

Beta kyseliny chmele, význam a využití

Hop beta acids: Properties, Significance and Utilization

Karel KROFTA¹, Alexandr MIKYŠKA²

¹Chmelařský institut, s.r.o., Kadaňská 2525, 438 01 Žatec / *Hop Research Institute, Ltd. Kadaňská 2525, CZ 438 01 Žatec, Czech Republic*

²Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. Lípová 15, 120 44, Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting PLC,*

Lípová 15, CZ 120 44 Praha 2, Czech Republic

e-mail : krofta@chizatec.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed paper*

Krofta, K. – Mikyška, A.: Beta kyseliny chmele, význam a využití. Kvasny Prum. 60, 2014, č. 4, s. 96–105

Význam a využití beta kyselin chmele, významné složky chmelových pryskyřic, se odvíjí ve třech rovinách, pivovarské, antimikrobiální a fyziologické. V pivovarství je určující vlastností beta kyselin nízká rozpustnost ve vodných roztocích a schopnost oxidace na rozpustnější produkty. Oxidace probíhá při zpracování a skladování chmele a v malé míře při výrobě piva. Piva chmelená pre-oxidovanými beta kyselinami mají výraznou senzorickou hořkost, hořčící vydatnost oxidačních produktů beta kyselin chmele dosahuje přibližně 35–40 % hořkosti iso-alfa kyselin. Byla shromážděna řada důkazů o biologických a farmakologických účincích chmelových hořkých kyselin a speciálně účincích beta kyselin. Chmelové kyseliny jsou potenciálním zdrojem pro léčbu anebo prevenci řady onemocnění včetně rakoviny, diabetu, osteoporózy, kardiovaskulárních chorob, zánětlivých procesů a metabolických poruch. Významné jsou antimikrobiální účinky beta kyselin proti řadě různých mikroorganismů, které již našly využití v cukrovanictví, lihovarství a chovu hospodářských zvířat. Tento přehledový článek shrnuje dosavadní poznatky o beta kyselinách chmele jak z hlediska působení v pivovarském procesu, tak z hlediska jejich bioaktivních účinků.

Krofta, K. – Mikyška, A.: Hop beta acids: Properties, significance and utilization. Kvasny Prum. 60, 2014, No. 4, pp. 96–105

Hop beta acids, the vital components of hop resins, are important on three levels – brewer, antimicrobial, and physiological. In the brewing industry, low solubility in aqueous solutions and the ability to oxidation into more soluble products is the defining characteristic of beta acids. Oxidation occurs in the course of processing and storage of hops and to a small extent also during beer production. Beers hopped by pre-oxidized beta acids have strong sensory bitterness. The bittering yield of oxidation products of hop beta acids is approximately 35–40% of the iso-alpha acids' bitterness intensity. A wide range of evidence of the biological and pharmacological effects of hop bitter acids, especially the effects of beta acids has been collected. Hop acids are potential sources of treatment or prevention of many diseases, including cancer, diabetes, osteoporosis, cardiovascular diseases, inflammatory and metabolic disorders. In addition, the antimicrobial effects of beta acids against different microorganisms are significant and have been utilized in sugar production, distilling and livestock sectors. This paper summarizes the current knowledge about the role beta acids play in the brewing process, and focuses on their bioactive effects.

Krofta, K. – Mikyška, A.: Beta-Hopfensäure, Bedeutung und Anwendung. Kvasny Prum. 60, 2014, Nr. 4, S. 96–105

Die Bedeutung und Anwendung der Beta – Hopfensäuren, die eine bedeutende Hopfenharzen darstellen, erstrecken sich über drei Ebenen, Brau-, Antimikrobielle- und Physiologischesebene. In der Brauindustrie stellt die entscheidende Eigenschaft der der Beta – Hopfensäuren eine niedrige Löslichkeit in den wässrigen Lösungen und Fähigkeit der Oxidation zu den mehr löslichen Produkten. Die Oxidation verfolgt während der Hopfenverarbeitung und Lagerung, in geringem Umfang auch bei der Bierherstellung. Die mit den preoxidierten Beta-Hopfensäuren gehopfte Biere wiesen eine signifikante sensorische Bitternis auf, die Bitterergiebigkeit von Oxidationsprodukten der Beta – Hopfensäuren erreicht etwa 35–40% Bitternis der iso-alpha-Säuren. Es wurde eine Reihe von Beweisen über biologischen und pharmakologischen Wirkungen Hopfenbittersäuren und speziell über Wirkungen der Beta Säuren zusammengefasst. Die Hopfensäuren sind eine potenzielle Quelle für ein Heilverfahren oder Prävention viele Krankheiten, einschließlich Krebs, Diabetes, Osteoporose, Kardiovaskuläres-Krankheiten, Entzündungsprozesse und Stoffwechselstörungen. Die antimikrobielle Wirkungen der Beta – Hopfensäuren sind bedeutend gegen die Reihen von verschiedenen Mikroorganismen, die einen Einsatz in der Zuckerindustrie, Spiritusindustrie und Tierhaltung gefunden haben. Dieser Übersichtsartikel zusammenfasst vorhandenes Wissen über die Beta – Hopfensäuren sowohl aus der Hinsicht auf ihre Wirkung in der Brauindustrie als auch in Bezug auf ihre bioaktive Wirkungen.

Klíčová slova: chmel, beta kyseliny, hulupony, pivo, fyziologické účinky, antimikrobiální účinky

Keywords: Hops, beta acids, hulupones, beer, physiological effects, antimicrobial effects

1 ÚVOD

Pěstování chmele (*Humulus lupulus* L.) má dlouhou historii. Chmel jako léčivou rostlinu zmiňuje římský historik Plinius v 1. století př. n. l. a od 8. století byl pěstován zejména v okolí klášterů. Ve středověku se chmel začal používat při vaření piva jako konzervační a hořčící agens. Od té doby je chmel základní surovinou při výrobě piva, asi 95 % celosvětové produkce chmele je určeno pro pivovarské účely (Biendl a Pinzl, 2007), zbytek je z velké části použit pro výrobu fyto-medikamentů a přírodních potravinových doplňků.

Z taxonomického hlediska rod *Humulus* patří čeledi *Cannabaceae* z řádu *Urticales*, ale v roce 2003 byl zahrnut do řádu *Rosales* (Bremer et al., 2003). Rod *Humulus* zahrnuje druhy *Humulus japonicus* Siebold a Zucc., *Humulus yunnanensis* Hu, *Humulus lupulus* L., posledně jmenovaný je téměř výhradně pěstován pro pivovarské účely.

Zralé chmelové hlávky obsahují řadu sekundárních metabolitů, pryskyřice, silice a polyfenolové látky (tab. 1), jejichž empiricky zjištěné digestivní, zklidňující a antiseptické působení bylo využíváno v přírodní medicíně a popsáno v řadě herbářů (Biendl, 2009).

V posledních 10–15 letech je prováděn intenzivní biomedicínský výzkum s cílem zjistit bioaktivní látky v chmelu a objasnit základní molekulární mechanismy, kterými tyto látky působí. Znáčná po-

1 INTRODUCTION

Hop (*Humulus lupulus* L.) growing has a long history. As a medicinal plant, hop was mentioned by the Roman historian Plinius in the 1st century BC. In the 8th century, it was grown mainly in the vicinity of monasteries. In the Middle Ages, hop started to be used in beer brewing as a preservative and bittering agent. Since then hop has served as the basic raw material in beer production. About 95% of the world production of hops is produced for brewing purposes (Biendl and Pinzl, 2007); the rest is largely used for phyto pharmaceuticals and natural dietary supplements production.

From the taxonomical viewpoint, the *Humulus* genus belongs to the family of *Cannabaceae* of the *Urticales* order, but in 2003, it was included in the *Rosales* order (Bremer et al., 2003). The *Humulus* genus includes species *Humulus japonicus* Siebold and Zucc., *Humulus yunnanensis* Hu, *Humulus lupulus* L., the latter is almost exclusively grown for brewing purposes.

Mature hop cones contain various secondary metabolites such as resins, essential oils and polyphenolic compounds (Table 1). Empirically identified digestive, calming, and antiseptic effects have been used in natural medicine and described in a number of herbals (Biendl, 2009).

Tab. 1 Průměrné složení sušených chmelových hlávek* / Table 1 Average composition of hop cones*

Složka	Component	Obsah (% hm.) / Contents (% w/w)
alfa kyseliny	alpha acids	2–17
beta kyseliny	beta acids	2–10
silice	hop oils	0.5–3
polyfenoly	polyphenols	3–6
aminokyseliny	aminoacids	0.1
popel	ash	10
vosky, mastné kyseliny	waxes, fatty acids	1–5
celulosa-lignin	cellulose, lignin	40–50
monosacharidy	monosacharides	2
pektiny	pectines	2
proteiny	proteins	15
voda	water	8–12

*Beniilez et al. (1997)

zornost je věnována obsahu specifických multipotentních bioaktivních polyfenolových látek chmele, jako jsou například xanthohumol a 8-prenylarigenin (Stevens a Page, 2004; Gerhauser, 2005; Chadwick et al., 2006).

Výzkum přináší rostoucí množství důkazů ukazujících na zajímavé účinky různých sekundárních metabolitů chmele na lidské zdraví. Je zřejmé, že hořké kyseliny jsou účinné na karcinogenní bujení, kardiovaskulární choroby, zánětlivé procesy, diabetes mellitus a některé metabolické syndromy (Van Cleemput et al., 2009).

Převážná část publikací z oblasti poznatků o sekundárních metabolitech chmele je věnována buď jejich chemismu a působení v pivovarském procesu, nebo jejich bioaktivním účinkům. V tomto článku jsme se pokusili o syntézu obou pohledů a shrnutí dosavadních poznatků o beta kyselinách chmele.

2 STRUKTURA A VLASTNOSTI BETA KYSELIN

Beta kyseliny patří společně s alfa kyselinami mezi významné složky chmelových pryskyřic. Poprvé byly izolovány Lermerem v roce 1863 (Lermer, 1863). Chemická struktura lupulonu byla navržena až v roce 1925 Wöllmerem a korigována v roce 1949 Verzelem a Govaertem (Verzele a Govaert, 1949). Řada jejich vlastností je díky strukturálním rozdílům odlišná od vlastností alfa kyselin.

Protože beta kyseliny neobsahují terciární alkoholovou skupinu v aromatickém jádru, nemohou na rozdíl od alfa kyselin při chmelovaru izomerovat (obr. 1). Přítomnost dalšího isoprenylového bočního řetězce způsobuje, že molekula jako celek má hydrofobnější charakter. Beta kyseliny jsou proto ve vodě v porovnání s alfa kyselinami mnohem méně rozpustné. Unikátní struktura je na druhé straně zdrojem antimikrobiálních vlastností a schopnosti působit proti celé řadě mikroorganismů a dalších fyziologických účinků na organismus savců.

Převážná část odborných prací, které se zabývají strukturálními změnami beta kyselin jak v průběhu chmelovaru, tak v různých modelových systémech, pochází z 50. až 70. let minulého století. Renesanci zájmu o beta kyseliny z pohledu chování při chmelovaru a jejich příspěvku k hořkosti piva lze zaznamenat až ke konci první dekády tohoto století díky německým a českým výzkumníkům (Haseleu et al., 2009a; Krofta, Mikyška, 2013b). Pomocí moderních analytických a separačních technik se podařilo úlohu beta kyselin v procesu výroby piva hodnověrně objasnit.

Beta kyseliny se ve chmelu nachází ve směsi analogů, z nichž nejvýznamnější jsou kolupulon, lupulon a adlupulon. Obsah dalších analogů, prelupulonu a postlupulonu, je velmi malý. Jednotlivé analogy se strukturálně liší radikálem R na druhém uhlíku aromatického jádra (tab. 2). Beta kyseliny jsou bezbarvé krystalické látky s bodem tání v intervalu 82 až 97 °C. Jsou velmi málo rozpustné ve vodě, což je dáno přítomností hydrofobních postranních řetězců v molekule. Při teplotě 100 °C a pH 5,6 je rozpustnost beta kyselin pouze 8,5 mg/l. Rozpustnost alfa kyselin za stejných podmínek je přibližně 250 mg/l (Spetsig, 1955). Na rozdíl od alfa kyselin, beta kyseliny

In the last 10–15 years, intensive biomedical research has been carried out in order to identify bioactive substances in hops and clarify the underlying molecular mechanisms based on which these substances act. Considerable attention has been paid to the content of specific multipotent bioactive polyphenolic compounds in hops, such as xanthohumol and 8-prenylarigenin (Stevens and Page, 2004; Gerhauser, 2005; Chadwick et al., 2006).

Recent research provides an increasing amount of evidence pointing to interesting effects that the various secondary hop metabolites have on human health. Bitter acids may be effective in suppressing cancerous growth, cardiovascular diseases, inflammatory processes, diabetes mellitus, and certain metabolic syndromes (Van Cleemput et al., 2009).

Majority of the publications in the field of secondary hop metabolites focus on both their chemistry and effects in the brewing process, or on their bioactive impact. In this paper we have tried to synthesize these two perspectives and summarize the up-to-date knowledge about hops beta acids.

2 STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE BETA ACIDS

Beta and alpha acids are important components of hop resins. They were first isolated by Lermer in 1863 (Lermer, 1863). The chemical structure of lupulone was designed by Wöllmer in 1925, and in 1949, it was corrected by Verzele and Govaert (Verzele and Govaert, 1949). Due to structural differences, many of their properties are different from the properties of alpha acids. As beta acids do not contain tertiary alcohol group in the aromatic nucleus, in contrast to hop alpha acids, they cannot isomerize (Fig. 1). The presence of another isoprenyl side chain causes the molecule as a whole to have a more hydrophobic character. Therefore, in comparison with alpha acids, beta acids are much less soluble in water. On the other hand, the unique structure is a source of antimicrobial properties, ability to act against a variety of microorganisms and other physiological effects on the organisms of mammals.

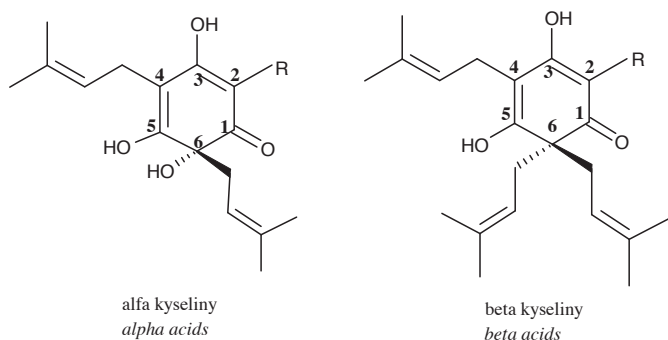
The bulk of scientific works dealing with structural changes of beta acids, both during wort boiling and in various model systems, have derived from the 1950s up to 1970s of the last century. Based on German and Czech researchers' work, renaissance of interest in beta acids in terms of their behavior during wort boiling and their contribution to beer bitterness can be recorded up to the end of the first decade of this century (Haseleu et al. 2009a; Krofta, Mikyška 2013b). The role of beta acids during the process of beer production was reliably verified by the use of modern analytical and separation techniques.

Beta acids in hops are a mixture of analogues with colupulone, lupulone and adlupulone being the most important ones. The content of other analogues, prelupulone and postlupulone, is very small. Individual analogues are structurally different by radical R on the second carbon of the aromatic ring (Table 2). Beta acids are colorless crystals with a melting point in the range of 82–97 °C. They are very poorly soluble in water which is caused by the presence of hydrophobic side chains in the molecule. The solubility of beta acids is only 8.5 mg/l at the temperature of 100 °C and pH of 5.6. The solubility of alpha acids under the same conditions is approximately 250 mg/l (Spetsig, 1955). In contrast to alpha acids, beta acids do not form insoluble lead salts, do not affect the rotation of polarized light and they absorb UV light at different wavelengths. For example, the UV absorption maxima of colupulone in acidic conditions are at wavelengths of 232, 275, and 340 nm and the absorption maxima under alkaline conditions are at 225 and 357 nm. (Verzele and De Keukeleire, 1991).

3 BETA ACIDS AND BEER

In terms of brewing, hop resins are the most important hop components. Their transformation products formed during wort boiling are a source of typical beer bitterness. In addition, they stabilize beer foam and due to their antiseptic effects, they increase biological stability of beer (Haas, 1994; Schmalreck, 1975). Transformation products of hop alpha acids are the main contributors to the overall beer bitterness. In the course of wort boiling, alpha acids are isomerized to cis- and trans-iso-alpha-acids (Jaskula, 2008; Jaskula, 2010; Haseleu, 2010). As a result of structural differences, hop beta acids cannot isomerize. Substances such as "iso-beta acids" do not exist (Peacock, 1998).

The most important property of beta acids that determines their behavior during hop processing and storage as well as during beer



Obr. 1 Struktura alfa a beta kyselin chmele / Fig. 1 Structure of hop alpha and beta acids

netvoří nerozpustné olovnaté soli, neovlivňují rotaci polarizovaného světla a UV světlo absorbují při jiných vlnových délkách. Například absorpční UV maxima kolupolonu jsou v kyselém prostředí při 232, 275 a 340 nm a při 225, 357 nm v alkalickém prostředí (Verzele a De Keukeleire; 1991).

3 BETA KYSELINY A PIVO

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; Haseleu, 2010). V důsledku strukturní odlišnosti nemohou beta kyseliny při chmelovaru izomerovat. Látky typu „iso-beta kyseliny“ neexistují (Peacock, 1998).

Za nejdůležitější vlastnost beta kyselin, která určuje jejich chování během zpracování a skladování chmele i v průběhu výroby piva, lze považovat značnou nestabilitu v přítomnosti kyslíku a sklon k oxidačním reakcím (Laws, 1968; Verzele, 1991). Ve větším rozsahu dochází k oxidačním změnám během dlouhodobého skladování nezpracovaných hlávek. V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty vyjadřující rychlost oxidace beta kyselin chmele vzdušným kyslíkem jako relativní úbytek původních beta kyselin chmele v čase (% rel.) po nanesení beta kyselin chmele na mikronizovanou celulózu, což charakterizuje dynamiku transformace v závislosti na teplotě a reakční době (Krofta a Mikyška, 2014).

Nejdéle známými oxidačními produkty transformace beta kyselin jsou hulupony (obr. 2) (Spetsig a Steninger, 1960). Na rozdíl od jiných látek, byla jejich existence potvrzena i v nedávných studiích (Haseleu, 2009a). Hulupony vznikají ve chmelu během dlouhodobého skladování a jsou společně s humulinony hlavními produkty přirozeného stárnutí chmele za přístupu vzduchu (Taniguchi et al., 2013). Data o jejich obsahu ve chmelu se rozcházejí. Spetsig a Steninger (Spetsig a Steninger, 1956) uvádí, že obsah huluponů ve chmelu může být až 3 % hm. Realističtější data ohledně obsahu huluponů ve chmelu do 0,5 % publikoval Stevens (Stevens a Wright, 1961).

Oxidační produkty beta kyselin ve starších chmelech do značné míry kompenzují při chmelovaru pokles hořkosti piva daný úbytkem alfa kyselin (Whitaker, 1966; Aitken et al., 1970). V literatuře jsou zmiňovány i další oxidační produkty beta kyselin, jako například luputriony, lupoxy, lupdoxy (Kokubo et al., 1971), lupdoly, lupdepy (Kowaka et al., 1973). Tyto deriváty vznikají cyklizací a epoxidací bočních izopentenylových řetězců při zachování původního šestičlenného aromatického kruhu. Lupoxy údajně dosahují 50 % hořkosti isohumulonů (Kowaka a Kokubo, 1977). Existence těchto látek však nebyla v dalších nezávislých studiích potvrzena.

Protože beta kyseliny z hlediska hořkosti piva mají omezený význam, byly v minulosti činěny některé pokusy transformovat tyto látky na hořké deriváty využitelné při výrobě piva (Seaton et al., 1985). Oxidace beta kyselin na hulupony byla předmětem několika patentů, průmyslové realizace se však doposud neuskutečnily. Technologické postupy jsou založeny na oxidaci beta kyselin kyslíkem v alkalickém prostředí. Jeden z procesů (Hirsch a Hartl, 1976) využívá k oxidaci přítomnost fotosenzitivních barviv. Průběh reakce, vedené při teplotách 20 °C až 60 °C, je kontrolován na základě poklesu pH a objemu absorbovaného kyslíku. Konverze beta kyselin na hulupony je přibližně 50%.

production is the significant instability in the presence of oxygen and the susceptibility to oxidation reactions (Laws, 1968; Verzele, 1991). During long-term storage of unprocessed cones, a wide range of oxidative changes occurs. Table 3 shows the representative values of hop beta acids oxidation rates by atmospheric oxygen expressed as a relative loss of the original hop beta acids in time (% rel.) after depositing hop beta acids on a micronized cellulose, which characterizes the dynamics of the transformation, depending on the temperature and reaction time (Krofta and Mikyška, 2014).

The longest time known oxidation products of beta acids transformation are hulupons (Spetsig and Steninger, 1960) (Fig. 2). In contrast to other materials, their presence was also confirmed in recent studies (Haseleu, 2009a). Hulupons are formed in hops during long-term storage and together with humulinons they are the main products of natural aging of hops under air conditions (Taniguchi et al., 2013). Data on their content in hops vary. Spetsig and Steninger (Spetsig and Steninger, 1956) states that the content of hulupons in hops may be up to 3% wt. More realistic data about the content of hulupons in hops, up to 0.5%, were published by Stevens (Stevens, Wright, 1961).

During wort boiling, oxidation products of beta acids in aged hops largely compensate beer bitterness decrease caused by the loss of alpha acids in these hops (Whitaker, 1966; Aitken et al., 1970). Other oxidation products of beta acids such as luputriols, lupoxes, lupdols (Kokubo et al., 1971), lupdols, lupdeps (Kowaki et al., 1973) are mentioned in literature. These derivatives are formed by cyclization and epoxidation of isopentenyl side chains while maintaining full six-membered aromatic ring. Lupoxes reportedly reach 50% of the bitterness of isohumulones (Kowaki and Kokubo, 1977). The existence of these substances has not been confirmed by other independent studies.

Since beta acids have limited importance in terms of beer bitterness, some attempts to transform these compounds to bitter derivatives usable in the production of beer were made in the past (Seaton et al., 1985). The oxidation of beta acids to hulupons has been the subject of several patents, however, industrial implementation of these patents have not been carried out. Technological procedures are based on the oxidation of beta acids with oxygen under alkaline conditions. One of the processes (Hirsch and Hartl, 1976) uses the presence of photosensitive dyes in oxidation. Progress of the reaction conducted at temperatures from 20 °C to 60 °C is controlled on the basis of pH decline and the volume of oxygen absorbed. Conversion of beta acids to hulupons is approximately 50%.

Desoxytetrahydrohumulons are formed by catalytic hydrogenation on palladium of an ethanol solution of beta acids in an acidic medium. The pH value of the solution was changed to alkaline by the excess of sodium carbonate. After the addition of $MgCl_2$, the reaction mixture is heated to a temperature between 50–60 °C and bubbled by oxygen or air. Desoxytetrahydrohumulons converse to tetrahydroisohumulons under these conditions. If the reaction gas is oxygen, the oxidation and isomerization reactions take 30 minutes. The takes 90 minutes if the reaction gas is the air (Cowles et al., 1986). By using this method, beta acids can be advantageously transformed and oxidized. Beta acids can be produced as a by-product of the alkaline separation of alpha acids from the CO_2 extract in the course of manufacturing of the isomerized hop products. Hydrogenated isohumulons are characterized by distinctive bitterness. Also, they do not subject to oxidation and are stable in daylight.

Completely new information on the transformation products, beta acids, during wort boiling has been brought about by the most recent work, in which modern analytical methods and detection systems were employed. Using LC-TOF-MS and 1D/2D-NMR of fractionated hop extracts that have undergone a model wort boiling, Haseleu et al. (Haseleu et al., 2009a; 2009b) discovered seven previously unknown degradation products of beta acids with a bitter taste. In addition to previously known hulupone, the structures of other compounds – two hydroxytricyclopone epimers, two dehydrotricyclopone epimers, two hydroperoxytricyclopone and nortricyclopone epimers (Fig. 3) – were determined. Cohulupone and the transformation products summary and structural formulas are displayed in Table 4 and Fig. 4.

According to the authors of this study, all newly identified degradation products showed unpleasant adhering bitterness with sensory threshold in the range of 38 to 90 $\mu mol/l$. In contrast, hulupones exhibited short lingering fine bitterness, similar to the one of iso-alpha acids. Of all the tested compounds hulupons had the lowest threshold of sensory bitterness in the range of 8–15 $\mu mol/l$. The concentration of the original beta acids in beer is negligible, 0.05 to 0.17 $\mu mol/l$ (Intelmann et al., 2009). Interestingly, analogous degradation products are formed during beta acids metabolism in terms of „in vitro“ liver cells of experimental animals

Tab. 2 Charakteristika nejdůležitějších analogů beta kyselin / Table 2 Characteristics of the most important analogues of beta acids

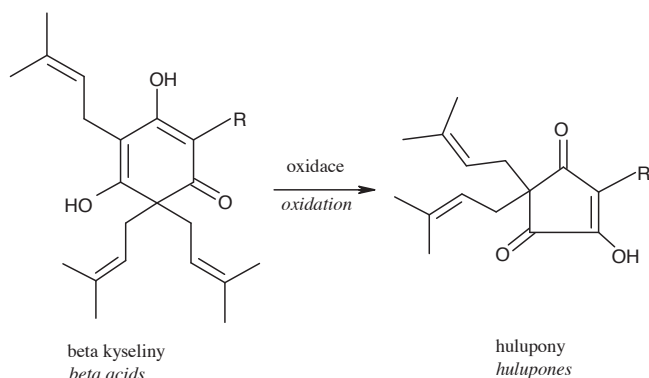
Analog / Analogue	Sumární vzorec / Suma formula	Strukturní vzorec R / Structural formula R	Boční řetězec / Side chain	Bod tání (°C) / Melting point
lupulone	C ₂₆ H ₃₈ O ₄	-CO·CH ₂ ·CH(CH ₃) ₂	isovaleryl	91*-92**
colupulone	C ₂₅ H ₃₆ O ₄	-CO·CH(CH ₃) ₂	isobutyryl	93*-97*
adlupulone	C ₂₆ H ₃₈ O ₄	-CO·CH(CH ₃)·CH ₂ ·CH ₃	2-methylbutyryl	82–83**
prelupulone	C ₂₇ H ₄₀ O ₄	-CO·CH ₂ ·CH ₂ ·CH(CH ₃) ₂	4-methylpentyl	-
postlupulone	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	-CO·CH ₂ ·CH ₃	propionyl	-

* Verzele, De Keukeleire, 1991.

** Hough et al., 1982.

Tab. 3 Rychlost oxidace beta kyselin chmele na vzduchu po nanesení na inertní nosič – mikronizovaná celulóza (% rel.) (Krofta a Mikyška, 2014) / Table 3 Rate of hop beta acids oxidation under open air after application on inert carrier – micronized cellulose (% rel.) (Krofta and Mikyška, 2014)

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

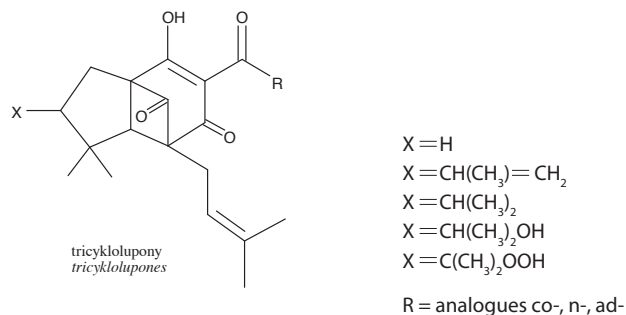


Obr. 2 Transformace beta kyselin na hulupony / Fig. 2 Transformation of beta acids to hulupones

Katalytickou hydrogenací ethanolového roztoku beta kyselin na paladiovém katalyzátoru v kyselém prostředí vznikají desoxtetrahydrohumulony. Přebytkem sody se pH roztoku změní na alkalické. Po přidavku MgCl₂ se reakční směs zahřeje na teploty v rozmezí 50–60 °C a probublává kyslíkem nebo vzduchem. Za uvedených podmínek dojde ke konverzi desoxtetrahydrohumulonů na tetrahydrohumulony. Oxidační a izomerační reakce trvá 30 minut, pokud se jako reakční plyn použije kyslík, nebo 90 minut, pokud je reakčním plynem vzduch (Cowles et al., 1986). Tímto způsobem lze výhodně transformovat beta kyseliny, které vznikají jako vedlejší produkt po alkalické separaci alfa kyselin z CO₂-extraktů při výrobě izomerovaných chmelových produktů. Hydrogenované iso-humulony se vyznačují výraznou hořkostí, nepodléhají oxidaci a jsou stabilní na denním světle.

Zcela nové informace o transformačních produktech beta kyselin v průběhu chmelovaru přinesly nejnovější práce, které již využily možnosti moderních chromatografických metod a detekčních systémů. Haseleu et al. (Haseleu et al., 2009a; 2009b) pomocí LC-TOF-MS a 1D/2D-NMR objevili ve frakcionovaných chmelových extraktech, které podrobili modelovým chmelovarům, sedm dosud neznámých degradačních produktů beta kyselin vykazujících hořkou chuť. Kromě již dříve známého huluponu byly v médiu určeny struktury dalších látek, 2 epimery hydroxytricyklohexoponu, 2 epimery dehydrotricyklohexoponu, 2 epimery hydroperoxytricyklohexoponu a nortriacyklohexopon (obr. 3). Sumární vzorec kohuluponu a transformačních produktů jsou uvedeny v tab. 4, strukturní vzorec přibližuje obr. 4.

Podle autorů studie vykazovaly všechny nově určené degradační produkty ulpívající nepříjemnou hořkost se senzorickým prahem v rozmezí 38–90 μmol/l. Naproti tomu hulupony vykazovaly krátce doznívající, mírnou hořkost podobnou hořkosti iso-alfa-kyselin. Ze



Obr. 3 Struktura tricyklických derivátů beta kyselin / Fig. 3 Structure of tricyclic derivatives of beta acids

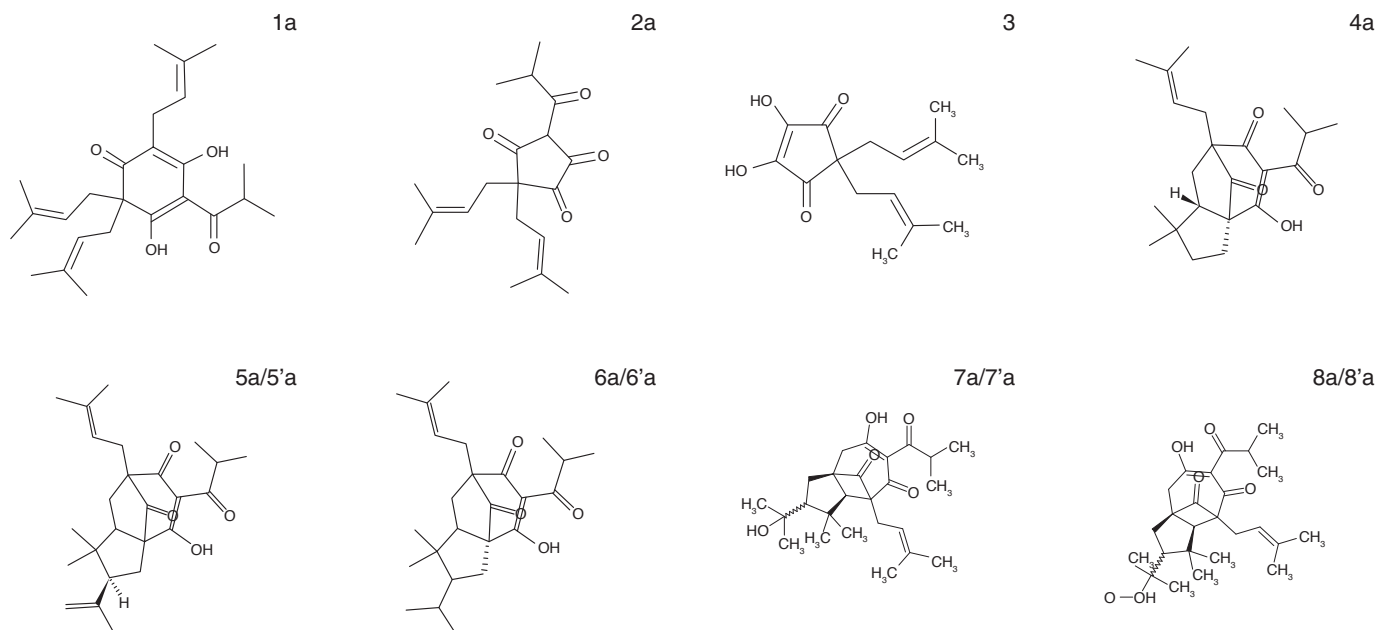
(Cattoor et al., 2013). A preparation of pure non-oxidized beta-acids added to wortboiling either as a diluted ethanolic solution or immobilized on an inert carrier produces beer that is not noticeably bitter for the average consumer. Beer hopped by pre-oxidized beta acids deposited on a solid carrier had significant sensory bitterness. The bittering ability of beta acids oxidation products – mainly hulupones – is 35–40% of the bittering yield of iso-alpha acids (Krofta et al., 2013b).

It is important that the bitterness of beers hopped by oxidation products of beta acids was pleasant and lingering faster in comparison to the bitterness of beers hopped by pure alpha acids. (Mikyška et al., 2012). The conditions under which oxidation of beta acids in boiling wort takes place are not favorable because the solubility of oxygen at the boiling point is practically zero. For this reason, they are transformed to bitter products to only a very small extent and hence the contribution of beta acids to the total beer bitterness is negligible. Due to low solubility, an overwhelming proportion of beta acids – 70–85% remains in spent grains and break. In contrast, the sorption of bitter acids to yeast is relatively small.

The concentration of hulupinic acid (Fig. 4), the oxidation product of hulupons, is negligible in beer (Haseleu et al., 2010). Hulupones are present in fresh hop products (pressed hops, hop pellets) as a result of hop oxidation during post-harvest processing of hops. The content increases in the course of hop storage. When aroma hop varieties with more or less balanced content of alpha and beta acids are used for hopping, a greater contribution of hulupones to the overall bitterness of beer can be expected (Mikyška and Krofta, 2014). Greater impact of beta acids on sensory bitterness of beer is to be expected when processing hops that were stored for a long time, in which case, a higher rate of oxidative degradation of beta acids can be anticipated (Mikyška and Krofta, 2012).

Tab. 4 Oxidační produkty kolupulonu / Table 4 Oxidation products of colupulone

	Název / Name	Sum. vzorec / Suma formula	[M-H]-
1a	kolupulon	C ₂₅ H ₃₆ O ₄	399,2541
2a	kohulupon	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	317,1758
3	hulupinová kyselina / <i>hulupin acid</i>	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	263,1289
4a	nortricyklokolupon	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	397,2384
5a/5'a	dehydrotricyklokolupon epimery A a B	C ₂₅ H ₃₄ O ₄	397,2384
6a/6'a	tricyklokolupon epimery A a B	C ₂₅ H ₃₆ O ₄	399,2541
7a/7'a	hydroxytricyklokolupon epimery A a B	C ₂₅ H ₃₆ O ₅	415,249
8a/8'a	hydroperoxytricyklokolupon epimery A a B	C ₂₅ H ₃₆ O ₆	431,2439



Obr. 4 Strukturální vzorce oxidačních produktů kolupulonu / Fig. 4 Structural formulae of colupulone oxidation products

Haseleu et al. 2009b

všech zkoumaných látek měly hulupony nejnižší práh senzorické hořkosti v rozmezí 8–15 mol/l. Koncentrace původních beta kyselin v pivu je nepatrná, 0,05–0,17 μmol/l (Intelmann et al., 2009). Zajímavé je, že analogické degradační produkty vznikají i při metabolizaci beta kyselin v podmínkách „in vitro“ jaterními buňkami pokusných zvířat (Cattoor et al., 2013).

Preparát čistých, neoxidovaných beta kyselin přidáný do reálného chmelovaru buď ve formě zředěného ethanolového roztoku, nebo imobilizovaný na inertním nosiči poskytne pivo, které není pro běžného konzumenta znatelně hořké. Výraznou senzorickou hořkost měla až piva chmelená pre-oxidovanými beta kyselinami nanesenými na pevný nosič. Hořčící vydatnost oxidačních produktů beta kyselin, v nich převládají hulupony, dosahovala 35 až 40 % hořkosti iso-alfa kyselin (Krofta et al., 2013b).

Podstatné je, že hořkost piva chmeleného oxidačními produkty beta kyselin byla příjemná, rychleji doznívající než u piva, které bylo chmeleno čistými alfa kyselinami (Mikyška et al., 2012). Podmínky pro oxidaci beta kyselin ve vroucí mladině nejsou příznivé, protože rozpustnost kyslíku je při teplotě varu prakticky nulová. Z toho důvodu se transformují na hořké produkty jen ve velmi malé míře a tudíž příspěvek beta kyselin k celkové hořkosti piva je zanedbatelný. Převážný podíl beta kyselin 70–85 %, vzhledem k malé rozpustnosti, zůstává v mlátu a mladinnových kalech. Naproti tomu sorpce hořkých kyselin na kvasinky je poměrně malá.

Koncentrace hulupinové kyseliny (obr. 4) v pivu, jako oxidačního produktu huluponů je zanedbatelná (Haseleu et al., 2010). Hulupony jsou přítomny i v čerstvých chmelových výrobcích (lisovaný chmel, pelety) v důsledku oxidace při posklizňovém zpracování chmele a při skladování chmele jejich obsah vzrůstá. Při chmelení aromatickými odrůdami s přibližně vyrovnaným obsahem alfa a beta kyselin na pelety lze předpokládat větší příspěvek huluponů k celkové hořkosti piva (Mikyška a Krofta, Nepublikované výsledky, 2014). Větší uplatnění beta kyselin v senzorické hořkosti piva je možno očekávat při

4 ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF BETA ACIDS

The antimicrobial activity of beta acids is attributed to a range of congeners/analogues that have alicyclic structure of 2,4-cyclohexadien-1-one (Fig. 1). Three non-polar isoprenyl chains that give the whole molecule of beta acids a powerful hydrophobic character are the most important structural features in terms of their antibacterial properties (Schmalreck et al., 1975). Any substitutions by hydrophilic groups as well as a conversion of the six-membered aromatic ring to a five-membered one result in additional losses of antimicrobial activity. These findings support the theory that the lipophilic region of the cell membrane represents the target site for the hop bitter resins. The antibacterial effect of weak acids derived from the hop plant (*Humulus lupulus* L.) increases with the decreasing pH at which the dissociation of hop bitter acids is considerably suppressed (Simpson and Smith, 1992).

It is estimated that approximately 50% of population is infected by *Helicobacter pylori* bacteria. These bacteria contribute to the development of gastric ulcers and stomach carcinoma. Beta acids of hops are able to effectively suppress infection by *H. pylori* (Ohsugi et al., 1996). Recently, a study of the effects of hop compounds on a wide range of 30 *H. pylori* strains has been carried out. It was confirmed that beta acids had a greater impact on *H. pylori* than alpha acids. Moreover, a higher effect of a whole complex of secondary metabolites contained in fresh hop cones, comparable with the effect of antibiotics, was found (Čermák et al., 2014). Preparation of a formula made with green hops and its application to food supplements have been patented (Houška et al., 2013; Houška et al., 2012; Strohalm et al., 2013).

Seven naturally derived components from hop plant (*Humulus lupulus* L.) extracts were tested for evaluation of biological activities affecting acne vulgaris. Acne is one of the most common skin

zpracování déle skladovaných chmelů, u kterých lze přepokládat vyšší míru oxidační degradace beta kyselin (Mikyška a Krofta, 2012).

■ 4 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI BETA KYSELIN

Antimikrobiální aktivita beta kyselin je připisována sérii kongenerů/analogů, které mají alicyklickou strukturu 2,4-cyklohexadien-1-onu (obr. 1). Za nejdůležitější strukturální vlastnost beta kyselin z hlediska antibakteriálních vlastností považuje Schmalreck (Schmalreck et al., 1975) přítomnost 3 nepolárních isoprenylových řetězců, které dávají celé molekule silně hydrofobní charakter. Jakékoli substituce hydrofilními skupinami stejně jako kontrakce šestičlenného aromatického jádra na pětičlenné, vede k podstatnému snížení antimikrobiální aktivity. Antibakteriální aktivita je větší v kyselém prostředí při pH 4, ve kterém je disociace beta kyselin do značné míry potlačena (Simpson a Smith, 1992).

Odhaduje se, že přibližně 50 % populace je infikováno bakteriemi *Helicobacter pylori*. Zhruba u třetiny postižených vede tato infekce ke vzniku žaludečních vředů a karcinomu žaludku. Bylo prokázáno, že beta kyseliny chmele jsou schopny infekci *H. pylori* účinně potlačovat (Ohsugi et al., 1996). V nedávné minulosti byl proveden výzkum účinků chmele na širokém spektru 30 kmenů *H. pylori*. Byl potvrzen vyšší účinek beta kyselin oproti alfa kyselinám. Navíc byl zjištěn ještě vyšší účinek při aplikaci celého komplexu sekundárních metabolitů obsažených v nesušených chmelových hlávkách, který byl srovnatelný s účinkem antibiotik (Čermák et al., 2014). Příprava a aplikace preparátu ze zeleného chmele do potraviných doplňků je patentově chráněna (Houška et al., 2013; Houška et al., 2012; Strohal et al., 2013).

Šedm látek, které se nachází ve chmelových extraktech (*Humulus lupulus* L.) bylo testováno na biologické aktivity v souvislosti s výskytem akné. Akné je velmi rozšířené kožní onemocnění, které postihuje především děti a dospívající mládež v pubertě. Při akné vznikají na těle drobné vrádky, způsobené zánětem vývodů kožních mazových žláz. Patogeneze akné je multifaktoriální. Stav mj. zhoršuje přítomnost bakterií *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila* a *Staphylococcus pyogenes*. Xanthohumol a beta kyseliny chmele vykazovaly silný inhibiční efekt vůči těmto bakteriím (Yamaguchi et al., 2009). Podobný efekt je přisuzován i chmelovým silicím (Langezaal, Chandra 1992).

V důsledku obecného šíření rezistence vůči antibiotikům v humánní medicíně vzniká potřeba hledat alternativy při používání antibiotik při chovu hospodářských zvířat. Například chov drůbeže ohrožuje patogenní bakterie *Clostridium perfringens*. Antimikrobiální aktivita beta kyselin proti bakterii *Clostridium perfringens* byla prokázána v zažívacím traktu drůbeže po 22 dnech podávání vodního roztoku beta kyselin (Siragusa a Haas, 2008). *Clostridium perfringens* je gram pozitivní tyčinkovitá anaerobní sporující bakterie. V přírodě je všudypřítomná a je běžně obsažena v rozkládající se vegetaci, trávicí soustavě člověka i jiných obratlovců, na tělech hmyzu i v půdě. Bakterie *C. perfringens* je častou příčinou nemocí z potravin, např. po požití nedostatečně tepelně upraveného masa. Mezi typické příznaky nemoci patří břišní křeče, průjem a zvracení. Enterotoxin *Clostridium perfringens* způsobující onemocnění je termolabilní, rozkládá se při 74 °C.

Chmelový extrakt s vysokým podílem beta kyselin inhiboval růst a metabolismus *Streptococcus bovis* a zlepšil zažívání skotu (Flythe a Aiken, 2010).

Larson et al. (1996) zkoumali vliv směsných chmelových extraktů na růst bakterií *Listeria monocytogenes* na různých médiích a v potravinách. Infekce bakterií *Listeria monocytogenes* je spojována s konzumací různých typů potravin, především sýrů, balených masných výrobků, zeleninových salátů aj. Nejvýraznější inhibice růstu zmíněných bakterií na modelových médiích byla prokázána u extraktů, které obsahovaly velký podíl beta kyselin (40–95 %). Inhibice byla efektivní v dávkách 0,1–3 g/kg (tvaroh), 1 mg/g (zeleninový salát), 1 mg/ml (mléko). Větší účinnost byla pozorována v potravinách s kyselou rekcí (tvaroh), než v potravinách s vyšší hodnotou pH. Podle amerického patentu 5,286,506 (Millis a Schengel, 1994) potlačují beta kyseliny výskyt *Listeria monocytogenes* v sýrech, rybách, masných a jiných výrobcích při dávce 6–15 ppm.

Antimikrobiální aktivitu chmelových pryskyřic, iso-alfa kyselin a beta kyselin, proti *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* B. a *Bacillus subtilis* zkoumali Haas a Barsoumian (Haas a Barsoumian, 1994). *S. salivarius*, *S. aureus* a *B. megaterium* byly před vytvořením rezistence inhibovány

disease affecting children and adolescents. The pathogenesis of acne is multifactorial with the primary feature of increased sebum production during early puberty. The proliferation of bacteria such as *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila* and *Staphylococcus pyogenes* cause a primary skin infection and an abnormal follicular keratinization and inflammation. Hop extracts containing xanthohumol and lupulones showed strong inhibitory effects against all of the strains mentioned above. All naturally occurring xanthohumol, humulones and lupulones showed moderate to strong anticollagenase inhibitory activities (Yamaguchi et al., 2009). Similar effects are attributed to hop oils (Langezaal and Chandra 1992).

Due to the spread of antibiotic resistance to human infectious agents, there is a need to research antibiotic alternatives that could be used in animal agricultural systems. Antibiotic-free broiler chicken production systems are known to suffer from frequent outbreaks of necrotic enteritis due to the pathogenic *Clostridium perfringens* bacteria. Lupulone was tested for in vivo antimicrobial activity to inhibit *C. perfringens* in a chick gastrointestinal colonization model. Lupulone was added to drinking water in 62.5, 125 and 250 ppm concentrations and compared with the 0 ppm control. At day 22, post-hatch intestinal *C. Perfringens* counts of lupulone-treated chickens were significantly lower ($P < 0.05$) than the water-treated control groups across all lupulone dosages tested (Siragusa et al., 2008). *Clostridium perfringens* is a Gram-positive, rod-shaped anaerobic spore-forming bacterium of the *Clostridium* genus. It is present in nature and can be found as a normal component of decaying vegetation, marine sediments, the intestinal tract of humans and other vertebrates, insects, and soil. *C. perfringens* bacteria are frequent causes of foodborne illnesses spread from poorly prepared meat and poultry or from food properly prepared but badly stored. Typical symptoms of these illnesses are stomach spasms, diarrhoea, and vomiting. *C. Perfringens* enterotoxin (CPE) that mediates the disease is heat-labile and inactivated at 74 °C. Also, it can be detected in contaminated food.

Hop extracts with a high proportion of beta acids inhibited the growth and metabolism of *Streptococcus bovis* and improved cattle digestion (Flythe and Aiken, 2010).

Larson et al. (Larson et al., 1996) investigated the effect of hop extracts containing varying concentrations of alpha and beta acids on the growth of bacteria *Listeria monocytogenes* in various foods. Hop extracts were applied in the form of ethanol solutions. *Listeria monocytogenes* is associated with the consumption of a wide range of food types, particularly soft cheese and paté as well as hams and other pre-packed meat and poultry products. Extracts containing the highest concentrations of beta acids (40–95%) were the most effective at dosages of 0.1–3 g/kg (cottage cheese), 1 mg/g (coleslaw), 1 mg/ml (milk). It showed that the in-vitro activity of antimicrobials does not accurately match their efficacy in food. Overall, the antimicrobial activity of hop extracts in food appeared to increase with acidity and lower fat content. The results indicated that hop extracts could be used to control *Listeria monocytogenes* in minimally processed food with a low fat content.

According to a US Patent, 5,286,506 (Millis and Schengel, 1994), beta acids suppress the incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese, seafood, processed meats including hot dogs, sausages, hams, turkey and chicken at the dose of 6–15 ppm based on the weight of the food.

Antimicrobial activity of hop resins, iso-alpha-acids and beta acids, against *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* B. and *Bacillus subtilis* was studied by Haas and Barsoumian. Prior to the development of resistance, *S. salivarius*, *S. aureus* and *B. megaterium* were all inhibited by iso-alpha-acids in the 0.01 to 0.03% range. Hop beta acids were more active than iso-alpha-acids and initially inhibited these organisms at concentrations of 0.003 to 0.01%. The ease of resistance development varied among the different microbes, *B. megaterium* being the least prone to resistance development (Haas and Barsoumian, 1994).

Mizobuchi and Sato (Mizobuchi and Sato, 1985) established the antimicrobial effect of alpha and beta acids on microorganisms of the *Trichophyton*, *Candida*, *Fusarium*, *Mucor* and *Staphylococcus* strains. The effect is attributed to the six-membered aroma ring since analogues with five-membered ring were inactive.

The inhibition effect of beta acids on the growth of lactic bacteria has been taken advantage of in the sugar industry for many years. By dosing a hop-based extract periodically at the mid tower position in amounts of 10 g per ton of beet, the lactic acid content of raw juice was reduced to 400 mg/kg of raw juice without severe adverse influence on fermentation in the upper part of the tower. The hop beta ex-

iso-alfa kyselinami v koncentračním rozmezí 0,01 až 0,03 %. Beta kyseliny byly účinnější, inhibovaly růst těchto bakterií v intervalu koncentrací 0,003 až 0,01 %. Vznik rezistence byl závislý na druhu mikroorganismu, nejmenší sklon vykazala bakterie *B. megaterium*.

Mizobuchi a Sato (Mizobuchi a Sato, 1985) prokázali antimikrobiální účinky alfa a beta kyselin proti mikroorganismům z rodu *Trichophyton*, *Candida*, *Fusarium*, *Mucor* a *Staphylococcus*. Účinek připisují šestičlennému aromatickému jádru, protože analogy s pětičlenným kruhem byly inaktivní.

Inhibiční působení beta kyselin na bakterie mléčného kvašení se využívá mnoho let v cukrovarnickém průmyslu. Extrakt beta kyselin v opakovaných dávkách 10 gramů na tunu cukrové řepy je schopen potlačit tvorbu kyseliny mléčné v průběhu výroby na 400 mg/kg surové cukerné šťávy. Chmelový produkt tak nahradil dosud používaný formaldehyd (Hein a Pollach, 1997).

Hořké kyseliny chmele jsou využívány i v lihovarství a při výrobě bioethanolu pro zamezení mikrobiální kontaminace ve výrobě (Rueckle a Senn, 2006). Při výrobě bioethanolu jsou problémem mikroorganismy rezistentní vůči antibiotikům a z hlediska zdravotní bezpečnosti omezené možnosti aplikace antibiotik. Byl porovnán chmelový extrakt BETA-BIO 45 (Hopsteiner) a průmyslový biocid Kamoran®. Účinek chmelového extraktu byl plně srovnatelný s biocidem (Leite et al., 2013).

Růst mikroorganismů, jako jsou například bakterie, řasy, stejně jako makroorganismů (mlži, škeble), působí v průmyslových a jiných vodních systémech řadu problémů. Jejich množení působí technologické a zdravotní problémy. Většina chemických přípravků používaných k potlačování výskytu vodních organismů je toxická, při manipulaci dráždí oči a pokožku. Hledají se proto alternativy mezi přírodními biocidy, které by tyto problémy odstranily. Skupinou látek, které se osvědčily při udržování čistoty vody v průmyslových systémech, jsou beta kyseliny chmele v koncentracích od 0,1 do 10 ppm. Ve formě 10% vodného alkalického roztoku jsou v kombinaci se smáčedly a dalšími biocidy schopny účinně omezovat růst řas ve vodních systémech jako jsou například chladicí věže, výměníky tepla, pastéry, vodojemy, veřejné fontány apod. (Cooper et al., 2002; Breen et al., 2002).

Beta kyseliny a další chmelové látky (di- a tetra-iso-alfa kyseliny) přidávané do zubních past nebo ústních vod potlačují výskyt Gram pozitivních bakterií, které v ústní dutině vytváří zubní plak, způsobují záněty dásní a vývoj paradentózy. Účinné množství chmelových látek v dentálních přípravcích je 10–100 ppm (Barney et al., 1994).

Beta kyseliny jsou pro průmyslové použití dodávány ve formě roztoku v propylenglykolu (1,1-propandiol) potravinářské kvality většinou v koncentracích do 30 % (Wilson et al., 2003). Firma Hopsteiner uvedla na trh produkt Beta-Bio 45, který obsahuje dokonce 45 % beta kyselin (www.hopsteiner.com). Surovinou je frakce beta kyselin po alkalické separaci chmelových extraktů na bázi oxidu uhličitého. V této formě jsou beta kyseliny stabilní, mísitelné s vodou a bez tvorby sedimentů i při teplotách pod bodem mrazu. Propylenglykol, který má sladkou chuť, maskuje v potravinářských aplikacích slabě nahořklou příchut beta kyselin, která je způsobena stopami iso-alfa kyselin.

■ 5 FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY BETA KYSELIN

Chmel má dlouhou historii jako léčivá rostlina při problémech s nespavostí, zažíváním, křečemi, záněty, bolestmi uší a zubů aj. Není proto překvapením, že chmel byl v roce 2007 vyhlášen za léčivou rostlinu roku (Hopfen-Rundschau Int., 2007). První záznamy o chmelu jako léčivém prostředku sahají až do středověku. Nejstarší zmínka pochází z 11. století od arabského lékaře Mesue, který popisuje protizánětlivé vlastnosti chmele. Četné středověké herbáře zobrazují chmelovou rostlinu v souvislosti s použitím v medicíně např. při léčení infekcí a zažívacích potíží. Použití chmele v gynekologii uvádí poprvé v roce 1539 Hieronymus Bock (Biendl, 2009; Piendl a Schneider, 1981). Moderní věda díky pokrokům v analytické instrumentaci a separačním technikách postavila po staletí empiricky získané zkušenosti na vědecký základ. Za léčivými účinky chmele stojí unikátní struktury a složení nejdůležitějších sekundárních metabolitů, chmelových pryskyřic, silic a polyfenolů. Nové výzkumy navíc objevily například pozoruhodné vlastnosti xanthohumolu, iso-xanthohumolu, humulonu v prevenci rakoviny, osteoporózy a dalších chorob (Gernhauser, 2002). Dále bylo zjištěno, že chmel obsahuje v malém množství 8-prenylaringenin, nejúčinnější dosud známý fytoestrogen (Milligan, 2002) a jeho prekurzor desmethylxanthohumol (Krofta et al., 2013).

tracts substituted formaldehyde after it stopped being used for these purposes in several sugar factories in the central Europe (Hein and Pollach, 1997). Hop bitter acids are utilised in the distilling industry in production of bioethanol to prevent microbial contamination (Rueckle and Senn, 2006). Microorganisms resistant to antibiotics and limited possibilities of antibiotic application are the main problems of bioethanol production. Leite et al. evaluated the efficacy of the Beta-Bio 45 (Hopsteiner) hop extract and compared it to the commercial biocide Kamoran® and found similar effects (Leite et al., 2013).

Growth of microorganisms such as bacteria, fungi and algae, as well as macroorganisms such as mussels and clams is problematic in water systems and process streams. Proliferation of these organisms can cause mechanical, operational and chemical problems with economic and health-related consequences. Many of the chemicals used to control fouling in water systems are toxic to terrestrial animals or aquatic life. They are also eye or skin irritants. Environmentally compactible natural substances that control microbial fouling such as hop beta acids have been optimized. The hop extract, defined as an extract primarily composed of beta acids in the form of 10% alkali aqueous solution, is added to the water system at the concentration preferably in the range of 0.1 to about 10 ppm. Water systems to which hop extracts may be added include cooling towers, food, beverage and industrial process waters, pulp and paper mill systems, brewery pasteurizers, heat transfer systems, decorative fountains, ballast water tanks etc. (Cooper et al., 2002; Breen et al., 2002).

US Patent No. 5,370,863 disclosed that oral care compositions containing hop acids or their salts are effective in inhibiting Gram positive bacteria, including *Streptococcus mutans*, which can cause plaque or periodontal disease. Toothpastes, tooth powders, mouthwashes containing tetrahydro-iso-humulone and lupulone have been developed to treat oral cavity in combination with suitable pharmaceutically acceptable carriers. Such compositions contain 1–100 ppm of one or more hop acid or their salts. Barney et al., 1994).

Beta acids designed for industrial applications are delivered in the form of their alkali salts solution in food-quality propylene glycole (1,1-propandiol) in concentrations of up to 30% (Wilson et al., 2003). The Hopsteiner company has recently marketed a product named Beta-Bio 45 with a 45% content of beta acids (Hopsteiner, 2014). Beta acids in the propylene glycole solution are stable and do not form any precipitates even at storage temperatures well below 0 °C. Conveniently they are also miscible with water, which facilitates easy dosing at reduced concentrations. Beta acids may be prepared from liquid or supercritical CO₂ extracted hops. Propylene glycol has a sweet taste and thus may help mask any residual bitterness of the beta acids preparation arising from the presence of small amounts of bitter iso-alpha acids.

■ 5 PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF BETA ACIDS

For centuries, hop has been known as a remedy for a number of disorders in traditional medicine such as sleep disorders, bowel obstructions, earaches and toothaches, healing wounds, inflammatory diseases and others. It is not surprising that the Medicinal plant research study group at the University of Würzburg declared hop the medicinal plant of the year 2007 (Hopfen-Rundschau Int., 2007). The first reports about utilisation of hop as a medicinal plant date back to the Middle Ages. The oldest report is found in a book from the 11th century assigned to the Arabic physician Mesue who described the anti-inflammatory properties of hops. Numerous medieval herbal books show the hop plant in connection with treatments of ear infections, spleen disorders, diuretic and digestive problems, and fevers. The use of hops in gynecology was first mentioned by Hieronymus Bock in 1539 (Biendl, 2009; Piendl and Schneider, 1981). Thanks to the progress in analytical instrumentation and separation techniques, modern science has been able to root the experience that was empirically gathered for centuries into the scientific basis. The unique structure and composition of the most important secondary metabolites are in the background of many curative effects of hops. New research has revealed remarkable properties of xanthohumol, iso-xanthohumol, humulone and lupulone in prevention of cancer, osteoporosis and other diseases (Gernhauser, 2002). Hops contain small amounts of 8-prenylaringenin, the most potent phytoestrogen currently known (Milligan, 2002) and its precursor desmethylxanthohumol (Krofta et al., 2013).

Zanolí (Zanolí et al., 2007) studied the effects of beta acids on the central nervous system functions under both „in vitro“ and „in

Zanolí (Zanolí et al., 2007) zkoumala v podmínkách „in vitro“ i „in vivo“ vliv beta kyselin na funkci centrálního nervového systému u laboratorních kryš. Orální podávání beta kyselin v dávce 5–10 mg/kg zvýšilo průzkumnou aktivitu testovaných zvířat v otevřeném prostoru. Elektrofyziologické studie provedené na cerebrálních buňkách prokázaly, že beta kyseliny snižovaly, v závislosti na dávce, proud vyvolaný neurotransmiterem GABA (gama-aminomáselná kyselina).

Chemoprevence karcinomů, definovaná jako působení látek s cílem inhibovat nebo zpozdit procesy vedoucí ke vzniku nádorů, jejich růstu a šíření, byla prokázána, kromě již výše zmíněného xanthohumolu a humulonů, i u beta kyselin chmele. Vaskularizace nádorů je nezbytná pro jejich růst a metastatické šíření. Inhibice angiogeneze (tvorba nových cév) představuje v chemoprevenci nádorů v „in vitro“ i „in vivo“ podmínkách perspektivní terapeutický směr. U myši, které dostávaly lupulon v dávce 20 mg/kg/den po dobu 21 dní, byla tvorba nových cév potlačena o 50 % (Siegel et al., 2008).

U beta kyselin byl prokázán retardační účinek na růst rakovinných buněk karcinomu tlustého střeva (SW 620). Vznik karcinomu byl u pokusných zvířat vyvolán peritoneálními injekcemi azoxymethanu jednou týdně po dobu 14 dní. Růst SW 620 buněk u laboratorních kryš byl inhibován o 70 % po 48hodinové expozici beta kyselinami v dávce 40 µg/ml. Beta kyseliny rovněž zvýšily mitochondriální membránovou permeabilitu (Lamy et al., 2007).

Alfa a beta hořké kyseliny jsou schopny, v závislosti na dávce, potlačovat životaschopnost lidských leukemických buněk linií HL-60 a U937. Po 24 hodinách byla pozorována vysoká mortalita především u buněčného kmene HL-60, pro který byla zjištěna hodnota IC50 8,68 mg/ml. Kmen U937 byl více rezistentní, hodnota IC50 činila 58,9 mg/ml (Chen a Lin, 2004). Alfa a beta kyseliny způsobily fragmentaci DNA leukemických buněk, což vedlo posléze k jejich apoptóze.

Schiller et al. zkoumali sedativní účinky chmelových extraktů u laboratorních myšič (Schiller et al., 2006). Preparáty lipofilních chmelových extraktů snižovaly spontánní lokomoční aktivitu, prodlužovaly ketaminem indukovanou dobu spánku a snižovaly tělesnou teplotu. Sedativní účinky autoři přisuzují především alfa kyselinám, dále beta kyselinám a chmelovým silicím.

Podle US patentu 6,352,726 (Haas a Srinivasan, 2001) bylo prokázáno, že některé látky chmele, mj. i beta kyseliny, jsou schopny potlačovat výskyt prvoků (Protozoa). Prvoci hrají velmi důležitou roli např. při tzv. samočištění vody, v půdách jsou součástí edafonu. Někteří zástupci jsou však parazitní a svým hostitelům jsou schopni způsobit těžká onemocnění a často je i usmrcují (malárie, toxoplasmóza, spavá nemoc). Zatímco tetra-iso-alfa kyseliny byly účinné v koncentračním rozmezí 0,2–20 µg/ml, beta kyseliny působily při koncentracích 0,1–2 µg/ml. Ještě účinnější byl xanthohumol, u něhož byla 100% mortalita prvoků dosažena při dávkách 0,05–1,0 µg/ml. Zároveň bylo zjištěno, že účinek chmelových látek se podstatně zvýšil synergickým účinkem oxidu uhličitého.

Aplikace ethnolového roztoku kolupulonu na povrch listů měla repelentní účinky na svilušku chmelovou (*Tetranychus urticae*), odpuzovala dospělce z povrchu listů chmelové rostliny a rovněž snižovala počet nakladených vajíček. Celá frakce beta kyselin byla v repelentních účincích efektivnější než samotný kolupulon ve stejné koncentraci (Jones et al., 1996).

6 ZÁVĚR

Aktuální výzkum potvrdil obecně přijímaný fakt, že hlavní podíl na celkové hořkosti piva mají transformační produkty chmelových alfa kyselin, cis- a trans-iso-alfa-kyseliny. Významnými transformačními (oxidačními) produkty transformace beta kyselin jsou hulupony, na rozdíl od jiných látek, byla jejich existence a senzorická aktivita potvrzena i v nedávných studiích. Hulupony vykazují krátce doznívající, mírnou hořkost podobnou hořkosti iso-alfa-kyselin.

Hulupony vznikají především při zpracování a skladování chmele, v zanedbatelné míře pak při chmelovaru. Význam oxidačních produktů beta kyselin pro hořkost piva se výrazně snížil s postupující ochranou chmele před oxidací v průběhu posklizňového zpracování chmele a skladování chmelových výrobků. Přesto je při chmelení aromatickými chmelami s vyrovnaným poměrem alfa a beta kyselin možno předpokládat příspěvek huluponů k hořkosti piva.

V průběhu let byla shromážděna řada důkazů o biologických a farmakologických účincích chmelových hořkých kyselin a speciálně účincích beta kyselin. Chmelové kyseliny jsou proto potenciálním zdrojem pro léčbu nebo prevenci řady onemocnění včetně rakoviny, diabetu, osteoporózy, kardiovaskulárních chorob, zánětlivých

vivo“conditions. Oral administration of beta acids (5–10 mg/kg) in rats produced an increased exploratory activity in the open field and reduction in the pentobarbital hypnotic activity. Electrophysiological studies performed on cerebellar granule cells in culture showed that the beta acids fraction decreased GABA-evoked current in a dose-dependent way (GABA; γ-aminobutyric acid).

Cancer chemoprevention defined as the use of pharmacological or natural agents in order to inhibit or delay the processes of tumor initiation, promotion and progression has been proved for the above mentioned xanthohumol, humulone and beta acids as well. Tumor vascularization is mandatory for growth and metastatic dissemination. Inhibition of tumor angiogenesis (formation of new blood vessels) represents an attractive strategy in cancer chemoprevention. Lupulone caused a significant reduction of closed capillary-like structures in Matrigel, indicating a strong inhibitory effect on neovascularization. In mice receiving lupulone (20 mg/kg/day) in drinking water for 21 days, new vessel formation was reduced by 50% in matrigel plugs implanted under the skin when compared with controls. Lupulone is able to inhibit angiogenesis under „in vitro“ and „in vivo“ conditions (Siegel et al., 2008).

Beta acids showed retardation effect on the growth of cancer-derived metastatic SW620 cells in the human colon. Colon carcinogenesis was initiated in rats by intra-peritoneal injections of azoxymethane once a week for 2 weeks. SW 620 cell growth was inhibited by 70% after a 48 h exposure to lupulones at the dose of 40 µg/ml. Lupulones also increased the mitochondrial membrane permeability (Lamy et al., 2007).

Alpha and beta bitter acids displayed a strong increase of the inhibitory effect against human leukemia HL-60 and U937 cells in a dose-dependent way. High mortality of HL-60 cells was observed after a 24-hour exposition with an estimated IC50 8.68 µg/ml. More resistant U937 cells showed IC50 58.9 µg/ml. Alpha and beta acids induced DNA fragmentation of leukemia cells that finally resulted in their apoptosis (Chen a Lin, 2004).

Schiller et al. studied the sedating effect of hop extracts on laboratory mice (Schiller et al., 2006). Preparations of lipophilic hop extracts reduced the spontaneous locomotor activity, increased ketamine-induced sleeping time and reduced body temperature, and thus, confirmed the central sedating effect. Initially, the sedating activity could have been attributed to alpha acids. Beta acids and hop oils clearly contributed to the sedating activity of lipophilic Humulus lupulus extracts.

According to the US patent 6,352,726 (Haas and Srinivasan, 2001), it was proved that some hop substance including beta acids are able to suppress incidence of protozoa (Protozoa). Protozoa play an important role in the process of water self-purification; moreover, they are components of soil edaphone as well. On the other hand, there are many pathogenic protozoa in the intestinal tract that may cause human diseases (malaria, toxoplasmosis, sleeping disorder). The agent is an effective amount of hop extract composed of alpha acids, beta acids, xanthohumol and combinations thereof. The minimum effective amounts of alpha resin (humulone, iso-alpha acids, tetrahydro-iso-alpha acids) are about 0.2–20 µg/ml. The effective amount of beta resins is approximately 0.1–2 µg/ml. Xanthohumol appears to be more lethal to protozoa than to beta resin. The quantity that is necessary to achieve a 100% kill rate varies from about 0.05 to 1.0 µg/ml. It has also been found that a greatly improved synergistic effect against protozoa is attained when carbon dioxide is used in combination with hop resins.

Colupulone, the main component of the beta-acids fraction of hop extract, was shown to repel the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch from the surface of plant leaves. The total beta acid fraction was found to be more effective at repelling mites and reducing the number of eggs laid than colupulone at equivalent concentrations, suggesting that other components of the extract have repellent and oviposition-detering effects (Jones et al., 1996).

CONCLUSION

Current research confirmed the generally accepted fact that the transformation products of hop alpha acids, cis- and trans-iso-alpha-acids have major impact on overall beer bitterness. Hulupons are the most important transformation (oxidative) products of beta acids. In contrast to other compounds, the existence of hulupons and their sensorial activity have been verified by recent studies. Hulupons exhibit short-lasting mild bitterness similar to the bitterness of iso-alpha-acids.

Hulupones emerge mainly during hop processing and storage, however, they arise at negligible rates in the course of wort boiling. The importance of oxidation products of beta acids in respect to beer bit-

procesů a metabolických poruch. Účinky transformačních produktů hořkých kyselin jsou relativně dobře prozkoumány u iso-alfa kyselin, možné působení oxidačních produktů beta kyselin čeká na objasnění.

Pro využití potenciálu chmelových látek se nabízí několik cest. Prvou je výroba specifických preparátů konkrétních látek a jejich použití při výrobě léčiv a potravních doplňků, jako se to děje v případě prenylflavonoidů. Druhou cestou je příprava komplexních výtažků chmelových sekundárních metabolitů a jejich aplikace při výrobě potravních doplňků či funkčních potravin pro komplexní podpůrné působení na lidský organismus. Chmel totiž obsahuje široké spektrum látek s řadou prokázaných fyziologických efektů a působností na různé druhy onemocnění. Obdobné efekty, například z hlediska antimikrobiálních účinků, jsou uváděny pro hořké kyseliny, prenylflavonoidy a chmelové silice. Příznivé působení různých složek se může potencovat. Třetí cestou je příjem fyziologicky účinných látek chmele konzumací piva. Příznivé působení moderovaného pití piva na lidský organismus bylo prokázáno řadou epidemiologických studií (Klatsky et al. 1997). V případě hořkých kyselin je obsah v pivu limitován jejich nízkou rozpustností a význam mohou nabývat jejich transformační lépe rozpustné produkty alfa a beta kyselin, iso-alfa kyseliny respektive hulupony. Je zjevné, že silněji a aromatickým chmelem s významným podílem beta kyselin chmelená piva obsahují více těchto látek. V posledních letech byly podány i nové důkazy o chemismu oxidačních přeměn beta kyselin a senzorické aktivitě jejich produktů. Je velmi pravděpodobné, že hulupony se u piv chmelených aromatickým chmelem se srovnatelným obsahem alfa a beta kyselin podílejí na intenzitě a charakteru hořkosti. V této oblasti je potřebný další výzkum pro upřesnění míry moderování hořkosti piv hulupony.

PODEKOVÁNÍ

Tato studie byla vypracována v rámci projektu QI91B227 „Význam beta kyselin pro české pivo“ podpořeném Ministerstvem zemědělství České republiky.

terness has been significantly reduces in the context of hop protection against oxidation during post-harvest processing and storage of hop products in air-conditioned warehouses. A higher contribution of hulupons to the overall beer bitterness can be anticipated if aroma hops with a balanced alpha and beta acids ratio are used in wort boiling. A considerable number of proofs about the biological and pharmacological effects of hop resins and especially beta acids under „in vitro“ as well as „in vivo“ conditions has been gathered. Hop resins are, therefore, potential sources of treatment or prevention of many diseases including cancer, diabetes, osteoporosis, cardiovascular diseases, inflammatory and metabolic disorders. The effects of alpha acids transformation products are relatively well-known. The possible impact of oxidative decomposition products of beta acids still waits elucidation.

There are several ways to utilize hop bioactive compounds. The first one lies in the production of preparations with a well-defined content of particular compounds and their utilisation in the form of medication and food supplements. The second one is based on the preparation of comprehensive essences of hop secondary metabolites and their application in the form of food supplements or functional food products. Hops contain a wide spectrum of substances (bitter acids, prenylflavonoids, hop oils) with many beneficial physiological effects on various diseases. Positive properties can be substantially enhanced by synergic effects. The third way to take in the physiologically active hop compounds is moderate beer drinking. The positive effect of moderate beer drinking on human health has been proved in numerous epidemiological studies (Klatsky et al., 1997). The content of bitter acids in beer is limited by the low solubility in the medium. Thus, more soluble transformation product such as iso-alpha acids and hulupons may gain importance. Beers hopped by aroma hops with a significant ratio of beta acids contain more beta acids oxidative decomposition by-products. A lot of new information in regard to the chemistry of hop beta acids oxidative transformation and sensorial activity of the products have been acquired in the past decade. The exact role of hulupones in moderating beer bitterness requires further research.

LITERATURA / REFERENCES

- 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.
- Barney, M.C., Kot, E.J., Chicoye, E., Jilek, J.K., 1994: Oral care compositions containing hop acids and method. US Patent 5,370,863.
- Benítez, J. L., Forster, A., De Keukeleire, D., Moir, M., Sharpe, F. R., Verhagen, L. C., Wetwood, K. T., 1997: Hops and Hop Products; HansCarl-Verlag: Nuremberg, Germany.
- Biendl, M., Pinzl, C., 2007: Arzneipflanze Hopfen; Deutsches Hopfenmuseum Wolznach, Munich. ISBN 3-929749-05-X.
- Biendl, M., 2009: Hops and Health. MBAA TQ: 1–7. doi:10.1094/TQ-46-2-0416-01.
- Breen, A.W., Cronan, J.M., Davis, P.S., Mayer, M.J., Singleton, F.L. (2002: Methods of using hop acids to control organism. Patent WO 02/078450.
- Bremer, B. et al., 2003: Bot. J. Linn. Soc., 141: 399–436.
- Cattoor, K., Dresel, M., De Bock, L., Boussery, K., Van Bocxlaer, J., Remon, J., De Keukeleire, D., Deforce, D., Hofmann, T., Heyerick, A., 2013: Metabolism of Hop-Derived Bitter Acids. J. Agric. Food Chem., 61: 7916–7924.
- Cooper, A.J., Dallmier, A.W., Barnes, H.R., 2002: Composition containing hops extract and their use in water systems and process streams to control biological fouling. US Patent 6,379,720.
- Cowles, J., Goldstein, H., Chicoye, E., Ting, P., 1986: Process for separation of beta acids from extract containing alpha acids and beta acids. US Patent 4,590,296.
- Čermák, P., Palečková, V., Houška, M., Strohalm, J., Novotná, P., Mlýšková, A., Sikorová, M., 2014 : Nepublikované výsledky.
- Flythe, M.D., Aiken G.E., 2010: Effects of hops (*Humulus lupulus* L.) extract on volatile fatty acid production by rumen bacteria. Journal of Applied Microbiology. ISSN 1364-5072. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04739.
- Gerhaeuser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauft, J., Neumann, I., Scherf, H. R., Frank, N., Bartsch, H., and Becker, H., 2002: Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. Mol. Cancer Ther. 1:959–969.
- Gerhäuser, C., 2005: Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. European J. Cancer, 41: 1941–1954.
- Haas, G.J., Barsoumian, R., 1994: Antimicrobial Activity of Hop Resins. J. Food Protection, 57, No. 1: 59–61.
- Haas, G.J., Srinivasan, V., 2002: Method of killing Protozoa. US Patent 6,353,726.
- 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 quantitation of bitter-tasting beta-acids transformation products in beer. J. Agric. Food Chem., 57: 7480–7489.
- Haseleu, G., Lagemann, A., Stephan, A., Intelmann, D., Dunkel, A., Hofmann, T., 2010: Quantitative sensorial profiling of hop-derived bitter compounds throughout a full-scale beer manufacturing process. J. Agric. Food Chem., 58: 7930–7939.
- Hein, W., Pollach, G., 1997: Neue Erkenntnisse beim Einsatz von Hopfenprodukten in der Zuckerindustrie. Zucker Ind. Nr. 12: 940–949.
- Hirsch, H., Hartl, A., 1976: Process for the production of hulupones. US Patent 3,977,953.
- Hops is the medicinal plant of the year, 2007: Hopfen-Rundschau Int. 2007/2008: 26.
- Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R., Young, T.W., 1982: Malting and Brewing Science, Chapman & Hall, London, New York, ISBN 0 412 16590 2.

- Houška, M., Strohalm, J., Mikyška, A., Čermák, P., 2013: Potravinový přípravek s čerstvým chmelem a způsob jeho výroby. 304200. Praha, 13.11.2013.
- Houška, M., Strohalm, J., Mikyška, A., Čermák, P., 2012: Potravinový přípravek s čerstvým chmelem. UV č. 23420. Praha, 20. 2. 2012.
- Chadwick, L. R., Pauli, G. F., Farnsworth, N. R., 2006: The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine*, 13: 119–131.
- Chen, W.J., Lin, J.K., 2004: Mechanism of cancer chemoprevention by hop bitter acids through induction of apoptosis mediated by fas and caspase cascades. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 55–64.
- Intelmann, D., Haseleu, G., Hofmann T., 2009: LC-MS/MS Quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using ECHO Technique. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 1172–1182.
- Jaskula, B., Aerts, G., De Cooman, L., 2010: Hop alpha-acids isomerization and utilisation: an experimental review. *Cerevisia*, 35: 57–70.
- Jaskula, B., Kafarski, P., Aerts, G., De Cooman, L., 2008: A kinetic study on the isomerization of hop beta-acids. *J. Agric. Food Chem.*, 67: 44–57.
- Jones, G., Campbell, C.A.M., Pye, B.J., Maniar, S.P., Mudd, A., 1996: Relellent and oviposition-deterrent effects of hop beta-acids on the two-spotted spider mite *tetranychus urticae*. *Pestic. Sci.*, 47: 165–169.
- Klatsky, A., Armstrong, M.A., Friedman, G.D., 1997: Red wine, white wine, Liquor, Beer, and risk for coronary artery disease hospitalization. *Am. J. Cardiol.*, 80: 416–420.
- Kokubo, E., Kowaka, M., Kuroiwa, Y., 1971: New bitter substances: – lupoxes a, lupoxes b and lupdoses a. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem. Proc.*: 265–279.
- Kowaka, M., Kokubo, E., Kuroiwa, Y., 1973: New bitter substances of beer-lupdeps and lupdols. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*: 66–71.
- Kowaka, M., Kokubo, E., 1977: Composition of bitter substances of hops and characteristics of beer bitterness. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 35: 16–21.
- Krofta, K., Lišková, H., Vrabcová, S., 2012: Způsob přípravy čistých beta kyselin chmele. Patent č. 303017, Úřad průmyslového vlastnictví, Praha, 18.1.2012.
- Krofta K., Mikyška, A., 2014: Způsob přípravy hořčících látek z beta kyselin chmele. Patent č. 304283. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha, 2.1.2014.
- Krofta, K., Mikyška, A., 2013: Vital, česká hybridní odrůda chmele, část I. *Kvasny Prum.*, 59: 2–13.
- Krofta, K., Vrabcová, S., Mikyška, A., Jurková, M., 2013a: The effect of hop beta acids oxidation products on beer bitterness. *Kvasny Prum.*, 59 (10/11): 296–305.
- Krofta, K., Vrabcová, S., Mikyška, A., Jurková, M., Čajka, T., Hajšlová, T., 2013b: Stability of hop beta acids and their decomposition products during natural ageing. *Acta Horticulture No. 1010: 221–230. ISBN 978-0-6605-696-1, ISSN 0567-7572.*
- Lamy, V., Roussi, S., Chaabi, M., Goss'e, F., Schall, L., Lobstein, A., Raul, F., 2007: Chemopreventive effects of lupulone, a hop acid, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 28: 1575–1581.
- Langezaal, C. R., Chandra, A., and Scheffer, J. J. C., 1992: Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars. *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.* 14:353–356.
- Larson, A.E., Yu, R., Lee, O., Price, S., Haas, G., Johnson, E.A., 1996: Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Int. J. Food Microbiology*, 33: 195–207.
- Laws, D.R.J., 1968: Hop resins and beer flavour V. The significance of oxidized hop resins in brewing. *J. Inst. Brew.*, 74: 178–182.
- Leite, I. R., Faria, J.R., Marquez, L.D.S., Reis, M.H.M., de Resende, M.M., Ribeiro, E.J., Cardoso, V.L., 2013: Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. *Fuel Processing Technology*, 106: 611–618.
- Lerner, H., 1863: *J. Prakt. Chem.*, 90: 254.
- Medicinal plant, 2007: *Hopfen-Rundschau International* 2007/2008: 26.
- Mikyška a Krofta, 2014: Nepublikované výsledky.
- Mikyška, A., Jurková, M., Čejka, P., Krofta, K., 2012: Nové poznatky o hořkosti beta kyselin chmele. Sborník přednášek a plných textů XX. konference technologie a hodnocení výrobků nápojového průmyslu, Plzeň 14. a 15. června 2012. ISBN 978-80-7080-831-3.
- Mikyška, A., Krofta, K., 2012: Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. *J. Inst. Brew.*, 118 (3): 269–279.
- Milligan, S., Kalita, J., Pocock, V., Heyerick, A., De Cooman, L., Rong, H., De Keukeleire, D., 2002: Oestrogenic activity of the hop phytoestrogen 8-prenylnaringenin. *Reproduction*, 123: 235–242.
- Millis, J. R., Schengel, M. J., 1994: Inhibition of food pathogens by hop acids. US Patent 5,286,506.
- Mizobuchi, S., Sato, Y., 1985: Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agric. Biol. Chem.*, 49: 399–403.
- Piendl, A., and Schneider, G., 1981: Über die physiologischen Eigenschaften des Hopfens. *Brauwelt*, 121: 600–608: 724–734.
- Ohsugi, M., Basnet, P., Kadota, S., Namba, T., Ishii, E., Tamura, T., Okamura, Y., 1996: Antibacterial activity of *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. *J. Trad. Med.*, 13: 344–345.
- Peacock, V., 1998: Fundamentals of hop chemistry. *MBA Tech. Quart.*, 35: 4–8.
- Rueckle, Senn, 2006: Hop acids can efficiently replace antibiotics in ethanol production. *Int. Sugar Journal*, 108: 139–147.
- Seaton, J. C., Hutcheson, J. M., Moir, M., 1985: A practical method for enhancement of beer bitterness using beta-acids. *Proc. Eur. Brew. Congr. Helsinki, Fachverlag Hans Carl: Nürnberg*: 603–610.
- Schiller, H., Forster, A., Vonhoff, C., Hegger, M., Biller, A., Winterhoff, H., 2006: Sedating effects of *Humulus lupulus* L. extracts. *Phytomedicine*, 13: 535–541.
- Schmalreck, A. F., Teuber, M., Reininger, W., Hartl, A., 1975: Structural features determining the antibiotic potencies of natural and synthetic hop bitter resins, their precursors and derivatives. *Can. J. Microbiol.*, 21: 205–212.
- Siegel, L., Mitternig-Grosse, A., Griffon, Ch., Klein-Soyer, C., Lobstein, A., Raul, F., Stephan, D., 2008: Antiangiogenic Properties of Lupulone, a Bitter Acid of Hop Cones. *Anticancer Research*, 28: 289–294.
- Simpson, W. J., Smith, A. R. W., 1992: Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *J. Appl. Bacteriology*, 72: 327–334.
- Siragusa, G. R., Haas, G. J., Matthews, P. D., Smith, R. J., Buhr, R. J., Dale, N. M., Wise, M. G., 2008: Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract jejunum and caecum. *J. of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 853–858.
- Spetsig, L. O., 1955: Electrolytic constants and solubilities of humulinic acid, humulone and lupulone. *Acta Chem. Scand.*, 9: 1421–1424.
- Spetsig, L. O., Steninger, M., 1960: Hulupones, a new group of hop bitter substances. *J. Inst. Brew.*, 413–417.
- Stevens, J. F., Page, J. E., 2004: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health? *Phytochemistry*, 65: 1317–1330.
- Stevens, R., Wright, D., 1961: Evaluation of hops X. Hulupones and the significance of beta acids in brewing. *J. Inst. Brew.*, 67: 496–501.
- Strohalm, J., Čermák, P., Novotná, P., Houška, M., Mikyška, A.: Potravinový přípravek na bázi čokolády s čerstvým chmelem. UV č.25580. Praha, 24.6.2013.
- Taniguchi, Y., Matsukura, Y., Ozaki, H., Nishimura, K., Shindo, K., 2013: Identification and Quantification of the Oxidation Products Derived from α -Acids and β -Acids During Storage of Hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 61: 3121–3130.
- Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., Heyerick, A., 2009: Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *J. Nat. Prod.*, 72: 1220–1230.
- Verzele, M., De Keukeleire, D., 1991: Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids, Elsevier, ISBN 0 444 88165 4.
- Verzele, M., Govaert, F., 1949). *Bull. Soc. Chim. Belges*, 58: 432.
- Whitear, A. L., 1966: Changes in resin composition and brewing behaviour of hops during storage. *J. Inst. Brew.*, 72: 177–183.
- Wilson, R., Smith, R., Haas, G., 2003: Improved application for hop acids as anti-microbial agents. Patent WO 03/097079.
- Hopsteiner [online]. <http://www.Hopsteiner.com> [cit. 2014-03-10].
- Yamaguchi, N., Satoh-Yamaguchi, K., Ono, M., 2009: In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. *Phytomedicine*, 16: 369–376.
- Zanolli, P., Zavatti, M., Rivasi, M., Brusiani, F., Losi, G., Puia, G., Avallone, R., Baraldi, M., 2007: Evidence that the beta-acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 87–92.