 6–100 kDa were detected after electrophoretic separation. A visual inspection of a gel confirmed significant changes of protein profile

šem případech využita nejen k separaci bílkovin, ale i ke komplexní charakterizaci změn v proteinovém profilu během sladování. Naše pozornost byla věnována proteomické analýze ječných proteinů, u kterých dochází během sladování k modifikacím, které mohou vést ke stabilizaci daného proteinu (například zlepšení odolnosti proteinu vůči zvýšené teplotě). Jednou z takových modifikací je připojení jedné či více molekul glukosy na polypeptidický řetězec. Tato modifikace se nazývá *glykace* [11].

Po elektroforetickém dělení ječných extraktů byla odhalena na gelu řada proteinových proužků v rozmezí molekulových hmotností 6–100 kDa. Vizuální kontrola gelů potvrdila, že změny proteinového profilu je možné pozorovat již od druhého dne sladování, a to minimálně u pěti proteinových proužků. Nejmarkantnější rozdíly byly nalezeny v oblasti s molekulovou hmotností 59, 43, 30 a 23 kDa (obr. 1).



Obr. 1 1-D TRIS-HCl gradientový gel. 1, 10 – směs standardů, 2 – extrakt z obilí, 3 – extrakt z obilí po prvním dnu sladování, 4 – extrakt obilí po druhém dnu sladování, 5 – extrakt obilí po třetím dnu sladování, 6 – extrakt z obilí po čtvrtém dnu sladování, 7 – extrakt z obilí po pátém dnu sladování, 8 – extrakt ze zeleného sladu, 9 – extrakt ze sladu. / Fig. 1 1-D TRIS-HCl gradient gel. 1, 10 – molecular weight marker (MWM), protein extract from: 2 – barley grain, 3 – the first day of malting, 4 – the second day of malting, 5 – the third day of malting, 6 – the fourth day of malting, 7 – the fifth day of malting, 8 – green malt, 9 – malt

Vybrané proteinové proužky byly vyříznuty z gelu a podrobeny štěpení enzymem. Byl získán soubor specifických peptidů daného proteinu, které byly po purifikaci použity pro MALDI-TOF MS analýzu. V MALDI-TOF hmotnostních spektrech digestů jednotlivých proteinů byly nalezeny ionty peptidů. Příklad jednoho z hmotnostních spekter je na obr. 2.

Soubor naměřených hmotností peptidů byl pak srovnáván pomocí prohledávacích programů s proteinovými databázemi. Dále byly nalezené peptidy odpovídající jednotlivým proteinům fragmentovány (MS/MS analýzy) a získaná fragmentační spektra opět databázově vyhodnocena. S vysokou pravděpodobností byla identifikována řada proteinů, z nichž následující patří k těm, u kterých dochází k nevýraznějším kvantitativním či kvalitativním modifikacím: amylasa subtilisin inhibitor (22,4 kDa), protein Z (43,3 kDa), peroxidasa PB1(32,2 kDa) a β -amylasa (59,9 kDa).

Jedním z nejzajímavějších proteinů z vybrané skupiny je „protein Z“. Tato bílkovina je považována za jednu z klíčových látek, které pozitivně ovlivňují pěnivost piva. Protein Z je ječná albuminová bílkovina tvořená několika homologními proteiny představující 10–25 % všech nedialyzovatelných bílkovin piva [12].

Pomocí 1-D GE bylo možné charakterizovat některé změny

obsahované po druhém dni sladování na minimálně pět proteinových pásů. The most noticeable differences were found at molecular masses about 59 kDa, 43 kDa, 30 kDa, and 23 kDa (Fig. 1).

Selected protein bands were cut out from a gel and digested by enzyme. The series of specific peptides of particular protein was obtained, purified and used for MALDI-TOF MS analysis. The MALDI-TOF mass spectra of protein digests showed the ions of peptides. An example of such mass spectrum is on the Fig. 2.

A set of masses obtained by a mass spectrometer was compared to protein database by using computer programs. Furthermore, the peptides, corresponding to individual proteins, were fragmented (MS/MS analyses) and obtained fragmentation spectra were interpreted by databases too.

Several proteins were identified with high correlation scores. The proteins, which quantitative or qualitative changes were the most noticeably included: amylase subtilisin inhibitor (22.4 kDa), peroxidase PB1(32.2 kDa), protein Z (43.3 kDa), and β -amylase (59.9 kDa).

Protein Z is one of the most interesting proteins from this group. It is considered to one of the key factor that can positively influence beer foam. Protein Z is barley albumin formed by several homologous proteins that represent 10–25 % of all non-dialyzed beer proteins [12].

We were able to characterize certain changes of protein profile using 1-D GE; nevertheless the resolution of individual proteins was not sufficient therefore 2-D GE was performed. Proteins are separated from each other by an isoelectric point in the first step (1st dimension) and then by their molecular masses (2nd dimension). Thereby 2-D GE is also applied for separation of proteins that differ only in a modification. Fig. 3 and Fig. 4 show 2-D gels of extracts from grain and malt. The areas of the noticeable changes are marked by rectangles in Fig. 3 and 4.

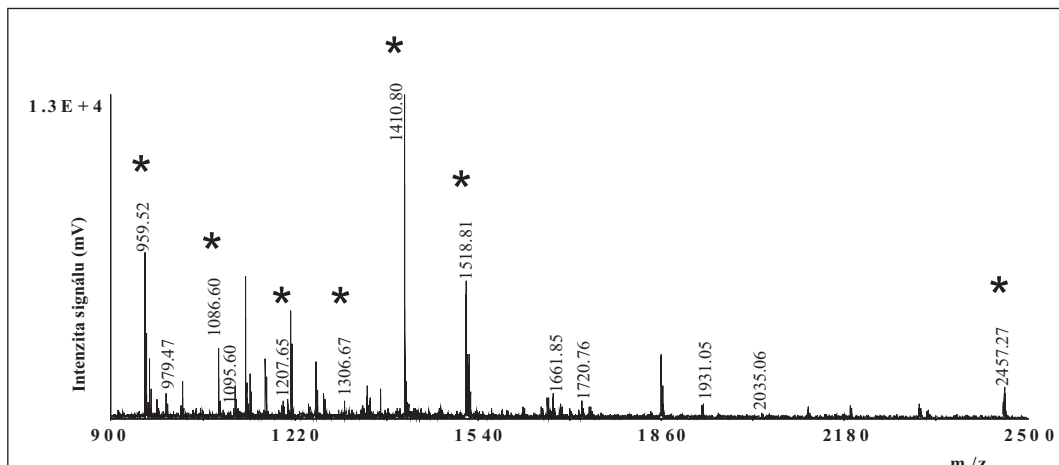
Protein patterns of extracts from grain and malt were compared using PDQuest imaging system (special software, BioRad). The spots that had a statistically significant difference were enzymatically digested, characterized by MALDI-TOF MS and identified.

The results from 1-D and 2-D GE confirmed that protein Z belongs among the proteins that are subject to changes. 2-D GE of malt extract revealed that protein Z formed several 2-D spots due to the presence of chemical modifications which modify this protein during the malting.

Moreover the presence of several sequence homologues (= proteins vary in one or more amino acids) could cause this observation too. We clearly confirmed minimal two molecules of protein Z with the different amino acid sequence.

4 CONCLUSION

The changes of protein profile induced by malting were monitored using up-to-date proteomic approach including the combination of



Obr. 2 MALDI-TOF hmotnostní spektrum peptidové směsi získané z proteinového bandu s molekulovou hmotností 43 kDa po enzymovém štěpení. (*) označuje peptidy proteinu Z. / Fig. 2 MALDI-TOF mass spectrum of peptide mixture from in-gel enzyme digest of a protein band 43 kDa. The asterisks (*) mark peptides coming from barley protein Z

v proteinovém profilu, nicméně rozlišení jednotlivých proteinů nebylo ideální. Proto bylo přistoupeno k 2-D GE, která v prvním kroku rozděljuje proteiny na základě jejich izoelektrických bodů (1. rozměr) a pak teprve dle jejich molekulových hmotností (2. rozměr). Tím umožňuje například i rozdělení proteinů, které se liší pouze v modifikaci. Na obr. 3 a 4 jsou uvedeny 2-D gely představující extrakt z obilí a ze sladu. Oblasti nejvýznamnějších změn byly zvýrazněny rámečky.

Pomocí speciálního vyhodnocovacího programu (PDQuest, Bio-Rad) byly gely z extraktů zrna a sladu porovnány a proteinové skvrny, které byly vyhodnoceny jako statisticky významně změněné, byly opět enzymaticky štěpeny, charakterizovány pomocí MALDI-TOF MS a identifikovány.

Výsledky z 2-D GE potvrdily, že mezi proteiny, které podléhají změnám, patří již zmíněný protein Z. 2-D GE sladu odhalila, že protein Z se nachází ve více spotech díky modifikacím, kterým daný protein podléhá během sladování. Navíc tento jev může být způsoben i přítomností několika sekvenčních homologů dané bílkoviny (= stejné proteiny lišící se vzájemně o jednu nebo více aminokyselin). V našem případě byl jednoznačně potvrzen výskyt minimálně dvou různých molekul proteinu Z, lišících se aminokyselinovým složením.

4 ZÁVĚR

Pomocí moderních proteomických postupů, které zahrnovaly kombinaci separačních metod (1-D a 2-D GE) a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, byly sledovány změny v proteinovém profilu během sladování, přičemž byl důraz kladen zejména na majoritní proteiny a jejich modifikace. Z modifikací proteinů byly studovány zejména tzv. glykace, které se objevily u proteinů po sladování ječmene.

Předložená studie ukazuje, že tento proteomický přístup by mohl být aplikován na monitorování vývoje sladování a analýza proteinů ve sladu by pak mohla být užitečná zejména sladařům při posuzování kvality sladu a následně i piva.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podporována projektem č. 1M0570 (Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele) – Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a výzkumným záměrem Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i. č. AV0Z40310501.

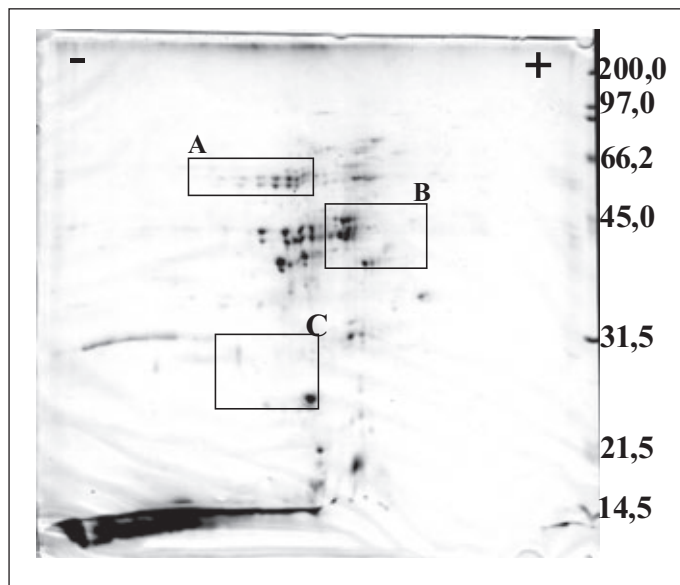
LITERATURA / REFERENCES

1. Twyman, R. M.: Principles of proteomics. BIOS Scientific Publishers, New York, 2004.
2. Chmelík, J.: Proteomický průvodce. Chem. Listy **99**, 2005, 883–885.
3. Vaňková, H.: Peptidové mapy. Chem. Listy **93**, 1999, 120–127.
4. Zdráhal, Z., Plocek, J., Konečný, P., Chmelík, J.: Characterization of biomacromolecules using mass spectrometry. Chem. Listy **91**, 1997, 811–818.
5. Kadlčík, V., Kodíček, M., Hassman, M.: Utilization of MALDI-TOF mass spectrometry for study of spatial structure of proteins. Chem. Listy **96**, 2002, 618–623.
6. McGregor, A. W., Bhatti, R. S.: Barley: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA, 1993.
7. Weiss, W., Postel, W., Görg, A.: Barley cultivar discrimination 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and glycoprotein blotting. Electrophoresis **12**, 1991, 323–330.
8. Finnie, C., Svensson, B.: Barley seed proteomics from spots to structures. J. Proteomics, **72**, 2009, 315–324.
9. Prokeš, J., Vaculová, K., Milotová, J.: Vybrané sladovnické parametry nových přírůstků z kolekce genetických zdrojů jarního ječmene. Kvasný Prům. **53**, 2007, 162–167.
10. Rabilloud, T., Vaezzadeh, A. R., Potier, N., Lelong, C., Leize-Wagner, E., Chevallet, M.: Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategie. Mass Spectrom Rev. **28**, 2009, 816–843.
11. Niwa, T.: Mass spectrometry for the study of protein glycation in disease. Mass Spectrom Rew. **25**, 2006, 713–723.
12. Čížková, H., Dostál, P., Fiala, J., Kolouchová, I.: Importance of proteins from the viewpoint of stability of the beer foam. Chem. Listy **100**, 2006, 478–485.

Recenzovaný článek

Do redakce došlo 1. 10. 2009

Přijato k publikování: 18. 11. 2009



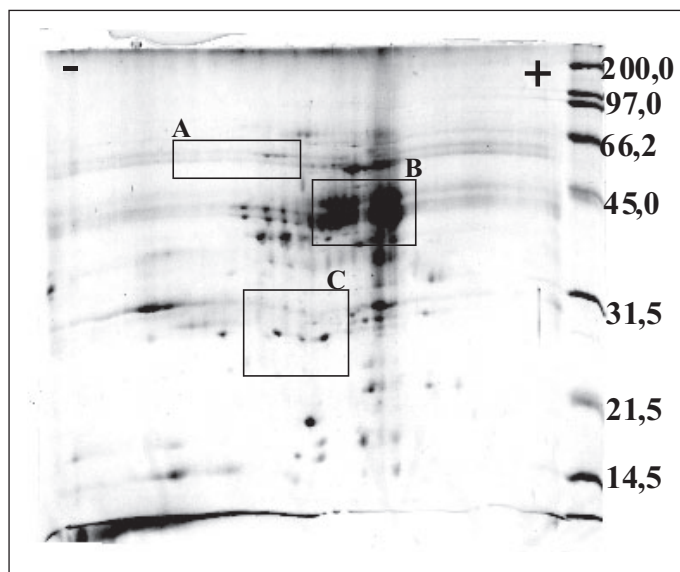
Obr. 3 2-D 15% SDS gel barvený CBB-G250 – vzorek: bílkovinný extrakt z ječných zrn. Rámečky A–C označují oblasti nejvýznamnějších změn proteinového profilu / Fig. 3 2-D 15% SDS gel stained by CBB-G250 – sample: protein extract of barley grain. The rectangles represent the areas of the noticeable changes

separation methods (1-D and 2-D GE) and MALDI-TOF mass spectrometry. The main attention was focused on the important proteins and their modifications, mainly glycations which were observed after malting.

This study shows that used proteomic approach can be applied for the monitoring of malting stages and thus the analysis of proteins can be helpful to maltsters and to all beer producers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant No. 1M0570 (Research Centre for Study of Extract Compounds of Barley and Hop) from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and the Institutional Research Plan AVOZ40310501 of Institute of Analytical Chemistry of the ASCR, v. v. i.



Obr. 4 2-D 15% SDS gel barvený CBB-G250 – vzorek: bílkovinný extrakt z hotového sladu. Rámečky A–C označují oblasti nejvýznamnějších změn proteinového profilu / Fig. 4 2-D 15% SDS gel stained by CBB-G250 – sample: protein extract of barley malt. The rectangles A–C represent the areas of the noticeable changes