

DOI: 10.18832/kp201725

Stanovení hořkých látek v chmelu – vliv ročníku a stáří chmele

Determination of Bitter Compounds in Hops – Effect of Crop Year and Hops Age

Karel KROFTA¹, Alexandr MIKYŠKA², Marie JURKOVÁ², Lenka MRAVCOVÁ¹, Petra VONDRÁČKOVÁ¹¹ Chmelařský institut s. r. o., Kadaňská 2525, 438 01 Žatec / Hop Research Institute Co., Ltd. Kadaňská 2525, CZ 438 01 Žatec² Výzkumný ústav pivovarský a sladařský a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / Research Institute of Brewing and Malting, Lípová 15, CZ 120 44 Praha 2

e-mail: krofta@chizatec.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Krofta, K., Mikyška, A., Jurková, M., Mravcová, L., Vondráčková, P., 2017: Stanovení hořkých látek v chmelu – vliv ročníku a stáří chmele. Kvasny Prum. 63(5): 241–247

Práce je zaměřena na vzájemné porovnání čtyř metod stanovení alfa kyselin ve chmelu (EBC 7.4, EBC 7.5, ČSN a EBC 7.7) a jejich aplikaci při hodnocení chmele skladovaného za různých podmínek. Dále jsou diskutovány výsledky porovnání prognózovaných a skutečných hodnot alfa kyselin v dlouhodobém sledování sklizní tří českých odrůd chmele. Největší rozdíly byly zjištěny mezi metodami EBC 7.5 (KH) a EBC 7.7 (HPLC), prvá dává systematicky vyšší výsledky a rozdíl exponenciálně stoupá s hodnotou indexu skladování chmele (HSI), u čerstvých chmelů je rozdíl 10 – 15 % rel., u starších chmelů s HSI 0,6 – 0,7 je rozdíl 25 – 45 % rel. Předsklizňová prognóza i sklizňový odhad alfa kyselin v Žateckém poloraném červeňáku jsou v dobré shodě se skutečností ($kr = 0,93$; $kr = 0,95$), totéž platí i pro relaci sklizňového odhadu a skutečnosti odrůd Sládek a Premiant ($kr = 0,93$; $kr = 0,97$).

Krofta, K., Mikyška, A., Jurková, M., Mravcová, L., Vondráčková, P., 2017: Determination of bitter compounds in hops – Effect of crop year and hops age. Kvasny Prum. 63(5): 241–247

Our study is focused on mutual comparison of four methods of determination of alpha acids in hops (EBC 7.4, EBC 7.5, ČSN and EBC 7.7) and their application in evaluation of hops stored under different conditions. Furthermore, the results of the comparison of predicted and actual alpha acid values in the long-term monitoring of harvesting of three Czech hop varieties are discussed. The largest differences were found between the EBC 7.5 (LCV) and EBC 7.7 (HPLC) methods; the first method gives systematically higher results and the difference exponentially increases with the hop storage index (HSI) value. The difference in HSI in fresh hops is 10 – 15% rel. while the difference in older hops with HSI 0.6 – 0.7 is 25 – 45% rel. Pre-harvest prognosis and harvest estimate of alpha acids in the Saaz variety are in good agreement with the facts ($kr = 0.93$, $kr = 0.95$) and the same holds for the harvest estimation relation and the reality of the varieties Sládek and Premiant ($kr = 0.93$; 0.97).

Krofta, K., Mikyška, A., Jurková, M., Mravcová, L., Vondráčková, P., 2017: Die Bestimmung von Bitterstoffen – der Einfluss des Jahrganges und des Alters. Kvasny Prum. 63(5): 241–247

Der Artikel beschäftigt sich mit einem Gegenvergleich von vier Methoden zur Bestimmung α - Säuren im Hopfen (EBC 7.4, EBC 7.5, Tschechische Norm ČSN und EBC 7.7) und ihre Applikation im unter unterschiedlichen Bedingungen gelagerten Hopfen. Weiterhin werden die Ergebnisse der Vergleichung vom vorhersagten und wichtigen Gehalt an α - Säuren im Hopfen während der langfristigen Ernten Verfolgung von drei tschechischen Hopfensorten diskutiert. Die größten Unterschiede wurden unter folgenden Methoden EBC 7.5 (KH) und EBC 7.7 (HPLC) festgestellt, die erste systematisch gibt höhere Ergebnisse, der Unterschied exponentiell steigt mit dem Wert des Hopfenlagerungsindex (HSI), bei dem frischen Hopfen tut der Unterschied 10 – 15% (rel.) bei älteren Hopfen mit dem Wert HSI 0,6–0,7 gibt's schon Unterschied 25 – 45 % (rel.). Die Vorerntevorhersage und Ernteabschätzung des Gehalts an α - Säuren im Hopfen in Hopfen Sorte Žatecký poloraný červeňák (Saazer halbfrüher Rothopfen) sind in einer guten Übereinstimmung mit der Wirklichkeit ($kr=0,93$; $kr = 0,95$), dasselbe gilt auch die Relation der Vorerntevorhersage und Wirklichkeit bei den Hopfensorten Sládek und Premiant ($kr = 0,93$; $kr = 0,97$).

Klíčová slova: chmel, alfa kyseliny, stárnutí chmele, HSI, skladovatelnost, kapalinová chromatografie**Keywords:** hops, alpha acids, hop aging, HSI, shelf life, liquid chromatography

1. ÚVOD

Nejdůležitější složkou chmele z pohledu pivovarské technologie jsou alfa kyseliny. Samy o sobě nejsou hořké, ale termickou izomerací z nich vznikají iso-alfa kyseliny, které mají intenzivně hořkou chuť a vytváří tak základ typického sensorického znaku piva. Více než 85 % hořkosti piva je připisováno iso-alfa kyselinám. Koncentrace iso-alfa kyselin v pivech se pohybuje v intervalu 10–100 mg/l podle typu piva. Další transformační produkty alfa kyselin, humulinony, vznikají oxidací alfa kyselin např. při zpracování chmele na pelety nebo při stárnutí chmele za přítomnosti vzduchu. Jsou dobře rozpustné ve vodě, ale jejich příspěvek k celkové hořkosti piva není při chmelování do kotle velký, přestože jejich sensorická hořkost dosahuje 65 % hořkosti iso-alfa kyselin. Tyto látky ale pravděpodobně přispívají k hořkosti studeně chmelených piv (Vollmer et al., 2017).

Příspěvek beta kyselin k celkové hořkosti piva byl řadou autorů zohledňován při určování dávky chmele pro chmelovar a vyjadřován jako součet obsahu alfa kyselin a definovaného podílu beta kyselin. Asi nejznámější je Wöllmerův vztah „ $\alpha + \beta/9$ “ (Wöllmer, 1930). Pro Žatecký červeňák byl Wöllmerův vztah Salačem a Dyrem upraven na „ $\alpha + \beta/3$ “ (Salač a Dyr, 1944). Nejnovější výzkumy ukázaly, že čisté beta kyseliny k hořkosti piva nijak nepřispívají. To jednoznačně potvrdily experimenty, při kterých byly čisté beta kyseliny přidávány

1 INTRODUCTION

The most important ingredient of hops in terms of brewing technology is alpha acids. They are not bitter by themselves, but thermal isomerization converts them into iso-alpha acids, which have an intense bitter taste and thus form the basis of a typical sensory feature of beer. More than 85% of the bitterness of beer is attributed to iso-alpha acids. The concentration of iso-alpha acids in beers ranges from 10 to 100 mg/l depending on the type of beer. Other transformation products of alpha acids, humulinones, are formed by the oxidation of alpha acids during the processing hops to pellets or aging of hops by air. They are well soluble in water, but their contribution to the overall bitterness of beer is not high with kettle hopping, although their sensory bitterness reaches 65% of that of bitter iso-alpha acids. These substances are likely to contribute to the bitterness of cold-hopped beers (Vollmer et al., 2017).

The contribution of beta acids to the total bitterness of beer has been taken into account by a number of authors when determining the hop dose for the hopping and is expressed as the sum of the alpha acid content and the defined beta acid content. Probably the most famous is Wöllmer's relationship " $\alpha + \beta / 9$ " (Wöllmer, 1930). The Wöllmer's relationship was modified for the Saaz variety by Salač and Dyr to " $\alpha + \beta / 3$ " (Salač and Dyr, 1944). Recent research

do mladiny ve formě ethanolového roztoku. Mladina ani pivo nevykazovaly žádnou senziorickou hořkost (Krofta et al., 2015). Výrazně hořkou chuť ale mají produkty oxidace beta kyselin, které jsou rozpustné ve vodě. Nejdéle známými transformačními produkty beta kyselin jsou hulupony a hulupinová kyselina (Stevens a Wright, 1961). Hulupony vznikají již ve chmelu v průběhu sušení a skladování, kdy jejich obsah ve chmelu může být kolem 1%. Piva chmelená oxidačními produkty beta kyselin vykazují zřetelnou senziorickou hořkost, která není v žádném případě nepřijemná a ulpívající. Samotné hulupony dosahují $84 \pm 10\%$ hořkosti iso-alfa kyselin, naproti tomu hulupinová kyselina není vůbec hořká (Algazzali a Shellhammer, 2016). Absence kyslíku ve vroucí mladině neumožňuje rozpuštěným alfa a beta kyselinám významnější transformaci na hořké produkty.

Složení chmele se neustále mění, a to nejen v procesu dozrávání, ale i při posklizňovém zpracování na výrobky a zejména při skladování. Po sklizni chmel stárne. Stárnutím se rozumí nevratné změny ve složení chmelových pryskyřic, silic a dalších složek chmele, způsobené oxidací. Nejzávažnější změnou je pokles obsahu alfa a beta kyselin. Rychlost oxidačních procesů je ovlivňována řadou faktorů, z nichž nejdůležitější jsou čas, teplota, přístup vzduchu, světlo. Je známo, že rychlost ztráty alfa a beta kyselin se po sklizni za srovnatelných podmínek u jednotlivých odrůd liší. To se následně promítá do hořčící vydatnosti chmele. Varní zkoušky starších chmelů potvrdily, že jejich hořčící schopnost neklesá tak rychle, jak by odpovídalo analytickým hodnotám, tj. především úbytku alfa kyselin (Almaguer et al., 2012).

Nejběžnějším kritériem hodnocení stárnutí chmele je tzv. index skladování chmele, známý z anglického překladu „Hop Storage Index“ jako HSI. Jedná se o bezrozměrný index definovaný jako poměr absorpance toluenového extraktu chmele v prostředí alkalického methanolu při vlnových délkách 275 a 325 nm (Likens a Nickerson, 1970). V čerstvém zeleném chmelu se jeho hodnota pohybuje v rozmezí 0,20-0,25. Po sklizni hodnota HSI nevratně stoupá. Staré, nevhodně skladované chmele, mohou mít HSI v rozmezí 1,00-2,00.

Nejdůležitější vliv na obsah alfa a beta kyselin ročníkové sklizně chmele má průběh povětrnostních podmínek během vegetační sezóny. V podmínkách střední Evropy se jedná především o teploty a srážky v období červen-srpen, u hybridních odrůd s delší vegetační dobou se toto období prodlužuje až do září. Informace o obsahu alfa kyselin v českých chmelech z nové sklizně jsou odbornou veřejností vždy očekávány s velkým zájmem. Z tohoto důvodu se prognózování a hodnocení obsahu alfa a beta kyselin z ročníkové sklizně chmele věnuje dlouhodobě značná pozornost (Krofta, 2012). Tento proces začíná předsklízňovými odhady pro Žatecký červeňák. Na to navazují sklízňové prognózy, a nakonec se provádí hodnocení skutečnosti na základě zpracování výsledků analýz dostupných sklízňových vzorků chmele. Ke kvantitativnímu stanovení obsahu alfa a beta kyselin ve chmelu se používá několik analytických metod. Ke stanovení obsahu čistých alfa a beta kyselin se používá kapalinná chromatografie s UV detekcí v isokratickém či gradientovém režimu (Analytica EBC, 1998). K analýze alfa kyselin se dále široce užívají konduktometrické metody, založené na srážecí reakci humulonů s ionty Pb^{2+} , při které se tvoří žlutá sraženina humulonátu olovnatého. V tomto případě se jedná o metody nespecifické, protože olovnatými ionty se sráží nejen alfa kyseliny, ale i některé minoritní složky chmelových pryskyřic. Výsledek analýzy se pak označuje jako konduktometrická hodnota chmele (KH). Přes zatížení řadou systematických chyb, jsou titrační metody pro svou jednoduchost a rychlost v praxi velmi rozšířené (Analytica EBC, 1998; ČSN 462520, 1997). Je však nutné mít na paměti, že každá metoda poskytuje jiný výsledek a vzájemné „přepočítávací“ koeficienty neexistují.

Publikace je zaměřena na vzájemné porovnání metod stanovení alfa kyselin ve chmelu, jejich aplikaci při hodnocení chmele v průběhu skladování za různých podmínek. Dále jsou prezentovány výsledky dlouhodobého sledování obsahu alfa kyselin ve vybraných českých odrůdách chmele ve formě porovnání prognózovaných a skutečných hodnot.

2 MATERIÁL A METODY

Soubor hlávkových chmelů (české odrůdy Premiant, Sládek, Agnus, Žatecký červeňák) ze sklizní 2015 a 2016 byl použit pro porovnání výsledků stanovení alfa kyselin různými analytickými metodami. Část chmelů byla skladována při pokojové teplotě, část v klimatizovaných prostorech při teplotě $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Všechny vzorky byly analyzovány kapalinnou chromatografií dle metody EBC 7.7. (Analytica EBC, 1998), s použitím externího kalibračního standardu ICE 3 a třemi různými

has shown that pure beta-bitter acids do not contribute to the bitterness of beer. This was clearly confirmed by experiments in which pure beta acids were added to the wort as an ethanol solution. Neither the wort nor the beer showed any sensory bitterness (Krofta et al., 2015). Distinctly bitter taste have oxidation products of beta acids which are soluble in water.

The best known transformation products of beta acids are hulupones and hulupinic acid (Stevens and Wright, 1961). Hulupones are produced in hops already during drying and storage and their hops content may be around 1%. Beers hopped with beta acid oxidation products show a distinct sensory bitterness, which is by no means unpleasant and clinging. The hulupones themselves reach $84 \pm 10\%$ bitterness of iso-alpha acids; on the other hand, hulupinic acid is not bitter (Algazzali and Shellhammer, 2016). The absence of oxygen in the boiling wort does not allow soluble alpha and beta acids to be transformed into bitter products.

The composition of the hops is constantly changing, not only during the ripening process, but also during the post-harvest processing to hop products and especially during storage. After harvest hops undergoes aging, which involves irreversible changes in the composition of hop resins, oils, and other hops components due to oxidation. The most significant change is the decrease in alpha and beta acid content. The speed of oxidation processes is influenced by a number of factors, the most important being time, temperature, air access and light. It is known that the post-harvest rate of loss of alpha and beta acids for different varieties under comparable conditions is different. This is then reflected in the bittering capability of hops. Brewing trials confirmed that bittering ability of older hops does not decrease as quickly as would correspond to analytical values, i.e. mainly to loss of alpha acids (Almaguer et al., 2012).

The most common criterion for assessment of hops aging is the so-called hops storage index (HSI). It is a dimensionless index defined as the ratio of absorbance of toluene hops extract in alkaline methanol at 275 and 325 nm (Likens and Nickerson, 1970). In fresh green hops the value ranges from 0.20-0.25. After harvest, the value of HSI irreversibly rises. Old, badly stored hops may have an HSI in the range of 1.00-2.00.

The most important effect on the alpha and beta acid content of a crop year's harvest of hops is the course of weather conditions during the growing season. In terms of Central Europe, this is mainly the temperature and rainfall in June-August. In hybrid varieties with a longer growing season this period is extended until September. Information about alpha acid content in Czech hops from the new harvest is always awaited with great interest by the professional public. For this reason, considerable attention is paid in the long term to the forecasting and evaluation of the alpha and beta acid content of hops harvests (Krofta, 2012). This process begins with pre-harvest estimates for the Saaz variety. This is followed by harvesting forecasts, and eventually evaluating the actual reality based on the results of the analysis of available harvest hop samples. A variety of analytical methods are used to quantify the alpha and beta acid content of hops., Liquid chromatography with UV detection in isocratic or gradient mode is used to determine the content of pure alpha and beta acids (Analytica EBC, 1998). Conductometric methods based on the precipitation reaction of humulones with Pb^{2+} ions to form a yellow precipitate of lead humulonate are widely used for the analysis of alpha acids. These methods are non-specific because lead precipitates are formed not only by alpha acids but also by some minor components of hop resins. The result of the analysis is then referred to as the lead conductance value of hops (LCV). Despite the burden of a series of systematic errors, the titration methods are widespread in practice for their simplicity and speed (Analytica EBC, 1998; ČSN 462520, 1997). However, it must be borne in mind that each method provides a different result and mutual „conversion“ coefficients do not exist.

Our study is focused on mutual comparison of the methods of determining alpha acids in hops and their application in hops evaluation during storage under different conditions. Furthermore, the results of the long-term monitoring of alpha acid content in selected Czech hop varieties are presented in the form of comparison of predicted and actual values.

2 MATERIAL AND METHODS

A set of Czech hops varieties (Premiant, Sládek, Agnus and Saaz) from the 2015 and 2016 harvests was used to compare the results of the determination of alpha acids by various analytical methods. Part

nými konduktometrickými metodami – EBC 7.4, ČSN 462520-15 a EBC 7.5. Jedná se o metody, které se v praxi používají nejčastěji. První dvě používají jako extrakční rozpouštědlo toluen, v metodě EBC 7.5 se používá diethylether. V dalším textu, tabulkách a obrázcích jsou výše zmíněné analytické metody uváděny jako HPLC (EBC 7.7), KH 7.4 (EBC 7.4), KH 7.5 (EBC 7.5), KH ČSN (ČSN 462520-15).

Změny vybraných analytických parametrů granulovaných chmelů (HSI, alfa a beta kyselin, KH 7.5), skladovaných za různých podmínek po dobu 12 měsíců byly hodnoceny na odrůdě Rubín. Granulované chmele byly skladovány ve vakuovaných obalech bez přístupu vzduchu při teplotách +4 a +20 °C. Další variantou byl granulovaný chmel skladovaný volně na vzduchu při teplotě 20 °C, tj. stav, který simuluje skladování protrženého obalu při pokojové teplotě. Skladovatelnost odrůdy Rubín byla vyhodnocena v průběhu přirozeného stárnutí hlávkového chmele při pokojové teplotě po dobu 12 měsíců.

Výsledky prognózování a hodnocení skutečného obsahu alfa a beta kyselin ve vybraných českých odrůdách chmele z ročníkové sklizně chmele jsou dokumentovány časovými řadami za období let 2000 až 2016 pro Žatecký červeňák a 2004–2016 pro hybridní odrůdy Premiant a Sládek. Analýzy alfa kyselin u odrůd Sládek a Premiant byly provedeny metodou HPLC. Předsklizňové odhady se analyticky hodnotí konduktometrickou metodou KH ČSN. Pro Žatecký červeňák se kombinuje analýza metodou HPLC (sklizňová prognóza) s konduktometrickou metodou dle ČSN (skutečnost).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Stanovení hořkých látek ve chmelu

Výsledky simultánního stanovení obsahu alfa kyselin ve vybraném souboru českých odrůd (Žatecký červeňák, Premiant, Sládek, Saaz Late, Kazbek) několika analytickými metodami jsou uvedeny v *tab. 1*. Část chmelů byla skladována při pokojové teplotě (T), část v klimatizovaném skladu při teplotě +3 °C (CH). Různé skladovací podmínky se výrazně odrazilily na hodnotách indexu skladování chmele. Vzorky skladované v teplu měly HSI na hranici 0,70, kdežto HSI chmelů skladovaných v klimatizovaném skladu většinou nepřesáhli hranici 0,40. Hodnoty v *tab. 1* ukazují, že analytické výsledky stanovení alfa kyselin vybranými metodami se liší, v některých případech i o desítky procent. Vzájemné porovnání analytických dat v relativních procentech je shrnuto v *tab. 2*. Srovnání je provedeno pro konduktometrické metody KH ČSN a KH 7.5 vůči HPLC metodě. Dále jsou porovnány dvě konduktometrické metody KH 7.4 a ČSN. Obě metody používají jako extrakční činidlo toluen, liší se především ve způsobu extrakce. Metoda KH 7.4 využívá speciální rychloběžné míchadlo, v metodě ČSN se chmele extrahuje v klasické třepačce. Vzájemný rozdíl těchto metod v průměrných hodnotách 11 až 12% rel. je dán především intenzitou míchání. Výsledky zjištěné metodou KH 7.4

Tab. 1 Výsledky stanovení obsahu alfa kyselin / *Table 1 Results of determination of alpha acid content*

Vzorek Sample	HPLC	KH 7.5 LCV 7.5	KH 7.4 LCV 7.4	KH ČSN LCV ČSN	HSI	Chlad/ Teplota Cold/RT
1	4.01	5.34	4.79	4.53	0.601	T
2	9.26	10.06	9.21	8.70	0.342	CH
3	6.01	6.83	6.22	5.83	0.398	CH
4	8.41	9.49	8.91	8.24	0.418	CH
5	5.98	7.57	6.93	5.89	0.667	T
6	4.63	5.57	5.07	4.45	0.565	T
7	2.39	3.49	3.01	2.53	0.618	T
8	4.20	4.86	4.51	4.21	0.472	T
9	3.27	3.98	4.22	3.76	0.546	T
10	8.08	9.04	9.81	8.8	0.326	CH
11	7.93	8.58	8.55	8.06	0.328	CH
12	6.14	7.12	6.72	5.75	0.384	CH
13	5.65	6.77	6.02	5.37	0.534	T
14	7.40	10.06	8.70	7.54	0.640	T

RT = room temperature

of the hops was stored at room temperature, another part in air-conditioned rooms at +4 °C. All samples were analyzed by liquid chromatography according to the EBC 7.7 method. (Analytica EBC, 1998), using the external calibration standard ICE 3 and three different conductometric methods - EBC 7.4, ČSN 462520-15 and EBC 7.5, which are most commonly used in practice. The first two use toluene as the extraction solvent while the EBC 7.5 method uses diethyl ether. In the following text these analytical methods are referred to as HPLC (EBC 7.7), LCV 7.4 (EBC 7.4), and LCV 7.5 (EBC 7.5), LCV ČSN (ČSN 462520-15).

Changes in selected analytical parameters of granulated hops (HSI, alpha and beta acids, LCV 7.5) were evaluated on the Rubín variety stored under different conditions for 12 months. Granulated hops were stored in vacuum packs without air access at +4 and +20 °C. Another variant was granulated hops stored freely in air at 20 °C, i.e. a condition that simulates the storage in a ruptured container at room temperature. The shelf life of the Rubín variety was evaluated during the natural aging of hops cones at room temperature for 12 months.

The results of the forecasting and evaluation of the actual alpha and beta acid content in selected Czech varieties of hops from the crop year's harvest are documented by the time series from 2000 to 2016 for Saaz and 2004-2016 for the hybrid varieties Premiant and Sládek. The alpha acid analyses of the Sládek and Premiant varieties were performed by HPLC method. Pre-harvest estimates are analytically evaluated by the conductometric LCV ČSN method. For Saaz variety the analysis by HPLC method (harvest prognosis) was combined with the conductometric method according to ČSN (reality).

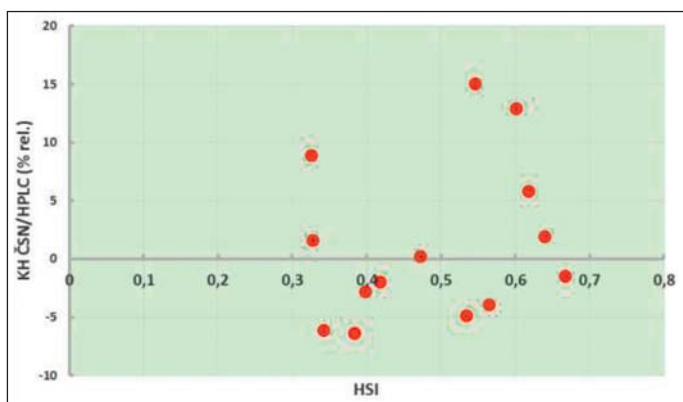
3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Determination of bitter substances in hops

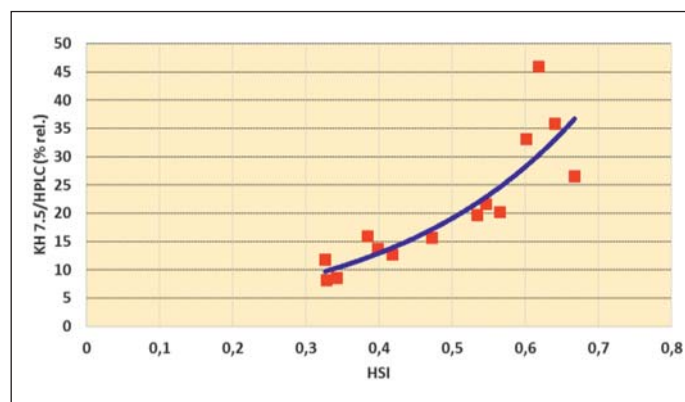
The results of the simultaneous determination of the alpha acid content in a selected set of Czech varieties (Saaz, Premiant, Sládek, Saaz Late, Kazbek) by several analytical methods are presented in *Table 1*. Part of the hops was stored at room temperature (T), part in an air-conditioned warehouse at +3 °C (CH). Different storage conditions were significantly reflected in hop storage index values. Samples stored at RT had HSI at the 0.70 limit, whereas the HSI of hops stored in the air-conditioned warehouse mostly did not exceed 0.40. *Table 1* shows that the analytical results of the determination of alpha acids by the selected methods differ, in some cases even by tens of

Tab. 2 Porovnání rozdílů analytických dat mezi metodami / *Table 2 Comparison of analytical data differences between methods*

Vzorek Sample	KH ČSN/HPLC LCV ČSN/HPLC	KH 7.5/HPLC LCV 7.5/HPLC	KH 7.4/KH ČSN LCV 7.4/LCV ČSN	HSI
	% rel.	% rel.	% rel.	
1	12.9	33.2	5.7	0.601
2	-6.1	8.6	5.9	0.342
3	-2.8	13.8	6.7	0.398
4	-2.0	12.8	8.1	0.418
5	-1.5	26.6	17.6	0.667
6	-3.9	20.3	13.9	0.565
7	5.8	46.0	18.9	0.618
8	0.2	15.7	7.1	0.472
9	15.0	21.7	12.2	0.546
10	8.9	11.9	11.5	0.326
11	1.6	8.2	6.1	0.328
12	-6.4	16.0	16.9	0.384
13	-4.9	19.8	12.1	0.534
14	1.9	35.9	15.4	0.640
Průměr / Average (% rel.)	1.3	20.7	11.3	
Medián / Median (% rel.)	-0.7	17.9	11.8	



Obr. 1 Závislost analytických rozdílů mezi metodami KH ČSN, HPLC a HSI / Fig. 1 Dependence of analytical differences between the ČSN LCV method and HPLC on HSI



Obr. 2 Závislost analytických rozdílů mezi metodami KH 7.5, HPLC a HSI / Fig. 2 Dependence of analytical differences between LCV 7.5 and HPLC on HSI

jsou systematicky vyšší. Je patrné, že intenzivní míchání (6000 min⁻¹; 8 minut) je účinnější než třepání po dobu 90 minut. Porovnání metod KH ČSN/HPLC sice ukazuje, že se v průměrných hodnotách zásadně neliší, ale rozdíly individuálních hodnot se pohybují v rozmezí od -6,4 do 15,0% rel. (tab. 2). Diference analytických dat nejsou závislé na stáří chmele, jak je patrné z grafu na obr. 1. Obdobný charakter má i závislost rozdílů mezi metodami KH 7.4 a KH ČSN na HSI.

Největší rozdíly byly zjištěny mezi metodami KH 7.5 a HPLC. Konduktometrická metoda dává v analyzovaném souboru vzorků systematicky vyšší výsledky o 15 až 20% rel. Navíc se ukázalo, že relativní rozdíly významně závisí na stáří chmele. Závislost analytických rozdílů mezi metodami KH 7.5, HPLC na HSI je uvedena na obr. 2. U dobře skladovaných chmelů je relativní rozdíl mezi těmito metodami do 15% rel., u starších chmelů může být rozdíl 40 až 50% rel. Tato skutečnost je dána vznikem četných oxidačních produktů alfa a beta kyselin, které se v diethyletheru extrahují a jsou titrovatelné roztokem octanu olovnatého.

3.2 Hořké látky a stáří chmele

V tab. 3 jsou uvedeny analytické výsledky sledování stárnutí odrůdy Rubín v granulované formě za anaerobních podmínek při dvou teplotách, pokojové a teplotě klimatizovaného skladu +4 °C. Vyšší hodnoty HSI na začátku testu jsou způsobeny 4měsíční časovou prodlevou mezi sklizní a granulací, kdy skladovací teploty nezpracovaného chmele prakticky kopírovaly venkovní teploty podzimního a části zimního období. Nejlepší kvalitativní parametry po 13 měsících skladování mají podle očekávání granulace skladované v klimatizovaných podmínkách bez přístupu vzduchu. Pokles obsahu alfa kyselin, beta kyselin i hodnot KH je výrazně pod úrovní 10% rel. Tento způsob uchovávání chmele je dnes u velkých zpracovatelů chmele běžným standardem a stejným způsobem jej skladuje i řada pivovarů. Skladování granulí bez přístupu vzduchu za normální teploty již vede k poměrně značnému úbytku alfa kyselin (30% rel.). Zajímavé je, že snížení konduktometrické hodnoty chmele je zhruba poloviční (16% rel.). Ještě menší je pokles obsahu beta kyselin (8,3% rel.). Je to dáno tím, že řada transformačních reakcí alfa kyselin, na rozdíl od beta kyselin, nevyžaduje přítomnost kyslíku (Taniguchi, 2014). Skladování granulovaného chmele za přístupu vzduchu při teplotách kolem 20 °C má na kvalitu chmele silně destruktivní vliv. Během několika týdnů je chmel pro pivovarské účely prakticky znehodnocen. V případě výše diskutované odrůdy Rubín došlo během 3 měsíců k poklesu obsahu alfa kyselin z původních 9,3% na 0,40%

percent. Mutual comparison of analytical data in relative percentages is summarized in Table 2. Comparison was performed for the conductometric methods LCV ČSN and LCV 7.5 against the HPLC method. In addition, two conductometry methods, LCV 7.4 and ČSN, were compared. Both methods use toluene as the extraction agent, and differ mainly in the extraction method. The LCV 7.4 method uses a special high-speed stirrer, in the ČSN method the hops are extracted in a conventional shaker. The difference between these methods in average values of 11 to 12% rel. is mainly due to the intensity of mixing. The results obtained by the LCV 7.4 method are systematically higher. It can be seen that intensive stirring (6000 min⁻¹, 8 minutes) is more effective than shaking for 90 minutes. Comparison of the LCV ČSN/HPLC methods shows that they do not differ significantly in average values, but the individual value differences range from -6.4 to 15.0% rel. (Table 2). As can be seen from Figure 1, differences of analytical data do not depend on the age of the hops. The dependence of the differences between the methods LCV 7.4 and LCV ČSN on HSI is similar.

Major differences were found between conductometric 7.5 and HPLC methods. In the analyzed sample set the conductometric method gives systematically 15 to 20% rel. higher results. In addition, it has been shown that relative differences depend significantly on the age of hops. The dependence of analytical differences between LCV 7.5, HPLC on HSI is shown in Fig. 2. For well-stored hops, the relative difference between these methods is up to 15% rel., in older hops it may amount to 40 to 50% rel. This fact is due to the formation of numerous oxidation products of alpha and beta acids which are extracted in diethyl ether and are titrated with lead acetate solution.

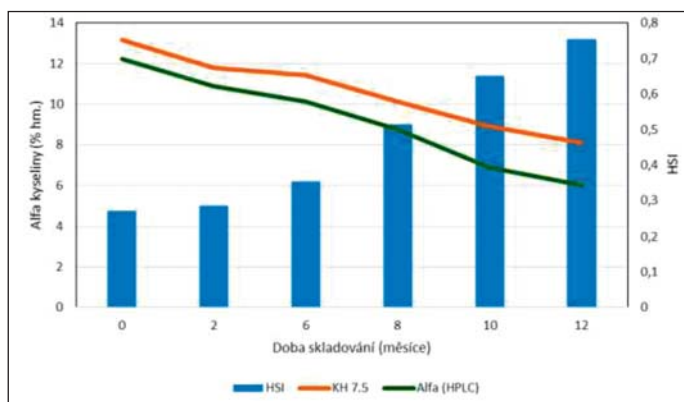
3.2 Bitter substances and age of hops

Table 3 shows the analytical results of monitoring the aging of the Rubín variety in pellet form under anaerobic conditions at two temperatures: at room and the +4 °C ones (air-conditioned store). Higher HSI values at the start of the test are due to a 4-month time lag between harvesting and granulation, during which the storage temperature of unprocessed hops practically copied the ambient temperatures of the autumn and part of the winter period. As expected, the best quality parameters after 13 months of storage were found in pellets stored in air-conditioned conditions without air access. The decrease in alpha acids, beta acids and LCV was significantly below 10% rel. This method of storing hops is currently a standard for large hop processors, and a number of breweries store it in the same way.

Tab. 3 Stárnutí odrůdy Rubín v granulích T90 / Table 3 Aging of the Rubín variety in pellets T90

(teplota /T/ = 20 °C; chladno /CH/ = +4 °C, anaerobní podmínky) / (room temperature/T/ = 20 °C, cold /CH/ +4 °C, anaerobic conditions)

Parametr Parameter	0	3 měsíce / 3 months		6 měsíců / 6 months		10 měsíců / 10 months		13 měsíců / 13 months	
		T	CH	T	CH	T	CH	T	CH
HSI	0.521	0.589	0.528	0.606	0.53	0.662	0.534	0.685	0.544
KH 7.5 / LCV 7.5	10.02	9.23	10.09	9.02	10.11	8.81	9.73	8.40	9.67
Alfa / Alpha (HPLC)	9.28	8.58	9.22	7.87	9.12	6.91	8.67	6.51	8.64
Beta (HPLC)	3.83	3.66	3.80	3.66	3.71	3.74	3.75	3.51	3.69



Obr. 3 Stárnutí odrůdy Rubín volně na vzduchu (hlávky, normální teplota, bez přístupu světla) / Fig. 3 Aging of the Rubín variety under open air (cones, room temperature, no light access)

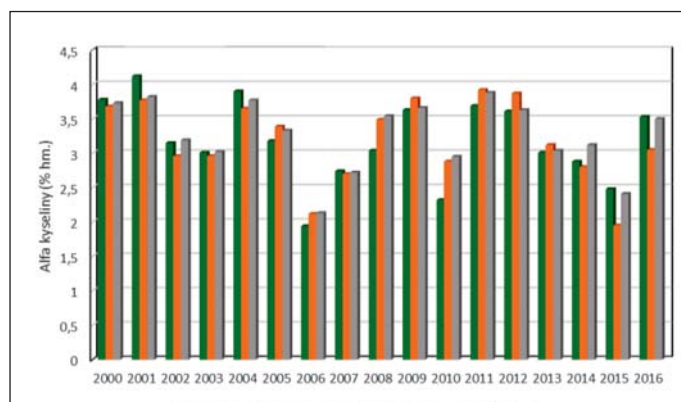
hm., obsah beta kyselin byl zanedbatelný a hodnota indexu skladování chmele přesáhla hodnotu 2,00. Konduktometrická hodnota (KH 7.5) takto zdegradovaného chmele však byla poměrně vysoká - 6,2% hm. Příčinou rychlé degradace chmelových granulí je narušení integrity lupulinových zrn, ke kterému dochází v průběhu výroby především při mletí chmele a během granulace, kdy se chmel navíc zahřívá.

Je známo, že rychlost ztráty alfa kyselin po sklizni se za srovnatelných podmínek skladování u jednotlivých odrůd liší (Mikyška a Krofta, 2012). Z tohoto důvodu se dnes při charakterizaci chmelových odrůd často uvádí tzv. skladovatelnost (*storage*). Je definována jako relativní úbytek alfa kyselin po 6 měsících skladování hlávkového chmele volně na vzduchu při teplotě 20 °C. Průběh skladovacího pokusu za podmínek, které umožňují tento parametr stanovit pro odrůdu Rubín, je uveden na obr. 3. Protože byl založen bezprostředně po sklizni, je startovací hodnota HSI < 0,30. Obsah alfa kyselin poklesl z hodnoty 12,22% hm. na 10,11% hm. po 6 měsících. Relativní úbytek alfa kyselin tak činil méně než 20% rel., což řadí odrůdu Rubín mezi chmele s dobrou skladovatelností, společně s odrůdami Galena či Nugget. Za nejstabilnější je z hlediska skladovatelnosti považována odrůda Cluster s úbytkem alfa kyselin < 10% rel. (Nickerson a Likens, 1979).

3.3 Vliv ročníku na obsah hořkých látek ve chmelu

Na obr. 4 jsou znázorněny obsahy alfa kyselin v Žateckém červeňáku v období 2000 až 2016. Každý ročník je charakterizován trojicí analytických dat pro předsklizňový odhad, sklizňovou prognózu a skutečnost. Výsledky jsou prezentovány pro Žateckou chmelařskou oblast, protože počet vzorků je vzhledem k přesné ploše zdaleka nejvyšší v porovnání s oblastí Úštěckou a Tršickou. Je patrné, že výsledné ročníkové hodnoty vykazují velmi dobrou shodu, přestože byly získány z různých velikých souborů vzorků a hodnoceny dvěma analytickými metodami. Zejména předsklizňové odhady mohou být zatíženy řadou systematických nejistot (např. každá individuální hodnota má stejnou váhu, bez ohledu na rozsah pěstování v dané lokalitě, obsah alfa kyselin se může měnit ještě v průběhu sklizně, což prognostickým modelem nelze v plné míře podchytit aj.). Rozdíly mezi min. a max. hodnotami v trojici analytických dat, které charakterizují každý ročník, nepřesahují zpravidla 0,5% hm. Obr. 4 velmi dobře dokumentuje značné meziroční rozdíly v obsahu alfa kyselin, které jsou determinovány především průběhem povětrnostních podmínek v období červen-srpen (Kučera a Krofta, 2009). Průměrné obsahy alfa kyselin v ŽPČ se v hodnoceném období pohybovaly v intervalu 2 až 4% hm. Dva ročníky, 2006 a 2015, s průměrnými obsahy alfa kyselin pod 2,5% hm. z časové řady značně vybočují. Povětrnostní podmínky v těchto letech mají společný rys – vysoké teploty v letním období s nedostatkem srážek. Výsledkem jsou nízké výnosy chmele a podprůměrné obsahy alfa kyselin. Takové extrémní podmínky postihují většinou celou střední Evropu včetně Německa, což ovlivňuje trh se chmelem v celosvětovém měřítku.

Na obr. 5 a 6 jsou znázorněny obsahy alfa kyselin ve chmelech Sládek a Premiant v období 2004 až 2016. Každý ročník je charakterizován dvojicí analytických dat pro sklizňovou prognózu a skutečnost. Výsledky jsou opět prezentovány pro Žateckou chmelařskou oblast. U odrůdy Sládek byly hodnoty sklizňového odhadu ve většině případů nižší oproti skutečnosti, rozdíl v obsahu alfa kyselin mezi sklizňovým odhadem a skutečností se pohyboval mezi 0,2–0,5%



Obr. 4 Obsahy alfa kyselin v Žateckém červeňáku v žatecké oblasti v období 2000 až 2016 / Fig. 4 Content of alpha acids in the Saaz variety in the Žatec region between 2000 and 2016

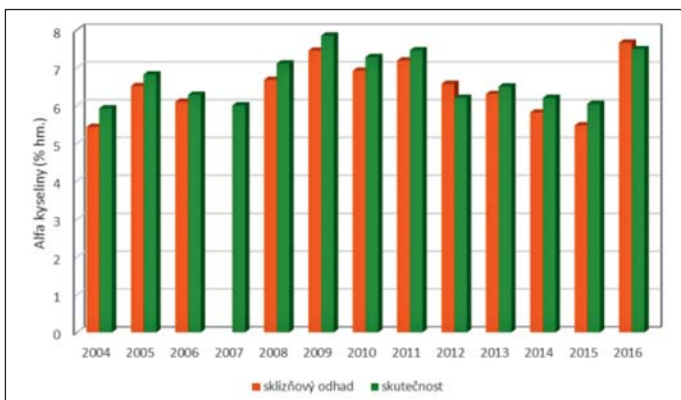
Storage of pellets without access to air at normal temperatures already leads to a relatively significant decrease in alpha acids (30% rel.). Interestingly, the reduction in the conductometric value of hops is only roughly half that (16% rel.). Even lower is the decrease in beta acid content (8.3% rel.). This is due to the fact that unlike in beta acids, a number of transformation reactions of alpha acids do not require the presence of oxygen (Taniguchi, 2014). Storage of granulated hop in air at temperatures around 20 °C has a strong destructive effect on the quality of hops. Within a few weeks the hops for brewing purposes are virtually devalued. In the case of the Rubín variety discussed above, the alpha acid content dropped from 9.3% to 0.40% by weight in 3 months, the beta acid content was negligible and the hop storage index exceeded 2.00. However, the conductometric value (LCV 7.5) of this degraded hops was relatively high - 6.2% w/w. The cause of the rapid degradation of the hop granules is the disruption of the integrity of the lupuline grains, which occurs during the production, especially during the grinding of hops and during granulation, when the hops are additionally heated.

It is known that the rate of loss of alpha acids after harvesting is different under comparable storage conditions for different varieties (Mikyška and Krofta 2012). For this reason, so-called shelf life is often referred to in the characterization of hop varieties. It is defined as the relative reduction of alpha acids after 6 months of free-air hop cone storage at 20 °C. The course of the storage experiment under conditions that allow this parameter to be determined for the Rubín variety is shown in Fig. 3. Because it was started immediately after the harvest, the starting value of HSI is <0.30. The alpha acid content dropped from 12.22% by weight to 10.11% by weight after 6 months. Relative alpha acid loss was less than 20% rel., classing the Rubín variety among hops with good shelf life, along with the Galena or Nugget varieties. The Cluster variety with an alpha acid loss of <10% rel. is considered the most stable (Nickerson and Likens, 1979).

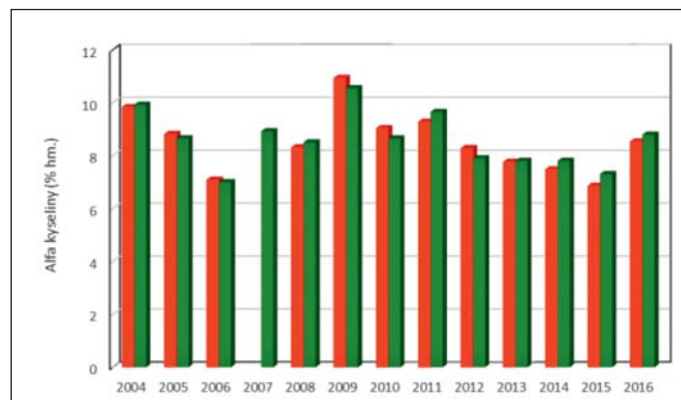
3.3 Influence of crop year on the content of bitter substances in hops

Fig. 4 shows the alpha acid content in Saaz variety in the period 2000 to 2016. Each crop year is characterized by three analytical data for pre-harvest estimation, harvest prognosis and reality. The results are presented for the Žatec hop growing region, because the number of samples in relation to the growing area is far higher than that in the Úštěk and Tršice regions. It can be seen that the final crop year values show very good agreement, although they were obtained from different sets of samples and evaluated by two analytical methods. Pre-harvest estimates can be burdened by a number of systematic uncertainties (e.g. each individual value has the same weight regardless of the range of cultivation at the site, and the alpha acid content may change during the harvest which cannot be fully taken into account by the prognostic model). Differences between minimum and maximum values in the set of three analytical data that characterize each vintage do not generally exceed 0.5% by weight.

Fig. 4 documents very well the significant year-to-year differences in alpha acid content, which are determined mainly by weather conditions in June-August (Kučera and Krofta, 2009). The average alpha acid content in the Saaz variety in the period under review was in the range of 2 to 4% w/w. Two years, 2006 and 2015, with an average alpha acid content below 2.5% by weight significantly deviate from the time series. Weather conditions in these years have had

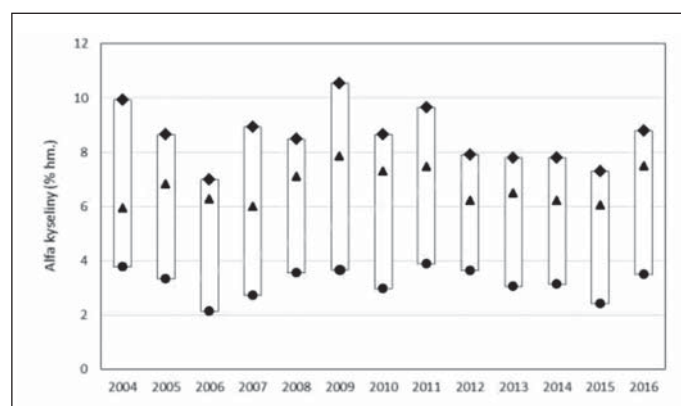


Obr. 5 Obsahy alfa kyselin v odrůdě Sládek v Žatecké oblasti v období 2004 až 2016 / Fig. 5 Content of alpha acids in the Sládek variety in the Žatec region between 2004 and 2016



Obr. 6 Obsahy alfa kyselin v odrůdě Premiant v Žatecké oblasti v období 2004 až 2016 / Fig. 6 The alpha acid content of the Premiant variety in the Žatec region between 2004 and 2016

hm. (průměr -0,26% hm.), tedy od 3 do 8% relativních (průměr -3,8% rel.). Pro chmele Premiant byly kladné a záporné odchylky mezi odhadem a skutečností vyvážené, rozdíl mezi sklizňovým odhadem a skutečností byl od 0,1–0,4% hm., tedy 0,9 až 6% rel. Vezmeme-li v úvahu velikost souborů, méně než poloviční počet vzorků ve sklizňové prognóze a zčásti odlišné lokality oproti souboru vzorků „skutečnosti“, je opět patrná dobrá shoda dat ze sklizňové prognózy a finálního hodnocení, o čemž svědčí i korelace dat pro Sládek i Premiant ($r = 0,93$ resp. $r = 0,97$). U chmelů obou odrůd jsou zřetelné meziroční rozdíly v obsahu alfa kyselin, pro Sládek v rozpětí 6–8% hm. a Premiant 7 až 10,5% hm. Jak je patrné z obr. 7, porovnání dat skutečnosti pro odrůdy Žatecký červeňák, Sládek a Premiant v období 2004 až 2016, je obsah alfa kyselin u různých odrůd průběhem počasí v konkrétním roce ovlivněn různou měrou, jedním z důvodů je různá vegetační doba odrůd a tím daný termín sklizně.



Obr. 7 Porovnání obsahů alfa kyselin v odrůdách ŽPČ, Sládek a Premiant v Žatecké oblasti v období 2004 až 2016 / Fig. 7 Comparison of alpha acid contents in the Saaz, Sládek and Premiant varieties in the Žatec region between 2004 and 2016

4 ZÁVĚR

Kvantitativní hodnota obsahu alfa kyselin ve chmelu a chmelových výrobcích je značně ovlivněna použitou analytickou metodou. Protože od toho se odvíjí stanovení dávky chmele pro chmelovar, lze pro pivovarskou praxi doporučit některou z konduktometrických metod. Při volbě analytické metody je důležité používat stále stejnou, nejlépe KH 7.5. Na rozdíl od dalších konduktometrických metod zohledňuje i stáří chmele a hořící vydatnost některých degradačních produktů alfa a beta kyselin. Metoda HPLC (EBC 7.7) měří pouze obsah čistých alfa a beta kyselin. Skutečný hořící potenciál chmele je tak částečně podhodnocen. Nespornou výhodou konduktometrických metod je i nižší cena za analýzu v porovnání se stanovením kapalinovou chromatografií.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky, projekty RO1916 „Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin“ a QJ1610202 „Vývoj nových plodin s cílem produkce výrobků s vyšší výživovou hodnotou“.

LITERATURA / REFERENCES

- Algazzali V., Shellhammer T., 2016: Bitterness Intensity of Oxidized Hop Acids: Humulinones and Hulupones. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 74(1): 36–43.
- Almaguer C., Gastl M., Arendt E.K., Becker, T., 2012: Contributions of Hop Hard Resins to beer Quality. *BrewingScience*, 65, 118–128.
- ČSN 462520, 1997: Česká technická norma, Zkoušení chmele ČSN 462520, část 15, Stanovení konduktometrické hodnoty chmele. Český normalizační institut, 1997.
- EBC Analysis committee, 1998: Analytica EBC, Hans Carl Getränke Fachverlag, Nürnberg, Methods 7.4, 7.5, 7.7.
- Krofta, K., Mikyška, A., Hervert, J., Dušek, M., 2015: Hop Beta Acids, from Hops to Beer. *Acta Horticulturae* (v tisku).
- Krofta, K., Mikyška, A., Tichá, J., 2012: Ročníkové prognózy obsahu alfa kyselin v českých chmelech. *Kvasný Prům.*, 58 (9): 256–263.
- Kučera, J., Krofta, K., 2009: Mathematical Model for Prediction of Alpha Acid Contents from Meteorological Data for Saaz Aroma Variety. *Acta Horticulturae* 848: 131–139.

a common feature – high temperatures in the summer with no precipitation. The result is low hop yields and below-average alpha acid content. Such extreme conditions affect mostly the whole of Central Europe, including Germany, which in turn affects the global hops market.

Figures 5 and 6 show the alpha acid content in Sládek and Premiant hops in the period 2004 to 2016. Each crop year is characterized by a pair of analytical data for the harvest prognosis and reality. The results are again presented for the Žatec hop field. In the case of the Sládek variety, the harvest estimation values were in most cases lower than reality, and the difference in the alpha acid content between the harvest estimate and the reality ranged between 0.2–0.5% w/w (average -0.26% by weight), i.e. from 3 to 8% relative (mean -3.8% relative). The positive and negative differences between the harvest estimate and the reality for Premiant hops between the estimate and the reality was 0.1–0.4% w/w, i.e. 0.9 to 6% rel. Considering the size of the sample sets, i.e. less than half the samples in the harvest forecast and partially different locations compared to the set of „real“ samples, we can again see a good match of the data from the harvest forecast and the final evaluation, as evidenced by the data correlation for Sládek and Premiant ($r = 0,93$ or $r = 0,97$). The hops of both varieties evince distinct year-to-year differences in alpha acid content, ranging for Sládek from 6 to 8% by weight and for Premiant from 7 to 10.5% by weight. As can be seen from Fig. 7 that shows, the comparison of the actual data for the varieties Saaz, Sládek and Premiant in the period 2004 to 2016, the alpha acid content of different varieties is influenced by different weather patterns in a particular year, one of the reasons being different vegetation period of different varieties and thus the term of harvest.

- Likens, S. T., Nickerson, G. B., Zimmermann, C. E., 1970: An Index of Deterioration in Hops. ASBC Proceedings, 68–74.s
- Mikyška, A., Krofta, K., 2012: Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. J. Inst. Brew., 118(3): 269–279.
- Nickerson, G. B., Likens, S. T., 1979: Hop Storage Index. J. Am. Soc. Brew. Chem. 37(4): 184–187.
- Salač, V., Dyr, J., 1944: Gambrinus 5 (72): 63.
- Stevens, R., Wright, D., 1961: Hulupones and the significance of beta acids in brewing. J. Inst. Brew. 67: 496–501.
- Taniguchi, Y., Taniguchi, H., Matsukura, Y., Kawachi, Y., Shindo, K., 2014: Structural Elucidation of Humulone Autoxidation Products and Analysis of Their Occurrence in Stored Hops. J. Nat. Products, 77: 1252–1261.
- Vollmer, D. M., Algazzali, V., Shellhammer, T. H., 2017: Aroma Properties of Lager Beer Dry-Hopped with Oxidized Hops. J. Am. Soc. Brew. Chem. 75(1): 22–26.
- Wöllmer, W., 1930: Wochenschr. Brauerei 47: 521.

Do redakce došlo / Manuscript received: 06/07/2017
Přijato k publikování / Accepted for publication: 13/08/2017

4 CONCLUSIONS

The quantitative value of alpha acid content in hops and hop products is greatly influenced by the analytical method used. Since the determination of the hops dose for hopping is based on this, one of the conductometric methods can be recommended for brewing practice. When choosing an analytical method, it is important to use always the same, most preferably LCV 7.5. Unlike other conductometric methods, it also takes into account the age of the hops and the bittering yield of some alpha and beta acid degradation products. The HPLC method (EBC 7.7) measures only the content of pure alpha and beta acids. The real bittering potential of hops is thus partially underestimated. The undisputed advantage of conductometric methods is the lower price for analysis compared to the liquid chromatographic determination.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, projects RO1916 „Quality and processing of malt and brewery raw materials“ and QJ1610202 „Development of new crops with the aim of producing products with a higher nutritional value“.

Translated by Eva Paterson