

VPLIV HLADNEGA HMELJENJA PIVA NA VSEBNOST POLIFENOLOV IN GRENČICE

Miha OCVIRK¹, Ksenija RUTNIK², Zarja MEDVED³ in Iztok Jože KOŠIR⁴

Originalni znanstveni članek / Scientific article

Prispelo / Received: 8. 11. 2022

Sprejeto / Accepted: 8. 12. 2022

Izvleček

Hladno hmeljenje piva ali »dry hopping«, je tehnika hmeljenja pivine, primerna predvsem za ale tipe piva, s katero izrazito povečamo intenziteto arome, hkrati pa lahko v pivo vnesemo alfa-kisline, ki so neprijetnega grenkega okusa, ker ne pride do izomerizacije. Od časa doziranja in časa kontakta hmelja z vodno fazo je odvisno koliko hmeljnih komponent eteričnega olja bo prešlo in ostalo v pivini, mladem pivu in končnem produktu pivu.

Ključne besede: Hmelj, pivo, alfa-kisline, polifenoli, grenčica

INFLUENCE OF DRY HOPPING ON BEER BITTERNESS AND POLYPHENOLS CONTENT

Abstract

Dry hopping of beer is a hopping technique, suitable especially for ale types of beer, which can significantly increase the intensity of the aroma, at the same time alpha-acids can be introduced into the beer, which have an unpleasant bitter taste because isomerization does not occur. How many hop components of the essential oil will pass through and remain in the wort, young beer and the final beer product depends on the dosing time and the contact time of the hops with the water phase.

Key words: Hop, beer, alpha-acids, polyphenols, bitterness

1 UVOD

Pivo se z namenom pridobivanja tipične pivske arome in okusa, v različnih fazah procesa varjenja piva, običajno dodajajo posušeni storžki hmelja ali hmeljni briketi. Hmelj se dodaja pivu predvsem zaradi intenzivne arome in grenčice, saj odlično

¹ Dr., univ. dipl. kem. teh., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: miha.ocirk@ihps.si

² Mag. inž. kem. teh., IHPS, e-pošta: ksenija.rutnik@ihps.si

³ Dipl. inž. kem. inž., Univerza v Ljubljani, fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

⁴ Dr., univ. dipl. kem., IHPS, e-pošta: iztok.kosir@ihps.si

kompenzira sladek okus ječmenovega slada z grenkobo alfa-kislin. Nosilec grenkega okusa so mehke smole, natančneje alfa-kisline: humulon, kohumulon in adhumulon ter beta-kisline lupulon, kolupulon in adlupulon. Hmelj ima pomembno vlogo pri pripravi piva tudi zaradi močnih antimikrobnih učinkov beta-kislin, zato je pivo pijača, ki ne vsebuje konzervansov. Polifenolne spojine iz hmelja imajo antioksidativne lastnosti, hkrati pa so pomembne za stabilnost pene, negativno pa lahko vplivajo na koloidno stabilnost piva. Polifenolne spojine, ki izvirajo iz hmelja, pomembno prispevajo k trpkosti, grenčici in polnosti piva (Roberts in Wilson, 2006; Oladokun in sod., 2016). Polienolne spojine predstavljajo 3 – 6 % suhe mase hmeljnih storžkov. Razdelimo jih lahko v tri večje skupine: flavonoide (flavonoli, flavan-3-oli), fenolne kisline in ostale fenolne spojine (fenilflavonoidi, stilbenoidi itd.) (Karabín in sod., 2016). Pivovarji, ki uporabljajo aromatične vrste hmelja z majhno vsebnostjo alfa-kislin, morajo za doseg željene grenčice uporabiti večje količine hmelja, s tem pa vnesejo v vrelo sladico več polifenolnih spojin kot pivovarji, ki uporabljajo novejša različica sort hmelja, bogatih z alfa-kislinami. Polifenolne spojine zaradi svoje kemijske sestave dobro ščitijo pivo pred oksidacijo in s tem nastankom oksidacijskih produktov, ki imajo za posledico t.i. negativne privonje (Humia in sod., 2019; Jurić in sod., 2015; Mikyška in sod., 2002). Alfa-kisline niso glavni nosilec grenkega okusa, saj so težko topne v vodi in prav tako v sladici, zato jih je v pivu zelo malo. Nosilec grenkega okusa so njihove izomerizirane oblike, ki so mnogo bolj topne v vodi oz. pivu in te dajejo pivu značilno, prijetno grenkobo. Izomerizacija je tako najpomembnejša reakcija v kemiji hmelja. Glavni razlog vrenja sladice z dodanim hmeljem je reakcija pretvorbe alfa-kislin v njihove izomerizirane oblike. Gre za kemijski proces, kjer se določena molekula pod posebnimi pogoji, največkrat zaradi povišanja toplote ali izpostavljenosti svetlobi, pretvori v drugo molekulo, sestavljeno iz istih atomov vendar so ti v molekuli v drugačnem položaju. Malowicki in Shellhammer (2005) sta ugotovila, da je izomerizacija reakcija prvega reda, hitrost reakcije pa je odvisna od temperature. Trajanje toplega hmeljenja, tj. vrenja pivine z dodanim hmeljem je odvisno od časa, potrebnega za potek izomerizacije. Z namenom doseganja značilne hmeljne grenčice v pivu, je hmelj potrebno dodati že na začetku vrenja sladice, če pa želimo pripraviti piva z močnejšo aromo se dodaja hmelj še v končnih fazah vrenja ali celo v procesu fermentacije oz. zorenja. Tak način hmeljenja imenujemo hladno hmeljenje ali »dry hopping«. Z njim izrazito povečamo intenziteto arome piva, hkrati pa lahko v pivo vnesemo alfa-kisline, ki so neprijetnega grenkega okusa. Od časa doziranja in časa kontakta hmelja z vodno fazo je odvisno koliko hmeljnih komponent eteričnega olja bo prešlo in ostalo v pivini, mlademu pivu in končnem produktu pivu. Poznavanje dinamike prenosa in stabilnosti teh spojin je zato izrednega pomena za pivovarsko industrijo.

2 METODE DELA

2.1 Priprava piva

Za namen raziskave smo 200 mL osnovnega piva dodali 1 g zmletega hmelja (5 g/L). Uporabili smo 5 različnih sort hmelja: Styrian Wolf, Citra, Palisade, Cascade in Chinook. Eksperiment smo izvajali pri nizki temperaturi v hladilnici (2 °C) in pri visoki temperaturi v rastni komori (10 °C). Pri obeh temperaturah smo hladno hmeljenje izvajali brez stresanja in s stresanjem (uporaba stresalnika IKA KS 4000i), nastavljenega na 150 rpm). Za vzorec piva, ki smo ga stresali, smo uporabili 500 mL reagenčne steklenice za mirujoče vzorce pa 250 mL steklenice. Vzorčili smo vsak dan poskusa, štiri dni zapored, zadnji vzorec je bil odvzet sedmi dan, kot ekstremno dolg čas hladnega hmeljenja. Eksperiment smo izvajali v paralelkah, torej smo za vsako sorto hmelja pripravili 10 steklenic za posamezen režim. Vzorce smo nato prelili iz reagenčnih steklenic in jih prefiltrirali skozi filter papir – črni trak. Tako smo odstranili zmlete delce hmeljnih peletov ter prekinili proces hladnega hmeljenja.

2.2 Analiza alfa- in izo-alfa kislin

Alfa- in izo-alfa-kislina v pivu smo določali po metodi Analytica-EBC 9.50 (Analytica-EBC, 2020). Razplinjeno pivo, smo prefiltrirali čez 0.45 µm PET filter v HPLC vijale. Določitev smo izvedli na tekočinskem kromatografu Agilent 1200 (Agilent, ZDA), z DAD detektorjem pri 270 nm. Ločitev je potekala na kromatografski koloni Nucleodur® 5–100 C18, 125×4 mm (Macherey-Nagel, Nemčija). Kot mobilno fazo smo uporabili izokratsko mešanico metanola, vode in ortofosforne kisline (77,5 : 21 : 0,9).

2.3 Analiza skupnih polifenolnih spojin

Določitev koncentracije skupnih polifenolnih spojin v pivu je bila izvedena po metodi Analytica-EBC 9.11 (Analytica-EBC, 2016). Odpipetirali smo 10 mL razplinjenega vzorca v 25 mL bučko, v katero smo dodali 8 mL CMC/EDTA reagenta (5 g CMC + 1 g EDTA/ 500 mL destilirane vode) in 0,5 mL raztopine amonijaka (amonijak:voda, 1:2). V vzorec smo dodali še 0,5 mL raztopine barvila (3,5% raztopina amonijevega železovega(III) citrata), v kontrolni vzorec (slepi vzorec) pa ne. Nato smo do oznake dopolnili z destilirano vodo, vzorec in slepi vzorec dobro pretresli in izvajali meritve po 10 minutah. Meritve smo izvajali na Shimadzu UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu, Japonska) pri valovni dolžini 600 nm. Za izračun koncentracije skupnih polifenolov smo uporabili sledečo formulo:

$$c = A \times 820$$

kjer je:

c – koncentracija polifenolov [mg/L]

A – absorbanca izmerjena pri 600 nm.

2.4 Analiza grenčice

Določitev grenčice v enotah IBU je potekala po metodi Analytica-EBC 9.8 (Analytica-EBC, 2020). Odpipetirali smo 10 mL razplinjenega piva v centrifugirko, dodali smo 3 steklene kroglice, 0,5 mL raztopine 6 mol/L HCl in 20 mL izooktana. Nato smo vzorec stresali 15 min. Po končanem stresanju smo vzorec centrifugirali 3 minute na 3000 obratov/minuto. Po 30 minutah smo izvajali meritve. Za slepo meritev smo uporabili čisti izooktan. Iz vzorca smo odpipetirali izooktansko fazo ter pomerili absorbanco na Hewlett Packard UV-VIS spektrofotometru (Hewlett Packard, ZDA) pri 275 nm. Za izračun IBU smo uporabili sledečo formulo:

$$c = A \times 50$$

kjer je:

c – število grenčičnih enot [IBU]

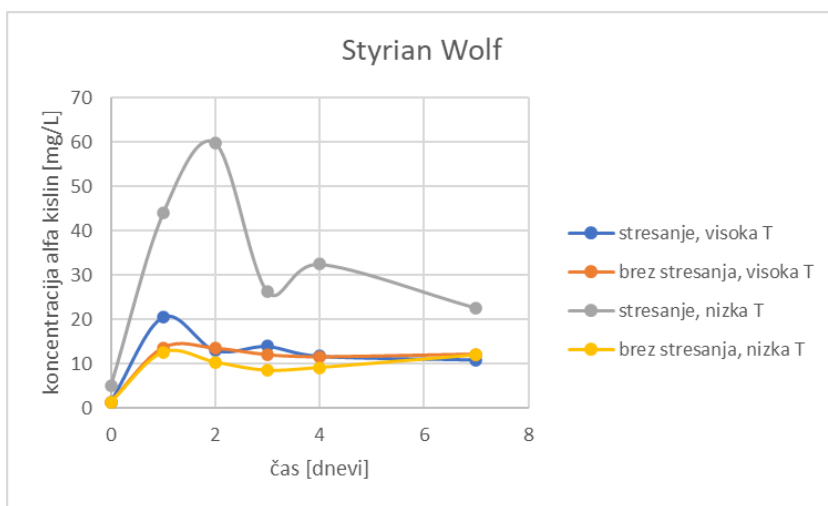
A – absorbanca izmerjena pri 275 nm

3 REZULTATI

Predstavljeni rezultati se nanašajo na sorto Styrian Wolf. Pri vseh ostalih sortah opazimo podobne trende in oblike krivulj ekstrakcije. Štiri, na grafu predstavljene krivulje, predstavljajo štiri režime hladnega hmeljenja (stresanje pri visoki temperaturi; brez stresanja pri visoki temperaturi; stresanje pri nizki temperaturi; brez stresanja pri nizki temperaturi). Določali smo koncentracijo alfa-kislin (kohumulon, n-humulon in adhumulon) in izo-alfa-kislin, koncentracijo skupnih polifenolnih spojin ter grenčico.

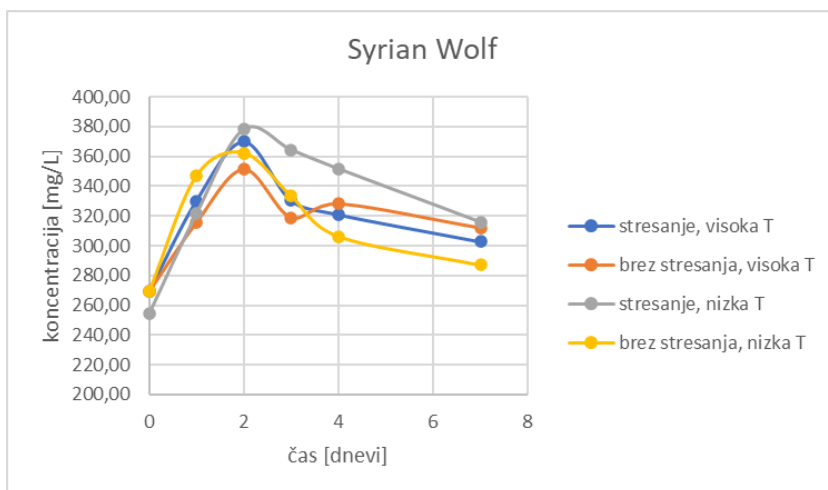
Ker se vse paralelke niso izvajale v istem tednu z istim izhodnim vzorcem piva, smo za primerljivost meritve vsakokrat normirali na uporabljeno pivo, ki ni bilo hladno hmeljeno. To pomeni, da smo vsaki meritvi odšteli vrednosti izmerjene v osnovnem pivu. To je bilo potrebno le pri določevanju alfa- in izo-alfa-kislin. Vrednosti grenčice in polifenolnih spojin v začetnem pivu so bile konstantne.

Slika 1 prikazuje graf koncentracije alfa kislin v odvisnosti od časa ekstrakcije. Opazimo lahko, da se koncentracija alfa-kislin v prvih dveh dneh ekstrakcije poveča, nato pa začne koncentracija padati. Ta trend je opazen predvsem pri hmeljenju s stresanjem in pri nizki temperaturi. Vsebnost alfa kislin pri ostalih načinih se nato ustali, pri stresanju pri nizki temperaturi pa je zaznati blag padec alfa kislin.



Slika 1: Koncentracija alfa kislin v odvisnosti od časa ekstrakcije. Koncentracija alfa kislin je normirana na pivo pred dodatkom hmelja.

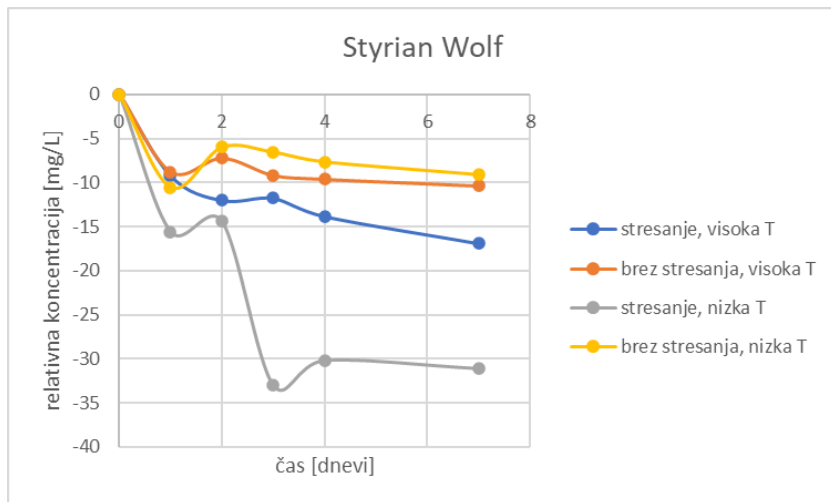
Dinamiki prenosa in vsebnosti alfa-kislin sledi tudi dinamika ekstrakcije polifenolnih spojin, vendar z občutno manjšimi razlikami med različnimi načini hmeljenja kot pri alfa-kislinah. Prenos polifenolnih spojin iz hmelja v pivo je tako manj občutljiv na način hmeljenja kot prenos alfa kislin.



Slika 2: Koncentracija polifenolnih spojin v pivu v odvisnosti od časa ekstrakcije.

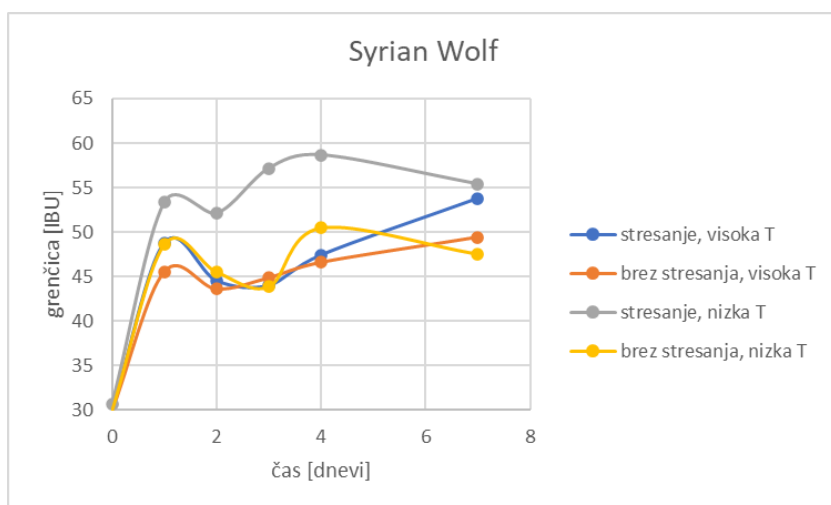
Zanimiva je ugotovitev, da med procesom hladnega hmeljenja koncentracija izo-alfa- kisline pada, kar je posledica adsorpcija le-teh na tkive ostanke (kvasa, slada in hmelja), na večje makromolekule kot je npr. CO₂ in se z njimi vred izločijo. Upad

izo-alfa kislin je prikazan na sliki 3. Iz rezultatov vidimo, da je ekstrakcija polifenolnih spojin in alfa-kislin uspešnejša pri nizkih temperaturah s stresanjem, medtem ko je vpliv temperature pri vzorcih brez stresanja zanemarljiv.



Slika 3: Relativna koncentracija izo-alfa kislin v odvisnosti od časa ekstrakcije.

Na sliki 4 so prikazane grenčične enote v odvisnosti od časa reakcije. Pri vzorcih, ki smo jih stresali, je izkoristek v grenčičnih enotah približno 10 % višji, kot pri vzorcih, ki jih nismo stresali. Iz predstavljenega sledi, da lahko pivovarji za doseganje željene grenčice svojega produkta skrajšajo čas hladnega hmeljenja z mešanjem pивine.



Slika 4: Grenčične enote v odvisnosti od časa ekstrakcije.

4 ZAKLJUČEK

S primernimi spremembami tehnoloških postopkov, kot sta npr. sprememba temperature in/ali stresanje, lahko dinamiko prehoda sekundarnih metabolitov hmelja v pivo pospešimo ali upočasnimo. S stresanjem pri nizkih temperaturah dosežemo najvišjo grenčico in prav tako najvišjo vsebnost alfa-kislin in polifenolnih spojin. Zaradi filtracije piva skozi zelo fine filtre, lahko izgubimo precejšen del alfa-kislin, polifenolnih spojin in s tem splošno grenčice. Kot tehnološki postopek je zato primernejša sedimentacija, kjer grenčične snovi in polifenolne spojine sedimentirajo na dno tanka.

5 LITERATURA

- European Brewry Convention, Analytica-EBC, 9.8, 2020, Bitterness units (BU) in (IM).
European Brewry Convention, Analytica-EBC, 9.50, 2020, Bitter compounds in dry-hopped beer by HPLC (IM).
European Brewry Convention, Analytica-EBC, 9.11, 2002 Total polyphenols in beer by spectrophotometry.
Humia B. V., Santos K. S., Barbosa A. M., Sawata M., Mendonça M. d. C., Padilha F. F. Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. *Molecules*. 2019; 24(8), 1568.
Ikram S., Huang L., Zhang H., Wang J., Yin M. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science*. 2017; 82(10), 2232-2242.
Jurić A., Ćorić N., Odak A., Herceg Z., Tišma M. Analysis of Total Polyphenols, Bitterness and Haze in Pale and Dark Lager Beers Produced under Different Mashing and Boiling Conditions. *Journal of the Institute of Brewing*. 2015; 121(4), 541-547.
Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15(3), 542-567.
Mikyška A., Hrabák M., Hašková D., Šrogl J. The Role of Malt and Hop Polyphenols in Beer Quality, Flavour and Haze Stability. *Journal of the Institute of Brewing*. 2002; 108(1), 78-85.
Terpinc, P. Usoda fenolnih spojin med proizvodnjo piva. *Hmeljarski bilten*. 2020; 27, 112-127