

Auf der Spur von Hartharzkomponenten

BITTERSTOFFANALYSE | Die Entwicklung moderner Analytik bietet im Bereich der Bierherstellung Möglichkeiten zur Erweiterung des analytischen Spektrums. Der Weg einzelner Verbindungen aus dem Rohstoff ins fertige Bier kann mit Hilfe von Massenspektrometrie genau erforscht werden. Der Hartharzfraktion des Hopfens, die überwiegend aus polaren, also gut wasserlöslichen Bitterstoffen besteht, wird bei der Technologie der Kalthopfung eine besondere Rolle zugeschrieben. Die Kalthopfung ermöglicht einen effizienten Übergang dieser Substanzen aus dem Hopfen ins Bier. Um welche Verbindungen es sich handelt und welchen Geschmacksbeitrag sie zur Bierbittere leisten, beschreibt dieser Artikel.

IM RAHMEN SEINER Dissertation beschäftigte sich Michael Dresel mit der Erforschung sensorisch aktiver Einzelkomponenten aus der Hartharzfraktion [1]. Es gelang die Charakterisierung von 40 Bitterstoffen aus dem Hartharz. Das Auftreten dieser Verbindungen wurde in 75 unterschiedlichen Hopfensorten aus der ganzen Welt verifiziert und ihr Verhalten während der Lagerung und der Extraktion untersucht [1].

handelt es sich um Glucopyranoside, an einen Zuckerrest gebundene Multifidole und Flavonole wie Kaempferol und Quercetin. Zum anderen werden Prenylflavonoide beschrieben, bei denen Xanthohumol die Hauptkomponente ist. Die chemischen Strukturformeln von Verbindungen der beiden Substanzklassen zeigt Abbildung 1.

Multifidol-Glukoside wurden 2005 erstmals aus Hopfen isoliert [2]. Es handelt sich um Zwischenprodukte der Biosynthese von Alpha- und Beta-Säuren. Sie weisen diesel-

ben (Acyl-) Seitenketten wie die Bitterstoffe auf. Die Menge in Hopfen beträgt etwa 0,5 Prozent [3]. Im Gegensatz zu Multifidol-Glukosiden sind Flavonol-Glukoside in der Natur weit verbreitet. Im Hopfen werden für diese Verbindungen Gehalte von nicht mehr als ein Prozent beschrieben [3]. Sowohl Multifidol-Glukoside als auch Prenylflavonoide sind typisch für Hopfen. Die Entdeckung von Xanthohumol, dem Hauptvertreter der Substanzklasse der Prenylflavonoide, erfolgte bereits vor 100 Jahren. Die Menge in getrocknetem Hopfen kann bis zu 1,2 Prozent betragen und ist abhängig von der Hopfensorte [3]. Bis heute sind mehr als 250 wissenschaftliche Beiträge über gesundheitlich positive Eigenschaften von Xanthohumol erschienen. Die meisten zeigen Ergebnisse aus in-vitro-Studien mit isolierten Körperzellen oder Enzymen. Neueste Studienergebnisse werden jedoch als Meilenstein in der Xanthohumol-Forschung eingestuft, da sich die Wirkung der Substanz in ersten Humanstudien bestätigt [4]. Neben Xanthohumol sind Isoxanthohumol, welches durch die Umwandlung von Xanthohumol beim Würzekochen entsteht, 8-Prenylnaringenin und 6-Prenylnaringenin Vertreter der Gruppe der Prenylflavonoide. Die beiden letzten Verbindungen

Glucopyranoside und Prenylflavonoide

Die wichtigsten identifizierten Substanzen lassen sich in zwei unterschiedliche Verbindungsklassen einteilen. Zum einen

Autoren: Dr. Christina Schmidt und Dr. Martin Biendl, Hallertauer Hopfenveredelungsges.m.b.H. (Hopsteiner), Mainburg

NACHWEIS- (NWG) UND BESTIMMUNGSGRENZEN (BG) IN MG/L

Substanz	NWG	BG
8-Prenylnaringenin	0,01	0,05
Kaempferol-Glukosid	0,01	0,05
Quercetin-Glukosid	0,01	0,05
Quercetin-Rutinosid	0,01	0,05
Quercetin-Malonylglukosid	0,01	0,05
co-Multifidol-Glukosid	0,05	0,10
Isoxanthohumol	0,05	0,10
Xanthohumol	0,05	0,10

Tab. 1

entstehen durch einen Ringschluss von Desmethylxanthohumol im Verhältnis 1:3 (8-PN:6-PN).

■ HPLC-MS/MS-Analytik

Während die Analyse von Bitterstoffen wie Alpha-Säuren oder Humulinonen (oxidierte Alpha-Säuren) in kaltgehopften Bieren mittels HPLC-UV Analytik möglich ist, erfordert die Analyse der Glucopyranoside sowie der Prenylflavonoide in kaltgehopften Bieren den Einsatz der Massenspektrometrie. Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung stellt ein analytisches Verfahren zur Bestimmung von nichtflüchtigen Substanzen in Lebensmitteln dar. Der empfindliche Detektor ermöglicht die Quantifizierung selbst geringer Konzentrationen im Spurenbereich.

Die bereits erwähnten Untersuchungen von Dresel stellen eine HPLC-MS/MS-Methode zur Bestimmung verschiedener Hartharzkomponenten in Hopfenprodukten, Hopfenextrakten und Bier vor [1]. In Anlehnung an die veröffentlichte Methode wurde eine HPLC-MS/MS-Methode entwickelt, welche die Identifizierung und Quantifizierung von vorerst neun Einzelkomponenten der Hartharzfraction aus Hopfen in kaltgehopften Bieren mit nur einem LC-MS/MS-Lauf und unter Verwendung von ausgewählten Massenübergängen ermöglicht. Die in die Methode aufgenommenen Substanzen sind Einzelkomponenten der Hartharzfraction. Es handelt sich um co-Multifidol-Glukosid, Kaempferol- und Quercetin-Glukosid, Quercetin-Rutinosid, Quercetin-Malonylglukosid, Xanthohumol, Isoxanthohumol sowie um 6- und 8-Prenylnaringenin (Abb. 1). Die Probenvorbereitung besteht aus dem Entgasen und Verdünnen der Biere.

Einen spezifischen Massenübergang und die entsprechenden Retentionszeiten für jede untersuchte Substanz zeigt Abbildung 2. Als interne Standards wurden Dicamba, Bentazon und Nicarbazin eingesetzt. Diese Verbindungen werden in Bier nicht detektiert, decken jedoch die verschiedenen Retentionszeiten der analysierten Verbindungen ab. So wurde Dicamba als interner Standard für co-Multifidol-Glukosid, Bentazon für Kaempferol- und Quercetin-Glukosid, Quercetin-Rutinosid sowie Quercetin-Malonylglukosid und Nicarbazin für die restlichen Komponenten verwendet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der hier vorgestellten Methode zeigt Tabelle 1.

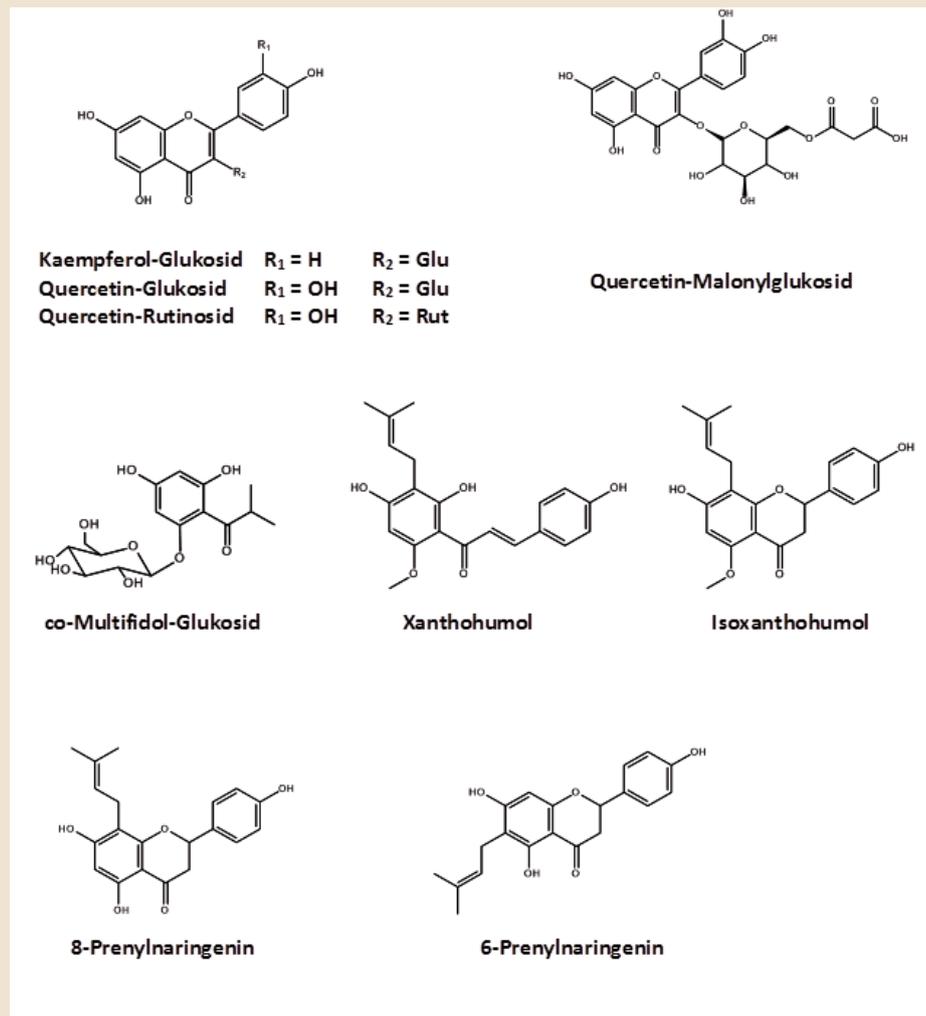


Abb. 1 Chemische Strukturen ausgewählter Hartharzkomponenten

Eine ausführliche Beschreibung der Methodenparameter ist der Publikation „LC-MS/MS Analysis of hop flavonoids in dry-hopped beers“ aus der Zeitschrift *Brewing Science – Monatsschrift für Brauwissenschaft* [5] zu entnehmen.

■ Einfluss der Hopfensorte

Zwei verschiedene Brauversuche dienen als Untersuchungsgrundlage für die entwickelte HPLC-MS/MS-Methode.

Beim ersten Brauversuch wurde zum Basisbier ausschließlich das Hopfenprodukt „Alpha-Extrakt“ zur Einstellung der Bittere beim Kochbeginn gegeben. Beim Alpha-Extrakt handelt es sich um eine wässrige Lösung der Alpha-Säuren [6]. Dementsprechend konnte in dem Basisbier aus dem ersten Versuch keiner der untersuchten Analyten nachgewiesen werden. Das Basisbier mit 4,6 Vol.-% Alkohol, 21 Bittereinheiten und einem pH-Wert von 4,0 wurde aufgeteilt und mit fünf verschiedenen Hopfensorten kaltgehopft. Tabelle 2 gibt einen Über-

blick über die Kalthopfungszusammensetzung. Die Biere wurden sieben Tage bei 3 °C statisch im Fass kaltgehopft und vor der Abfüllung nicht filtriert.

Die Ergebnisse der Biere Nr. 1-5 zeigen den Einfluss der einzelnen Hopfensorten auf die Zusammensetzung der spezifischen Bitterstoffe im kaltgehopften Bier. Die quantitativen Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Der höchste Gehalt an co-Multifidol-Glukosid mit 3,32 mg/l wurde in Bier Nr. 2 mit der Hopfensorte Bravo detektiert. Der geringste Gehalt dieser Substanz mit 0,38 mg/l wurde in Bier Nr. 4 nachgewiesen. Dieses Bier wurde mit der Sorte Denali kaltgehopft. Signifikante Unterschiede für die Einzelkomponente co-Multifidol-Glukosid konnten für Bier Nr. 2, Nr. 3 und Nr. 4 beobachtet werden.

Die höchsten Konzentrationen der analysierten Substanzen wurden in Bier Nr. 2 gefunden. Die geringsten Mengen zeigte Bier Nr. 4. Die beiden Verbindungen 6- und

8-Prenylnaringenin wurden in keinem der untersuchten Biere nachgewiesen. Der Grund hierfür liegt in den extrem niedrigen Gehalten dieser beiden Verbindungen im

Hopfen. 8-Prenylnaringenin wird mit einer Menge von weniger als 0,01 Prozent in der Pflanze beschrieben. Der Gehalt an Isoxanthohumol lag nicht höher als 0,11 mg/l. Ei-

ne höhere Konzentration an Isoxanthohumol in Bier kann mit einer früheren Hopfendosage erreicht werden. So wird das Xanthohumol während der Würzekochung zu Isoxanthohumol umgewandelt [7]. Die Konzentrationen an Xanthohumol in den untersuchten Bieren lagen zwischen 0,10 und 0,18 mg/l. Auch Gahr et al. beschrieben Xanthohumolgehalte in kaltgehopften Bieren zwischen 0,10 und 0,17 mg/l [8].

Beim zweiten Brauversuch wurde ein Pale Ale Basisbier mit der Sorte Hallertauer Tradition (Pellets Typ 90 einem einem Alpha-Säuren Gehalt von 3,8 %) gebraut.

Dieses Pale Ale Basisbier mit einem Alkoholgehalt von 6,0 Vol.-%, 24 Bittereinheiten und einem pH-Wert von 4,3 wurde anschließend aufgeteilt und mit den Hopfsorten Lemondrop und Bravo mit Hilfe der HopGun (BrauKon GmbH) kaltgehopft. Eine Filtration fand auch hier nicht statt.

Die Analyse des Basisbieres ergab bereits quantitative Daten für acht der neun untersuchten Verbindungen. Die Ergebnisse zeigen den Transfer der Substanzen ins Bier bereits während des Würzekochens (Abb. 3). Der Einfluss der Kalthopfung ist ersichtlich.

Beide Biere, Pale Ale Nr. 1 und Nr. 2, zeigen eine deutlich Zunahme der Konzentration im Vergleich zum Basisbier für die Substanzen co-Multifidol-Glukosid, Quercetin-Glukosid, Kaempferol-Glukosid und Xanthohumol. Für Pale Ale Nr. 1 wurde kein Unterschied zum Basisbier für die beiden Quercetinderivate Quercetin-Rutinosid und Quercetin-Malonylglukosid beobachtet. Im Pale Ale Nr. 2 stiegen diese beiden Einzelkomponenten jedoch signifikant an.

Eine Abnahme von Isoxanthohumol im Vergleich zum Basisbier konnte in beiden kaltgehopften Bieren nachgewiesen werden.

Das Verhältnis von Quercetin-Glukosid zu Kaempferol-Glukosid in Bier Nr. 5 (Versuch 1) und Pale Ale Nr. 1 (Versuch 2), beide Biere kaltgehopft mit der Hopfsorte Lemondrop, unterschied sich vom Verhältnis dieser beiden Substanzen in den restlichen Bieren. In diesen beiden Bieren entsprechen die ermittelten Konzentrationen einem 1:1 Verhältnis. Im Vergleich dazu zeigten alle anderen Biere eine höhere Konzentration an Quercetin-Glukosid im Vergleich zu Kaempferol-Glukosid. Das Verhältnis dieser beiden Glukoside ist genetisch bedingt und abhängig von der Hopfsorte. Dies zeigten Untersuchungen des Welthopfsortiments von 121 Hopfsorten [9].

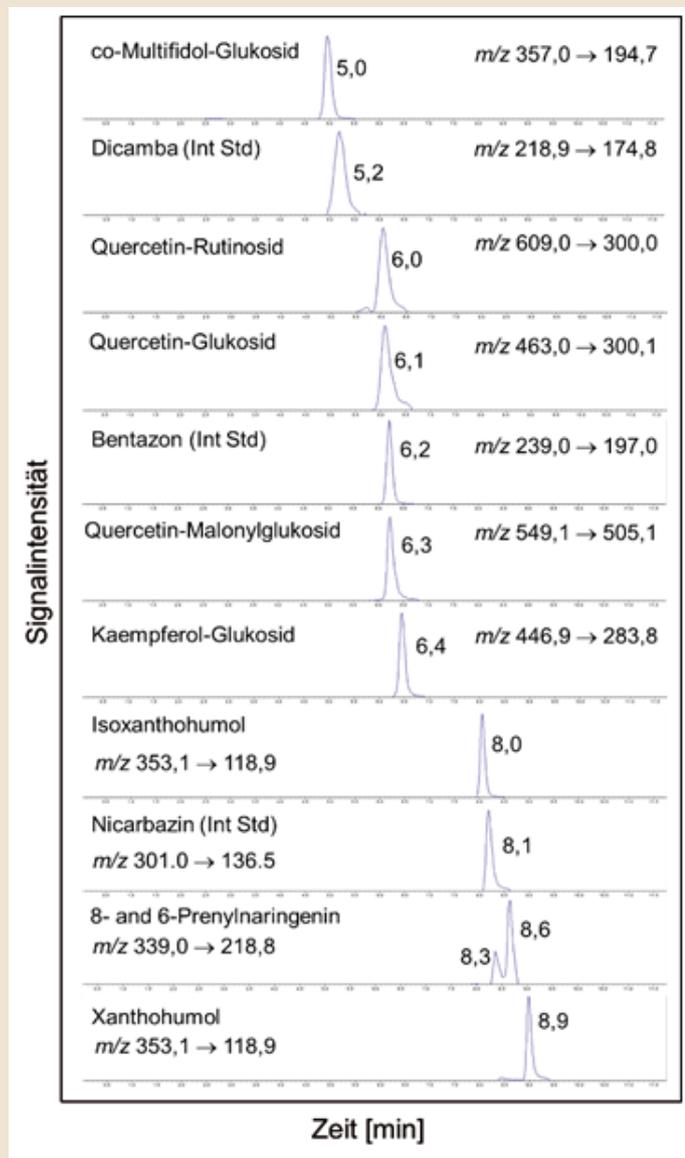


Abb. 2 LC-MS/MS Chromatogramme der untersuchten Hartharzkomponenten in kaltgehopften Bieren

REZEPTUR KALTHOPFUNG			
	Hopfsorte	Hopfenprodukt	Hopfenmenge
Versuch 1			
Bier Nr. 1	Apollo	P90	500 g/hl
Bier Nr. 2	Bravo	P90	500 g/hl
Bier Nr. 3	Calypso	P90	500 g/hl
Bier Nr. 4	Denali	P90	500 g/hl
Bier Nr. 5	Lemondrop	P90	500 g/hl
Versuch 2			
Pale Ale Nr. 1	Lemondrop	P90	500 g/hl
Pale Ale Nr. 2	Bravo	P90	500 g/hl

Tab. 2

Sensorischer Beitrag zur Bierbittere

Die Wahrnehmung der Bittere wird bei Menschen durch die Rezeptorfamilie hTAS2R mit etwa 25 G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) vermittelt. Molekularbiologische Studien konnten zeigen, dass die in Bier vorkommenden iso-Alpha-Säuren aber auch die Prenylflavonoide Xanthohumol, Isoxanthohumol und 8-Prenylnaringenin die drei Bitterrezeptoren hTAS2R1, hTAS2R14 und hTAS2R40 aktivieren [10].

Die Bestimmung des Beitrages eines Bitterstoffes auf die Gesamtbittere z.B. eines kaltgehopften Bieres erfordert die Kenntnis der sogenannten Geschmacksschwellenwerte. Ein direkter Beitrag zur Bittere ist gegeben, wenn die ermittelte Konzentration im Bier gleich oder höher ist als der Geschmacksschwellenwert. Additive Effekte spielen dann eine Rolle, wenn verschiedene Substanzen die selben Rezeptoren aktivieren. So können sie auch unterhalb der Geschmacksschwelle für die Gesamtbittere relevant sein.

Die Hartharzkomponenten co-Multifidol-Glukosid und alle Prenylflavonoide werden in der Literatur als ausschließlich bitter beschrieben, während die Glukoside von Quercetin und Kaempferol neben der Bittere auch als adstringierend wahrgenommen werden. Die Geschmacksschwellenwerte dieser Substanzen werden der Dissertation von Dresel entnommen [1] und sind in der Tabelle 4 dargestellt. Die Schwellenwerte wurden in fünf Prozent

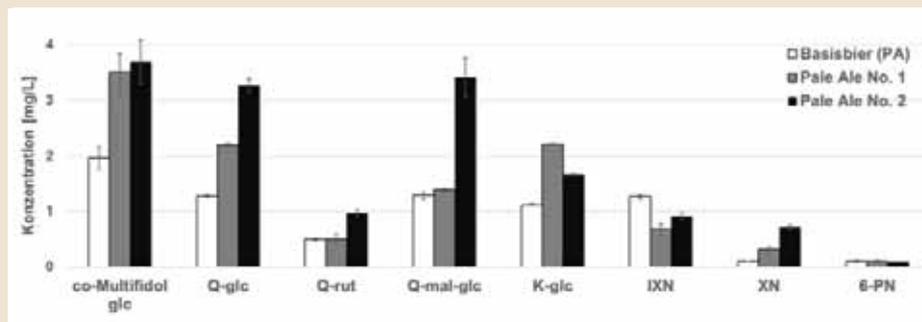


Abb. 3 Konzentration (mg/l) und Standardabweichung (n=3) der Hartharzkomponenten in kaltgehopften Bieren aus Versuch 2

Ethanol mit pH 4,4 bestimmt [1]. Neben der quantitativen Untersuchung zeigten Brauveruche, dass durch die Hartharzkomponenten die Qualität der Bierbittere positiv beeinflusst wird [1].

Der Geschmacksschwellenwert von co-Multifidol-Glukosid liegt bei 1,8 mg/l. Die ermittelten Konzentrationen für co-Multifidol-Glukosid liegen im Bier Nr. 2 aus Versuch 1 und in drei Bieren aus Versuch 2 über dem Geschmacksschwellenwert, so dass ein Beitrag dieser Einzelkomponente zur Gesamtbittere erwartet wird. Die Gehalte von Kaempferol- und Quercetin-Glukosid in den untersuchten Bieren liegen unterhalb ihrer Geschmacksschwellenwerte für Wahrnehmung der Bittere, jedoch wird der Geschmacksschwellenwert für Adstringenz in den drei Bieren aus Versuch 2 und im Bier Nr. 2 aus Versuch 1 überschritten. Ein Beitrag dieser beiden Verbindungen zur Gesamtwahrnehmung der Adstringenz in diesen Bieren wird also erwartet. Die bestimmten Gehalte an Xanthohumol,

Isoxanthohumol und 6-Prenylnaringenin liegen deutlich unterhalb der jeweiligen Geschmacksschwellenwerte. Die Kombination von Kalthopfung und Röstmalz bei der Bierherstellung kann jedoch zu Xanthohumolkonzentrationen von z.B. 6 mg/l im Bier [11] führen. Der Geschmacksschwellenwert für Xanthohumol von 3,5 mg/l ist somit eindeutig überschritten und ein Beitrag zur Bittere ist gegeben.

Fazit

Die hier vorgestellte Methode ermöglicht eine quantitative Analyse spezifischer Bitterkomponenten, die als repräsentativ für die jeweiligen Verbindungsklassen betrachtet werden. In Abhängigkeit von der Hopfensorte zeigen die Biere signifikante Unterschiede für die untersuchten Einzelkomponenten der Hartharzfraktion. Der Geschmacksbeitrag der einzelnen Substanzen zur Gesamtbittere kann zudem anhand der in der Literatur bekannten Geschmacksschwellenwerte ermittelt werden. ■

KONZENTRATIONEN (MG/L) DER HARTHARZ-KOMPONENTEN IN BIEREN AUS VERSUCH 1

Substanz	Basis-bier	Bier Nr. 1	Bier Nr. 2	Bier Nr. 3	Bier Nr. 4	Bier Nr. 5
co-Multifidol-Glukosid	n.d.	1,48	3,32	1,15	0,38	1,59
Quercetin-Glukosid	n.d.	0,72	1,72	0,63	0,48	0,38
Quercetin-Rutinosid	n.d.	0,46	0,54	0,33	0,22	0,34
Quercetin-Malonylglukosid	n.d.	0,30	1,24	1,30	0,43	0,55
Kaempferol-Glukosid	n.d.	0,21	0,38	0,19	0,11	0,52
Xanthohumol	n.d.	0,10	0,16	0,18	0,10	n.d.
Isoxanthohumol	n.d.	0,10	0,11	0,10	0,10	n.d.
6-Prenylnaringenin*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8-Prenylnaringenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* 6-Prenylnaringenin wurde mit 8-Prenylnaringenin quantifiziert. n.d. = nicht detektiert

Tab. 3

GESCHMACKSQUALITÄT- UND SCHWELLENWERTE IN MG/L AUS [1]

Substanz	Qualität	Geschmacksschwelle (mg/l)
co-Multifidol-Glukosid	bitter	1,8
Kaempferol-Glukosid	bitter/adstringierend	13/0,5
Quercetin-Glukosid	bitter/adstringierend	13/0,9
Xanthohumol	bitter	3,5
Isoxanthohumol	bitter	5,6
6-Prenylnaringenin	bitter	3,4
8-Prenylnaringenin	bitter	2,7

Tab. 4

Literatur

1. Dresel, M.: Struktur und sensorischer Beitrag von Hopfenhartharzen zum Bittergeschmack von Bier sowie zellbasierte Studien zu deren Resorption und Metabolismus, Dissertation Technische Universität München, Verlag Dr. Hut, 2013.

2. Bohr, G.; Gerhäuser, C.; Knauff, J.; Zapp, J., und Becker, H.: „Anti-inflammatory Acylphloroglucinol Derivatives from Hops (*Humulus lupulus*)“, *J. Nat. Prod.*, 68, 2005, S. 1545-1548.
 3. Biendl, M.; Engelhard, B.; Forster, A.; Gahr, A.; Lutz, A.; Mitter, W.; Schmidt, R., und Schönberger, C.: Hopfen

– Vom Anbau bis zum Bier, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2012.

4. Biendl, M.: „Meilenstein in der Xanthohumol-Forschung: Wirkung in ersten Humanstudien bestätigt“, *Hopfen-Rundschau International* 2017/2018, S. 59-68.
 5. Schmidt, C., und Biendl, M.: „LC-MS/MS Analysis of Hop Flavonoids in Dry-Hopped Beers“, *BrewingScience – Monatschrift für Brauwissenschaft*, 70, 11/12, 2017, S. 197-202.
 6. Produktdatenblatt „AlphaExtrakt“ (https://www.hopsteiner.com/wp-content/uploads/2017/06/51_07_AlphaExtrakt.pdf)
 7. Stevens, J. E.; Taylor, A. W.; Clawson, J. E., und Deinzer, M. L.: „Fate of Xanthohumol and Related Prenylflavonoids from Hops to Beer“, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1999, S. 2421-2428.
 8. Gahr, A.; Forster, A., und Van Opstaele, E.: „Reproducibility Trials in a Research Brewery and Effects on the Evaluation of Hop Substances in Beer. Part 1: Reproducibility in fresh beers“, *Brewing Science – Monatschrift für Brauwissenschaft*, 69, 11/12, 2016, S. 103-111.
 9. Kammhuber, K.: „Differentiation of the World Hop Collection by Means of the Low Weight Molecular Polyphenols“, *BrewingScience – Monatschrift für Brauwissenschaft*, 65, 3/4, 2012, S. 16-23.
 10. Intelmann, D.; Batram, C.; Kuhn, C.; Haseleu, G.; Meyerhof, W.; und Hofmann, T.: „Three TAS2R Bitter Taste Receptors Mediate the Psychophysical Responses to Bitter Compounds of Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer“, *Chem. Percept.*, 2, 2009, S. 118-132.
 11. Back, W; Biendl, M.: „Mikrobiologisch bedeutsame Inhaltsstoffe in hopfenintensiven Bieren, Teil 2“, *BRAUWELT* Nr. 12-13, 2017, S. 362-365.