



Chmelařský institut s.r.o.



# HODNOCENÍ KVALITATIVNÍCH PARAMETRŮ CHMELE PŘI SUŠENÍ A STÁRNUTÍ

Karel KROFTA a kol.

Certifikovaná metodika





Chmelařský institut s.r.o.



Česká zemědělská univerzita v Praze  
Technická fakulta  
Katedra zemědělských strojů

# HODNOCENÍ KVALITATIVNÍCH PARAMETRŮ CHMELE PŘI SUŠENÍ A STÁRNUTÍ

Karel KROFTA a kol.

Certifikovaná metodika

# HODNOCENÍ KVALITATIVNÍCH PARAMETRŮ CHMELE PŘI SUŠENÍ A STÁRNUTÍ

Certifikovaná metodika

Vedoucí autorského kolektivu:

**Ing. Karel Krofta, Ph.D.**

## **Autorský kolektiv**

Ing. Karel Krofta, Ph.D.

Ing. Jaroslav Pokorný, Ph.D.

Ing. Josef Ježek, Ph.D.

Ing. Ivo Klupal

Lenka Mravcová

Petra Vondráčková

doc. Ing. Adolf Rybka, CSc.

doc. Ing. Petr Heřmánek, Ph.D.

Ing. Ivo Honzík

Ing. Jan Podsedník

Ing. Jan Melč

Ing. Karel Šrámek

Ing. Zdeněk Kolman

Jaromír Nádvorník

Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Chmelařský institut s.r.o., Žatec

ČZU v Praze, Technická fakulta

ČZU v Praze, Technická fakulta

Chmelařství, družstvo Žatec

Chmelařství, družstvo Žatec

Rakochmel s.r.o., Kolečovice

Agrospol Velká Bystřice s.r.o.

Agrospol Velká Bystřice s.r.o.

Posudek pracovníka státní správy:

**Ing. Zdeněk Nesvadba**

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ)

Sekce rostlinné výroby, Oddělení chmele

Pracoviště zkoušení odrůd chmele Žatec

odborný referent pro plodiny

Posudek odborného oponenta z oboru:

**Ing. Alexandr Mikyška**

vědecký sekretář

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský Praha, a.s.

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) vydal osvědčení o uznání certifikované metodiky (UKZUZ 122796/2017 z 11. 12. 2017), které odsouhlasilo Ministerstvo zemědělství, Odbor výzkumu, vzdělávání a poradenství (21. 12. 2017).



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

Projekt QJ1510004 „Šetrný způsob konzervace pivovarských a dalších cenných látek chmele“ byl řešen s finanční podporou NAZV.

© Chmelařský institut s.r.o., 2017

© Česká zemědělská univerzita v Praze, 2017

Vydavatel Petr Svoboda

ISBN 978–80–86836–16-4

## Metodika pro praxi

### „HODNOCENÍ KVALITATIVNÍCH PARAMETRŮ CHMELE PŘI SUŠENÍ A STÁRNUTÍ“

#### OBSAH

	Strana
1. ÚVOD	4
2. CÍL METODIKY A DEDIKACE	4
3. ANALYTICKÉ PARAMETRY CHMELE PŘI SUŠENÍ A STÁRNUTÍ	4
3.1 VLHKOST CHMELE	4
3.2 INDEX SKLADOVÁNÍ CHMELE	6
3.3 ALFA A BETA KYSELINY	8
3.4 PRENYLFLAVONOIDY	10
3.5 HUMULINONY	13
3.6 CHMELOVÉ SILICE	14
4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	18
5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	19
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY	19
7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	19
8. PUBLIKACE, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	20
9. SOUHRN, ABSTRACT	20

## 1. ÚVOD

Složení chmele se neustále mění, a to nejen v průběhu dozrávání a sklizně, ale především při sušení, skladování a zpracování na chmelové výrobky. Během zrání se v chmelu syntetizuje mnoho sekundárních metabolitů, látek důležitých pro výrobu piva. Jedná se zejména o alfa a beta kyseliny, chmelové silice a prenylflavonoidy. Jejich biosyntéza je prováděna například změnami ve vzájemných poměrech analogů hořkých kyselin nebo zastoupením monoterpenů a seskviterpenů v chmelových silicích. Během sušení chmele, jako první fáze zpracování chmele bezprostředně po sklizni, k tomu přistupují další faktory, jako jsou zvýšená teplota při sušení a mechanické manipulace s chmelem při balení do pěstitelských hranolů. Změny nevratně pokračují při skladování a zpracování na chmelové výrobky. Rozhodujícími faktory jsou teplota a relativní vlhkost prostředí, čas, přístup kyslíku a případně denního světla. Kvalitu a šetrnost procesu sušení chmele a stupeň stárnutí lze hodnotit na základě řady objektivních analytických parametrů. Přehled těchto parametrů, principy stanovení, výhody a nevýhody a kvalitativní limity jsou předmětem předložené metodiky.

## 2. CÍL METODIKY A DEDIKACE

Cílem metodiky je charakterizovat kvalitativní ukazatele šetrnosti sušení a stárnutí chmele. Tyto ukazatele jsou zvoleny tak, aby je bylo možno stanovit v běžné chemické laboratoři, zaměřené na analýzy chmele. Potřebné přístrojové vybavení v podobě UV-VIS spektrofotometru, kapalinového chromatografu, případně plynového chromatografu patří v dnešní době již ke standardu. Metodika byla vypracována jako výstup z výzkumného projektu NAZV Ministerstva zemědělství České republiky QJ1510004 „Šetrný způsob konzervace pivovarských a dalších cenných látek chmele“.

## 3. ANALYTICKÉ PARAMETRY CHMELE PŘI SUŠENÍ A STÁRNUTÍ

V podkapitolách 3.1–3.6 jsou podrobně popsány kvalitativní parametry chmele vhodné pro hodnocení kvality procesu sušení chmele a jeho stárnutí při zpracování na chmelové výrobky a skladování. U každého parametru je uveden princip a způsob stanovení, pracovní postup, vymezení kvalitativních limitů a příklad využití v praxi.

### 3.1 Vlhkost chmele

Vlhkost je velmi důležitým kvalitativním parametrem chmele. Optimální obsah vlhkosti sušeného chmele leží v intervalu 8–11 %. Obsahuje-li sušený chmel méně než 7 % vlhkosti, má tendenci k rozplevování, tj. rozpadu na listeny a věténka, což je z hlediska ztrát lupulinu při dalším zpracování nežádoucí. Při obsahu vody vyšším než 13 % hrozí chmelu zaplísnění a znehodnocení v důsledku změny barvy, v krajním případě až samovznícení. Pokud je zjištěn nadměrný obsah vody, chmel je vrácen pěstiteli zpět k dosušení. Pěstitelé jsou si rizik špatného usušení chmele dobře vědomi, protože počet případů z praxe, kdy musí být chmel dosušen, je ojedinělý.

### *Princip a způsob stanovení*

Vlhkost vzorku chmele se stanoví sušením definovaného množství mletého chmele v laboratorní sušárně s nuceným oběhem vzduchu nebo na sušicích vahách. Z rozdílu hmotností chmele před a po sušení se stanoví vlhkost vzorku.

### *Pracovní postup*

Při měření v laboratorní sušárně se do hliníkové či skleněné vzorkovnice odváží 5 až 10 gramů mletého chmele. Miska s odváženým vzorkem se vloží (bez víčka) do sušárny, předem vytemperované na 105 °C. Vzorek se suší po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby se miska s vysušeným chmelem uzavře víčkem a vloží do exikátoru k vychladnutí. Po ochlazení na pokojovou teplotu se miska zváží. V případě sušení čerstvého zeleného chmele je postup obdobný s tím, že hlávky se předem rozstíhají na menší kousky a doba sušení se prodlouží. Doba 1,5 hodiny je v tomto případě postačující.

Vlhkost chmele lze stanovit kromě sušení v laboratorní sušárně i na sušicích vahách, kdy vlhkost vzorku se průběžně zobrazuje na displeji přístroje. Množství vzorku je v tomto případě přibližně 3 gramy a chmel musí být rovnoměrně rozprostřen po celé ploše vážicí misky. Konec sušení nastane v okamžiku, kdy úbytek hmotnosti vzorku během definovaného časového intervalu je menší než předem stanovená hodnota. K měření vlhkosti chmele se osvědčila sušicí váha HE43 od firmy Mettler-Toledo (obr. 1).

Mezní hodnoty vlhkosti chmele:

< 8,0 %

*přesušený chmel*

9–11 %

*optimální hodnoty*

11–12 %

*akceptovatelná zvýšená vlhkost*

> 12 %

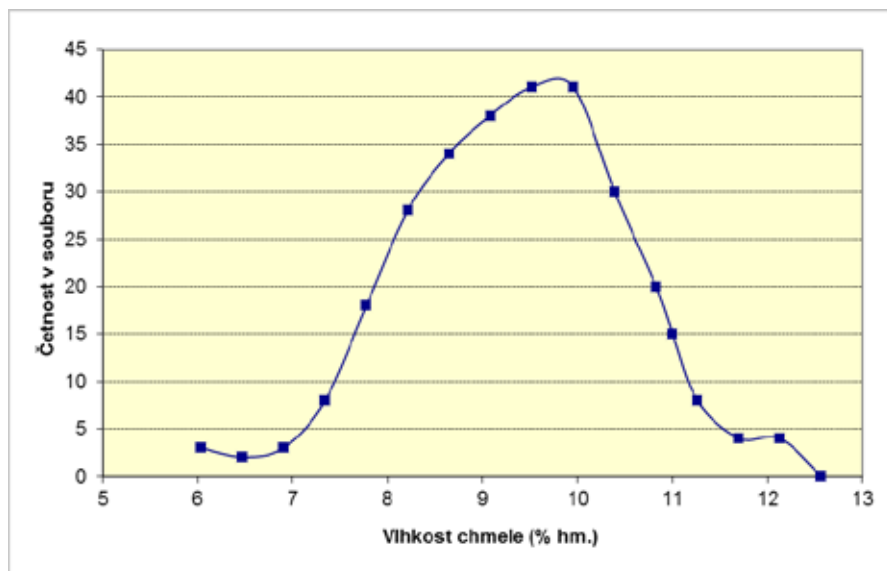
*vysoká vlhkost, chmel musí být dosušen*



Obr. 1: Sušicí váhy HE43 od firmy Mettler-Toledo

### Poznámka

Na obr. 2 je znázorněna distribuce vlhkostí českých chmelů ze sklizně 2015. Analytická data byla získána z hodnocení partií chmele při nákupu, při kterém se stanovuje obsah alfa kyselin, biologických příměsí a vlhkost. Prakticky všechny chmele měli vlhkost v téměř optimálním intervalu 7 až 12 % s průměrnou hodnotou 9,2. Sušení chmele je náročný proces. Pěstitelé jsou si toho vědomi, a proto na obsluhu sušáren nasazují zkušené pracovníky s mnohaletou praxí. Špatným usušením lze chmel snadno nevratně poškodit nebo až znehodnotit.



Obr. 2: Distribuce vlhkostí chmele v českých chmelech ze sklizně 2015

## 3.2 Index skladování chmele

### Princip metody

Index skladování (HSI – Hop Storage Index) je jednoduchým kvalitativním měřítkem chmele, které hodně vypovídá o jeho čerstvosti a míře stárnutí. Jedná se o bezrozměrný parametr, který se vypočítává jako poměr absorbancí toluenového extraktu chmele při 275 a 325 nm, měřený za definovaných podmínek. V zelených hlávkách před sušením se jeho hodnota pohybuje v rozmezí 0,20–0,25 bez ohledu na odrůdu. Potom jeho hodnota nevratně vzrůstá v závislosti na podmínkách skladování, způsobu zpracování a odrůdě. U špatně skladovaných chmelů může být jeho hodnota vyšší než 1,00.

### Postup stanovení

Do skleněné láhve o objemu 250 ml se naváží 5 gramů rozemletého chmele. Přidá se 100 ml toluenu. Láhev se uzavře a třepe v třepačce po dobu 30 minut. Po vytřepání se obsah láhve nechá usadit. Do 100ml odměrné baňky se odpipetuje 5 ml vyčereného toluenu.



nového extraktu a doplní methanolem po rysku (roztok A). Z roztoku A se odpipetuje 5 ml do 50ml odměrné baňky a doplní alkalickým methanolem po rysku (roztok B). Absorbance roztoku B se proměří na UV-VIS spektrofotometru při vlnových délkách 275 a 325 nm proti slepému vzorku, který se připraví ředěním 5 ml toluenu stejným způsobem jako vzorky chmele. Index skladování chmele se vypočte ze vztahu [1].

$$HSI = A_{275}/A_{325} \quad [1]$$

Stanovení HSI dle tohoto postupu odpovídá metodě uvedené v ASBC metodě, Hops 6. Postup je vhodný pro sušené hlávky a chmelové granule. Proměřování čerstvých zelených chmelů ukázalo, že výše popsany způsob přípravy vzorku je pro zelené chmele nepoužitelný (naměřené hodnoty jsou nelogicky vysoké > 0,75 a neodpovídají realitě). Pro čerstvé zelené chmele byl proto vypracován alternativní způsob přípravy vzorku, při zachování principu finálního stanovení.

#### *Modifikace přípravy vzorku pro čerstvé zelené chmele*

Do skleněné láhve o objemu 250 ml se naváží 10 gramů nakrájených či jinak vhodně dezintegrováných zelených hlávek chmele. Přidá se 20 ml methanolu, 100 ml diethyletheru a 40 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (c = 0,1 mol/L). Láhev se uzavře a třepe se v třepačce po dobu 40 minut. Po vytřepání se obsah láhve nechá usadit. Do 100ml odměrné baňky se odpipetuje 5 ml vyčereného etherového extraktu a doplní methanolem po rysku (roztok A). Z roztoku A se odpipetuje 5 ml do 50ml odměrné baňky a doplní alkalickým methanolem po rysku (roztok B). Další postup je stejný jako u sušených hlávek.

Mezní hodnoty HSI pro chmele:

Čerstvý zelený chmel	0,20–0,25
Sušený chmel, bezprostředně po sklizni	0,24–0,31
Granulovaný chmel	0,30 a více
Nevhodně skladované chmele	> 1,00

#### *Poznámka*

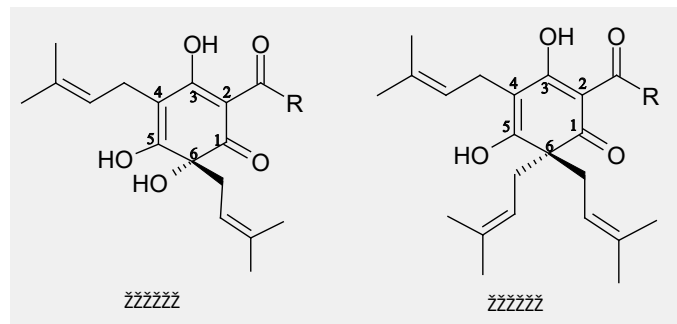
Řada pivovarů má stanovení indexu skladování chmele zahrnuto v systémech kontroly kvality surovin. Limitní hodnota HSI pro chmel se pohybuje zpravidla v intervalu 0,40–0,45. Měření indexu skladování ve chmelech bezprostředně po sklizni se neprovádí rutinně. Obchodní organizace si tímto způsobem namátkově kontrolují kvalitu sušení chmele od svých dodavatelů. V tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty HSI v českých chmelech, především v Žateckém poloraném červeňáku, krátce (tj. do 1 měsíce) po usušení v letech 2013–2017. Převážná většina hodnot se nachází v intervalu 0,270–0,312, což je pro chmele v této době po sklizni běžné.

Tabulka 1: Hodnoty HSI v českých chmelech krátce po usušení

Pořadí vzorku	HSI				
	2013	2014	2015	2016	2017
1	0,275	0,278	0,291	0,270	0,281
2	0,281	0,295	0,308	0,274	0,252
3	0,287	0,291	0,290	0,263	0,281
4	0,291	0,311	0,288	0,293	0,262
5	0,304	0,295	0,289	0,269	0,302
6	0,291	0,267	0,305	0,276	0,272
7	0,277	0,273	0,294	0,289	0,290
8	0,312	0,283	0,270	0,270	0,288
9	0,291	0,300	0,301	0,307	0,265
10	0,305	0,293	0,302	0,279	0,296

### 3.3 Alfa a beta kyseliny

Alfa a beta kyseliny patří mezi specifické složky chmelových pryskyřic (obr. 3). Alfa kyseliny jsou tvořeny několika analogy humulonů (kohumulon, humulon, adhumulon aj.). Beta kyseliny se od alfa kyselin liší přítomností dalšího postranního řetězce na 6. uhlíku aromatického jádra. Podobně jako alfa kyseliny se i beta kyseliny vyskytují ve formě několika analogů lupulonu (kolupulon, lupulon, adlupulon). V průběhu chmelovaru alfa kyseliny spontánně termicky izomerují na iso-alfa kyseliny, které mají výrazně hořkou chuť. Během sušení, skladování a zpracování se obsah alfa i beta kyselin nevrátně snižuje v závislosti na podmínkách (teplota, přístup vzduchu, světlo). Vzniká celá řada degradačních produktů, z nichž nejdůležitější jsou humulinony (alfa kyseliny) a hulupony v případě beta kyselin. Obsah alfa a beta kyselin se stanovuje kapalinovou chromatografií dle uzanční metody EBC 7.7. Kromě toho existuje několik nesespecifických metod, založených na konduktometrické titraci alfa kyselin octanem olovnatým. Pro účely kvantifikace rychlosti stárnutí chmele na základě poklesu obsahu alfa kyselin je však nutno použít kapalinovou chromatografii.



Obr. 3: Strukturální vzorce chmelových alfa a beta kyselin (Priest, Stewart, 2006)

### *Princip metody*

Alfa a beta kyseliny jsou z chmele a chmelových výrobků extrahovány směsí diethylether-methanol a zředěným vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové. Chmelové pryskyřice vyextrahované do etherové fáze se dělí na chromatografické HPLC koloně s reverzní fází. Analyty jsou spektrofotometricky detekovány při vlnové délce 314 nm.

### *Pracovní postup*

Sušený chmel se rozemele ve vhodném mlýnku na jemnou drť. Odváží se přesně 10 gramů jemně mletého chmele do 250ml skleněné láhve. Přidá se 20 ml methanolu, 100 ml diethyletheru a 40 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ). Láhev se uzavře a třepe se v třepačce po dobu 40 minut. Po vytřepání se obsah láhve nechá cca 10 minut usadit, aby se fáze oddělily (vodná a etherová). Do 50ml odměrné baňky se odpipetuje 5 ml vyčištěného etherového extraktu a doplní methanolem po rysku. Obsah baňky se důkladně promíchá a zfiltruje přes stříkačkový či membránový filtr vhodný pro organické fáze. Zfiltrovaný extrakt je připraven k chromatografické analýze. Vzorky jsou stabilní po dobu 24 hodin, pokud jsou uchovány při nízkých teplotách a chráněny před denním světlem.

Uvede se do chodu kapalinový chromatograf. Průtok mobilní fáze se nastaví na 0,80 ml/min. UV nebo DAD detektor se nastaví na snímání analytického signálu při vlnové délce 314 nm. Zkontroluje se správná funkce celého systému (těsnost spojení, teplota termostatu kolony, stabilita tlaku mobilní fáze). Mobilní fáze má složení methanol : voda : kyselina fosforečná ( $c = 85 \%$ ) v poměru 830 : 170 : 5 ml. Chromatografická kolona se před nástřikem prvního vzorku kondicionuje průtokem mobilní fáze přibližně 30 minut. Osvědčený typ kolony je Nucleosil 250 x 4 mm, C18 EC, 5  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel). Objem nástřiku vzorku je 10  $\mu\text{l}$ . Analýza hořkých kyselin trvá přibližně 15–17 minut.

### *Poznámka*

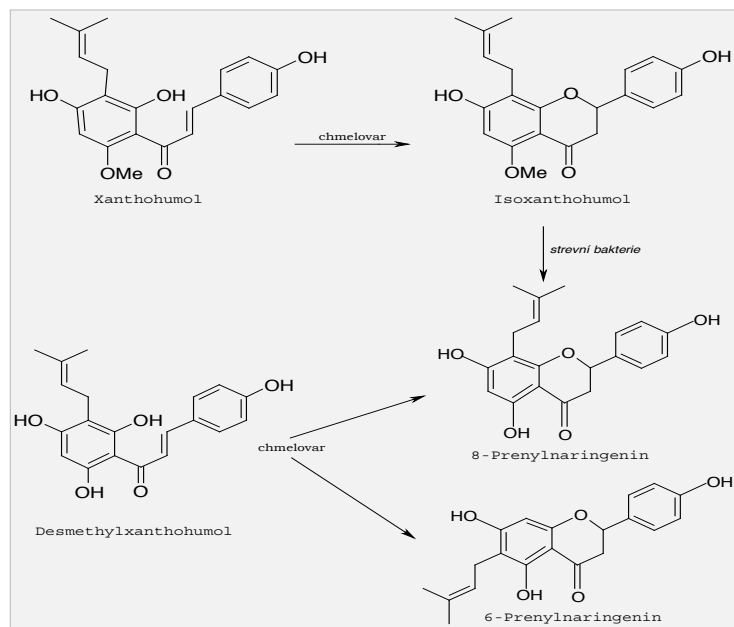
Kvalitativní limity pro posouzení kvality procesu sušení chmele na základě poklesu obsahu alfa kyselin nelze v tomto případě stanovit, protože v časovém horizontu několika dní jsou alfa kyseliny stabilní látky. Úbytky v průběhu sušení jsou neprůkazné mj. i s ohledem na nehomogenitu chmele na vstupu do sušárny. Pokles obsahu alfa a beta kyselin je vhodný k monitorování procesu stárnutí chmele v delším časovém horizontu v řádech měsíců až roků. Hodí se zejména pro granulované chmele, u kterých byla v průběhu výroby dosažena značná míra homogenity díky tomu, že namletý chmel se před granulací homogenizuje v sílech pomocí šnekových míchadel. V tabulce 2 jsou uvedeny obsahy alfa a beta kyselin v průběhu 12měsíčního testu stárnutí českých odrůd chmele ze sklizně 2016. Vzorky chmele byly analyzovány na začátku testu, dále po 6 a 12 měsících skladování při normální teplotě. Značný pokles obsahu alfa i beta kyselin v časovém období několika měsíců je zřejmý.

Tabulka 2: Obsah alfa kyselin v českých odrůdách chmele během přirozeného stárnutí (2016/2017)

Doba	ŽPČ	Saaz Late	Saaz Special	Sládek	Harmonie	Kazbek	Premiant	Rubin	Agnus	Vital
začátek	3,41	5,11	5,86	8,46	7,11	6,12	7,01	12,19	12,05	12,87
6 měsíců	3,10	3,17	3,41	6,15	5,17	3,68	6,16	9,92	7,69	7,99
12 měsíců	1,42	1,85	1,77	3,93	3,04	1,90	4,72	5,63	3,94	3,10

### 3.4 Prenylflavonoidy

Prenylované flavonoidy jsou specifickou složkou chmelových polyfenolů chalkonové řady, které strukturně představují přechod mezi pryskyřicemi a polyfenoly. Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny látek, které se nachází ve chmelu, jsou xanthohumol (X) a desmethylxanthohumol (DMX). Prenylflavonoidy se spolu s pryskyřicemi kumulují v lupulinových žlázách chmelových hlávek. Díky tomu je lze snadno analyzovat kapalinovou chromatografií simultánně s alfa a beta kyselinami.



Obr. 4: Strukturální vzorce a transformační produkty chmelových prenylflavonoidů (Karabín, 2016)

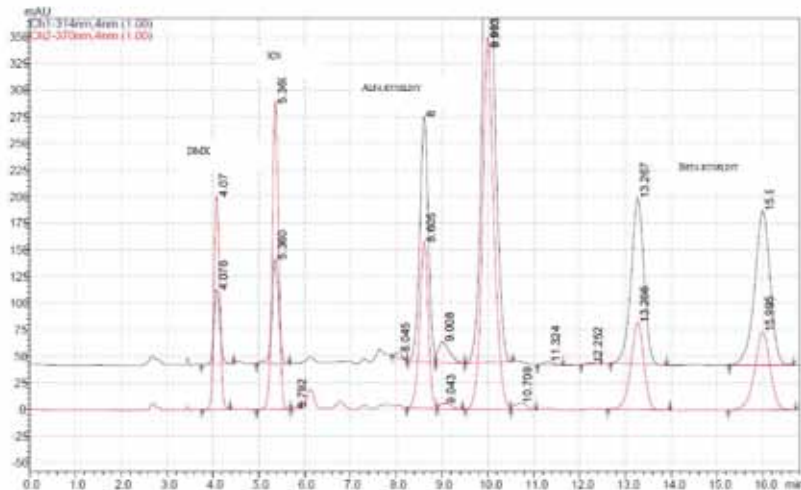
Na obr. 4 jsou uvedeny jejich strukturální vzorce a nejvýznamnější transformační reakce. V průběhu chmelovaru se xanthohumul izomeruje na iso-xanthohumul a DMX na směs 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin. 8-prenylnaringenin je v současné době považován za dosud nejúčinnější fytoestrogen. U xanthohumolu byla prokázána řada příznivých bioaktivních účinků například v prevenci proti osteoporóze nebo několika typům karcinomů. Není proto překvapením, že na chmelové prenylflavonoidy se obrací zájem farmaceutických firem při vývoji nových fytofarmak.

### Princip metody

Prenylflavonoidy xanthohumul a DMX jsou z chmele a chmelových výrobků extrahovány směsí diethylether-methanol a zředěným vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové. Analyty vyextrahované do etherové fáze se dělí na chromatografické HPLC koloně s reverzní fází. Prenylflavonoidy jsou spektrofotometricky detekovány při vlnové délce 370 nm. V praxi se jejich stanovení provádí simultánně se stanovením alfa a beta kyselin.

### Pracovní postup

Pracovní postup je shodný s přípravou vzorků pro stanovení alfa a beta kyselin. Při stanovení kapalinovou chromatografií je analytický signál snímán při dvou vlnových délkách, 314 nm alfa a beta kyseliny, prenylflavonoidy při 370 nm. Typický chromatogram simultánního stanovení alfa a beta kyselin, xanthohumolu a DMX je na obr. 5. Analyty se eluují v pořadí DMX (4. minuta), xanthohumul (5.–6. minuta), kohumulon (8.–9. minuta), humulon (10.–11. minuta), kolupulon (13.–14. minuta), lupulon (15.–16. minuta).



Obr. 5: Chromatogram simultánní analýzy alfa kyselin, beta kyselin a prenylflavonoidů (xanthohumul a DMX) modifikovanou metodou EBC 7.7

### Poznámka

V tabulce 3 jsou shrnuty výsledky analýz alfa kyselin, beta kyselin a prenylflavonoidů v odrůdě Vital v předsklizňovém období, při sklizni a po usušení na dvou typech sušáren. Obsah alfa kyselin v průběhu dozrávání, na rozdíl od beta kyselin, postupně narůstal. Množství prenylflavonoidů se výrazně neměnilo. Sušením se snížil obsah alfa kyselin o cca 10 %, což lze připisat na vrub ztrátám lupulinu během česání a sušení. K největším změnám (ztrátám) došlo v obsahu DMX v závislosti na teplotě sušení. Při sušení v provozní pásové sušárně došlo k úbytku bezmála 50 % původního množství DMX. Sušením při 40 °C v experimentální komorové sušárně ubylo pouze 28 % DMX.

Tabulka 3: Obsahy alfa kyselin, beta kyselin a prenylflavonoidů v odrůdě Vital během zrání a po sušení na provozní pásové sušárně (55 °C) a experimentální komorové sušárně (40 °C)

Popis vzorku	Datum	Alfa*	Beta*	X*	DMX*	Vlhkost	HSI
zelený chmel	18. 8.	12,51	11,71	0,85	0,53	78,5	-
zelený chmel	25. 8.	13,80	8,93	0,88	0,59	77,4	0,205
zelený chmel	5. 9.	15,11	11,25	0,88	0,56	75,6	0,220
zelený chmel	13. 9.	15,04	9,74	0,77	0,59	69,8	0,222
zelený sklizňový vzorek	17. 9.	15,54	9,96	0,75	<b>0,57</b>	72,4	0,229
sušený sklizňový vzorek 55 °C	18. 9.	14,18	9,41	0,68	<b>0,29</b>	8,7	0,331
sušený sklizňový vzorek 40 °C	18. 9.	14,06	9,19	0,67	<b>0,41</b>	10,3	0,258

\* Obsahy jsou přepočteny na absolutně suchý vzorek.

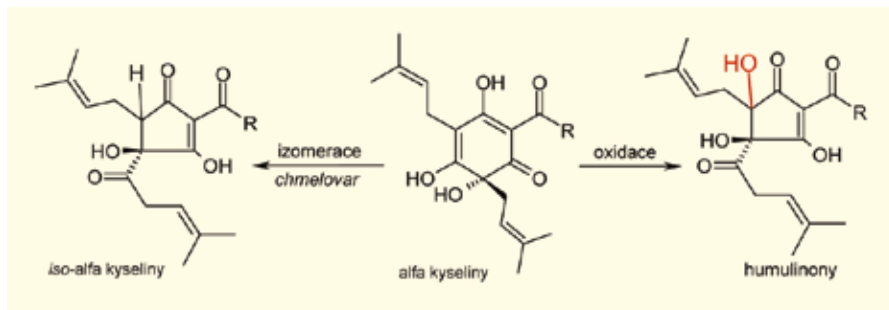
Teplné nestability desmethylxanthohumolu lze s výhodou použít při testování inovací při vývoji nových technologií sušení a zpracování chmele. Měření množství uvedené látky je spolehlivým indikátorem šetrnosti technologických procesů zpracování chmele po sklizni. Protože jednotlivé odrůdy se liší v přirozeném obsahu DMX, jsou k tomuto účelu vhodné odrůdy s vysokým či nadprůměrným obsahem desmethylxanthohumolu, především odrůda Vital, případně odrůda Sládek.

### 3.5 Humulinony

Humulinony vznikají oxidací alfa kyselin, např. při zpracování chmele na pelety nebo při stárnutí chmele za přístupu vzduchu (obr. 6). Jsou dobře rozpustné ve vodě, ale jejich příspěvek k celkové hořkosti piva není při chmelení do varní pánve velký, přestože jejich sensorická hořkost dosahuje 65 % hořkosti iso-alfa kyselin. Tyto látky ale přispívají k hořkosti studeně chmelených piv. K izomeraci alfa kyselin při sušení a skladování chmele nedochází. Měření obsahu humulinonů po sušení je alternativním kritériem hodnocení kvality chmele a stupně stárnutí. Analýza humulinonů ve chmelu, v rámci zpracování této metodiky, byla spojena s jejich syntézou z alfa kyselin v laboratorních podmínkách a následnou separací kapalinovou chromatografií.

#### Příprava humulinonů

Jeden gram alfa kyseliny se rozpustí v 5 ml diethyletheru. Přidá se 0,5 ml kumenhydroperoxidu a 35 ml nasyceného roztoku uhlíčitanu sodného. Směs se nechá reagovat na vzduchu po dobu 48 hodin při pokojové teplotě za stálého míchání. Po uplynutí této doby se na rozhraní fází vytvoří pevná krystalická vrstva humulinonů. Humulinony se od matečného louhu oddělí filtrací a rekrystalizují ve směsi methanol-diethylether (1 : 1). K roztoku sodné soli humulinonů v methanolu se v přebytku přidá vodný roztok zředěné kyseliny chlorovodíkové ( $c = 0,10 \text{ mol/l}$ ). Humulinony se reextrahují do čistého diethyletheru. Extrakt se promyje čistou vodou, aby se odstranily zbytky minerální kyseliny. Odpařením etheru se získá čistý humulinon ve formě nažloutlé pevné látky.



Obr. 6: Oxidace a izomerace alfa kyselin (De Clippeller, 2014)

#### Chromatografické stanovení humulinonů

Příprava vzorku chmele k analýze humulinonů je shodná s přípravou k analýze alfa a beta kyselin. Standardní roztok humulinonů o koncentraci 20 mg/l se připraví rozpuštěním 2 mg čerstvě izolovaných humulinonů v 100 ml methanolu. Chromatografická separace se provede na analytické koloně Luna 250 x 4,6 mm, 5 m, při teplotě 40 °C. Eluce se provede v gradientovém režimu při celkovém průtoku mobilní fáze 0,80 ml/min. Mobilní fáze A: acetonitril – voda – kyselina fosforečná (650 : 350 : 1 obj.), mobilní fáze B: acetonitril – kyselina fosforečná (99 : 1 obj.). Složení mobilní fáze při gradientové eluci je následující:

Čas	Gradient (B, % obj.)
0–2 minuty	5
2–25 minut	5 ▶ 90
25–30 minut	90
30–40 minut	5

Analytický signál je snímán při 270 nm. Eluční čas humulinonů je do 15 minut. Na obr. 7 a obr. 8 jsou uvedeny chromatogramy analýzy standardního roztoku humulinonů a reálného vzorku hlávek odrůdy Kazbek ze sklizně 2017 bezprostředně po usušení.

Standardní hodnoty obsahu humulinonů ve chmelu:

< 0,10 %	čerstvý zelený chmel, sušený chmel bezprostředně po sklizni
> 0,10 %	starší chmele v různé fázi stárnutí, granulované chmele

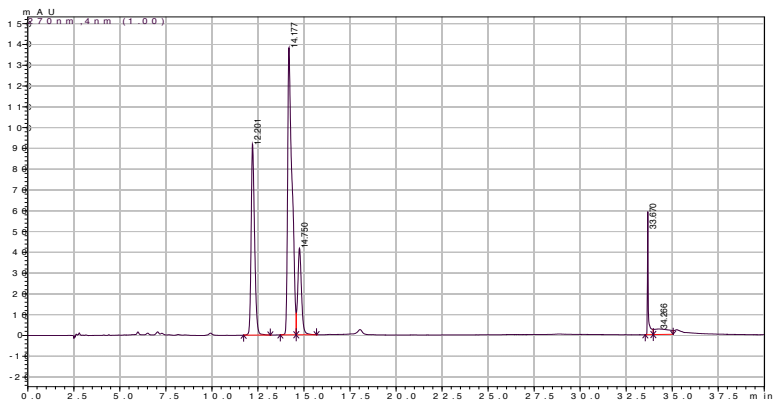
Obsah humulinonů v zelených chmelech před sklizní i bezprostředně po usušení je zanedbatelný (do 0,10 %). V sušených hlávkách po několika měsících skladování při pokojové teplotě a zejména v granulovaných chmelech je obsah humulinonů několikanásobně vyšší (0,20 až 0,50 %).

### 3.6 Chmelové silice

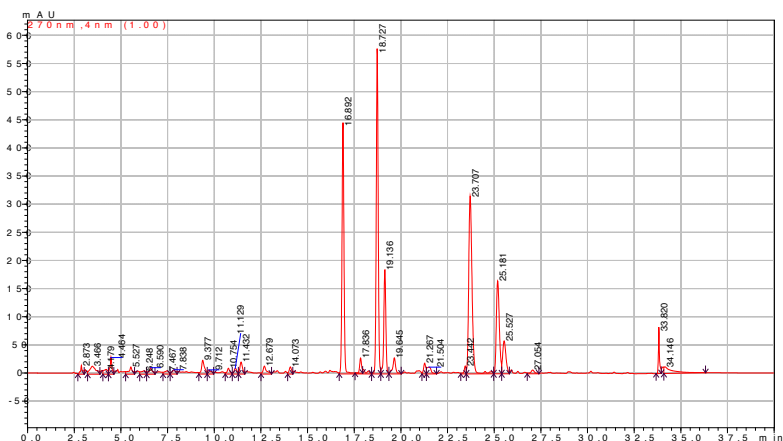
#### *Princip metody*

Chmelové silice jsou nejdůležitější skupinou obsahových látek chmele odpovědných za aroma chmele. V závislosti na odrůdě obsahuje chmel 0,5 až 3,0 % silic, které se spolu s pryskyřicemi a dalšími látkami kumulují v lupulinových žlázách v průběhu tvorby a zrání hlávek. Chmelové silice jsou směsí několika set přírodních těkavých látek různého chemického složení. Některé jsou zastoupeny řádově v desítkách procent (myrcen,  $\alpha$ -humulen), jiné se vyskytují v malém až stopovém množství. Všechny se však společně podílí na vzniku charakteristického chmelového aroma. Složky chmelových silic se rozdělují do tří skupin. Největší podíl připadá na uhlovodíkovou frakci, která tvoří 70–80 % celkové hmotnosti silic, 20–30 % připadá na kyslíkatou frakci. Zbývající podíl připadá na kyslíkaté a sírné látky. Zatímco analýza složení chmelových silic se provádí výhradně plynovou chromatografií, izolaci silic z chmelové matrice lze provádět několika metodami. Tradičním a stále často používaným postupem je destilace s vodní párou, při které se směs vody a jemně mletého chmele vaří po definovanou dobu, během níž těkavé složky silic v parní fázi kondenzují ve vodním chladiči. Protože jsou lehčí než voda (měrná hmotnost  $\rho = 850 \text{ kg/m}^3$ ), zůstávají na hladině vodního sloupce, ze kterého se snadno oddělí. Alternativní způsob izolace silic z chmele je extrakce na tuhou fázi (SPME), při které se složky silic sorbují na povrchu vlákna, pokrytého aktivní vrstvou sorbentu. Po dosažení rovnovážného stavu se složky silic desorbují z vlákna přímo v nástřikovém prostoru plynového chromatografu. Některé složky chmelových silic podléhají snadno oxidaci a jejich aktuální obsah lze použít jako parametr míry oxidace a stárnutí chmele. Takovými látkami jsou například karyofylenepoxid a humulenepoxid II, oxidační produkty příslušných seskviterpenů.





Obr. 7: Chromatografický záznam analýzy standardu humulinonů ( $c = 20 \text{ mg/L}$ )



Obr. 8: Chromatografický záznam analýzy humulinonů, alfa a beta kyselin odrůdy Kazbek ze sklizně 2017

### Pracovní postup izolace silic destilační metodou

Do zábrusové varné baňky o objemu 4 l se nalije 2 l destilované vody a přidá se 100 gramů mletého chmele a několik varných kamínků. V případě čerstvého zeleného chmele se ručně nakrájí 150 gramů zelených hlávek. Mletí chmele provádíme bezprostředně před izolací silic. Je nutno se vyvarovat rovněž skladování rozemletých vzorků v lednici z důvodu rychlé ztráty těkavých látek ze vzorku. Baňka se vzorkem se umístí do topného hnízda. Na varnou baňku se nasadí kolimátor s dvoukruhovým vodním chlazením. Vzhled celé aparatury na destilaci chmelových silic je na obr. 9. Pustí se chladicí voda do kolimátoru a současně zapne elektrické vyhřívání topného hnízda. Za začátek varu se považuje okamžik, kdy



zkondenzovaná voda začne separační tubicí přetékat zpět do varné baňky. Doba varu je 90 minut. Po jeho ukončení se vypne topení hnízda. Z kolimátoru se nejprve odpustí voda. Vydestilovaná silice, která se udržuje na hladině vodního sloupce, se odpustí do předem zvážené zkumavky. Injekční stříkačkou se odsaje zbytek vody a zkumavka opět zváží. Z rozdílů hmotností se určí první podíl silice (A). Kolimátor se propláchne 20 ml n-pentanu. Proplach se jímá do 100ml zábrusové baňky. Rozpouštědlo se oddestiluje na rotačním vakuovém odpařovačku při teplotě lázně 37–38 °C a absolutním tlaku 60 kPa po dobu 5 minut. Po odpaření rozpouštědla se baňka opět zváží a z rozdílů hmotností se stanoví druhý podíl silice (B). Celková hmotnost silice je dána součtem podílů A + B. Výsledek se uvádí s přesností na dvě desetinná místa.

Obr. 9: Aparatura pro izolaci chmelových silic destilační metodou

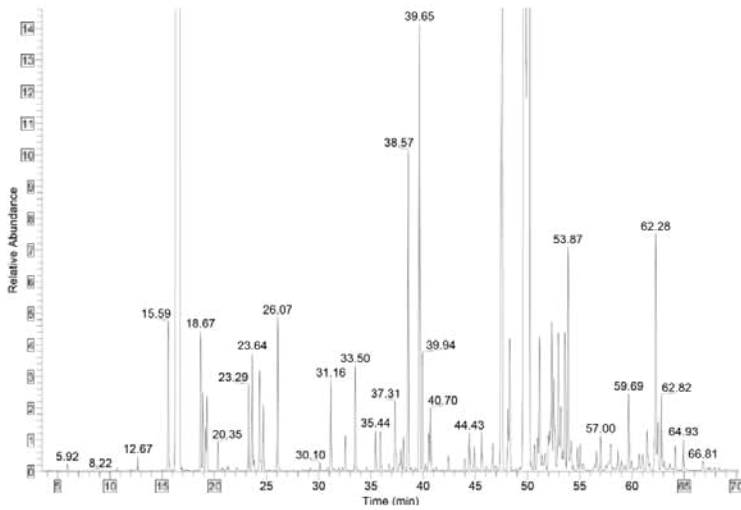
### Chromatografická analýza

K chromatografické analýze chmelových silic se použije podíl A. Chmelová silice se naředí n-hexanem v poměru 1 : 1 a injikuje se na kolonu plynového chromatografu v objemu 0,5  $\mu$ l a splitem poměru 1 : 50. Chromatografická kolona DB 5 (Agilent) má tyto parametry: 30 m x 0,25 mm x 0,50  $\mu$ m. K analýze lze použít i kolony stejných parametrů od jiných výrobců (Restek, Thermo aj.). Nosný plyn je helium (čistota 5,0) o konstantním tlaku 60 kPa na vstupu do kolony. Teplotní gradient na separační koloně je následující:

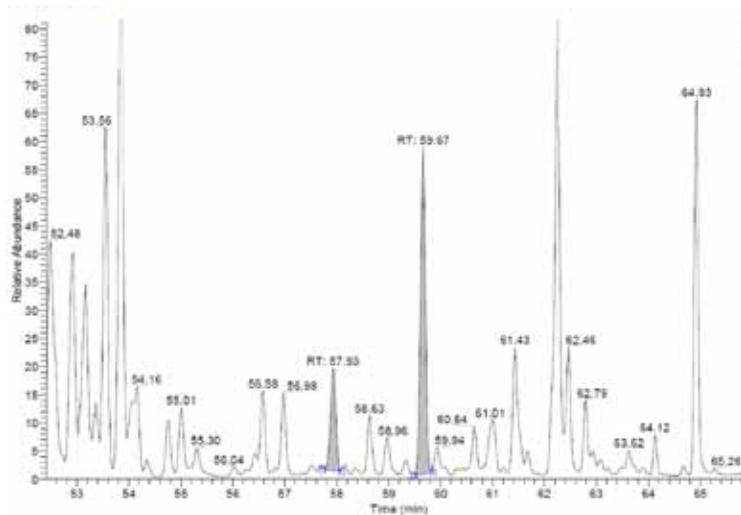
60 °C – 5 minut, izotermicky  
 60–150 °C – gradient 2 °C/min  
 150–225 °C – gradient 5 °C/min  
 225–250 °C – gradient 25 °C/min  
 250 °C – 5 minut, izotermicky

Přístroj: plynový chromatograf Focus ve spojení s hmotnostním detektorem DSQ II (Thermo)

Teplota injektoru: 250 °C  
 Teplota detektoru: 250 °C  
 Iontový zdroj: 70 eV



Obr. 10: Chromatografický záznam celé analýzy chmelových silic



Obr. 11: Detail chromatografického záznamu analýzy chmelových silic s indikací retenčních časů karyoflenepoxidu (RT=57:93 min) a humulenepoxidu II (RT=59:67 min)

## Vyhodnocení výsledků

Semikvantitativní hodnocení složení silice se vyjadřuje v relativních procentech jako podíl integrované plochy složky k celkové integrované ploše všech složek silice. Při kvantifikaci jsou integrační parametry voleny tak, aby bylo kvantifikováno 50–70 složek silice. Největší podíl připadá na terpenické uhlovodíky myrcen, karyofylen, humulen, farnesen a selineny, které tvoří 50–70 % celkové hmotnosti silic. K identifikaci složek se používají dva parametry: elučňací čas a hmotnostní spektrum. Při změně kolony od jiného výrobce nebo změnou parametrů (délka kolony, vnitřní průměr či tloušťka filmu) je nutno počítat se změnou elučňacího pořadí některých složek. Na obr. 10 je uveden celkový chromatogram chmelových silic a na obr. 11 detailní výřez s indikací elučňacích pásů a retenčních časů karyofylenepoxidu a humulenepoxidu II.

Hodnoty míry stárnutí chmele na základě obsahu karyofylenepoxidu a humulenepoxidu v chmelových silicích:

	karyofylenepoxid (%)	humulenepoxid II (%)
čerstvý zelený chmel	0,15–0,35	0,25–0,60
sušený chmel bezprostředně po sklizni	0,14–0,20	0,30–0,50
starší chmele v různé fázi stárnutí	> 0,50	> 1,00

Experimentálně zjištěné intervaly spolehlivosti pro obsah terpenických epoxidů v čerstvých zelených a sušených chmelech bezprostředně po sklizni ukázaly, že se prakticky neliší. Výrazné nárůsty obsahu karyofylenepoxidu a humulenepoxidu byly zjištěny v chmelových granulích a dlouhodobě skladovaných hlávkových chmelech při normální teplotě. Z tohoto důvodu je nutno tento parametr pro hodnocení kvality sušení považovat za pomocný a posuzovat jej v kontextu s dalšími kritérii uvedenými v této metodice.

## 4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost postupů spočívá především v modifikaci analytických metod pro čerstvé zelené chmele. Zelené hlávky obsahují cca 75 % vody. Při přípravě k analýzám zaujímají mnohem větší objem než rozemleté sušené hlávky. To vyžaduje úpravu navážek a objemů extrakčních činidel. Pro stanovení indexu skladování chmele v zelených chmelech byl vypracován originální postup, který je, na rozdíl od dosud užívané metody, univerzální a použitelný pro zelené i sušené chmele. Nově byla vypracována analytická metoda stanovení humulinonů ve chmelu a chmelových výrobcích od přípravy analytického standardu po kvantitativní stanovení kapalinovou chromatografií. Desmethylxanthohumul (DMX) se ukázal jako tepleně labilní látka. Jeho kvantitativní stanovení v zelených a sušených hlávkách umožňuje spolehlivě posoudit efektivnost inovativních kroků při vývoji technologií pro šetrné sušení a zpracování chmele.

## 5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika najde uplatnění v kontrolních mechanismech hodnocení kvality sušeného chmele v průběhu skladování a zpracování na chmelové výrobky. Z chmelových výrobků se jedná především o granulované chmele. Chmelové extrakty jsou z hlediska stárnutí velmi stabilní a lze je bez ztráty kvality skladovat několik let. Vzhled hlávkových a granulovaných chmelů nemusí vždy korespondovat s jejich stářím. To spolehlivě odhalí až analýzy uvedené v této metodice. Metodické postupy využijí zejména obchodní organizace, které vykupují chmel od pěstitelů, ke kontrole šetrnosti sušícího procesu chmele bezprostředně po sklizni. Uplatnění najde i při kontrole kvality granulovaných chmelů, protože při granulaci dochází ke značnému mechanickému i tepelnému zatížení chmele. Využití je může i státní orgán (ÚKZÚZ), který dozoruje nákupní a zpracovatelský proces českých chmelů z ročníkové sklizně. Garantem uplatnění metodiky v praxi je Svaz pěstitelů chmele České republiky.

## 6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Postupy uvedené v této metodice jsou schopny odhalovat případy falzifikace chmele nikoli ve smyslu identity deklarované odrůdy, ale ve smyslu stáří chmele. Trh s chmelem je zřídka vyrovnaný. V letech, kdy je na trhu přebytek chmele, se volný chmel skladuje, aby mohl později vyrovnat jeho nedostatek v ročnících s nižší úrodou. Tento chmel by se však měl obchodovat za nižší ceny než chmele z nové sklizně, přičemž cena by měla odpovídat stáří chmele a míře zhoršení kvalitativních parametrů uvedených v této metodice.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Analytica EBC (1998). Hans Carl Getränke Fachverlag, Nürnberg, Method 7.7.

Analytica ASBC, American Society of Brewing Chemists, 8<sup>th</sup> Revised Edition, St. Paul, Minnesota, USA, 1992.

Likens S.T., Nickerson G.B., Zimmermann C.E. 1970. An index of Deterioration of Hops. ASBC Proceedings, 68–74.

Algazzali V., Shellhammer T. 2016. Bitterness Intensity of Oxidized Hop Acids: Humulinones and Hulupones. J. Am. Soc. Brew. Chem. 74(1), 36–43.

Priest F.G., Stewart G.G. 2006. Handbook of Brewing. CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN 0-8247-2657-X.

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.

Volmer 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.

Van Opstaele F., De Rouck G., De Clippeleer J., Aerts G., De Cooman L. 2010. Analytical and Sensory Assessment of Hoppy Aroma and Bitterness of Conventionally Hopped and Advanced Hopped Pilsner Beers. *J. Inst. Brew.* 116(4), 445–458.

De Clippeller J., De Cooman L., Aerts G. 2014. Beer's Bitter Compounds – A Detailed Review on Iso-alpha-acids, Current Knowledge of the Mechanism for their formation and Degradation. *BrewingSci.* 67, 167–181.

Karabin M., Hudcova T., Jelinek T., Dostalek P. 2016. Biologically active compounds from hops and prospects for their use. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 542–567.

## **8. PUBLIKACE, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE**

Krofta K., Zagorová J., Kořen J., Tichá J., Urban J. Sledování procesu stárnutí nových českých hybridních odrůd Bor, Sládek, Premiant. *Kvasný průmysl*, 45(2), 41–45, 1999.

Krofta K., Nesvadba V., Tichá J., Urban J., Čepička J. Kvalitativní a ekonomické aspekty stárnutí českých chmelů. *Kvasný průmysl*, 49(11–12), 326–335, 2003.

Mikyška A., Krofta K., Hašková D., Čulík J., Čejka P. Vliv skladování chmelových pelet na kvalitu piva. *Kvasný průmysl*, 58(5), 148–154, 2012.

Mikyška A., Krofta K. Assessment of changes in hop resins and polyphenol during long-term storage. *J. Inst. Brew.* 118, 269–279, 2012.

Krofta K., Pokorný J., Křivánek J., Ježek J. Changes of hop prenylflavonoids content during maturation, harvesting and processing. *Proceedings of the Scientific Commission IHGC, Kiev, Ukraine, 04–09 June, 2013.*

## **9. SOUHRN**

Složení chmele podléhá neustálým změnám v časové řadě dozrávání – sklizeň – sušení – zpracování – skladování. Nejvýznamnější změnou je obsah vody během sušení. Další změny spočívají v obsahu a složení většiny sekundárních metabolitů. Předložená metodika obsahuje metodické postupy pro kvantifikaci kvalitativních změn, ke kterým při sušení, zpracování a dlouhodobém skladování chmele dochází. Jedná se o stanovení vlhkosti, indexu skladování chmele, obsahu alfa kyselin, beta kyselin, prenylflavonoidů, humulinonů a vybraných složek chmelových silic. Některé analytické postupy vyžadovaly modifikace pro čerstvý zelený chmel. U každého parametru je uveden princip stanovení, pracovní postup a kvalitativní limity. Analytické postupy jsou voleny tak, aby je mohla stanovit běžná laboratoř zaměřená na analytiku chmele. Aplikace metodiky v praxi umožní odhalovat falzifikaci stárí chmele a chmelových výrobků. Je rovněž využitelná při vývoji nových šetrných technologií sušení a zpracování chmele.

## **Abstract**

The composition of the hops is subject to constant changes in the time series of ripening – harvesting – drying – processing – storage. The most significant change is the water content in the course of hop drying. Other changes consist in the content and composition of most secondary metabolites. The present methodology includes methodological procedures for quantification of qualitative changes that occur during drying, processing and long-term storage of hops. These are moisture, hops storage index, alpha and beta acid contents, content of humulinones, prenylflavonoids and selected components of hop oils. Some analytical procedures required modifications for fresh green hops. For each parameter, the principle of determination, workflow and qualitative limits are given. Analytical procedures are chosen to be set by a conventional laboratory engaged in hops analytics. The application of the methodology in practice will allow to detect the falsification of the age of hops and hop products. It is also usable in the development of new technologies for the drying and processing of hops.

# Hodnocení kvalitativních parametrů chmele při sušení a stárnutí

Certifikovaná metodika

Autoři: Chmelařský institut s.r.o., Žatec  
Ing. Karel Krofta, Ph.D., Ing. Jaroslav Pokorný, Ph.D., Ing. Josef Ježek, Ph.D.,  
Ing. Ivo Klapal, Lenka Mravcová, Petra Vondráčková

Česká zemědělská univerzita v Praze, Technická fakulta  
doc. Ing. Adolf Rybka, CSc., doc. Ing. Petr Heřmánek, Ph.D., Ing. Ivo Honzík

Chmelařství, družstvo Žatec  
Ing. Jan Podsedník, Ing. Jan Melč

Rakochmel s.r.o., Kolečovice  
Ing. Karel Šrámek

Agrospol Velká Bystřice s.r.o.  
Ing. Zdeněk Kolman, Jaromír Nádvorník



Projekt QJ1510004 „Šetrný způsob konzervace pivo-  
varenských a dalších cenných látek chmele“ byl řešen  
s finanční podporou NAZV.

Fotografie: Ing. Karel Krofta, Ph. D.

Náklad: 100 ks

Vydání: první

Nakladatelé: © Chmelařský institut s.r.o., 2017  
© Česká zemědělská univerzita v Praze, 2017

Vydavatel Petr Svoboda

ISBN 978–80–86836–16-4

Grafická úprava,  
sazba, tisk:

  
www.hilldesign.cz





Česká zemědělská univerzita v Praze

**Technická  
fakulta**



# TECHNICKÁ FAKULTA

## České zemědělské univerzity v Praze

nabízí zájemcům o studium v rámci akreditovaných dvoustupňových studijních programů tříleté bakalářské a dvouleté navazující magisterské studium v prezenční i kombinované formě v těchto akreditovaných studijních programech

Technická fakulta je zde pro vás  
**65**  
již 65 let

**Zemědělská technika**

**Silniční a městská automobilová doprava**

**Technika a technologie zpracování odpadů**

**Technologická zařízení staveb**

**Obchod a podnikání s technikou**

**Informační a řídicí technika v agropotravinářském komplexu**

**Inženýrství údržby**

**Technology and Environmental Engineering (vyučovaný v AJ)**

**Agricultural Engineering (vyučovaný v AJ)**

[www.tf.czu.cz](http://www.tf.czu.cz)



# Chmelařský institut s. r. o.

## Hop Research Institute Co., Ltd.

Kadaňská 2525, 438 46 ŽATEC

[www.chizatec.cz](http://www.chizatec.cz)

Žatec

Tel.: +420 415 732 111  
E-mail: [patzak@chizatec.cz](mailto:patzak@chizatec.cz)

Účelové hospodářství  
Stekník u Žatce  
Tel.: +420 415 735 865

Výzkumná stanice  
Tršice u Olomouce  
Tel.: +420 585 957 237

### Vědecko-výzkumná činnost

- šlechtění chmele
- chemie chmele
- biotechnologie
- ochrana chmele
- agrotechnika chmele
- pokusný minipivovar

### Výroba chmele

#### Výroba chmelové sadby

- Žatecký poloraný červeňák
- hybridní odrůdy

#### Poradenská a školicí činnost

- školení strojníků česaček a sušáren chmele
- školení odborné způsobilosti pro nakládání s přípravky na ochranu rostlin

#### Zemědělská výroba

#### Obchodní činnost

- autenticita chmele (prokázání falšování)
- prodej chmele a **E-SHOP** s chmelovými výrobky
- prodej **čerstvých chmelových** hlávek ve sklizni



#### NOVINKA!

Stanovení reziduí pesticidů nejen ve chmelu.

#### Czech Hops

##### | Fine Aroma

- SAAZ
- Saaz Late

##### | Aroma

- Sládek
- Kazbek
- Bohemie
- Harmonie

##### | Dual Purpose

- Premiant

##### | Bitter

- Bor
- Rubín
- Agnus
- Vital
- **Gaia**
- **Boomerang**

##### | Flavour

- Kazbek
- **Boomerang**

##### | Pharmaceutical (X, DMX)

- Agnus
- Vital