

**Metody pro ověřování autenticity odrůd chmele – účinný nástroj proti falzifikaci***Methods for verifying the authenticity of hops – an effective tool against falsification*Jana OLŠOVSKÁ<sup>1</sup>, Karel KROFTA<sup>2</sup>, Vladimíra JANDOVSKÁ<sup>1,3</sup>, Josef PATZAK<sup>2</sup>, Karel ŠTĚRBA<sup>1</sup><sup>1</sup>Výzkumný 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*<sup>2</sup>Chmelařský institut, s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec / *Hop Research Institute, Kadaňská 2525, 438 46 Žatec*<sup>3</sup>Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2 / *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, CZ 128 43 Prague 2*

e-mail: olsovska@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed Paper***Olšovská, J., Krofta, K., Jandovská, V., Patzak, J., Štěrba, K., 2016: Metody pro ověřování autenticity chmele – účinný nástroj proti falzifikaci.** Kvasny Prum. 62, č. 10, s. 294–305

K pokusům o falzifikaci dochází téměř u všech komodit a výjimkou není ani chmel. Je proto nezbytné hledat způsoby, jak ověřovat jeho autenticitu. Přehledový článek shrnuje moderní metody pro ověřování autenticity chmele a uvádí rovněž nejnovější výsledky spolupráce Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. a Chmelařského institutu, s.r.o., v Žatci. K ověřování autenticity chmele se používají metody chemotaxonomické a genetické. V roce 2015 byly provedeny chemické analýzy novošlechtěných hybridů pro České pivo (obsah a složení alfa a beta kyselin, obsah a složení chmelových silic, obsah celkových polyfenolů) a byly provedeny molekulárně-genetické analýzy 150 vybraných genotypů chmele ze světového sortimentu a šlechtitelského materiálu. Pomocí výsledků byl z testovaných genotypů sestaven přehledný dendrogram. Autoři se dále zabývali profilováním českých odrůd chmele na základě chemických profilů proanthokyanidinů a podařilo se jim pomocí klastrové analýzy jasně odlišit odrůdy chmele včetně jejich genetické příbuznosti.

**Olšovská, J., Krofta, K., Jandovská, V., Patzak, J., Štěrba, K., 2016: Methods for verifying the authenticity of hops – an effective tool against falsification.** Kvasny Prum. 62, No. 10, pp. 294–305

Falsification attempts occur in almost all commodities and hops is no exception. It is therefore necessary to look for ways to verify its authenticity. This review summarizes modern methods for verifying the authenticity of hops and also provides the latest results of the collaboration of the Research Institute of Brewing and Malting, PLC. and the Hop Research Institute, Ltd., in Žatec. Chemotaxonomic and genetic methods are used to verify the authenticity of hops. Chemical analyzes of newly bred hybrids potentially suitable for Czech beer focused on the content and composition of alpha and beta acids, content and composition of hop oils, and content of total polyphenols were performed and molecular genetic analyses of 150 selected hop genotypes including a world-wide range and breeding material were conducted in 2015. These data were used to construct a comprehensive dendrogram from the tested genotypes. The authors also examined the profiling of Czech hop varieties based on the chemical profiles of proanthocyanidins, and succeeded in using cluster analysis to clearly distinguish the varieties of hops including their genetic relatedness.

**Olšovská, J., Krofta, K., Jandovská, V., Patzak, J., Štěrba, K., 2016: Die Methoden zur Prüfung der Hopfenauthentizität – ein wirksames Instrument gegen die Falsifikation.** Kvasny Prum. 62, Nr. 10, pp. 294–305

Bei fast allen Kommoditäten werden die Fälschungsversuche durchgeführt und der Hopfen dabei macht auch keine Ausnahme, Dadurch ist es notwendig, die Methoden zur Prüfung der Hopfenauthentizität zu entwickeln oder zu finden. Der Übersichtsartikel fasst die moderne Methoden zur Prüfung der Hopfenauthentizität zusammen und führt die neueste Ergebnisse aus der Zusammenarbeit des Forschungsinstitutes für Brau- und Malzwesen AG mit dem Hopfeninstitute GmbH in Žatec (Saaz) bei. Zur Prüfung der Hopfenauthentizität werden die chemotaxonomische und genetische Methoden angewandt. Im Jahre 2015 wurden die chemische Analysen von neugeschlechteten Hybriden für České pivo (Tschechisches Bier) (Gehalt und Zusammensetzung an Alpha- und Betasäuren, Gehalt und Zusammensetzung an Hopfensilizen, Gehalt an gesamten Polyphenole) und molekular-genetische Analyse von 150 ausgesuchten Hopfengenotypen aus dem Weltsortiment und Veredlungsmaterial durchgeführt. Aus den getesteten Genotypen wurde mittels Ergebnissen ein übersichtliches Dendrogramm zusammengefasst. Weiter haben die Verfasser auf der Basis der chemischen Profile von Proanthocyanidine die Profilierung der tschechischen Hopfensorten festgestellt und es gelang ihnen durch Clusteranalyse der Verwendung deutlich die einschließlich ihrer genetischen Verwandtschaft Hopfensorten zu unterscheiden.

**Klíčová slova:** chmel, autenticita, odrůda, pryskyřice, silice, polyfenoly, DNA markery**Keywords:** hop, authenticity, resins, hop oils, polyphenols, DNA markers**1 ÚVOD**

Autenticita potravin je termín, který jednoduše označuje, zda potraviny nakupované spotřebitelem odpovídají jejich popisu, a je aktuálním tématem v nejrůznějších potravinářských komoditách. Proto je v současné době věnováno mnoho pozornosti a jsou vynakládány nemalé finanční prostředky na vývoj analytických metod pro ověřování autenticity potravin, nápojů a jejich surovin.

Také chmel je komodita, ve které dochází k falzifikaci původu a odrůd, což může ve velké míře ovlivnit senzorický profil piva z něho vyrobeného. Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ) je na trhu všeobecně považován za světový standard kvality v kategorii aromatických chmelů. Prvotřídní kvalitě odpovídá i vyšší cena. V uplynulých letech bylo zaznamenáno několik opakovaných případů jeho falzifikace. Falzifikace Žateckého poloraného červeňáku ve formě granulí byla

**1 INTRODUCTION**

The authenticity of foods is a term that simply indicates whether the foods purchased by consumers match their description, and is a hot topic in various food commodities. Therefore, much attention is currently paid and considerable funds are spent on the development of analytical methods for verifying the authenticity of food, beverages and their ingredients.

Also hops is a commodity that is experiencing falsification of origin, which can largely affect the sensory profile of the produced beer. In the market, Saaz hops variety is widely regarded as the world standard in the category of quality aromatic hops. Its first class naturally corresponds to a higher price. Some cases of repeated falsification have been recorded in recent years. Falsification of Saaz hops in granular form was demonstrated based on the results of chemical

prokázána na základě výsledků chemických a genetických analýz suroviny. V případě chemických rozborů se jednalo o analýzy chmelových pryskyřic, silic a prenylovaných flavonoidů. Přítomnost či absence některých látek, jejich obsahy a vzájemné poměry jsou odrůdově specifické. Velmi citlivé na přítomnost příměsí je složení chmelových silic. V případě Žateckého poloraného červeňáku je spolehlivým markerem autenticity  $\beta$ -farnesen, jehož obsah v silicích se pohybuje kolem 15%. Ve falzifikovaných chmelech byl jeho obsah pouze 5%. Přítomny byly naopak jiné látky, které se v silicích ŽPČ běžně nevyskytují. V jednom případě nebyl  $\beta$ -farnesen vůbec nalezen, což jednoznačně dokazuje, že zákazníkovi byla v tomto případě podvržena zcela jiná odrůda nebo směs odrůd.

Ověřování odrůdové čistoty chmele se v ČR provádí pod státním dozorem (ÚKZÚZ, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský) v průběhu celého výrobního cyklu počínaje přípravou sadbového materiálu, kontrolou vysazených porostů a konče zpracováním sklizeného chmele na výrobky. Spolehlivost identifikace chmelových odrůd obecně závisí na stáří vzorků a na způsobu zpracování. Jak pro chemotaxonomické, tak pro genetické analýzy obecně platí, že stárnutím vzorků se míra průkaznosti snižuje. Modelové pokusy ukázaly, že přítomnost příměsí cizí odrůdy je prokazatelná přibližně od 10% hm. V případě chmelových extraktů jsou genetické metody nepoužitelné, protože procesní podmínky DNA destruuji nebo odstraňují (Krofta a Patzak, 2011). Z toho jasně vyplývá, že mají své nezastrupitelné místo jak metody genetické, tak i chemotaxonomické. Je vhodné oba postupy kombinovat, pokud to okolnosti, např. množství vzorku, umožňují.

Tento přehledový článek shrnuje moderní metody pro ověřování autenticity chmele a kromě přehledu zahraničních a domácích prací uvádí nejnovější výsledky spolupráce Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s., a Chmelařského institutu, s.r.o., v Žatci.

## 2 CHEMOTAXONOMICKÉ METODY

Chemotaxonomické metody jsou založeny na chemické analýze vybrané látky nebo skupiny látek, jejich koncentraci a jejich vzájemném poměru. V odborné literatuře se lze setkat s termíny jako profilování či „otisk prstu – *fingerpint*“. Může se jednat jak o analýzy cílené, kde se vyhodnocují koncentrace a poměry látek známých (profilování), nebo metody necílené, kde se pomocí speciálních statistických softwarů vyhodnocují získané výstupy – otisky prstu. Analýzu lze dále klasifikovat podle typu analyzovaných látek (v případě chmelu silice, pryskyřice, polyfenolové látky) a podle typu použité instrumentace. Dosud vyvinuté a publikované metody využívají profilování jedné ze tří (nebo kombinací) skupin sekundárních metabolitů chmele, tedy chmelových pryskyřic, silic a polyfenolových látek. Následující text zahrnuje historický vývoj metod od základních skupinových používaných rutinně pro stanovení kvalitativních parametrů chmele až po ty nejméně instrumentálně náročné metody používané v současnosti k ověřování autenticity chmele.

### 2.1 Chmelové pryskyřice (hořké kyseliny)

Analytické metody stanovení chmelových pryskyřic, zejména alfa-hořkých kyselin, se vyvíjely souběžně s pokrokem ve výzkumu jejich složení. Gravimetrické a titrační metody používané do 50.–70. let minulého století nahradily a doplnily metody spektrofotometrické, chromatografické, popř. elektroforetické. Jejich zavádění bylo umožněno rychlým vývojem v oblasti instrumentální techniky, zejména kapalinové chromatografie (HPLC). Nové postupy v analýze chmelových pryskyřic si vynutil i vývoj nových chmelových výrobků jako například chmelových extraktů, pre-isomerovaných produktů aj. Analytické postupy stanovení jednotlivých frakcí a složek chmelových pryskyřic lze obecně rozdělit na skupinové a specifické. Chemická struktura cílových analytů poskytuje fyzikální základ řadě analytických metod. Například dvojná vazba v pěti- či šestičlenném cyklickém jádru způsobují silnou absorpci ultrafialového záření. Přímé spektrofotometrické stanovení alfa- a beta-hořkých kyselin se provádí na základě měření absorpce toluenového extraktu chmele v prostředí alkalického methanolu při vlnových délkách 275, 325 a 355 nm (Analytica ASBC, 1992).

Gravimetrická Wöllmerova metoda je typickou skupinovou metodou (Wöllmer, 1925). Umožňuje stanovit ve chmelu veškeré, měkké a tvrdé pryskyřice, dále obsah alfa-hořkých kyselin a beta frakce. Metoda prošla během let několika modifikacemi, z nichž dosud poslední (Ganzlin, 1975) je součástí platných metodik (Analytica EBC, 1998). Nejvýznamnější úpravou je nahrazení gravimetrického stanovení alfa-hořkých kyselin konduktometrickou titrací roztokem octa-

and genetic analyzes of raw materials. The chemical analysis included the analysis of hop resins, oils and prenylated flavonoids. The presence or absence of certain substances, their contents and proportions are variety specific. The composition of hop oils is very sensitive to the presence of impurities. A reliable marker of Saaz hops authenticity is  $\beta$ -farnesene, whose content in essential oils is around 15% whereas in falsified hops it was a mere 5%. On the other hand, the falsified hops contained compounds that are not normally seen in Saaz essential oils. In one case, no  $\beta$ -farnesene was found, which clearly proved that the customer received a completely different variety or blend of varieties.

Verification of purity of hops in the Czech Republic is conducted under state supervision (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture) during the entire production cycle, from the preparation of planting material, control of planted hop yards up to the processing of harvested hop products. Reliability of the identification of hop varieties generally depends on the age of the samples and on the method of processing. With both chemotaxonomic and genetic analysis the aging of the samples in general reduces the reliability of analysis. Model experiments have shown that the presence of foreign varieties is demonstrable from about 10% wt. Genetic methods are unusable in the case of hop extracts because the processing conditions destroy or remove DNA (Krofta and Patzak, 2011). This clearly shows that both genetic and chemotaxonomic methods are indispensable. It is advisable to combine both procedures if circumstances, e.g. sample quantities, allow.

This review summarizes modern methods used for verifying the authenticity of hops, provides a review of foreign studies and presents the latest results of the collaboration of the Research Institute of Brewing and Malting, PLC. and the Hop Research Institute, Ltd., in Zatec.

## 2 CHEMOTAXONOMIC METHODS

Chemotaxonomic methods are based on the chemical analysis of certain substances or groups of substances, their concentration and their ratio. In the literature one may encounter terms such as profiling or “fingerprint.” This may concern targeted analyses, in which concentrations and ratios of known substances are evaluated (profiling) or untargeted methods in which the outputs – fingerprints are evaluated by means of special statistical software. Analysis can be further classified according to the type of analytes (hop essential oils, resins, polyphenolic compounds) and by the type of instrumentation. Hitherto developed and published profiling methods utilize one of three (or a combination of) groups of secondary metabolites of hop, namely hop resins, oils and polyphenols. The following text includes the historical development of the methods, from basic group-wide ones routinely used to determine the quality parameters of hops to the most demanding modern instrumental methods currently used to verify the authenticity of hops.

### 2.1 Hop resins (bitter acids)

Analytical methods for the determination of hop resins, particularly alpha acids, were developed in parallel with the progress in the research of their composition. Gravimetric and titration methods used in 50s-70s of the last century have been replaced and complemented by spectrophotometric, chromatographic and electrophoretic methods. Their implementation was derived from rapid developments in instrumental techniques, in particular liquid chromatography (HPLC). New methods in analysis of hop resins have been necessitated by the development of new hop products such as hop extracts, pre-isomerized products and others. Analytical procedures for determining individual fractions and components of hop resins can be broadly divided into group-wide and specific. The chemical structure of the target analytes provides the physical basis for a number of analytical methods. For example, double bonds in a five- or six-membered cyclic nucleus cause strong absorption of ultraviolet radiation. Direct spectrophotometric determination of alpha- and beta-bitter acids is carried out by measuring the absorbance of toluene extract of hops in an alkaline methanol at the wavelengths of 275, 325 and 355 nm (Analytica ASBC, 1992).

Gravimetric Wöllmer's method is a typical group-wide method (Wöllmer, 1925). It allows one to specify all the hop soft and hard resins, as well as the content of alpha acids and the beta fraction. Over the years the method underwent a number of modifications the last of which (Ganzlin, 1975) is part of the current methodologies (Analytica EBC, 1998). The most significant modification is

nu olovnatého. Alfa kyseliny vytváří se solemi  $Pb^{2+}$  nerozpustnou sraženinu sytě žlutého zabarvení. Výsledek titračního stanovení je označován jako konduktometrická hodnota chmele a vyjadřuje se v hmotnostních procentech. Přestože princip stanovení je poměrně jednoduchý, celý analytický postup obsahuje několik důležitých operací, které významně ovlivňují výsledek analýzy. V první řadě je to extrakce alfa-hořkých kyselin z chmele vhodným rozpouštědlem (methanol, diethylether, toluen, isopropylalkohol, dichlormethan aj.) za mechanického míchání. Rozpouštědla se dávají samostatně nebo v kombinaci s vodnými roztoky kyselin nebo pufrů (Anderegg, 1994). Dalším úskalím titračních metod je selektivita srážecí reakce. Olovnatými ionty se sráží nejen alfa-hořké kyseliny, ale i některé minoritní složky chmelových pryskyřic. Hlavním motivem pro existenci různých titračních metod jsou pokusy najít optimální kompromis mezi kvantitativní extrakcí alfa kyselin na jedné straně a omezením extrakce balastních látek na straně druhé. Přes zatížení řadou systematických chyb jsou titrační metody pro svou jednoduchost a rychlost v praxi velmi rozšířené (Analytica EBC, 1998; Analytica ASBC, 1992). Je však nutné mít na paměti, že každá metoda poskytuje jiný výsledek a vzájemné „přepočítávací“ koeficienty neexistují.

Obsah kohumulonu ve chmelu, resp. jeho podíl v celkovém obsahu alfa-hořkých kyselin byl prvním používaným parametrem pro odlišení odrůd chmele. Nickerson a Williams v roce 1986 zjistili, že odrůdová specifita může být navíc ovlivněna meziročně v závislosti na klimatu a v neposlední řadě místem původu. Aby bylo možné charakterizovat odrůdu s vyšší přesností, navrhli přidat další chemické charakteristiky, což je podstata chemického profilování (Nickerson et al., 1986).

Krofta v roce 2003 publikoval studii, kde srovnával chemické profily vybraných českých a zahraničních chmelů, zahrnující vysoko obsažené hořké odrůdy, jemné aromatické odrůdy a odrůdy hybridní. Kromě profilů silic, porovnával obsahy alfa kyselin, beta kyselin a podíl kohumulonu (Krofta, 2003). Autor zjistil a zdokumentoval charakteristické rozsahy koncentrací charakteristických látek studovaných chmelových odrůd. Z výsledků dále vyplývá, že rozlišení zahraničních odrůd chmele za použití pouze určení spektra silic není dostačující, přestože tradiční středoevropské jemné aromatické odrůdy chmele mají charakteristický obsah několika silic. Podobně lze interpretovat výsledky autorů Štěrba et al. z roku 2015, kde autoři v 3D projekci rozlišili 4 české odrůdy chmele (Agnus, Premiant, ŽPČ and Sládek) právě na základě obsahu alfa kyselin, beta kyselin a linalolu (Štěrba et al., 2015).

Autoři Jelínek et al. v roce 2010 studovali odlišnosti v chemickém složení sekundárních metabolitů (alfa-hořké kyseliny, beta-hořké kyseliny, silice, polyfenoly) u sedmi českých odrůd chmele (Agnus, Bor, Harmonie, Premiant, Rubín, Sládek, ŽPČ). Ze získaných dat vytvořili dichotomický klíč k určení české odrůdy chmele na základě chemické analýzy (Jelínek et al., 2010). Tento klíč byl později rozšířen i o další odrůdy a ještě dále zpřesněn (Jelínek et al., 2011). Při tvorbě klíče je nutné brát v úvahu i fakt, že obsahy těchto sekundárních metabolitů nejsou závislé jen odrůdově, ale jejich obsah ovlivňuje i pěstební lokalita, stáří rostliny a její infekce viry (Jelínek et al., 2012).

Všechny výše uvedené studie, korelující obsah alfa- a beta-hořkých kyselin s odrůdovou specifikou, byly provedeny pomocí dnes již rutinní HPLC metody. V roce 2012 byla publikována studie, kde autoři pro metabolomické profilování a rozlišení 13 odrůd chmele použili soubor instrumentálně náročných metod, a to LC-MS, FTMS (hmotnostní detekce s Fourierovou transformací), ESI-FTICR-MS (elektrospray ionisation Fourier transform ion cyclotron resonance) a NMR (Frag et al., 2012), pomocí kterých se jim kromě získání jasně odlišných chemických profilů podařilo identifikovat 18 hořkých kyselin. Navíc se ukázalo, že metoda FTMS není pro tyto účely vhodná, neboť se nepodařilo rozdělit izomerní sloučeniny humulon a adhumulon. V roce 2014 stejný autor vydal studii, ve které pomocí 2D NMR spektroskopie charakterizoval 13 odrůd chmele (Frag, 2014). I když je NMR instrumentace náročná a stále ještě ne úplně běžná v provozních laboratořích, vlastní příprava vzorku a optimalizace metody je ve srovnání s HPLC rychlá a jednoduchá, výsledky jsou dobře reprodukovatelné.

## 2.2 Chmelové silice

Analýza chmelových silic představuje dvě na sebe navazující operace. Prvním krokem je izolace silic z chmele či chmelového preparátu, po které následuje vlastní analýza složení silic. Zatímco k analýze silic se používá výhradně plynová chromatografie v různém instrumentálním provedení, k izolaci silic z chmelové matrice existuje několik principiálně odlišných postupů.

the replacement of the gravimetric determination of alpha acids by conductometric titration with lead acetate. Alpha acid forms with  $Pb^{2+}$  salts an insoluble precipitate with bright yellow coloration. The titration assay is referred to as the conductometric value of hops and is expressed in weight percent. Although the principle of the determination is relatively simple, the whole analytical process includes several important operations which significantly affect the outcome of the analysis. Firstly, it is the extraction of alpha acids from hops with a suitable solvent (methanol, diethyl ether, toluene, isopropyl alcohol, dichloromethane, etc.) under mechanical stirring. The solvents are dosed alone or in combination with aqueous solutions of acids or buffers (Anderegg, 1994). Another pitfall of titration methods is the selectivity of the precipitation reaction. Lead ions are precipitated not only by alpha-bitter acid, but also by some minor components of the hop resins. The main reason for the existence of different titration methods are attempts to find the optimum balance between achieving quantitative extraction of alpha acids on the one hand and limiting the extraction of ballast substances on the other. Despite the range of systematic errors titration methods are widespread in practice for their simplicity and speed (Analytica EBC, 1998; Analytica ASBC, 1992). However, it is important to remember that each method provides a different result and reciprocal “conversion factors” do not exist.

Cohumulone content in hops or its share of the total content of alpha acids was first used as the parameter for distinguishing varieties of hops. Nickerson et al. in 1986 found that varietal specificity can be affected differently in different years depending on the climate and the place of origin. In order to characterize a variety with higher accuracy, they suggested to add other chemical characteristics, which is the essence of the chemical profiling (Nickerson et al., 1986).

In 2003 Krofta published a study which compared the chemical profiles of selected Czech and foreign hops, comprising high-content bitter varieties, fine aroma varieties and hybrid varieties. Besides profiles of oils he compared the contents of alpha acids, beta acids and cohumulone (Krofta, 2003). The study discovered and documented distinctive concentration ranges of characteristic substances in hop varieties under study. The results further showed that the resolution of foreign varieties of hops using only a specified range of essential oils is not sufficient, even though traditional Central European fine aroma hop varieties have a characteristic content of several essential oils. Similar conclusion can be made from the data of Štěrba et al. from 2015, who distinguished 4 Czech hop varieties (Agnus, Premiant, Saaz and Sládek) in a 3D projection based on the content of alpha acids, beta acids and linalool (Štěrba et al., 2015).

Jelínek et al. studied differences in the chemical composition of secondary metabolites (alpha-bitter acids, beta-bitter acids, essential oils, polyphenols) in seven Czech hop varieties (Agnus, Bor, Harmony, Premiant, Rubín, Sládek and Saaz) in 2010. They used the collected data to create a dichotomous key to identify the Czech hop varieties based on chemical analysis (Jelínek et al., 2010). The key was later extended by addition of other varieties and further refined (Jelínek et al., 2011). When creating a key, it is necessary to take into account the fact that the contents of these secondary metabolites are dependent not only on the variety but the content is also affected by the growing location, age of the plant and its infection with viruses (Jelínek et al., 2012).

All the above studies correlating the contents of alpha- and beta-bitter acids with varietal specificity were performed using the currently routine HPLC method. In 2012 Frag et al. used a set of instrumentally challenging methods such as LC-MS, FTMS (Fourier transform mass detection), ESI-FTICR-MS (electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance) and NMR for metabolomic profiling and resolution of 13 varieties of hops (Frag et al. 2012). In addition to clearly different chemical profiles, they identified 18 bitter acids. Additionally it was shown that the FTMS method is not suitable for these purposes since it failed to separate the isomeric compounds humulone and adhumulone. In 2014, the same author published a study in which they characterized 13 varieties of hops using 2D NMR spectroscopy (Frag et al., 2014). Although the NMR instrumentation is cost-intensive and is still not completely routine in operational laboratories, sample preparation and method optimization is fast and simple compared with the HPLC and the results are highly reproducible.

## 2.2 Essential oils

Analysis of the hop oils involves two successive operations. The first step is the isolation of essential oils from hops or hop preparation, followed by analysis of the composition of essential oils. While



Nejstarší a stále rozšířenou izolační metodou je destilační postup, při kterém jsou složky silice uvolňovány z matrice destilací s vodní párou. Celý postup se provádí na speciální destilační aparatuře zpravidla za atmosférického tlaku, ale jsou popsány i postupy, kterými je izolace provedena za sníženého tlaku. Destilační metoda je časově náročná a k dosažení spolehlivých výsledků vyžaduje poměrně velké množství chmele (min. 50 g). Uvádí se, že destilace za atmosférického tlaku vede k degradativním změnám aroma, takže aroma výsledné silice neodpovídá vůni původního chmele (Rettberg et al., 2012). Extrakční postupy používají k izolaci silic organická rozpouštědla jako je například hexan, ethanol, trichlorethylen nebo methylenchlorid (Laws, 1981). Při odpařování rozpouštědla však dochází ke ztrátám nejtěkavějších složek, což vede ke změnám charakteru aroma získané silice (Pickett, 1975). Další nevýhodou těchto extraktů je možná přítomnost reziduálních zbytků rozpouštědla.

Principiálně odlišný přístup k analýze chmelových silic je založen na přímém vzorkování plynné fáze nad pevným vzorkem v uzavřené vzorkovnici. Tyto postupy jsou často označovány jako „head space“ metody. Existují v statickém nebo dynamickém uspořádání. Ve statickém provedení je vzorek plynné fáze, po inkubaci vzorku při zvýšené teplotě, dávkován přímo na analytickou kolonu plynové chromatografu (Freundorfer, 1991). Dynamický postup založený na termické desorpci (DTD-Direct Thermal Desorption) použili k analýze chmelových silic Eri et al. (2000). Při aplikaci této metody jsou složky chmelových silic termicky uvolňovány z matrice v desorpční komoře a proudem inertního plynu nanášeny na analytickou kolonu.

Jinou technikou separace těkavých látek z plynné, kapalné i pevné fáze je mikroextrakce na tuhou fázi (SPME, solid-phase microextraction) (Arthur et al., 1992). Metoda, která nepoužívá žádná rozpouštědla, je založena na sorpci analytů na povrchu křemenného vlákna pokrytého aktivní vrstvou sorbentu nebo polymeru. Vlákno může být ponořeno do kapaliny nebo v provedení „head space“ exponováno v plynné fázi nad kapalným nebo pevným vzorkem. Metoda HS-SPME byla s úspěchem použita i pro izolaci chmelových silic (Field et al., 1996; Krofta a Čepička, 2000; Kovačević a Kač, 2001). Nejpoužívanější jsou vlákna na bázi polydimethylsiloxanu (PDMS 100 µm, PDMS/DVB 65 µm). Největší výhodou „head space“ metod je malé množství vzorku potřebné k izolaci, tj. méně než 1 gram. V případě HS-SPME provedení postačuje jedna hlávka chmele, dokonce i zeleného čerstvě utrženého na chmelnici. Tímto způsobem lze rychle a snadno zjistit případnou příměs cizí odrůdy v porostu chmele. Další velkou výhodou jsou nízké teploty při extrakci (40–50 °C po dobu 30–60 minut), které minimalizují sekundární změny ve složení silic.

Konečně v roce 2015 byla kolektivem autorů vyvinuta a publikována metoda založená na principu extrakce na fluidním loži (Štěrbá et al., 2015). K extrakci je zapotřebí pouze 2 g mletého chmele, extrakce probíhá ve čtyřech šestiminutových cyklech do ethanolu. Protože jsou silice extrahovány parami ethanolu, nejsou vystaveny vysoké teplotě, pouze 78 °C, což je šetrný způsob z hlediska jejich možné degradace.

Zásadní pokrok v analýze chmelových silic přineslo v 50. letech minulého století zavedení plynové chromatografie (GC) a posléze i kapilárních kolon. Teprve jejich použití poprvé odhalilo, jak složitou směsí různých látek chmelové silice jsou. Buttery a Ling (1967) tak na 50 m kovové kapilární koloně rozdělili silice několika odrůd na téměř 100 složek. Šíře poznatků o složení chmelových silic narůstala souběžně s pokrokem v analytické instrumentaci, a to nejen v oblasti separačních kolon, ale také v oblasti detektorů. Rutinní analýza složení chmelových silic se provádí jednorozměrnou plynovou chromatografií ve spojení s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID) nebo hmotnostním detektorem (GC-MS). Spojení plynového chromatografu s hmotnostním detektorem se pro další vývoj v této oblasti ukázalo jako klíčové, protože MS detektory jsou nejen dostatečně citlivé, ale hmotnostní spektra poskytují užitečné informace o možné struktuře látek a jejich molekulové hmotnosti. Problém rutinních analýz spočívá v omezené separační schopnosti analytických kolon. Teoretická separační kapacita 50 m GC kolony je omezena na cca 250 piků (Bartle, 2002).

Roberts a Lewis (2000) s využitím GC/MS/TOF identifikovali 440 látek. Při analýze chmelových silic dochází proto k četným koelucím. Navíc eluční pásy nejsou na chromatogramu distribuovány rovnoměrně. To vede k tomu, že identifikace neznámých, senzorycky aktivních minoritních složek chmelových silic, koeluujičích s většími piky, je velmi obtížná. Řešením je aplikace vícerozměrné plynové chromatografie, která používá k separaci dvě kolony s odlišnou polaritou stacionární fáze. Separací kapacita plynové chromatografie v dvourozměrném uspořádání (GC x GC) je podstatně vyšší, než separace na jedné koloně. V kombinaci s hmotnostním detekto-

the analysis of the essential oils uses solely gas chromatography in different instrumental modes, several principally different methods are used for the isolation of essential oils from hops matrix.

The oldest and still widely employed isolation method is distillation in which the components of oils are released from the matrix by steam distillation. The entire procedure is performed on a special distillation apparatus usually at atmospheric pressure, but procedures are also described by which the isolation is carried out under reduced pressure. The distillation method is time consuming, and a relatively large amount of hops (min. 50 g) is needed to achieve reliable results. Distillation under atmospheric pressure has been reported to lead to degradative changes in aroma so that the resultant oil aroma does not match the aroma of the original hops (Rettberg et al., 2012). Extraction procedures use organic solvents such as hexane, ethanol, methylene chloride or trichlorethylene (Laws, 1981) for the isolation of essential oils. Solvent evaporation, however, causes losses of the most volatile components, which leads to changes in the character of the resulting oil (Pickett, 1975). Another drawback of these extracts is the possible presence of residual solvent.

A fundamentally different approach to the analysis of hop oils is based on the direct sampling of the gas phase above the fixed sample in a sealed sampling vessel. These procedures are often referred to as the “head space” methods. They exist in a static or dynamic configuration. In a static configuration, the sample of the gaseous phase obtained after incubating the sample at an elevated temperature, is dosed directly onto the analytical column of a gas chromatograph (Freundorfer, 1991). To analyze hop oils, Eri et al. (2000) used the dynamic process based on thermal desorption (DTD-Direct Thermal Desorption). When applying this method, the components of the hop oils are thermally released from the matrix in a desorption chamber and a stream of inert gas is used to transport them onto the analytical column.

Another technique for separation of volatile compounds from gaseous, liquid and solid phase is a solid phase microextraction (SPME, Solid-Phase Microextraction) (Arthur et al., 1992). The method, which uses no solvent, is based on the sorption of analytes on the surface of a quartz fiber coated with an active layer of sorbent or polymer. The fiber can be immersed in the liquid or in the “headspace” exposed in the gas phase above the liquid or solid sample. HS-SPME method was successfully used for the isolation of hop oils (Field et al., 1996; Krofta and Čepička, 2000; Kovačević and Kač, 2001). The most widely used fibers are based on polydimethylsiloxane (PDMS 100 µm, PDMS/DVB 65 µm). The biggest advantage of the “headspace” method is the small amount of sample needed for isolation, i.e. less than 1 gram. Sufficient for satisfactory HS-SPME performance is a single hops cone, even a green cone freshly taken from the hops plant. This technique allows one to detect quickly and easily any extraneous admixtures in hops crop varieties. Another great advantage is the low temperature in the extraction (40–50 °C for 30–60 minutes) which minimizes secondary changes in the composition of essential oils.

In 2015, a team of authors developed and published a method based on the principle of fluidized bed extraction (Štěrbá et al., 2015). The extraction requires a mere 2 g of ground hops and the extraction into ethanol takes place in four six-minute cycles. Because the oils are extracted by ethanol vapour, they are not exposed to a high temperature, only to 78 °C, which is a gentle method in view of their easy degradation.

Major progress in the analysis of hop oils was brought about in the 50's of the last century, by the introduction of gas chromatography (GC) and then the capillary columns. Their use revealed for the first time the complexity of hop oils as the mixtures of different substances. Buttery and Ling (1967) used a 50 m metal capillary column to separate several varieties of oils into nearly 100 components. The extent of knowledge about the composition of the hop oils grew in parallel with advances in analytical instrumentation that concerned both separation columns and detectors. Routine analysis of the composition of the hop oils is carried out by one-dimensional gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID) or mass detector (GC-MS). The joining of gas chromatograph with a mass spectrometer was crucial for further development in this area because MS detectors are not only sufficiently sensitive, but the mass spectra provide useful information on the structure of substances and their molecular weight. The problem of routine analysis is the limited separation capability of analytical columns. Theoretical separation capacity of 50 m GC column is limited to ca. 250 peaks (Bartle, 2002).

Roberts and Lewis (2000) identified 440 substances using GC/MS/TOF. This may reflect numerous coelutions that take place when

rem typu TOF (time of flight), který charakterizuje látky na základě přesných molekulových hmotností, vzniká velmi účinný identifikační nástroj neznámých složek chmelových silic (Roberts et al., 2004). Vícerozměrné techniky se používají většinou pro výzkumné účely, protože jejich potenciál objevit nové sensoricky aktivní látky je obrovský.

Silice se jako markery odrůdové specifity začaly uplatňovat v chemotaxonomických studiích v druhé polovině 20. století a byla publikována řada prací věnovaných diferenciaci chmelových odrůd. V těchto pracích se kromě odrůdové specifity často objevuje také vliv pěstební regionu, tedy složení půdy a klimatu. V roce 1984 byla publikována velice obsažná práce, ve které autoři pomocí destilace s vodní párou a GC-MS analyzovali 148 chmelových odrůd ze Severní Ameriky a Evropy. Na kapilární GC koloně rozlišili 117 pík odpovídajících silicím; data po zpracování pomocí multivariační analýzy prokázala odrůdovou i regionální korelaci mezi chmelovou odrůdou a chemickým profilem silic (Stenroos a Siebert, 1984).

Autoři Rigby and Bethune využili pro charakterizaci 16 různých chmelových odrůd klasickou přípravu vzorku pomocí destilace s vodní párou, analýzu silic provedli pomocí GC s teplotně vodivostním detektorem. Jedním ze zajímavých závěrů je vzájemná korelace mezi obsahem myrcenu a kohumulonu (alfa kyselina) a také mezi obsahem humulenonu (silice) a humulonu (alfa kyselina). Dále bylo zjištěno, že evropské odrůdy chmele obsahují obecně méně myrcenu a více humulenonu ve srovnání s odrůdami ze Severní Ameriky (Rigby a Bethune, 1957).

Nickerson a Van Engel identifikovali pomocí kapilární GC 250 chmelových silic. Z tohoto spektra vybrali 22 látek, které tvořily tzv. profil složek chmelového aroma (HACP z angl. hop aroma component profile), látky kvantifikovali jako nanolitry dané silice na gram chmele (1 ppm, v/w). Tímto způsobem porovnával HACP extraktů 7 komerčních vzorků pelet (Cascade, Chinook, Cluster, Hallertau, Saaz, Tettnang, and Willamette), extrakty připravili pomocí destilace s vodní párou. Kromě porovnání HACP chmelových silic z extraktů srovnávali změněný HACP těchto látek v mladině a hotovém pivu. Bylo zjištěno, že v rámci jedné odrůdy se celkový HACP může během technologického procesu změnit až o 50 %. Zároveň autoři navrhli zavedení nové jednotky „jednotka chmelového aroma“ pro charakterizaci chmelové odrůdy pomocí sumy 22 vybraných silic (1 nl/g) podobně jako se běžně používá jednotka hořkosti pro charakterizaci obsahu hořkých látek chmele (Nickerson a Van Engel, 1992).

Vzhledem k vysokým úbytkům chmelových silic během varního procesu je instrumentálně velmi obtížné stanovit silice v hotovém pivu. Jejich nízké koncentrace navíc ovlivněné matričním efektem se pohybují často na limitu detekce. Inui et al. použili pro stanovení spektra silic v pivu dvoudimenzionální plynovou chromatografii (GC x GC) s hmotnostním detektorem TOF, který umožňuje velice přesné měření. Autor se zaměřil na detekci 67 vybraných složek silic, které byly korelovány s vybranými sensorickými deskriptory. Na základě výsledné, velmi dobré korelace, výsledků necílové analýzy GCxGC-TOF/MS s výsledky sensorické analýzy pomocí PCA lze konstatovat, že tato metoda je účinným nástrojem pro vysvětlení rozdílů chmelového aroma v pivu (Inui et al., 2013).

Extrakce silic ve chmelu pomocí metody headspace SPME s následnou GC analýzou byla použita pro verifikaci 4 chmelových slovinských odrůd (Aurora, Celeia, Magnum and Savinjski Golding). Autoři této práce identifikovali 11 sloučenin (silic) charakteristických pro danou odrůdu. Profily těchto silic po chemometrickém zpracování dat dobře korelovaly s analyzovanou odrůdou (Kovačević a Kač, 2001).

Stejná technika byla použita ve studii, kde byl pomocí vybraných terpenoidních sloučenin (13 monoterpenů, 10 sekviterpenů, 3 oxidované monoterpeny, a jeden hemiterpen) získán metabolický profil těchto látek v odrůdě Saaz (Žatecký poloraný červeňák). Ze studie vyplývá, že tato odrůda obsahuje charakteristicky vysoké koncentrace myrcenu, alfa-humulenu a beta-caryofylenu (Goncalves et al., 2012).

Farag et al. použili pro profilování chmelových silic ve 13 odrůdách chmele metodu dvoudimenzionální NMR; autoři identifikovali a kvantifikovali alfa-humulen, linalool a myrcen (Farag et al., 2014).

### 2.3 Polyfenolické látky

První pokusy o stanovení polyfenolů lze doložit již z konce 19. století, kdy se polyfenoly z chmelového extraktu odstraňovaly pomocí prášku z vyčíněné kůže (hide powder) nebo želatiny a sledoval se buď hmotnostní úbytek, nebo změna spotřeby při titraci manganistanem draselným. Nevýhodou těchto metod byly zejména nepřesné výsledky způsobené jak rozdílnou povahou jednotlivých složek poly-

analyzing hop oils. In addition, elution bands are not evenly distributed in the chromatogram. This leads to the fact that the identification of unknown, sensory active minor components of the hop oils coeluting with larger peaks is very difficult. The solution is the application of multidimensional gas chromatography which uses for separation two columns with different polarity of the stationary phase. The separating capacity of gas chromatography in two-dimensional arrangement (GC x GC) is significantly higher than separation on a single column. In combination with a TOF (time of flight) type mass spectrometer, which characterizes the substance on the basis of precise molecular weights, this represents a very efficient tool for identification of unknown components of hop oils (Roberts et al., 2004). Multidimensional techniques are used mostly for research purposes because of their huge potential to discover new sensory active ingredients.

Essential oils started to be applied as markers of varietal specificity in chemotaxonomical trials in the second half of the 20th century and many published studies were devoted to the differentiation of hop varieties. In addition to the varietal specificity, these works often pointed to the impact of the growing region, i.e. soil composition and climate. In 1984, Stenroos and Siebert published a comprehensive work in which using steam distillation and GC-MS they analyzed 148 hops varieties from North America and Europe. On a capillary GC column they distinguished 117 peaks corresponding to the oils. After processing the data using multivariate analysis they showed varietal and regional correlation between hop varieties and the chemical profile of essential oils (Stenroos and Siebert, 1984).

Rigby and Bethune used conventional sample preparation using steam distillation for characterization of 16 different hop varieties; analysis of the oils was made by GC with thermal conductivity detector. One of the interesting findings was the mutual correlation between the content of myrcene and cohumulone (alpha acids) and also between the content of humulenone (essential oil) and humulone (alpha acid). It was further found that European varieties of hops generally contain less myrcene and more humulenone compared to varieties from North America (Rigby and Bethune, 1957).

Nickerson and Van Engel identified 250 hop oils by capillary GC. From this spectrum they selected 22 substances that formed the so-called hop aroma component profile (HACP) and quantitated the substances in nanoliters of oil per gram of hops (1 ppm, v/w). In this way they compared the HACP of extracts from seven commercial samples of pellets (Cascade, Chinook, Cluster, Hallertau, Saaz, Tettnang and Willamette). The extracts were prepared by means of steam distillation. In addition to comparing HACP of hop oils from individual extracts they compared the changed HACP of these substances in wort and finished beer. They found that within a single variety, the total HACP may change by as much as 50% during the technological process. At the same time they suggested the introduction of a new unit, "hop flavor unit", to characterize hop varieties using the sum of 22 selected oils (1 µl/g) similar as the bitterness unit commonly used for characterizing the content of hops bitter substances (Nickerson and Van Engel, 1992).

Due to the high losses of hop oils during the brewing process it is instrumentally very difficult to determine oil in the finished beer. Their low concentrations, which are moreover affected by the matrix effect, are often at the limit of detection. Inui et al. used two-dimensional gas chromatography (GCxGC) TOF mass spectrometer, which allows a very accurate measurement, to determine the spectrum of essential oils in beer. They focused on the detection of 67 selected components of essential oils, which were correlated with the selected sensory descriptors. Based on the resulting very good correlation of the results of analysis of the non-target GCxGC-TOF/MS with the results of sensory analysis using PCA it can be stated that this method is an effective tool for explaining the differences in hop aroma in beer (Inui et al., 2013).

Extraction of essential oils from hops using the method of headspace SPME followed by GC analysis was used to verify 4 Slovenian hop varieties (Aurora, Celeia, Magnum and Savinjski Golding). The authors of this study identified 11 characteristic compounds (oils) typical for the variety. After chemometric data processing the profiles of these oils correlated well with the analyzed variety (Kovačević and Kač, 2001).

The same technique was used in a study in which, through selected terpenoid compounds (13 monoterpenes, 10 sekviterpenes, 3 oxidized monoterpenes and one hemiterpene) they obtained the metabolomic profile of these compounds in the Saaz variety. The study implied that this variety contains a high concentration of myrcene, alpha-humulene and beta-caryophyllene (Goncalves et al., 2012).



fenolů, tak i v případě prášku z vyčištěné kůže velká variabilita v jeho složení (Chapman, 1905).

V roce 1907 Chapman popsal gravimetrické stanovení polyfenolů. Chmel extrahoval vroucí vodou a polyfenoly v extraktu vysrážel pomocí cinchoninsulfátu (Chapman, 1907). Tento způsob byl modifikován např. Lingem a Nanjim (1921), kteří místo gravimetrické koncovky použili polarimetrické měření, tj. měření optické otáčivosti (stočení roviny polarizovaného světla cinchoninsulfátem). Byla vypracována ještě celá řada optických nebo volumetrických metod ke stanovení celkových polyfenolů, v současnosti je v metodice EBC uvedena metoda založená na reakci polyfenolů extrahovaných horkou vodou v alkalickém prostředí s železitými ionty a měření absorbance proti slepému pokusu při 600 nm (Analytica EBC, 2015), jejímž základem je práce De Clerka a Jerumanise (1967).

Vzhledem k různorodé povaze polyfenolů vyvstala během času potřeba jejich selektivnějšího stanovení. První metodu pro stanovení anthokyanogenů v pivovarství publikoval McFarlane et al. (1955). Metoda je založena na konverzi anthokyanogenů považením s kyselinou chlorovodíkovou a následné extrakci červeně zbarvených sloučenin amylalkoholem nebo butylalkoholem. Další možností jejich stanovení je adsorpce anthokyanogenů na polyamidový prášek a následné považení s kyselinou chlorovodíkovou, vzniklé zbarvení se měří při 550 nm (Harris a Ricketts, 1958). Vzhledem k citlivosti metody na způsob provedení byly vyvíjeny další metodiky (Basařová a Černá, 1974), např. Franken-Luykx vypracovala metodu založenou na reakci anthokyanogenů s molybdenanem sodným v neutrálním prostředí za vzniku hnědého zbarvení, které se měří při 400 nm, avšak tato metoda je méně selektivní, protože molybdenan může kromě anthokyanogenů reagovat i s katechinem (Basařová a Černá, 1974).

Další skupinou polyfenolů stanovených ve chmelu jsou tanoidy. Jejich stanovení se provádí nefelometricky. Ve vodném výluhu chmele se sleduje tvorba zákalu po přidavku PVP, koncentrace tanoidů odpovídá objemu PVP při maximální hodnotě zákalu (Basařová, 1993; Chapon, 1993).

K přesné identifikaci jednotlivých složek polyfenolů došlo až s příchodem chromatografie, jednotlivé látky (např. kvercetin, kvercitrin, kempferol, rutin, chlorogenová kyselina, kyanidin, delphinidin, galová kyselina atd.) byly identifikovány, příp. semikvantifikovány pomocí 2D tenkovrstvé (papírové) chromatografie (např. Harris, 1956; Hubáček a Trojna, 1964; Karel, 1960).

Metody založené na HPLC separaci byly poprvé popsány v 80. a 90. letech 20. století (např. McMurrough, 1981; Jerumanis, 1985). McMurrough stanovil mono-, di- a trimery flavonolů a flavonol mono-, di- a triglykosidy, více polymerované složky nebyly stanoveny. Jerumanis použil extrakci acetonem a přečištění vzorku na polyamidu 6, ve vzorcích stanovil katechin, prokyanidin B3 a prokyanidin C2, přičemž nejvyšší koncentrace byly zjištěny u katechinu.

De Cooman et al. použil pro rozlišení 3 odrůd chmele (Saaz, Wye Target a Nugget) chemotaxonomickou metodu založenou na principu stanovení všech tří hlavních chemických skupin chmelových látek. Pomocí metody PCA vyhodnotil získané profily silic, hořkých látek a flavonoidů, látek ze skupiny polyfenolů. Flavonoidy analyzoval pomocí metody HPLC s UV detekcí (De Cooman et al., 1998).

Jerkovic et al. (2005) analyzoval koncentraci stilbenů ze skupiny polyfenolů (cis- a trans-resveratrol a cis- a trans-piceid) v peletách devíti odrůd chmele pomocí metody HPLC a detekcí MS s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). Z výsledků srovnání celkové koncentrace stilbenů a alfa-kyselin vyplývá, že čím menší koncentraci alfa-kyselin odrůda obsahuje, tím je větší obsah stilbenů.

Magalhães et al. (2010) publikoval práci, ve které popsal separaci katechinu a epikatechinu a dále objasnil strukturu více než 30 polyfenolických látek zahrnujících kromě proanthokyanidinů také např. xanthohumol a kvercetin. Tyto látky extrahoval z chmele, směs absorboval na PVPP (polyvinylpyrrolidone), a následně je desorbboval směsí aceton/voda (7:3, v/v). Elucidace získaných sloučenin byla provedena pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí.

Li a Deinzer, kteří použili k identifikaci nově izolovaných proanthokyanidinů ze 13 odrůd chmele metody HPLC-APCI-MS (vysokou účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí, chemická ionizace) a HPLC-ESI-MS (ionizace elektrospřejem, poprvé popsalí závislost zastoupení jednotlivých analogů proanthokyanidinů ve vzorku chmele na jeho odrůdě (Li a Deinzer, 2006).

Jejich výsledky byly ověřeny ve studii autorů Olšovská et al., kteří potvrdili závislost profilu proanthokyanidinů na odrůdě chmele. Chemické profily proanthokyanidinů byly naměřeny ve vzorcích ze dvou po sobě jdoucích sklizní ze 4 odrůd českého chmele (ŽPČ, Sládek,

Farag et al. used the method of two-dimensional NMR for profiling hop oils in 13 varieties of hops; the authors identified and quantified alpha-humulene, linalool and myrcene (Farag et al., 2014).

## 2.3 Polyphenols

The first attempts to determine polyphenols can be documented in the late 19th century, when polyphenols were removed from the hops extract using hide powder or gelatin and either weight loss or a change in the agent consumption during potassium permanganate titration was determined. The disadvantage of these methods was the poor inaccuracy of the results caused by the different nature of the polyphenolic components and, in the case of the hide powder, large variability in its composition (Chapman, 1905).

In 1907, Chapman described a gravimetric determination of polyphenols. Hop was extracted with boiling water and polyphenols in the extract were precipitated using cinchonin sulfate (Chapman, 1907). The method was modified by Ling and Nanji (1921), who used instead of gravimetry polarimetric measurement, i.e. measurement of the optical rotation (rotation of the polarized light plane by cinchonin sulfate). A number of other optical or volumetric methods was developed for the determination of total polyphenols. The current EBC methodology prescribes a method based on reaction of polyphenols extracted with hot water in an alkaline medium with ferric ions and measurement of the absorbance against the blank at 600 nm (Analytica EBC, 2015), which is based on the work of De Clerk and Jerumanis (1967).

The diverse nature of polyphenols resulted in the need for their selective determination. The first method for determining anthocyanogens in brewing was published by McFarlane et al. (1955). The method is based on the conversion of anthocyanogens by boiling with hydrochloric acid and subsequent extraction of red colored compounds by amyl alcohol or butyl alcohol. Another way of determining anthocyanogens is their adsorption on polyamide powder followed by boiling with hydrochloric acid; the resulting color is measured at 550 nm (Harris and Ricketts, 1958). Other methodologies have been developed because of the sensitivity of the method to the mode of performance (Basařová and Černá, 1974). For instance, Franken-Luykx developed a method based on reaction of anthocyanogens with sodium molybdate under neutral conditions to give a brown color which is measured at 400 nm, but this method is less selective as apart from anthocyanogens molybdate can react also with catechin (Basařová and Černá, 1974).

Another group of polyphenols determined in hops are tannoids. Their determination is performed by nephelometry. Formation of turbidity is observed in an aqueous extract of hops after addition of the PVP; the concentration of tannoids corresponds to the volume of PVP at a maximum value of turbidity (Basařová 1993; Chapon, 1993).

The precise identification of individual components of polyphenols occurred with the advent of chromatography. Individual substances (e.g. quercetin, quercitrin, kaempferol, rutin, chlorogenic acid, cyanidin, delphinidin, gallic acid, etc.) have been identified or semi-quantified using 2D thin layer (paper) chromatography (e.g. Harris, 1956; Hubáček and Trojna, 1964; Karel, 1960).

Methods based on HPLC separation were first described in the 80s and 90s of the 20th century (e.g. McMurrough, 1981; Jerumanis, 1985). McMurrough determined mono-, di- and trimers of flavonols and flavonol mono-, di- or triglycosides; more highly polymerized components were not determined. Jerumanis used acetone extraction and purification of the sample on polyamide 6. He determined catechin, procyanidin B3 and procyanidin C2, the highest concentrations being found with catechin.

De Cooman et al. distinguished 3 varieties of hops (Saaz, Wye Target and Nugget) by using a chemotaxonomic method based on determining all three major chemical groups of hop substances. Using the PCA method, they evaluated the resultant profiles of essential oils, bitter substances and flavonoids, i.e. substances from the group of polyphenols. Flavonoids were analyzed by HPLC with UV detection (De Cooman et al., 1998).

Using HPLC and MS detection with chemical ionization at atmospheric pressure (APCI), Jerkovic et al. (2005) analyzed the concentration of stilbenes from the group of polyphenols (cis- and trans-resveratrol and cis- and trans-piceid) in pellets of nine hop varieties. The comparison of the total concentration stilbenes and alpha-acids showed that the lower the concentration of alpha-acids in the variety, the higher the content of stilbenes.

Magalhães et al. (2010) published the separation of catechin and epicatechin, and also clarified the structure of more than 30 poly-

Premiant a Agnus), které byly analyzovány metodou HPLC- TOF/MS. Ve vzorcích extrahovaných směsí aceton/voda (70/30) identifikovali di-, tri- a tetramery proanthokyanidinů, zejména catechinu, epikatechinu, gallokatechinu a epigalokatechinu. Na základě zastoupení těchto oligomerů prokázali autoři nejen odrůdovou, ale i lokalitní specifitu (Olšovská et al., 2013).

U některých odrůd chmele jsou také velmi charakteristické obsahy některých prenylflavonoidů. Zcela unikátní odrůdou je v tomto směru česká odrůda Vital, která má velmi vysoký obsah desmethyloxanthohumolu. Na základě obsahu těchto typů látek můžeme určení odrůdy ještě dále zpřesnit (Krofta et al., 2015).

### 3 GENETICKÉ METODY

Historicky byly odrůdy chmele (*Humulus lupulus* L.) hodnoceny podle morfologických znaků révy a hlávek. Příchod metod analytické chemie sekundárních metabolitů umožnil precizní analýzu obsahu a složení chmelových pryskyřic, silic a polyfenolů (Krofta a Patzak, 2011). Chemotaxonomie chmele vychází z faktu, že složení sekundárních metabolitů je v určitých parametrech odrůdově charakteristické a jen mírně ovlivněno podmínkami pěstování a prostředí. V současnosti je využití DNA molekulárně genetických metod nejlepším nástrojem pro hodnocení jednotlivých genotypů. Oproti chemickým analýzám nejsou DNA analýzy ovlivněny věkem chmelových rostlin a dalšími faktory prostředí. DNA molekulární metody nám umožňují kontrolovat změny způsobené kombinací rodičů, chybami přenosu, mutacemi a selekčním tlakem, vyhodnocovat příbuznost jednotlivých genotypů nebo variabilitu (diverzitu) uvnitř populace.

V posledních 20 letech bylo vyvinuto a použito několik metod analýzy DNA založených na polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP) a polymerázové řetězové reakci (PCR) pro hodnocení chmelových genotypů. RFLP byl použit pro charakterizaci chloroplastové DNA, ribozomální RNA a 7SL RNA na začátku molekulárně genetické éry (Pillay a Kenny, 1994; 1996b; Matoušek a Trněná, 1996; Matoušek et al., 1999; Arnold a Jeltsch, 1999). Polymorfismus náhodně amplifikované DNA (RAPD) byl použit jako první PCR metoda pro identifikaci rozdílů mezi odrůdami chmele (Abbott a Fedele, 1994; Jakše et al., 1994; Pillay a Kenny, 1996a; Vejil, 1997; Patzak et al., 1999; Šustar-Vozlič a Javorník, 1999; Murakami, 2000). S vývojem sekvenčních technologií pak bylo možné charakterizovat RAPD produkty a použít je v metodě specifických sekvenčních míst (STS) u genotypů chmele (Brady et al., 1996; Tsuchiya et al., 1997; Araki et al., 1998; Murakami, 1998). Další metodou, využívající neznámé sekvence, byl amplifikovaný délkový polymorfismus fragmentů (AFLP), který kombinuje RFLP a PCR. Je citlivější pro genotypizaci chmele (Hartl a Seefelder, 1998; Seefelder et al., 2000; Townsend et al., 2000; Jakše et al., 2001; Patzak, 2001; 2002; Fleischer et al., 2004; Townsend a Henning, 2009; Reeves a Richards, 2011; Solberg et al., 2014) a dokáže detekovat též somaklonální variabilitu (Patzak, 2003; Peredo et al., 2006; 2008; 2009). Neznámé sekvence v systému molekulární hybridizace byly využity v technologii rozlišovacích čipů (DArT) (Howard et al., 2011). Ale lepší pro identifikaci a determinaci chmelových odrůd je využití DNA specifické sekvenční metody, jako již zmíněnou metodu STS pro strukturní geny (Patzak et al., 2007; Bassil et al., 2008; Castro et al., 2008; Venger et al., 2015). Mikrosatelitní nukleotidové (di- nebo tri-) repetice jsou nejpoužívanější pro molekulárně genetickou analýzu variability a hodnocení biodiverzity u různých druhů rostlin. Jsou vysoce polymorfní, multi-alelické, často kodominantní, vysoce reprodukovatelné a náhodně a široce rozmístěné v genomu (Powell et al., 1996). Můžeme je využít nespecificky jako sekvence PCR primerů v metodě inter-jednoduchých sekvenčních repetice (ISSR) (Patzak, 2001; Danilova et al., 2003). Standardně se však využívají přímo v reakcích jednoduchých sekvenčních repetice (SSR). Proto byly a jsou SSR markery nejpoužívanější pro genotypování a studium molekulární variability u chmele (Jakše et al., 2001; 2002; 2004; 2008; Čerenak et al., 2004; Hadonou et al., 2004; Murakami et al., 2006a; b; Bassil et al., 2008; Štajner et al., 2005; 2008; Peredo et al., 2010; Patzak et al., 2010a; b; Horreo et al., 2014; Karlsson Strese et al., 2014; Mongelli et al., 2015; Korbecka-Glinka et al., 2016). Většina SSR markerů se nachází v nekódujících oblastech genomu. Nárůst informací pomocí sekvenování nové generace (NGS) transkriptomu (Nagel et al., 2008; Clark et al., 2013; Xu et al., 2013) a celého genomu (Natsume et al., 2015) zcela naplnil DNA sekvence genů chmele v EST databázích GeneBank, které tak poskytly možnost vyhledat nové specifické molekulární markery. Z těchto informací pak byly odvo-

phenols including, apart from proanthocyanidins, also e.g. xanthohumol and quercetin. They extracted these substances from hops, the mixture was then adsorbed on polyvinylpyrrolidone (PVPP) and subsequently desorbed with acetone/water (7: 3 v/v). Elucidation of the compounds was performed using liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

Li and Deinzer used HPLC-APCI-MS (high performance liquid chromatography with mass spectrometry, chemical ionization) and HPLC-ESI-MS (electrospray ionization) methods to identify newly isolated proanthocyanidins from 13 hop varieties and described the hops variety dependence of the proportion of proanthocyanidine analogs (Li and Deinzer, 2006).

Their results were validated in a study by Olšovská et al., who confirmed the dependence of the proanthocyanidin profile on hop variety. Chemical profiles of proanthocyanidins were determined in samples from two consecutive harvests of 4 Czech hop varieties (SaaZ, Sládek, Premiant and Agnus) which were analyzed by HPLC-TOF/MS. Samples extracted with acetone/water (70/30) were found to contain di-, tri- and tetramers of proanthocyanidins, in particular catechin, epicatechin, gallocatechin and epigallocatechin. Based on the proportion of these oligomers, the authors demonstrated not only varietal, but also location specificity (Olšovská et al., 2013).

Very characteristic for some hop varieties are also the contents of some prenylflavonoids. A quite unique variety in this respect is the Czech variety Vital, which has a very high content of desmethyloxanthohumol. Based on the contents of these compounds one can further refine the variety determination (Krofta et al., 2015).

### 3 GENETIC METHODS

From the beginning, hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars have been evaluated according to the morphological traits of bine and cones. Advances in analytical chemistry of hop secondary metabolites made it possible to analyze precisely the contents and composition of some hop resins, hop oils and polyphenol components (Krofta and Patzak, 2011). Chemotaxonomy of hop cultivars is based on the fact that the composition of secondary metabolites is in some parameters a varietal characteristic and is only slightly affected by growing and environmental conditions. Nowadays, utilization of DNA molecular genetic methods is the best tool for the evaluation of individual genotypes. Unlike chemical analyses, DNA analyses are not influenced by the age of hop plants and other environmental influences. DNA molecular methods allow us to check the changes caused by the combination of parents, transfer errors, mutations and selection pressure and evaluate the relationships of genotypes or individual variability (diversity) within the population.

In the last 20 years, several methods of DNA analysis, based on Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Polymerase Chain Reaction (PCR) were developed and used for evaluation of hop genotypes. At the start of the molecular genetic era, RFLP was used for characterization of chloroplast DNA and ribosomal RNA and 7SL RNA (Pillay and Kenny, 1994, 1996b; Matoušek and Trněná, 1996; Matoušek et al., 1999; Arnold and Jeltsch, 1999). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used as the first PCR method for identification of differences between hop cultivars (Abbott and Fedele, 1994; Jakše et al., 1994; Pillay and Kenny, 1996a; Vejil, 1997; Patzak et al., 1999; Šustar-Vozlič and Javorník, 1999; Murakami, 2000). With progress of sequencing technology, RAPD products could be characterized and used in the Sequence-Tagged Sites (STS) method for hop genotypes by Brady et al. (1996), Tsuchiya et al. (1997), Araki (1998) and Murakami (1998). Another method based on unknown sequences has been the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), which combines RFLP and PCR. It was found to be more sensitive for genotyping of hops (Hartl and Seefelder, 1998; Seefelder et al., 2000; Townsend et al., 2000; Jakše et al., 2001; Patzak, 2001; 2002; Fleischer et al., 2004; Townsend and Henning, 2009; Reeves and Richards, 2011; Solberg et al., 2014) and could detect also somaclonal variability (Patzak, 2003; Peredo et al., 2006; 2008; 2009). Unknown sequences in molecular hybridization system have also been used in Diversity Arrays Technology (DArT) method (Howard et al., 2011) but better identification and determination of hop cultivars is achieved when using DNA sequence specific methods such as the previously mentioned STS methods in structural genes (Patzak et al., 2007; Bassil et al., 2008; Castro et al., 2008; Venger et al., 2015). Microsatellite nucleotide (di- or tri-) repeats are the most useful for molecular genetic analysis of variability and evaluation of biodiversity in different plant



zeny nové molekulární markery typu jednoduchých sekvenčních repetit v exprimovaných sekvenčních úsecích (EST-SSR) (Patzak a Matoušek, 2011; Jakše et al., 2011; Koelling et al., 2012; Singh et al., 2012) a jedno-nukleotidového polymorfismu (SNP) (Matthews et al., 2013; Yamauchi et al., 2014; Henning et al., 2015). Nedávno byla vydána studie představující efektivní markerovací systém pro genotypování a kontrolu autenticity českých odrůd chmele založený na EST-SSR, který byl implementován do systému identifikace odrůd chmele a kontroly čistoty sadbového materiálu (Patzak a Matoušek, 2013a; 2013b). Tento systém v PCR amplifikuje alely těchto genů: WRKY transkripční faktor 1 (WRKY1), 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodifosát synthasa (CMPS), leukoantokyanidin reduktasa 1 (LAR1) a vápník-vazebný EF hand family protein (CaEFh). Doplněný dvěma dříve publikovanými STS lokusy genů chalcon synthasy 1 (CHS1) a endochitiny 1 (HCH1) (Patzak et al., 2007) pak úspěšně a přesně identifikuje a determinuje všechny české registrované odrůdy. Pro potřeby identifikace 135 světových odrůd chmele, které jsou v kolekci Chmelařského institutu, s.r.o., v Žatci, je nutné rozšířit molekulární markerovací systém. Z 269 SSR, STS a EST-SSR amplifikovaných markerů bylo pomocí programu MinimalMarker identifikováno 15 markerů (Fujii et al., 2013), které efektivně rozliší všechny použité odrůdy, s výjimkou původem shodných genotypů Žateckého, Spaltského, Tettnangského a Nadwislavského chmele. K již dříve zmíněným tak přibyl HIGA3, HIGA29 a HIGA7 (Jakše et al., 2002; Štajner et al. 2005) z SSR markerů, NDBP (Patzak et al., 2007) z STS a EST-SSR markerů ESTGA5 (Patzak a Matoušek, 2011), flavanon 3-hydroxylasy (F3H), MYB transkripčního faktoru 5 (MYB5), celulasy 1 (CEL1), intenzivního genu kyseliny gibberelinové (GAI1) a oxidasy 2 kyseliny gibberelinové 2 (GA2oxy2) (Patzak a Henychová, 2016).

#### 4 NEJNOVĚJŠÍ POZNATKY

Jak bylo ukázáno na řadě příkladů, pokud jsou chemotaxonomické metody založeny na stanovení více typů látek (sekundárních metabolitů) chmele, je korelace s odrůdou mnohem vyšší. Ve spojení s výsledky genetické analýzy jsou dnes metody ověřování autenticity chmele velice přesné. V roce 2011 publikovali autoři Krofta et al. studii, kde stanovovali chmelové pryskyřice, silice a prenylflavonoidy u 11 českých registrovaných chmelových odrůd. V roce 2015 byly provedeny chemické analýzy dalších novošlechtěných hybridů pro České pivo (obsah a složení alfa a beta kyselin, obsah a složení chmelových silic, obsah celkových polyfenolů). Byly provedeny molekulárně-genetické analýzy 150 vybraných genotypů chmele ze světového sortimentu a šlechtitelského materiálu. Pro molekulární analýzy bylo využito 7 SSR, 9 STS a 35 EST-SSR markerů, jež celkem amplifikovaly 269 polymorfních produktů. Na základě těchto výsledků autoři sestavili dendrogram, zahrnující novošlechtěné hybridy zařazené do Státních odrůdových pokusů. Nejnovější výsledky, které budou použity mj. pro Atlas českých odrůd chmele po zařazení nových kultivarů na Listinu povolených odrůd, jsou uvedeny na obr. 1.

V loňském roce byla v časopise Kvasný průmysl publikována práce zabývající se profilováním českých chmelových odrůd na základě chemických profilů proanthokyanidinů (Olšovská et al., 2015). Výsledky klastrové analýzy (obr. 2) relativního zastoupení monomerních jednotek a oligomerů, proanthokyanidinů zcela jasně odlišily odrůdy chmele, a to i z pohledu genetické příbuznosti odrůd. České odrůdy s podílem ŽPČ v genomu se od tohoto tradičního chmele odlišují méně nežli odrůdy vzdálené. Geneticky vzdálené jsou odrůdy Kazbek a Agnus, které se řadí do skupiny amerických chmelů (Atlas, 2012). Kazbek má v původu plané kavkazské chmele, Agnus odrůdy ŽPČ, Sládek, Bor, Fuggle a Northern Brewer. Bližší ŽPČ jsou odrůdy chmele Sládek a Premiant. Obě tyto odrůdy mají v původu významný podíl ŽPČ. Je zřejmé, že genetický původ chmele koresponduje s chemotaxonomickým profilem proanthokyanidinů chmele. Výsledky získané novou metodou plně potvrdily závěry předchozí studie (Olšovská et al., 2013).

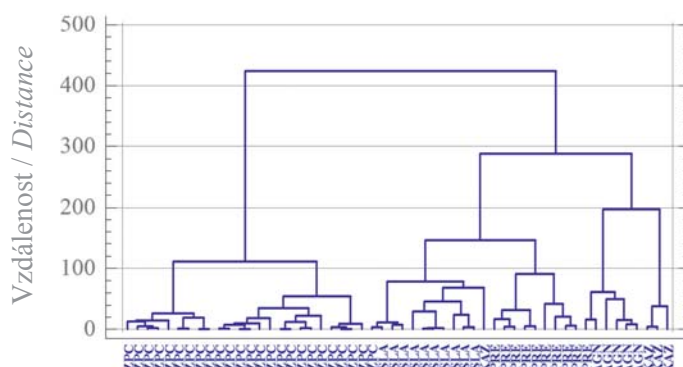
#### 5 ZÁVĚR

Společně se zdokonalující analytickou instrumentací došlo během posledních desetiletí k významným objevům v oblasti odrůdové specifity chmele. Jak metody chemotaxonomické, tak metody genetické jsou již na tak vysoké úrovni, že lze v současné době s velkou pravděpodobností určit původ chmelové odrůdy nebo prokázat falzifikát. Obě skupiny metod mají své výhody. Proto je ideální obě meto-

species. They are highly polymorphic, multi-allelic, frequently co-dominant, highly reproducible and randomly and widely distributed in the genome (Powell et al., 1996). We can use them unspecifically as PCR primer sequences in the Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) method (Patzak, 2001; Danilova et al., 2003). A standard approach is to use them directly in Simple Sequence Repeat (SSR) reactions. Therefore, SSR markers have also been the most used for genotyping and studies of molecular variability of hops (Jakše et al., 2001; 2002; 2004; 2008; Čerenak et al., 2004; Hadonou et al., 2004; Murakami et al., 2006a; b; Bassil et al., 2008; Štajner et al., 2005; 2008; Peredo et al., 2010; Patzak et al., 2010a; b; Horreo et al., 2014; Karlsson Strese et al., 2014; Mongelli et al., 2015; Korbecka-Glinka et al., 2016). The majority of SSR markers occur in non-coding regions of the genome. The increasing information by Next Generation Sequencing (NGS) about transcriptome (Nagel et al., 2008; Clark et al., 2013; Xu et al., 2013) and whole genome sequences (Natsume et al., 2015) complemented hop DNA gene sequences in GeneBank EST databases, which have provided the possibility to look for new gene specific molecular markers. From this information, a new type of molecular markers was derived such as Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat (EST-SSR) (Patzak and Matoušek, 2011; Jakše et al., 2011; Koelling et al., 2012; Singh et al., 2012) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers (Matthews et al., 2013; Yamauchi et al., 2014; Henning et al., 2015). Recently, we reported on an efficient marker system for genotyping and authenticity control of Czech hop cultivars based on EST-SSR, which was implemented into the identification of hop genotypes and purity control of cultivar rootstocks (Patzak and Matoušek, 2013a; b). This system amplifies alleles of the following genes in PCR: WRKY transcription factor 1 (WRKY1), 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (CMPS), leucoanthocyanidin reductase 1 (LAR1) and calcium-binding EF hand family protein (CaEFh). In addition to two previous STS loci of chalcone synthase 1 (CHS1) and endochitinase 1 (HCH1) genes (Patzak et al., 2007), we can successfully and accurately identify and determine all Czech registered cultivars. When we needed to identify 135 world hop cultivars in our collection it was necessary to extend our molecular marker system. Out of 269 SSR, STS and EST-SSR amplified markers, 15 markers were identified by MinimalMarker (Fujii, 2013) that effectively differentiated all used cultivars except for originally the same genotypes: Saaz, Spalt, Tettnang and Nadwislavsky. Next to the previous mentioned, there were HIGA3, HIGA29 and HIGA7 (Jakše et al., 2002; Štajner et al., 2005) from SSR markers, NDBP (Patzak et al., 2007) from STS and EST-SSR markers ESTGA5 (Patzak and Matousek, 2011), flavanone 3-hydroxylase (F3H), MYB transcription factor 5 (MYB5), cellulase 1 (CEL1), gibberellic acid intensive gene 1 (GAI1) and gibberellic acid 2 oxidase 2 (GA2oxy2) (Patzak and Henychová, 2016).

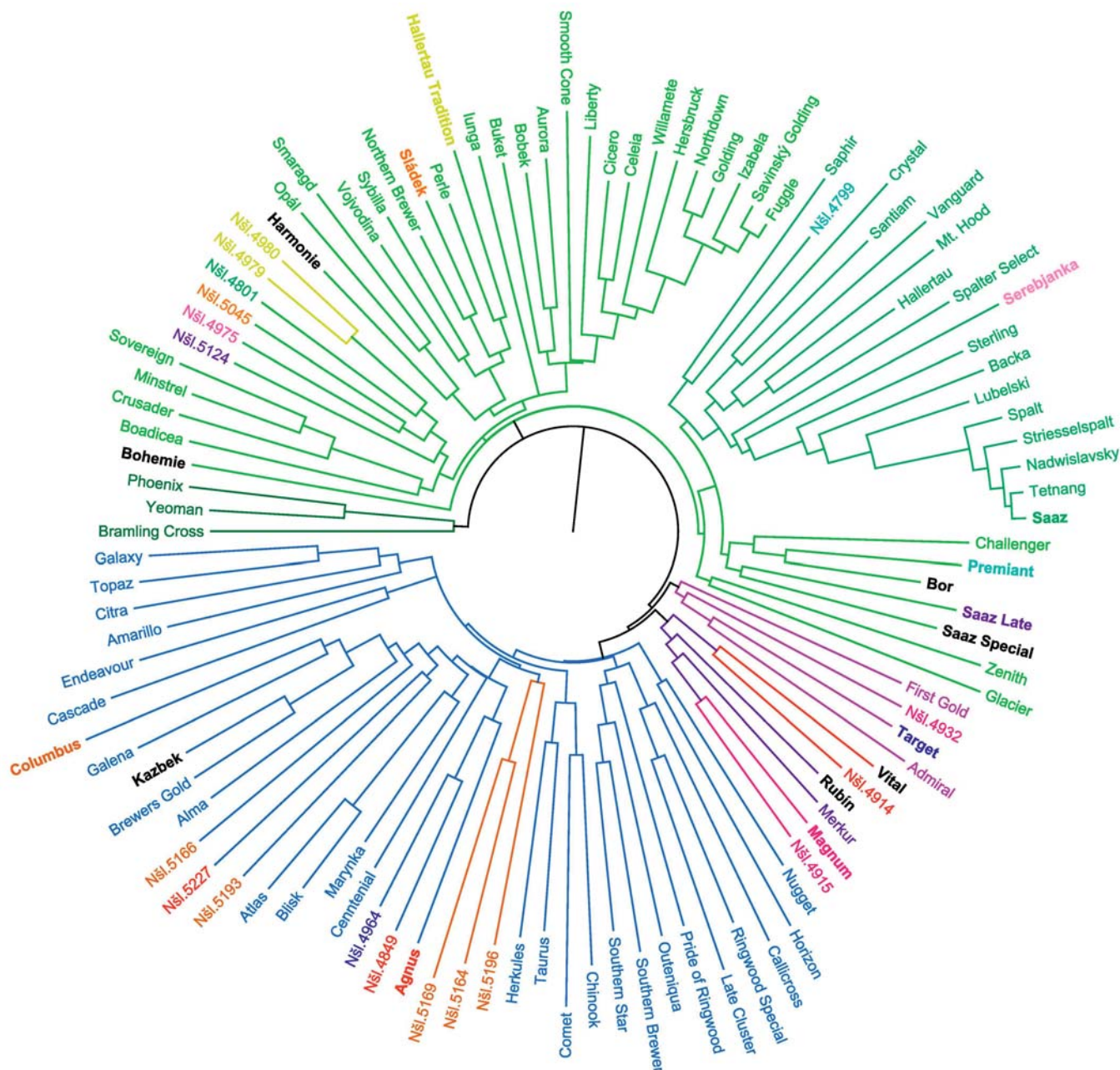
#### 4 RECENT FINDINGS

As shown in many of the examples if the chemotaxonomic methods are based on determination of a number of types of hop substances (secondary metabolites) the correlation with the variety is much higher. In conjunction with the results of genetic analyses, the methods used for verifying the authenticity of hops are now very ac-



Obr. 1 Dendrogram genetických vzdáleností 150 odrůd světového sortimentu chmele na základě 238 polymorfních molekulárních markerů / Fig. 1 Dendrogram of genetic distances of 150 varieties of world-wide hops assortment based on 238 polymorphic molecular markers





Obr. 2 Klastrová analýza. Odrůdová specifita chmele (Žatecký poloraný červeňák = Saaz) v závislosti na chemickém profilu proanthokyanidinů / Fig. 2 Cluster analysis. Varietal specificity of hops reflecting the chemical profile of proanthocyanidins

dy kombinovat, pokud to okolnosti, jako množství vzorku, dostupnost instrumentace a v neposlední řadě finanční prostředky, umožňují.

#### PODĚKOVÁNÍ

Tato studie vznikla za podpory Technologické agentury České republiky v rámci projektu TE02000177 „Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků.“

In 2011, Krofta et al. determined hop resins, oils and prenylflavonoids in 11 Czech registered hop varieties. Chemical analyses of further newly bred hybrids for Czech beer (content and composition of alpha- and beta-bitter acids, contents and composition of hop oils, the content of total polyphenols) were carried out in 2015. Molecular genetic analyses of 150 selected hop genotypes of worldwide range and breeding material were performed. A total of 7 SSR, 9 STS and 35 EST-SSR markers were used for molecular analysis which amplified a total of 269 polymorphic products. Based on these results, the authors have compiled a dendrogram including newly bred hybrids included in the State Variety Trials. The latest results, which will be used, among other things, in the Atlas of Czech hop varieties after the inclusion of new cultivars to the Charter of authorized varieties, are shown in Fig. 1.

Olšovská et al. (2015) published in Kvasný Prumysl a study dealing with profiling of Czech hop varieties based on the chemical profiles of proanthocyanidins. The results of cluster analysis (Fig. 2) of the fraction of the monomer units and oligomers of proanthocyanidins clearly differentiated hop varieties also in terms of genetic relatedness. Czech Saaz hops varieties with a share in the genome varieties differ from this traditional hop less than the remote varieties. Genetically distant are the varieties Kazbek and Agnus, which

## LITERATURA/REFERENCES

- Abbott, M.S., Fedele, M.J., 1994: A DNA-based identification procedure for hop leaf tissue. *J. Inst. Brew.*, 100: 283–285.
- Analytica ASBC, 1992: American Society of Brewing Chemists, 1992, St. Paul, Minnesota, USA.
- Analytica EBC, 1998: European Brewery Convention, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.
- Analytica EBC, 2015: European Brewery Convention, Analytica-EBC. Section 7 Hops and Hop Products, Method 7.14 Total polyphenols in hops and hop pellets. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.
- Anderegg, P., Pfenninger, H., 1994: Präzisionsdaten von Konduktometerwert und Alpha-Säurenbestimmung sowie deren Interpretation. *Brauerei und Getränke-Rundschau*, 105: 123–129.
- Araki, S., Tsuchiya, Y., Masachika, T., Tamaki, T., Shinotsuka, K., 1998: Identification of hop cultivars by DNA marker analysis. *J. Am. Soc. Brewing Chem.*, 56: 93–98.
- Arnold, C., Jeltsch, J.M., 1999: Hop (*Humulus lupulus* L.) genotyping. *Proceedings of Scientific Commission of IHGC*, Pulawy, Poland, July 27–30: 49–54.
- Arthur, C., Belardi, R., Pratt, K., Motlagh, S., Pawliszyn, J., 1992: Environmental analysis of organic compounds in water using solid phase microextraction. *J. High Res. Chromatogr.*, 15: 741–744.
- Atlas, 2012: Atlas českých odrůd chmele, 2012 [Atlas of Czech Hop Varieties]. Chmelařský institut, s.r.o., Žatec. ISBN 978-80-87357-11-8
- Bartle, K.D., 2002: Introduction. In Mondello, L., Lewis, A.C., Bartle, K.D. *Multidimensional Chromatography*. John Wiley and Sons, Chichester, England: 3–16.
- Basařová, G., 1993: Pivovarsko sladařská analytika. Kap. 5.1.7 Stanovení polyfenolů, a Kap. 6.10 Polyfenoly. Merkanta, s.r.o., Praha: 462–465; 594–607.
- Basařová, G., Černá, I., 1974: Přehled metod stanovení polyfenolů v pivovarské praxi. *Kvasny Prum.*, 20: 100–103.
- Bassil, N.V., Gilmore, B., Oliphant, J.M., Hummer, K.E., Henning, J.A., 2008: Genic SSRs for European and North American hop (*Humulus lupulus* L.). – *Genetic. Resour. Crop Evol.*, 55: 959–969.
- Brady, J.L., Scott, N.S., Thomas, M.R., 1996: DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagget sites (STS). *Euphytica*, 91: 277–284.
- Buttery, R., Ling, L., 1967: Identification of hop varieties by gas chromatography analysis of their essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 15: 531–535.
- Castro, C.B., Harlow, L.D., Whittock, S.P., Leggett, G., Kotoulis, A., 2008: DNA sequence and expression variation of valerophenone synthase (VPS) during hop (*Humulus lupulus* L.) cone development. – *Ann. Botany*, 102: 265–273.
- Chapman, A. C., 1905: Chapter: The part played by hop tannin in brewing. In: *The hop and its constituents*. London: The brewing trade review, 13 Little trinity lane, Upper Thames street, 1905: 92–99.
- Chapman, A. C., 1907: Hop tannin. *J. Inst. Brew.*, 13: 646–657.
- Chapon, L., 1993: Nephelometry as a method for studying the relations between polyphenols and proteins. *J. Inst. Brew.*, 99: 49–56.
- Clark, S.M., Vaitheeswaran, V., Ambrose, S.J., Purves, R.W., Page, J.E., 2013: Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). *BMC Plant Biol.* 13: 12.
- Čerenak, A., Jakše, J., Javornik, B., 2004: Identification and differentiation of hop varieties using simple sequence repeat markers. *J. Am. Soc. Brewing Chem.*, 62: 1–7.
- Danilova, T.V., Danilov, S.S., and Karlov, G.I., 2003. Assessment of genetic polymorphism in hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars by ISSR-PCR analysis. *Russ. J. Gen.*, 39: 1252–1257.
- De Clerk, J., Jerumanis, J., 1967: Determination of polyphenols in brewery products. *Bulletin de l'Association Royale des Anciens Etudiants en Brasserie de l'Université de Louvain*, 63: 137–161.
- De Cooman, L., Everaert, E., De Keukeleire D., 1998: Quantitative Analysis of Hop Acids, Essential Oils and Flavonoids as a Clue to the Identification of Hop Varieties, *Phytochem. Anal.*, 9: 145–150.
- Eri, S., Khoo, B., Lech, J., Hartman, T.G., 2000: Direct thermal desorption – gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils of varietal characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1140–1149.
- Farag, M.A., Porzel, A., Schmidt, J., Wessjohann, L.A., 2012: Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L.(hop): A comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics*, 8: 492–507.
- belong rather to the group of American hops (Atlas, 2012). Kazbek has in its origin Caucasian wild hops, Agnus variety resembles Saaz, Sládek, Bor, Fuggle and Northern Brewer. Nearer to Saaz hops are varieties Sládek and Premiant. Both these varieties have in their origin a significant proportion of Saaz. It is clear that the genetic origin of hops corresponds with the chemotaxonomic profile of hop proanthocyanidins. The results obtained using a new method fully confirmed the conclusions of previous studies (Olšovská et al., 2013).

## 5 CONCLUSION

Along with the improvement of analytical instrumentation the last decade witnessed significant discoveries in the field of varietal specificity of hops. Both chemotaxonomic and genetic methods are already at a level that can make it currently possible to determine the origin of the hop variety or identify it as fake. Both groups of methods have their advantages. Therefore, it is ideal to combine both methods, if circumstances, such as sample size, the availability of instrumentation and, last but not least, financial resources allow.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the project TE02000177 „Centre for Innovative Use and Strengthening of Competitiveness of Czech Brewery Raw Materials and Products“ of the Technology Agency of the Czech Republic.

Translated by Karel Sigler

- Farag, M.A., Mahrous, E.A., Lübken, T., Porzel, A., Wessjohann, L., 2014: Classification of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L.(hop) by chemometric pixel analysis of two dimensional nuclear magnetic resonance spectra, *Metabolomics*, 10: 21–32.
- Field, J., Nickerson, G., James, D., Heider, C., 1996: Determination of essential oils in hops by head-space SPME. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1768–1772.
- Fleischer, R., Horlemann, C., Schwekendiek, A., Kling, C., Weber, G., 2004: AFLP fingerprinting in hop: analysis of the genetic variability of the Tetnang variety. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 51: 211–220.
- Freundorfer, J., Maier, J., Reiner, L., 1991: Rechnergestützte Verfahren zur Sortenerkennung bei Hopfen und Hopfenprodukten auf der basis der ätherischen Ole. *Monatsschr. Brauwiss.*, 44: 221–238.
- Fujii, H., Ogata, T., Shimada, T., Endo, T., Iketani, H., Shimizu, H., Omura, M., 2013: Minimal marker: an algorithm and computer program for the identification of minimal sets of discriminating DNA markers for efficient variety identification. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 11: 1–17.
- Ganzlin, G., 1975: *Brauwissenschaft*, 28: 205–215.
- Goncalves, J., Figueira, J., Rodrigues, F., Camara, J.S., 2012: Headspace solid-phase microextraction combined with mass spectrometry as a powerful analytical tool for profiling the terpenoid metabolomic pattern of hop-essential oil derived from Saaz variety. *J. Sep. Sci.*, 35: 2282–2296.
- Hadonou, A.M., Walden, R., Darby, P., 2004: Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for assessment of genetic variation of hops (*Humulus lupulus* L.). *Mol. Ecol. Notes*, 4: 280–282.
- Harris, G., 1956: General composition of non-biological hazes of beers and some factors in their formation. II. Chromatographic separation of hop and malt tannins. *J. Inst. Brew.*, 62: 390–406.
- Harris, G., Ricketts, R. W., 1958: Studies on non-biological hazes of beers. *J. Inst. Brew.*, 64: 22–32.
- Hartl, L., Seefelder, S., 1998: Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 112–116.
- Henning, J.A., Coggins, J., Peterson, M., 2015: Simple SNP-based minimal marker genotyping for *Humulus lupulus* L. identification and variety validation. *BMC Res. Notes*, 8: 542.
- Horreo, J. L., Peredo, E. L., Olmedo, J. L., Valladares, J. E., García E., Revilla, M. A., 2014: Genetic Diversity Inferred from Microsatellites of Wild Hops in Galicia (Spain). *Brew. Sci.*, 67: 185–191.
- Howard, E. L., Whittock, S.P., Jakse, J., Carling, J., Matthews, P.D., Probasco, G., Henning, J. A., Darby, P., Čerenak, A., Javornik, B., Kilian, A., and Koutoulis, A., 2011: High-throughput genotyping



- of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DART), Theor. Appl. Genet., 122: 1265–1280.
- Hubáček, J., Trojina, M., 1964: Chmelová tříslovina – Flavonolové glykosidy některých našich a zahraničních odrůd. Kvasny Prum., 10: 169–172.
- Inui, T., Tsuchiya, F., Ishimaru, M., Oka, K., Komura, H., 2013: Different Beers with Different Hops. Compounds for Their Aroma Characteristics. J. Agric. Food Chem., 61: 4758–4764.
- Jakše, J., Luthar, Z., Javornik, J., 2008: New polymorphic dinucleotide and trinucleotide microsatellite loci for hop *Humulus lupulus* L. Mol. Ecol. Res., 8: 769–772.
- Jakše, J., Bandelj, D., Javornik, B., 2002: Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). Mol. Ecol. Notes, 2: 544–546.
- Jakše, J., Kindlhofer, K., Javornik, B., 2001: Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. Genome, 44: 773–782.
- Jakše, J., Satovic, Z., Javornik, B., 2004: Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). Genome, 47: 889–899.
- Jakše, J., Stajner, N., Luthar, Z., Jelsch, J.M., Javornik, B., 2011: Development of transcript-associated microsatellite markers for diversity and linkage mapping studies in hop (*Humulus lupulus* L.). Mol. Breeding, 28: 227–239.
- Jakše, J., Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., 1994: Identification of hop cultivars by RAPD markers. Proceedings of the International Colloquium on IPBA, Rogla, Slovenia, December 5-7: 147–151.
- Jelínek, L., Šneberger, M., Karabín, M., Dostálek, P., 2010: Comparison of Czech hop cultivars based on their contents of secondary metabolites. Czech J. Food Sci., 28: 309–316.
- Jelínek, L., Dolečková, M., Hudcová, T., Karabín, M., Dostálek, P., 2011: Profiling of Czech hop varieties by means of analyses of alpha – and beta -bitter acids, essential oils and polyphenols. Kvasny Prum., 57: 272–276.
- Jelínek, L., Dolečková, M., Karabín, M., Hudcová, T., Kotlíková, B., Dostálek, P., 2012: Influence of Growing Area, Plant Age, and Virus Infection on the Contents of Hop Secondary Metabolites. Czech J. Food Sci., 30: 541–547.
- Jerkovic, V., Callemien, D., Collin, S., 2005: Determination of Stilbenes in Hop Pellets from Different Cultivars, J. Agric. Food Chem., 53: 4202–4206.
- Jerumanis, J., 1985: Quantitative analysis of flavanoids in barley, hops and beer by high-performance liquid chromatography (HPLC). J. Inst. Brew., 91: 250–252.
- Karel, V., 1960: Polyfenolové látky při výrobě piva. Kvasny Prum., 6: 193–196.
- Karlsson Strese, E.M., Lundström, M., Hagenblad, J., Leino, M.W., 2014: Genetic Diversity in Remnant Swedish Hop (*Humulus lupulus* L.) Yards from the 15th to 18th Century. Economic Botany, 68: 231–245.
- Koelling, J., Coles, M.C., Matthews, P.D., Schwekendiek, A., 2012: Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. Mol. Breeding, 30: 479–484.
- Korbecka-Glinka, G., Skomra, U., Olszak-Przybys, H., 2016: Cultivar identification in dry hop cones and pellets using microsatellite loci. Eur. Food Res. Technol., 242: 1599–1605.
- Kovačević, M., Kač, M., 2001: Solid-phase microextraction of hop volatiles. Potential use for determination and verification of hop varieties. J. Chromatogr. A, 918: 159–167.
- Krofta, K., 2003: Comparison of quality parameters of Czech and foreign hop varieties. Plant Soil Environ., 49: 261–268.
- Krofta, K., 2010: The content of hop prenylflavonoids on czech and foreign beers, Kvasny Prum., 56: 2–9.
- Krofta, K., Čepička, J., 2000: Stanovení chmelových silic metodou mikroextrakce na tuhou fázi (SPME). Kvasny Prum., 46: 235–241.
- Krofta, K., Patzak, J., 2011: Investigation of Czech hop varieties authenticity by means of chemical and genetis analyses. Kvasny Prum., 57: 296–303.
- Krofta, K., Vrabcová, S., Mravcová, L., Dostálek, P., Karabín, M., Jelínek, L., Hudcová, T., 2015: Classification of Czech hops according to their contents of prenylflavonoids. Kvasny Prum., 61: 62–68.
- Laws, D.R.J., 1981: Hop extracts – A review. J. Inst. Brew., 87: 24–29.
- Li, H. J., Deinzer, M. L., 2006: Structural Identification and Distribution of Proanthocyanidins in 13 Different Hops. J. Agric. Food Chem., 54: 4048–4056.
- Ling, A. R., Nanji, D. J., 1921: A rapid polarimetric method of estimating tannin in hops. J. Inst. Brew., 27: 310–313.
- Magalhães, P.J., Viera, J.S., Gonçalves, L.M., Pacheco, J.G., Guido, L.F., Barros, A.A., 2010: Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1217: 3258–3268.
- Matoušek, J., Trněná, L., 1996: 7SL RNA polymorphism in hop (*Humulus lupulus* L.). Rostlinná Výroba, 42: 173–177.
- Matoušek, J., Vrba, L., Patzak, J., Orctová, L., Steger, G., 1999: Structure and modification of hop (*Humulus lupulus* L.) 7SL RNA genes. Proceedings of Scientific Commission of IHGC, Pulawy, Poland, July 27-30: 66–74.
- Matthews, P.D., Coles, M.C., and Pitra, N.J., 2013: Next Generation Sequencing for a Plant of Great Tradition: Application of NGS to SNP Detection and Validation in Hops (*Humulus lupulus* L.). Brew. Sci., 66: 185–191.
- McFarlane, W. D., Wye, E., Grant, H. L., 1955: Proc. Eur. Brew. Conv. Congress, Baden-Baden: 298.
- McMurrough, I., 1981: High-performance liquid chromatography of flavonoids in barley and hops. J. Chromatography A, 218: 683–693.
- Mongelli, A., Rodolfi, M., Ganino, T., Marieschi, M., Dall'Asta, C., Bruni, R., 2015: Italian hop germplasm: Characterization of wild *Humulus lupulus* L. genotypes from Northern Italy by means of phytochemical, morphological traits and multivariate data analysis. Industrial Crops and Products, 70: 16–27.
- Murakami, A., 1998: The practical application of PCR for the verification of hop variety. MBAA Tech. Quart., 35: 185–188.
- Murakami, A., 2000: Hop variety classification using the genetic distance based on RAPD. J. Inst. Brewing, 106: 157–161.
- Murakami, A., 2001: Structural differences in the intergenic spacer of 18S-26S rDNA and molecular phylogeny using partial external transcribed spacer sequence in hop, *Humulus lupulus* L. Breeding Sci., 51: 163–170.
- Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M.S., Seigner, E., Lutz, A., Svoboda, P., 2006a: Microsatellite DNA analysis of wild hops, *Humulus lupulus* L. Genet. Resources Crop Evol., 53: 1553–1562.
- Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M.S., Seigner, E., Lutz, A., Svoboda, P., 2006b: Molecular phylogeny of wild hops, *Humulus lupulus* L. Heredity, 97: 66–74.
- Nagel, J., Culley, L.K., Lu, Y., Liu, E., Matthews, P. D., Stevens, J.F., and Page, J.E., 2008: EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. Plant Cell, 20: 186–200.
- Natsume, S., Takagi, H., Shiraishi, A., Murata, J., Toyonaga, H., Patzak, J., Takagi, M., Yaegashi, H., Uemura, A., Mitsuoka, C., Yoshida, K., Krofta, K., Satake, H., Terauch, R., and Ono, E., 2015: The Draft Genome of Hop (*Humulus lupulus*), an Essence for Brewing. Plant Cell Physiol., 56: 428–441.
- Nickerson, G.B., Van Engel, E.L., 1992: Hop Aroma Component Profile and the Aroma Unit. J. Am. Soc. Brew. Chem., 50: 77–81.
- Nickerson, G. B., Williams, P.A., Haunold, A., 1986: Varietal differences in the proportions of cohumulone, adhumulone and humulone in hops. J. Am. Soc. Brew. Chem., 44: 91–94.
- Olšovská, J., Kameník, Z., Čejka, P., Jurková, M., Mikyška A., 2013: Ultra-high-performance liquid chromatography profiling method for chemical screening of proanthocyanidins in Czech hops. Talanta, 116: 919–926.
- Olšovská, J., Dušek, M., Zušťáková, V., Mikyška, A., 2015: Profil proanthokyanidinů v pivu a jeho surovinách. Kvasny Prum., 61: 296–304.
- Patzak, J., 2001: Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica, 121: 9–18.
- Patzak, J., 2002: Characterization of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes by molecular methods. Plant. Prod., 48: 343–350.
- Patzak, J., 2003: Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) in vitro meristem cultures and clones by molecular methods. Euphytica, 131: 343–350.
- Patzak, J., Hencychová, A., 2016: Utilization of molecular methods for hop (*Humulus lupulus* L.) genotype evaluation. Acta Horticulturae, in press.
- Patzak, J., Matoušek, J., 2011: Development and evaluation of expressed sequence tag-derived microsatellite (EST-SSR) markers for genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.). Biol. Plant., 55: 761–765.
- Patzak, J., Matoušek, J., 2013a: Combination of sets of primers for detection of genetic polymorphism of Czech hop species and de-



- termination thereof. Utility model, No. 25678. The Patent Office of the CR Prague, 18.7.2013.
- Patzak, J., Matoušek, J., 2013b: Methodology of utilization of molecular-genetic markers of gene sequences and genetic elements in breeding and management of hop (*Humulus lupulus*) [in Czech]. Certified methodology, Hop Research Institute, Žatec, 40pp. ISBN 978-80-86836-94-2
- Patzak, J., Nesvadba, V., Henychová, A., Krofta, K., 2010a: Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. *Biochem. System. Ecol.*, 38: 136–145.
- Patzak, J., Nesvadba, V., Krofta, K., Henychová, A., Marzoev, A.I., Richards, K., 2010b: Evaluation of genetic variability of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Canada and Caucasus region by chemical and molecular methods. *Genome*, 53: 545–557.
- Patzak, J., Oriniaková, P., Matoušek, J., Svoboda, P., 1999: Czech hop characterization using RAPD method and genetic distance analysis of selected genotypes. *Plant. Prod.*, 45: 165–172.
- Patzak, J., Vrba, L., Matoušek, J., 2007: New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.). *Genome*, 50, 15–25.
- Peredo, E.L., García-Arroyo, R., Reed, B.M., Revilla, M.A., 2008: Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops. *Cryobiology*, 57: 234–241.
- Peredo, E.L., García-Arroyo, R., Revilla, M.A., 2009: Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. *J. Plant Physiol.*, 166: 1101–1111.
- Peredo, E.L., Revilla, M.A., García-Arroyo, R., 2006: Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures. *J. Plant Physiol.*, 163: 1071–1079.
- Peredo, E.L., Revilla, M.A., Reed, B.M., Javornik, B., Cires, E., Prieto, J.A.F., García-Arroyo, R., 2010: The influence of European and American wild germplasm in hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *Genet Resour Crop Evol.*, 57: 575–586.
- Pickett, J., Coates, J., Sharpe, R., 1975: Distortion of essential oil composition during isolation by steam distillation. *Chemistry and Industry*: 571–572.
- Pillay, M., Kenny, S.T., 1994: Chloroplast DNA differences between cultivated hop, *Humulus lupulus* and the related species *H. japonicus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 372–378.
- Pillay, M., Kenny, S.T., 1996a: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: Level of genetic variability and segregation in F1 progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 334–339.
- Pillay, M., Kenny, S.T., 1996b: Structure and inheritance of ribosomal DNA variants in cultivated and wild hop, *Humulus lupulus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 333–340.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A., 1996: The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.*, 2: 225–238.
- Reeves, P.A., Richards, C.M., 2011: Species Delimitation under the General Lineage Concept: An Empirical Example Using Wild North American Hops (*Cannabaceae: Humulus lupulus*). *Syst. Biol.*, 60: 45–59.
- Rettberg, N., Thörner, S., Garbe, L., 2012: Bugging hop analysis – on the isomerization and oxidation of terpene alcohols during steam distillation. *BrewingScience*, 65: 112–117.
- Rigby, F. L., Bethune, J.L., 1957: Analysis of hop oil by gas-liquid partition chromatography. *J. Inst. Brew.*, 63: 154–161.
- Roberts, M.T., Lewis, A.C., 2002: Rapid characterization of hop essential oils using gas chromatography-time of flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 60: 116–121.
- Roberts, M.T., Dufour, J.P., Lewis, A.C., 2004: Application of comprehensive multidimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS) for high resolution of analysis of hop essential oils. *J. Sep. Sci.*, 27: 473–478.
- Seefelder, S., Ehrmaier, H., Schweizer, G., and Seigner, E., 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop, *Humulus lupulus*, as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. *Plant Breeding*, 119: 257–263.
- Singh, S., Gupta, S., Mani, A., Chaturvedi, A., 2012: Mining and gene ontology based annotation of SSR markers from expressed sequence tags of *Humulus lupulus*. *Bioinformation*, 8: 114–122.
- Solberg, S. Ø., Kolodinska Brantestam, A., Kylin, M., Bjørn, G.K., Thomsen, M.G., 2014: Genetic variation in Danish and Norwegian germplasm collections of hops. *Biochemical Systematics and Ecology*, 52: 53–59.
- Stenroos, L. E., Siebert, K.J., 1984: Application of pattern-recognition techniques to the essential oil of hops. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 42: 54–61.
- Štajner, N., Jakše, J., Kozjak, P., Javornik, B., 2005. The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant. Sci.*, 168: 213–221.
- Štěrbá, K., Čejka, P., Čulík, J., Jurková, M., Krofta, K., Pavlovič, M., Mikyška, A., Olšovská, J., 2015: Determination of Linalool in Different Hop Varieties Using a New Method Based on Fluidized-Bed Extraction with Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Detection. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 73: 151–158.
- Šuštar-Vozlič, J., Javornik, B., 1999: Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant Breeding*, 118: 175–181.
- Townsend, M.S., Henning, J.A., 2009: AFLP discrimination of native North American and cultivated hop. *Crop Sci.*, 49: 600–607.
- Townsend, M.S., Henning, J.A., Moore, D.L., 2000: AFLP analysis of DNA dried hop cones. *Crop Sci.*, 40: 1383–1386.
- Tsuchiya, Y., Araki, S., Takashio, M., Tamaki, T., 1997: Identification of hop varieties using specific primers derived from RAPD markers. *J. Ferment. Bioeng.*, 84: 103–107.
- Vejl, P., 1997: Identification of genotypes in hop (*Humulus lupulus* L.) by RAPD analysis using program Gel Manager for Windows. *Rostlinná Výroba*, 43: 325–333.
- Venger, A. M., Volkova, N. E., Sivolap Yu, M., 2015: Molecular Genetic Polymorphism of chs H1 Gene in Ukrainian Hop Varieties. *Cytology and Genetics*, 49: 294–298.
- Wöllmer, W., 1925: Über die Bitterstoffe des Hopfens. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A und B Series)*, 58: 672–678.
- Xu, H., Zhang, F., Liu, B., Huhman, D.V., Sumner, L.W., Dixon, R.A., and Wang, G., 2013: Characterization of the Formation of Branched Short-Chain Fatty Acid: CoAs for Bitter Acid Biosynthesis in Hop Glandular Trichomes. *Mol. Plant*, 6: 1301–1317.
- Yamauchi, H., Mukouzaka, Y., Taniguchi, T., Nakashima, K., Furu-kubo, S., Harada, M., 2014: Newly developed SNP-based identification method of hop varieties. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 72: 239–245.