

Vliv oxidačních produktů beta kyselin chmele na hořkost piva

*The Effect of Hop Beta Acids Oxidation Products on Beer Bitterness*Karel KROFTA¹, Světlana VRABCOVÁ¹, Alexandr M IKYŠKA², Marie JURKOVÁ²¹Chmelářský institut, s.r.o., Kadaňská 2525, 438 01 Žatec / Hop Research Institute, Ltd. Kadaňská 2525, 438 01 Žatec, Czech Republic²Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 12044, Praha 2, Česká republika / Research Institute of Brewing and Malting PLC, Lípová 15, 12044 Praha 2, Czech Republic

e-mail: krofta@chizatec.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Krofta, K. – Vrabcová, S. – Mikyška, A. – Jurková, M.: Vliv oxidačních produktů beta kyselin chmele na hořkost piva. Kvasny Prum. 59, 2013, č. 10–11, s. 306–312

Určující vlastností beta kyselin je jejich nestabilita a sklon k oxidaci v závislosti na podmínkách. Uvedená vlastnost se projevuje jak při skladování chmele, tak při použití v procesu výroby piva. V čistém stavu se na vzduchu při pokojové teplotě rozloží po měsíci zhruba polovina původního množství. Po 6 měsících činí míra degradace více než 90 %. V hlávkových chmelech je dynamika degradace značně pomalejší, zejména v prvních 6 měsících skladování. Změny beta kyselin v průběhu stárnutí vysvětlují jednu z příčin, proč hořčíci potenciál starších chmelů neklesá úměrně s poklesem obsahu alfa kyselin. Významný podíl degradačních produktů tvoří látky, které vznikají cyklizací bočních isopentenylových řetězců beta kyselin (tricykloolupulony a hydroxytricykloolupulony). Piva chmelená oxidačními produkty beta kyselinami v dávce 20 g/hl vykazovala zřetelnou senzickou hořkost, která nebyla v žádném případě nepříjemná a ulpívající. Hořčíci vydatnost oxidačních produktů beta kyselin chmele dosahuje přibližně 35–40 % hořkosti iso-alfa kyselin.

Krofta, K. – Vrabcová, S. – Mikyška, A. – Jurková, M.: The effect of hop beta acids oxidation products on beer bitterness. Kvasny Prum. 59, 2013, No. 10–11, p. 306–312

Instability and tendency to oxidation depending on conditions is a dominant property of hop beta acids. This property has an impact on both the hop storage and the beer brewing process. Approximately one half of the amount decomposes in the air at room temperature in the course of one month. After 6 months the rate of degradation is more than 90%. The dynamics of the decomposition is much slower in leaf hops, primarily during the first 6 months of storage. Changes of beta acids during ageing explain why the bittering potential of old hops does not decline proportionally to the alpha acid loss. A large share of degradation products are formed by cyclization of prenyl side chains of beta acids (tricyclopululones and hydroxytricyclopululones). Beers hopped by oxidation products of beta acids at the rate of 20 g/hl showed distinct sensorial bitterness that was not unpleasant and clinging. The bittering potential of oxidation products of beta acids reaches approximately 35–40% of the bitterness of iso-alpha acids.

Krofta, K. – Vrabcová, S. – Mikyška, A. – Jurková, M.: Der Einfluss der Oxidationsprodukten Beta Säuren des Hopfens auf die Bitterkeit des Bieres. Kvasny Prum. 59, 2013, Nr. 10–11, S. 306–312

Die bestimmende Eigenschaft der Beta Säuren des Hopfens ist ihre Unbeständigkeit und in Abhängigkeit auf die Bedingungen auch Neigung zur Oxidation. Die angeführte Eigenschaft äußert sich sowohl bei der Hopfenlagerung als auch unter ihre Anwendung im Prozess der Bierherstellung. Bei der Raumtemperatur in einem reinen Zustand zersetzt sich etwa eine Hälfte der ursprünglichen Menge nach 1 Monat. Nach 6 Monaten tut die Degradation schon 90%. Im Doldenhopfen ist die Dynamik der Zersetzung wesentlich langsamer, insbesondere in den ersten 6 Monaten der Lagerung. Die Änderungen der Beta-Säuren in Prozess der Alterung erklären eine von mehreren Ursachen, warum Bitterkeitspotenzial von alten Hopfen nimmt proportional mit der Abnahme Alfa-Säuren nicht ab. Der bedeutende Anteil der Degradationsprodukten bildet Stoffe, die durch eine Zyklisierung der Seiten Isopentenylketten der Beta-Säuren (Tricykloolupulone und Hydroxytricykloolupulone) entstehen. Die mit Oxidationsmitteln Beta-Säuren gehopfte Biere in Menge 20 g/hl wiesen eine deutliche sensorische Bitterkeit auf, die in keinem Fall unangenehm oder haftenbleibende war. Die Bitternissergiebigkeit von Oxidationsprodukten Beta Säuren des Hopfens erreicht ungefähr 35–40% der Bitternis von Iso-Alfa Säuren.

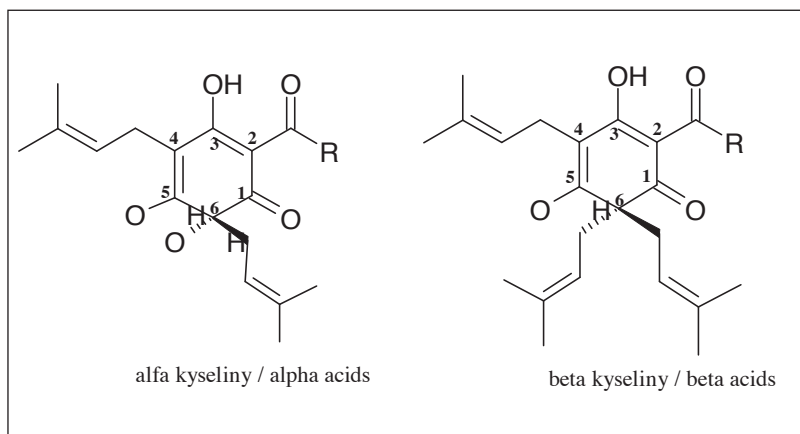
Klíčová slova: chmel, alfa kyseliny, beta kyseliny, pivo, stárnutí chmele, rozkladné produkty, chmelovar**Keywords:** hops, alpha acids, beta acids, beer, hops ageing, decomposition products, wort boiling**1 ÚVOD**

Chmelové pryskyřice jsou z pivovarského hlediska nejdůležitější složky chmele. Jejich transformační produkty, které se tvoří při chmelovaru, jsou zdrojem typické hořkosti piva, stabilizují pивní pěnu a díky antiseptickým účinkům zvyšují biologickou trvanlivost piva (Haas, 1994; Schmalreck, 1975). Nejdůležitější podíl na celkové hořkosti piva patří transformačním produktům chmelových alfa kyselin, které se při chmelovaru izomerují na příslušné *cis*- a *trans*-iso-alfa kyseliny (Jaskula, 2008; Jaskula, 2010; Intelmann, 2010). Jejich hořkost, změny v průběhu stárnutí piva, autooxidační reakce a další vlastnosti jsou dobře popsány (Hughes, 1996; Fritsch, 2008). Byly také zpracovány kinetické studie izomerační reakce za různých podmínek chmelovaru (Malowicki, 2005).

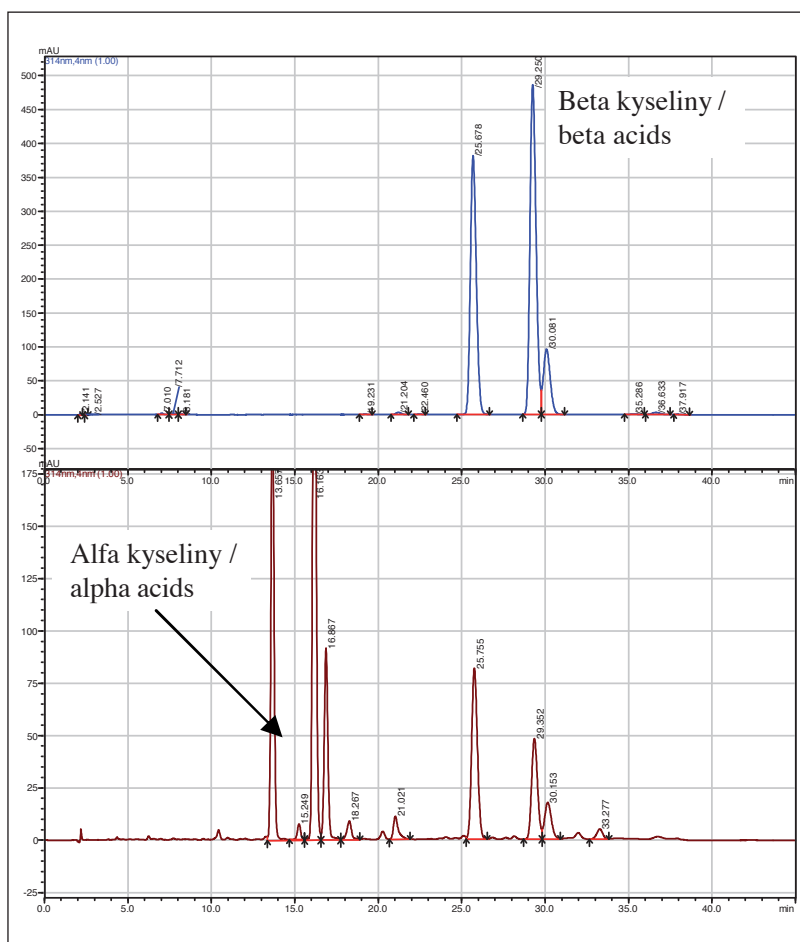
Chování beta kyselin za stejných podmínek je zcela odlišné. Protože neobsahují terciární alkoholovou skupinu v aromatickém jádru, nemohou izomerovat podobně jako alfa kyseliny. Beta kyseliny, přítomné ve chmelu, jsou citlivé k oxidačním reakcím, iniciovaným vzduchem (Laws, 1968; Verzele, 1991). Ve větším rozsahu dochází k oxidačním změnám během dlouhodobého skladování nezpracovaných hlávek. Oxidace je téměř kvantitativní během varního procesu piva (Regan, 1968). Nejdéle známými oxidačními produkty rozkladu beta kyselin jsou hulupony (Ste-

1 INTRODUCTION

From the brewing technology point of view, hop resins are the most important components of hops. Their transformation products that originate during wort boiling are the carriers of the typical beer bitterness. They also stabilize beer foam and prolong the biological durability of beer (Haas, 1994; Schmalreck, 1975). *Cis*- and *trans*-iso-alpha acids are the most important transformation products of alpha acids and have a basic impact on total beer bitterness (Jaskula 2009; Jaskula 2010; Intelmann, 2010). Bitterness, autooxidation reactions, changes during beer ageing and other properties have been well described (Hughes, 1996; Fritsch, 2008). Malowicki (2005) elaborated a kinetic study of the isomerization reaction under various wort boiling conditions. The behaviour of beta acids under the same conditions is quite different. Beta acids cannot isomerize in the same way as the alpha acids can because they do not contain tertiary alcohol group in the aroma ring (Fig. 1). Hop beta acids are sensitive to oxidation reactions initialised by air (Laws, 1968; Verzele, 1991). It is almost quantitative during the wort boiling process (Regan, 1968). Hulupones are the longest known oxidation products of beta acids (Stevens, 1961; Aitken, 1970). In contrast to other compounds, their identity was confirmed in recent studies (Haseleu, 2009a). Concentration of hulupones in beers is estimated to 1–2 mg/l (Whitear, 1964). Hulupones originate in leaf hops



Obr. 1 Strukturní vzorce alfa a beta kyselin / Fig. 1 Structures of alpha and beta acids



Obr. 2 Chromatogram čistých beta kyselin a standardu alfa a beta kyselin ICE 3 / Fig. 2 HPLC chromatogram of pure beta acids and the standard of alpha and beta acids ICE 3

vens, 1961; Aitken, 1970). Na rozdíl od jiných látek, byla jejich existence potvrzena i v nedávných studiích (Haseleu, 2009a). Koncentrace huluponů v pivo je odhadována na 1–2 mg/l (Whitaker, 1964). Hulupony vznikají i ve chmelu během dlouhodobého skladování a jsou společně s humulinony hlavními produkty přirozeného stárnutí chmele za přístupu vzduchu (Taniguchi, 2012). V čerstvě sklizeném chmelu není obsah huluponů vyšší než 0,5 %, v průběhu stárnutí jejich obsah stoupá. Data o jejich obsahu ve chmelu se rozcházejí. Někteří autoři uvádí, že obsah huluponů ve chmelu může být až 3 % hm. Realističtější data ohledně obsahu huluponů ve chmelu do 1 % publikoval Stevens (1961). Zcela nové informace přinesly nejnovější práce, které již využily možnosti moderních chromatografických metod (LC–MS) a detekčních systémů (TOF, NMR aj.). Haseleu et al. (2009a, 2009b) objevili ve frakcionovaných chmelových extraktech, které podrobili modelovým chmelovarům, sedm dosud neznámých degradačních produktů beta kyselin vykazujících hořkou chuť.

during long-term storage, and together with humulinones are considered the main products of natural hops ageing under aerobic conditions (Taniguchi, 2012). The content of hulupones in freshly harvested hops is estimated to be ranging in the interval of 0.5–3.0%. Stevens (1961) reported the level of hulupones in hops was up to 1% of weight. Recent research has brought about quite new information involving modern chromatography methods (LC–MS) and detection systems (TOF, NMR etc.). Seven to date unknown degradation products of beta acids with bitter taste were found by Haseleu et al. (2009a, 2009b) in fractions of hop extracts after model wort boiling tests. Besides the previously known hulupones, the structures of other compounds – 2 epimers of hydroxytricyclolupulone, 2 epimers of dehydrotricyclolupulone, 2 epimers of hydroperoxytricyclolupulone, and nortriacyclolupulone – were elucidated. According to the author, all the new degradation products showed lingering bitterness with the sensorial threshold in the interval of 38–90 mmol/l. On the contrary, hulupones showed short-lasting mild bitterness similar to iso-alpha acids. Hulupones had the lowest sensorial threshold in the range of 8–15 mmol/l.

The article presents results of several experiments aimed at elucidation of the impact of hop beta acids on intensity and character of beers bitterness. In spite of a few papers being published recently (Haseleu et al., 2009a, 2009b), devoted to the structure and sensorial assessment of beta acids decomposition products, definite answer for key question did not bring. The topic is important from Czech hop industry point of view, because many of Czech aroma varieties preferably Saazer are typical by high content of beta acids.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Making of pure beta acids preparation

Beta acids were isolated from CO₂-hop extracts by a two-step rafination according to the schedule developed in the Hop Research Institute (Krofta, 2012). The preparation of pure beta acids was free of alpha acids residues. The purity was over 99% as documented in the chromatograms in Fig. 2. The isolation procedure enables to prepare beta acids in amounts of several tens of grams in a relatively short period of time. The preparation of pure beta acids was used for studying the natural ageing dynamics and for the wort boiling tests in a laboratory and a pilot scale.

2.2 Making of alpha acids preparation

Twenty grams of hop CO₂-extract (alpha acids 45.8% w/w; beta acids 22.5% w/w) were dissolved in 75 ml of toluene and partitioned with 200 ml of di-natrium carbonate water solution (c = 0.15 mol/l). The mixture was shaken for 10 minutes. Alpha acids were selectively extracted into the water phase. The alkali solution of alpha acids was acidified by the hydrochloric acid (c = 6 N). Free alpha acids were reextracted with n-hexane. The hexane layer was dried over the anhydrous sodium sulphate and concentrated to dryness in order to produce an alpha acids fraction.

The HPLC analysis confirmed the purity of alpha acids at the level of 85% w/w.

2.3 Ageing of beta acids

Two grams of beta acids were weighted into Petri dishes and placed in a dark room at ambient temperature (20 °C). Subsamples were taken for analyses in the interval of 1–12 months. The dynamics of the beta acids decomposition in leaf hops of the Saaz and Vital varieties was monitored in a similar way. The rate of decomposition was assessed by the HPLC analysis EBC 7.7 (Analytica EBC, 1998) on the basis of residual beta acids elution bands. Standard ICE 3 and pure beta acids samples were used as references.

2.4 Application of beta acids on solid carriers surface

The preparation of pure beta acids and alpha acids were spread on a solid carrier prior to application into the brewing process. The inert

Kromě již dříve známého huluponu byly v médiu určeny struktury dalších látek, 2 epimery hydroxytricyklohexopulonu, 2 epimery dehydrotricyklohexopulonu, 2 epimery hydroperoxytricyklohexopulonu a nortrixyklohexopulonu. Podle autorů studie vykazovaly všechny nově určené degradační produkty ulpívající hořkost se senzorickým prahem v rozmezí 38–90 mmol/l. Naproti tomu hulupony vykazovaly krátce doznívající, mírnou hořkost podobnou hořkosti iso-alfa kyselin. Ze všech zkoumaných látek měly hulupony nejnižší práh senzorické hořkosti v rozmezí 8–15 mmol/l.

Předložený článek prezentuje výsledky několika experimentů, zaměřených na objasnění vlivu beta kyselin chmele na intenzitu a charakter hořkosti piva. I když byla v posledních letech publikována řada fundovaných prací, které se zabývaly strukturou a senzorickým hodnocením rozkladných produktů beta kyselin vznikajících při chmelovaru (Haseleu et al., 2009a, 2009b), jednoznačnou odpověď na klíčovou otázku nepřinesly. Z pohledu českého chmelařství je problematika důležitá mj. z toho důvodu, že řada českých aromatických odrůd chmele v čele se Žateckým červeňákem je typická právě vysokým obsahem beta kyselin.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Příprava preparátu čistých beta kyselin

Základem experimentů byla příprava preparátu čistých beta kyselin. Beta kyseliny byly izolovány z CO₂-chmelových extraktů dvoustupňovou rafinací dle postupu vypracovaného ve Chmelářském institutu (Krofta, 2012). Preparát čistých beta kyselin byl zcela prostý reziduí alfa kyselin a měl čistotu 99 %, jak to dokumentují chromatogramy na obr. 2. Postup umožňuje přípravu čistých beta kyselin v množství několika desítek gramů v relativně krátkém čase. Preparát čistých beta kyselin byl použit ke studiu dynamiky přirozených procesů stárnutí, provedení pokusných chmelovarů a přípravě několika várek piva v čtvrtprovozním měřítku.

2.2 Příprava preparátu alfa kyselin

Dvacet gramů chmelového CO₂-extraktu (alfa kyseliny 45,8 % hm.; beta kyseliny 22,5 % hm.) se rozpustilo v 75 ml toluenu. K roztoku se přidalo 200 ml uhlíčitanu sodného (c = 0,15 mol/l) a směs se vytřepala po dobu 10 minut. Alfa kyseliny se selektivně extrahovaly do vodní fáze. Vodný alkalický roztok alfa kyselin se okyslel kyselinou chlorovodíkovou (c = 6 N). Volné alfa kyseliny se reextrahovaly n-hexanem. Frakce alfa kyselin o čistotě 85 % se získala po odpaření n-hexanu na rotačním vakuovém odpařovači.

2.3 Stárnutí beta kyselin

Do Petriho misky byly naváženy 2 g čerstvě připravených čistých beta kyselin a umístěny ve tmě. Experiment byl proveden při pokojové teplotě. Po 1 až 12 měsících byly v měsíčních a 2 měsíčních intervalech odebírány vzorky beta kyselin k provedení analýzy. Metodicky obdobným způsobem byla sledována i dynamika rozpadu beta kyselin v hlávkových chmelech odrůd Žatecký červeňák a Vital. Míra rozpadu beta kyselin byla vyhodnocována metodou chromatografické analýzy EBC 7.7. na základě ploch elučních pásů reziduálních beta kyselin. Při každé analýze byl jako referenční pokus analyzován vzorek čerstvě připravených beta kyselin a standard ICE 3.

Tab. 1 Míra degradace čistých beta kyselin za různých podmínek (údaje v tabulce udávají obsah zbytkových beta kyselin v % rel. vztaženo na původní množství) / *Degradation of beta acids under various conditions (data represent relative amounts of residual beta acids in % in relation to the original amounts)*

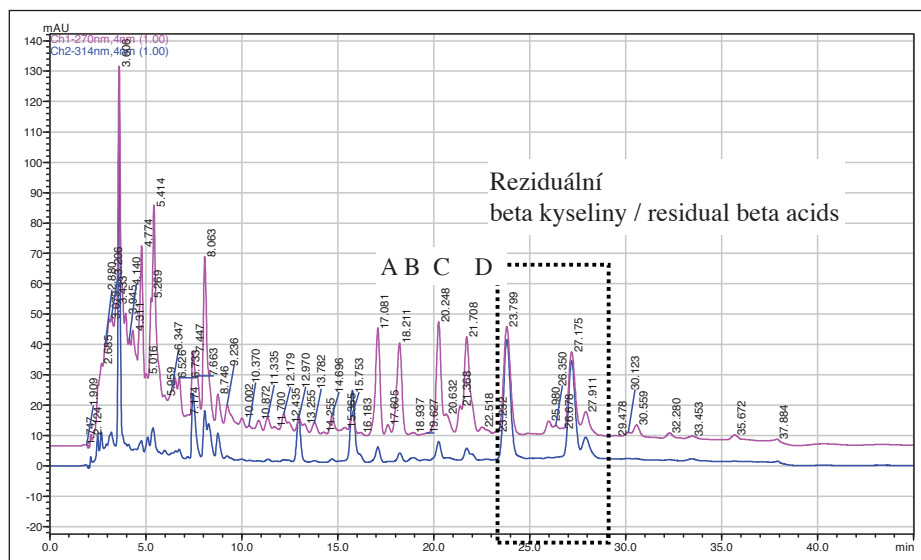
Doba expozice (měsíců) / <i>Duration of exposition (months)</i>	Čisté beta-kyseliny* / <i>Pure beta acids*</i>	ŽPČ – hlávky* / <i>Saaz – raw hops*</i>	Vital – hlávky* / <i>Vital – raw hops*</i>
1	49.4	-	-
2	33.5	85.5	95.5
4	27.2	83.8	94.8
6	8.9	80.2	82.4
7	7.1	-	-
8	5.0	76.2	58.9
10	4.0	57.6	36.6
12	< 1.0	50.4	22.5

*Pokojová teplota, bez přístupu světla, volně na vzduchu / *Room temperature, dark room, open air*

Tab. 2 Rychlost oxidace beta kyselin chmele na vzduchu po nanesení na inertní nosič (mikronizovaná celulóza, % rel.) / *Oxidation rate of hop beta acids under open air after application on an inert carrier surface (micronized cellulose, % rel.)*

Umístění / <i>Placement</i>	Teplota / <i>Temperature (°C)</i>	Doba oxidace (hodiny) / <i>Duration of oxidation time (hours)</i>			
		24	48	96	168
temná místnost / <i>dark room</i>	20	96.9%	98.3%	98.6%	98.8%
lednice / <i>refrigerator</i>	+4	32.2%	85.7%	94.0%	95.5%
mrazicí box / <i>freezing box</i>	-18	11.1%	17.0%	25.7%	29.8%

silica sand (50–70 mesh particle size, Sigma-Aldrich), cellulose powder (50 mm, Fluka) and debittered spent hops after CO₂-extraction were used for this purposes. Alpha and beta acids were dissolved in pure ethanol and mixed with a solid carrier. After a thorough mixing, ethanol was removed to dry on a rotary vacuum evaporator. The theoretical amount of beta acids on carriers was 9.0% of weight. The preparations were kept for 24–72 hours at various temperatures (-18 °C, +4 °C, +20 °C) until consumption. Some preparations were used in the brewing process immediately after making (see Tab. 3). Their composition was verified by the liquid chromatography with UV detection at wavelengths 260, 290, 314, 355 nm on column Nucleodur 250x4 mm (Macherey-Nagel). The elution of components was going in the gradient regimen with a mobile phase consisted of the mixture of acetonitrile-water-formic acid (70:30:1, v/v/v). The dura-



Obr. 3 Chromatogram beta kyselin při přirozeném stárnutí ve tmě po 6 měsících skladování / *Fig. 3 HPLC chromatogram of beta acids during natural ageing in a dark room after 6 months of storage*

Tab. 3 Analytické hořkosti piv chmelených preparáty připravených z čistých beta kyselin / Tab. 3 Analytical bitterness of beers hopped by pure beta acids preparations

Označení pokusu / Trial marking	Způsob přidavku preparátu čistých beta kyselin / Addition of beta acids	Dávka / Amount	Mladina (IBU) / Wort (IBU)	Mladé pivo (IBU) / Green beer (IBU)	Pivo (IBU) / Beer (IBU)
1	beta kyseliny, ředěný ethanolový roztok ve vodě, aplikace ihned po přípravě na začátku chmelovaru / beta acids, ethanol diluted in water, application immediately after preparation at the beginning of wort boiling	20 g/hl	6.3	3.7	< 1
2	beta kyseliny + celulóza, aplikace ihned po přípravě na začátku chmelovaru / beta acids + cellulose, application immediately after preparation at the beginning of wort boiling	20 g/hl	5.5	3.3	< 1
3	beta kyseliny + odhořčený chmel, aplikace ihned po přípravě na začátku chmelovaru / beta acids + debittered hops, application immediately after preparation at the beginning of wort boiling	20 g/hl	7.8	5.4	< 1
4	alfa kyseliny + celulóza, aplikace ihned po přípravě na začátku chmelovaru / alpha acids + cellulose, application immediately after preparation at the beginning of wort boiling	8 g/hl	48.2	30.1	26.8
5	alfa kyseliny – extrakt, bez dalších úprav, aplikace ihned po přípravě na začátku chmelovaru / alpha acids – extract, no treatment, application immediately after preparation at the beginning of wort boiling	8 g/hl	50.1	32.8	29.2
6	beta kyseliny + křemičitý písek, 24 hodin při teplotě +4 °C, dávkování na začátku chmelovaru, cca 50 % beta kyselin se rozložilo / beta acids + silica sand, 24 hours at the temperature +4 °C, addition at the beginning of wort boiling, cca 50% of beta acids were decomposed	20 g/hl	20.5	15.3	15.1
7	beta kyseliny + celulóza, 72 hodin stárnutí při 20 °C, dávkování na začátku chmelovaru / beta acids + cellulose, 72 hours ageing of at 20 °C, addition at the beginning of wort boiling	20 g/hl	39.7	28.5	26.6
8	beta kyseliny + celulóza, 72 hodin stárnutí při 20 °C, dávkování 15 minut před koncem chmelovaru / beta acids + cellulose, 72 hours of ageing at 20 °C, addition 15 minutes before the end of wort boiling	20 g/hl	38.2	29.3	28.5

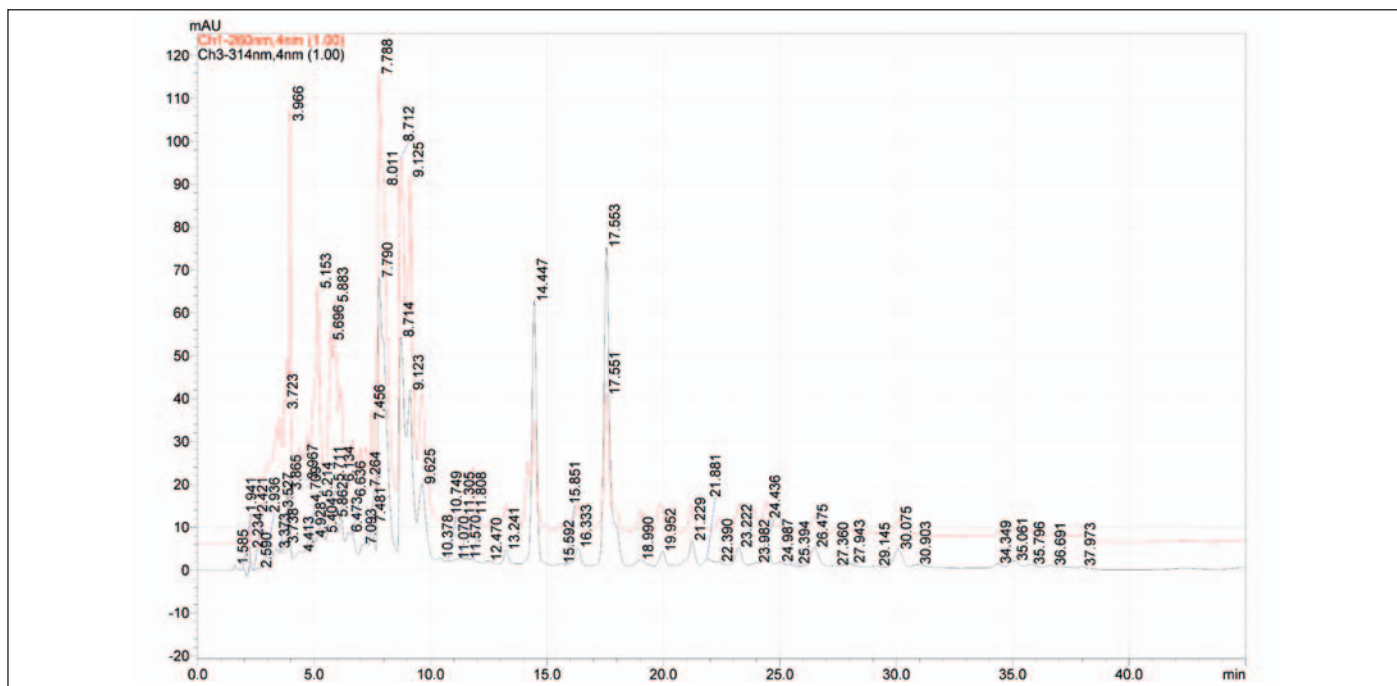
2.4 Postup nanesení alfa a beta kyselin na pevný nosič

Pro účely aplikace alfa a beta kyselin při chmelení pokusných várek byl preparát čistých beta kyselin a alfa kyselin nanesen na pevný nosič. K tomuto účelu byla použita mikronizovaná celulóza, inertní křemičitý písek a odhořčený chmel po extrakci oxidem uhličitým. Alfa a beta kyseliny byly rozpuštěny v absolutně čistém ethanolu a roztok smíchán s pevným nosičem. Po důkladném promíchání byl ethanol odpařen na rotačním vakuovém odpařovači do sucha.

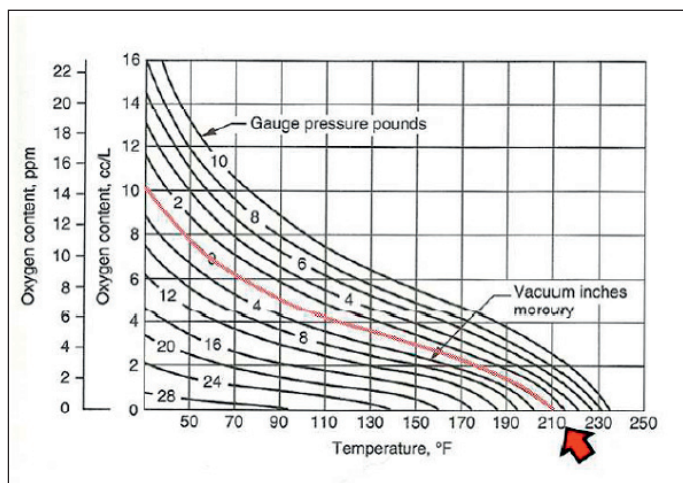
tion of the analysis was 45 minutes under the mobile phase flow rate of 0.8 ml/min.

2.5 Brewing pilot plant tests of beta acids

In the brewing pilot plant test, a double decoction mashing process of wort production, which is the classic main fermentation technology in open fermentation tanks and maturation in kegs at temperatures of +8 °C and +2 °C, was used. The brew house capacity is 65 liters



Obr. 4 Chromatogram rozkladných produktů beta kyselin po nanesení na celulosu a ponechání produktu při pokojové teplotě a ve tmě po dobu 72 hodin / Fig. 4 Chromatogram of beta acids decomposition products after application on cellulose and leaving the product in the dark at room temperature for 72 hours



Obr. 5 Rozpustnost kyslíku ve vodě v závislosti na teplotě a tlaku (červená křivka odpovídá teplotě varu za normálního tlaku) / Fig 5 Solubility of oxygen in water in dependence on temperature and pressure (red line corresponds to the boiling point at normal pressure) Intenzita hořkosti, charakter hořkosti – škála 0–5 /Bitterness intensity, bitterness character – range 0–5

Pivo / Beer	1	2	3	4	5	6	7	8
charakter / character 0 s	1.5	1.5	1.6	2.4	2.3	2.2	2.3	2.2
charakter / character 40 s	0.6	1.0	1.0	1.8	2.3	1.8	1.5	1.5

Teoretické množství beta kyselin na nosičích bylo 9 % hm. Připravené preparáty byly až do použití uchovávány po dobu 24 hodin až 72 hodin při různých teplotách od -18°C do $+20^{\circ}\text{C}$. Některé byly použity do chmelovaru bezprostředně po přípravě (viz tab. 3). Složení připravených preparátů se ověřovalo kapalinovou chromatografií s UV detekcí při vlnových délkách 260, 290, 314 a 355 nm na koloně Nucleodur 250 x 4 mm. Mobilní fáze se skládala ze směsi acetonitril-voda-mravenčí kyselina (70:30:1, v/v/v). Eluce látek probíhala v gradientovém režimu. Při průtoku mobilní fáze 0,8 ml/min byla doba analýzy 45 minut.

2.5 Pivovarské testy beta kyselin ve čtvrtprovozním měřítku

Při čtvrtprovozních pivovarských testech byl použit dvoumrtvový dekokční postup výroby sladiny, klasická technologie hlavního kvašení v otevřených kvasných nádobách a dokvašování v KEG sudech při teplotách $+8^{\circ}\text{C}$, resp. $+2^{\circ}\text{C}$. Varna má objem 65 litrů vyražené mladiny. Testy byly provedeny při výrobě 10% výčepních piv. Pro pokusné várky bylo z beta a alfa kyselin připraveno několik preparátů, které se lišily použitým sorbentem a podmínkami skladování (teplota, čas) před aplikací do varného procesu.

- Ethanolový roztok čistých beta kyselin ředěný vodou v poměru 1:25, připravený bezprostředně před dávkováním do mladiny.
- Beta kyseliny nanášené na mikronizovanou celulosu a odhořčený chmel po CO_2 -extrakci, preparát byl před aplikací skladován v temnu při pokojové teplotě po dobu 72 hodin. V době aplikace obsahoval pouze stopová množství beta kyselin.
- Beta kyseliny nanášené v tenké vrstvě na křemičitý písek. Preparát byl před aplikací skladován při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. Obsah beta kyselin v připraveném preparátu byl v okamžiku dávkování 47 % původního množství.
- Alfa kyseliny nanášené na mikronizovanou celulózu, preparát byl bezprostředně po přípravě přidán do mladiny.

Preparáty beta kyselin se přidávaly v jedné dávce na začátku chmelovaru nebo 15 minut před koncem chmelovaru v množství 20 g/hl. Preparáty alfa kyselin v dávce 8 g/hl se přidávaly na začátku chmelovaru. Další technologický postup se nijak nelišil od standardních várek, tj. zakvašování v běžné dávce pivovarských kvasnic, doba ležení 5 týdnů při teplotě $+2^{\circ}\text{C}$. Stáčení do lahví se provádělo po filtraci přes celulóзовé desky pod ochrannou atmosférou oxidu uhličitého a dusíku. Piva byla sensoricky hodnocena komisí certifikovaných hodnotitelů deskriptivní metodou a dále stanovením profilu dozrívání sensorické hořkosti, kdy po napití a polknutí doušku je sledována intenzita hořkého vjemu. Po polknutí a po 40 s je zaznamenán charakter, příjemnost hořkosti (Mikyška a Čejka, 2013).

of hot wort. Tests were performed during production of 10% bottom fermented pale beers. For experimental batches, several beta and alpha acids preparations that differed in terms of the used sorbent and storage conditions (temperature, time) were made before being applied into the brewing process.

- Ethanol solution of pure beta acids diluted with water (1:25), prepared immediately before application to the wort.
- Beta acids applied in a thin layer on a cellulose powder surface or debittered spent hops after CO_2 extraction. The preparation was kept for 72 hours at ambient temperature before usage. At time of application, it contained only trace amounts of beta acids.
- Beta acids applied in a thin layer on a silica sand surface, the preparation was kept for 24 hours at $+4^{\circ}\text{C}$ before usage. The content of residual beta acids was 47% rel. of origin.
- Alpha acids applied in a thin layer on a cellulose powder surface, the preparation was added to the wort immediately after making.

The preparations of beta acids were added in one portion at the start of wort boiling or 15 minutes before the end of the wort boiling in the amount of 20 g/hl. The preparation of alpha acids in a dose of 8 g/hl was added at the start of wort boiling. The technological process was not different from standard brews, i.e. pitching with common of brewer's yeast, maturation for five weeks at $+2^{\circ}\text{C}$. After filtration through cellulose plates, bottling under a protective atmosphere of carbon dioxide and nitrogen was performed. The sensorial properties of the beer were evaluated by certified evaluators using the descriptive method and determination of the profile of sensory bitterness decrease. After having a sip and swallowing it, the bitterness perception is monitored. After swallowing and after 40 seconds, the character and pleasantness of bitterness is recorded (Mikyška and Čejka, 2013).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Ageing tests of beta acids

The results of pure beta acids ageing as well as results of Saaz and Vital raw hops are summarized in Tab. 1. The rate of pure beta acids ageing is much faster compared to raw hops of both cultivars under similar storage conditions. After as early as one month of storage, approximately one half of the original amount of beta acids had decomposed. The rate of loss reached 90% after 6 months of storage. The dynamics of beta acid decomposition in raw hops is considerably slower especially in the course of the first 6 months of storage. Cell bio membranes protect the compounds contained in lupulin glands against fast deterioration efficiently. The sensitivity of beta acids to oxidation is generally known (Verzele, 1991) but it has not been satisfactorily quantified yet. The sensitivity of beta acids to the impact of oxygen is illustrated by the spreading test on a solid carrier surface (micronized cellulose). Beta acids in the form of a thin film are exposed to air oxygen. Tab. 2 shows the significant effect of the storage temperature on the decomposition rate after 24 hours. Keeping the preparation at ambient temperature resulted in over 90% beta acids loss. The degradation of beta acids is significantly suppressed if stored at low temperatures (-18°C). The chromatogram (Fig. 3) shows the elution profile of pure beta acids decomposition products after 6 months of ageing at room temperature and exposition to open air. Four compounds with elution times in the range of 17 to 21 minutes (A-D) dominate the rich spectrum of decomposition fragments. Their UV spectra with two absorption maxima of 232 and 283 nm are very alike, thus indicate also a structural similarity. Important degradation products of beta acids are formed by cyclisation of aroma ring side chains when several steric isomers of hydroxytricyclopulone and tricyclopulone emerge as confirmed DART-MS analyses (Krofta, Mikyška, 2013).

3.2 Brewing pilot plant tests with pure alpha and beta acids preparations

When preparing the first agent (beta acids dissolved in a mixture of ethanol-water made shortly before application), formation of white haze occurred immediately after dilution with water. Neither during the wort boiling nor in the course of the brewing process abnormalities were observed. The sensory perception of bitterness was compounded by the fact that beers were deep attenuated. The results of the analytical determination of bitterness in the row wort-young beer-beer are summarized in Tab. 3. The results of the sensory analyses of beer using the descriptive method are documented in Tab. 4. It was found that the analytical and sensorial bitterness of beer, in which beta acids were added immediately after making the prepara-

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Testy stárnutí beta kyselin

Výsledky testů stárnutí čistých beta kyselin a hlávkových chmelů odrůd Žatecký poloraný červenák (ŽPČ) a Vital v hlávkové formě jsou shrnuty v tab. 1. Výsledky ukazují, že čisté beta kyseliny degradují za uvedených podmínek velmi rychle, mnohem rychleji než v hlávkovém chmelu, skladovaném za srovnatelných podmínek. Již po měsíci se rozložila zhruba polovina původního množství čistých beta kyselin. Po 6 měsících činila míra degradace více než 90 %. Ve chmelech je dynamika degradace značně pomalejší, zejména v prvních 6 měsících skladování. Lupulinové žlázy chrání před rychlou degradací látek v nich obsažených biomembrány. Vysokou citlivost beta kyselin k oxidaci, která je obecně známa (Verzele, 1991), dokumentují výsledky testu, při kterém byly čisté beta kyseliny nanášeny v tenké vrstvě na pevný inertní nosič a uchovávány po definované dobu za přístupu vzduchu při různých teplotách. (tab. 2). Při uchování preparátu při normální teplotě se po 24 hodinách degradovalo více než 80 % původních beta kyselin. Uchováním beta kyselin při velmi nízkých teplotách se rychlost transformačních reakcí výrazně zpomalí, ale nezastaví. Na chromatogramu (obr. 3) je patrný eluční profil rozkladných produktů čistých beta kyselin po 6 měsících stárnutí při pokojové teplotě a přístupu vzduchu. Spektru rozkladných produktů, které je velmi bohaté, dominují 4 látky označené písmeny A až D. Eluují se v časech od 17. do 21. minuty. Jejich UV spektra s dvěma absorpčními maximy při 232 a 283 nm jsou si velmi podobná a naznačují strukturální podobnost rozkladných produktů. Hmotnostní spektra vzorku čistých beta kyselin a rozkladných produktů po 6 měsících přirozeného stárnutí získaná metodou DART–MS prokázala, že významné degradační produkty beta kyselin vznikají cyklizací bočních řetězců aromatického jádra za vzniku několika sterických izomerů hydroxytricyklopolupolonu a tricyklopolupolonu (Krofta, Mikyška, 2013).

3.2 Čtvrtprovozní varní zkoušky s preparáty připravenými z čistých alfa a beta kyselin

Při přípravě prvního preparátu, roztoku beta kyselin ve směsi ethanol-voda prováděné těsně před aplikací, došlo ihned po naředění vodou k tvorbě bílého zákalu. V průběhu chmelovaru ani v dalším průběhu varního procesu nebyly pozorovány ani v jenom případě žádné anomálie. Sensorický vjem hořkosti byl umocněn tím, že piva se nechala hlouběji prokvasit. Výsledky stanovení analytických hořkostí v řadě mladina-mladé pivo-pivo jsou shrnuty v tab. 3. Výsledky sensorické analýzy piv deskriptivní metodou dokumentuje tab. 4. Zcela zásadním poznatkem je zjištění, že analytické i sensorické hořkosti všech piv, do kterých byly beta kyseliny přidány bezprostředně po přípravě preparátu, byly velmi nízké, na úrovni pokusů, do kterých není vůbec přidán chmel. I nechmelené pivo má velmi slabou hořkost/trpkost způsobenou sladem, polyfenolovými látkami (Callemien et al., 2005) a hordatiny (Tada et al., 2004). Nepatrně vyšší hořkost u várky č. 3 lze přičíst na vrub reziduálnímu zbytku alfa kyselin v odhořčeném chmelu. Preparáty alfa kyselin přidávané za stejných podmínek měly hořkosti adekvátní množství nadávkovému do chmelovaru. Piva chmelená preparáty beta kyselin nanášených na pevné inertní nosiče s časovou prodlevou před aplikací již nezanedbatelnou analytickou i sensorickou hořkost vykazovala. Tato piva byla ve skutečnosti chmelená směsí rozkladných produktů, vzniklých oxidací beta kyselin, jak ukazuje chromatogram rozkladných produktů beta kyselin nanášených na celulózu po 72 hodinách expozice na vzduchu při pokojové teplotě (obr. 4). Z obrazku je patrné, že množství původních beta kyselin je zanedbatelné.

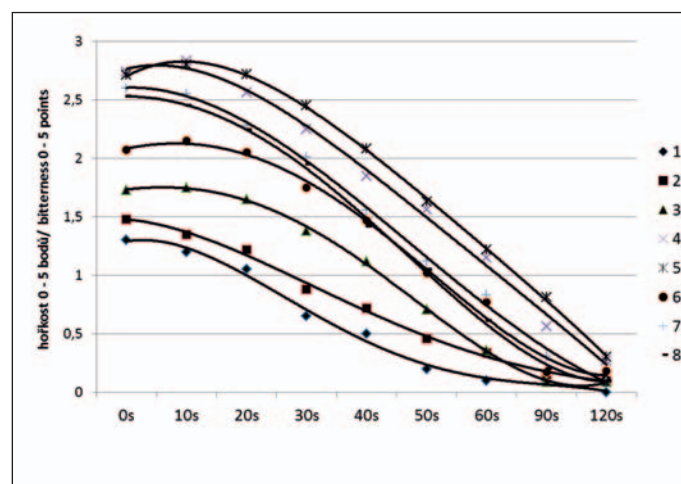
Intenzita sensorické hořkosti korespondovala s hořkostí analytickou i v případě piv chmelených oxidačními produkty beta kyselin s tím, že při srovnatelné analytické hořkosti měla piva chmelená alfa kyselinami (várky č. 4 a 5) mírně, o 0,2 bodu vyšší sensorickou hořkost v porovnání s pivy chmelenými oxidovaným preparátem beta kyselin (várky č. 7 a 8), hodnota u piva č. 6 chmeleného částečně oxidovanými beta kyselinami byla adekvátně nižší. Průběh dozrívání sensorické hořkosti piv chmelených výhradně oxidovanými beta kyselinami se od piv chmelených výhradně alfa kyselinami prakticky neliší, dozrívání hořkosti bylo plynulé, mírně rychlejší v porovnání s pivy chmelenými alfa kyselinami. Charakter hořkosti byl jemný a od charakteru hořkosti piv chmelených alfa kyselinami se neliší (obr. 6). V celkovém dojmu po napití byla piva chmelená alfa kyselinami a piva chmelená oxidovanými beta kyselinami plně srovnatelná. Hořkost způsobená připravenými preparáty oxidačních produktů beta kyselin nebyla v žádném případě nepříjemná a ulpívající. Nepříjemná hořkost některých produktů beta kyselin je uváděna v literatuře (Haseleu et al., 2009b).

Ukázalo se, že převážná většina oxidačních produktů beta kyselin je dobře rozpustná ve vodě. Hořkost piva č.8 s přidavkem preparátu beta kyselin 15 minut před koncem chmelovaru byla srovnatelná s pivem č.7,

was very low; in fact, it was at the level of experiments in which no hops were added. Even unhopped beer has a very slight bitterness/astringency to it caused by malt polyphenol compounds (Callemien et al., 2005) and hordatins (Tada et al., 2004). The slightly stronger bitterness of brew No. 3 can be attributed to residual alpha acids in debittered hops. The alpha acids preparations added under the same conditions had bitterness corresponding with the amounts added to wort boiling. Beer hopped with beta acids applied on a solid inert carrier with a time delay prior to the application showed considerable analytical and sensory bitterness. This beer was in fact hopped with a mixture of decomposition products formed by oxidation of beta acids, as shown in the chromatogram of degradation products of beta acids deposited on cellulose after 72-hour-long exposure to air at room temperature (Fig. 4). The figure shows that the amount of the original beta acids is negligible.

The intensity of the sensory bitterness corresponded with the analytical bitterness of beers hopped with oxidation products of beta acids. In terms of analytical bitterness, beer hopped with alpha acids (brew No. 4 and 5) had a slightly higher sensory bitterness (by 0.2 points) when compared to beers hopped with oxidized preparation of beta acids (batch No. 7 and 8), the value of beer No. 6 hopped with partially oxidized beta acids was correspondingly lower. Almost no difference was observed between the courses of the decrease of the sensory bitterness of beers hopped exclusively with oxidized beta acids and beers hopped exclusively with alpha acids; bitterness lingering was smooth, slightly faster in comparison with beers hopped with alpha acids. The bitterness character was soft and the nature of the bitterness of beer hopped with alpha acids was not different (Fig. 6). The overall impression after drinking beers hopped with alpha acids and beers hopped with oxidized beta acids was fully comparable. The bitterness caused by prepared oxidation products of beta acids was by no means unpleasant and adhering. Unpleasant bitterness of some beta acid products has been reported in the literature (Haseleu et al., 2009b).

It turned out that the vast majority of oxidation products of beta acids are soluble in water. The bitterness of beer No. 8 with the addition of beta acids preparation 15 minutes before the end of wort boiling was comparable with beer No.7, to which the same preparation was added in the beginning of the wort boiling process. Analytical bitterness of beers hopped with alpha and beta acids also show that bitterness yield of beta acids oxidation products is approximately 35–40% of iso-alpha acids bitterness. The defining feature of beta acids during prolonged storage of hop is their instability and tendency to oxidation depending on conditions. Only beta acids decomposition products resulting from oxidation have a bitter taste. The conditions for oxidation of beta acids after adding the boiling wort are not favorable. Their solubility in water is very small and the amount of oxygen in the wort is negligible (Fig. 5). Therefore, they transform into the bitter products only in a small extent so the contribution of beta acids to the total beer bitterness is insignificant. In contrast, the behavior of alpha acids under comparable conditions is quite different. In the course of the wort boiling process, a thermal isomerization occurs. The thermal isomerization does not require the presence of oxygen, and thus, the basic character of beer bitterness is determined by the isomerization products of alpha acids.



Obr. 6 Dozrívání a charakter sensorické hořkosti čerstvých piv / Fig. 6 The lingering and character of sensory bitterness of fresh beers

do kterého se stejný preparát přidal na začátku chmelovaru. Analytické hořkosti pív chmelených alfa a beta kyselin dále ukazují, že hořící vydatnost oxidačních produktů beta kyselin chmele dosahuje přibližně 35–40 % hořkosti iso-alfa kyselin. Určující vlastností beta kyselin při dlouhodobém skladování chmele je jejich nestabilita a sklon k oxidaci v závislosti na podmínkách. Pouze rozkladné produkty beta kyselin, vzniklé oxidací, vykazují hořkou chuť. Podmínky pro oxidaci beta kyselin po přidavku do vroucí mladiny však nejsou příznivé. Jejich rozpustnost ve vodě je velmi malá a množství kyslíku v mladině je zanedbatelné (obr. 5). Z toho důvodu se transformují na hořké produkty jen v malé míře, a tudíž příspěvek beta kyselin k celkové hořkosti piva je zanedbatelný. Naproti tomu chování alfa kyselin za srovnatelných podmínek je zcela odlišné. Při chmelovaru dochází k termické izomeraci, která nevyžaduje přítomnost kyslíku, a tudíž základní charakter hořkosti piva určují izomerační produkty alfa kyselin.

4 ZÁVĚR

Degradace beta kyselin v čistém stavu za přístupu vzduchu při pokojové teplotě je velmi rychlá. Po 30 dnech se rozloží přibližně polovina původního množství. Naproti tomu degradace beta kyselin v hlávkových chmelech je za stejných podmínek podstatně pomalejší. Po 6 měsících činí pokles zhruba 20 %. Vysoká citlivost beta kyselin vůči oxidaci se nejvíce projevila po nanesení na pevné nosiče (mikronizovaná celulóza, křemenný písek). Stupeň oxidace byl značně závislý na teplotě, při které byly preparáty uchovávány. Piva chmelená částečně zdegradovanými beta kyselinami v dávce 20 g/hl vykazovala zřetelnou a příjemnou senzorickou hořkost. Hořící vydatnost oxidačních produktů beta kyselin chmele dosahuje přibližně 35–40 % hořkosti iso-alfa kyselin.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla vypracována jako součást řešení projektu QI91B227 „Význam beta kyselin pro České pivo“, který je řešen s finanční podporou Ministerstva zemědělství ČR.

LITERATURA / REFERENCES

- Analytica EBC, Method 7.7, 1998: Hans Carl Verlag, Nuremberg, Germany.
- Aitken, R.A., Bruce, A., Harris, J.O., Seaton, J.C., 1970: The bitterness of hop-derived materials in beer. *J. Inst. Brew.*, 76: 29–36.
- Callemien, D., Bennani, M., Counet, C., Collin, S., 2005: Which polyphenols are involved in aged beer astringency? Assessment by HPLC and time-intensity method. *Proc. Eur. Brew. Congr.*, Prague, Fachverlag Hans Carl: Nurnberg, CD-ROM: 809–814.
- Fritsch, A., Shellhammer, T.H., 2008: Relative Bitterness of Reduced and Nonreduced Iso-beta-acids in Lager Beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 66(2): 88–93.
- Haas, G.J., Barsoumian, R., 1994: Antimicrobial Activity of Hop Resins. *J. Food Protection*, 57: 59–61.
- Haseleu, G., Intelmann, D., Hofmann, T., 2009a: Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from beta-acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chem.*, 116: 71–81.
- Haseleu, G., Intelmann, D., Hofmann, T., 2009b: Identification and RP-HPLC-ESI-MS/MS Quantification of Bitter-Tasting beta-Acids Transformation Products in Beer. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 7480–7489.
- Hughes, P.S., Simpson, W.J., 1996: Bitterness of Congeners and Stereoisomers of Hop-Derived Bitter Acids Found in Beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54(4): 234–237.
- Intelmann, D., Hofmann, T., 2010: On the Autooxidation of Bitter-Tasting Iso-beta-acids in Beer. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 5059–5067.
- Jaskula, B. et al., 2009: Hopping Technology in Relation to beta-Acids Isomerization Yield, Final Utilisation, and Stability of Beer Bitterness. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 67(1): 44–57.
- Jaskula, B., Aerts, G., De Cooman, L., 2010: Hop beta-acids isomerization and utilisation: an experimental review. *Cerevisia*, 35: 57–70.
- Krofta, K., Lišková, H., Vrabcová, S., 2012: Způsob přípravy čistých beta kyselin chmele. Patent č. 303017, Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- Laws, D.R., 1968: Hop resins and beer flavour V. The significance of oxidized hop resins in brewing. *J. Inst. Brew.*, 74: 178–182.

Tab.4 Výsledky senzorické analýzy pív / Results of sensorial analysis of beers

Pivo / Beer	1	2	3	4	5	6	7	8
Říz / Sharpness	2.5	2.6	2.6	2.8	2.7	2.6	2.7	2.8
Plnost / Fullness	2.0	2.1	2.2	2.4	2.5	2.5	2.6	2.3
Hořkost / Bitterness	1.2	1.4	1.6	2.8	2.7	2.2	2.6	2.5
Trpkost / Harshness	0.8	0.9	1.1	1.0	0.9	0.7	1.1	0.8
Sladkost / Sweetness	0.6	0.8	0.7	0.5	1.2	1.1	1.2	1.3
Kyselost / Sourness	0.9	1.4	1.6	1.2	0.8	1.5	0.8	0.8
Ovocná-esterová / Fruity-esters	1.1	1.2	0.7	0.9	1.2	1.2	1.1	1.3
Celkový dojem / Overall impression	5.6	5.4	5.5	3.6	3.7	4.2	3.7	3.9

4 CONCLUSIONS

Degradation of beta acids in a pure form in the access of air at room temperature is very quick. After 30 days, approximately half of the original amount decomposes. On the contrary, the degradation of beta acids in hop cones under the same conditions is significantly slower. After 6 months, the decrease is about 20%. High sensitivity of the beta acids to oxidation is most apparent after application on a solid carrier (micronized cellulose, quartz sand). The degree of oxidation was significantly dependent on the temperature at which the preparations were kept. Beer hopped with partially degraded beta acids at a dose of 20 g / hl showed distinct and pleasant sensory bitterness. The bittering yield of beta acids oxidation products is approximately 35–40% of the iso-alpha acids bitterness.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out as a partial outcome of activities within the project QI91B227 „Importance of beta acids for Czech beer“ with the financial support of the Ministry of Agriculture the Czech Republic.

- Krofta, K., Mikyška, A., Čejka, T. et al., 2013: Stability of hop beta acids and their decomposition products during natural ageing. 3rd ISHS Humulus Symposium, Žatec, 2012; Acta Horticulturae, v tisku.
- Malowicki, M.G., Shellhammer, T.H., 2005: Isomerization and Degradation Kinetics of Hop (*Humulus lupulus* L.) Acids in a Model Wort-Boiling System. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 4434–4439.
- Mikyška, A., Čejka, P., Krofta, K., 2013: Metodické hodnocení hořkosti piva. Sborník přednášek z Pivovarsko-chmelařského semináře, Chmelařský institut Žatec, květen 2013. ISBN 978-80-86836-97-3.
- Mikyška, A., Čejka, P., 2013: Stanovení senzorické hořkosti piva. Certifikovaná metodika, VÚPS Praha. ISBN 978-80-86576-59-6 (v tisku).
- Regan, J.P., Elvidge, J.A., 1969: Chemistry of hop constituents. Part XXXIII. Reactions of beta-acids. *J. Inst. Brew.*, 75: 10–14.
- Schmalreck, A. F., Teuber, M., Reininger, W., Hartl, A., 1975: Structural features determining the antibiotic potencies of natural and synthetic hop bitter acids, their precursors and derivatives. *Can. J. Microbiol.*, 21: 205–212.
- Stevens, R., Wright, D., 1961: Evaluation of hops X. H lupulones and the significance of beta acids in brewing. *J. Inst. Brew.*, 67: 496–501.
- Tada, N., Inui, T., Kageyama, N., Takaoka, S., Kawasaki, Y., 2004: The influence of malt acrospires on beer taste and foam quality. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 41: 305–309.
- Taniguchi, Y., Matsukura, Y., Ozaki, H., Nishimura, K., Shindo, K., 2013: Identification and Quantification of the Oxidation Products Derived from beta-Acids and beta-Acids During Storage of Hops (*Humulus lupulus* L.) *J. Agric. Food Chem.*, 61 (12): 3121–3130.
- Verzele, M., De Keukeleire, D. 1991: Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids. Developments in Food Science 27. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-88165-4.
- Whitewar, A. R., Hudson, J. R. 1964: Hop resins and beer flavor, III. *J. Inst. Brew.*, 70: 24–29.