

STANOVENÍ METHIONINU VE SLADU

DETERMINATION OF METHIONINE IN MALT

RENATA MIKULÍKOVÁ, ZDENĚK SVOBODA, KAROLÍNA BENEŠOVÁ, SYLVIE BĚLÁKOVÁ
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Sladařský ústav, Mostecká 7, CZ-614 00 Brno
Research Institute of Brewing and Malting Plc., Malting Institute, Mostecká 7, CZ-614 00 Brno
e-mail: mikulikova@brno.beerresearch.cz

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Benešová, K. – Běláková, S.: Stanovení methioninu ve sladu. *Kvasny Prum.* 55, 2009, č. 11–12, s. 310–314.

Těkavé sirmé látky mají nezanedbatelnou roli v senzoričké jakosti piva. Jejich prekursori jsou sirmé aminokyseliny a hlavně sirmá aminokyselina methionin. Byl sledován obsah methioninu ve sladech vyrobených ze šesti odrůd ječmene (Bojos, Jersey, Malz, Prestige, Tolar a Xanadu) ze dvou lokalit (Branišovice, Hrubčice). Dále byl sledován obsah methioninu v závislosti na teplotě hvozdění (pražení). Byla optimalizována metoda stanovení methioninu ve sladu pomocí plynové chromatografie se selektivním plamenofotometrickým detektorem. Při validaci metody se dosáhlo těchto parametrů LOQ 1,6, R² 0,99974, RSD 15 %.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Benešová, K. – Běláková, S.: Determination of methionine in malt. *Kvasny Prum.* 55, 2009, No. 11–12, p. 310–314.

Volatile sulphur substances play an important role in sensory beer quality. Their precursors are sulphur amino acids, first of all sulphur amino acid methionine. Content of methionine was studied in malts made from six barley varieties (Bojos, Jersey, Malz, Prestige, Tolar, and Xanadu) from two localities (Branišovice, Hrubčice). In addition, methionine content in dependence on temperature of kilning (roasting) was monitored. The technique for the determination of methionine in malt was optimized using the gas chromatography with a selective flame photometric detector. At the validation of this method, the following parameters were achieved: LOQ 1.6, R² 0.99974, RSD 15 %.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Benešová, K. – Běláková, S.: Die Methioninbestimmung im Malz. *Kvasny Prum.* 55, 2009, Nr. 11–12, S. 310–314.

In der sensorischen Qualität des Bieres stellen flüchtige schwefelhaltige Stoffe eine unvernachlässigbare Rolle dar. Ihre Precursoren sind Schwefelaminosäuren und insbesondere die Schwefelaminosäure Methionin. Es wurde ein Gehalt an Methionin im aus den sechs Malzgerstensorten (Bojos, Jersey, Malz, Prestige, Tolar a Xanadu) aus den zweien Anbaugebieten (Branišovice, Hrubčice) hergestellten Malz verfolgt. Weiterhin wurde auch der Gehalt an Methionin in der Abhängigkeit von der Darrtemperatur (Röstungstemperatur) geforscht. Die Methode der Methioninbestimmung im Malz durch die Gaschromatographie mit selektivem Flammenphotometrischendetektor ist optimiert worden. Bei der Validation der Methode wurden die folgende Parameter LOQ 1,6, R² 0,99974, RSD 15 % erreicht.

Klíčová slova: *methionin, GC/FPD, derivatizace, slad*

Keywords: *Methionine, GC/FPD, derivatization, malt*

1 ÚVOD

Sirmé aminokyseliny jsou přirozenou součástí ječmene, sladu i piva a jsou prekursori těkavých sirmých látek, které mají nezanedbatelnou roli v senzoričké jakosti piva. Tyto těkavé sirmé látky mohou nepříznivě ovlivnit chuť piva i ve velmi nízkých koncentracích. Proto je nutné znát nejen obsah jejich prekurzorů, ale i možnosti jejich vzniku v průběhu technologie výroby piva.

Mezi hlavní meziproducty při vzniku senzoričce aktivních sirmých látek během výroby piva patří S-methylmethionin, který vzniká metylací methioninu v cyklu sirmých aminokyselin (*obr. 1*).

Během hvozdění sladu, když teplota přesáhne 60 °C, je S-methylmethionin degradován na homoserin a dimethylsulfid, takže nezanedbatelná část může vytekat do plynné fáze. Syntéza a degradace S-methylmethioninu je závislá na vlhkosti a teplotě zrna. Oxidací uvolněného dimethylsulfidu vzniká dimethylsulfoxid. Rychlost oxidace roste s teplotou hvozdění. Rozsáhlejší oxidace dimethylsulfidu vede ke vzniku dimethylsulfonu [1].

Další cestou vzniku dimethylsulfidu je rozklad methioninu vzájemnou reakcí s redukcujícími cukry (*obr. 2*). Hlavním produktem této degradace je methional nebo od něj odvozený methionol. Dalšími dvěma produkty jsou dimethylsulfid a dimethylsulfoxid. Rozkladem methionalu může vznikat ethylmethylsulfid. Termickým rozkladem cysteinu a cystinu vzniká sirovodík [2].

Během rmutování přechází S-methylmethionin, vzniklý při sladování, do roztoku, kde probíhá jeho rozklad. Vznikající dimethylsulfid je za varu strháván parami. Rychlost vypařování dimethylsulfidu je v této fázi rychlejší než jeho syntéza [2].

Po vaření piva dochází v chladnoucí mladině stále k degradaci S-methylmethioninu, ale již nedochází k odpařování dimethylsulfidu [2].

V ležáckých pivech se nachází dimethyltrisulfid, který vzniká degradací methionalu a methionolu v čerstvém pivu. Methional pochází především ze Streckerovy eliminace methioninu při sladování ječmene [2].

1 INTRODUCTION

Sulphur amino acids are natural components of barley, malt and beer. They are precursors of volatile sulphur substances which play an important role in sensory beer quality. These volatile sulphur substances can unfavorably affect beer taste even in very low concentrations. For this reason it is necessary to know not only the content of their precursors but also possibilities of their origin during beer production technology.

S-methylmethionine, which is formed by methylation of methionine in the cycle of sulphur amino acids, belongs to the principal intermediates upon the origin of sensorially active sulphur substances during the beer production. (*Fig. 1*)

During malt kilning when the temperature exceeds 60 °C, S-methylmethionine is degraded to homoserine and dimethylsulfide and not a negligible part can volatilize to a gaseous phase. Synthesis and degradation of S-methylmethionine depends on grain moisture and temperature. Released dimethyl sulfide is oxidized to dimethyl sulfoxide. The rate of oxidation increases with kilning temperature. More extensive oxidation of dimethyl sulphide results in the origin of dimethyl sulfone [1].

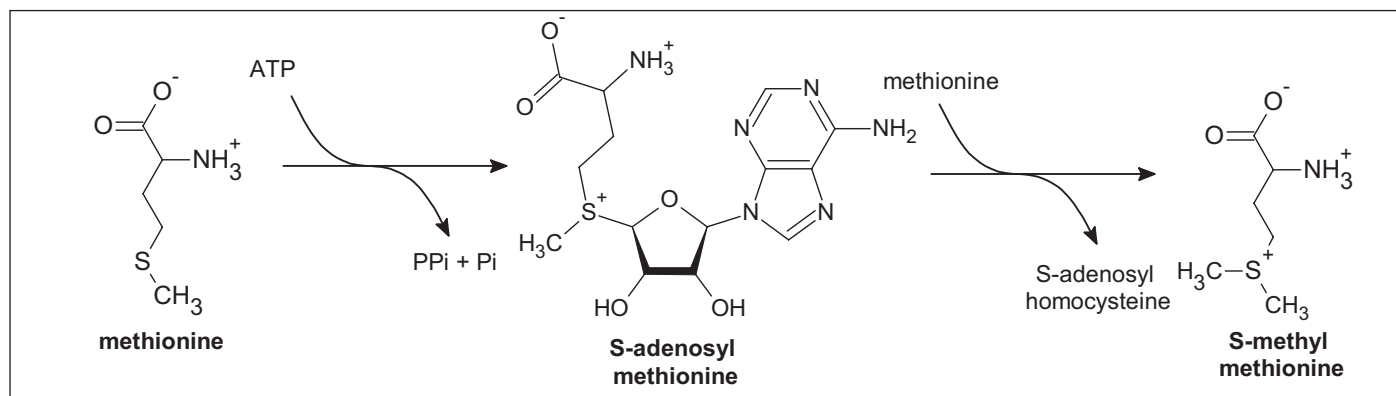
Another route of the dimethyl sulphide formation is the breakdown of methionine by interaction with reducing sugars (*Fig. 2*). The main product of this degradation is methional or from it derived methionol. Other two products are dimethyl sulphide and dimethyl sulfoxide. Breakdown of methional can give rise to ethyl methyl sulfide. Thermal degradation of cystein and cystin produces hydrogen sulphide [2].

During mashing, S-methylmethionine, formed at malting, passes to a solution where it is decomposed. The dimethyl sulphide formed is taken up by hot vapors. The rate of dimethyl sulphide evaporation is faster than its synthesis in this phase [2].

After boiling, S-methylmethionine is still decomposed in cooling hopped wort but it is not evaporated any more [2].

In lager beers, dimethyl trisulphide occurs, it is produced by degradation of methional and methionol in fresh beer. Methional comes

Obr. 1 Vznik S-methylmethioninu / Fig. 1 Origin of S-methylmethionine



Stanovení sirných aminokyselin v potravinách je jednou z nejnáročnějších analytických operací v oblasti analýz potravin. Musí se zvolit taková metoda dělení a stanovení, která zaručuje dostatečnou přesnost a správnost, musí být dostatečně rychlá a experimentálně akceptovatelná. Analýza sirných aminokyselin je navíc komplikována přítomností dalších složek v potravinách, které dané stanovení mohou rušit nebo mohou dávat pozitivní chyby. V současné době je využívána ke stanovení sirných aminokyselin především plynová chromatografie (GC). Před vlastní analýzou je třeba sirné aminokyseliny derivatizovat. Derivatizace sirných aminokyselin se provádí za účelem jejich transformace na produkt se žádanými separačními a detekčními vlastnostmi. Při GC analýze se musí zajistit úplné zablokování protických funkčních skupin (mají aktivní vodíky např. -OH, -SH, -NH₂) a zvýšení těkavosti sirných aminokyselin [3].

K derivatizaci sirných aminokyselin lze využít několik derivatizačních metod [3,4,5]:

- Esterifikace karboxylu bezvodým alkoholem v HCl a následná acylace dalších protických funkčních skupin.
- Silylace protických funkčních skupin za tepla v bezvodém prostředí pomocí trimethylsilyl nebo terc-butyldimethylsilyl derivátů.
- Derivatizace alkyl chloroformiáty.

K detekci sirných aminokyselin lze použít FID (plamenoionizační detektor) i FPD (plamenofotometrický detektor – selektivní pro sirné látky) detektor. Velmi výhodné je spojení plynového chromatografu s hmotnostním detektorem.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Chemikálie

D, L – methionin (Fluka, USA), pyridin (Merck, Německo), ethanol (ML Chemica, ČR), methanol, 1-propanol, chloroform, methyl chloroformiát, ethyl chloroformiát (Sigma Aldrich, USA), destilovaná voda.

Vzorky sladu

Bylo analyzováno 12 vzorků sladu, které byly vyrobeny z 6 od-

mainly from Strecker degradation of methionine during barley malting [2].

Determination of sulphur amino acids is one of the most demanding analytical operations in the whole area of food analyses. The selected method of amino acids separation and determination must guarantee sufficient accuracy and correctness; it must be sufficiently fast and experimentally acceptable. In addition, the amino acid analysis is complicated by the presence of other components in food which can distort the given determination or can give positive mistakes. Currently, the gas chromatography (GC) method has been frequently used for the determination of sulphur amino acids. Prior to the analysis alone, amino acids must be derivatized. The purpose of amino acid derivatization is to transform them to a product with the required separation and detection characters. Prior to the GC analysis, protic functional groups must be completely blocked (they have active hydrogens, e.g. -OH, -SH, -NH₂) and enhanced volatility of amino acids secured [3].

Several methods can be used for the amino acid derivatization [3,4,5]:

- Esterification of carboxyl group with anhydrous alcohol in HCl and subsequent acylation of other protic functional groups.
- Silylation of protic functional groups in anhydrous media at higher temperatures using trimethylsilyl or terc-butyldimethylsilyl derivatives.
- Derivatization with alkyl chloroformates.

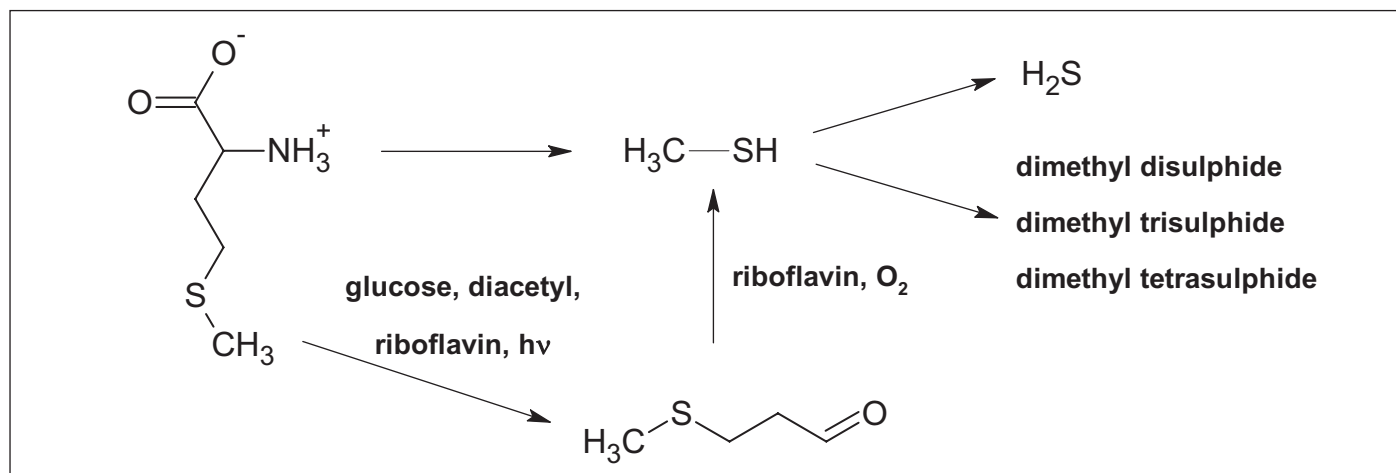
For the amino acid detection, the FID (flame ionization detector) and FPD (flame photometric detector – selective for sulphur substances) detectors can be used. Coupling of the gas chromatograph and mass detector is very advantageous.

2 EXPERIMENTAL

Standards and chemicals

D, L – methionine (Fluka, USA), pyridine (Merck, Germany), ethanol (ML Chemica, CR), methanol, 1-propanol, chloroform, methyl

Obr. 2 Možný mechanismus syntézy polysulfidů z methioninu během mrtování sladu / Fig. 2 Possible mechanism of synthesis of polysulfides from methionine during malt mashing



růd jarního ječmene (Bojos, Jersey, Malz, Prestige, Tolar a Xanadu) a které pocházely ze dvou šlechtitelských a zkušebních stanic (Braníšovice, Hrubčice) ze sklizňového ročníku 2007.

U vybraného vzorku sladu bylo v průběhu hvozdění (pražení) sladu odebíráno 18 vzorků. První vzorek byl odebrán při 50 °C a poslední při 220 °C, teplotní interval odebrání byl 10 °C.

Příprava a zpracování vzorků sladu

5 g pomletého sladu se 15 min extrahuje v ultrazvukové lázni směsi destilované vody s methanolem (4:1). Po sonifikaci se směs převede do centrifugační zkumavky a odstředí (15 minut, 6500 min⁻¹). 1 ml supernatantu se převede do mikrozkušavky a centrifuguje (5 minut, 5000 min⁻¹). Z čirého roztoku se odebere 300 ml vzorku na derivatizaci.

Derivatizace vzorků

K 300 µl vodného roztoku vzorku se přidá 200 µl směsi propanol-pyridin (4:1), následně se přidá 25 µl ethyl chlorformiátu. Směs se míchá 3 minuty při laboratorní teplotě, poté se přidá 700 µl chloroformu obsahujícího 1 % ethyl chlorformiátu. Směs derivatizovaného vzorku se po protřepání centrifuguje (5 minut, 5000 min⁻¹) a pak se 500 µl organické fáze převede do nové zkumavky. Chloroform se odpaří proudem plynného dusíku do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí v 200 µl methanolu. Takto připravený vzorek se analyzuje plynovou chromatografií.

Příprava standardů methioninu

Standard methioninu byl navážen na analytických vahách s přesností na 0,1 mg, rozpouštěn v destilované vodě, kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a objem byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Rozsah koncentrací standardu methioninu byl 0,8 až 14 mg.µl⁻¹. Na derivatizaci bylo použito 300 µl standardního roztoku.

Instrumentace a chromatografické stanovení

Analýzy vzorků byly prováděny na plynovém chromatografu (Trace GC Ultra, Thermo Finigan, USA) s plamenofotometrickým detektorem (FPD) selektivním pro síru. K separaci analyzovaných látek byla použita kapilární kolona RTX-5 (15m x 0.32 mm i.d., 0.25 mm, stacionární fáze 5 % difenyl – 95 % dimethyl polysiloxan) s následujícím teplotním programem: počáteční teplota 100 °C po dobu 0,5 min, nárůst teploty 6 °C.min⁻¹ do 180 °C, setrvání 3 min, nárůst teploty 10 °C min⁻¹ do 280 °C, setrvání 1 min. Konstantní průtok nosného plynu He 1.5 ml.min⁻¹. Teplota SSL injektoru 250 °C, splitless režim 0,8 min, průtok 60 ml.min⁻¹. Teplota detektoru 150 °C, průtok vzduchu 105 ml.min⁻¹, průtok vodíku 90 ml.min⁻¹, průtok dusíku (make-up) 20 ml.min⁻¹.

Identifikace analyzovaného methioninu byla provedena na základě porovnání retenčních časů se standardem, kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Nejdříve bylo nutné zvolit nejvhodnější extrakční činidlo pro extrakci volného methioninu ze vzorků sladů. Pro optimalizaci extrakce methioninu ze sladu byly testovány extrakční směsi methanol-voda, ethanol-voda a propanol-voda v poměru 1 : 4. Jako nejvhodnější byla vybrána směs methanol-voda a u této směsi byly testovány různé poměry methanolu a vody (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6). Na základě dosažených experimentálních výsledků byla zvolena extrakce methioninu směsí methanol-voda v poměru 1 : 4. Účinnost extrakce byla určena podle velikosti ploch pík analytů. Extrakce methioninu směsí ethanol-voda a propanol-voda vykazovaly výrazně menší výtěžnosti

chloroformate, ethyl chloroformate (Sigma Aldrich, USA), distilled water.

Malt samples

A total set of 12 samples of malting barley were analyzed. The samples were prepared from 6 varieties of spring barley (Bojos, Jersey, Malz, Prestige, Tolar, and Xanadu) and they were obtained from two breeding and testing stations (Braníšovice, Hrubčice) from the harvest year 2007.

In the selected malt sample, 18 samples were taken during kilning (roasting). The first sample was taken at the temperature of 50 °C and the last one at 220 °C, thermal interval of sample taking was 10 °C.

Preparation and processing of the samples of malt

Five grams of ground malt was extracted for 15 min in the ultrasound bath in the mixture of distilled water and methanol (4:1). After sonification, the mixture was transferred to a centrifugal tube and centrifuged (15 minutes, 6.500 RPM). 1 ml of supernatant was transferred to a microtube and centrifuged (5 minutes, 5.000 RPM). From the transparent solution, 300 ml of the sample was taken for derivatization.

Derivatization of samples

200 ml of propyl alcohol-pyridin mixture (4:1) was added to 300 ml of aqueous solution of the sample, after that 25 ml of ethyl chloroformate was added. The mixture was blended for 3 minutes at the laboratory temperature, then 700 ml of chloroform containing 1 % ethyl chloroformate was added. The mixture of the derivatized sample was shaken and then centrifuged (5 minutes, 5.000 RPM), subsequently organic phase (500 ml) was transferred to a new tube. Chloroform was dry-evaporated in a stream of nitrogen gas. The residue left after the evaporation was dissolved in 200 ml methanol. The sample was then analyzed by gas chromatography.

Preparation of methionine standards

Standard of methionine was weighed on the analytical scales with 0.1 mg precision, dissolved in distilled water, quantitatively transferred to 25 ml volumetric flasks and the volume was completed with distilled water to a scale line. Range of standard methionine concentrations was from 0.8 to 14 mg.ml⁻¹. For the derivatization, 300 ml of standard solution was used.

Instrumentation and chromatographic determination

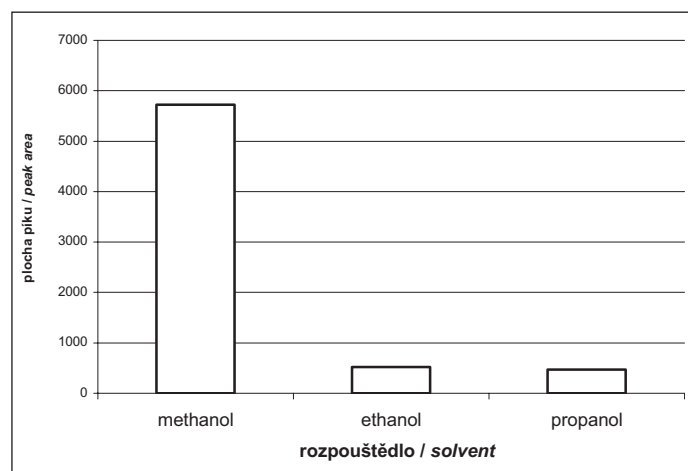
The samples were analyzed on the gas chromatograph (Trace GC Ultra, Thermo Finigan) with the flame photometric detector (FPD) selective for sulphur. For the separation of the analyzed substances, the capillary column RTX-5 (15m x 0.32mm i.d., 0.25 mm, stationary phase 5 % diphenyl – 95 % dimethyl polysiloxan) with following thermal program was used: initial temperature 100 °C for 0.5 min., increase in temperature 6 °C.min⁻¹ to 180 °C, kept for 3 min, increase in temperature 10 °C.min⁻¹ to 280 °C, kept for 1 min. Constant flow of the carrying gas He was 1.5 ml.min⁻¹. Temperature of the SSL injector 250 °C, splitless regime for 0.8 min, flow rate 60 ml.min⁻¹. Temperature of the detector 150 °C, air flow rate 105 ml.min⁻¹, hydrogen flow rate 90 ml.min⁻¹, nitrogen flow rate (make-up) 20 ml.min⁻¹

Identification of the analyzed sulphur amino acids was performed based on the comparison of retention times with the standards, quantification was carried using the calibration curves.

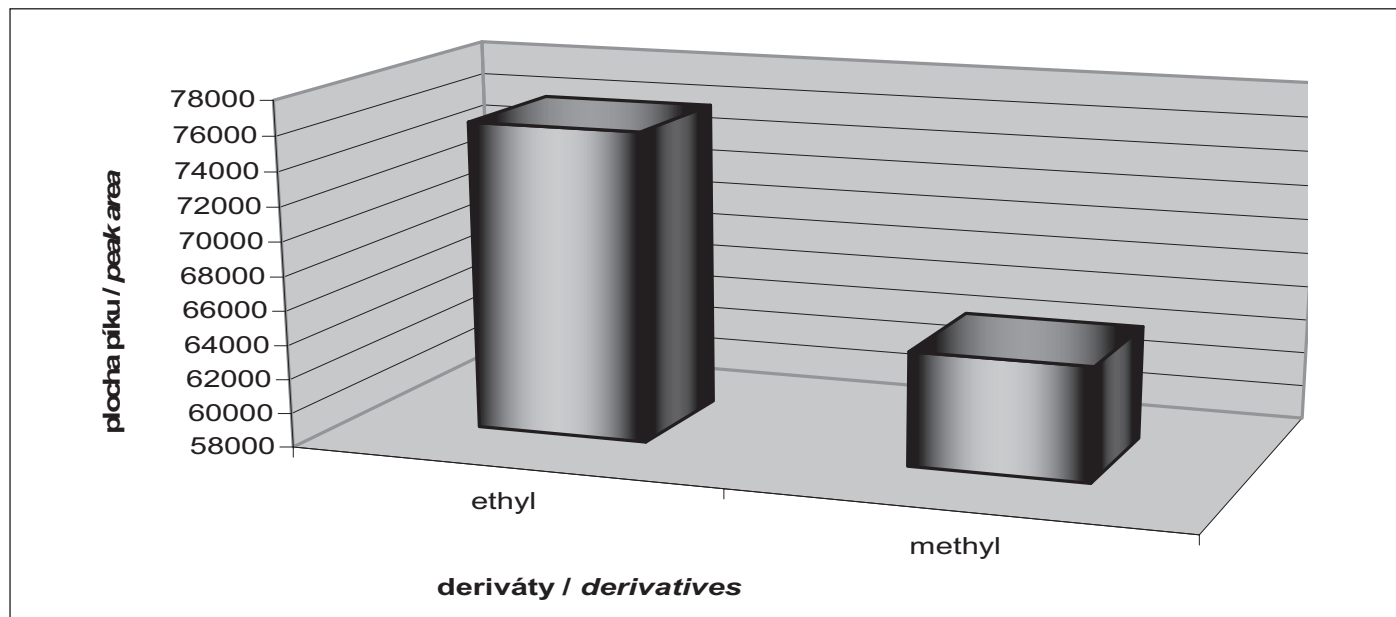
3 RESULTS AND DISCUSSION

At first, it was necessary to choose the most suitable extraction agent for the extraction of methionine from the malt samples. To optimize extraction of methionine from malt, the extraction mixtures methanol-water, ethanol-water and propanol-water in ratio 1 : 4 were tested. The mixture methanol-water was selected as the most appropriate and in this mixture various ratios

Obr. 3 Optimalizace extrakce methioninu (směs 1:4) / Fig. 3 Optimization of methionine extraction (mixture 1:4)



Obr. 4 Optimalizace volby derivatizačního činidla / Fig. 4 Optimization of the selection of the derivatizing agent



než směs methanol-voda, což je znázorněno pro poměr 1 : 4 na obr. 3.

Pro analýzu methioninu je rozhodující volba derivatizačního činidla. Při optimalizaci derivatizace byla testována dvě derivatizační činidla pro přípravu N(O,S)-alkoxykarbonyl propyl ester derivátů methioninu. Testovanými derivatizačními činidly byly methyl chlorformiát a ethyl chlorformiát (obr. 4). U vzniklých derivátů methioninu byly srovnány plochy píků. Z experimentálních výsledků derivatizace standardu byl pro derivatizaci methioninu použit ethyl chlorformiát.

Byla optimalizována a validována metoda stanovení methioninu ve sladu [6,7]. Validační parametry jsou uvedeny v tab. 1.

Vzorky sladů byly pro stanovení methioninu zpracovány optimalizovaným pracovním postupem, vlastní stanovení methioninu bylo provedeno metodou GC/FPD. Jeho obsah byl vypočítán pomocí softwaru ChromCard 2.4.0 z kalibrační křivky.

Chromatogram vzorku sladů je znázorněn na obr. 5.

of methanol and water (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6) were tested. Based on the experimental results achieved, extraction of methionine with the mixture methanol-water in the ratio 1 : 4 was selected. The efficacy of the extraction was determined according to the size of analyte peak area. Extraction of methionine with the mixtures ethanol-water and propanol-water exhibited significantly lower yield. Yield than the mixture methanol-water as shown for the ratio 1 : 4 in Fig. 3.

Selection of derivatizing agent is decisive for the methionine analysis. To optimize the derivatization, two derivatizing agents for preparation of N(O,S)-alkoxycarbonyl propyl ester derivatives of methionine were tested. The tested derivatizing agents were methyl chloroformate and ethyl chloroformate. In the methionine derivatives formed, peak areas were compared (Fig. 4). Based on the experimental

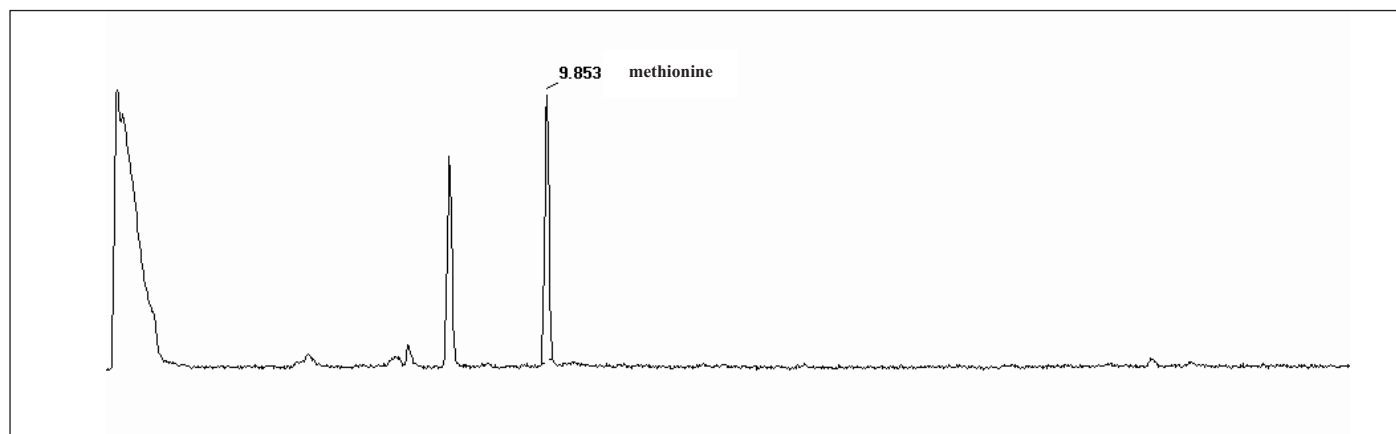
results of standard derivatization, ethyl chloroformate was used for methionine derivatization.

The method for the determination of methionine in malt was optimized and validated [6,7]. Validation parameters are given in Tab. 1.

Tab. 1 Validační parametry / Tab. 1 Validation parameters

	LOD mg.g ⁻¹	LOQ mg.g ⁻¹	R ²	RSD %
Methionin / Methionine	0.5	1.6	0.99974	15

Obr. 5 Chromatogram vzorku sladů / Fig. 5 Chromatogram of malt sample



Obsahy methioninu v analyzovaných vzorcích sladů z obou lokalit (Branišovice a Hrubčice) se pohybovaly od 23,0 do 36,0 mg/g. Slady vyrobené z odrůd Malz, Radegast a Tolar měly při vzájemném porovnání srovnatelné obsahy methioninu v obou lokalitách. Slady vyrobené z ječmenů z pěstební lokality Branišovice měly obsahy methioninu u jednotlivých odrůd vyrovnané. U sladů vyrobených z pěstební lokality Hrubčice byl výrazně vyšší obsah methioninu u od-

The malt samples for the methionine determination were processed using the optimized procedure; the methionine alone was determined by the GC/FPD method. Its content was calculated from the calibration curve using the software ChromCard 2.4.0.

Malt sample chromatogram is illustrated in Fig. 5.

Contents of methionine in the analyzed malt samples from both the localities (Branišovice and Hrubčice) moved from 23.0 to 36.0 mg/g.

růd Bojos a Sebastian než u ostatních analyzovaných odrůd (obr. 6).

Slady sladované (pražené) při teplotách 50 až 220 °C vykazovaly snižující se koncentraci methioninu se vzrůstající teplotou. Tato závislost je způsobena degradací methioninu na dimethylsulfid, který ze sladu uniká. Výsledkem odbourávání sírných aminokyselin jsou sensoricky aktivní sírné látky [8]. Na obr. 7 je znázorněna závislost obsahu methioninu na teplotě hvozdění respektive pražení sladu.

ZÁVĚR

Byla optimalizována a validována metoda stanovení methioninu ve sladu. Optimalizace extrakce spočívala v použití různých extrakčních rozpouštědel, pro optimalizaci derivatizace byla srovnávána dvě derivatizační činidla. Na základě experimentálního ověření byla zvolena jako nejvhodnější extrakce směsí methanol-voda (1:4) a derivatizace ethyl chlorformiátem.

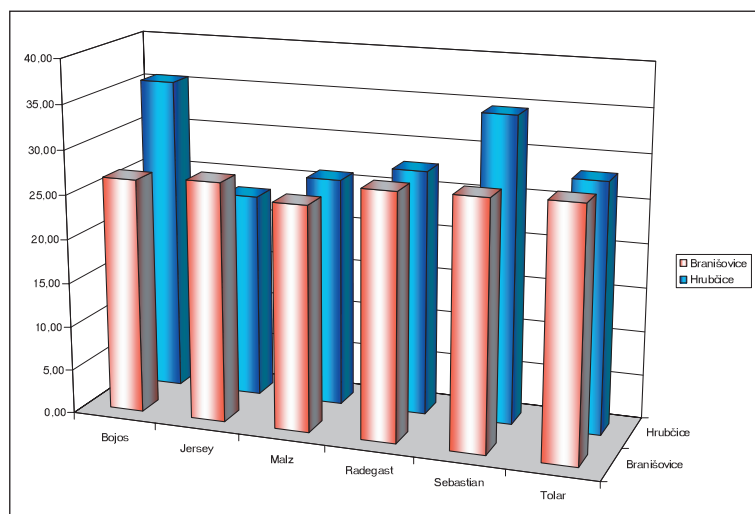
Významný rozdíl v obsahu methioninu z pohledu lokalit i odrůd byl pouze u odrůdy Bojos a Sebastian.

Při analýze sladů hvozděných (pražených) při různých teplotách byla prokázána závislost poklesu obsahu methioninu na vzrůstající teplotě. Tato skutečnost souvisí s degradací sírných aminokyselin na jednodušší těkavé sírné látky. Prokázanou závislost obsahu methioninu a teploty lze využít při optimalizaci teploty hvozdění, s cílem snížit obsah methioninu ve vyráběných sladech.

Poděkování

Výsledků bylo dosaženo v rámci Výzkumného záměru MSM 6019369701.

Obr. 6 Obsah methioninu (mg/g) ve sladu – sklizeň 2007 / Fig. 6 Methionine content (mg/g) in malt – harvest 2007



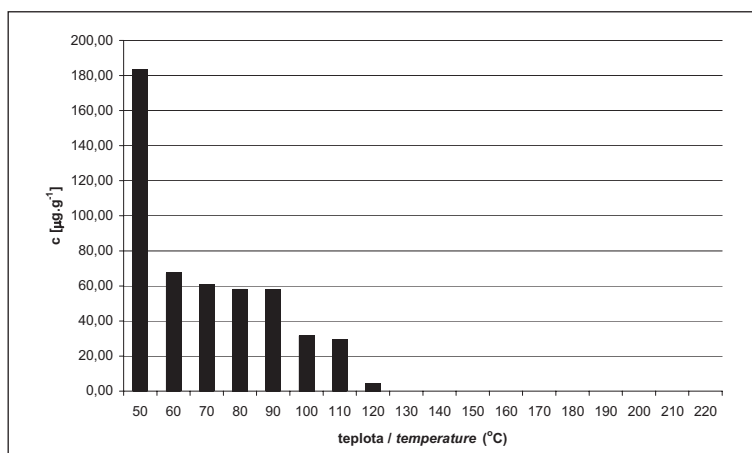
Comparison of the malts produced from the varieties Malz, Radegast, and Tolar showed comparable contents of methionine in both localities. Malts produced from barleys from the growing locality Braníšovice had relatively balanced methionine content in the individual varieties. Malts produced from the growing locality Hrubčice had significantly higher methionine content in the varieties Bojos and Sebastian compared to the other varieties analyzed (Fig. 6).

4 CONCLUSION

The method for the determination of methionine in malt was optimized and validated. Principle of the optimization of the extraction was based on the use of different extraction solvents, to optimize the derivatization, two derivatizing agents were compared. Based on the experimental verification, extraction with the mixture methanol-water (1:4) and derivatization with ethyl chloroformate were selected as the most suitable.

A significant difference in methionine content in terms of localities and varieties was found only in the varieties Bojos and Sebastian.

Obr. 7 Obsah methioninu ve sladu sladovaném při různých teplotách / Fig. 7 Methionine content of malt malted at different temperatures



The analysis of malts kilned (roasted) at different temperatures proved the dependence of the decline in methionine content on the increasing temperature. This fact is connected with degradation of sulphur amino acids to more simple volatile sulphur substances. The proved dependence of the methionine content and temperature can be utilized for the optimization of the kilning temperature with the aim to reduce methionine content in produced malts.

Acknowledgement

The results were obtained within the Research Plan of the MEYS CR MSM 6019369701

LITERATURA / REFERENCES

- Perpete, P., Gijis, L., Collin, S.: Methionine: A key amino acid for flavour biosynthesis in beer. *Brewing Yeast Fermentation Performance* (2nd Edition), K. Smart ed., Blackwell Science Ltd, 2003, ISBN0-632-06498-6, 206–212.
- Gijes, L., Veermeulen, C., Collin, S.: Výskyt a vznik sírných aromat v pivu. *Cerevisia*, 1, 2003.
- Hušek, P.: Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *J. Chromatogr. B*, 717, 1998, 57–91.
- Hušek, P., Matucha, P., Vránová, A., Šimek, P.: Simple plasma work-up for fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic amino acids. *J. Chromatogr. B*, 789, 2003, 311–322.
- Myung, S., Kim, M., Min, H., Yoo, E., Kim K.: Determination of homocysteine and its related compounds by SPME/ GC/ MSD. *J. Chromatogr. B*, 727, 1999, 1–8.
- Barek, J. a kol.: *Metrologická terminologie v chemii*. Chem. Listy 94, 2000, 439–444.
- Spektroskopická společnost Jana Marka Marci: Nejistota a nezávislost výsledků spektroskopických metod, 2001, ISBN 80-7080-447-5.
- Alix, J. H.: Molecular aspect of the in vivo and in vitro effects of ethionine, an analog of methionin. *Microbiological reviews*, 46, 1982, 281–295.

Translated by Vladimíra Nováková