



Prenylflavonoïden in hop en bier

23 augustus 1999

Recentelijk werd in het Journal of Chromatography een artikel gepubliceerd van dr. Jan F. Stevens van de Oregon State University over het voorkomen van bepaalde stoffen in hop en bier [1]. In bier bleken deze stoffen nog nooit eerder te zijn aangetroffen. Na het lezen van zijn artikel heb ik via e-mail contact met hem gezocht wat mij een uitbundige hoeveelheid informatie opleverde over deze materie. Ik heb de belangrijkste gegevens uit deze technische artikelen hieronder in het kort weergegeven. Het één en ander heb ik nader toegelicht vanuit mijn chemische achtergrond. Er wordt ingegaan op het voorkomen van deze stoffen in hop, hun (mogelijke) betekenis en het gedrag van deze stoffen in het brouwproces.

Inleiding

Dat hop gebruikt wordt tijdens het brouwproces om bitterheid en aroma aan bier te verschaffen is welbekend. Dat de research centra zich voornamelijk toegespitst hebben in het bestuderen van deze aspecten is dan ook niet verwonderlijk. Dat hop meer stoffen dan 'slechts' bitter- en aromastoffen bevatten is eveneens ook al langer bekend. Een voorbeeld hiervan zijn de zogenaamde tanninen of looistoffen die weer behoren tot de polyfenolen. Deze namen van stofgroepen komen regelmatig voor in artikelen over bierbrouwen, maar worden meestal omhuld door een wazige identiteit. Belangrijk is om te weten dat deze stofgroepen onder te verdelen zijn in vele individuele componenten. Tanninen of looistoffen is een grote groep van verbindingen die is onder te verdelen in hydrolyseerbare looistoffen (gallo- en ellagitanninen) en gecondenseerde looistoffen (proanthocyanidinen) [2]. Van de tanninen is bekend dat ze behulpzaam zijn in het neerslaan van eiwitten tijdens het kookproces [3]. De precieze functie van polyfenolen in het brouwproces is echter nog niet geheel begrepen [1].

Polyfenolen is dus een verzamelnaam voor vele stoffen waaronder ook de flavonoïden. De flavonoïden aanwezig in hop omvat flavonol glycosiden, gecondenseerde tanninen en de zogenaamde *prenylflavonoïden*, die in dit artikeltje de hoofdrol spelen. Prenylflavonoïden is dus een subgroep van de flavonoïden. Aan flavonoïden wordt meestal een wrange, bittere smaak toegekend. Fred Stevens deelde per e-mail mee dat over de smaak van prenylflavonoïden weinig bekend is. Zelf had hij een spatelpuntje van de meest voorkomende prenylflavonoïde in hop (xanthohumol) geproefd, maar kon slechts vaststellen dat het als pure stof weinig smaak had. Verder kon hij over de smaak van flavonoïden mededelen dat deze naast bitter ook zoet kan zijn (taxifoline-3-O-acetaat smaakt ca. 80 maal zoeter dan bietsuiker) [4].

Deze prenylflavonoïden hebben recentelijk aandacht gekregen vanwege het feit dat er o.a. potentiële anti-carcinogene-, oestrogene- en antimicrobische effecten aan worden toegeschreven [5,6]. Zo werd vastgesteld dat bepaalde hopcomponenten tumorgroei verminderde en vernietiging van de schadelijke stoffen die kanker veroorzaken, bevorderde [5,6].

Verder kan gemeld worden dat de prenylflavonoïden samen met de bitterzuren en de essentiële oliën uitgescheiden worden door de lupuline (hopmeel) producerende klieren.

Er is in het algemeen echter weinig bekend over de opname van flavonoïden uit voedsel als we het hebben over welke en hoeveel. Voedselproducten zoals groente en fruit bevatten hoofdzakelijk andere flavonoïden dan prenylflavonoïden. Prenylflavonoïden worden gevonden in een beperkt aantal plantenfamilies, waarvan de Moraceae-Cannabinaceae (waaronder de hop!), Leguminosae en de Astraceae grofweg 80% van de ca. 1100 bekende prenylflavonoïden herbergen [1]. Alhoewel er een aantal voedselplanten behoren tot deze families, is er in de westerse wereld geen enkele die in aanmerking komt als een rijke voedselbron voor deze stoffen. Verder is er in de literatuur weinig meer bekend over bronnen van deze stoffen.

De onderzoeksgroep van Fred Stevens, Nederlander met een postdoc aanstelling aan de Oregon State University, heeft eind 1998 gehalten aan prenylflavonoïden in bier en hop gepubliceerd. Doordat er voorheen weinig is gepubliceerd over voedselbronnen van deze stoffen, kan dit betekenen dat bier waarschijnlijk de belangrijkste bron hiervoor kan zijn. Dit



betekent niet dat zij pleiten voor een verhoging van de bierconsumptie om deze stoffen binnen te krijgen. De groep van Stevens identificeerde en kwantificeerde in hop en bier zes prenylflavonoïden, te weten: xanthohumol, isoxanthohumol, desmethylxanthohumol, 6-prenylnaringenine, 8-prenylnaringenine en 6-geranylnaringenine. Ze identificeerden deze stoffen aan de hand van zuivere prenylflavonoïden die tot hun beschikking stonden [1].

De analyse

De analyse werd uitgevoerd met een techniek die HPLC-MS-MS wordt genoemd. Dit staat voor High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry. Zo een analysesysteem is te beschouwen als een scheidingssysteem (HPLC) met een zeer geavanceerde detector (MS-MS). In combinatie is dit een zeer selectieve analysetechniek.

Op een HPLC wordt als volgt een scheiding bewerkstelligd. In het systeem is een kolom opgenomen, voor te stellen als een buis van bijvoorbeeld 250 mm lang en een interne diameter van 4 mm. De kolom is gevuld met een bepaald materiaal waar de stoffen van interesse een verschillende wisselwerking mee hebben. Door deze kolom stroomt een vloeistofstroom, onder druk. Het extract wordt vervolgens d.m.v. een schakelkraan met vulloop in de vloeistofstroom meegenomen en zo op de kolom gebracht. Eenmaal op de kolom aangekomen, zullen de verschillende componenten door hun specifieke wisselwerking met het materiaal van de kolom, na elkaar van de kolom komen. Immers, de stoffen die liever in het oplosmiddel blijven en weinig affiniteit met het kolommateriaal hebben, zullen de kolom snel doorlopen en verlaten. De stoffen die meer affiniteit met het kolommateriaal hebben, zullen er langer over doen om de kolom te doorlopen. Een scheiding kan op deze manier bewerkstelligd worden. Nadat de componenten gescheiden van de HPLC-kolom afkomen, komen ze in de MS-MS-detector terecht. Het voert echter te ver om deze techniek hier uitgebreid te bespreken. In grote lijnen komt het erop neer dat op basis van verschillende massafragmenten (zijn geladen brokken van het molecuul) van de verschillende stoffen (is specifiek voor elke component), deze zeer specifiek gedetecteerd kunnen worden.

De hopextracten werden verkregen door extractie in een ultrasoon trilbad met methanol. Het bier werd, eventueel verdund met water/ethanol 95/5 v/v, slechts ontgast voordat het in het analysesysteem werd gebracht. De monsters werden dus met de HPLC voorgescheiden en de met de MS-MS detector gedetecteerd.

Resultaten

De resultaten van de hopanalyses waren dat de hoofdcomponenten van de prenylflavonoïden xanthohumol en desmethylxanthohumol zijn. In de brouwketel blijken deze te worden omgezet tot resp. isoxanthohumol en 6- en 8-prenylnaringine. 6-geranylnaringine blijkt in zeer lage concentraties in hop voor te komen. Uit experimentele brouwsessies (265 liter bier met als doelstelling een bitterheid van 12 EBU; kooktijd 75 minuten; 172 gr Willamette oogst '97; gist Wyeast 2035) bleek dat de totaal aanwezige xanthohumol voor ca. 30% uiteindelijk in het gelagerde bier werd teruggevonden [7]. Xanthohumol uit de *bitterhop* werd voor 98% teruggevonden als isoxanthohumol [7]. 'Verliesposten' voor het rendement waren onvolledige extractie, uitvlokken door eiwitten zowel in de zogenaamde 'hot' als 'cold break' en hechting aan gist [7]. Dit alles lijkt sterk op het verklaren van het rendement aan iso-alfazuur uit alfazuur [8].

In tabel 1 staan een aantal hopsoorten met hun alfa- en betazuur- en xanthohumol gehalten als percentages van het drooggewicht. Deze meetwaarden zijn van Gail Nickerson en beschikbaar gesteld door Fred Stevens. Uit tabel 1 blijkt dat ca. 80% van de hopsoorten minder dan 0.6% xanthohumol op drooggewicht bevatten. Hänsel en Schultz hebben het xanthohumolgehalte gedurende opslag bepaald en vonden een vermindering van 0.5% naar 0.09% op drooggewicht in het vierde jaar [9]. De opslag condities waaronder de hop is bewaard zijn echter niet vermeld in het artikel [9].

Tabel 1: diverse hopsoorten met % alfazuur, betazuur en xanthohumol op drooggewicht (bron: Gail Nickerson).

hopsoort	locatie	% alfazuur	% betazuur	% xanthohumol
----------	---------	------------	------------	---------------



Prenylflavonoiden in hop en bier

Brewers Gold	Hallertau	9.50	5.42	0.87
Cascade	Washington	4.89	6.92	0.29
Cluster	Idaho	5.03	4.60	0.45
Cluster	Washington	8.36	5.44	0.46
Columbus	Washington	15.36	4.36	0.69
Galena	Idaho	10.25	8.10	0.46
Galena	Washington	12.81	8.88	0.56
Hallertau mf	Hallertau	3.92	4.90	0.32
Hallertau Trad. (A)	Hallertau	7.08	5.04	0.48
Hallertau Trad. (B)	Hallertau	7.09	4.94	0.46
Hersbruck	Hallertau	4.50	6.83	0.30
Horizon	Washington	10.96	5.96	0.46
Magnum	Hallertau	17.36	6.18	0.63
Mount Hood	Oregon	4.93	5.69	0.32
Mount Hood	Washington	3.09	6.05	0.26
Northern Brewer	Hallertau	11.72	5.91	0.88
Nugget	Idaho	11.51	3.98	0.61
Nugget	Oregon	14.07	4.65	0.80
Nugget	Washington	12.60	4.34	0.65
Perle	Hallertau	8.58	4.46	0.71
Perle	Oregon	7.83	3.86	0.52
Perle	Washington	3.94	2.94	0.31
Saaz	Saaz	3.80	5.74	0.40
Santiam	Washington	4.89	6.57	0.22
Spalt	Spalt	4.96	6.06	0.43
Spalter Select	Spalt	5.77	5.70	0.55
Sterling	Oregon	6.82	4.72	0.35
Strisselspalt	Elzas	2.46	6.28	0.23
Taurus	Hallertau	17.31	5.36	1.17
Tettnang	Tettnang	5.28	5.55	0.40
Tomahawk	Washington	15.50	4.27	0.73
Willamette	Idaho	3.73	2.86	0.37
Willamette	Oregon	4.05	3.23	0.46
Zeus	Washington	12.89	4.19	0.49

De resultaten van de analyses van 15 onderzochte commerciële bieren waren, dat er een correlatie gevonden werd met de hoeveelheid gebruikte hop en de concentraties van de prenylflavonoïden. Dit voldeed aan de verwachtingen. De componenten met de hoogste concentraties waren isoxanthohumol en xanthohumol. Isoxanthohumol ontstaat tijdens de kookfase van het gehopte wort uit xanthohumol. Dit is analoog aan de isomerisatiereactie van alfazuur tot iso-alfazuur, de belangrijkste bitterstof in bier. De verhouding xanthohumol/isoxanthohumol geeft dan ook een indicatie hoe lang de hop heeft meegekookt. De halfwaardetijd van de isomerisatie van xanthohumol naar isoxanthohumol in kokend water met 10% sucrose en een pH=5.4 bedroeg 30 minuten [7]. De hoogste concentratie isoxanthohumol werd gevonden in een US strong ale met een gehalte van 3.4 mg/l bier [1]. Opmerkelijk was een pilsner die deze zes stoffen niet bevatte, althans concentraties bevatte lager dan de detectiegrens. Dit zou een indicatie kunnen zijn dat de brouwerij een hopextract gebruikt heeft dat gewonnen is d.m.v. extractie met superkritisch koolzuur. Eerdere experimenten hebben reeds uitgewezen dat deze extractiemethode ca. 1% extractie-efficiëntie heeft voor prenylflavonoïden. Het gebruik van hopextracten, al dan niet extra bewerkt, is vandaag de dag vrij gebruikelijk in de grote commerciële brouwerijen [10]. Zeer recentelijk is nog een zevende prenylflavonoïde gevonden in een aantal Amerikaanse hopsoorten. Deze stof werd *xanthogalenol* genoemd naar de soort Galena, waaruit het geïsoleerd werd.



Conclusie

Dit verhaal maakt duidelijk dat het 'ontrafelen' van het complexe mengsel bier nog steeds verder gaat. Het identificeren van deze prenylflavonoïden met hun potentiële anti-carcinogene eigenschappen zijn daar een voorbeeld van. Door het aantonen van deze stoffen in hop en bier, zou hop weleens voor andere doeleinden gekweekt kunnen worden dan alleen voor het verzorgen van bitterheid en aroma in bier. Het isoleren van deze stoffen uit hop om het geconcentreerd te kunnen toedienen als medicijn, zou tot de mogelijkheden behoren. Ook kunnen er door het meten van deze prenylflavonoïden meer parameters in het brouwproces achterhaald worden, zoals gebruik van bepaalde soorten hopextract en lange of korte kooktijd van de hop.

Ter besluit toch de opmerking dat wat er ook allemaal in bier aangetroffen wordt geanalyseerd met welke analysemethode dan ook, het uiteindelijk toch de persoonlijke sensorische sensatie is, die bepalend is of een bier als aangenaam beschouwd wordt. Op Uw gezondheid!

Referenties

1. Jan F. Stevens, Alan W. Taylor en Max L. Deinzer. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 832, blz. 97-107, 1999.
2. Jan F. Stevens. Nomenclatuur der flavonoïden. E-mail 19 augustus 1999.
3. Jac. Lambrechts. Bieren zelf brouwen, blz. 64-65, 1989.
4. Feng Gao, Huiping Wang, Tom J. Mabry and A. Douglas Kinghorn. Dihydroflavonol sweeteners and other constituents from *Hymenoxys turneri*. *Phytochemistry* 29(9), 2865-2869, 1990.
5. Michael Day. Your very good health. *New Scientist* blz. 21, maart 1998.
6. Jan F. Stevens, Cristobal L. Miranda, Donald R. Buhler and Max L. Deinzer. Chemistry and Biology of Hop Flavonoids. *Journal of Am. Soc. Brew. Chem.* 56(4), blz. 136-145, 1998.
7. Jan F. Stevens, Alan W. Taylor, Jeff E. Clawson and Max L. Deinzer. Fate of Xanthohumol and Related Prenylflavonoids from Hops to Beer. *J. Agric. Food Chem.* 47(6), 2421-2428, 1999.
8. J. Bertens. Hoprendement (1). *PROOST* 16, blz. 14-18, juli/aug. 1996.
9. R. Hänsel und J. Schultz. Hopfen und Hopfenpräparata, *Deutsches Apoth. Ztg.* 126, blz. 2033-2037, 1986.
10. De Standaard. Interview met prof. Denis de Keukeleire, 26-1-98.

Revisie:

- Rev 1.0 [23 augustus 1999], eerste publicatie door Peter Wester
- Rev 1.1 [27 februari 2009], KWBG layout toegepast