

Vliv pivovarského procesu na profil proteinů ječmene

Influence of the Brewing Process on the Barley Protein Profile

DAGMAR BENKOVSKÁ^{1,2}, DANA FLODROVÁ¹, VRATISLAV PSOTA³, JANETTE BOBÁLOVÁ¹

¹ Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 97, 602 00 Brno / *Institute of Analytical Chemistry of the ASCR, v. v. i., Veveří 97, 602 00 Brno, Czech Republic*

² Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 118, 612 00 Brno / *Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic*

³ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Mostecká 7, 614 00 Brno / *Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Mostecká 7, 614 00 Brno, Czech Republic*

e-mail: benkovska@iach.cz

Benkovská, D. – Flodrová, D. – Psota, V. – Bobálová, J.: Vliv pivovarského procesu na profil proteinů ječmene. Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 260–265.

Práce byla zaměřena na identifikaci proteinů v průběhu výroby piva, přičemž největší pozornost byla věnována proteinům, které ovlivňují kvalitu a stabilitu pěny, obzvláště nsLTP proteinům a proteinu Z. Profil uvedených proteinů byl sledován v ječmenném zrně, sladu, sladidě a mladidě a bylo provedeno porovnání zastoupení jednotlivých proteinů. K porovnání bílkovinného profilu byla využita kombinace separačních technik a hmotnostní spektrometrie. Na základě HPLC a elektroforetické separace byly sledovány kvalitativní rozdíly v obsahu proteinů v jednotlivých meziproduktech výroby piva a nalezené proteiny byly úspěšně identifikovány.

Benkovská, D. – Flodrová, D. – Psota, V. – Bobálová, J.: Influence of the brewing process on the barley protein profile. Kvasny Prum. 57, 2011, No. 7–8, p. 260–265.

Our work was focused on identification of proteins within the process of beer production, whereas the main interest was oriented to proteins that can affect the quality and stability of foam, especially nsLTP and protein Z. The protein profile was monitored in barley grain, malt, sweet wort and wort and green beer and individual protein representation was compared. For the comparison of protein profile the combination of separating techniques and mass spectrometry was used. On the basis of HPLC and electrophoretic separation also the quantitative differences of protein content in individual intermediate products of beer technology were observed and found proteins were successfully identified.

Benkovská, D. – Flodrová, D. – Psota, V. – Bobálová, J.: Der Einfluß des Brauprozesses auf Profil der Gerstenproteine. Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 7–8, S. 260–265.

Der Artikel befaßt sich mit der Identifikation der Proteine im Laufe der Bierherstellung, die größte Aufmerksamkeit wurde der Bierqualität und -Schaumstabilität beeinflussenden Proteinen (insbesondere nsLTP Proteinen und Z Protein) gewidmet. Das Profil angeführten Proteine wurde im Gerstenkorn, im Malz, in der Süßwürze, in der Würze verfolgt, weiterhin ist ein Vergleich der einzelnen Proteine durchgeführt worden. Zum Vergleich des Proteinprofils wurde eine Kombination der Separationstechnik und Masspektrometrie angewandt. Auf Grund der HPLC und elektrophoretischen Separation wurden die qualitative Unterschiede im Gehalt an Proteine in den verschiedenen Etappen der Bierherstellung, die gefundene Proteine wurden erfolgreich identifiziert.

Klíčová slova: ječmen, proteiny, výroba piva

Keywords: barley, protein, brewing process

1 ÚVOD

Pivo je jedním z nejoblíbenějších alkoholických nápojů, pro jehož výrobu jsou nezbytné čtyři suroviny: ječmen (slad), chmel, voda a kvasinky. Obsahuje přibližně 300–800 mg/ml bílkovinného materiálu, který pochází zejména z ječmene, přičemž albuminy, proteiny rozpustné ve vodě a zředěných roztocích solí, kyselin a hydroxidů představují pouze 4 % všech bílkovin v ječmeni. V průběhu výroby piva dochází ke změnám obsahu proteinů. První a zároveň klíčovou fází pivovarského procesu je výroba sladu neboli sladování, při kterém je ječmen přeměněn na slad bohatý na enzymy. Mnoho proteinů je při sladování a obzvláště při rmutování štěpeno aktivními proteolytickými enzymy [1,2]. Proces výroby sladu zahrnuje tři fáze: máčení, klíčení a hvozďení. V průběhu máčení se zvýší obsah vody v zrně pro zahájení enzymatických reakcí a pro klíčení zrna. Klíčení je hlavní fáze výroby sladu, při které dochází k aktivaci a nové tvorbě enzymů. Příkladem jsou amylolytické enzymy, které se podílejí na hydrolýze škrobu, glykogenů a dalších polysacharidů, v nichž se vyskytují α -1,4-glykosidické vazby. Jsou to α -amylasa a β -amylasa a mají zásadní význam především v procesu rmutování. Tyto enzymy štěpí škrob a tím se podílejí na obsahu zkvasitelných sacharidů ve sladidě. Alfa-amylasa nebyla v ječmeni prokázána a vzniká teprve při klíčení. Beta-amylasa je v malém množství přítomna již v ječmenném zrně a při sladování se její obsah zvyšuje. Při hvozďení oba enzymy částečně denaturují, α -amylasa více vzhledem k značné citlivosti na teplotu. Hvozďení je závěrečnou fází výroby sladu, během které je zelený slad s vysokým obsahem vody převeden do skladovatelného a stabilního stavu. Po něm navazuje odklíčování, čištění a šrotování sladu. Dále v pivovarském procesu následuje vystírání (smísení sladového

1 INTRODUCTION

Beer belongs to the one of the most popular alcoholic beverage, for its production the four main raw materials are required: grain (malt), hop, water and yeast. Beer contains approximately 300–800 mg/mL of proteins that originate mainly from grain, whereas albumins, water soluble proteins and proteins soluble in salt solutions of acids and alkali represent only 4 % of all barley grain proteins. During the beer production there is change of protein content. The first and essential phase of brewing is malting, when the grain is converted into the enzyme rich malt. Within the malting and mainly mashing, a lot of proteins are digested by active proteolytic enzymes [1,2]. Process of malt production includes three steps: steeping, germination and malt kilning. During the steeping there is a growth of water content in grain what initiates enzymatic reactions for grain germinating. Germination means the main stage of malting, when new enzymes are activated and formed. For example, amylolytic enzymes are involved in hydrolysis of starch, glycogen and other polysaccharides containing α -1,4-glycosidic bonds. The crucial signification shows α -amylase and β -amylase mainly during mashing. These enzymes degrading the starch are responsible for the increasing amount of fermentable sugars in sweet wort. Alpha-amylase has not been proven and is indicated not until the germination phase. Beta-amylase is presented already in barley grain and during malting the amount increases. Both of these enzymes are partially degraded during the malt kilning, whereas α -amylase is more temperature sensitive and its decomposition run faster. The kilning process is the final part of malting, when the green malt is converted into the more storable and stable form. This process is followed by the germ removing, refining and malt breaking. Next

šrotu s vodou) a rmutování, při kterém se při řízeném vzestupu teploty převedou žádoucí složky extraktu sladu do roztoku [2]. Rmutování probíhá v několika stupních při různých teplotách, které odpovídají teplotnímu optimu žádoucích enzymů [3].

Získaný extrakt sladiny je oddělen od nerozpustných zbytků sladového zrna, tj. od mláta. Dále je sladina povařena s chmelem, přičemž se do ní rozpustí hořké látky chmele a produkt se tepelně stabilizuje. V průběhu chmelovaru klesá hodnota pH, což příznivě ovlivňuje koagulaci (srážení) bílkovin. Získaná mladina je po odloučení kalů a ochlazení připravena pro kvasný proces. Při kvašení piva dochází k řízené přeměně sacharidů na alkohol a CO₂ za působení pivovarských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, a současně k vytváření vhodných organoleptických vlastností piva [2].

V pivovarské technologii je důležitým aspektem kvality piva pěna piva, převážně její stabilita, tvorba a textura. Stabilitu pěny ovlivňuje přítomnost několika chemických látek: polysacharidů, látek z chmele a metaloninů a v neposlední řadě proteinů, přičemž nejdůležitější proteiny v pivu jsou protein Z, nespecifické proteiny přenášející lipidy (ns-LTPs) LTP1 a LTP2, trypsin/α-amylasové inhibitory a hordeiny [4,5].

V této studii byly sledovány a porovnány změny profilu proteinů během sladařského a pivovarského procesu. Ve vodě rozpustné proteiny z ječmenného zrna, sladu, mladiny a prokvašené mladiny byly separovány na polyakrylamidovém gelu, enzymově štěpeny v gelu a získané peptidy byly následně extrahovány a identifikovány pomocí MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrie. Aplikace elektroforézy na polyakrylamidovém gelu a hmotnostní spektrometrie jsou oblíbené metody v proteomice a efektivní nástroj pro stanovení změn v proteinovém složení různých biologických a technologických procesů. Dále byly proteiny separovány na reverzní fázi vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a získané chromatogramy byly porovnány. Chromatografie s monolitickou kolonou C18 byla použita jako vhodná technika pro velmi rychlou separaci proteinů [6]. Separované proteiny zrna a sladu byly rovněž enzymově štěpeny a identifikovány. Nakonec byla pozornost zaměřena na nízkomolekulární intaktní proteiny a jejich profil byl zmapován pomocí MALDI/TOF MS v lineárním módu.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Materiál

Téměř všechny chemikálie byly získány od Sigma-Aldrich (Schnell-dorf, Německo). Trypsin byl opatřen od Roche Diagnostics (Manheim, Německo), C18 ZipTip od Millipore (Billerica, MA, USA) a α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA) od LaserBio Labs (Sophia-Antipolis Cedex, Francie). Vzorky ječmenného zrna, sladu, mladiny a fermentované mladiny odrůdy Tolar byly získány z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského (VÚPS, Brno, ČR).

2.2 Extrakce proteinů

Vzorky mladiny, mladiny a prokvašené mladiny byly pro další použití lyofilizovány. Pro získání albuminové frakce zrna a sladu bylo při pokojové teplotě, dvakrát pomocí 0,5 ml deionizované vody, extrahováno 50 mg pomletého zrna. Poté byly extrakty centrifugovány a supernatanty jednoho vzorku byly spojeny a lyofilizovány.

2.3 Elektroforetická separace proteinů

Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v Laemmli vzorkovacím pufru (BioRad, CA, USA) a krátce povařeny. Elektroforetická separace byla provedena na gradientovém gelu 4–20 % TRIS-HCl (BioRad) a poté byl gel obarven barvivem Commassie Brilliant Blue R-250 (CBB). Jednotlivé obarvené bandy byly z gelu vyříznuty a podrobeny trypsinovému štěpení [7]. Získané peptidy byly pro MS analýzu purifikovány pomocí C18 ZipTip (Millipore).

2.4 HPLC separace proteinů

Separace byla provedena na kapalinovém chromatografu Hewlett-Packard 1100 Series, vybaveném kolonou s reverzní fází Poroshell 300SB-C18, 2.1 x 75 mm, 5 μl I.D. (Agilent Technologies, USA). Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v 0,1% kyselině trifluoroctové (TFA) v koncentraci 60 mg/ml, centrifugovány a bylo analyzováno 5 μl extraktu. Frakce byly separovány v lineárním gradientu 10–80% acetonitrilu (ACN) v 0,1% TFA při průtoku 1 ml/min a monitorovány při 214 nm. Získané frakce byly enzymově štěpeny a identifikovány hmotnostní spektrometrií.

2.5 Identifikace hmotnostní spektrometrií

Všechna spektra byla získána pomocí spektrometru 4700 Proteomic

step of brewing technology is mashing, when due to the increasing temperature all desirable compounds of malt extract are converted into solution [2]. The mashing program is running in several steps and the program is set to hold the temperatures corresponding to optimal conditions of individual enzymes [3].

After separation from insoluble residues of malt, the obtained sweet wort extract is boiled with hop, what results in dissolution of hop bitter substances and product stabilization. During the hop boiling, the pH value is decreasing importantly for proteins coagulation. Acquired wort is separated from sediment and so prepared for the fermentation process. The fermentation of beer promoted by brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* cause the controlled conversion of saccharides into alcohol and CO₂ as well as production of required organoleptic properties of beer [2].

In brewing technology, the formation, stability, and texture of foam on the surface of beer are important aspects of beer quality. The components that influence foam stability include proteins, polysaccharides, substances from hops and metal ions. The most important proteins in beer are protein Z, nonspecific lipid transfer proteins (ns-LTPs) LTP1 and LTP2, trypsin/α-amylase inhibitors and hordein fractions [4,5].

In this work, changes of protein profile during the brewing process were monitored and compared. Water soluble proteins from barley grain, malt, sweet wort, wort and green beer were separated on polyacrylamide gel, in-gel digested and obtained peptides were then identified using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry are the most useful methods in proteomics and powerful tools for determination of changes in protein composition in various biological and technological processes. Furthermore, proteins were separated on reverse phase HPLC and chromatograms were compared. Chromatography with C18 monolithic column was used as a suitable technique for very fast separation of proteins [6]. Separated grain and malt proteins were digested and identified as well. Finally the attention was focused on low molecular intact proteins and their profile was mapped using MALDI/TOF MS in linear mode.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Material

Almost all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Schnell-dorf, Germany). Trypsin was obtained from Roche Diagnostics (Manheim, Germany), C18 ZipTip from Millipore (Billerica, MA, USA) and α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) from LaserBio Labs (Sophia-Antipolis Cedex, France). Barley grain, malt, sweet wort, wort and green beer samples of variety Tolar were obtained from Research Institute of Brewing and Malting, PLC (RIBM, Brno, CZ).

2.2 Protein extraction

For further use, sweet wort, wort and green beer samples were lyophilized. 50 mg of milled barley grain and malt were extracted at room temperature twice with 0.5 mL of deionised water to obtain the albumin fractions. The extracts were next centrifuged and supernatants from one sample were combined and lyophilized.

2.3 Electrophoretic separation of proteins

Lyophilized samples were dissolved in Laemmli sample buffer (BioRad, CA, USA) and briefly boiled. Electrophoretic separation was carried out on gradient gel 4–20 % TRIS-HCl (BioRad) and after that gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB). The protein bands were excised from the gel and subjected to in-gel trypsin digest [7]. For MS analysis obtained peptides were purified with ZipTip C18 pipette tips (Millipore).

2.4 HPLC separation of proteins

Liquid chromatography separation was carried out using Hewlett-Packard 1100 Series chromatograph equipped with reverse phase column Poroshell 300SB-C18, 2.1 x 75 mm, 5 μL I.D. (Agilent Technologies). Lyophilized samples were dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in concentration of 60 mg/mL, centrifuged and 5 μL of extract were analyzed. Fractions were separated in a linear gradient of 10–80% acetonitrile (ACN) in 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min and monitored at 214 nm. Obtained fractions were digested and identified by mass spectrometry.

2.5 Mass spectrometry identification

All spectra were acquired on 4700 Proteomic Analyzer (Applied

Analyzer (Applied Biosystems) vybaveným Nd:YAG laserem (355 nm) a TOF/TOF analyzátozem. Data byla analyzována s využitím softwaru 4000 Data Explorer 3.6 (Applied Biosystems) a proteiny byly identifikovány s využitím vyhledávacího nástroje MASCOT a databáze NCBI nr. Vzorky byly míchány s matricí přímo na MALDI destičce v poměru 1:1. Pro vzorky peptidů byla jako matrice použita CHCA (8 mg/ml v ACN/0.1% TFA – 1/1; v/v), zatímco vzorky proteinů byly míchány s 2,6-dihydroxyacetofenonem (DHAP; 50 mg/ml v ACN/0.1% TFA – 1/1; v/v).

Biosystems) equipped with an Nd:YAG laser (355 nm) and TOF/TOF analyzer. Data were analyzed using 4000 Data Explorer 3.6 software (Applied Biosystems) and protein identifications were assigned using MASCOT search engine using the NCBI nr database. Samples were mixed directly on MALDI plate 1:1 with the matrix solution. CHCA (8 mg/mL in ACN/0.1% TFA – 1/1; v/v) were used as matrix for peptide samples while protein samples were mixed with 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP; 50 mg/mL in ACN/0.1% TFA – 1/1; v/v).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí gelové SDS elektroforézy byly proteiny v analyzovaných vzorcích dostatečně separovány podle jejich molekulových hmotností (obr. 1) a po následném trypsinovém štěpení byly identifikovány pomocí MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrie. Identifikované proteiny jsou sepsány v tab. 1.

Ve studovaných stupních pivovarského procesu byly zaznamenány významné změny v proteinovém složení albuminové frakce, přičemž nejmarkantnější změny se uskutečňují v průběhu sladování a rmutování.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Proteins were sufficiently separated using SDS gel electrophoresis according their molecular masses (Fig 1) and after trypsin digestion they were identified using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Identified proteins are summarized in Tab. 1.

In the investigated stages of brewing process significant changes in protein composition of albumin fraction were noticed, whereas the most apparent changes occur within malting and mashing. During malting the barley grain is germinating what increases the protein

Tab. 1 Přehled proteinů identifikovaných po tryptickém štěpení / Survey of proteins identified after tryptic digestion

| spot | zrno grain | slad malt | sladina sweet wort | mladina wort | prokvašená mladina green beer |
|------|---------------|---|-----------------------|-----------------|---|
| 1. | | heat shock 70 kDa protein [<i>Zea mays</i>] | | | |
| 2. | | beta-D-xylosidase | | | |
| 3. | | beta-glucosidase | | | |
| 4. | | beta-amylase | | | |
| 5. | | | | | enolase 1 [<i>Saccharomyces cer.</i>] |
| 6. | | chain A, Amy2BASI PROTEIN-Protein Complex alpha-amylase | | | |
| 7. | | protein z-type serpin | | | |
| | | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic fructose-bisphosphate aldolase | | | |
| 8. | | aldose reductase peroxidase BP 1 | | | |
| | | glucose and ribitol dehydrogenase homolog | | | |
| 9. | | chain A, The Three-Dimensional Structures Of Two Plant Beta-Glucan Endohydrolases With Distinct Substrate Specificities 26 kDa endochitinase 1 | | | |
| 10. | | 26 kDa endochitinase 2 triosephosphate isomerase, cytosolic | | | |
| 11. | | barperm1 thaumatin-like protein TLP6; TLP7 basic pathogenesis-related protein PR5 | | | |
| | | thaumatin-like protein TLP8 chitinase | | | |
| 12. | | alpha-amylase/subtilisin inhibitor bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor chain C, Amy2BASI PROTEIN-Protein Complex | | | |
| 13. | | alpha-amylase/trypsin inhibitor CMd CMd3 protein alpha-amylase inhibitor BMAI-1 trypsin inhibitor CMe BTI-CMe2.1 alpha-amylase/trypsin inhibitor Cma | | | |
| | | pathogenesis-related protein 1; PRB1-2; PRB1-3 PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a) | | | |
| 14. | | alpha-amylase/trypsin inhibitor CMB | | | |
| 15. | | barwin trypsin inhibitor CMc | | | |
| 16. | | alpha-amylase inhibitor BDAI-1 trypsin/amylase inhibitor pUP38 | | | |
| 17. | | non-specific lipid-transfer protein 1 lipid transfer protein complexed with palmitate | | | |
| 18. | | probable non-specific lipid-transfer protein LTP2 | | | |

vání. Při sladování dochází ke klíčení ječného zrna, které se projevuje růstem množství proteinů i vznikem nových proteinů. Ve vzorku sladu byla stanovena přítomnost enzymů, které nebyly detekovány ve vzorku zrna: α -amylasa, β -D-xylosidasa, endochitinasa 1 nebo chitinasa. Tyto proteiny se buď v neklíčeném zrně nevyskytují a začínají se objevovat až během procesu sladování, nebo je v zrně přítomno velmi malé množství, které nebylo možno detekovat. Pokud se zaměříme na amylolytické enzymy, v souladu s literaturou [2], byla v zrně detekována pouze β -amylasa a α -amylasa vzniká až v procesu sladování a byla identifikována pouze ve vzorku sladu. Zároveň nárůst množství β -amylasy po klíčení zrna se projevil výraznějším bandem na SDS gelu u vzorku sladu.

Ve vzorcích zrna a sladu byly v oblasti 70 kDa identifikovány proteiny rodiny Heat shock 70 pocházející z kukuřice, rýže, *Arabidopsis thaliana* a jiných rostlin. I v ječmeni se předpokládá obsah proteinu s homologními částmi těchto proteinů, ale dosud není uveden v použité databázi. Hmotnostní spektrum tohoto proteinu je uvedeno na obr. 2 a jsou v něm rovněž vyznačeny peptidy identifikované pomocí MS/MS fragmentace.

Jak je zřejmé z proteinového profilu vzorku sladiny (obr. 1), v dalších krocích pivovarského procesu dochází naopak ke značnému úbytku proteinů. Sladina vzniká po rmutování, kdy se slad míchá s vodou a zahřívá. Působením teploty a enzymů, obzvláště proteolytických enzymů, dochází k rozpadu mnoha albuminů. α -amylasa je jedním z proteinů, které ve sladině zůstávají ještě detekovatelné. Naopak teplotně citlivější α -amylasa v procesu rmutování denaturuje. Ve vzorku sladiny byly vedle α -amylasy ještě stanoveny β -D-xylosidasa, barperm a thauma-

amount and formation of new proteins. In malt sample there were discovered some enzymes, which wasn't detected in the grain sample: α -amylase, β -D-xylosidase, endochitinase 1 or chitinase. These proteins either doesn't occur in non-germinated seed and are starting to appear within the malting process or in grain sample a very small and not-detectable amount is present. Focused on amylolytic enzymes, in agreement with literature [2], in barley grain was detected β -amylase alone, whereas β -amylase is forming during the malting process and was identified in the malt sample only. Moreover increasing amount of β -amylase after grain germination was shown in the malt sample as more marked SDS band.

In grain and malt samples in 70 kDa area were identified Heat shock 70 family proteins from maize, rice, *Arabidopsis thaliana* and other plants. In barley, presence of protein with homologous parts with these proteins is hypothesized, but barley protein is not listed in used databases yet. Mass spectrum of this protein with marked peptides, identified using MS/MS fragmentation, is shown in Fig. 2.

As obvious from protein composition of sweet wort sample (Fig. 1), in subsequent steps of brewing process number of proteins is significantly decreasing. Sweet wort is forming after mashing, upon which malt is mixed with water and heated. Many proteins are decomposed by temperature and enzymatic treatment, especially due to proteolytic enzymatic activity. Alpha-amylase is one of the proteins that are in sweet wort still detectable, whereas temperature-sensitive α -amylase denature within mashing. In the sweet wort sample were, together with α -amylase, β -D-xylosidase, barperm and thaumatin-like proteins identified. Apparently, these proteins are precipitated during brewing, since they weren't determined in the wort and green beer samples.

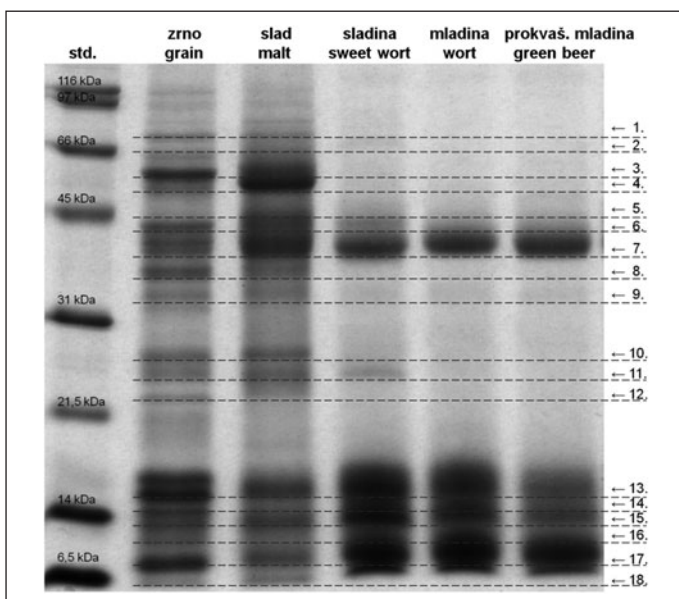
In sweet wort, wort and green beer samples, two general zones of proteins presence were identified: an area about 40 kDa and low-molecular weight proteins in range from 20 to 6 kDa. In the first mentioned area protein Z was identified. This protein with a molecular mass of about 43 kDa has been the first characterized protein in beer where it contributes to foam stability and haze formation. It is composed of different isoforms with an acidic isoelectric point. It is structurally related to serpins, which are the members of the serine protease inhibitor family. During Maillard reactions of the malting process protein Z is glycosylated, otherwise bond of sugar molecule. Glycosylation of protein Z improves foam stability and might prevent precipitation of protein during the wort boiling step [4,5].

Among low-molecular weight proteins, proteins from α -amylase inhibitor group and lipid transfer proteins (LTPs) were identified. Concentration of α -amylase inhibitors is decreased during the brewing process, what resulted to less intense SDS gel band intensity and less intense peptides intensity in MS spectra.

LTPs are ubiquitous plant lipid binding proteins that were originally identified by their ability to catalyze the transfer of lipids between membranes *in vitro*. LTP1 and LTP2 were identified in all analyzed samples. Non specific nLTP1 is an abundant protein of the aleurone layers from barley endosperm. It is characterized by a pI of about 9 and consists of 91 amino acid residues for a molecular mass of 9689 Da. In its structure it has a small hydrophobic cavity allowing the binding of different types of lipids [1].

Furthermore, proteins were separated using liquid chromatography according to their polarity. The changes in proteins profile shown in

Obr. 1 Separace proteinů pomocí SDS gelové elektroforézy / Fig. 1 SDS gel electrophoretic protein separation

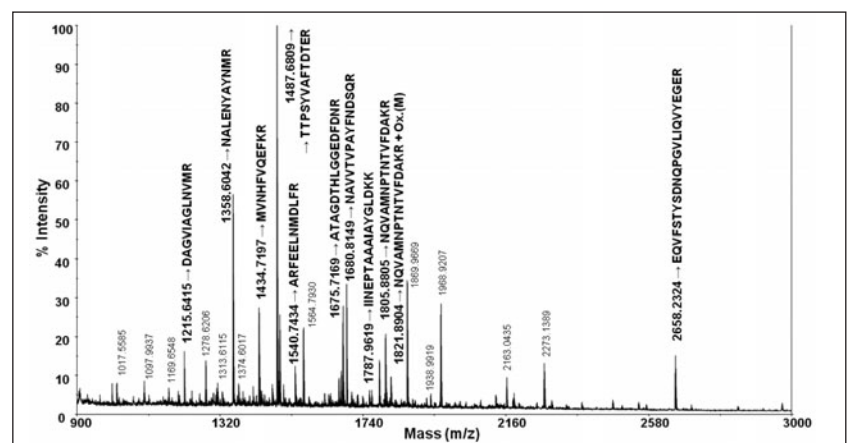


tin-like proteiny. Tyto proteiny jsou zřejmě vysráženy v průběhu chmelovaru, jelikož již nebyly stanoveny ve vzorcích mladiny a prokvašené mladiny.

Ve vzorcích sladiny, mladiny i prokvašené mladiny byly identifikované dvě hlavní oblasti výskytu proteinů: oblast okolo 40 kDa a nízkomolekulární proteiny v rozsahu 20 až 6 kDa. V první jmenované oblasti byl identifikován protein Z. Tento protein s molekulovou hmotností 43 kDa je první charakterizovaný protein v pivo, kde přispívá ke stabilitě pěny a tvorbě zákalu. Je složen z několika isoform s kyselým isoelektrickým bodem. Strukturně je příbuzný serpinům a tedy náleží do skupiny serin proteasových inhibitorů. V průběhu sladování a tzv. Maillardových reakcí dochází k jeho glykaci, neboli navázání cukerné jednotky. Glykace proteinu Z zlepšuje stabilitu pěny a může zabránit precipitaci proteinu během vaření sladiny s chmelem [4,5].

Mezi nízkomolekulárními proteiny byly identifikovány proteiny skupiny α -amylasových inhibitorů a proteiny přenášející lipidy (lipid transfer proteins, LTPs).

Obr. 2 Hmotnostní spektrum proteinu Heat shock 70 kDa (*Zea mays*) identifikovaného ve vzorcích zrna a sladu / Fig. 2 Mass spectrum of Heat shock 70 kDa protein (*Zea mays*) identified in grain and malt samples



Koncentrace α -amylasových inhibitorů se v průběhu výroby piva snižuje, což se projevilo slábnutím intenzity bandů na SDS gelu i snížením intenzity peptidů v MS spektru.

LTP proteiny jsou všudypřítomné rostlinné proteiny, které byly původně identifikovány díky jejich schopnosti katalyzovat přenos lipidů přes membránu *in vitro*. Ve všech analyzovaných vzorcích byly identifikovány proteiny LTP1 a LTP2. Nespecifický nsLTP1 se hojně vyskytuje v aleuronových vrstvách endospermu ječmene. Jeho molekulární hmotnost je 9689 Da, skládá se z 91 aminokyselinových zbytků a je charakterizován isoelektrickým bodem kolem pH 9. Ve své struktuře obsahuje malou hydrofobní dutinu, dovolující vazbu různých typů lipidů [1].

Dále byly proteiny separovány kapalinovou chromatografií dle jejich polarity. Změny v profilu proteinů zobrazené v chromatogramech (obr. 3) souhlasí s elektroforetickou separací. V chromatogramu vzorku zrna je patrné velké množství relativně úzkých píků, zatímco u vzorku sladu se větší počet proteinů projevuje vznikem širších píků. Označené frakce zrna a sladu byly štěpeny trypsinem v roztoku a analyzovány pomocí MS. Identifikované proteiny jsou uvedeny v tab. 2. Ve vzorku sladiny je zřetelný zánik některých proteinů, které jsou degradovány při rmutování, avšak některé proteiny jsou stále patrné. Tyto proteiny jsou proteolyticky štěpeny a sráženy v průběhu chmelovaru a ve vzorku mladiny se již nevyskytují. Vzorky mladiny a prokvašené mladiny mají téměř stejný chromatogram, ve kterém se podle předchozí identifikace vyskytují pouze LTP proteiny, α -amylasové inhibitory a protein Z.

Nakonec byla pozornost zaměřena na nízkomolekulární proteiny, jejichž profil v zru, sladu a sladině byl analyzován pomocí hmotnostního spektrometru MALDI v lineárním módu. Jednotlivá spektra včetně hmotnostně odpovídajících proteinů jsou uvedena na obrázku 4. Mezi majoritní proteiny v oblasti 3–20 kDa patří fragment proteinu Z (4,03 kDa) a LTP proteiny: LTP1 (9,69 kDa), LTP1b (LTP1 s navázanou molekulou lipidu o hmotnosti 294 Da; 9,98 kDa) a LTP2 (7,10 kDa). Ve vzorku zrna byly identifikovány proteiny LTP2 a LTP1b, fragment proteinu Z není detekován. V průběhu sladování dochází ke glykacím, tedy navázáním hexosové jednotky (např. glukosa, maltosa) na protein, které se projeví nárůstem hmotnosti o 162 Da. Ve sladu byl identifikován fragment proteinu Z, LTP2 a LTP1b a jejich glykované formy. Zatímco ve sladu se protein LTP1 vyskytuje zejména v lipidicky modifikované formě, v průběhu rmutování pravděpodobně dochází k štěpení nestabilní vazby připojující lipidickou část, což se projevilo intenzivnějším píkem proteinu LTP1. Protein LTP1b byl ve spektru rovněž identifikován, stejně jako glykované formy obou proteinů.

Zatímco nativní forma nsLTP1 ječmenného zrna nevykazuje pěnotvorné vlastnosti, odpovídající protein v pivu je povrchově aktivní. Této změny je dosaženo díky modifikacím proteinu: glykace v průběhu Maillardových reakcí při sladování, acylaci při rmutování a rozvinutí struktury v průběhu chmelovaru. Navíc zmíněné modifikace, jako lipidace nebo glykace, dodávají ječmenným LTP1 proteinům vysokou teplotní stabilitu. Pěnotvorná forma LTP1 se koncentruje v pивní pěně a pozitivně podporuje její tvorbu, zatímco stabilita pěny závisí na přítomnosti proteinu Z [1,8].

4 ZÁVĚR

V této práci byl úspěšně zmapován profil proteinů v průběhu celého pivovarského procesu. Složení proteinů piva a meziproduktů při jeho výrobě má velký technologický význam, například přítomnost některých enzymů může ovlivnit průběh celého sladování a tím i kvalitu finálního produktu. Nepříznivé podmínky při výrobě piva a působení proteolytických enzymů přecházejí jen minimum proteinů ječmene. Patří mezi ně LTP proteiny, protein Z a trypsin/ α -amylasové inhibitory, které příznivě ovlivňují tvorbu a stabilitu pивní pěny. Při hodnocení jakosti piva je bohatá a hustá pěna významný znak kvalitního Českého piva. Použité techniky mohou být využity pro charakterizaci proteinového profilu během sladovnického a pivovarského procesu. Sledování proteinového profilu má rovněž význam při výběru odrůdy vhodné pro výrobu Českého 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. AV0240310501.

Tab. 2 Srovnání identifikovaných proteinů nalezených v HPLC frakcích zrna a sladu / Comparison of identified proteins obtained from HPLC fractions of grain and malt

| peak No. pik č. | zrno / grain | slad / malt |
|--------------------|--|------------------------------|
| 1. | probable non-specific lipid-transfer protein LTP2 | |
| 2. | non-specific lipid-transfer protein 1 | |
| 3. | Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb trypsin/amylase inhibitor pUP38 CMd3 protein alpha-amylase inhibitor BMAI-1 | |
| 4. | bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor chain C, Amy2BASI PROTEIN-Protein Complex | |
| 5. | putative avenin-like a precursor | |
| 6. | subtilisin-chymotrypsin inhibitor-2A chymotrypsin inhibitor-2 | |
| 7. | alpha-amylase inhibitor/endochitinase 26 kDa endochitinase 2 | |
| 8. | aldose reductase chain A, Crystal Structure Of Barley Grain Peroxidase 1 | |
| 9. | fructose-bisphosphate aldolase | alpha-amylase type B isozyme |
| 10. | beta-amylase | |
| 11. | beta-glucosidase | |
| 12. | protein z-type serpin | |

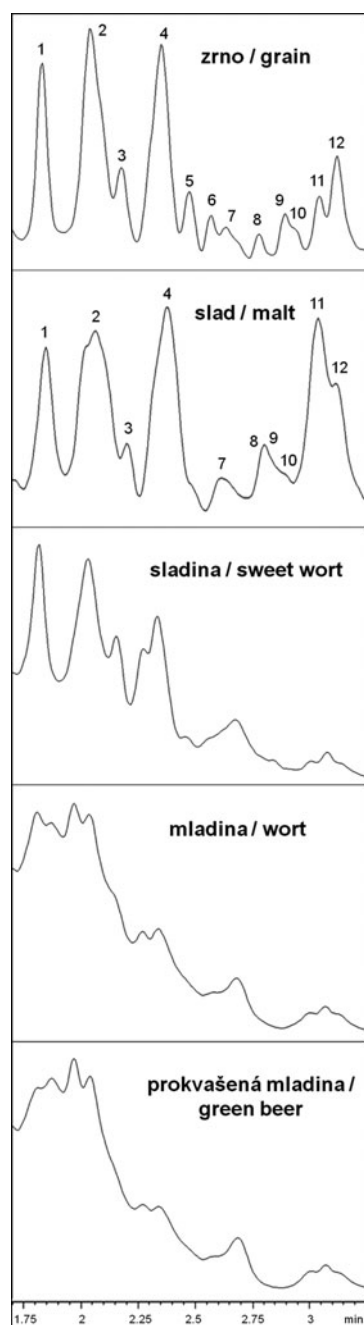
chromatograms (Fig. 3) correspond with electrophoresis separation. In the chromatogram of grain sample, large amount of relatively narrow peaks is evident, while in malt sample the higher amount of proteins has been shown in formation of broader peaks. Marked fractions of grain and malt were in-solution digested with trypsin and analyzed using MS. Identified proteins are introduced in the Tab. 2. In malt sample, disappearance of the same proteins degraded within mashing is distinctive; however some proteins are still evident. These proteins are proteolytically digested and precipitated during the wort boiling and they don't occur in the wort sample. Malt and green beer sample have almost identical chromatogram, in which, according to previous identification, only LTPs, α -amylase inhibitors and protein Z are present.

At the end, attention was focused on low-molecular weight proteins, whose profiles in grain, malt and sweet wort were analyzed using mass spectrometer MALDI in linear mode. Acquired spectra with mass corresponding proteins are shown in Fig. 4. Among major proteins in 3–20 kDa area belong protein Z fragment (4,03 kDa) and LTPs: LTP1 (9,69 kDa), LTP1b (LTP1 with bounded 294 Da lipid-like molecule; 9,98 kDa) and LTP2 (7,10 kDa). LTP2 and LTP1b were identified in grain sample, while fragment of protein Z wasn't detected. Proteins are glycosylated during malting, otherwise some hexose units (e.g. glucose, maltose) are bounded to the protein, what leads to the increase of 162 Da. Protein Z fragment, LTP2 and LTP1b and their glycosylated forms were identified in the malt sample. While LTP1 occurs especially in lipid-modified form in malt, during mashing the unstable lipid-protein bond is probably breaking up, what was shown in more intensive peak of LTP1. LTP1b and glycosylated forms of both proteins were identified in sweet wort sample as well.

Whereas the native barley seed nsLTP1 does not display any foaming properties, the corresponding beer protein is surface-active. Such an improvement is related to glycation by Maillard reactions on malting, acylation on mashing, and structural unfolding on brewing process. Whatever the modification, lipid adduction or glycation, barley LTP1s are highly stable proteins that resisted high temperatures. Foam promoting LTP1 form concentrates in beer foam and contributes widely to foam formation, whereas foam stability depends on protein Z [1,8].

4 CONCLUSION

In this work, profile of proteins during the whole brewing process was successfully mapped. Protein composition of beer and intermediate products of brewing has a great technological importance, for example presence of some enzymes can influence the whole malting process and thereby the quality of the final product as well. Only a few proteins survive the undesirable conditions upon the beer production



Obr. 3 HPLC separace proteinů ve vzorcích zrna, sladu, sladiny, mladiny a prokvašené mladiny. V případě zrna a sladu jsou v chromatogramech zaznačeny jednotlivé frakce, které byly použity pro tryptickém štěpení a následnou identifikaci pomocí MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrie / Fig. 3 HPLC separation of proteins in grain, malt, sweet wort, wort and green beer samples. In grain and malt chromatograms, individual fractions used for tryptic digestion and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry identification are marked

Recenzovaný článek / Reviewed paper

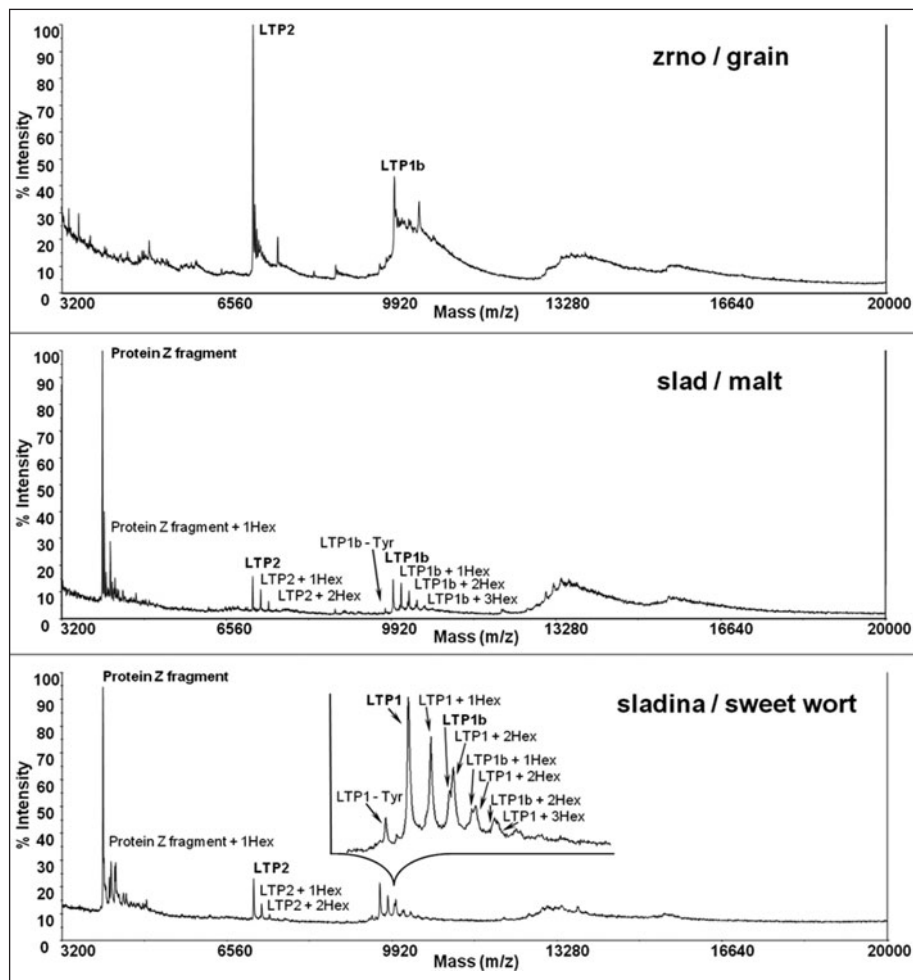
Do redakce došlo / Manuscript received: 26. 4. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 26. 5. 2011

LITERATURA / REFERENCES

1. Perrocheau, L., et al.: Stability of Barley and Malt Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) toward Heating and Reducing Agents: Relationships with the Brewing Process. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2006, 3108–3113.
2. Kosař, K., Procházka, S.: Technologie výroby sladu a piva. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha, 2000. 398 s. ISBN 80-902658-6-3.
3. Nilsson, F.: A study of barley protein composition during beer brewing process using SE-HPLC. University of Kalmar, Sweden, 2009. 35 s.
4. Jégou, S., et al.: Purification and structural characterization of LTP1 polypeptides from beer. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2000, 5023–5029.
5. Bobáľová, J., et al.: Monitoring of malting process by characteriza-

Obr. 4 Hmotnostní spektra intaktních proteinů zrna, sladu a sladiny. Ve spektrech jsou vyznačeny vybrané proteiny (fragment proteinu Z a nsLTP proteiny) a jejich glykace / Fig. 4 Mass spectra of intact proteins of barley grain, malt and sweet wort. Chosen proteins (protein Z fragment and ns LTPs) and their glycation forms are marked



and proteolytic enzymes activity. Some of them are LTPs, protein Z and trypsin/ α -amylase inhibitors that favorably affect the formation and stability of beer foam. Upon the beer quality evaluation, rich and creamy foam is a significant character of high-quality Czech beer. Applied techniques can be used for achievement characterization of protein profile during the malting and brewing process. Monitoring of protein profile could be also helpful for selection of new variety suitable for Czech beer production.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic (Grant No. 1M0570) and from the Institutional Research Plan of the Institute of Analytical Chemistry AS CR, v.v.i. No. AV0Z40310501.

tion of glycation of barley protein Z. *Eur. Food Res. Technol.* **230**, 2010, s. 665–673.

6. Bobáľová, J., Chmelík, J.: Proteomic identification of technologically modified proteins in malt by combination of protein fractionation using convective interaction media and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **1163**, 2007, 80–85.
7. Schevchenko, A., et al.: Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 1996, 850–858.
8. Jégou, S., et al.: Evidence of the Glycation and Denaturation of LTP1 during the Malting and Brewing Process. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2001, 4942–4949.