



HOPFEN

R U N D S C H A U

International Edition of the German Hop Growers Magazine

2016/2017



B 3848 E - Pokorny Design München

UNSER REINHEITSGEBOT

5 Jahre

Vier Zutaten. Sonst nichts.

Veranstaltungen
Events

Sonderveröffentlichung
Special Edition

Auszug aus / Excerpt from Hopfen-Rundschau International 2016/2017

Hartharze

Neue Erkenntnisse über eine altbekannte Hopfenfraktion

Hard resins

New findings about a familiar hop fraction

Dr. Martin Biendl und Sandro Cocuzza, Hopsteiner



Hartharze

Neue Erkenntnisse über eine altbekannte Hopfenfraktion

Bei den Hartharzen handelt es sich um die vorwiegend polaren (gut wasserlöslichen) Bitterstoffe des Hopfens. Definitionsgemäß ist diese Fraktion nur in Methanol löslich, nicht jedoch in Hexan. Selbst frischer (noch nicht getrockneter) Hopfen weist ca. 10 % Hartharze relativ zum Gesamtharz auf. Der Rest sind die (in Hexan löslichen) Weichharze mit den Alpha- und Beta-Säuren als Hauptkomponenten. Diese Einteilung der Hopfenharze hat Wöllmer bereits vor 100 Jahren eingeführt.

Während man den Hartharzen in der Vergangenheit eher eine geringe Bedeutung zugesprochen hat, rückt diese Fraktion heute aus den folgenden Gründen immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses:

1. In den letzten Jahren wurden bei Xanthohumol und anderen Prenylflavonoiden des Hopfens diverse physiologisch und pharmakologisch positive Eigenschaften entdeckt. Diese Verbindungen liegen alle im Hartharz von frischen Hopfen vor und bilden sogar dessen Hauptbestandteile.
2. Da es sich bei den Hartharzen um polare und somit gut wasserlösliche Verbindungen handelt, kann man davon ausgehen, dass diese bei der Technologie der Kalthopfung sehr effizient in das Bier übergehen.
3. Moderne analytische und sensorische Methoden ermöglichen es heute, die Geschmacks- und Aromabeiträge einzelner Komponenten zu ermitteln, auch wenn diese im Lebensmittel nur in geringer Konzentration vorliegen.

In diesem Beitrag wird nun vor allem auf Punkt 3 näher eingegangen. Dass neben den Alpha-Säuren noch andere Hopfenbitterstoffe für den Biergeschmack wichtig sind, ist in der Brauwissenschaft unumstritten (1).

Identifizierung sensorisch aktiver Einzelkomponenten der Hartharzfraktion

Die Entschlüsselung des Beitrags von Einzelkomponenten der Hartharzfraktion zur Bierbittere geht in erster Linie auf die Dissertation von Michael Dresel zurück („Struktur und sensorischer Beitrag von Hopfenharzen zum Bittergeschmack von Bier sowie zellbasierte Studien zu deren Resorption und Metabolismus“, Technische Universität München, Verlag Dr. Hut, München 2013). Erste Teile davon sind inzwischen auch in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift publiziert (2).

Dieser Arbeit liegen die folgenden methodischen Arbeitsschritte zugrunde, wie sie heute in der modernen Aromaforschung etabliert sind:

1. Isolierung sensorisch aktiver Einzelkomponenten.
2. Identifizierung ihrer chemischen Strukturen.

Hard resins – New findings about a familiar hop fraction

Hard resins are more the polar (water-soluble) bitter substances of the hop. By definition this fraction is only soluble in methanol, but not in hexane. Even fresh hops (not yet dried) have approx. 10% hard resin relative to the total resin. The remainder is the soft resins (soluble in hexane) with the alpha acids and beta acids as main components. Wöllmer introduced this classification of hop resins 100 years ago.

Whereas in the past little attention was paid to hard resins, today this fraction is attracting ever more interest for the following reasons:

1. *In recent years, diverse positive physiological and pharmacological properties have been discovered in the xanthohumol and other prenylflavonoids in hops. All these compounds are in the hard resin of fresh hops and are even their main components.*
2. *Since hard resins are polar and thus water-soluble compounds, it can be assumed that they are transferred very efficiently to the beer with dry hopping.*
3. *Today, modern analytical and sensory methods make it possible to determine the taste and aroma of individual components even if they are only present in very small concentrations in the foodstuff.*

In this article we will be taking a closer look at point 3 in particular. The fact that in addition to alpha acids other hop bitter substances are important for the taste of the beer is indisputable among brewers (1).

Identification of sensorily active components of the hard resin fraction

This article's decryption of the separate components of the hard resin fraction for beer bitterness is based primarily on the dissertation of Michael Dresel ("Structure and sensory contribution of hop hard resins to the bitter taste of beer as well as cell-based studies on their resorption and metabolism", Technische Universität München, published by Verlag Dr. Hut, München 2013). First excerpts of this have also already been published in a scientific journal (2).

This work is based on the method below as established today in modern aroma research.

1. *Isolation of sensorily active components.*
2. *Identification of their chemical structures.*
3. *Characterization of their sensory properties, i.e. determination of the flavor perception threshold concentration and the flavor tendency, possibly combined with receptor tests (examination of the interaction of components with isolated human receptor cells, in this case with the receptors known for recognizing bitterness).*

hard resins

3. Charakterisierung ihrer sensorischen Eigenschaften, d. h. Bestimmung der geschmacklichen Wahrnehmungsschwellenkonzentration sowie der Geschmacksrichtung, evtl. kombiniert mit Rezeptortests (Prüfung einer Wechselwirkung von Einzelkomponenten mit isolierten menschlichen Rezeptorzellen, in diesem Fall mit den für die Wahrnehmung der Bittere bekannten Rezeptoren).
4. Exakte Konzentrationsbestimmung der Einzelkomponenten im Lebensmittel.
5. Rekombinationsexperimente (Zugabe der Einzelkomponenten, in diesem Fall zu nicht gehopftem Bier).

Auf diese aufwendigen Untersuchungen kann hier nicht im Detail eingegangen werden. Aus der Zusammenfassung der Dissertation von Dresel sollen lediglich die folgenden wesentlichen Erkenntnisse zitiert werden:

1. „Brauerexperimente mit Hart- und Weichharz demonstrierten, dass der Bittergeschmack insbesondere die Bitterqualität, eines fertigen Bieres durch das Hartharz positiv beeinflusst wird.“
2. „Durch die Kombination analytischer Trenntechniken und der molekularsensorischen Arbeitsweise ist es gelungen über 40 Bitterstoffe, darunter 10 bislang unbekannte Verbindungen, des Hartharzes zu isolieren und strukturell zu charakterisieren.“
3. „Durch Rekombinationsexperimente wurde bewiesen, dass alle bitterschmeckenden Schlüsselgeschmacksstoffe von Bier erfolgreich analytisch erfasst wurden. Darüber hinaus wurde das Bier als harmonisch-abgerundet und biertypisch bewertet.“

Das Vorkommen der über 40 aus dem Hartharz isolierten Bitterstoffe konnte Dresel in einem weltweiten Sortiment von 75 (!) unterschiedlichen Hopfensorten bestätigen. Auch deren Verhalten während der Lagerung (von Hopfenpellets) und während der Hopfenextraktion (mit Kohlendioxid bzw. Ethanol) wurde von ihm untersucht.

Die wichtigsten von Dresel identifizierten Einzelkomponenten lassen sich zwei unterschiedlichen Verbindungsklassen zuordnen:

1. Glucopyranoside (hauptsächlich an den Zucker Glukose gebundene Multifidole und Flavonole wie Quercetin oder Kaempferol).
2. Prenylflavonoide mit der Hauptkomponente Xanthohumol, die ihren Beitrag zur Bittere teilweise auch in Form von Folgeprodukten (z. B. Isoxanthohumol) nach chemischer Umwandlung während der Würzekochung leisten.

Beispielhaft sind einige chemische Strukturen dieser beiden Verbindungsklassen in Abbildung 1 dargestellt. Multifidol-Glukoside wurden erstmals 2005 aus Hopfen isoliert (3). Diese Verbindungen stellen Zwischenprodukte der Biosynthese von Alpha- und Beta-Säuren dar

4. *Exact determination of concentration of the components in the foodstuff.*
5. *Recombination experiments (addition of the separate components, in this case to unhoppled beer).*

We cannot deal with these complex examinations in detail here. We just quote the main findings taken from the summary of Dresel's dissertation:

1. *“Trial brews with hard and soft resins demonstrated that the bitter taste, in particular the bitter quality of a finished beer is positively influenced by hard resin.”*
2. *“By combining analytical separating techniques and molecular sensory methods it was possible to isolate and structurally characterize over 40 bitter substances of the hard resin including 10 previously unknown compounds.”*
3. *“Through recombination experiments it was proven that all the bitter-tasting key flavors of beer had been successfully analyzed. Furthermore, the beer was assessed as harmoniously rounded and typical to beer.”*

Dresel was able to confirm the occurrence of over 40 bitter substances isolated from the hard resin in a worldwide selection of 75 (!) different hop varieties. He also examined the behavior of the hops during storage (as hop pellets) and during hop extraction (with carbon dioxide or ethanol).

The most important components identified by Dresel can be sorted into two different compound classes:

1. *Glucopyranosides (mainly multifidols and flavonols bound to sugar (glucose) like quercetin and kaempferol).*
2. *Prenylflavonoids with the main component xanthohumol which contribute to the bitterness partly also in the form of secondary products (like isoxanthohumol) after chemical transformation during wort boiling.*

Figure 1 shows a number of chemical structures from both of these compound classes.

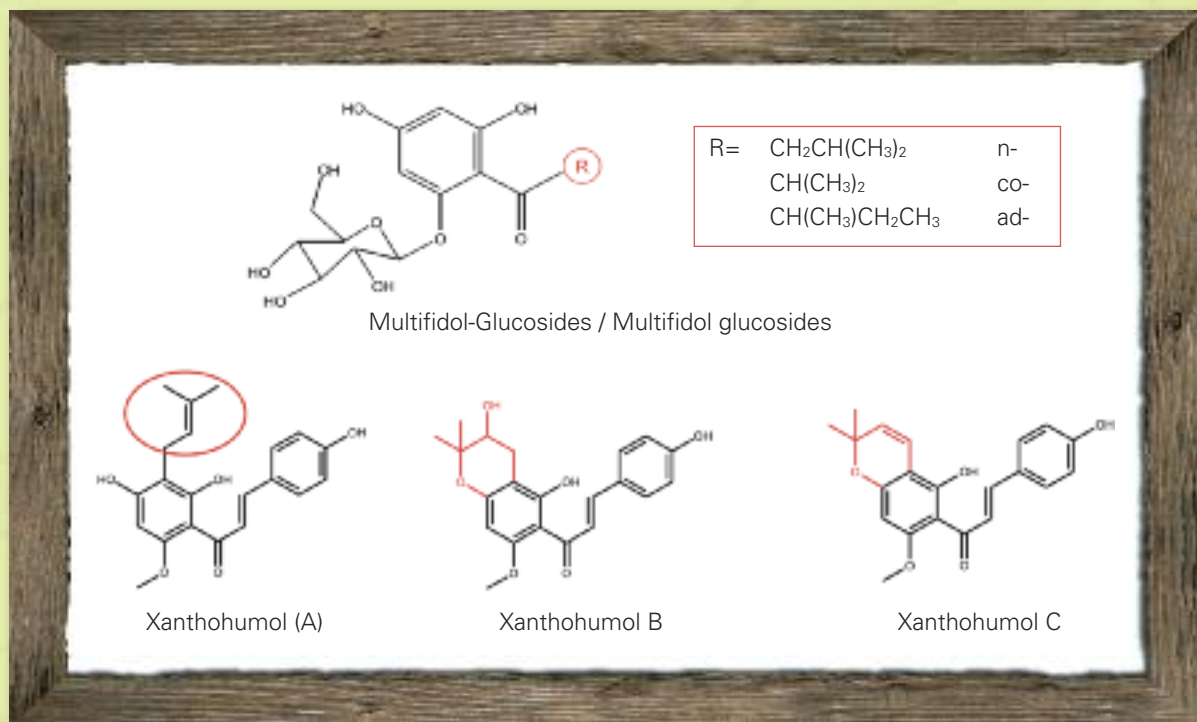
Multifidol glucosides were first isolated from hops in 2005 (3). These compounds are intermediate products of the biosynthesis of alpha and beta and therefore have the same (acyl) side chains as these bitter substances. Surprisingly however it has not yet been possible to verify the n-homolog in hops.

Both multifidol glucosides and prenylflavonoids are typical for hops and are otherwise rare in the plant world. Flavonols on the other hand are widespread in nature and are also very well known above all for their positive health properties. Thus quercetin is considered to be one of the most effective natural antioxidants known.

The xanthohumol compound was discovered in hops already back in 1913. The definitive structure determination came in 1961. Later, a series of other compounds

Abbildung 1:
Chemische Strukturen
von im Hartharz
enthaltenen Multi-
fidol-Glukosiden
und verschiedenen
Prenylflavonoiden
(rot markierte
Prenyl-Gruppe)

Figure 1:
Chemical structures
of multifidol
glucosides and
various prenyl
flavonoids (red
marked prenyl group)
present in hard resins



und weisen daher dieselben (Acyl-)Seitenketten wie diese Bitterstoffe auf. Erstaunlicherweise konnte man jedoch das n-Homologe in Hopfen bislang noch nicht nachweisen.

Sowohl die Multifidol-Glukoside als auch alle Prenylflavonoide sind typisch für Hopfen und treten sonst nur selten im Pflanzenreich auf, während Flavonole in der Natur weitverbreitet und vor allem aufgrund ihrer gesundheitlich positiven Eigenschaften auch sehr bekannt sind. So gilt Quercetin als einer der wirksamsten antioxidativ aktiven Naturstoffe, die man kennt.

Die Verbindung Xanthohumol wurde bereits 1913 in Hopfen entdeckt. Die endgültige Strukturaufklärung erfolgte 1961. Später wurde eine Reihe weiterer Verbindungen mit ähnlichem chemischen Aufbau nachgewiesen, die man dann als Xanthohumol B, C usw. bezeichnete. Zu den Prenylflavonoiden zählen aber auch Verbindungen mit deutlich abweichenden Strukturen, denen nur noch die Prenyl-(Isopentenyl-)Seitenkette bzw. deren oxidierte oder cyclisierte Form gemeinsam sind. Verbindungen mit Xanthohumol-ähnlicher (Chalcon-)Struktur können sich während der Würzekochung umwandeln, wobei die (modifizierte) Prenylgruppe stets erhalten bleibt. Zwei Beispiele derartiger Reaktionen zeigt Abbildung 2. Zur Ermittlung des Geschmacksbeitrags im Bier ist dann nicht mehr nur die ursprünglich im Hartharz vorliegende Komponente zu berücksichtigen, sondern auch das Umwandlungsprodukt.

Nach deren Isolierung konnte Dresel die über 40 Hartharzkomponenten (inklusive entsprechender Umwandlungsprodukte) sensorisch alle einzeln beurteilen. Außerdem dienten die isolierten Substanzen als Kalibrierstandards zur exakten Analyse (mittels HPLC-Massenspektroskopie) von Hopfen, Hopfenprodukten und Bier. Ein direkter Geschmacksbeitrag ist nur anzuneh-

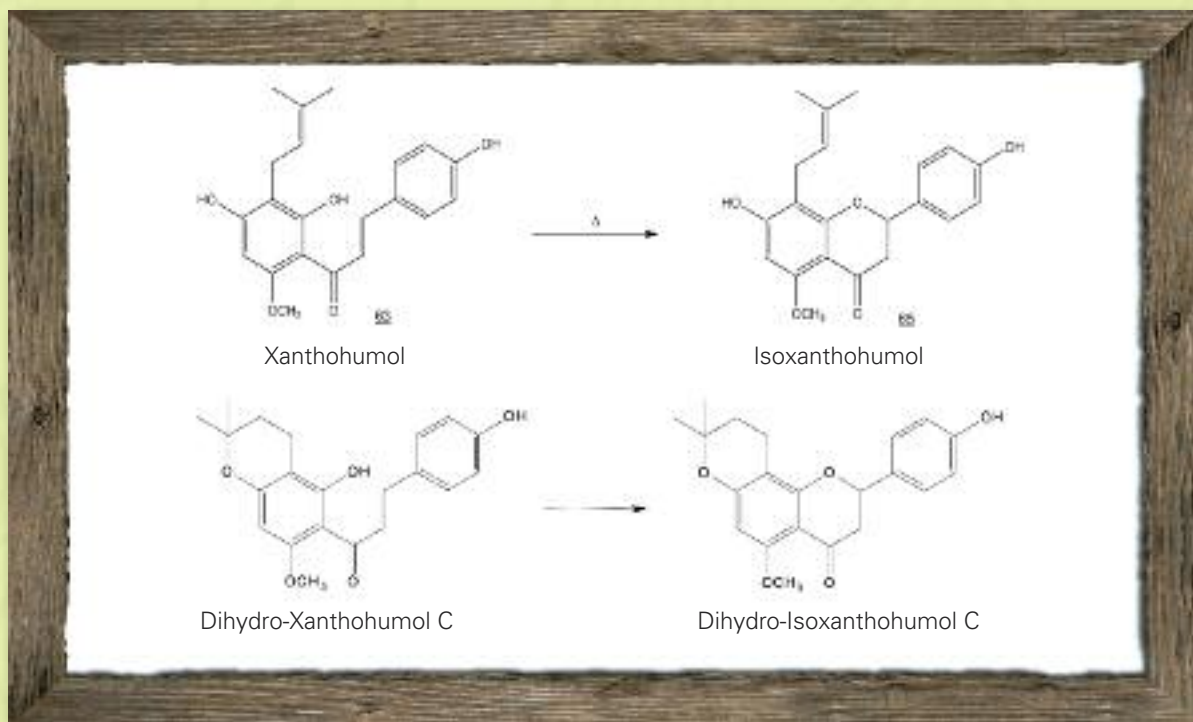
with similar chemical structures were proven, which were designated as xanthohumol B, C and so on. Also counted as prenylflavonoids however are compounds with significantly different structures which have only the prenyl (isopentenyl) side chain or its oxidized or cyclized form in common. Compounds with a xanthohumol-like (chalcone) structure can transform during the wort boil whereby the (modified) prenyl group is always preserved. Figure 2 shows two examples of such reactions. To determine the flavor contribution in the beer we should take into account no longer only the component originally in the hard resin, but also the transformation product.

After isolating them, Dresel could sensorily assess each of the over 40 hard resin components (including the associated transformation products). Furthermore, the isolated substances served as calibration standards for the exact analysis of hops, hop products and beer (using HPLC mass spectrometry). A direct flavor contribution can only be assumed if the determined concentration of a compound in the foodstuff is higher than its perception threshold concentration (flavor threshold value). You can assume additive effects if different components interact with the same flavor receptors. In this way even concentrations below the flavor threshold value can be relevant.

Table 1 shows the threshold values for flavor perception of the major hard resin components (or their transformation products) compared with the frequency of exceeding this flavor threshold concentration in the examination of 88 (!) samples of commercially available international beers. It can be seen that it is prevalently the glucopyranosides that make a direct contribution to the beer bitterness. In contrast the prenylflavonoids, with one single exception, are constantly under their flavor threshold. But even then, a contribution to the beer bitterness via the additive effects is still to be taken into account, because these might well interact with all the same receptors as the iso-alpha

Abbildung 2:
Chemische
Umwandlung von
Prenylflavonoiden
während der
Würzekochung

Figure 2:
Chemical conversion
of prenylflavonoids
during wort boiling



men, wenn die ermittelte Konzentration einer Verbindung im Lebensmittel höher ist als seine Wahrnehmungsschwellenkonzentration (Geschmacksschwellenwert). Von additiven Effekten kann man ausgehen, wenn verschiedene Komponenten mit denselben Geschmacksrezeptoren in Wechselwirkung treten. Dadurch können auch Konzentrationen unter dem Geschmacksschwellenwert relevant werden.

Tabelle 1 zeigt die Schwellenwerte für die geschmackliche Wahrnehmung der wichtigsten Hartharzkomponenten (bzw. von deren Umwandlungsprodukten) im Vergleich zur Häufigkeit einer Überschreitung dieser Geschmacksschwellenkonzentration in insgesamt 88 (!) untersuchten kommerziell erhältlichen internationalen Bierproben.

Dabei wird ersichtlich, dass vor allem die Glucopyranoside sehr häufig einen direkten Beitrag zur Bierbittere leisten. Dagegen liegen die Prenylflavonoide bis auf eine einzige Ausnahme stets unter ihrer Geschmacksschwelle vor. Selbst dann ist jedoch ein Beitrag zur Bierbittere über additive Effekte zu berücksichtigen, da diese vermutlich alle mit denselben drei Rezeptoren (hTAS2R1, hTAS2R14, hTAS2R40) in Wechselwirkung treten können wie die Iso-Alpha- und Alpha-Säuren. Dies ist zumindest für einige Leitsubstanzen wie Xanthohumol oder Isoxanthohumol erwiesen (4). Einen additiven Effekt der Gesamtheit aller aus dem Hartharz isolierten Prenylflavonoide bestätigte Dresel schließlich in Rekombinationsexperimenten durch Zugabe entsprechender Einzelsubstanzen zu nicht gehopftem Bier (2).

Glykosidisch gebundene Verbindungen können mit den oben erwähnten Bitterrezeptoren nicht in Wechselwirkung treten. Sie wirken über andere Mechanismen, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Erwähnenswert ist, dass die Glykoside von Quercetin und Kaempferol zunächst eine adstringierende Geschmackswahrnehmung

and alpha acids (hTAS2R1, hTAS2R14, hTAS2R40). This has been proven for at least a number of key substances like xanthohumol and isoxanthohumol (4). An additive effect of all the prenylflavonoids isolated from the hard resin is finally confirmed by Dresel in recombination experiments through the addition of corresponding substances to unhoppled beer (2).

Glycosidically bound compounds cannot interact with the above-mentioned bitter receptors. They work via other mechanisms for which there are still no complete explanations. It is worth mentioning that the glycosides of quercetin and kaempferol initially evoke an astringent flavor which is however overlaid by the bitter taste at higher concentrations. In contrast, the multifidol glucosides and all the prenylflavonoids are perceived exclusively as bitter.

It should also be pointed out that the only time the flavor threshold value was exceeded with the prenylflavonoids was in the case of a stout with a particularly high xanthohumol content of 4.5mg/l. As is known from the literature, a high portion of roasted malt results in more xanthohumol being retained than in lighter beers (5). In the case of isoxanthohumol, the maximum content of 4.9mg/l found in the 88 beers that were tested was only just under its flavor threshold value of 5.6mg/l.

Trial brews with special hop products rich in hard resins

For his dissertation Dresel also made trial brews with hop products that are highly enriched with hard resins. Since this fraction is not extracted using the usual procedure with supercritical carbon dioxide, the resulting residue (spent hops) is ideal for this sort of examination. Here it was established that the spent hops from the carbon dioxide extraction provided a beer bitterness that is described as pleasant and harmonious.

In order to verify these results through independent examinations and to exclude a negative influence of the hard

Tabelle / Table 1		
Verbindungsklasse Compound class	Geschmacksschwelle Flavor threshold mg/l	Prozentsatz an Bieren mit Konzentration über der Geschmacksschwelle Percentage of beers with concentration exceeding the flavor threshold
Glucopyranoside:		
Quercetin-Glukosid	0,9	86%
Kaempferol-Glukosid	0,5	95%
Kaempferol-Malonylglukosid	2,7	1%
co-Multifidol-Glukosid	1,8	54%
ad-Multifidol-Glukosid	3,7	2%
Prenylflavonoide:		
Xanthohumol	3,5	1%
Isoxanthohumol	5,6	0
Xanthohumol B	5,5	0
Xanthohumol C	2,1	0
Xanthohumol D	8,9	0
Xanthohumol H	9,3	0
Isoxanthohumol H	9,3	0
Xanthohumol I	10,7	0
Xanthohumol L	3,0	0
Xanthohumol M	5,4	0
Isoxanthohumol M	7,3	0
Xanthohumol O	2,8	0
Xanthohumol P	8,0	0
Isoxanthohumol P	9,6	0
Isoxantholupon	2,9	0
Hydroxy-Xanthohumol M	3,6	0
Dihydro-Xanthohumol C	2,8	0
Dihydro-Isoxanthohumol C	2,2	0
Dihydro-Xanthohumol F	5,1	0
Dihydro-Xanthohumol K	5,6	0
Prenylxanthohumol	2,9	0
8-Prenylnaringenin	2,7	0
6-Prenylnaringenin	3,4	0

Important components of the hard resin fraction with their flavor threshold values and how often those values are exceeded as a percentage in 88 samples of commercially available beers (as per Dresel dissertation).

mung hervorrufen, die allerdings bei höherer Konzentration durch den Bittergeschmack überlagert wird. Demgegenüber werden die Multifidol-Glukoside sowie alle Prenylflavonoide ausschließlich als bitter wahrgenommen.

Es ist noch darauf hinzuweisen, dass die einzige Geschmacksschwellenüberschreitung bei den Prenylflavonoiden auf einen mit 4,5 mg/l besonders hohen Gehalt von Xanthohumol in einem Stout zurückzuführen ist. Wie aus der Literatur bekannt ist, trägt ein hoher Röstmalzanteil dazu bei, dass hier mehr Xanthohumol erhalten bleibt als in helleren Bieren (5). Bei Isoxanthohumol lag der in den 88 untersuchten Bieren ermittelte Maximalgehalt mit 4,9 mg/l nur sehr knapp unter seiner Geschmacksschwelle von 5,6 mg/l.

Brauversuche mit speziellen, hartharzureichen Hopfenprodukten

In seiner Dissertation hat Dresel auch Brauversuche mit Hopfenprodukten durchgeführt, die stark mit Hartharz angereichert sind. Da diese Fraktion durch das übliche Extraktionsverfahren mit überkritischem Kohlendioxid nicht extrahiert wird, bietet sich der resultierende Rückstand (Treber) für derartige Untersuchungen an. Dabei wurde festgestellt, dass mit den Trebern der Kohlendioxidextraktion eine Bierbittere resultiert, die als angenehm und harmonisch beschrieben wird.

Wichtige Einzelkomponenten der Hartharzfraktion mit jeweils ermitteltem Geschmacksschwellenwert sowie jeweilige prozentuale Häufigkeiten von dessen Überschreitung in 88 untersuchten kommerziell erhältlichen Bieren (laut Dissertation Dresel).

resins, a hop product that is highly enriched with the components of the hard resin fraction was tested in collaboration with the Chair for Brewing and Beverage Technology (BGT) of the TU Munich-Weihenstephan (6). This comes from the ethanol extraction of hops. As Dresel could demonstrate, all components of the hard resin could be extracted with ethanol. However, whereas xanthohumol and the other prenylflavonoids are transferred to the pure resin extract in practically identical quantities, the recovery rate of the glucopyranosides is less. These can be detected in the so-called tannin extract (2) which is usually separated after the ethanol extraction in order to remove unwanted substances like nitrate and copper.

If the ethanol pure resin extract is once again extracted using supercritical carbon dioxide, all the existing hard resin components remain in the extraction residue (Figure 3). The iso-alpha acids that form during the ethanol extraction are not extracted with carbon dioxide. A product produced in this way is very suitable for comparative trial brews with conventional hop products, because the iso-alpha acids are transferred to the beer together with the hard resins. The aim of our trial brews was to produce beers with identical iso-alpha acid content at simultaneously different concentrations of hard resin components.

The composition and dosage of the hop products used are shown in tables 2 and 3. The trial brews were done on the 6hl scale with addition of the hop products only at begin of wort boil (60 minutes). Lager beers were brewed with a target concentration of 18mg/l of iso-alpha acids. This level was chosen on purpose to find out whether with this relative mild bitterness a product with a high portion of hard resin will have a negative influence on the flavor. Conventional type 90 pellets of the Hallertau Taurus variety, 2013 crop, were taken for the comparison. The two products tested in the comparison – ethanol pure resin extract and the extraction residue enriched with hard resin components – were also produced from this variety of the same year. All the products were tested in double brews.

The specific bitter components were analyzed using HPLC coupled with UV and mass spectrometry detection. The analysis covered in addition to the alpha acids and iso-alpha acids the hard resin compounds xanthohumol, isoxanthohumol, quercetin glucoside, kaempferol glucoside and co-multifidol glucoside, which are taken into

Um diese Ergebnisse durch eigene Untersuchungen weiter zu verifizieren und einen negativen Einfluss der Hartharze auszuschließen, wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie (BGT) der TU München-Weihenstephan in der dortigen Pilotbrauerei ebenfalls ein Hopfenprodukt getestet, das mit den Komponenten der Hartharzfraktion stark angereichert ist (6). Dieses stammt aus der Ethanolextraktion von Hopfen. Wie Dresel aufzeigen konnte, werden mit Ethanol alle Komponenten des Hartharzes extrahiert. Während jedoch Xanthohumol und die anderen Prenylflavonoide nahezu quantitativ in den Reinharzextrakt übertragen werden, ist die Wiederfindung der Glucopyranoside geringer. Diese lassen sich auch im sogenannten Gerbstoffextrakt nachweisen (2), der nach der Ethanolextraktion üblicherweise abgetrennt wird, um so unerwünschte Stoffe wie Nitrat oder Kupfer zu entfernen.

Wird der Ethanol-Reinharzextrakt durch überkritisches Kohlendioxid nachextrahiert, verbleiben alle vorhandenen Hartharzkomponenten im Extraktionsrückstand (Abbildung 3). Die sich bei der Ethanolextraktion in geringem Umfang bildenden Iso-Alpha-Säuren werden durch Kohlendioxid ebenfalls nicht mitextrahiert. Ein derartig hergestelltes Produkt eignet sich für vergleichende Brauveruche mit konventionellen Hopfenprodukten besonders gut, da damit zusammen mit den Hartharzen auch die Iso-Alpha-Säuren in das Bier transferiert werden. Ziel unserer Brauveruche war es, Biere mit identischem Gehalt an Iso-Alpha-Säuren bei gleichzeitig unterschiedlichen Konzentrationen an Hartharzkomponenten herzustellen.

account on the one hand because they are considered as representative for the compound class concerned and on the other for their contribution to the beer bitterness.

As Table 4 shows, it was possible to achieve a comparable content of 17-19mg/l iso-alpha acids in all the beers. The presence of corresponding lead substances in all the beers is proof of successful transfer of the hard resins. Compared to the pellet variant ("P90") the variant with ethanol pure resin extract ("ERH") has practically identical volumes of isoxanthohumol (which together with xanthohumol is representative of all prenylflavonoids of the hard resin fraction), but lower concentrations of quercetin glucoside, kaempferol glucoside and co-multifidol glucoside, which were not transferred quantitatively to the ethanol pure resin extract.

In contrast both isoxanthohumol and the glucosides were as expected significantly higher in the variant with the hard resin enriched extract ("EHH") than in the "ERH". As can be seen in Table 3 the dosage of hard resins was 8-fold higher than in other trials. In comparison, a likewise practically 8-fold higher content of isoxanthohumol once again confirms the quantitative transfer of prenylflavonoids. In the trials with "EHH" the amount of co-multifidol glucoside of on average 2mg/l is over the flavor threshold value of 1.8mg/l (see Table 1), whereas with "P90" and "ERH" the threshold value was not exceeded.

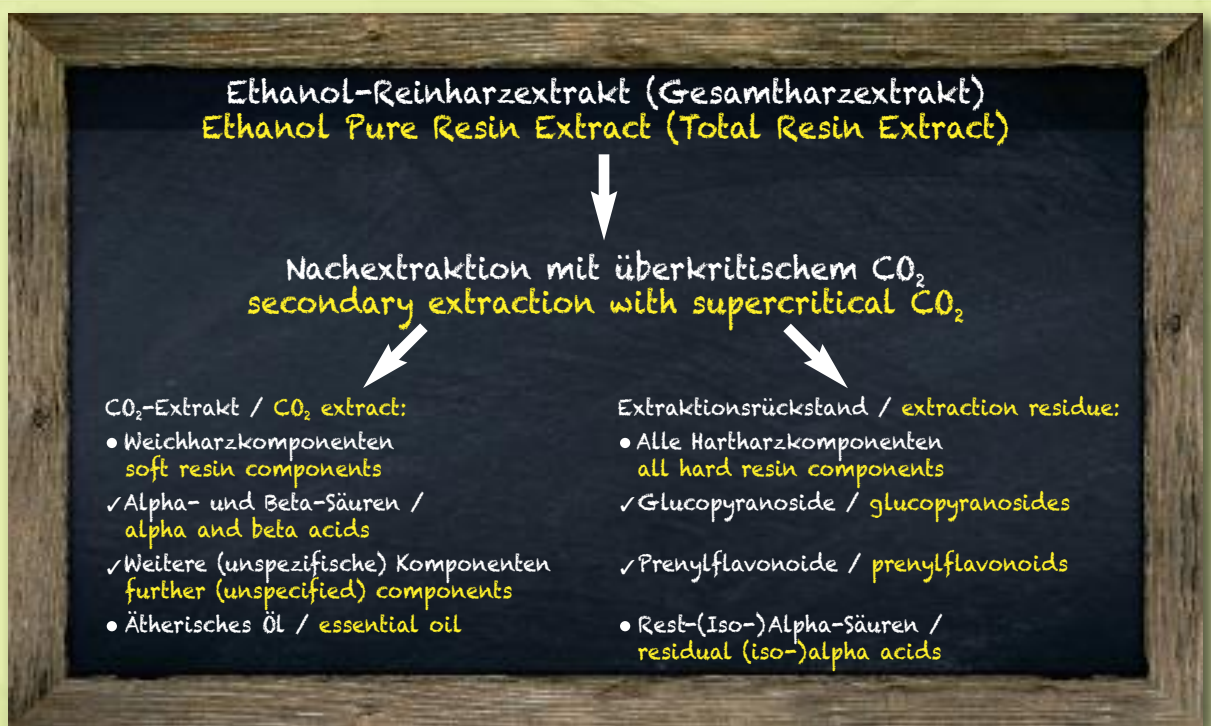


Abbildung 3: Herstellung eines Hopfenprodukts mit hohem Hartharzanteil
Figure 3: Production of a hop product rich in hard resins

Tabelle 2:
Zusammensetzung
der eingesetzten
Hopfenprodukte (alle
Hallertauer Taurus,
Ernte 2013)

Tabelle / Table 2			
	Pellet Typ 90 (P90)	Ethanol-Reinharzextrakt Ethanol pure resin extract (ERH)	Hartharzextrakt hard resin extract (EHH)
Iso-Alpha-Säuren / Iso-alpha acids	-	1,7 %	8,2 %
Alpha-Säuren / Alpha acids	14,9 %	42,4 %	5,3 %
Cohumulon (% rel.)	24,4	25,9	23,1
Beta-Säuren / Beta acids	4,7 %	13,1 %	0,5 %
Xanthohumol	0,8 %	2,7 %	10,6 %
Gesamtharze / Total resin	29,7 %	89,3 %	100 %
Hartharze / Hard resins (% rel.)	11,5	12,5	39,2

Table 2:
Composition of the
hop products used
(all Hallertau Taurus,
2013 crop)

Zusammensetzungen und Dosage-Mengen der eingesetzten Hopfenprodukte sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt. Die Brauversuche erfolgten im 6 hl Maßstab mit Zugabe der Hopfenprodukte nur zu Beginn der Würzekochung (60 Minuten). Es wurden helle Lagerbiere mit einer Zielkonzentration von 18 mg/l Iso-Alpha-Säuren hergestellt. Dieses Niveau wurde bewusst gewählt, um festzustellen, ob bei dieser relativ milden Bittere ein Produkt mit hohem Hartharzanteil den Geschmack unangenehm beeinflusst.

Apart from the above-mentioned differences in the bitter substance spectrum both the standard analysis for beer and the standard tasting (DLG scheme) showed no significant variations between the various double brews. It was therefore sufficient to take only the beers of a single brew per variant for a differentiated sensory examination.

Tabelle 3:
Dosage der
verschiedenen
Hopfenprodukte

Tabelle / Table 3				
Versuch Trial	Gesamtmenge Total amount g/hl	(Iso-)Alpha-Säure (Iso-)Alpha acid mg/l	Hartharze Hard resins mg/l	Xanthohumol mg/l
1 / P90	46,2	69	16	4,2
2 / P90	46,2	69	16	4,2
3 / ERH	13,5	60	15	3,7
4 / ERH	13,5	60	15	3,7
5 / EHH	30,8	42	121	39
6 / EHH	30,8	42	121	39

Table 3:
Dosage of the
different hop products

Als Vergleich dienten herkömmliche Pellets Typ 90 der Sorte Hallertauer Taurus, Ernte 2013. Die beiden im Vergleich dazu getesteten Produkte Ethanol-Reinharzextrakt und der mit Hartharzkomponenten angereicherte Extraktionsrückstand wurden ebenfalls aus dieser Sorte und diesem Jahrgang hergestellt. Alle Produkte wurden jeweils in Doppelsuden getestet.

To evaluate whether there is a significant effect with a lower input of the particularly flavor-active glucopyranosides through ethanol pure resin extract compared with the hop addition with pellets, both beers of the "P90" and "ERH" variants were tasted using the so-called duotrio test (7). This is particularly good way of identifying slight differences in flavor between two samples. The "P90" beer was taken as a comparative sample to check whether the "ERH" variant was significantly different from the "P90" variant. The tasters had to decide whether another "P90" sample or the "ERH" sample matched without knowing which sample was which. Apart from that the tasters had to define which of the two comparative samples they preferred.

Die Analytik der spezifischen Bitterkomponenten im Bier erfolgte durch HPLC gekoppelt mit UV- bzw. massenspektrometrischer Detektion und umfasste neben den Alpha- und Iso-Alpha-Säuren noch die aus dem Hartharz stammenden Verbindungen Xanthohumol, Isoxanthohumol, Quercetin-Glukosid, Kaempferol-Glukosid sowie Co-Multifidol-Glukosid, die zum einen als repräsentativ für die jeweilige Verbindungsklasse eingestuft werden und zum anderen für einen Beitrag zur Bierbittere am ehesten in Frage kommen.

The same test procedure was used in a second, separate round of tasting to verify the question as to whether the "EHH" variant differs significantly from the "ERH" variant, which like "P90" has an up to 8-fold lower concentration of hard resin components.

Wie Tabelle 4 zeigt, gelang es, in allen Bieren einen vergleichbaren Gehalt von 17-19 mg/l Iso-Alpha-Säuren einzustellen. Dass ein erfolgreicher Transfer der Hartharze erfolgte, belegt der Nachweis entsprechender Leitsubstanzen in allen Bieren. Im Vergleich zur Pellet-Variante („P90“) weist die Variante mit Ethanol-Reinharzextrakt („ERH“) nahezu identische Gehalte an Isoxanthohumol auf (das zusammen mit Xanthohumol stellvertretend für

The tastings were held independently of each other by the experienced panels of the Chair for Brewing and Beverage Technology (DLG panel, 9 tasters) and the Hopsteiner company, Mainburg (13 tasters).

Tabelle / Table 4							
Versuch Trial	Iso-Alpha-Säure Iso-Alpha acid mg/l	Alpha-Säure Alpha acid mg/l	Xanthohumul mg/l	Isoxantho- humol mg/l	Co-Multifidol- Glukosid mg/l	Quercetin- Glukosid mg/l	Kaempferol- Glukosid mg/l
1 / P90	18,9	3,2	< 0,1	0,4	0,6	0,3	0,1
2 / P90	19,1	2,2	< 0,1	0,5	0,7	0,3	0,1
3 / ERH	18,3	1,3	< 0,1	0,5	0,3	< 0,1	< 0,1
4 / ERH	17,0	2,6	< 0,1	0,5	0,3	< 0,1	< 0,1
5 / EHH	16,8	1,2	0,1	3,6	2,1	0,3	0,1
6 / EHH	17,7	1,1	0,2	4,0	1,8	0,3	0,1

Tabelle 4: Konzentrationen in den mit den verschiedenen Hopfenprodukten hergestellten Bieren

Table 4: Concentrations in the beers produced with the different hop products

alle Prenylflavonoide der Hartharzfraktion steht), jedoch geringere Konzentrationen an Quercetin-, Kaempferol- und Co-Multifidol-Glukosiden, die ja nicht quantitativ in den Ethanol-Reinharzextrakt übertragen worden sind.

Dagegen sind wie erwartet in der Variante mit dem hartharzureichen Extrakt („EHH“) sowohl Isoxanthohumul als auch die Glukoside gegenüber „ERH“ deutlich erhöht. Gemäß Tabelle 3 wurde damit eine 8-fach höhere Menge an Hartharzen dosiert als bei den anderen Versuchen. Ein im Vergleich dazu um den Faktor von ebenfalls ca. 8 höherer Gehalt an Isoxanthohumul bestätigt erneut den quantitativen Transfer an Prenylflavonoiden. Bei den Versuchen mit „EHH“ liegt der Gehalt von Co-Multifidol-Glukosid mit durchschnittlich 2 mg/l über dem Geschmacksschwellenwert von 1,8 mg/l (siehe Tabelle 1), während mit „P90“ und „ERH“ keine Überschreitungen erfolgten.

Mit Ausnahme der oben erwähnten Unterschiede im Bitterstoffspektrum ergab sowohl die Standardanalytik für Bier als auch die Standardverkostung (DLG-Schema) keine signifikanten Abweichungen zwischen den diversen Doppelsuden. Für eine differenziertere sensorische Untersuchung war es daher ausreichend, pro Variante jeweils nur die Biere eines Einzelsuds heranzuziehen.

Um zu überprüfen, ob sich ein im Vergleich zur Hopfengabe mit Pellets etwas geringerer Eintrag der besonders geschmacksaktiven Glucopyranoside durch Ethanol-Reinharzextrakt signifikant auswirkt, wurden die beiden Biere der Varianten „P90“ und „ERH“ durch den sogenannten Duo-Trio-Test (7) verkostet. Dieser eignet sich besonders gut dafür, bereits geringe geschmackliche Unterschiede zwischen zwei Proben zu identifizieren. Zur Überprüfung der Fragestellung, ob die Variante „ERH“ signifikant von der Variante „P90“ abweicht, diente Bier „P90“ als Vergleichsprobe. Die Verkoster mussten sich entscheiden, ob eine weitere Probe „P90“ oder die Probe „ERH“ damit übereinstimmt, ohne dass bekannt war, um welche der beiden Proben es sich jeweils handelte. Außerdem mussten die Verkoster festlegen, welche der beiden Vergleichsproben präferiert wird.

Dasselbe Testverfahren wurde dann bei einer zweiten, separaten Verkostungsrunde noch zur Überprüfung der Frage angewendet, ob die Variante „EHH“ signifikant von der Variante „ERH“ abweicht, die wie „P90“ eine bis zu 8-mal niedrigere Konzentration an Hartharzkomponenten aufweist.

In both cases, neither panel could determine a significant difference. Tables 5 and 6 give a summary of the results of both panels. In the cases where there was correct assignment of the samples, there was never a clear preference for one or the other of the variants tasted, which further confirms that there is no significant difference.

Summing up it can be said that from the tastings there is no significant difference between beers brewed with type 90 pellets, ethanol pure resin extract and an extract strongly enriched with hard resin components. This proves that even in high concentrations the hard resin components extracted with ethanol have no negative effects at all on the flavor. According to Dresel's work they provide only a positive contribution to a harmoniously rounded beer bitterness.

From this point of view it seems obvious in future to better designate the ethanol pure resin extract as the "total resin extract" of the hops. This is for precise definition and should emphasize that similar to hop cones or pellets all components of the soft and hard resin fractions are included in the brewing process and thus make a sensory contribution to the "total bitterness" of beer.

In conclusion it should also be pointed out that through ethanol not only the complete spectrum of the bitter substances in hops is transferred to the "total resin extract", but also all components of the hop oil fraction. This includes not only the free essential oils, but also glycosidically bound aroma substances like linalool glucoside (8), which are probably even a component of the hard resin fraction. This assumption is based on their structural relationship with the glucopyranosides.



Tabelle 5:
Duo-Trio-Test zur
Unterscheidung
zweier Biere

Table 5:
Duo-trio test to
differentiate
between two beers

Tabelle / Table 5	
Ist Bier „P90“ unterscheidbar von Bier „ERH“? Difference between beer “P90” and beer “ERH”?	Panel: TU München-Weihenstephan / Hopsteiner Panel: TU Munich-Weihenstephan / Hopsteiner
Korrekte Zuordnung Correct assignment	15 von 22 Verkostern 15 of 22 tasters
Signifikanter Unterschied Significant difference	Nein* / No*
Präferenz: „P90“ / „ERH“ / keine Preference: “P90” / “ERH” / None	6 / 9 / 0 von 15 Verkostern 6 / 9 / 0 of 15 tasters with correct assignment

*Gem. / As per Mebak –
Methods of Sensory Analysis,
2014: Method 3.1.2

Tabelle / Table 5	
Ist Bier „ERH“ unterscheidbar von Bier „EHH“? Difference between beer “ERH” and beer “EHH”?	Panel: TU München-Weihenstephan / Hopsteiner Panel: TU Munich-Weihenstephan / Hopsteiner
Korrekte Zuordnung Correct assignment	15 von 22 Verkostern 15 of 22 tasters
Signifikanter Unterschied Significant difference	Nein* / No*
Präferenz: „ERH“ / „EHH“ / keine Preference: “ERH” / “EHH” / None	8 / 4 / 3 von 15 Verkostern 8 / 4 / 3 of 15 tasters with correct assignment

*Gem. / As per Mebak –
Methods of Sensory Analysis,
2014: Method 3.1.2

Die Verkostungen erfolgten jeweils unabhängig voneinander bei den geschulten Panels des Lehrstuhls für Brau- und Getränketechnologie (DLG-Panel, 9 Verkoster) sowie der Firma Hopsteiner, Mainburg (13 Verkoster).

In beiden Fragestellungen stellte kein Panel eine signifikante Abweichung fest. In den Tabellen 5 und 6 sind die Ergebnisse beider Panels zusammengefasst. In den Fällen einer richtigen Zuordnung der Proben kristallisierte sich nie eine klare Präferenz für eine der beiden verkosteten Varianten heraus, was eine nicht signifikante Unterscheidung weiter bestätigt.

Zusammenfassend lässt sich aus den Verkostungen also ableiten, dass sich die mit Pellet Typ 90, Ethanol-Reinharzextrakt und einem mit Hartharzkomponenten stark angereicherten Extrakt hergestellten Biere nicht signifikant voneinander unterscheiden. Dies belegt, dass die mit Ethanol extrahierten Hartharzkomponenten selbst in hoher Konzentration keinerlei negative Auswirkungen auf den Geschmack haben. Gemäß den Arbeiten von Dresel liefern diese also ausschließlich einen positiven Beitrag für eine harmonisch abgerundete Bierbittere.

Aus dieser Sicht erscheint es naheliegend, den Ethanol-Reinharzextrakt zukünftig vorteilhafter als „Gesamtharzextrakt“ des Hopfens zu bezeichnen. Dies dient zur Präzisierung und soll betonen, dass damit analog zu Doldehopfen oder Pellets alle Komponenten der Weich- und Hartharzfraction dem Brauprozess zugeführt werden und so einen sensorischen Beitrag zur „Gesamtbittere“ von Bier leisten.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, dass durch Ethanol nicht nur das gesamte Spektrum der im Hopfen vorliegenden Bitterstoffe in den „Gesamtharzextrakt“ übertragen wird, sondern ebenso alle Komponenten der Hopfenölfraction. Dazu zählt nicht nur das freie ätherische Öl, sondern auch glykosidisch gebundene Aromastoffe (z. B. Linalool-Glukosid) (8), die vermutlich sogar ein Bestandteil der Hartharzfraction sind. Diese Annahme liegt aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft mit den Glucopyranosiden nahe.

Literatur / Literature:

- (1) Narziß, There is More to Hops Than Simply Alpha Acids, Brauwelt International, 2010/I, 28, 17 ff.
- (2) Dresel et al., Sensomics Analysis of Key Bitter Compounds in the Hard Resin of Hops (*Humulus Lupulus* L.) and Their Contribution to the Bitter Profile of Pilsner-Type Beer, J. Agric. Food Chem., 2015, 63, 3402 ff.
- (3) Bohr et al., Anti-inflammatory Acylphloroglucinol Derivatives from Hops (*Humulus Lupulus*), J. Nat. Prod., 2005, 68, 1545 ff.
- (4) Intelmann et al., Three TAS2R Bitter Taste Receptors Mediate the Psychophysical Responses to Bitter Compounds of Hops (*Humulus Lupulus* L.) and Beer, Chemosensory Perception, 2009, 2, 1936 ff.
- (5) Walker et al., Investigations into the High Levels of Xanthohumol Found in Stout and Porter-Style Beers, Brauwelt International, 2004/II, 22, 100 ff.
- (6) Biendl et al., Tagung American Society of Brewing Chemists, Palm Springs, 2015
- (7) Mebak – Methods of Sensory Analysis, 2014
- (8) Kollmannsberger et al., Occurance of Glycosidically Bound Flavour Compounds in Hops, Hop Products and Beer, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 2006, 59, 83 ff.

Autoren: Dr. Martin Biendl und Sandro Cocuzza, Hopsteiner
Bild: © Alexander Pokusay, © Urheber-stockphoto-graf – Fotolia.com



Dr. Martin Biendl



Sandro Cocuzza