

XANTHOHUMOL: MOŽNOSTI IZOLACE A OBOHACOVÁNÍ PIVA

LUKÁŠ JELÍNEK, MARCEL KARABÍN,
TOMÁŠ KINČL, TEREZA HUDCOVÁ, BLANKA
KOTLÍKOVÁ a PAVEL DOSTÁLEK

Ústav biotechnologie VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28
Praha 6

Lukas.Jelinek@vscht.cz

Došlo 18.4.12, přijato 18.6.12.

Klíčová slova: chmel; prenylované flavonoidy;
xanthohumol; pivo

Obsah

1. Úvod
2. Xanthohumol – charakteristika
3. Izolace xanthohumolu
4. Zvyšování obsahu xanthohumolu v pivu
5. Závěr

1. Úvod

Xanthohumol (X) je biologicky aktivní látka vyskytující se téměř výhradně ve chmelu, odkud částečně přechází i do piva. Z fyzikálně-chemického hlediska může být považován za přechodné stádium mezi chmelovými pryskyřicemi a polyfenoly¹. V posledních deseti letech se X dostává do popředí zájmu mnoha vědců díky svým antioxidačním^{2,3}, antiinfekčním⁴ a především antikancerogenním⁵⁻⁷ účinkům. Ty se však začínají projevovat až při dávce 0,32 mg X /kg hmotnosti člověka⁸, která je konzumací piva, kde se obsah X většinou pohybuje pod hranicí 0,1 mg l⁻¹ (cit. ^{9,10}), téměř nedosažitelná. V uplynulých deseti letech byla tedy pozornost mnoha odborníků soustředěna nejen na studium těchto zajímavých biologických aktivit, ale také na vývoj nových postupů pro izolaci xanthohumolu z chmelových hlávek a jeho následnou purifikaci.

Z tohoto hlediska je nyní stále větší pozornost věnována vedlejším produktům, které vznikají při výrobě chmelových pelet a extraktů. Tyto produkty obecně obsahují velké množství prenylovaných flavonoidů a doposud nenalezly žádné širší technologické využití.

Během výroby piva dochází ke značným ztrátám xanthohumolu zejména při výrobě mladiny, kvašení a stabilizaci pomocí polyamidových sorbentů. Mnoho odborných prací se tedy v současnosti zabývá otázkou, jak těmto ztrátám zamezit, případně jak obsah této látky v pivu zvý-

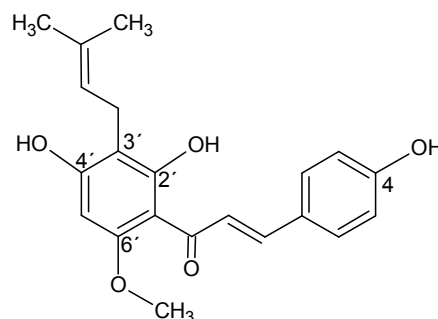
šit. Sledováním celého výrobního procesu byly největší ztráty zaznamenány během chmelovaru⁹. Při pokusech obohacovat pivo o tuto látku se vyskytla celá řada problémů plynoucích především z molekulární struktury X. Jedná se zejména o velmi nízkou rozpustnost ve vodě, která se při 8 °C pohybuje kolem 1,1 mg l⁻¹ (cit. ¹¹) a termolabilitu¹². Postupem času bylo navrženo mnoho metod a postupů, s jejichž pomocí lze zmíněné nedostatky buď částečně eliminovat či obejít. Univerzální řešení však dodnes neexistuje a ztráty musí být kompenzovány přídatkem X, což v mnoha zemích naráží na problémy s legislativou.

Cílem této práce je popsat fyzikálně-chemické vlastnosti xanthohumolu, které úzce souvisí s pivovarskou technologií a představit současné trendy v izolaci a obohacování piva touto látkou.

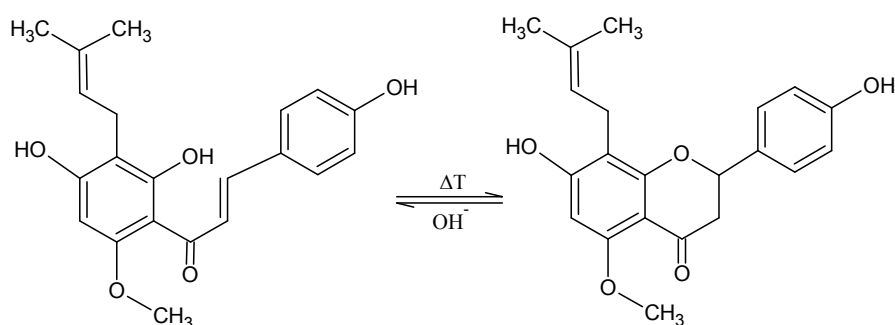
2. Xanthohumol – charakteristika

Xanthohumol (3'-[3,3-dimethylallyl]-2'4'4-trihydroxy-6'-methoxychalkon, viz obr. 1) je žlutooranžová krystalická látka, mající molární hmotnost 354,4 g mol⁻¹. Jeho absorpční maximum bylo zaznamenáno v UV oblasti při vlnové délce 368 nm (měřeno v methanolovém roztoku). Z chemického hlediska jde o chalkonový skelet, mající na uhlících 2',4' a 4 hydroxyskupinu a na uhlíku 6' methoxyskupinu. Tyto substituenty obecně přispívají ke zlepšení rozpustnosti látek v polárních rozpouštědlech. Zcela opačný účinek má isoprenylová skupina na uhlíku 3', která je hlavní příčinou nízké rozpustnosti X ve vodě a pivu.

Jako většina prenylovaných chalkonů je i X, prostřednictvím své hydroxyskupiny na uhlíku 2', schopen isomerace na příslušnou flavanovou formu, tzv. isoxanthohumol (IX) (viz obr. 2). Tato nepatrná strukturální změna zapříčiňuje ztrátu velkého množství pozitivních zdravotních účinků X^{2,13,14}. Rozsah isomerační reakce se zvyšuje se vzrůstající teplotou a hodnotou pH. Vzniklý isoxanthohumol je



Obr. 1. Struktura xanthohumolu



Obr. 2. Isomerace xanthohumolu na isoxanthohumol

Tabulka I

Rozpustnost xanthohumolu a isoxanthohumolu při teplotách 8 a 23 °C v různých médiích

Médium	Teplota [°C]	Xanthohumol [mg l ⁻¹]	Isoxanthohumol [mg l ⁻¹]
Voda	23	1,3	5,0
	8	1,1	3,9
Ethanol 5 % obj.	23	3,5	5,5
	8	1,8	4,4
Pivo	23	5,3	27,2
	8	4,0	23,8
Mladina 8,5 °	23	8,7	39,6
	8	7,0	37,6
Mladina 13 °	23	9,5	43,3
	8	8,9	37,3

bílá až světle žlutá krystalická látka s absorpčním maximumem zaznamenaným při vlnové délce 287 nm (měřeno v methanolemém roztoku), která dosahuje několikanásobně vyšší rozpustnosti ve vodě a pivo než X, jak je patrné z tabulky I (cit.¹⁰).

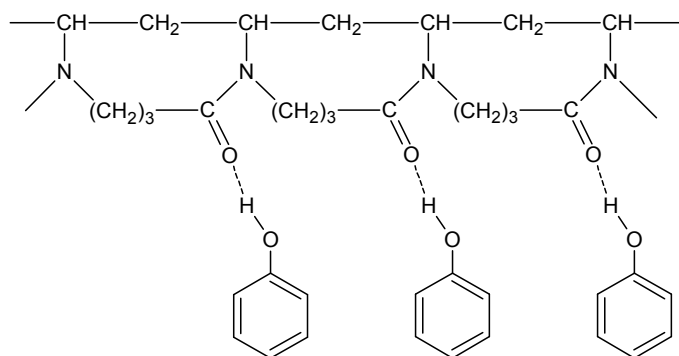
3. Izolace xanthohumolu

Xanthohumol je majoritním prenylflavonoidem chmelových hlávek, kde se jeho obsah pohybuje v rozmezí 0,2–1,1 hm.% v sušině¹⁵. Jelikož je X svou molekulovou strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi vysoce podobný chmelovým pryskyřicím, je zřejmé, že i izolační metody pro tyto dvě skupiny látek budou víceméně analogické. Pro izolaci v laboratorním měřítku lze s úspěchem využít například standardní metodu ASBC pro α - a β -hořké kyseliny¹⁶, kdy jsou chmelové hlávky extrahovány směsí diethyletheru a methanolu (v poměru 5:1). Hořké látky je následně možné z extraktu separovat odpařením diethyletheru a vytřepáním zbytku do hexanu. Dalším hojně využívaným extrakčním činidlem je směs methanolu

a kyseliny mravenčí v poměru 99:1 (cit.^{17,18}), která se kromě xanthohumolu používá i k extrakci ostatních chmelových polyfenolů.

V průmyslu je nejčastějším extrakčním činidlem 90% ethanol. Z výsledného extraktu je nejprve odpařeno rozpouštědlo a zbytek je rozdělen centrifugací na tříslovinou (polyfenolovou) složku obsahující zejména ve vodě rozpustné sole, cukry, bílkoviny a polyfenoly a pryskyřičnou složku sestávající převážně z prenylovaných flavonoidů, pryskyřic a ostatních ve vodě nerozpustných látek. Jelikož je ethanol rozpouštědlo s nízkou selektivitou, obsahuje výsledný extrakt řadu nečistot, má tmavě zelenou barvu, lepka-vou konzistenci a je nutné jeho další přečištění¹⁹.

Jinou možností průmyslové izolace X představuje využití chmelového zbytku po extrakci oxidem uhličitým. Ten se na chmelový materiál aplikuje buď v kapalném stavu při tlaku 60–65 bar a teplotě 10–15 °C, nebo v superkritickém stavu při tlaku 250–320 bar a teplotě 50–80 °C (cit.²⁰). Obě tyto formy oxidu uhličitého působí jako vysoce nepolární rozpouštědla, s jejichž pomocí jsou z chmelu odstraňovány v první řadě α - a β -hořké kyseliny a silice. Xanthohumol společně s ostatními polyfenoly zůstává ve



Obr. 3. Vazba fenolových sloučenin na PVPP prostřednictvím vodíkových můstků

chmelovém zbytku, odkud může být extrahován např. ethanolom pomocí výše zmíněného postupu²¹. Při extrémních podmínkách (600–1000 bar a 60–90 °C) může být i oxid uhličitý použit k extrakci prenylovaných flavonoidů. Výsledným produktem je v tomto případě tmavě zelený prášek s obsahem xanthohumolu 10–30 hm.% a isoxanthohumolu 1–3 hm.%. Zbytek je tvořen převážně tvrdými pryskyřicemi²².

Poslední dobou se stále častěji objevují postupy, využívající k izolaci fenolových látek pevné sorbenty. Polyvinylpyrrolidon (PVPP) je polymerní látka, která je schopna selektivně vázat polyfenoly z roztoku prostřednictvím vodíkových můstků²³ (obr. 3). Jedním z možných postupů je extrakce chmelových hlávek 90% ethanolom a následná aplikace PVPP do tohoto extraktu. Xanthohumol je poté desorbován pomocí 70% acetonu²⁴. Další možné využití PVPP při izolaci X představil v roce 2007 Biendl¹⁹. Celý postup vychází z již zmíněného ethanolového extraktu. Ten je v prvním kroku reextrahován superkritickým oxidem uhličitým, čímž je zbaven α - a β -hořkých kyselin. Po odpaření ethanolu pak vzniká tzv. XANTHO-EXTRACT, ve kterém jsou zakoncertovány převážně nespecifické tvrdé pryskyřice a prenylované flavonoidy. Ty

jsou z tohoto extraktu izolovány pomocí PVPP a následně desorbovány ethylacetátem. Po odpaření rozpouštědla je získán žlutý prášek – tzv. XANTHO-FLAV, který obsahuje kolem 80 % X. Tento extrakt může být dále překrystalizován za vzniku tzv. XANTHO-PURE extraktu ve kterém je garantovaný obsah X vyšší než 95 %. Složení jednotlivých extraktů je znázorněno v tabulce II.

4. Zvyšování obsahu xanthohumolu v pivu

Xanthohumol se při použití klasického výrobního procesu dostává do piva výhradně z chmele během chmelovaru. Tento proces trvá zhruba 90 min a chmel je obvykle dodáván ve třech dávkách. V časech 0 a 30 min je dávkován chmel či chmelový preparát, který má pivu dodat potřebnou hořkost a 10 min před koncem chmelovaru jsou přidávány aromatické chmelové odrůdy vnášející do piva charakteristické aroma. Jak již bylo zmíněno, xanthohumol podléhá za zvýšené teploty isomerační reakci, díky které dochází k nejvyšším ztrátám této látky během celého procesu výroby. Kinčl ve své práci demonstroval, že tato reakce začíná probíhat již při teplotách převyšujících 60 °C

Tabulka II

Složení extraktů XANTHO-EXTRACT, XANTHO-FLAV a XANTHO-PURE (% hm.)

Složka	XANTHO-EXTRACT	XANTHO-FLAV	XANTHO-PURE
Silice	–	–	–
Celkové pryskyřice	cca 85	–	–
Alfa kyseliny	1	–	–
Iso-alfa kyseliny	5	–	–
Beta kyseliny	< 0,5	–	–
Prenylflavonoidy	cca 12	> 90	> 98
Xanthohumol	10	80	95
8-Prenylnaringenin	0,06	0,2	< 0,02

(cit.²⁵). Wunderlich a spol. zkoumali chování xanthohumolu a isoxanthohumolu během chmelovaru podrobněji a zjistili, že při teplotě 80 °C se v prvních 5 minutách obsah X i IX nejprve lineárně zvyšuje a po 10. minutě se již výrazně nemění. Při aplikaci teploty 100 °C byl pozorován od 10. minuty chmelovaru dramatický úbytek X a rovněž odpovídající nárůst IX (cit.²⁶). Zbylý xanthohumol, který nepodlehli isomerační reakci a zároveň nebyl rozpuštěn v horké mladině, většinou ulpívá na povrchu chmelového mláta a společně s ním je odstraněn ve vířivé kádi¹¹.

Zmírnění ztrát obsahu X během chmelovaru je tedy zásadním krokem k obohacení piva touto látkou. Významnou roli v řešení zmíněné problematiky hraje bezesporu výběr vhodných surovin. Bylo zjištěno, že většina chmelových odrůd s vysokým podílem pryskyřic v hlávkách obsahuje rovněž vyšší množství xanthohumolu²⁷. Jejich využití jakožto zdroje xanthohumolu je však omezené, a to zejména díky přebytku hořkosti vnášené těmito chmelu do piva. Výběr vhodné odrůdy je tedy podmíněn nejen absolutním množstvím X, ale také obsahem α -hořkých kyselin. Lze tedy konstatovat, že odrůdy vnášející do piva nejvíce X, při minimálním ovlivnění plánovaného obsahu hořkosti, jsou jemné-aromatické či aromatické²⁸, u nichž se obsah α -hořkých kyselin (α -HK) pohybuje nejčastěji v rozmezí 3,5–6,5 hm.% v sušině a poměr X : α -HK kolem hodnoty 0,1.

Jako výhodné se ukázalo využití zbytků chmelových granulí po extrakci oxidem uhličitým, kde poměr X : α -HK často převyšuje hodnotu 1. Z českých chmelů zmíněným kritériím nejlépe vyhovují odrůdy Žatecký poloraný červenák a Sládek.

Pro lepší přestup X do mladiny lze tuto látku aplikovat zachycenou na inertním nosiči s velkým povrchem, jakým je např. křemelina²⁶.

Výrazného zamezení ztrát během chmelovaru bylo docíleno použitím tzv. XAN technologie, jejímž základem je výroba vysoce koncentrované mladiny a dávkováním chmelových preparátů se zvýšeným obsahem X zhruba 5 min před koncem chmelovaru. Horká mladina je pak rychle zchlazena na 80 °C přidávkem studené varní vody. XAN technologie byla v praxi využita například bavorským pivovarem Weihenstephan, který v roce 2004 představil pšeničné pivo XAN Hefeweissbier s obsahem xanthohumolu 1,4 mg l⁻¹ a nealkoholický sladový nápoj XAN Wellness s obsahem xanthohumolu 4 mg l⁻¹.

Zajímavý objev byl učiněn při pokusech obohacovat xanthohumolem piva tmavá. Bylo zjištěno, že X interaguje s molekulami barevných látek tmavých sladů (pravděpodobně melanoidiny) za vzniku komplexů, které jsou mnohem lépe rozpustné ve vodě než samotný xanthohumol a zároveň působí jako ochrana před isomerací a stabilizaci pevnými sorbenty (PVPP)¹². Podle Wunderlicha a Backa hrají při tomto procesu roli především barevné látky s vysokou molekulovou hmotností, a to konkrétně v rozmezí 300–600 kDa (cit.²⁹). Lze tedy konstatovat, že tmavá piva mohou být obohacována xanthohumolem mnohem snadněji a zároveň v nich lze dosáhnout i mnohem vyšších koncentrací této látky v porovnání s pivy světlými.

Krom chmelovaru dochází k výrazným ztrátám xanthohumolu i v některých fázích studeného úseku výroby piva. Jedná se konkrétně o proces kvašení a dokvašování a o stabilizaci. Během kvašení se xanthohumol podobně jako hořké látky sorbuje na povrch kvasničných buněk. Takto mohou jeho ztráty klesnout až na 20 % množství původně přítomného v mladině¹¹. Jako účinná eliminace těchto ztrát se ukázalo použití kvasinek uchovávaných ve vodném roztoku xanthohumolu či kvasinek s povrchem částečně zaneseným hořkými látkami. Tohoto jevu využil Forster a spol.³⁰, kteří v roce 2003 ve své práci představili velmi elegantní metodu přípravy nefiltrovaných piv bohatých na xanthohumol. Nápoje byly v tomto případě obohaceny přidávkem suspenze mladiny a kvasinek, které měly na své buněčné stěně nasorbované velké množství X. Tímto způsobem bylo možné obohatit různé druhy piv (světlá, tmavá a pšeničná), přičemž koncentrace X se vždy pohybovala kolem 2,5 mg l⁻¹.

Přímá fortifikace piva xanthohumolem je možná po skončení hlavního kvašení či dokvašení (v závislosti na národní legislativě), kdy je tato látka vnášena do piva formou ethanolového roztoku či uchycena na křemelině. Takto připravené pivo je možné filtrovat klasickou křemelínovou filtrací, avšak následná stabilizace pomocí sorbentů odstraňujících z piva polyfenoly se z pochopitelných důvodů zásadně nedoporučuje.

5. Závěr

Xanthohumol je prenylovaný flavonoid chmele s prokazatelně pozitivními účinky na lidské zdraví. Postupem času byla vypracována celá řada metod, díky kterým lze tuto látku extrahovat z chmelových hlávek. V současné době je využívána převážně ethanolová extrakce X ze zbytků chmelového materiálu po odstranění pryskyřic oxidem uhličitým. Výsledný extrakt obsahuje velké množství prenylovaných flavonoidů a je možné jej dále purifikovat, zejména pomocí pevných sorbentů selektivních pro fenolové látky.

Obohacování piva xanthohumolem naráží hned na několik úskalí, díky kterým je velké množství X během výrobního procesu nenávratně ztraceno. V první řadě se jedná o nízkou rozpustnost této látky, dále pak o její termolabilitu a v neposlední řadě fakt, že často ulpívá na povrchu kvasničných buněk. Pro snížení či zamezení těchto ztrát bylo navrženo několik modifikací technologického postupu, které byly v tomto článku představeny. Pro výrobu piva se zvýšeným obsahem X je nutné využití chmele či chmelových preparátů s co nejvyšším poměrem X : α -HK. Jednou z možností je využití zbytku chmelového materiálu po extrakci oxidem uhličitým, který je aplikován 5 min před koncem chmelovaru. Ztráty během hlavního kvašení a dokvašení mohou být částečně eliminovány nasazením kvasinek s částečně zaneseným povrchem buď samotným xanthohumolem, či hořkými látkami. Fortifikaci je doporučováno provádět ve studeném úseku výroby, většinou po skončení hlavního kvašení či dokvašení. Takto připravené pivo však nesmí být filtrováno.

Tato práce vznikla za finanční podpory MZe ČR (QI111B053).

LITERATURA

1. Hofta P., Dostálek P., Basařová G.: Chem. Listy 98, 825 (2004).
2. Miranda C. L., Stevens J. F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M. L., Buhler D. R.: J. Agric. Food Chem. 48, 3876 (2000).
3. Kolečkář V., Řeháková Z., Brojerová E., Kuča K., Jun D., Macáková K., Opletal L., Drašar P., Jahodář L., Chlebek J., Cahlíková L.: Chem. Listy 106, 113 (2012).
4. Gerhauser C.: Mol. Nutr. Food Res. 49, 827 (2005).
5. Gerhauser C., Alt A. P., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H. R., Frank N., Bartsch H., Becker H.: Mol. Cancer Ther. 1, 959 (2002).
6. Dorn Ch., Weiss T. S., Heilmann J., Hellerbrand C.: Int. J. Oncol. 36, 435 (2010).
7. Gerhauser C., Alt A. P., Klimo K., Knauff J., Frank N., Becker H.: Phytochem. Rev. 1, 369 (2003).
8. Miranda C. L., Yang Y-H., Henderson M. C., Stevens J. F., Santana-Rios G., Deinzer M. L., Buhler D. R.: Drug Metab. Dispos. 28, 1297 (2000).
9. Stevens J. F., Taylor A. W., Deinzer M. L.: J. Chromatogr., A 832, 97 (1999).
10. Krofta K.: Kvasný Prům. 56, 2 (2010).
11. Stevens J. F., Taylor A. W., Clawson J. E., Deinzer M. L.: J. Agric. Food Chem. 47, 2421 (1999).
12. Magalhaes P. J., Dostálek P., Cruz J. M., Guido L. F., Barros A. A.: J. Inst. Brew. 114, 246 (2008).
13. Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y. H., Deinzer M. L., Barners D. W.: Food Chem. Toxicol. 37, 271 (1999).
14. Chadwick L. R., Pauli G. F., Farnsworth N. R.: Phyto-medicine 13, 119 (2006).
15. Stevens J. F., Taylor A. W., Nickerson G. B., Ivancic M., Henning J., Haunold A., Deinzer M. L.: Phytochemistry 53, 759 (2000).
16. The American Society of Brewing Chemists: ASBC Methods of Analysis, Hops 14, α -acids and β -acids in hops and hop extracts by HPLC (ASBC 2009).
17. De Keukeleire J., Janssens I., Heyerick A., Ghekiere G., Cambie J., Roldán-Ruiz I., Van Bockstaele E., De Keukeleire D.: J. Agric. Food Chem. 55, 61 (2007).
18. Magalhaes P. J., Guido L. F., Cruz J. M., Barros A. A.: J. Chromatogr., A 1150, 295 (2007).
19. Biendl M.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 31, 110 (2007)
20. Fergus G. P., Stewart G. G.: *Handbook of Brewing*, 2. vyd. CRC Press Taylor & Francis Group, New York 2006.
21. Brunner G.: J. Food. Eng. 67, 21 (2005).
22. http://www.lfl.bayern.de/ipz/hopfen/10585/xanthohumul-enriched-hop_extract.pdf (staženo 6. 2. 2012).
23. Magalhaes P. J., Vieira J. S., Goncalves L. M., Pacheco J. G., Guido L. F., Barros A. A.: J. Chromatogr., A 1217, 3258 (2010).
24. Hudcová T.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha, Praha 2011.
25. Kinčl T.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha, Praha 2011.
26. Wunderlich S., Zürcher A., Back W.: Mol. Nutr. Food Res. 49, 874 (2005).
27. Krofta K., Poustka J., Nováková K., Hajšlová J.: Acta Hort. 668, 201 (2004).
28. Krofta K., Poustka J., Hajšlová J.: *International Hop Growers Convention: 50th Congress, Lanzhou 25.-30. July 2005*, Book of Abstract (Pavlovič M., ed.), str. 24.
29. Wunderlich S., Back W.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 31, 111 (2007).
30. Forster A., Ketterer M., Gahr A.: Hopfenrudschau International. 2003/2004, 65.

L. Jelínek, M. Karabín, T. Kinčl, T. Hudcová, B. Kotlíková, and P. Dostálek (*Department of Biotechnology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Xanthohumul: Possible Isolation and Beer Enrichment**

Xanthohumul is the main prenylated flavonoid from hop plants with proven positive effects on human health. Currently, the only source of this substance in human diet is beer, where the content of xanthohumul rarely exceeds 0.1 mg l^{-1} . The present article gives a comprehensive overview of current trends in the isolation of xanthohumul from hop cones and of production of beer with an increased content of this substance.