

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Robert HRASTAR

**VPLIV SORTE IN RASTIŠČA NA VSEBNOST
KSANTOHUMOLA V HMELJU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Robert HRASTAR

**VPLIV SORTE IN RASTIŠČA NA VSEBNOST
KSANTOHUMOLA V HMELJU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF CULTIVAR AND GROWING AREA ON
THE CONTENT OF XANTHOTHUMOL IN HOPS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

POPRAVKI:

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Laboratorijske analize in statistična obdelava podatkov sta bili opravljene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja imenovala doc. dr. Milico Kač, za somentorja dr. Iztoka Jožeta Koširja in za recenzenta doc. dr. Andreja Plestenjaka.

Mentor: doc. dr. Milica Kač

Somentor: dr. Iztok Jože Košir

Recenzent: doc. dr. Andrej Plestenjak

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Tatjana Košmerl

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Milica Kač

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Iztok Jože Košir

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Član: doc. dr. Andrej Plestenjak

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 19.09.2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Robert Hrastar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn
- DK UDK 663.791: 543.653 (043) = 863
- KG hmelj / ksantohumul / alfa-kislina / beta-kislina / polifenoli / prenilflavonoidi / sorte / c. Aurora / c. Bobek / c. Celeia / c. Savinjski golding / c. Magnum / rastišča / HPLC / KVH-TE / HSI / briketi 90 / kemometrične analize /
- AV HRASTAR, Robert
- SA KAČ, Milica (mentor) / KOŠIR, Iztok Jože (somentor) / PLESTENJAK, Andrej (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2006
- IN VPLIV SORTE IN RASTIŠČA NA VSEBNOST KSANTOHUMOLA V HMELJU
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XI, 72 str., 12 pregl., 24 sl., 56 vir.
- IJ SI
- JI sl/en
- AI Hmelj je naravni vir ksantohumola. Posušeni hmeljevi storžki vsebujejo od 0,2 do 1,1 % ksantohumola, ki se nahaja v lupulinskih žlezah skupaj z alfa- in beta-kislinami ter eteričnimi olji. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti vpliv sorte (Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding, Magnum) in rastišča (vzhodni in zahodni Žalec, Ptuj, Koroška) na vsebnost ksantohumola ter sklepati na morebitno povezavo metabolnih poti ksantohumola in drugih sekundarnih metabolitov hmelja. Ugotavljali smo tudi vpliv briketiranja na delež ksantohumola v hmelju. Raziskave so bile opravljene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v maju 2006. Vsi vzorci hmeljnih storžkov so bili letnika 2005, obrani v tehnološki zrelosti. Vzorcem smo gravimetrično določili delež vlage, s HPLC metodo vsebnosti ksantohumola ter alfa- in beta-kislin, spektrofotometrično smo določili indeks staranja hmelja. Rezultati potrjujejo vpliv sorte na vsebnost ksantohumola, medtem ko je vpliv rastišča le neznaten. Pri primerjanju rezultatov opazimo značilne povezave med vrednostmi za alfa-kislina in tistimi za ksantohumul. Od slovenskih kultivarjev po veliki vsebnosti ksantohumola izstopa sorta Aurora. Pri pripravi briketov tipa 90 se večina ksantohumola v surovini ohrani.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Dn
- DC UDK 663.791: 543.653 (043) = 863
- CX hops / xanthohumol / alpha acids / beta acids / polyphenols / prenylflavonoids / cultivars / c. Aurora / c. Bobek / c. Celeia / c. Savinjski golding / c. Magnum / growing area / HPLC / KVH-TE / HSI / pellets 90 / chemometrical analysis
- AU HRASTAR, Robert
- AA KAČ, Milica (supervisor) / KOŠIR, Iztok Jože (co-advisor) / PLESTENJAK, Andrej (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2006
- TI INFLUENCE OF CULTIVAR AND GROWING AREA ON THE CONTENT OF XANTHOTHUMOL IN HOPS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 72 p., 12 tab., 24 fig., 56 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB Hops are a rich natural source of xanthohumol. Dried hop cones contain from 0,2 to 1,1 % of xanthohumol, which is found in the lupulin glands together with alpha- and beta-acids as well as essential oils. The main purpose of this work was to determine the influence of the cultivar (Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding, Magnum) and the growing area (Žalec East, Žalec West, Ptuj, Koroška region) on the content of xanthohumol. Additionally, we were looking for data indicating possible connections between the metabolic pathways of xanthohumol and those of other secondary hop metabolites. Influence of pellet production on the xanthohumol content was also studied. The analyses were carried out at the Slovenian Institute for Hop Research and Brewing in May 2006. All the samples of hop cones were from 2005, picked in the time of technological maturity. The content of moisture was determined gravimetrically, those of xanthohumol, alpha-acids and beta-acids by HPLC. The spectrofotometric determination of the hop storage index was also performed. Results confirm the cultivar influence on the xanthohumol content, while the influence of the growing area is hardly noticeable. There are obvious connections between the values referring to alpha acids and those referring to xanthohumol. Among Slovene cultivars Aurora is the one standing out for its high xanthohumol content. In pellets type 90 most of the initially present xanthohumol is preserved.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 Delovna hipoteza	1
1.2 Namen dela	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 Hmelj	3
2.1.1 Botanika	3
2.1.2 Meteorologija	3
2.1.3 Pedologija	4
2.1.4 Geografska razširjenost	4
2.2 Hmelj v Sloveniji	5
2.2.1 Aurora	5
2.2.2 Bobek	5
2.2.3 Celeia	5
2.2.4 Savinjski golding	5
2.2.5 Magnum	5
2.3 Gospodarsko pomembni sekundarni metaboliti hmelja	6
2.3.1 Hmeljni storžek	6
2.3.2 Hmeljne smole	6
2.3.2.1 Alfa-kislina	7
2.3.2.2 Beta-kislina	9
2.3.2.3 Trde smole	10
2.3.2.4 Staranje mehkih hmeljnih smol – procesi med skladiščenjem	10
2.3.2.5 Metode za določanje alfa- in beta-kislin	11
2.3.2.5.1 Določanje alfa- in beta-kislin s HPLC	11
2.3.2.5.2 Določanje konduktometrične vrednosti hmelja (KVH-TE)	11
2.3.3 Eterično olje	11
2.3.4 Polifenolne spojine	12
2.4 Vpliv skladiščenja na kakovost hmelja	12
2.5 Ksantohumul	13
2.5.1 Splošno	13
2.5.2 Biosinteza ksantohumola	14
2.5.2 Pozitivne lastnosti ksantohumola	14
2.5.3 Nekatere reakcije in vsebnost ksantohumola pri varjenju piva	15

2.5.4	Vpliv briketiranja in ekstrakcije hmelja na vsebnost ksantohumola	15
2.5.5	Vpliv letnika	15
2.5.6	Količina ksantohumola v hmelju	16
2.5.7	Kvantitativno določanje ksantohumola	16
2.6	Visokotlačna tekočinska kromatografija – HPLC	17
2.6.1	Retencija.....	17
2.6.2	Ločljivost.....	18
2.6.3	Aparatura.....	19
2.7	Vrednotenje (validacija) analizne metode	20
2.7.1	Nekateri posebni vidiki validacije analizne metode	21
2.7.1.1	Linearnost	21
2.7.1.2	Natančnost.....	21
2.7.1.3	Točnost (pravilnost)	22
2.8	Osnove statistike in statistični testi.....	23
2.8.1	Osnovni statistični pojmi	23
2.8.2	Statistični testi.....	24
2.9	Opisi izbranih metod za kemometrično analizo podatkov	25
2.9.1	Metoda glavnih osi (PCA).....	26
2.9.2	Metoda analize grup (CA).....	27
3	MATERIAL IN METODE.....	28
3.1	Zasnova poskusa in material	28
3.1.1	Vpliv sorte in rastišča na vsebnost ksantohumola	28
3.1.2	Vpliv briketiranja na vsebnost ksantohumola	28
3.2	Metode	29
3.2.1	Določanje vlage v zračno suhem hmelju	29
3.2.2	Določanje konduktometrične vrednosti hmelja (KVH-TE).....	30
3.2.3	Določanje alfa- in beta-kislin in ksantohumola	33
3.2.4	Določanje indeksa staranja hmelja (HSI)	39
3.2.5	Validacije analiznih metod	41
3.2.6	Kemometrična analiza	41
4	REZULTATI	42
4.1	Validacija metode določanja alfa- in beta-kislin in metode določanja ksantohumola s HPLC.....	42
4.2	Validacija metode določanja indeksa staranja hmelja (HSI)	45
4.3	Vsebnost alfa- in beta-kislin, ksantohumola in HSI za vzorce sort Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding in Magnum	45
4.3.1	Delež ksantohumola (HPLC)	49
4.3.2	Delež alfa-kislin (HPLC)	50
4.3.3	Razmerje med kohumulonom in alfa-kislinami (HPLC)	51
4.3.4	Razmerje med ksantohumulom in alfa-kislinami (HPLC)	52
4.3.5	Indeks staranja hmelja (HSI)	53
4.3.6	Konduktometrična vrednost hmelja (KVH-TE).....	54
4.3.7	Kemometrična analiza	54
4.3.7.1	Metoda glavnih osi	54

4.3.7.2 Metoda analize grup	57
4.4 Rezultati primerjave vrednosti izmerjenih parametrov za suhe hmeljne storžke in za brikete tipa 90	58
5 RAZPRAVA	59
6 POVZETEK IN SKLEPI	65
6.1 Povzetek	65
6.2 Sklepi	67
7 VIRI.....	68

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Povprečna sestava zračno suhega hmelja	6
Preglednica 2: Pregled analogov alfa-kislin	8
Preglednica 3: Povprečna količina ksantohumola v različnih sortah hmelja.....	16
Preglednica 4: Določanje konduktometrične vrednosti hmelja (KVH-TE), natančnost metode pri pogojih obnovljivosti, rezultati meritev mednarodne laboratorijske primerjave	33
Preglednica 5: Rezultati statističnih testov za validacijo metode določanja alfa- in beta-kislin in metode določanja ksantohumola	42
Preglednica 6: Rezultati statističnih testov za validacijo metode HSI	45
Preglednica 7: Pregled parametrov za sorto Aurora.....	46
Preglednica 8: Pregled parametrov za sorto Bobek	47
Preglednica 9: Pregled parametrov za sorto Celeia	47
Preglednica 10: Pregled parametrov za sorto Savinjski golding.....	48
Preglednica 11: Pregled parametrov za sorto Magnum	48
Preglednica 12: Indeks ponovno določenih vrednosti parametrov po briketiranju.....	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Splošna strukturna formula alfa-kislin	7
Slika 2: Splošna strukturna formula izo-alfa-kislin	8
Slika 3: Splošna strukturna formula beta-kislin	10
Slika 4: Shematski prikaz razvrstitve nekaterih, predvsem za hmelj pomembnih polifenolov	13
Slika 5: Stukturna formula ksantohumola in izo-ksantohumola	14
Slika 6: Prikaz retencijskega časa na kromatogramu	18
Slika 7: Kromatogram dveh dobro ločenih vrhov	18
Slika 8: Osnovna sestava HPLC aparature	19
Slika 9: Stari in novi koordinatni sistem metode PCA.....	26
Slika 10: Kromatogram stardardne raztopine (ICE 2).....	36
Slika 11: Kromatogram vzorčne raztopine alfa- in beta-kislin.....	37
Slika 12: Kromatogram standarda ksantohumola.....	37
Slika 13: Kromatogram vzorčne raztopine ksantohumola	37
Slika 14: Umeritvena krivulja za ksantohumol	43
Slika 15: Umeritvene krivulje za frakcije alfa- in beta-kislin	44
Slika 16: Delež ksantohumola različnih sort hmelja glede na rastišče	449
Slika 17: Delež alfa-kislin različnih sort hmelja glede na rastišče.....	50
Slika 18: Delež kohumulona v alfa-kislinah različnih sort hmelja glede na rastišče	51
Slika 19: Razmerje med ksantohumolom in alfa-kislinami različnih sort hmelja glede na rastišče	52
Slika 20: Vrednost HSI različnih sort hmelja glede na rastišče.....	53
Slika 21: Vrednost KVH-TE različnih sort hmelja glede na rastišče	54
Slika 22: Projekcija vzorcev hmelja v ravnini definirani s prvima dvema glavnima osema PC1 in PC2, ki predstavljata 93,48 % variance	56
Slika 23: Prikaz pomembnosti posameznih spremenljivk na razporeditev vzorcev v ravnini definiranimi s prvima dvema glavnima osema PC1 in PC2, izračunanima z metodo PCA	56
Slika 24: Dendrogram 27 vzorcev hmelja, izračunan na osnovi 11 spremenljivk.....	57

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

HPLC	High Performance Liquid Chromatography (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti)
KVH-TE	konduktometrična vrednost hmelja s toluensko ekstrakcijo
HSI	Hop Storage Index (indeks staranja hmelja)
V	vzhod
Z	zahod
pKa	konstanta disociacije
EBC	European Brewery Convention
ASBC	American Society of Brewing Chemists
ICE 2	standardni hmeljni ekstrakt
pon 1	ponovljivost iz prvega dne meritev
pon 2	ponovljivost iz drugega dne meritev
obn	obnovljivost

1 UVOD

Ksantohumol je sekundarni metabolit hmelja. Sodi v skupino prenilflavonoidnih polifenolov. *In vitro* raziskovanja kažejo, da je potrebnih samo 100 μM prenilflavonoidov, da v kulturi 500.000 tumorskih celic zaznamo inhibicijo rasti in citotoksičen vpliv. *In vitro* laboratorijski testi niso zaznali nobene toksičnosti. Prenilflavonoidi imajo antialergijske in antioksidacijske lastnosti, delujejo proti virusom, bakterijam in glivicam (Miranda in sod., 1999).

Svet se vse bolj zaveda prednosti izdelkov, ki blagodejno vplivajo na metabolizem, ki je dandanes podvržen različnim stresom iz okolja. Izdelke s povečano vsebnostjo vitaminov, mineralov, biokultur ipd., uvrščamo med funkcionalne izdelke. Piva, kljub vsebnosti mnogih vitaminov, mineralov in ogljikovih hidratov zaradi alkohola v to skupino ne moramo uvrščati. Pivovarska industrija ima možnost uvedbe novega izdelka, ki bi konkuriral skupini funkcionalnih izdelkov. Pivo s povečano vsebnostjo ksantohumola to vsekakor je. Ker so alfa-kislina primarna surovina za pivovarstvo, bi lahko na podlagi podatkov o ugodnejšem razmerju med ksantohumolom in alfa-kislinami za hmeljenje piva uporabljali kultivarje hmelja, ki imajo to razmerje bolj v korist ksantohumola.

V svetu vsak dan več in več laboratorijev izvaja eksperimente o pozitivnih specifičnih vplivih ksantohumola na metabolizem živega dela sveta. Prenilflavonoidna pot je možna tarča nadaljnjih križanj in biotehnoloških modifikacij hmelja v smislu povečanja končne vsebnosti ksantohumola (Stevens in Page, 2004). V primeru medicinske potrditve lahko pričakujemo nov pomen hmelja kot prehranskega dodatka ali tudi kot naravnega zdravila, ki preprečuje razvoj rakastih obolenj.

Ksantohumol, polifenol iz skupine prenilflavonoidov, je del lupulina hmelja skupaj s hmeljnimi smolami in aromatičnimi snovmi. Vsebnost ksantohumola in njegovo razmerje z alfa-kislinami je odvisno od sorte hmelja, rastišča in rastnih pogojev (Biendl, 2002).

1.1 Delovna hipoteza

Vsebnost ksantohumola v hmelju v Sloveniji je odvisna od sorte in rastišča. V Sloveniji pridelan hmelj letnika 2005 bomo reprezentativno predstavili z vzorci iz različnih rastišč: pet sort (Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding, Magnum) iz vsaj treh rastišč. Predpostavljamo, da se bo količina ksantohumola signifikantno razlikovala tako glede na sorto hmelja kot glede na rastišče, pri čemer v okviru posamezne sorte pričakujemo

rezultate, ki bi pokazali na križanje metabolnih poti med enimi in drugimi sekundarnimi metaboliti: polifenoli in alfa-kislina (Donko in Kač, 2006).

1.2 Namen dela

Namen dela je z analizo reprezentativnih vzorcev pridobiti podatke o vsebnosti ksantohumola v hmeljnih storžkih različnih sort hmelja iz različnih geografskih področij v Sloveniji za leto 2005 v povezavi z vsebnostjo drugih grenčičnih snovi. Pridobljene rezultate smo vključili v bazo podatkov, ki bi bila pomembna v primeru večjega zanimanja trga za to pomembno antikancerogeno spojino. Baza omogoča večjo preglednost in splošno primerljivost rezultatov o vsebnosti ksantohumola v hmelju v Sloveniji.

Iz zbranih podatkov bomo lahko sklepali tudi o vplivu briketiranja hmelja na vsebnost ksantohumola.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je večletna industrijska rastlina, v veliki večini gojena za potrebe pivovarstva. Njegov glavni sekundarni metabolit in hkrati tržni produkt so alfa-kislina v lupulinu. To je rumen prah na krovnih listih storžkov. Njegove glavne sestavine so: smole (kamor spadajo alfa-kislina), aromatične snovi in polifenolne spojine (Narziš, 2004).

Hmelj je v različnih pogledih nepogrešljiv dodatek pivini. Da ji grenek okus, specifično aromo in povzroči čiščenje pивine z obarjanjem beljakovin. Nadalje pivu zboljša stabilnost pene in služi kot naravni konzervans. Polifenolne spojine, kamor spada tudi ksantohumol, delujejo tudi kot antioksidanti (Narziš, 2004).

2.1.1 BOTANIKA

Hmelj spada v družino konopljev (Cannabinaceae), je bližnji sorodnik konoplje in koprive, je dvodomna rastlina. V nasadih gojimo le ženske rastline, moške rastline pa zatiramo, ker o semenjen pridelek ni zaželen. Podzemni del rastline, imenovan tudi štor, je korenika, nad zemljo pa hmelj požene steblo, imenovano trta, liste, zalistnike ali panoge, cvetove, ki se razvijajo v storžke, ti pa lahko vsebujejo tudi plodove (semena). Imenovani nadzemni organi so zeleni in se začnejo razvijati spomladi, jeseni pa odmrejo. Ženski cvetovi so združeni v socvetje na panogah. Najprej cvetijo spodnje, nato zgornje panoge. Socvetje je zgrajeno iz drobnega členkastega vretenca, ki ima na vsakem členku klasek. Klasek je zgrajen iz dveh krovnih lističev in štirih cvetkov. Vsak cvetek je obdan s predlistom in ima plodnico z dvema resastima brazdama. Ko se ženski cvetovi odprejo, se naježijo. To nenavadno cvetenje imenujemo osip. Ko iz cvetkov pokukajo brazde, so pripravljene na oprashi tev. Moške rastline hmelja rastejo kot divjaki in jih moramo uničevati. V primeru, da pride cvetni prah z vetrom do cvetočih rastlin, se v storžkih razvije 1,5 do 2 mm veliko seme. O semenjen storžek je večji in ima bolj grobo vretenca ter blede zelene, daljše predliste. O semenjen hmelj je slabše kakovosti, vsebuje manj lupulina in daje pivu trpek okus (Kač, 1967).

2.1.2 METEOROLOGIJA

Pridelek in kakovost hmelja sta zelo odvisna od vremenskih razmer. Gojimo ga v območju zmerno toplega pasu; potrebuje zmerno toploto in dovolj padavin. Ustreza mu povprečna letna temperatura okoli 9 °C in nadmorska višina od 200 do 500 m. Za uspešen razvoj

potrebuje v času rasti vsaj 600 mm padavin, v obdobju najbolj intenzivne rasti pa se pri nas pogosto pojavljajo sušna obdobja, ki lahko močno zmanjšajo količino in kakovost pridelka, zato takrat hmelj namakamo. Najmanjši pridelki so v vročih in sušnih letih, največji v letih z dovolj toplote in vlage. Neugodne za razvoj so hitre temperaturne spremembe in sušna obdobja. Vročina in suša v času zorenja povzročita sušenje storžkov na rastlini, kar lahko zelo zmanjša pridelek, vlažna in hladna pomlad pospešuje razvoj kuštravcev (peronospora), suša in vročina poleti na lahkih tleh pospešita razvoj hmeljeve pršice (Majer, 1999).

2.1.3 PEDOLOGIJA

Za pridelovanje hmelja so primerna tla, kjer lahko vsaj približno zagotovimo zadovoljive vodo-zračne razmere. Slabše rastne pogoje lahko omilimo s pravilno izbiro kultivarjev hmelja. Hmeljišče dodatno založimo z organsko snovjo, na osnovi kemične analize poskrbimo za optimalno založenost z makro hranili in apnom. Hmelj najbolje uspeva v dovolj globokih in rodovitnih, rahlo kislih do nevtralnih tleh, ilovnato peščene ali peščeno ilovnate teksture. Čeprav potrebuje rastlina veliko vode za rast, ne prenaša visoke podtalnice. Zlasti na težjih tleh z visoko podtalnico se zgodi, da se korenine razrastejo le bočno, rastline so šibke, rumene in štori hitro odmrejo (Knapič, 1996).

2.1.4 GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST

Največje svetovno področje pridelave hmelja je v Nemčiji, na Bavarskem. V Evropi najdemo hmeljišča na Češkem, v Belgiji, Franciji, Angliji in Sloveniji. Združene države Amerike (ZDA), Kitajska in Nova Zelandija prav tako močno sodelujejo na svetovnem tržišču.

Na splošno delimo hmelj v dve skupini. Hmelj, z visokim deležm alfa-kislin uvrščamo v grenčično skupino, medtem ko sorte s povečano in poudarjeno aromo (terpeni, estri, karbonili, alkoholi) uvrščamo v skupino aromatičnih tipov. V ZDA prevladujejo grenčične sorte, v Angliji aromatične, na drugih hmeljarskih področjih pa gojijo praviloma oba tipa hmelja (Narziß, 2004).

2.2 Hmelj v Sloveniji

V Sloveniji so glavna rastišča hmelja na severovzhodu Slovenije: Celje, Petrovče, Braslovče, Vransko, Šempeter, Prebold, Mozirje, Ptuj in Radlje ob Dravi so področja, kjer trenutno raste hmelj za tržne namene. Sorte, ki jih v Sloveniji v veliki večini sadimo, in ki jih zajema pričujoča študija, uvrščamo med aromatične in grenčične sorte:

- aromatične: Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding,
- grenčična: Magnum.

2.2.1 AURORA

Diploidni križanec. Vsebuje 7 – 13 % alfa-kislin, od tega je 22 – 26 % kohumulona. Razmerje med alfa- in beta-kislinami je okoli 2,7. Vsebnost eteričnega olja je 0,9 – 1,6 % suhe snovi (Hmeljni kultivarji).

2.2.2 BOBEK

Diploidni križanec. Vsebuje 4 – 8 % alfa-kislin, od tega je 28 – 34 % kohumulona. Razmerje med alfa- in beta-kislinami je okoli 1. Vsebnost eteričnega olja je 0,7 – 4,0 % suhe snovi (Hmeljni kultivarji).

2.2.3 CELEIA

Triploidni križanec. Vsebuje 3 – 9 % alfa-kislin, od tega je 26 – 29 % kohumulona. Razmerje med alfa- in beta-kislinami je okoli 1,7. Vsebnost eteričnega olja je 0,6 – 3,6 % suhe snovi (Hmeljni kultivarji).

2.2.4 SAVINJSKI GOLDING

Tradicionalni kultivar v Sloveniji. Vsebuje 3 – 6 % alfa-kislin, od tega je 27 – 33 % kohumulona. Razmerje med alfa- in beta-kislinami je okoli 1,5. Vsebnost eteričnega olja je 0,3 – 1,7 % suhe snovi (Hmeljni kultivarji).

2.2.5 MAGNUM

Diploidni križanec. Vsebuje 11 – 16 % alfa-kislin, od tega je 21 – 29 % kohumulona. Razmerje med alfa- in beta-kislinami je okoli 2,2. Vsebnost eteričnega olja je 1,6 – 2,6 % suhe snovi (Hopfen aus Deutschland, 2002).

2.3 Gospodarsko pomembni sekundarni metaboliti hmelja

2.3.1 HMELJNI STORŽEK

Ženske rastline hmelja poženejo socvetja, ki se kasneje razvijejo v hmeljne storžke. Hmeljni kultivarji se med seboj razlikujejo po obliki in velikosti storžkov. Storžki so lahko kroglasti, valjasti, elipsoidni ali konusni. Zaradi različne oblike in zgradbe storžkov se pridelek različnih sort razlikuje tudi po nasipni gostoti, poroznosti sloja in specifični površini storžkov, kar so pomembni parametri v procesu sušenja (Zupanec, 1987). Hmeljni storžki vsebujejo lupulin, v katerem so hmeljne smole in eterična olja kot najpomembnejši skupini aktivnih sestavin hmelja. V listih storžka so poleg naravnih barvil in ostalih sestavin tudi polifenolne spojine kot tretja pomembna skupina sekundarnih metabolitov hmelja. Hmeljni kultivarji se razlikujejo po vsebnosti in sestavi sekundarnih metabolitov. Vsebnosti posameznih sestavin podaja preglednica 1.

Preglednica 1: Povprečna sestava zračno suhega hmelja (Verzele, 1985)

snov	vsebnost (%)	relativna pomembnost za pivovarstvo
alfa-kislina	2 – 12	xxx
beta-kislina	1 – 10	xx
eterično olje	0,5 – 1,5	xx
polifenoli	2 – 5	xx
olja in maščobne kisline	0 – 2,5	xx
parafini in steroidi	/	x
proteini	15	
celuloza	40 – 50	
voda	8 – 12	
klorofil	/	
pektin	2	
pepel	10	

Hmeljne smole, eterična olja in polifenolne sestavine dajejo hmelju specifično uporabnost, predvsem za proizvodnjo piva.

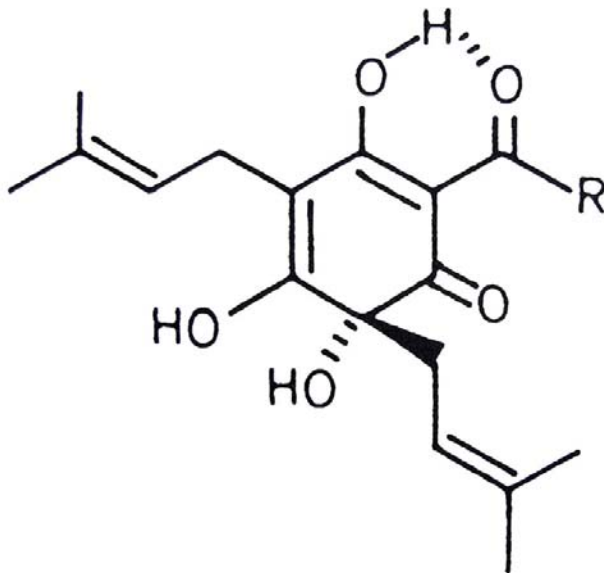
2.3.2 HMELJNE SMOLE

Hmeljne smole, ki jih sestavlja več sto spojin, so najpomembnejša skupina sekundarnih metabolitov hmelja. Celokupne smole (topne v hladnem etanolu do 6 °C in dietiletru) delimo v

mehke smole (topne v nižjih ogljikovodikih) in trde smole (netopne v nižjih ogljikovodikih). Najpomembnejše sestavine mehkih smol so alfa- in beta-kislina, medtem ko trde smole poleg ksantohumola v glavnem sestavljajo oksidacijski produkti alfa- in beta-kislin (Palamand in Aldenhoff, 1973).

2.3.2.1 Alfa-kislina

Vsebnost alfa-kislin je primaren podatek o kvaliteti hmelja, ker so alfa-kislina najpomembnejše sestavine hmeljnih smol, saj so izvor grenkega okusa v pivu. Kot derivati fluoroglucinola v enolni ali keto tautomerni obliki so zmes različnih analogov in izomernih oblik (Knorr in Kremkow, 1972, cit. po Zupanec, 1992). Splošna strukturna formula alfa-kislin je prikazana na sliki 1:



Slika 1: Splošna strukturna formula alfa-kislin (Verzele, 1985)

Alfa-kislina so torej derivati 1,3,5-trihidroksibenzena oziroma njegove tautomerne oblike cikloheksana-1,3,5-triona. Na ogljikova atoma na mestih 4 in 6 so vezane izo-pentilne skupine. Analogi humulon, kohumulon, adhumulon, prehumulon in posthumulon se razlikujejo v funkcionalni skupini, ki je vezana na ogljikov atom na mestu 2. Njihove lastnosti so prikazane v preglednici 2 (Knorr in Kremkow, 1972, cit. po Zupanec, 1992).

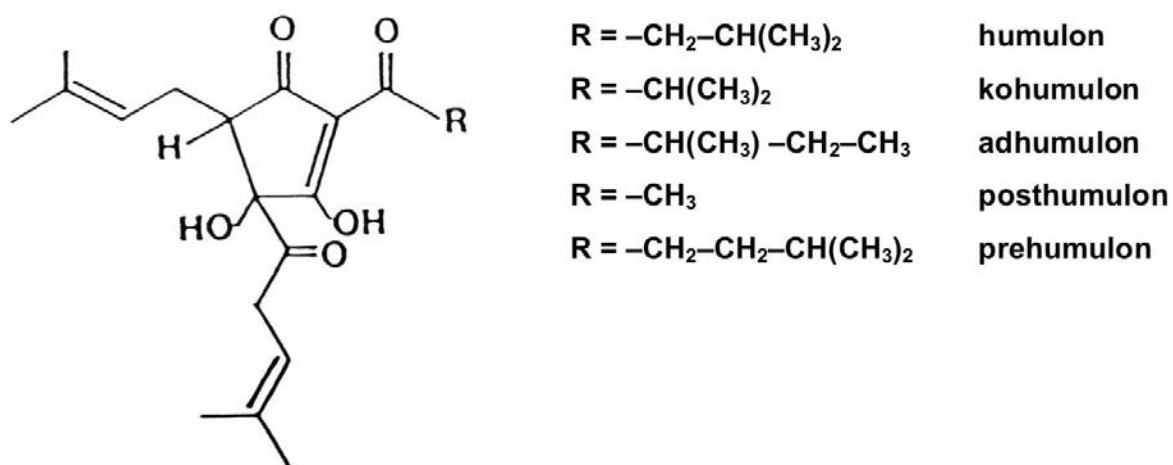
Humulon, kohumulon in adhumulon so prevladujoči analogi ne glede na kultivar. Zelo pomemben podatek, prikazan v preglednici 2 je, da se kohumulon razlikuje od ostalih dveh analogov po konstanti disociacije (pKa). Zaradi hidroksilnih skupin na heksacikličnem obroču so alfa-kislina kislina. Delež kohumulona v alfa-kislinah ima izrazit vpliv na kvaliteto grenkega okusa piva. Večji je delež kohumulona, bolj groba, bolj nekvalitetna je grenkoba piva. Z

razlikami v konstantah disociacije (preglednica 2) lahko razložimo, zakaj ima pivo, ki je hmeljeno s hmeljem z velikim deležem kohumulona, bolj grobo grenčico (Rigby, 1972, cit. po Zupanec, 1992).

Preglednica 2: Pregled analogov alfa-kislin (Zupanec, 1992)

ime analoga	radikal na drugem atomu	empir. formula	tališče (°C)	pKa	delež alfa-kislin
humulon	$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (izo-valeril)	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$	64,5	5,5	0,35 – 0,70
kohumulon	$-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (izo-butiril)	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$	olje	4,7	0,18 – 0,55
adhumulon	$-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ (2-metil-butiril)	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$	olje	5,7	0,10 – 0,15
posthumulon	$-\text{CO}-\text{CH}_3$ (propionil)	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_5$	–	–	0,01 – 0,10
prehumulon	$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (izo-kapronil)	$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_5$	olje	–	0,01 – 0,03

Alfa-kislina v sladici po kuhanju preidejo v izo-alfa-kislina. Izo-alfa-kislina so tiste spojine, ki dajejo grenak okus pivu, grenkoba ostalih sestavin hmelja je znatno manjša. Pri izomerizaciji alfa-kislin v izo-alfa-kislina se šestčlenski obroč pretvori v petčlenskega, pri tem se radikali ne spremenijo (Zupanec, 1992). Splošna strukturna formula izo-alfa-kislin je prikazana na sliki 2.



Slika 2: Splošna strukturna formula izo-alfa-kislin (Verzele, 1985)

Izo-alfa-kislina se pojavljajo kot zmes dveh stereoizomerov *cis* in *trans* izo-alfa-kislin, pri čemer je razmerje med *cis* izomerom in *trans* izomerom okrog 2:1 (Hums, 1973, cit. po Zupanec, 1992). Z razlikami v konstantah disociacije (preglednica 2) lahko razložimo, zakaj

ima pivo, ki je hmeljeno s hmeljem z velikim deležem kohumulona, bolj grobo grenčico. Izomerizacijo alfa-kislin v izo-alfa-kislino lahko pospešimo v alkalnem mediju, fotokemično ali termično (De Keukeleire, 1982, cit. po Zupanec, 1992). To so osnove postopkov, ki jih uporabljajo za proizvodnjo izomeriziranih hmeljnih ekstraktov.

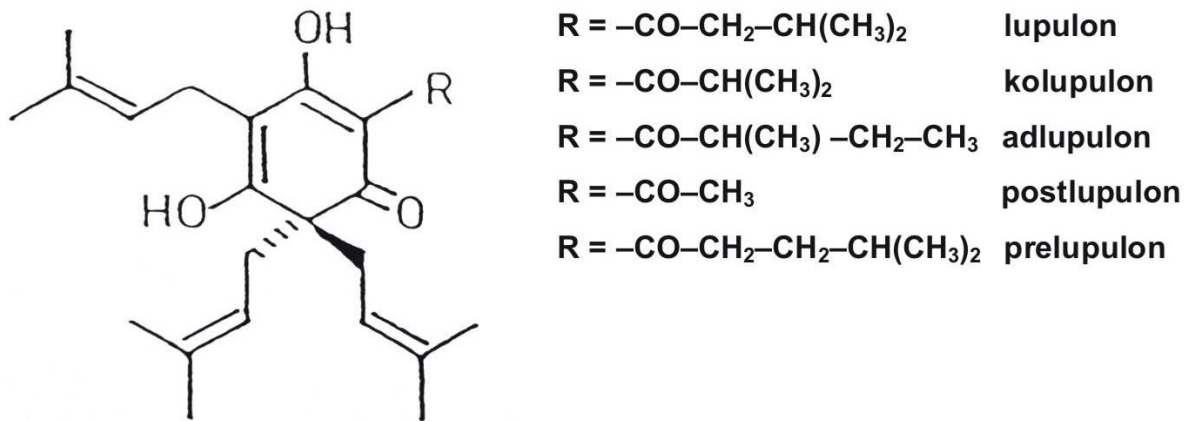
Pri klasičnem hmeljenju sladice je izkoristek pretvorbe alfa-kislin v izo-alfa-kislino od 0,3 do 0,4. Izkoristek je odvisen od vsebnosti kohumulona in od stopnje oksidiranosti hmeljnih smol (Hough in sod., 1982, cit. po Zupanec, 1992). Izgube alfa-kislin pri hmeljenju sladice so posledica nepopolne ekstrakcije alfa-kislin iz hmelja, nepopolne izomerizacije, ostanka v separatorju, adsorpcije na kvasu, precipitacije alfa-kislin zaradi znižanja pH medija in izgub na filtru. Največjo izgubo alfa-kislin predstavlja nepopolna izomerizacija in to je vzrok, da za hmeljenje sladice vse bolj uporabljajo izomerizirane hmeljne ekstrakte. Vsebnost izo-alfa-kislin v pivu na trgu je v območju od 25 mg/L do 40 mg/L (Knez, 1984).

Poznanih je nekaj derivatov izo-alfa-kislin: allo-izo-alfa-kislino, spiro-alfa-kislino, abeo-alfa-kislino, humulinoni in humulinske kisline (Knorr in Kremkow, 1972, cit. po Zupanec, 1992). Humulinske kisline, ki so le pol toliko grenke kot alfa-kislino, nastajajo s hidrolizo izo-alfa-kislin in jih najdemo v večji koncentracijah v izomeriziranih hmeljnih ekstraktih (Drewett in Laws, 1970, cit. po Zupanec, 1992).

Oksidacija alfa-kislin je prav tako pomembna, vendar nezaželena reakcija v kemizmu hmelja. Oksidacija alfa-kislin je znak staranja hmelja; zmanjševanje prvotnega deleža alfa-kislin pomeni manjšo ceno hmelja. Pri oksidaciji nastane kompleksna zmes produktov, ki zaradi netopnosti v sladici in nezadovoljive grenkobe nima prave pivovarske vrednosti (Verzele, 1985).

2.3.2.2 Beta-kislino

Beta-kislino so druga najpomembnejša skupina sestavin mehkih smol in so prav tako kot alfa-kislino derivati 1,3,5-trihidroksi benzena oziroma njegove tautomerne oblike cikloheksana-1,3,5-triona. Od alfa-kislin se razlikujejo v tem, da imajo na ogljikovem atomu na mestu 4 namesto hidroksilne skupine vezano še eno prenilno skupino (Vandenbossche, 1973, cit. po Zupanec, 1992). Beta-kislino so zmes petih optično aktivnih analogov kolupulona, lupulona, adlupulona, prelupulona in postlupulona z enakimi radikali na ogljikovem atomu na mestu 2 kot alfa-kislino (slika 3). V hmeljnih kultivarjih prevladujejo kolupulon (delež 0,4 – 0,6 glede na beta-kislino), lupulon (delež 0,3 – 0,5 glede na beta-kislino) in adlupulon (delež 0,1 – 0,2 glede na beta-kislino) (Bucke in Baker, 1987).



Slika 3: Splošna strukturna formula beta-kislin (Verzele, 1985)

Na okus piva vpliva razmerje med alfa- in beta-kislinami, čeprav vpliv beta-kislin pri tem še ni popolnoma pojasnjen. Beta-kislina so slabo topne v vodi, sladici in še slabše v pivu, zato je njihova količina v končnem produktu majhna (Zupanec, 1992).

Beta-kislina so bolj občutljive za oksidacijo kot alfa-kislina in se pri skladiščenju pri sobni temperaturi oksidirajo, pri čemer nastanejo grenki oksidacijski produkti (De Keukeleire, 1982).

2.3.2.3 Trde smole

Trde smole so polarna frakcija hmeljnih smol, ki ni topna v nižjih ogljikovodikih, topna je v hladnem metanolu in dietiletru, kar nam daje podatek o polarnosti sestavin te frakcije, o značaju kisikovih spojin. Nastajajo že med dozorevanjem hmelja. Te spojine so ksantohumul, dezmetilksantohumul, ksantohumoli B,C,D,E in drugi halkoni (Stevens in Page, 2004).

2.3.2.4 Staranje mehkih hmeljnih smol – procesi med skladiščenjem

Med skladiščenjem hmelja alfa- in beta-kislina oksidirajo in se pretvarjajo v bolj polarne spojine, ki tudi spadajo v frakcijo trdih hmeljnih smol. Zaradi dvojnih vezi na stranskih verigah in v šestčlenskem obroču je sestava produktov oksidacije alfa- in beta-kislin zelo pestra (De Keukeleire, 1982, cit. po Zupanec, 1992). Trdim smolam ne pripisujemo pomembnega vpliva na okus piva, vplivale naj bi na stabilnost grenčice v pivu (Forster in sod., 1989).

2.3.2.5 Metode za določanje alfa- in beta-kislin

2.3.2.5.1 Določanje alfa- in beta-kislin s HPLC

S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) lahko natančno določimo vsebnost alfa- in beta-kislin ter njihovo sestavo. V etru raztopljene alfa- in beta-kislino ločimo s HPLC tehniko in kvantitativno določimo s spektrofotometričnim detektorjem pri valovni dolžini 314 nm. Prednosti te metode so, da ločimo homologe alfa- in beta-kislin in tako določimo natančno sestavo hmeljnih smol, kar nam je v veliko pomoč pri oceni kvalitete posameznega kultivarja ter pri določevanju izvora neznanih vzorcev (Analytica – EBC , 1997). Poleg naštetih kromatografskih vrhov, dobimo kot rezultat preskusne metode tudi razmerje med alfa- in beta-kislinami, ki je pomemben podatek za pivovarsko industrijo.

2.3.2.5.2 Določanje konduktometrične vrednosti hmelja (KVH-TE)

Pri tej metodi alfa-kislino najprej ekstrahiramo s toluenom, ekstraktu dodamo metanol in nato titriramo z metanolno raztopino svinčevega acetata. Ekvivalentno točko določamo konduktometrično (Analytica – EBC , 1997). Nastaja rumena oborina alfa-kislin s svinčevimi ioni. Prebitni svinčev acetat po ekvivalentni točki povečuje prevodnost raztopine.

Konduktometrična metoda je hitra in dokaj enostavna, zato je njena uporaba najpogostejša in standardna. Rezultat je vsebnost (kumulativno) alfa-kislin. Slaba stran te metode je, da poleg alfa-kislin tvorijo oborino s svinčevim acetatom tudi oksidacijski produkti alfa-kislin (Košir, 1995).

2.3.3 ETERIČNO OLJE

Druga pomembna skupina sekundarnih metabolitov v hmelju je eterično olje. Hmeljevo eterično olje ima pestro sestavo, v njem je bilo identificiranih več sto spojin (Maier, 1982). Tako pestro sestavo je mogoče analizirati s plinsko kromatografijo, za identifikacijo posameznih sestavin je najprimernejša masna spektrometrija.

Proučevanje sestave hmeljnega eteričnega olja je deležno velike pozornosti zaradi identifikacije hmeljnih kultivarjev in njihovega razvrščanja v različne skupine (Kralj in sod., 1991) in zaradi ugotavljanja vpliva sestavin eteričnega olja na aromo piva (Irwin, 1989, cit. po Zupanec, 1992).

Hmeljno eterično olje vsebuje predvsem ogljikovodike, kisikove spojine in žveplove spojine (Sharpe in Laws, 1981, cit. po Zupanec, 1992).

2.3.4 POLIFENOLNE SPOJINE

V tej skupini sekundarnih metabolitov hmelja (hmeljni kultivarji jih vsebujejo 2 – 6 % glede na suho snov), so najpomembnejši tanini, flavonoidi, antociani in tanoidi. Polifenolnim sestavinam pripisujejo različne vplive na kvaliteto piva: pri hmeljenju sladice se vežejo na beljakovine in jih obarjajo (ta proces se nadaljuje tudi med odležavanjem piva), imajo pozitiven vpliv na okus piva, stabilizirajo grenčico piva, pozitivno vplivajo na biološko in koloidno stabilnost piva, vplivajo na stabilnost pene, barvo in aromo piva (Dale, 1987, cit. po Zupanec, 1992). V prevelikih količinah imajo lahko tudi negativen učinek: povzročajo motnost piva in poslabšajo okus piva (Dale, 1987, cit. po Zupanec, 1992). Nekaterim polifenolnim spojinam v hmelju pripisujejo tudi vpliv na skladiščno obstojnost hmelja, imajo jih za endogene inhibitorje oksidaze alfa-kislin, ki katalizira oksidacijo alfa-kislin (Menary in Doe, 1983, cit. po Zupanec, 1992).

Enostavna monomerna polifenola v hmelju sta galna kislina in kvercetin. Monomerni polifenoli so v hmelju v prosti in v glikozidni obliki. Flavonol kvercetin na primer obstaja kot kvercetin-glikozid. V hmelju so identificirali štirinajst flavonolnih glikozidov. Hmeljni kultivarji se razlikujejo po vsebnosti posameznih monomernih polifenolov (Hough in sod., 1982, cit. po Zupanec, 1992).

Monomerni polifenoli v različnih kombinacijah tvorijo dimere, trimere, oligomere in polimere. Identificirani so bili na primer dimerni procianidini B1, B2, B3 in B4. Pod vplivom toplotne energije ali v prisotnosti kisika ali kovinskih ionov monomerne spojine polimerizirajo. V pivu so na primer našli polimere, ki so bili zgrajeni iz sedmih različnih monomernih polifenolov (Pfenninger in sod., 1978, cit. po Zupanec, 1992).

2.4 Vpliv skladiščenja na kakovost hmelja

Standardizirana metoda za določanje skladiščne obstojnosti hmelja še ni splošno sprejeta. V večini primerov ocenjujemo skladiščno obstojnost s pomočjo indeksa staranja hmelja HSI (angl. Hop Storage Indeks) in sicer tako, da hmelj skladiščimo v škatli na temperaturi okoli 20 °C in v nekajdnevnikih presledkih merimo HSI vrednost, tj. kvocient absorbanc toluenskega ekstrakta hmelja pri valovnih dolžinah 275 in 325 nm (American Society of Brewing Chemists, 1990). Povečanje HSI vrednosti zaradi staranja za posamezne slovenske

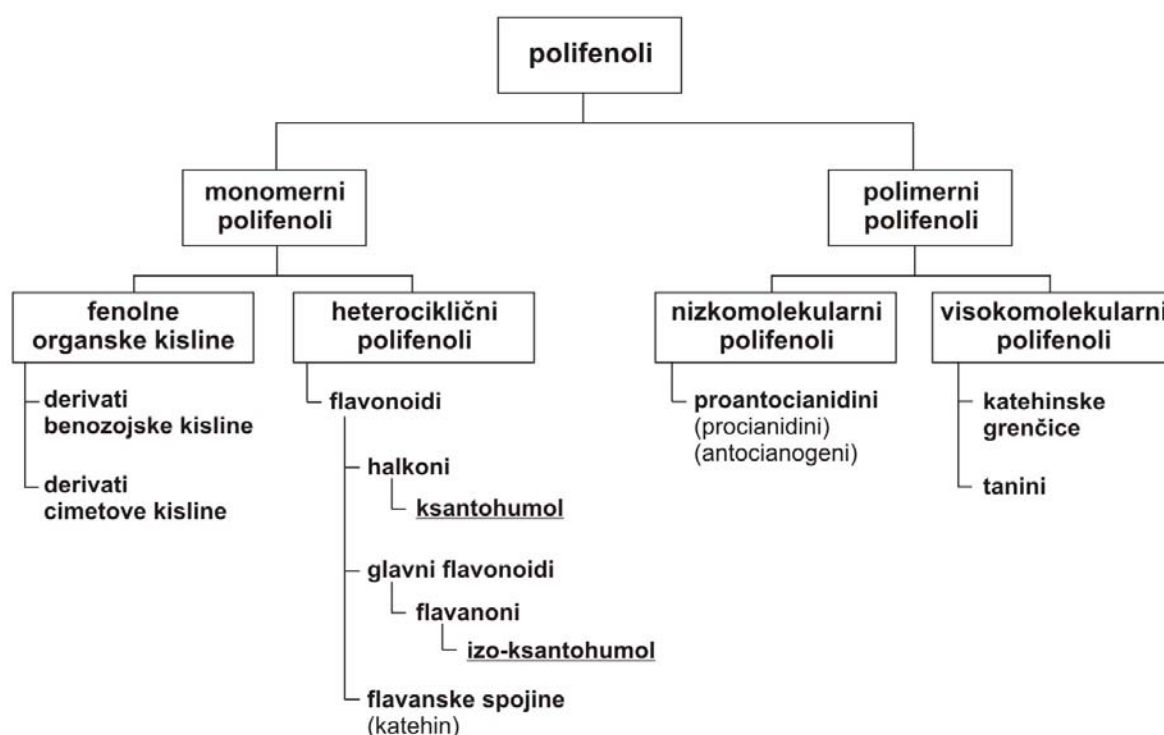
kultivarje kaže, da sta Savinjski golding in Aurora uvrščena med zelo dobro skladiščno obstojne kultivarje, Celeia in Bobek pa med skladiščno dobro obstojne kultivarje (Kralj in Zupanec, 1991). Sorta Magnum je uvrščena med skladiščno dobro obstojne kultivarje (Hopfen aus Deutschland, 2002).

Tak način določitve skladiščne obstojnosti nam omogoča primerjavo skladiščnih obstojnosti posameznih kultivarjev, vendar nam ne pove veliko o dejanskem zmanjševanju pivovarske vrednosti hmelja zaradi skladiščenja.

2.5 Ksantohumol

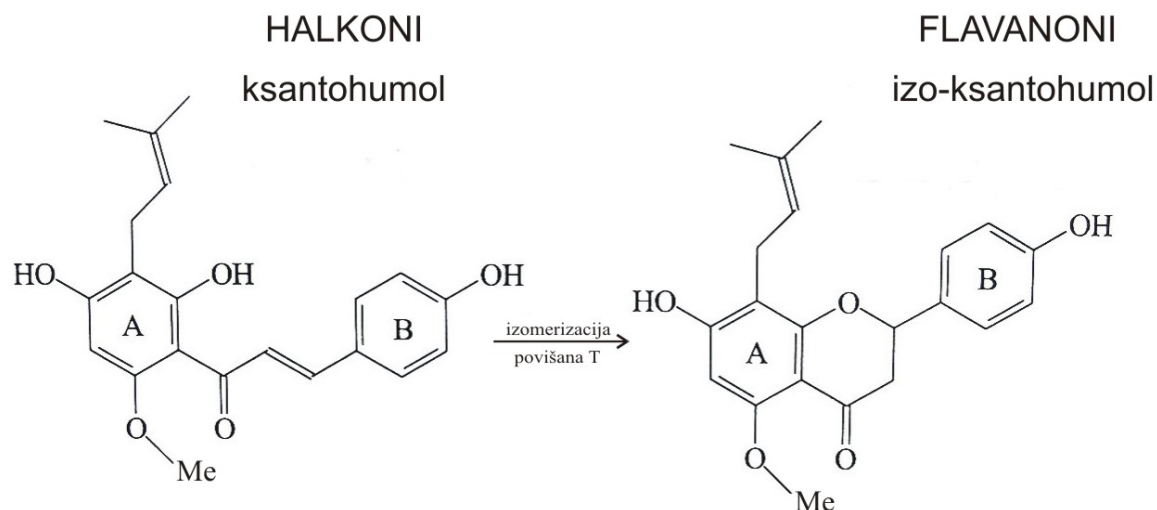
2.5.1 SPLOŠNO

Ksantohumol (3'-[3,3-dimetilalil]-2',4',4-trihidroksi-6'metoksihalkon) je glavni prenilflavonoid v hmeljnih storžkih (2.3.2.3 in 2.3.2). Spada v skupino monomernih heterocikličnih polifenolov. Za flavonoide je značilen osnoven C15 skelet, z dvema aromatskima obročema (t. i. obroč A in obroč B), ki sta povezana z mostom iz treh ogljikovih atomov. Prenilflavonoidi, ki jih delimo na flavanone in halkone, imajo, kot je razvidno iz slike 4, na A obroču vezano prenilno skupino $[(CH_3)_2C=CH-CH_2-]$ (Stevens in Page, 2004).



Slika 4: Shematski prikaz razvrstitve nekaterih, predvsem za hmelj pomembnih polifenolov (Kammhuber, 2005)

Polifenoli imajo polarni značaj in se topijo v vroči vodi, največ jih je v listih hmeljevih storžkov. Ksantohumol je kot izjema malo polaren, najdemo ga v lupulinu (v smolah in v olju) ne pa v listih hmeljevih storžkov. Ksantohumol je topen v etanolu (Forster in Köberlein, 1998).



Slika 5: Strukturna formula ksantohumola in izo-ksantohumola (Stevens in sod., 1999)

2.5.2 BIOSINTEZA KSANTOHUMOLA

Ksantohumol nastaja v lupulinskih žlezah po specifični poti biosinteze prenilflavonoidov (Stevens in Page, 2004).

De Keukeleire in sod. (2003) so na podlagi testov, kjer so ugotavljali čas nastanka alfa- in beta-kislin ter ksantohumola, ugotovili, da nastajajo ti metaboliti že od samega začetka cvetenja hmelja. Signifikantno povečano vsebnost teh spojin so zaznali v času, ko se je cvet začel spreminjati v storžek. Prisotnost alfa- in beta-kislin ter ksantohumola so zaznali tako v ženskih kot v moških rastlinah, vendar je bila količina v moških rastlinah zelo majhna. Suhi hmeljevi storžki vsebujejo do 1 % ksantohumola.

2.5.2 POZITIVNE LASTNOSTI KSANTOHUMOLA

In vitro študije so pokazale delovanje ksantohumola proti osteoporozi in močno antioksidativno delovanje na hidroksilne in peroksilne radikale, ki povzročajo poškodbe v celici; kaže pa tudi antikancerogeno in citostatično delovanje (Stevens in Page, 2004).

Vnos prenilflavonoidov s pivom je relativno majhen v primerjavi z vnosom skupnih polifenolov iz piva (Vinson in sod. 2003). Vendar so na drugi strani prenilflavonoidi v primerjavi z drugimi

polifenoli iz piva bolj lipofilne narave in na podlagi tega kažejo večji antioksidativni potencial na lipofilnih površinah, tj. na membranah in nizko molekularnih lipoproteinih (LDL – low density lipoproteins) (Stevens in sod., 2003).

2.5.3 NEKATERE REAKCIJE IN VSEBNOST KSANTOHUMOLA PRI VARJENJU PIVA

Potrebno je omeniti, da je ksantohumol malo polarna spojina in da se v vodi, pivini in v pivu slabo topi. Zaradi toplote ksantohumol v procesu varjenja piva izomerizira v izo-ksantohumol (slika 5), ki je bolj polaren in obstojnejši (Stevens in sod., 1999). Ta izomeriziran produkt tudi kaže antikancerogene lastnosti, a testi kažejo, da v manjši meri kot njegov predhodnik ksantohumol. Večjo količino neizomeriziranega ksantohumola je možno doseči s poznejšim doziranjem hmelja v kotel (Back, 2002, Biendl in sod., 2002).

Stettner in sod. (2003) opisujejo rabo hmeljnih izolatov s povečano vsebnostjo ksantohumola pri izdelavi piva. Ksantohumola je bilo v pivu najti samo v sledovih (< 0,1 mg/L), medtem ko je bilo izo-ksantohumola do približno 8 mg/L.

Back in sod. (2003) opisujejo pivovarski postopek, ki naj bi zagotovil več ksantohumola in izo-ksantohumola v pivu. S posebnim tehnološkim postopkom, ki so ga poimenovali »XAN-Technologie« so dosegli vsebnost ksantohumola, ki je bila večja od 1 mg/L.

2.5.4 VPLIV BRIKETIRANJA IN EKSTRAKCIJE HMELJA NA VSEBNOST KSANTOHUMOLA

Količina ksantohumola se pri briketiranju ne spreminja (Kammhuber in sod., 1998). Iste rezultate sta dobila Forster in Köberlein (1998). Ugotovila sta, da količina ksantohumola po briketiranju ostane enaka, tako v briketih tipa 90 kot v briketih tipa 45. Pri etanolni ekstrakciji smol preide v ekstrakt večina (90 %) ksantohumola, pri ekstrakciji z ogljikovim dioksidom pa le 5 %, večina ksantohumola ostane torej v hmeljnih tropinah.

2.5.5 VPLIV LETNIKA

Letina ima omejen vpliv na vsebnost ksantohumola v hmelju. V štirih obiranjih od leta 1998 do leta 2001 se količine ksantohumola znotraj sort na istem pridelovalnem območju razlikujejo le malo; za največ 0,1 g/100 g suhe snovi. Tudi razmerje med ksantohumolom in alfa-kislinami je relativno stabilno (Biendl, 2002).

Biendl (2002) je ugotovil, da je povprečna količina ksantohumola znatno večja na stari celini, medtem ko je v Severni Ameriki, na Kitajskem in na Novi Zelandiji (verjetno zaradi klime), razmerje med ksantohumulom in alfa-kislinami manjše kot v Evropi. Tako so Forster in sod. (2002) poročali o večji vsebnosti ksantohumola in večjem razmerju med ksantohumulom in alfa-kislinami v Nemčiji kot v Združenih državah Amerike (določevanje s HPLC). Primerjali so sorti Perle in Nugget. Razlike pripisujejo različni klimi.

2.5.6 KOLIČINA KSANTOHUMOLA V HMELJU

Maksimalno količino ksantohumola v hmelju so izmerili pri sorti Taurus iz nasada na področju Hallertau na Bavarskem in sicer 1,08 % glede na suho snov (Biendl, 2002). V svetovnem povprečju je količina ksantohumola od 0,2 do 1,0 % suhe snovi. Povprečno količino ksantohumola glede na suho snov v slovenskih sortah letine 2001 (Aurora, Bobek, Celeia in Savinjski golding) in nemške sorte Magnum iz področja Hallertau (rezultat povprečja letin 1998, 1999, 2000, 2001) podaja preglednica 3.

Preglednica 3: Povprečna količina ksantohumola v različnih sortah hmelja (podrobnosti v tekstu; Biendl, 2002)

sorta	ksantohumul (%)	ksantohumul/alfa kisline (g/g/s.s.)
Aurora (Slovenija)	0,38	0,051
Bobek (Slovenija)	0,56	0,090
Celeia (Slovenija)	0,16	0,069
Savinjski golding (Slovenija)	0,44	0,083
Magnum (Nemčija)	0,42 – 0,50 (0,46)	0,033 – 0,035 (0,034)

Razmerje med količino ksantohumola in količino alfa-kislin niha od 0,03 do 0,09. Za doziranje hmelja to pomeni, da bi v primeru vnosa 10 g alfa-kislin na hektoliter sladice vnesli od 0,3 do 0,9 g ksantohumola (Biendl, 2002).

2.5.7 KVANTITATIVNO DOLOČANJE KSANTOHUMOLA

S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) lahko natančno določimo vsebnost ksantohumola. Vzorce ekstrahiramo z etrom in v ekstraktu s HPLC ločimo ter s spektrofotometričnim detektorjem pri valovni dolžini 374 nm kvantitativno določimo ksantohumul (Stevens in sod., 1999). Razmerje med ksantohumulom in alfa-kislinami je pomemben podatek, ki bi lahko v prihodnosti pivovarju določal izbiro sorte hmelja pri hmeljenju sladice.

2.6 Visokotlačna tekočinska kromatografija – HPLC (Žorž, 1991)

Kromatografija je ena od separacijskih tehnik, ki nam omogoča kvalitativno in kvantitativno določanje posameznih substanc v kemijski zmesi. Kromatografija je splošen izraz za separacijske tehnike, ki temeljijo na porazdelitvi vzorca med mobilno fazo (plin ali tekočina) in stacionarno fazo (trdna snov ali tekočina).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je tip kromatografije, pri kateri se tekoča mobilna faza pomika vzdolž fino porazdeljene stacionarne faze. Mobilno fazo potiskamo skozi kolono s pomočjo visokotlačne črpalke. Kolona, skozi katero vodimo mobilno fazo, je napolnjena z različnimi polnili. Mobilna faza prenese skozi kolono zmes spojin. Posamezne komponente preiskovanega vzorca se ločijo med seboj na podlagi različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in s stacionarno fazo.

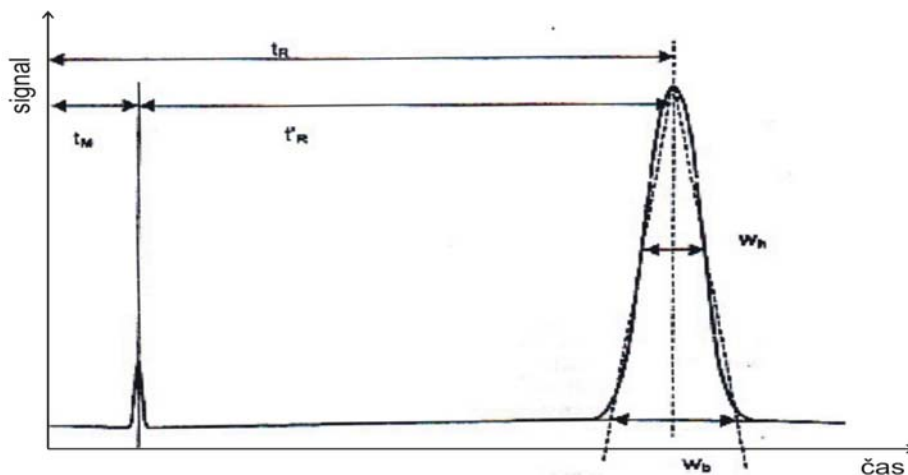
Stacionarna faza je lahko trdna, porozna ali površinsko aktivna spojina, ki jo sestavljajo majhni delci ali pa je tekoča in porazdeljena kot film na adsorbentu.

Mobilna faza je tekoča, biti mora čista in selektivna za komponente, ki jih želimo ločiti in ne sme reagirati s polnilom. Če je le mogoče, uporabljamo malo viskozne mobilne faze; to poveča hitrost masnega pretoka in zmanjša tlak.

2.6.1 RETENCIJA

Retencijski čas (t_R), tj. čas potovanja snovi skozi kolono, "razdelimo" na dva dela: na čas, ki ga molekula prebije v mobilni fazi (t_M) in na čas, ko se molekula nahaja na stacionarni fazi (t_R'). Razdelitev časov prikazuje slika 6.

$$t_R = t_M + t_R' \quad (1)$$



Slika 6: Prikaz retencijskega časa na kromatogramu (Žorž. 1991)

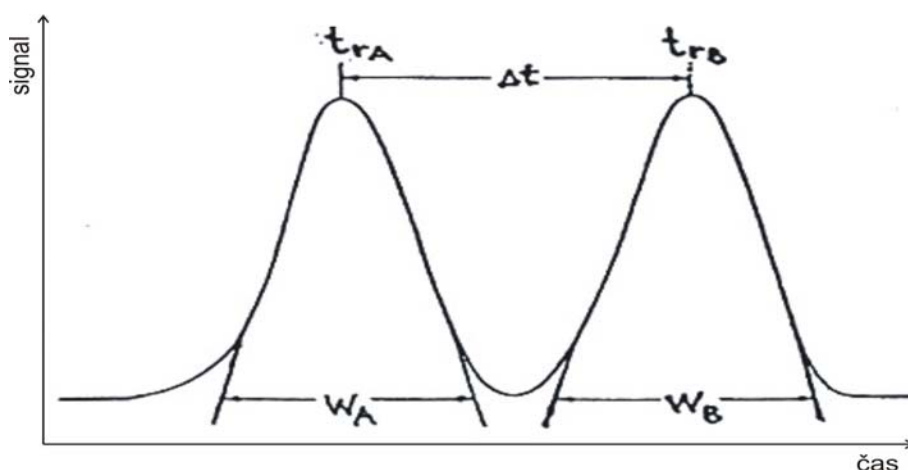
Legenda: t_R – retencijski čas, t_M – čas, ki ga molekula prebije v mobilni fazi, t'_R – čas, ko se molekula nahaja na stacionarni fazi

2.6.2 LOČLJIVOST

Cilj kromatografije je v primernem času ločiti zmes komponent na posamezne frakcije. Ločljivost ali resolucijo (R) med dvema vrhovoma podaja enačba 2. Način, kako izmerimo zahtevane parametre, prikazuje slika 7.

$$R = \frac{2 \cdot \Delta t}{W_A + W_B} \quad (2)$$

Legenda: R – ločljivost, W_A – širina vrha komponente A, W_B – širina vrha komponente B, Δt – razlika v retencijskem času komponente B in komponente A



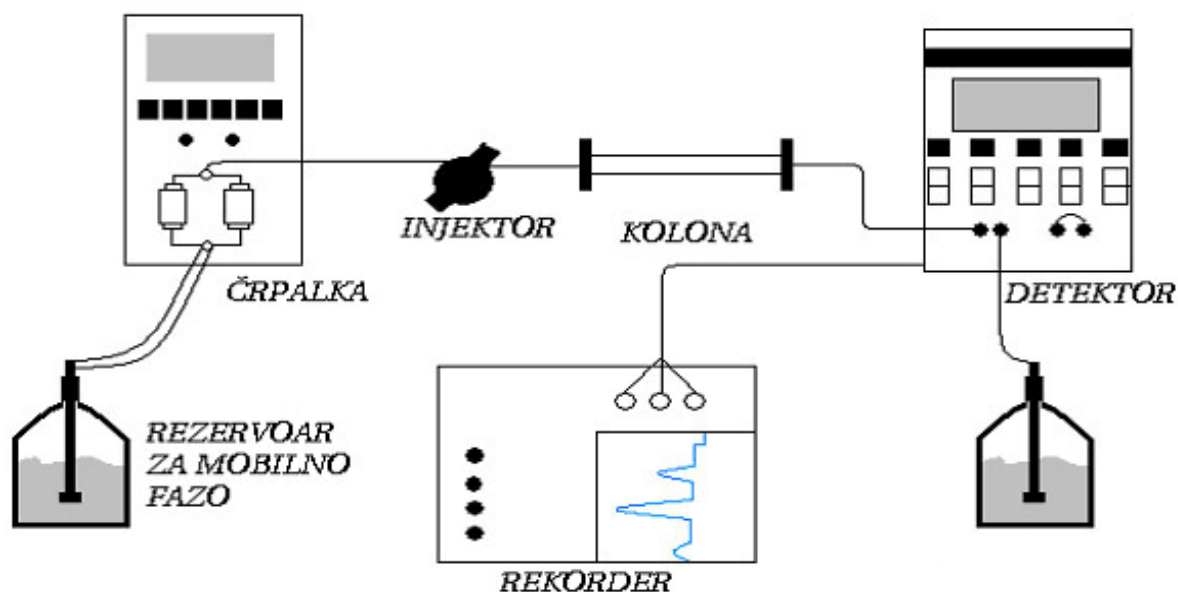
Slika 7: Kromatogram dveh dobro ločenih vrhov (Žorž, 1991)

Legenda: W_A – širina vrha komponente A, W_B – širina vrha komponente B, Δt – razlika v retencijskem času komponente B in A

Ločljivost kolone (R) je v zvezi s selektivnostjo (α), številom teoretskih podov (N) in kapacitivnim faktorjem (K). Ločljivost, retencijski čas in širine vrhov so odvisni tudi od temperature (Žorž, 1991).

2.6.3 APARATURA

Osnovni HPLC sistem mora imeti naslednje komponente: rezervoar za mobilno fazo, črpalko, injektor, kromatografsko kolono, detektor in rekorder. Zaporedje kromatografskih enot prikazuje slika 8.



Slika 8: Osnovna sestava HPLC aparature (Žorž, 1991)

Rezervoarji za mobilno fazo so najpogosteje primerne steklene posode, ki so dovolj tesno zaprte, da se sestava faze med delom ne spreminja. Mobilno fazo moramo pred uporabo filtrirati. Topila, ki se uporabljajo kot mobilne faze, naj bi bila praviloma zelo čista in razplinjena. Razplinjanje lahko izvedemo s pomočjo ultrazvoka ali s prepihovanjem s helijem ali z argonom. Upoštevati moramo, da mobilna faza po določenem času resorbira zrak.

Črpalka nam omogoča potiskanje mobilne faze skozi kolono. Pri HPLC tehniki uporabljamo visokotlačne črpalke, ki omogočajo tlake do 400 barov. Potrebni tlak je odvisen od kolone, mobilne faze in pretoka. Poznamo dve vrsti visokotlačnih črpalke: izokratske (konstantna sestava mobilne faze) in gradientne (sestava mobilne faze se med analizo spreminja).

Injekcijski ventili so konstruirani tako, da omogočajo vnos vzorca na kolono pri tlakih, ki znašajo tudi več sto barov. Nanje lahko pritrdimo različno velike zanke. Pri vnosu vzorca

najprej pri atmosferskem tlaku z injekcijsko iglo napolnimo zanko, po premiku ročice injektorja pa zanko povežemo s črpalko, ki hipno spere vzorec na kolono. Pri avtomatiziranem vnosu avtomatski vzorčevalnik uporablja enake injekcijske ventile, le preklon ventila in polnjenje zanke je avtomatsko.

Kolona je najpomembnejši del HPLC instrumenta. Na njej se ob pravilno izbranih pogojih vrši popolna ali delna separacija zmesi na posamezne komponente. Princip separacije je odvisen od vrste polnila. Običajne kolone so dolge od 60 do 300 mm, notranji premer je od 2 do 8 mm. Polnjene so običajno z delci premera od 3 do 10 μm . Po določenem številu vnosov vzorca se kolona kontaminira, tlak se poveča. Preventiva je vezava predkolon, ki so lahko polnjene z istim ali različnim polnilom kot glavna kolona, vendar so mnogo krajše (od 5 do 30 mm). Kljub preventivi in skrbni pripravi vzorcev pa se kolone po določenem številu vnosov kontaminirajo in tako izgubijo moč separacije.

Z detektorjem zasledujemo spremembo ene od fizikalnih lastnosti mobilne faze (efluenta) ob eluiranju komponent vzorca iz kolone. Detektor dobljeno informacijo prevaja v električni signal. Izbira detektorja je odvisna od komponent, ki jih želimo določati. Uporabljamo različne detektorje: detektor na lomni količnik, UV-VIS detektor, fluorescentni detektor. V zadnjem času pa se vedno bolj uveljavljajo "diode-array" in "fast-scan" detektorji, ki so v principu UV-VIS detektorji, le da nam omogočajo spremljanje treh parametrov (čas, intenziteta, valovna dolžina).

Integrator in rekorder vrednotita električni signal, ki ga posreduje detektor. Rekorder sicer beleži analogni signal, vendar pa je kvantitativno delo z njim zamudno. Integrator najprej prevede analogni signal iz detektorja v digitalnega, šele nato vrednoti dobljeni kromatogram. Integratorji so lahko samostojne enote ali softverski programi, ki jih instaliramo in krmilimo z osebnimi računalniki.

2.7 Vrednotenje (validacija) analizne metode (Christian, 1994)

Predpisi o izvajanju kemijskih analiz nas obvezujejo, da izvajamo analize metode po kriteriju o zagotovitvi kvalitete dela QA (Quality Assurance) in po načelu dobre laboratorijske prakse GLP (Good Laboratory Practice). Zagotavljanje kakovosti je sistem aktivnosti, ki daje proizvajalcu ali uporabniku produkta zagotovilo, da rezultat ustreza definiranim standardom kakovosti na predpisanem nivoju zaupanja. Standardi kakovosti zahtevajo validacijo vsake analizne metode, ne glede na to, ali smo jo razvili sami ali pa jo uvajamo po navodilih neke

druge institucije. Vrednotenje metode prikažemo z določenimi parametri in s tem zagotovimo, da je metoda ustrezna za analizo določene substance v določenem vzorcu in da daje zanesljive rezultate.

2.7.1 NEKATERI POSEBNI VIDIKI VALIDACIJE ANALIZNE METODE

Validacija analizne metode je proces, s katerim potrdimo, da daje analizni postopek za nek specifični preizkus ustrezne rezultate. Z validacijo dokažemo, da so izpolnjene vse zahteve, ki so predpisane za določeno analizno metodo. Zahteve so podane s standardi ali s predpisano dokumentacijo. Običajne zahteve so: pravilen rezultat meritve, ustrezna merilna negotovost meritve, primerna cena meritve in rezultat analize v dogovorjenem roku. Validacijski postopek vključuje primerjave rezultatov validacije s podanimi zahtevami. Rezultat validacije metode je končna potrditev, ki s pomočjo preverjanja in s pripravo objektivnih dokazov jasno pokaže, da so izpolnjene posamezne zahteve analize. Pri validiranju kromatografskih metod najprej preverimo posamezne faze analitske metode, od vzorčenja, priprave vzorcev in standardnih raztopin, detekcije in ocenitve rezultatov na podobni matrični raztopini. Sledi določanje optimalnih pogojev analize. Za kromatografsko ločitev je to izbira primerne kolone, mobilne faze, topila, in drugih analiznih parametrov.

Šele po tovrstni optimizaciji sledi celotna validacija, ki vključuje testiranje metode glede na naslednje parametre: specifičnost in selektivnost, linearnost, delovno območje, občutljivost, mejo zaznavnosti, mejo določljivosti, natančnost, točnost (pravilnost), robustnost in stabilnost. Nekaterim od teh (linearnost, natančnost, točnost) smo posvetili posebno pozornost.

2.7.1.1 Linearnost

Linearnost je lastnost metode, da daje v določenem območju proporcionalne rezultate, v odvisnosti od koncentracije vzorca. Določimo jo tako, da izmerimo standardne raztopine vzorca različnih koncentracij po celotnem delovnem območju in izračunamo enačbo regresijske premice z metodo najmanjših kvadratov. Linearnost preverimo z risanjem umeritvene krivulje, ki podaja odvisnost koncentracije od merjene količine. Metoda je linearna, če je vrednost korelacijskega koeficienta (R^2) 0,99 ali več.

2.7.1.2 Natančnost

Natančnost metode pove, koliko rezultati meritev znotraj skupine meritev med seboj nihajo (in je odvisna od koncentracije analita). Natančnost analizne metode podajamo kot

standardni odmik (s) analizne metode. Določimo jo tako, da izmerimo več meritev (paralelk) vzorca (ali standardnih raztopin ali referenčnih materialov). Natančnost metode podajamo na dva načina, odvisno od tega, pod katerimi pogoji smo jo določili:

Ponovljivost (angl. repeatability) je natančnost, dobljena iz rezultatov meritev pri ponovljivih pogojih (ista metoda, isti reagenti, isti analitik, isti laboratorij in ista oprema). Za določitev ponovljivosti je potrebno imeti 6 do 8 ponovitev vzorca v čim krajšem času in ob čim bolj nespremenjenih pogojih merjenja.

Obnovljivost (angl. reproducibility) je natančnost, dobljena iz rezultatov meritev pri obnovljivih pogojih (ista metoda, isti vzorec, drug analitik, daljše časovno obdobje analize, različni laboratoriji, različna oprema). Obnovljivost vrednostimo podobno kot ponovljivost.

2.7.1.3 Točnost (pravilnost)

Točnost analitske metode je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analitske metode dobimo pravilne rezultate. Točnost je merilo stopnje ujemanja rezultatov, ki jih izmerimo z našo metodo, s pravo vrednostjo. Pravo vrednost dobimo na dva načina. Eden je primerjanje rezultatov z referenčno metodo, za katero vemo, da nima sistematske napake. Manjša kot je razlika med povprečjem meritev in "pravo" (referenčno) vrednostjo, bolj je metoda točna. Drugi način je dodajanje znane koncentracije merjene komponente v matrično raztopino in merjenje pripadajočih signalov.

2.8 Osnove statistike in statistični testi (Bohanec, 1998)

Statistika (veda, ki je del matematike) se v zadnjem času veliko uporablja tudi na področju načrtovanja eksperimentov. Statistične metode nam pomagajo pri vrednotenju in podajanju rezultatov, iskanju virov različnih sistematskih napak, ocenjevanju velikosti napak, pri primerjavi različnih metod, različnih analitikov, načinov dela, različnih vzorcev itd.

2.8.1 OSNOVNI STATISTIČNI POJMI

Vsak rezultat merjenj mora vsebovati podatek o napakah, zato izvajamo vse analize v več ponovitvah. Ponovitve so analize, ki jih naredimo večkrat pod enakimi pogoji. Število ponovitev je odvisno od vrste analize, časa, ki je potreben za analizo, od tega, ali je analiza rutinska ali ne, od števila vzorcev in drugih faktorjev. Statistično gledano, je šest tisto minimalno število ponovitev, ki jih moramo narediti, da lahko ovrednotimo nek rezultat. Iz n ponovitev meritev izračunamo osnovne statistične parametre:

- povprečje meritev, ki je osnovna mera povprečne vrednosti merjenega parametra za populacijo:

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} \quad (3)$$

Legenda: \bar{x} – povprečje meritev, x_i – meritev i , n – število meritev

- standardni odklon meritev:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (4)$$

Legenda: s – standardni odklon, \bar{x} – povprečje meritev, x_i – meritev i , n – število meritev

Koeficient variacije ali relativni standardni odklon je standardni odklon izražen v odstotkih glede na povprečno vrednost meritev:

$$RSD = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \quad (5)$$

Legenda: RSD – relativni standardni odklon, s – standardni odklon, \bar{x} – povprečje meritev

2.8.2 STATISTIČNI TESTI

Pri interpretaciji eksperimentalnih rezultatov, primerjavi podatkov in iskanju povezav med različnimi skupinami podatkov si pomagamo z različnimi testi, ki z določeno verjetnostjo potrdijo ali ovržejo določene trditve. V nadaljevanju so naštet najosnovnejši statistični testi in njihova uporaba.

Določitev zunaj ležečih meritev (osamelcev)

Ponovitve neke analize pod enakimi pogoji sestavljajo skupino meritev. Pred njihovo statistično obdelavo in določitvijo osnovnih statističnih parametrov (povprečje, standardni odklon), meritve pregledamo in poskušamo ugotoviti, če katera od meritev zelo odstopa od ostalih. Take meritve so zunaj ležeče meritve ali osamelci (outliers); vplivajo na točnost in natančnost meritev. Pred nadaljnjo statistično obdelavo jih določimo in izločimo s pomočjo enega od znanih statističnih testov; uporabimo lahko Diksonov Q test:

$$Q_{\text{izrač}} = |OM - NM| / (MAX - MIN) \quad (6)$$

Legenda: $Q_{\text{izrač}}$ – izračunana Q vrednost, OM – opazovana meritev, ki jo želimo izločiti, NM – meritev, ki je najbližje opazovani meritvi, MAX – maksimalna meritev, MIN – minimalna meritev

Izračunano Q vrednost ($Q_{\text{izrač}}$) primerjamo s tabelarno vrednostjo (Q_{tab}). Če je $Q_{\text{izrač}}$ večja od Q_{tab} potem opazovano meritev izločimo. Če pa je $Q_{\text{izrač}}$ manjša od Q_{tab} , potem opazovana meritev ni osamelec (Bohanec, 1998).

F-test: primerjava standardnih odklonov dveh skupin meritev

Velikokrat moramo primerjati slučajno napako dveh skupin meritev, pri čemer je prva skupina rezultat analiz, dobljenih z eno metodo, druga skupina pa rezultat analiz, dobljenih z drugačno metodo. Če je standardni odklon prve skupine meritev (s_1) in standardni odklon druge skupine meritev (s_2) ter je v prvi (n_1), v drugi pa (n_2) meritev, potem izračunamo razmerje varianc obeh skupin po enačbi:

$$F_{\text{izrač}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (7)$$

Legenda: $F_{\text{izrač}}$ – izračunana F vrednost, s_1 – standardni odklon prve skupine meritev, s_2 – standardni odklon druge skupine meritev

s_1 in s_2 izberemo tako, da je $F \geq 1$.

Izračunano F vrednost ($F_{\text{izrač}}$) primerjamo s tabelarno vrednostjo (F_{tab}). Če je $F_{\text{izrač}}$ večja od F_{tab} potem se metodi razlikujeta po natančnosti. Če pa je $F_{\text{izrač}}$ manjša od F_{tab} , potem se metodi ne razlikujeta po natančnosti (Bohanec, 1998).

Opisani F -test uporabimo, kadarkoli imamo dve skupini meritev, ki se med seboj razlikujeta glede na način analize, glede na dan izvedbe analize, glede na izvajalce analiz, glede na različne vzorce in drugo. Ključno vprašanje je, ali sta metodi enako natančni ali ne. Ta test je eden najpogosteje uporabljenih testov, kadar primerjamo natančnost dveh skupin meritev, torej analitikov, metod, priprav vzorca.

t-test: Primerjava povprečij dveh skupin meritev

Kot prej pri F -testu, primerjamo dve skupini meritev: prva ima standardni odklon s_1 in druga s_2 , v prvi je n_1 , v drugi n_2 meritev. Za primerjavo povprečij dveh skupin meritev sta na voljo dva različna t -testa. Katerega bomo uporabili, je odvisno od tega, ali sta standardna odklona obeh skupin meritev primerljiva, ali ne. Ko s F -testom (enačba 7) primerjamo standardna odklona obeh skupin meritev, se glede na rezultat primerjave odločimo za način izračuna t -vrednosti. Če sta standardna odklona obeh skupin meritev primerljiva, je izračun t -vrednosti drugačen, kot v primeru, da se zelo razlikujeta. Izračunano t vrednost ($t_{\text{izrač}}$) primerjamo s tabelarno t vrednostjo (t_{tab}). Če je $t_{\text{izrač}}$ večja od t_{tab} , se povprečji obeh skupin statistično signifikantno razlikujeta. Če pa je $t_{\text{izrač}}$ manjša od t_{tab} , potem se povprečji obeh skupin statistično signifikantno ne razlikujeta (Bohanec, 1998).

Podobno kot F -test, tudi enega od obeh t -testov uporabimo, kadar primerjamo povprečne vrednosti dveh skupin meritev, ki se med seboj razlikujeta glede na izvajalca analiz, čas analiz ipd.

2.9 Opisi izbranih metod za kemometrično analizo podatkov (Massart, 1997)

Za analizo podatkov smo izbrali tri tehnike multivariatnih analiz, ki so bile najprimernejše glede na izbor podatkov:

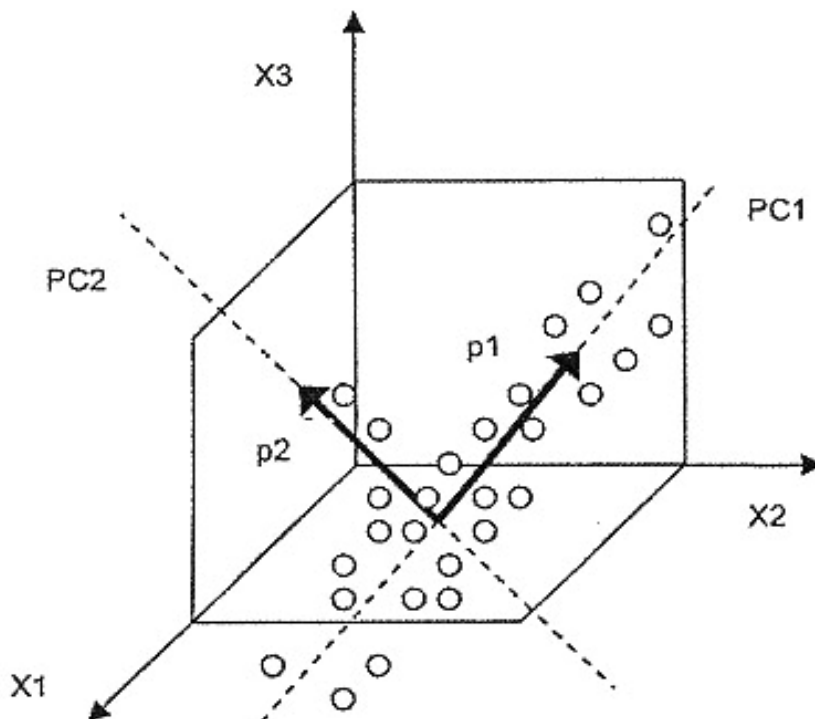
- metoda glavnih osi (angl. Principal Component Analysis – PCA)
- metoda analize grup (angl. Cluster Analysis – CA)

2.9.1 METODA GLAVNIH OSI (PCA)

Metoda glavnih osi je kemometrična tehnika multivariatne analize, s katero iz množice podatkov poiščemo tiste, ki nam dajo največ informacij o stanju naših preiskovanih vzorcev. Osnovna ideja je transformacija danega koordinatnega sistema v nov koordinatni sistem, kjer je večina informacij zbranih okoli manjšega števila koordinatnih osi kot v prvotnem koordinatnem sistemu (slika 9). Namen PCA je poiskati tiste koordinatne osi, ki vsebujejo več informacij. Običajno vsebujeta prvi dve tako določeni osi (PC1 in PC2) večino informacij in lahko ostale glavne osi zanemarimo.

V našem primeru bomo uporabili PCA analizo vzorcev glede na merjene spremenljivke. Smer, ki najbolj opiše razdaljo med opazovanimi vzorci, je smer maksimalne variance. Ta smer se imenuje prva glavna os, PC1. PC2 je pravokotna na PC1 in ima naslednjo največjo možno varianco.

Podatke prikažemo v obliki dvojnega diagrama. Z njim lahko prikažemo povezanost objektov (npr. podobnost) in vplivnost posameznih spremenljivk na posamezno glavno os.



Slika 9: Stari in novi koordinatni sistem metode PCA (Massart, 1997)

2.9.2 METODA ANALIZE GRUP (CA)

Prvi korak v analizi grup je določiti podobnost med objekti in spremenljivkami, ki opisujejo te objekte. Dobimo matriko podobnosti, kjer je podobnost med pari objektov izračunana z numeričnimi indikatorji. Z naslednjim korakom določimo podobnost. S tretjim korakom povezujemo grupe med sabo. Rezultate hierarhičnega grupiranja podamo z dendrogramom. Objekti so organizirani v vrsto, glede na medsebojne podobnosti, medtem ko vertikalna os predstavlja merilo podobnosti (razdaljo), pri kateri so se objekti zapovrstjo združevali v skupino.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Zasnova poskusa in material

Z laboratorijskem delom smo začeli v začetku maja in končali sredi junija. Vzorci hmeljnih storžkov, ki smo jih dobili v analizo, so bili vsi letnik 2005, obrani v času tehnološke zrelosti. Delo je potekalo na dveh področjih.

3.1.1 VPLIV SORTE IN RASTIŠČA NA VSEBNOST KSANTOHUMOLA

Pri določevanju vpliva sorte in rastišča na vsebnost ksantohumola smo analizirali 27 vzorcev hmeljnih storžkov, ki predstavljajo 5 sort:

- Aurora (7 vzorcev),
- Bobek (5 vzorcev),
- Celeia (5 vzorcev),
- Savinjski golding (5 vzorcev),
- Magnum (5 vzorcev),

iz štirih različnih rastišč:

- Vzhodni (V) Žalec (Petrovče in Celje),
- Zahodni (Z) Žalec (Braslovče, Vranksko, Šempeter, Prebold in Mozirje),
- Koroška (Radlje ob Dravi),
- Ptuj.

3.1.2 VPLIV BRIKETIRANJA NA VSEBNOST KSANTOHUMOLA

Skupina za določanje vpliva briketiranja je zajemala 4 sorte (Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding). Vsako sorto sta sestavljala dva vzorca hmeljnih storžkov in dva vzorca hmeljnih briketov tipa 90. Briketirali smo sredi maja 2005. Način vzorčenja je bil tak, da smo pred briketiranjem vzeli dva vzorca hmeljnih storžkov iz različnih delov kupa hmelja in nato po briketiranju še dva vzorca briketov iz različnih delov kupa briketov. Analizirali smo 16 vzorcev.

3.2 Metode

Vse analize smo opravili na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. Vse analize in meritve smo opravili v eni ponovitvi, razen v primeru validacije analitskih metod, kjer smo vsakemu vzorcu določili posamezno vrednost v sedmih ponovitvah.

3.2.1 DOLOČANJE VLAGE V ZRAČNO SUHEM HMELJU (Analytica – EBC 7.2, 1997)

Reagenti in pribor:

- sušilno sredstvo, Silica gel
- oštevilčena sušilna posoda iz aluminija s pokrovom premera 9 cm in višine 4 cm
- sušilnik s samodejnim nadzorom za vzdrževanje temperature
- eksikator s perforirano ploščo
- analitska tehtnica s točnostjo $\pm 0,0005$ g, Mettler

Postopek:

V suho, stehtano sušilno posodico (m_0) smo prenesli od 3 do 5 g hmeljnih storžkov ali zmletih hmeljnih briketov in oboje stehtali (m_1). Nato smo posodico odprli in jo prenesli v sušilnik, ki smo ga predhodno ogreli na od 103 – 104 °C. Vzorec smo sušili eno uro od trenutka, ko je sušilnik ponovno dosegel predpisano temperaturo. Po eni uri sušenja smo posodico s hmeljem pokrili in jo prenesli v eksikator, kjer se je hmelj ohladil na sobno temperaturo. Nato smo vzorec ponovno stehtali (m_2).

$$\text{Izračun: } w [\%] \text{ vlage} = \frac{(m_1 - m_0) - (m_2 - m_0)}{m_1 - m_0} \times 100 = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (8)$$

m_0 masa sušilne posodice (g)

m_1 masa vzorca pred sušenjem + masa sušilne posodice (g)

m_2 masa vzorca po sušenju + masa sušilne posodice (g)

Natančnost metode:

Natančnost pri pogojih ponovljivosti je določena na osnovi treh serij meritev določevanja vlage v zračno suhem hmelju, vsaka serija ima po 10 ponovitev. Natančnost pri pogojih ponovljivosti (Analytica – EBC 7.2, 1997) je izražena s standardnim odklonom: $s = 0,1$ (IHPS, metoda MKH 02).

3.2.2 DOLOČANJE KONDUKTOMETRIČNE VREDNOSTI HMELJA (KVH-TE) (Analytica – EBC 7.4, 1997)

Reagenti in pribor:

Za pripravo raztopin smo uporabljali demineralizirano vodo, ki zadostuje pogojem po ISO 3696: 1998, III. razred. Zahtevana čistost uporabljenih kemikalij je p.a.

- žveplova (VI) kislina, H_2SO_4 , $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/L} \pm 0,1 \%$, titer = 1,000, Merck
- toluen, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, $\rho = 0,86 \text{ g/mL}$, $w \left[\frac{m}{m} \right]$, $S \leq 0,002 \%$, Fluka
- metanol, CH_3OH , $\rho = 0,79 \text{ g/mL}$, Fluka
- svinčev acetattrihidrat, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Pb} \times 3\text{H}_2\text{O}$, min 99,9%, Ridel de Haën
- očetna kislina, CH_3COOH , 99 – 100 %, Carlo Erba
- $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/L}$
- $c(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Pb} \times 3\text{H}_2\text{O}) = 20 \text{ g/L}$
- $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{CH}_3\text{OH} = 1 : 1$

- polnilne pipete – kalibrirane; 5 mL, 10 mL, 15 mL, 50 mL, Assistent
- merilna pipeta; 1 mL, Assistent
- merilna bučka; 1000 mL, Brand
- stekleničke z zamaškom; 150 mL
- filtrirni liji premera 100 mm, Assistent
- filtracijske čašice; 50 ml, Assistent
- filtrirni papir (črni trak), Albet, DP \varnothing 135, size 150 mm

- konduktometer 712 z dodatno opremo, MeThrom
- stresalnik
- precizna tehtnica s točnostjo $\pm 0,01 \text{ g}$, Sartorius

Postopek

Izvedba ekstrakcije:

V 150 mL stekleničko smo zatehtali 5 g zmletih hmeljnih storžkov ali hmeljnih briketov, s točnostjo $\pm 0,01 \text{ g}$. Natehtanemu vzorcu hmelja smo dodali 50 mL toluena ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$), stekleničko zaprli in jo v pokončnem položaju stresali pol ure na stresalniku. Po stresanju

smo vsebino iz stekleničke filtrirali skozi filtrirni papir (črni trak) v stekleno kiveto in jo po izvedeni filtraciji pokrili.

Standardizacija raztopine svinčevega acetata ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) s standardno raztopino žveplove (VI) kisline (H_2SO_4):

V 50 mL titracijske čašice smo odpipetirali 5 mL raztopine H_2SO_4 , $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/L}$ in dodali 40 mL metanola (CH_3OH). Raztopino svinčevega acetata smo dodajali do približno 1 mL preko ekvivalentne točke.

Dopustna razlika med tremi ponovitvami (med največjo in najmanjšo vrednostjo) za volumen (mL) v ekvivalentni točki dodanega svinčevega acetata za titracijo 5 mL H_2SO_4 , $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/L}$ je 0,02 mL.

Konduktometrična titracija vzorca z raztopino svinčevega acetata ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$):

Konduktometrično titracijo vzorca smo izvedli najkasneje v eni uri po filtraciji, zaradi neobstoynosti alfa-kislin v organskih topilih in zaradi hlapnosti topila.

V ustrezno titracijsko čašico smo odpipetirali 10 mL filtrata (toluenskega ekstrakta), dodali 30 mL metanola (CH_3OH) in jo namestili na nosilec elektrode. Nosilec elektrode je moral biti med konduktometrično titracijo priključen na magnetni mešalnik, ki je mešal raztopino med dodajanjem raztopine svinčevega acetata. Dodajanje raztopine svinčevega acetata je potekalo približno 1 mL preko ekvivalentne točke ali dokler titracijska krivulja ni pričela enakomerno naraščati.

Krivulja prevodnosti v odvisnosti od volumna dodane raztopine svinčevega acetata je v začetku ravna linija, katere naklon se po ekvivalentni točki močno spremeni. Ekvivalentno točko določimo s pomočjo presečišča tangent na krivuljo pred spremembo naklona in po njej.

Med posameznimi merjenji smo spirali elektrodo z raztopino očetne kisline v metanolu.

$$\text{Izračun: KVH-TE v \% } \left[\frac{m}{m} \right] = \frac{M_{\text{alfa-kislin}} \cdot V_{\text{ekstr.}} \cdot c_{\%(m/V)} \cdot V_{pv}}{M_{\text{PbAc}} \cdot m_v \cdot a} = \frac{358 \cdot 50 \cdot 9,485 \cdot t \cdot V_{pv}}{379,4 \cdot 5 \cdot a} =$$

$$= \frac{89,5 \cdot V_{pv} \cdot t}{V_{ps} \cdot a} \quad (9)$$

$$c(\text{PbCH}_3(\text{COO})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}) = \frac{V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot \bar{c}_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot t \cdot M_{\text{PbAc}}}{V_{ps}} = \frac{5 \cdot 0,05 \cdot t \cdot 379,4}{V_{ps}} = \frac{94,85 \cdot t}{V_{ps}}$$

$$c_{\%(m/V)} = \frac{9,485 \cdot t}{V_{ps}} \quad (10)$$

KVH-TE konduktometrična vrednost hmelja s toluensko ekstrakcijo v % $\left[\frac{m}{m} \right]$

V_{pv} volumen (mL) dodane raztopine svinčevega acetata v ekvivalentni točki za titracijo vzorčne raztopine

V_{ps} volumen (mL) dodane raztopine svinčevega acetata v ekvivalentni točki za titracijo 5 mL H_2SO_4 , $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/L (standardizacija PbAc z raztopino H_2SO_4 točne koncentracije)

a volumen (mL) toluenskega ekstrakta (filtrata)

$V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ volumen žveplave (VI) kisline, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/L, (5 mL)

$\bar{c}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ koncentracija žveplave (VI) kisline, (0,05 mol/L)

t titer raztopine žveplave (VI) kisline, (vrednost iz certifikata)

$M_{\text{alfa-kislin}}$ povprečna vrednost molskih mas alfa-kislin, (358 g/mol)

$V_{\text{ekstr.}}$ volumen ekstrakcijskega sredstva (toluena), (50 mL)

M_{PbAc} molska masa $\text{PbCH}_3(\text{COO})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$, (379,4 g/mol)

m_v masa vzorca, (5 g)

Natančnost metode

Natančnost metode pri pogojih ponovljivosti:

Natančnost pri pogojih ponovljivosti je določena na osnovi štirih serij meritev določevanja KVH-TE, v vsaki seriji je opravljeno deset ponovitev. Vzorci za meritve so izbrani tako, da zajemajo vrednost % KVH-TE celotnega delovnega območja. Natančnost pri pogojih ponovljivosti je izražena s standardnim odklonom, $s = 0,12$ (IHPS, metoda MKH 06).

Natančnost metode pri pogojih obnovljivosti:

Obnovljivost metode je izračunana na osnovi rezultatov meritev mednarodne medlaboratorijske primerjave v shemi LBP HÜLL, izvedene septembra 2001. Rezultati meritev so podani v preglednici 4 (IHPS, metoda MKH 06).

Preglednica 4: Določanje konduktometrične vrednosti hmelja (KVH-TE), natančnost metode pri pogojih obnovljivosti, rezultati meritev mednarodne laboratorijske primerjave (IHPS, metoda MKH 06)

srednja vrednost KVH-TE (%)	št. sodelujočih laboratorijev	s - standardni odklon meritev med laboratoriji
8,54	9	0,31
10,31	9	0,29
14,96	9	0,36
5,42	9	0,44

3.2.3 DOLOČANJE ALFA- IN BETA-KISLIN (Analytica – EBC 7.7, 1997) IN KSANTOHUMOLA (Modificirana metoda Analytica – EBC 7.7, 1997) S HPLC

Reagenti in pribor:

Za pripravo raztopin smo uporabljali demineralizirano vodo, ki zadostuje pogojem po ISO 3696: 1998, III. razred. Zahtevana čistost uporabljenih kemikalij je p.a.

- metanol, CH_3OH , $\rho = 0,79$ g/mL, Fluka
- dietileter, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, z največ 0,2 % vode, brez sledov peroksida, Ridel de Haën
- klorovodikova kislina, HCl, 36 – 38 %, $\rho = 1,18$ g/mL, Carlo Erba
- fosforna kislina, H_3PO_4 , 85 %, $\rho = 1,71$ g/mL, J. T. Baker
- standardni hmeljni ekstrakt (ICE 2), LaborVeritas, Engimattstrasse 11, CH-8059 Zurich 2, Schweiz
- standard ksantohumola (90 % čistost), Hopsteiner, Simon H. Steiner, GmbH, Mainburg, Nemčija
- $c(\text{HCl}) = 0,1$ mol/L

- mobilna faza (metanol : voda : fosforna kislina = 85 : 21 : 0,5)
- zmes metanola in vode (1 : 1)

- stekleničke z zamaški; 150 mL
- merilni valj; 5 mL, 100 mL, 1000 mL, Brand
- membranski filter; 0,2 μm , $\Phi = 50$ mm
- steklenica za mobilno fazo; 1000 mL, Brand
- erlenmajerica za mobilno fazo; 500 mL, Brand
- merilne bučke; 50 mL, 1000 mL, Brand
- merilna pipeta; 10 mL, Assistant
- polnilne pipete; 5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL, Assistant
- steklena čaša; 50 mL, Brand
- filter papir črni trak, ALBET, DP $\varnothing 135$, size 150 mm
- siringa; 100 μL
- vijala s teflonskim zamaškom; 2 mL
- epruveta; ~ 10 mL

- kavni mlinček, Bosch
- stresalnik
- ultrazvočna kopel, Sonis
- sistem za vakumsko filtracijo
- precizna tehtnica s točnostjo $\pm 0,01$ g, Sartorius
- HPLC sistem, HP 1050[®] z UV-VIS detektorjem
- HPLC analitska kolona, 250 mm \times 4 mm, polnjena s 5 μ ODS RP18; npr. NUCLEOSIL 5 C18, Machery and Nagel, Düren, No. 720014 "Hop analysis"
- injekcijska zanka; 10 μL
- Integrator HP 3396A

Postopek

Standardni hmeljni ekstrakt (ICE 2):

Visoko viskozni ICE 2, temperiran na sobno temperaturo, smo shomogenizirali in zatehtali okoli 0,5 g ekstrakta s točnostjo $\pm 0,001$ g v 2 mL vijalo. Vijalo z zatehtanim ekstraktom smo položili v 50 mL čašo (pred tem smo zunanje stene očistili z metanolom), dodali približno 20 mL metanola in ekstrakt raztopili v ultrazvočni kopeli Sonis. Nato smo raztopino kvantitativno prelili v 50 mL merilno bučko, dopolnili z metanolom do oznake in dobro premešali. Tako pripravljeno osnovno standardno raztopino smo hranili v hladilniku.

Razredčeno standardno raztopino za analizo smo vedno pripravljali iz osnovne standardne raztopine. S 5 mL polnilno pipeto smo odpipetirali osnovno standardno raztopino v 50 mL merilno bučko, dopolnili z metanolom in dobro premešali. Tako pripravljeno razredčeno standardno raztopino smo injicirali v HPLC sistem. Raztopina je stabilna 24 ur v hladilniku.

Standard ksantohumola:

Tekoči standard ksantohumola smo pripravljali iz osnovnega standarda (bel prašek). Metanolno raztopino le-tega (30,1 g/50 mL) smo hranili v hladilniku.

Razredčeno standardno raztopino za analizo smo vedno pripravljali iz osnovne standardne raztopine. S 5 mL polnilno pipeto smo odpipetirali osnovno standardno raztopino v 50 mL merilno bučko, dopolnili z metanolom in dobro premešali. Tako pripravljeno razredčeno standardno raztopino smo injicirali v HPLC sistem. Raztopina je stabilna 3 dni v hladilniku.

Hmelj in hmeljni briketi:

Zatehtali smo 5 g zmletega hmelja s točnostjo $\pm 0,01$ g v 150 mL stekleničko. Z dilutorjem smo dodali 10 mL metanola, s polnilno pipeto 50 mL dietiletra, stekleničko zaprli in jo v pokončnem položaju stresali na stresalniku 30 min. Po tem času smo s polnilno pipeto dodali 20 mL raztopine HCl, $c(\text{HCl}) = 0,1$ mol/L in stresali dodatnih 15 min. Po koncu stresanja smo počakali nekaj minut da sta se ločili etrna in metanolna faza in nato z merilno pipeto odpipetirali 5 mL etrne faze v 50 mL bučko, dopolnili z metanolom do oznake in dobro premešali. Nato smo v epruveto (~10 mL) skozi filter papir črni trak prefiltrirali 5 do 10 mL raztopine in epruveto zaprli z zamaškom. Takoj potem smo injicirali v HPLC sistem.

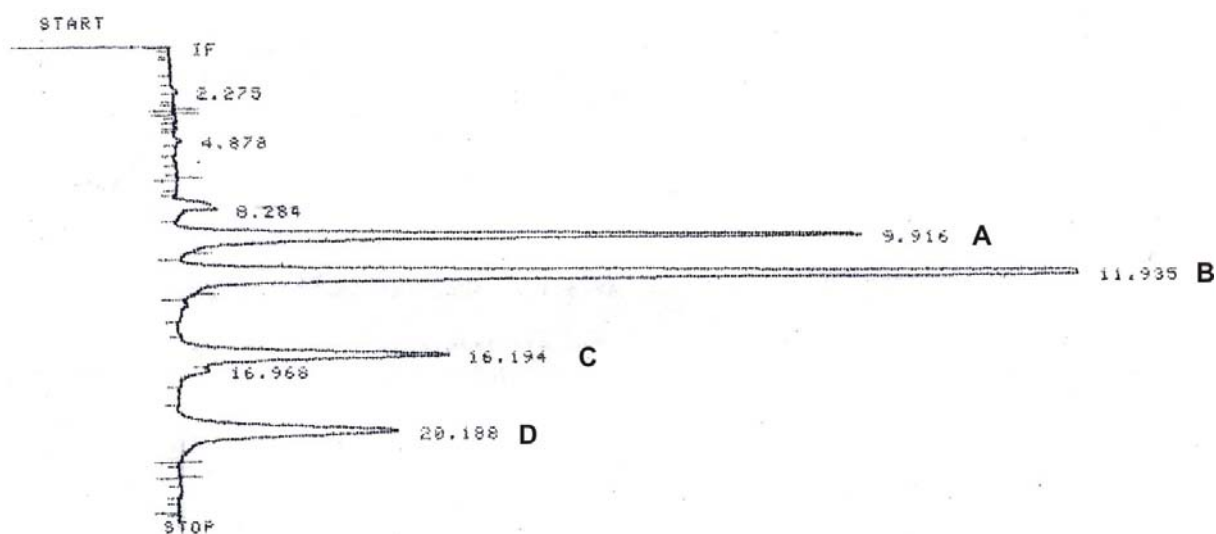
Kromatografska analiza:

V HPLC sistem smo vstavili analitsko kolono in 10 μ L injekcijsko zanko, ga vključili, razplinili mobilno fazo, postopno naravnali pretok na 1,0 mL/min, da je tlak dosegel okoli 200 barov in preverili celotni sistem na puščanje. Absorbicijo smo merili z UV detektorjem pri 314 nm za določanje alfa- in beta-kislin in pri 370 nm za določanje ksantohumola. Na integratorju smo nastavili sledeče parametre: ZERO 5, ATT 6, CHT SP 0.3, THRS 4 in PK WD 0.08. Pred injiciranjem vzorca smo spirali kolono z mobilno fazo najmanj 30 min. Po končanem delu smo celotni sistem dobro sprali z zmesjo vode in metanola (1 : 1).

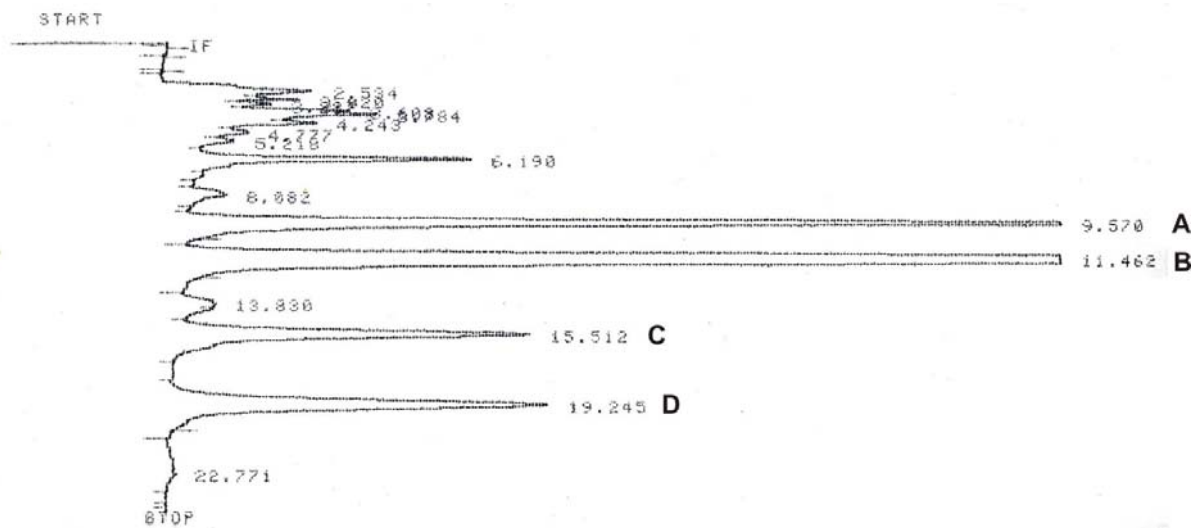
Vrednotenje kromatograma za alfa- in beta-kislino:

Slika 10 prikazuje kromatogram standardne raztopine (ICE 2), slika 11 pa kromatogram vzorčne raztopine alfa- in beta-kislin. Oznake vrhov pomenijo:

- A kohumulon, retencijski čas okoli 9,5 min,
- B n+adhumulon, retencijski čas okoli 11,5 min,
- C kolupulon, retencijski čas okoli 15,5 min,
- D n+adlupulon, retencijski čas okoli 19,0 min.



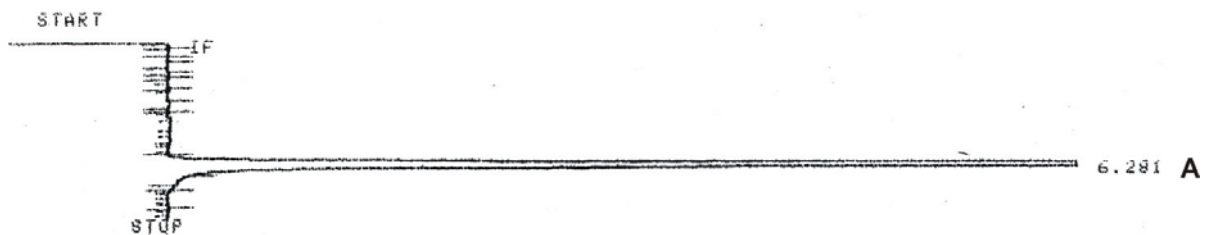
Slika 10: Kromatogram standardne raztopine (ICE 2)



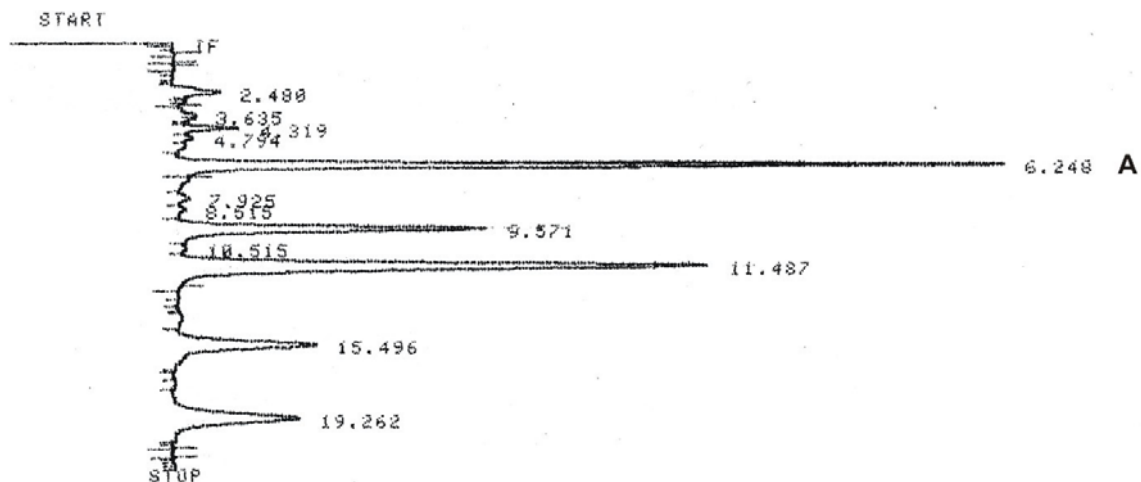
Slika 11: Kromatogram vzorčne raztopine alfa- in beta-kislin

Vrednotenje kromatograma za ksantohumul:

Slika 12 prikazuje kromatogram standardne raztopine ksantohumola, slika 13 pa kromatogram vzorčne raztopine ksantohumola. Kromatografski vrh ksantohumola (A) ima retencijski čas okoli 6,0 min.



Slika 12: Kromatogram standarda ksantohumola



Slika 13: Kromatogram vzorčne raztopine ksantohumola

Izračun za alfa- in beta-kislino:

Koncentracijo alfa- in beta-kislin ter njihovih frakcij: kohumulon (C_{koh}), nhumulon in adhumulon skupaj (C_{n+adh}), kolupulon (C_{kol}), nlupulon in adlupulon skupaj (C_{n+adl}) smo določili s pomočjo eksterne standarda (ICE 2) po sledečih formulah:

$$c_i = (m_s \times c_{is} \times A_{iv}) / (m_v \times A_{is}) \quad (11)$$

- c_i koncentracija komponente i izražena v utežnih % glede na zatehto vzorca
 m_s zatehta kalibracijskega ekstrakta v g
 c_{is} koncentracija komponente i v standardnem hmeljnem ekstraktu izražena v ut. %
 A_{iv} površina pika komponente i v vzorcu
 m_v zatehta vzorca
 A_{is} površina pika komponente i v kalibracijskem standardu (povprečje)

Vsebnost alfa-kislin izračunamo kot vsoto frakcij:

$$C_{\alpha} = C_{koh} + C_{n+adh} \quad (12)$$

Vsebnost beta-kislin izračunamo kot vsoto frakcij:

$$C_{\beta} = C_{kol} + C_{n+adl} \quad (13)$$

Delež kohumulona v alfa-kislinah izračunamo kot vsoto po enačbi:

$$X_{koh} = C_{koh} / (C_{koh} + C_{n+adh}) \quad (14)$$

Delež kolupulona v beta-kislinah izračunamo kot vsoto po enačbi:

$$X_{kol} = C_{kol} / (C_{kol} + C_{n+adl}) \quad (15)$$

Razmerje med alfa- in beta-kislinami izračunamo po enačbi:

$$R_1 = (C_{koh} + C_{n+adh}) / (C_{kol} + C_{n+adl}) \quad (16)$$

Izračun za ksantohumol:

Koncentracijo ksantohumola določimo s pomočjo eksterne standarda po sledeči formuli:

$$c_{ks} = (m_{ks} \times c_{ks} \times A_v) / (m_v \times A_{ks}) \quad (17)$$

c_{ks} koncentracija ksantohumola izražena v utežnih % glede na zatehto vzorca

m_{ks} zatehta kalibracijskega standarda v g

c_{kss} koncentracija ksantohumola v standardu izražena v ut. %

A_v površina vrha ksantohumola v vzorcu

m_v zatehta vzorca

A_{ks} površina vrha standarda

Razmerje med ksantohumolom in alfa-kislinami izračunamo po sledeči formuli:

$$R_2 = c_{ks} / c_{alfa} \quad (18)$$

3.2.4 DOLOČANJE INDEKSA STARANJA HMELJA (HSI) (American Society of Brewing Chemists, 1990)

Reagenti in pribor:

Za pripravo raztopin smo uporabljali demineralizirano vodo, ki zadostuje pogojem po ISO 3696: 1998, III. razred. Zahtevana čistost uporabljenih kemikalij je p.a.

- metanol, CH₃OH, $\rho = 0,79$ g/mL, Fluka
- toluen, C₆H₅CH₃, $\rho = 0,86$ g/mL, Fluka
- natrijev hidroksid, NaOH, Merck
- $c(\text{NaOH}) = 6$ mol/L
- alkalni metanol (1 mL 6M NaOH + metanol ad 500 mL)

- stekleničke z zamaškom; 150 mL
- dispencer (nastavljiv); območje 10 – 50 mL
- steklene kivete s pokrovčki; 100 mL
- polnilna pipeta; 1, 2, 5 mL, Assistent
- merilne bučke; 50, 100, 500 mL, Brand
- filter papir črni trak, ALBET, DP \varnothing 135, size 150 mm
- precizna tehtnica s točnostjo $\pm 0,01$ g, Sartorius
- kavni mlinček, Bosch
- stresalnik

- spektrofotometer, Hewlett Packard 8452 A ,diode array spektrofotometer
- kvarčne kivete

Postopek

Priprava toluenskega ekstrakta:

V 150 mL stekleničko smo zatehtali 2,50 g zmletega vzorca s točnostjo $\pm 0,01$ g, z dispenzerjem dodali 50 mL toluena in stresali 30 min na stresalniku. Po stresanju smo filtrirali skozi filter papir črni trak v stekleno kiveto in jo pokrili.

Raztopina A:

2,5 mL prefiltriranega ekstrakta smo s polnilno pipeto odpipetirali v merilno bučko (50 mL) in dopolnili z metanolom do oznake.

Raztopina B:

V 25 mL merilno bučko smo s polnilno pipeto odpipetirali 1 mL raztopine A in dopolnili z alkalnim metanolom do oznake. Absorbanco raztopine B je bilo potrebno izmeriti najkasneje v 5 min po pripravi.

Meritve:

Absorbance bi po navodilih morali meriti pri valovnih dolžinah 275 in 325 nm v kvarčni kiveti. Ker lahko na spektrofotometru HP 8452 A nastavimo samo sode valovne dolžine, smo v praksi nastavili 276 in 326 nm. Pred meritvijo vzorcev smo izmerili absorbanco slepega vzorca, ki je imel enak volumen raztopine A v raztopini B, kot je bilo to pri vzorcu. To vrednost je spektrofotometer obravnaval kot vrednost 0 (nič).

Izračun:

Indeks staranja hmelja izračunamo po enačbi:

$$HSI = A_{275} / A_{325} \quad (19)$$

HSI indeks staranja hmelja

A_{275} absorbanca raztopine B pri valovni dolžini 275 nm

A_{325} absorbanca raztopine B pri valovni dolžini 325 nm

3.2.5 VALIDACIJE ANALIZNIH METOD

Validirali smo metode:

- določanje alfa- in beta-kislin s HPLC (Analytica – EBC 7.7, 1997),
- določanje ksantohumola s HPLC (Modificirana metoda Analytica – EBC 7.7, 1997),
- določanje indeksa staranja (HSI) (American Society of Brewing Chemists, 1990).

Metodi določanja alfa- in beta-kislin s HPLC, metodi določanja ksantohumola s HPLC in metodi določanja indeksa HSI smo določili natančnost. Natančnost smo vrednotili z Diksonovim Q-testom, osnovnimi statističnimi parametri, F-testom in t-testom, kot so na voljo v okviru softvera Excel Microsoft.

Za prvi dve metodi smo določili še linearnost in točnost.

3.2.6 KEMOMETRIČNA ANALIZA

Rezultate o vplivu sorte in rastišča na vsebnost ksantohumola smo kemometrično obdelali s programsko opremo:

- Teach Me, (1999),
- Scan, (1995).

Uporabili smo metode:

- glavnih osi (PCA),
- analize grup (CA).

4 REZULTATI

4.1 Validacija metode določanja alfa- in beta-kislin in metode določanja ksantohumola s HPLC

Natančnost

Naključno izbran vzorec smo v HPLC sistem injicirali v sedmih ponovitvah prvi dan (ponovljivost 1) in v sedmih ponovitvah drugi dan (ponovljivost 2). Obnovljivost je rezultat povprečja rezultatov iz prvega in drugega dne in standardnega odklona iz prvega in drugega dne. Deleže kohumulona, n+adhumulona, kolupulona, n+adlupulona in ksantohumola smo obdelali z osnovnimi statističnimi testi kot kaže preglednica 5. Vse vrednosti deležev so izračunane na suho snov.

Preglednica 5: Rezultati statističnih testov za validacijo metode določanja alfa- in beta-kislin in metode določanja ksantohumola

frakcija	Q-test	n	\bar{x} (%)	s	$F_{izrač}$	F_{tab}	$t_{izrač}$	t_{tab}
kohumulon pon 1	ni	7	0,856	0,013	1,24	4,99	5,26	2,18
kohumulon pon 2	ni	7	0,817	0,015				
kohumulon obn	/	14	0,837	0,014	/	/	/	/
n+adhumulon pon 1	ni	7	1,987	0,035	1,96	4,99	2,11	2,18
n+adhumulon pon 2	ni	7	1,953	0,025				
n+adhumulon obn	/	14	1,970	0,030	/	/	/	/
kolupulon pon 1	1	6	0,930	0,013	2,39	5,69	5,01	2,20
kolupulon pon 2	ni	7	0,883	0,020				
kolupulon obn	/	13	0,906	0,017	/	/	/	/
n+adlupulon pon 1	ni	7	1,014	0,015	1,7	4,99	3,68	2,18
n+adlupulon pon 2	ni	7	0,980	0,019				
n+adlupulon obn	/	14	0,997	0,017	/	/	/	/
ksantohumulon pon 1	ni	7	0,250	0,008	16,4	4,99	3,97	2,36
ksantohumulon pon 2	ni	7	0,237	0,002				
ksantohumulon obn	/	14	0,244	0,005	/	/	/	/

Legenda: Q-test – Diksonov Q-test, n – število meritev, \bar{x} – povprečje, s – standardni odklon, $F_{izrač}$ – F izračunani, F_{tab} – F tabelarni, t_{izr} – t izračunani, t_{tab} – t tabelarni, pon 1 – ponovljivost iz prvega dne, pon 2 – ponovljivost iz drugega dne, obn – obnovljivost

V preglednici 5 so prikazani rezultati validacije metode določanja alfa- in beta-kislin in metode določanja ksantohumola. Q-test, ki smo ga uporabili za iskanje osamelcev, je določil iz serije sedmih meritev vsake frakcije v dveh dneh enega osamelca iz frakcije kolupulon iz prvega dne (ponovljivost 1). Izračunane vrednosti F-testa so vse manjše od tabelarnih vrednosti F-testa, razen v primeru ksantohumola, pri katerem je bila izračunana vrednost nekaj več kot trikrat večja od tabelarne vrednosti. Izračunane vrednosti t-testa so v vseh

primerih večje od tabelarnih vrednosti, razen v primeru n+adhumulona, kjer je izračunana vrednost manjša od tabelarne.

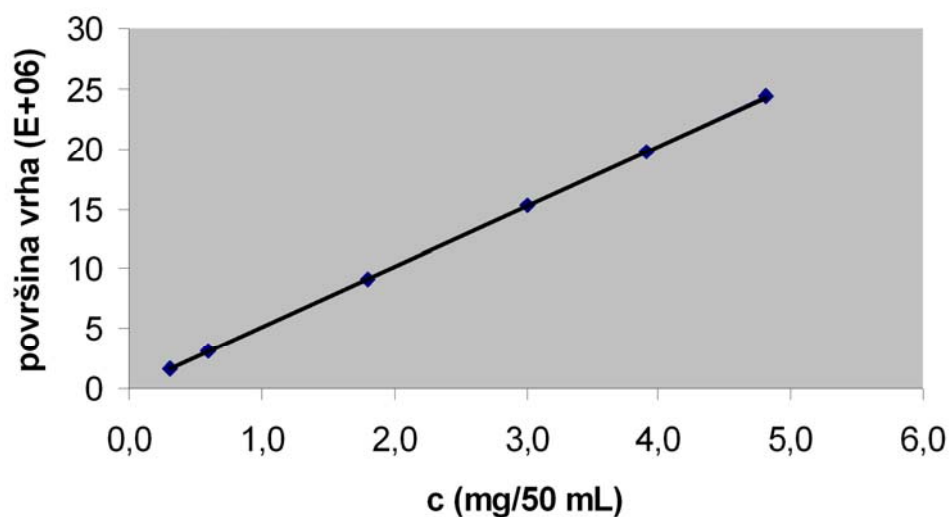
Linearnost in točnost (pravilnost)

Merjenje površine kromatografskih vrhov na različnih koncentracijskih nivojih za standardno raztopino hmeljnega ekstrakta (ICE 2) in za standardno raztopino ksantohumola je izvedeno za pripravo umeritvene krivulje, določitve enačbe umeritvene krivulje, korelacijskega koeficienta R^2 in posredno tudi za določitev linearnega območja metode.

Pravilnost smo določili na način dodajanja znane količine merjene komponente v matrično raztopino in hkratnega merjenja pripadajočih signalov.

standardni ekstrakt ksantohumola:

- enačba umeritvene krivulje $y = 5,02115 \cdot 10^6 x + 110299$ (slika 14)
- korelacijski koeficient R^2 0,999
- pravilnost 102,4 %



Slika 14: Umeritvena krivulja za ksantohumol*

* Rezultati so zaradi lažje sledljivosti podani s smiselno zmanjšanim številom mest

kohumulon:

- enačba umeritvene krivulje $y = 1,26375 \cdot 10^6 x + 23894,4$ (slika 15)
- korelacijski koeficient R^2 0,999
- pravilnost 100,60 %

n+adhumulon:

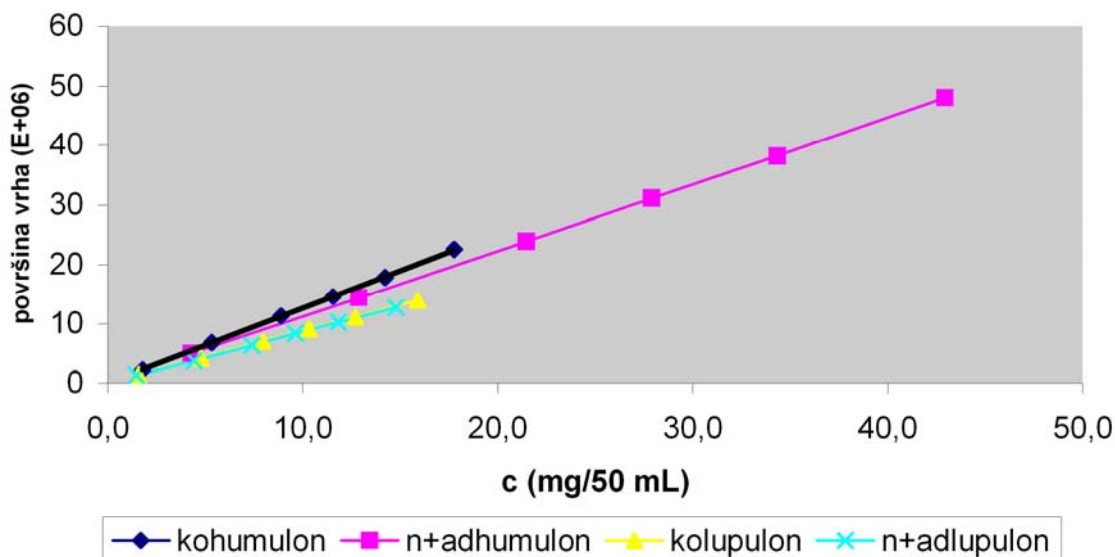
- enačba umeritvene krivulje $y = 1,11391 \cdot 10^6 x + 86725,5$ (slika 15)
- korelacijski koeficient R^2 0,999
- pravilnost 99,87%

kolupulon:

- enačba umeritvene krivulje $y = 876767,6 x + 25415,7$ (slika 15)
- korelacijski koeficient R^2 0,999
- pravilnost 103,26 %

n+adlupulon:

- enačba umeritvene krivulje $y = 860922,3 x + 3828,8$ (slika 15)
- korelacijski koeficient R^2 0,999
- pravilnost 101,07 %



Slika 15: Umeritvene krivulje za frakcije alfa- in beta-kislin*

* Rezultati so zaradi lažje sledljivosti podani s smiselno zmanjšanim številom mest

4.2 Validacija metode določanja indeksa staranja hmelja (HSI)

Natančnost

Naključno izbranemu vzorcu smo v sedmih ponovitvah izmerili absorbanci prvi dan (ponovljivost 1) in v sedmih ponovitvah drugi dan (ponovljivost 2). Obnovljivost je rezultat skupnega povprečja iz prvega in drugega dne in standardnega odklona iz prvega in drugega dne. V preglednici 6 so prikazani rezultati validacije metode HSI.

Preglednica 6: Rezultati statističnih testov za validacijo metode HSI

	Q-test	n	\bar{x}	s	$F_{\text{izrač}}$	F_{tab}	$t_{\text{izrač}}$	t_{tab}
HSI pon 1	ni	7	0,827	0,020	1,325	4,99	0,72	2,18
HSI pon 2	ni	7	0,834	0,017				
HSI obn	/	14	0,830	0,019	/	/	/	/

Legenda: Q-test – Diksonov Q-test, n – število meritev, \bar{x} – povprečje, s – standardni odklon, $F_{\text{izrač}}$ – F izračunani, F_{tab} – F tabelarni, t_{izr} – t izračunani, t_{tab} – t tabelarni, pon 1 – ponovljivost iz prvega dne, pon 2 – ponovljivost iz drugega dne, obn – obnovljivost

Diksonov Q-test ni določil osamelcev. V obeh statističnih testih je izračunana vrednost manjša od tabelarne.

4.3 Vsebnost alfa- in beta-kislin, ksantohumola in HSI za vzorce sort Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding in Magnum

Vsi rezultati so preračunani glede na suho snov.

Preglednica 7: Pregled parametrov za sorto Aurora

vzorec	koh (%)	n+adh (%)	alfa (%)	kol (%)	n+adl (%)	beta (%)	ksan (%)	KVH (%)	HSI	koh/alfa (%)	kol/beta (%)	alfa/beta	ksan/alfa (g/g)
V Žalec = 1	1,50	5,28	6,78	1,63	1,60	3,23	0,31	6,48	0,74	22,14	50,47	2,10	0,045
Koroška = 2	1,92	6,79	8,71	1,93	1,96	3,88	0,42	7,85	0,65	22,05	49,65	2,24	0,048
Z Žalec = 3	1,80	6,18	7,98	1,71	1,58	3,29	0,44	7,87	0,63	22,59	52,01	2,42	0,056
Ptuj = 4	1,47	4,85	6,32	1,32	1,37	2,69	0,34	5,39	0,60	23,24	49,17	2,35	0,054
Ptuj = 5	1,36	4,75	6,11	1,49	1,54	3,03	0,33	5,78	0,59	22,27	49,24	2,02	0,053
V Žalec = 6	1,77	6,28	8,05	1,65	1,62	3,27	0,42	7,78	0,70	21,99	50,49	2,46	0,053
Koroška = 7	1,86	6,75	8,61	1,98	2,01	3,98	0,41	8,20	0,57	21,59	49,63	2,16	0,048
\bar{x}	1,67	5,84	7,51	1,67	1,67	3,34	0,38	7,05	0,64	22,27	50,10	2,25	0,051
min	1,36	4,75	6,11	1,32	1,37	2,69	0,31	5,39	0,57	21,59	49,17	2,02	0,045
max	1,92	6,79	8,71	1,98	2,01	3,98	0,44	8,20	0,74	23,24	52,01	2,46	0,056
s	0,22	0,87	1,09	0,23	0,23	0,46	0,06	1,14	0,06	0,52	1,00	0,17	0,004
RSD	1,50	5,28	6,78	1,63	1,60	3,23	0,31	6,48	0,74	22,14	50,47	2,10	7,57
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

Legenda: koh – kohumulon, n+adh – n+adhumulon, alfa – alfa-kislina, kol – kolupulon, n+adl – n+adlupulon, beta – beta-kislina, ksan – ksantohumul, KVH-TE – konduktometrična vrednost hmelja, HSI – indeks staranja hmelja, koh/alfa – razmerje kohumulon/alfa-kislina, kol/beta – razmerje kolupulon/beta-kislina, alfa/beta – razmerje alfa-kislina/beta-kislina, ksan/alfa – razmerje ksantohumul/alfa-kislina, \bar{x} – povprečje meritev, min – minimum, max – maksimum, s – standardni odklon, RSD – relativni standardni odklon, n – število vzorcev

Preglednica 8: Pregled parametrov za sorto Bobek

vzorec	koh (%)	n+adh (%)	alfa (%)	kol (%)	n+adl (%)	beta (%)	ksan (%)	KVH (%)	HSI	koh/alfa (%)	kol/beta (%)	alfa/beta	ksan/alfa (g/g)
V Žalec = 8	0,82	2,28	3,10	1,39	1,34	2,73	0,26	2,58	0,98	26,51	50,90	1,13	0,082
V Žalec = 9	1,15	2,94	4,09	2,03	2,22	4,25	0,39	3,69	0,89	28,10	47,77	0,96	0,094
Z Žalec = 10	0,76	1,93	2,69	1,69	2,02	3,71	0,28	2,60	0,71	28,17	45,53	0,72	0,104
Ptuj = 11	1,09	3,07	4,16	1,67	2,02	3,69	0,31	4,35	0,90	26,16	45,32	1,13	0,075
V Žalec = 12	0,91	2,40	3,31	1,59	1,87	3,46	0,29	3,10	0,94	27,44	46,08	0,96	0,089
\bar{x}	0,95	2,52	3,47	1,68	1,89	3,57	0,31	3,26	0,88	27,28	47,12	0,98	0,089
min	0,76	1,93	2,69	1,39	1,34	2,73	0,26	2,58	0,71	26,16	45,32	0,72	0,075
max	1,15	3,07	4,16	2,03	2,22	4,25	0,39	4,35	0,98	28,17	50,90	1,13	0,104
s	0,17	0,47	0,64	0,23	0,33	0,55	0,05	0,76	0,10	0,91	2,32	0,17	0,011
RSD	17,82	18,73	18,36	13,77	17,57	15,39	16,29	23,15	11,72	3,35	4,93	16,98	12,26
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Preglednica 9: Pregled parametrov za sorto Celeia

vzorec	koh (%)	n+adh (%)	alfa (%)	kol (%)	n+adl (%)	beta (%)	ksan (%)	KVH (%)	HSI	koh/alfa (%)	kol/beta (%)	alfa/beta	ksan/alfa (g/g)
V Žalec = 23	0,68	2,00	2,68	1,44	1,15	2,59	0,16	2,73	1,05	25,46	55,51	1,03	0,060
V Žalec = 24	0,60	1,97	2,56	1,11	0,90	2,01	0,15	2,81	0,85	23,26	55,25	1,27	0,059
Koroška = 25	0,82	2,73	3,54	1,33	1,06	2,40	0,18	3,73	0,90	23,09	55,58	1,48	0,052
Z Žalec = 26	0,59	1,83	2,42	1,45	1,14	2,59	0,15	2,74	1,09	24,48	55,85	0,94	0,060
Z Žalec = 27	0,84	2,82	3,65	1,56	1,44	3,00	0,13	3,60	0,67	22,90	52,03	1,22	0,036
\bar{x}	0,71	2,27	2,97	1,38	1,14	2,52	0,15	3,12	0,91	23,84	54,85	1,19	0,053
min	0,59	1,83	2,42	1,11	0,90	2,01	0,13	2,73	0,67	22,90	52,03	0,94	0,036
max	0,84	2,82	3,65	1,56	1,44	3,00	0,18	3,73	1,09	25,46	55,85	1,48	0,060
s	0,12	0,47	0,58	0,17	0,20	0,36	0,02	0,50	0,17	1,10	1,59	0,21	0,010
RSD	16,65	20,56	19,54	12,26	17,08	14,18	12,18	16,02	18,45	4,61	2,90	17,89	19,26
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Legenda: koh – kohumulon, n+adh – n+adhumulon, alfa – alfa-kislina, kol – kolupulon, n+adl – n+adlupulon, beta – beta-kislina, ksan – ksantohumulol, KVH-TE – konduktometrična vrednost hmelja, HSI – indeks staranja hmelja, koh/alfa – razmerje kohumulon/alfa-kislina, kol/beta – razmerje kolupulon/beta-kislina, alfa/beta – razmerje alfa-kislina/beta-kislina, ksan/alfa – razmerje ksantohumulol/alfa-kislina, \bar{x} – povprečje meritev, min – minimum, max – maksimum, s – standardni odklon, RSD – relativni standardni odklon, n – število vzorcev

Preglednica 10: Pregled parametrov za sorto Savinjski golding

vzorec	koh (%)	n+adh (%)	alfa (%)	kol (%)	n+adl (%)	beta (%)	ksan (%)	KVH (%)	HSI	koh/alfa (%)	kol/beta (%)	alfa/beta	ksan/alfa (g/g)
Z Žalec = 13	0,77	1,71	2,47	0,90	0,98	1,88	0,23	2,51	0,79	30,99	47,89	1,31	0,092
Koroška = 14	1,09	2,68	3,76	1,11	1,22	2,33	0,25	3,69	0,61	28,85	47,54	1,62	0,067
Ptuj = 15	0,79	1,70	2,49	0,96	1,00	1,95	0,21	3,24	0,61	31,86	48,98	1,28	0,083
V Žalec = 16	0,79	1,83	2,62	0,79	0,84	1,63	0,21	2,75	0,74	30,27	48,69	1,61	0,079
Z Žalec = 17	0,90	2,11	3,00	0,97	1,07	2,04	0,26	3,10	0,74	29,81	47,61	1,47	0,087
\bar{x}	0,87	2,00	2,87	0,95	1,02	1,97	0,23	3,06	0,70	30,35	48,14	1,46	0,082
min	0,77	1,70	2,47	0,79	0,84	1,63	0,21	2,51	0,61	28,85	47,54	1,28	0,067
max	1,09	2,68	3,76	1,11	1,22	2,33	0,26	3,69	0,79	31,86	48,98	1,62	0,092
s	0,13	0,41	0,54	0,11	0,14	0,25	0,03	0,45	0,08	1,14	0,65	0,16	0,009
RSD	15,21	20,56	18,92	12,07	13,78	12,92	10,70	14,82	11,87	3,77	1,36	11,00	11,30
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Preglednica 11: Pregled parametrov za sorto Magnum

vzorec	koh (%)	n+adh (%)	alfa (%)	kol (%)	n+adl (%)	beta (%)	ksan (%)	KVH (%)	HSI	koh/alfa (%)	kol/beta (%)	alfa/beta	ksan/alfa (g/g)
Koroška = 18	2,47	6,33	8,81	2,47	2,79	5,26	0,38	7,57	0,63	28,08	46,95	1,68	0,043
Ptuj = 19	2,57	7,22	9,79	2,41	2,99	5,40	0,29	9,41	0,61	26,25	44,62	1,81	0,030
Z Žalec = 20	2,34	6,18	8,52	2,63	3,18	5,82	0,30	8,54	0,74	27,42	45,25	1,47	0,035
V Žalec = 21	2,61	7,33	9,94	2,02	2,43	4,45	0,31	9,64	0,83	26,27	45,44	2,24	0,031
V Žalec = 22	2,09	6,05	8,14	1,57	1,88	3,45	0,31	8,80	0,84	25,69	45,45	2,36	0,038
\bar{x}	2,42	6,62	9,04	2,22	2,65	4,87	0,32	8,79	0,73	26,74	45,54	1,91	0,035
min	2,09	6,05	8,14	1,57	1,88	3,45	0,29	7,57	0,61	25,69	44,62	1,47	0,030
max	2,61	7,33	9,94	2,63	3,18	5,82	0,38	9,64	0,84	28,08	46,95	2,36	0,043
s	0,21	0,60	0,79	0,43	0,51	0,94	0,04	0,82	0,11	0,98	0,86	0,38	0,005
RSD	8,70	9,12	8,75	19,24	19,37	19,22	11,40	9,28	14,79	3,66	1,88	19,72	15,32
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Legenda: koh – kohumulon, n+adh – n+adhumulon, alfa – alfa-kislina, kol – kolupulon, n+adl – n+adlupulon, beta – beta-kislina, ksan – ksantohumulol, KVH-TE – konduktometrična vrednost hmelja, HSI – indeks staranja hmelja, koh/alfa – razmerje kohumulon/alfa-kislina, kol/beta – razmerje kolupulon/beta-kislina, alfa/beta – razmerje alfa-kislina/beta-kislina, ksan/alfa – razmerje ksantohumulol/alfa-kislina, \bar{x} – povprečje meritev, min – minimum, max – maksimum, s – standardni odklon, RSD – relativni standardni odklon, n – število vzorcev

4.3.1 DELEŽ KSANTOHUMOLA (HPLC)

Iz slike 16 so razvidni deleži ksantohumola v suhem hmelju različnih sort hmelja glede na rastišče. Vzorci izvirajo iz štirih rastišč: vzhodni (V) Žalec, zahodni (Z) Žalec, Koroška in Ptuj. Pri sorti Bobek ni vzorcev s Koroške, medtem ko pri sorti Celeia ni vzorcev s Ptuja. Največji povprečni delež ksantohumola ima sorta Aurora (0,38 %), sledijo ji Magnum (0,32 %), Bobek (0,30 %) in Savinjski golding (0,23 %). Najmanjši povprečni delež med vsemi ima sorta Celeia (0,16 %).

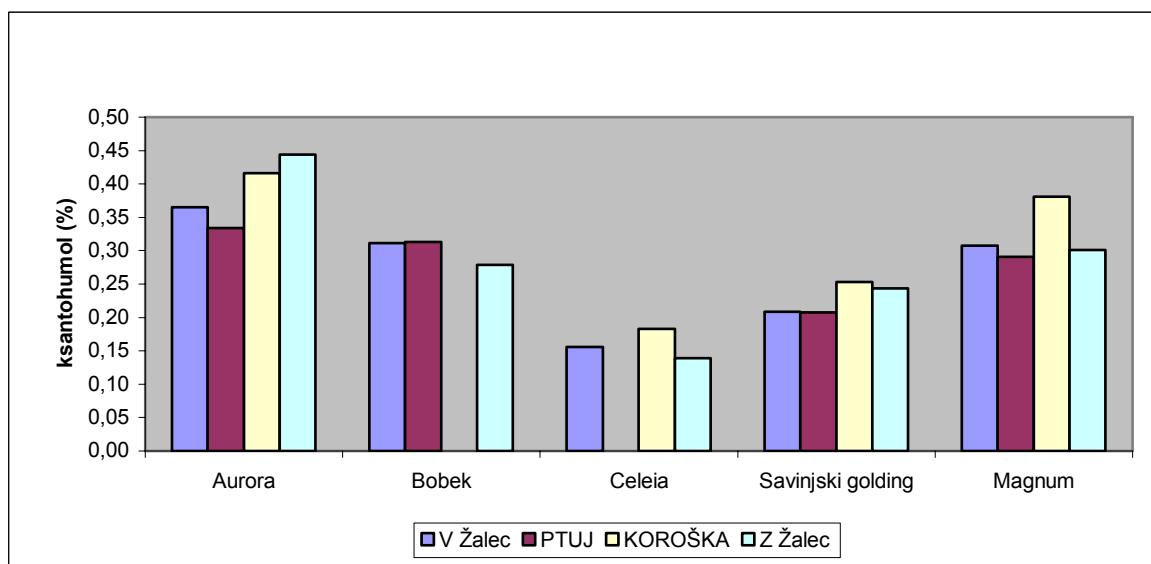
Pri sorti Aurora je delež ksantohumola največji pri vzorcih iz Z Žalca (0,44 %), sledita jima vzorca s Koroške (0,42%) in V Žalca (0,36 %), tem pa vzorec s Ptuja (0,34 %).

Za sorto Bobek je delež ksantohumola vzorcev iz V Žalca 0,31 %, enako za vzorec s Ptuja, delež ksantohumola za vzorec iz Z Žalca pa je 0,28 %.

Največji delež ksantohumola pri sorti Savinjski golding ima vzorec s Koroške (0,25 %), sledita mu vzorca iz Z Žalca (0,24 %), vzorec iz V Žalca in vzorec s Ptuja (oba po 0,21 %).

Največji delež ksantohumola pri sorti Magnum ima vzorec s Koroške (0,38 %), sledita mu vzorca iz V Žalca (0,31 %), vzorec iz Z Žalca (0,30 %) in vzorec s Ptuja (0,29 %).

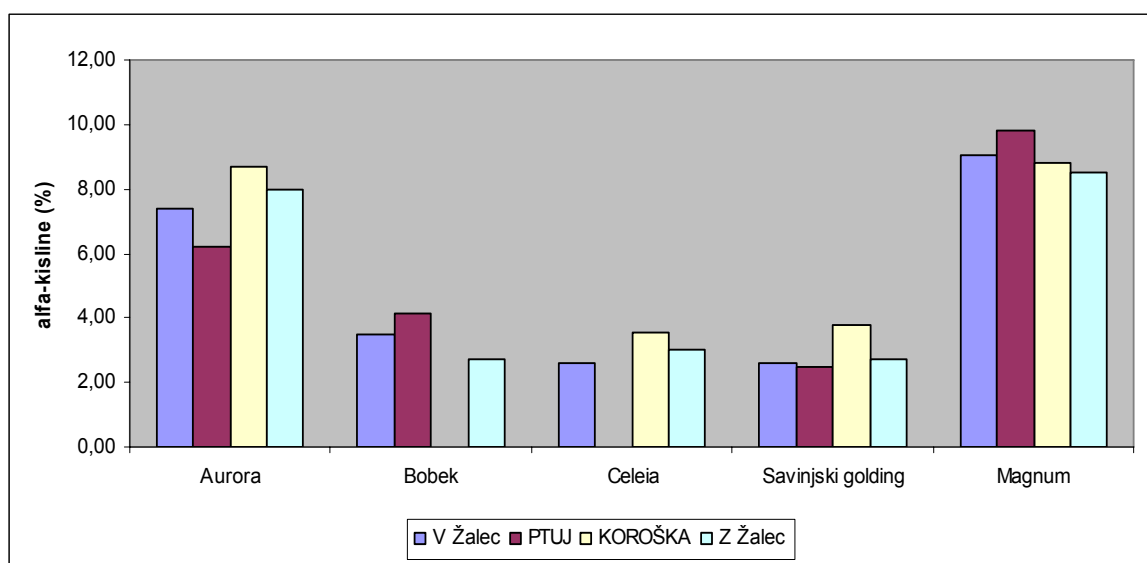
Delež ksantohumola pri sorti Celeia je največji pri vzorcu s Koroške (0,18 %), sledita mu vzorca iz V Žalca (0,16 %), tem pa vzorca iz Z Žalca (0,14 %).



Slika 16: Delež ksantohumola različnih sort hmelja glede na rastišče

4.3.2 DELEŽ ALFA-KISLIN (HPLC)

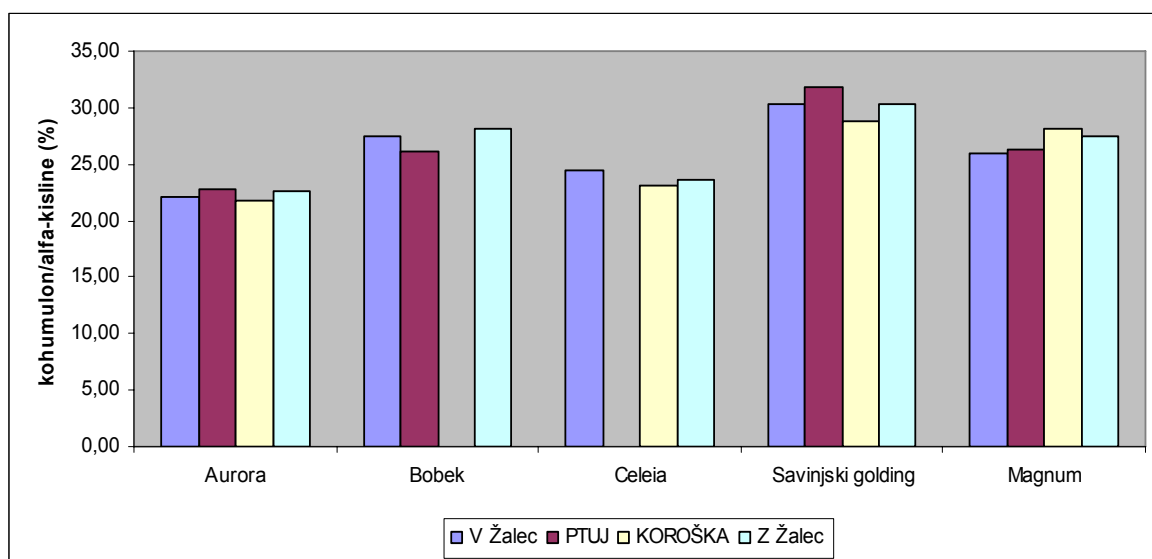
Slika 17 prikazuje delež alfa-kislin, kar je pomemben podatek v proizvodnji piva. Alfa-kislina so namreč primarna surovina pri izdelavi piva. Največji povprečni delež alfa-kislin ima sorta Magnum (9,04 %), sledijo ji Aurora (7,71 %), Bobek (3,47 %), Celeia (2,97 %) in Savinjski golding (2,87 %). Glede na rezultate lahko oblikujemo dve skupini. V prvi skupini sta Magnum in Aurora z največjima deležema alfa-kislin (grenčične sorte). Drugo skupino sestavljajo Bobek, Celeia, Savinjski golding (aromatične sorte). Vzorci s Koroške vsebujejo večinoma več alfa-kislin. Med vzorci, kjer so deleži alfa-kislin manjši, bi izpostavili rastišče Z Žalca, kjer je delež alfa-kislin najmanjši.



Slika 17: Delež alfa-kislin različnih sort hmelja glede na rastišče

4.3.3 RAZMERJE MED KOHUMULONOM IN ALFA-KISLINAMI (HPLC)

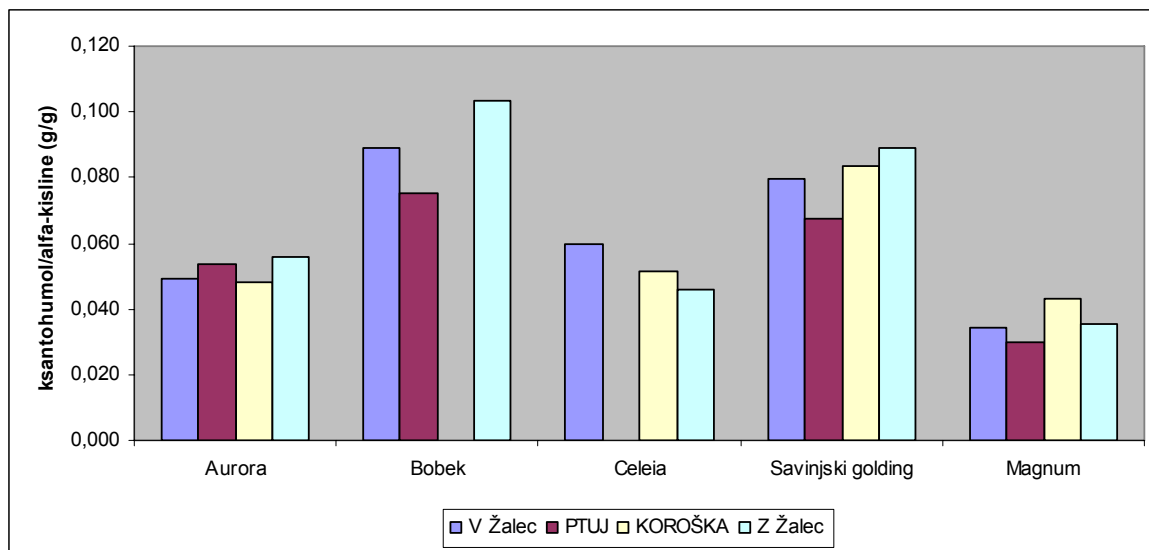
Slika 18 prikazuje delež kohumulona v alfa-kislinah različnih sort hmelja glede na rastišče. Večji ko je delež kohumulona, bolj groba oziroma nekvalitetna je grenčica, ki jo dajejo alfa-kislinae. Najbolj ugoden odstotek kohumulona v alfa-kislinah ima sorta Aurora (22,27 %), sledijo ji Celeia (23,84 %), Magnum (26,74 %), Bobek (27,28 %) in Savinjski golding (30,35 %). Pri Savinjskem goldingu je delež največji pri vzorcu s Ptuja. Glede na rezultate uvrstimo Savinjski golding v skupino z najmanj ugodnim deležem kohumulona v alfa-kislinah, v drugo skupino uvrstimo Bobek in Magnum, v skupino z najugodnejšim deležem pa uvrstimo sorti Aurora in Celeia.



Slika 18: Delež kohumulona v alfa-kislinah različnih sort hmelja glede na rastišče

4.3.4 RAZMERJE MED KSANTOHUMOLOM IN ALFA-KISLINAMI (HPLC)

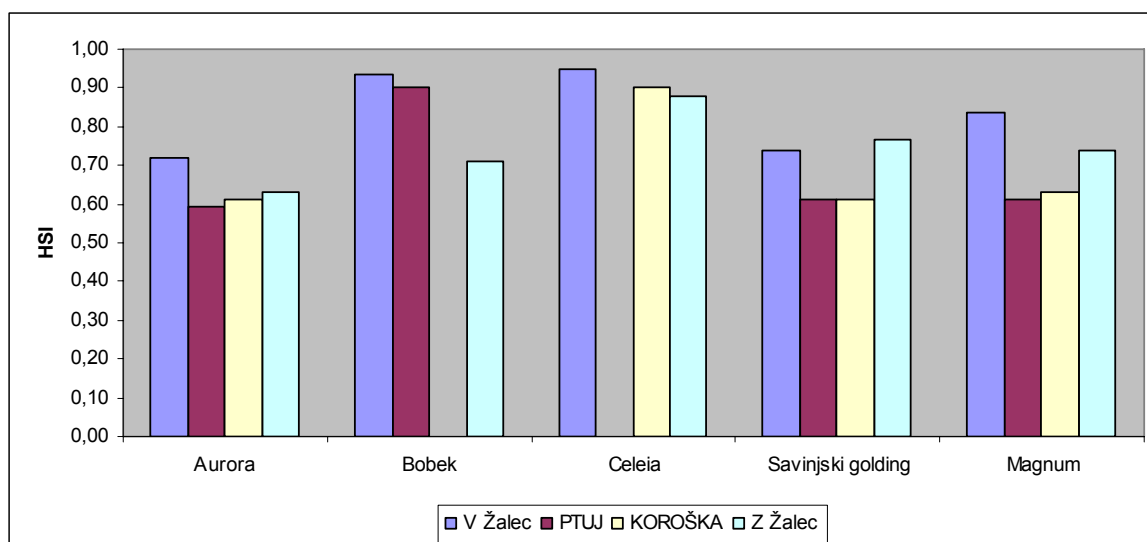
Razmerje med ksantohumolom in alfa-kislinami različnih sort hmelja glede na rastišče prikazuje slika 19. Omenjeno razmerje bi lahko v prihodnosti predstavljalo pomemben podatek pri izbiri sorte hmelja, s katerim bomo hmeljili sladico. Najbolj ugodno povprečno razmerje (0,089 g/g) ima sorta Bobek. Sledijo ji Savinjski golding (0,082 g/g), Celeia (0,053 g/g), Aurora (0,051 g/g) in Magnum z najmanjšim razmerjem (0,035 g/g).



Slika 19: Razmerje med ksantohumolom in alfa-kislinami različnih sort hmelja glede na rastišče

4.3.5 INDEKS STARANJA HMELJA (HSI)

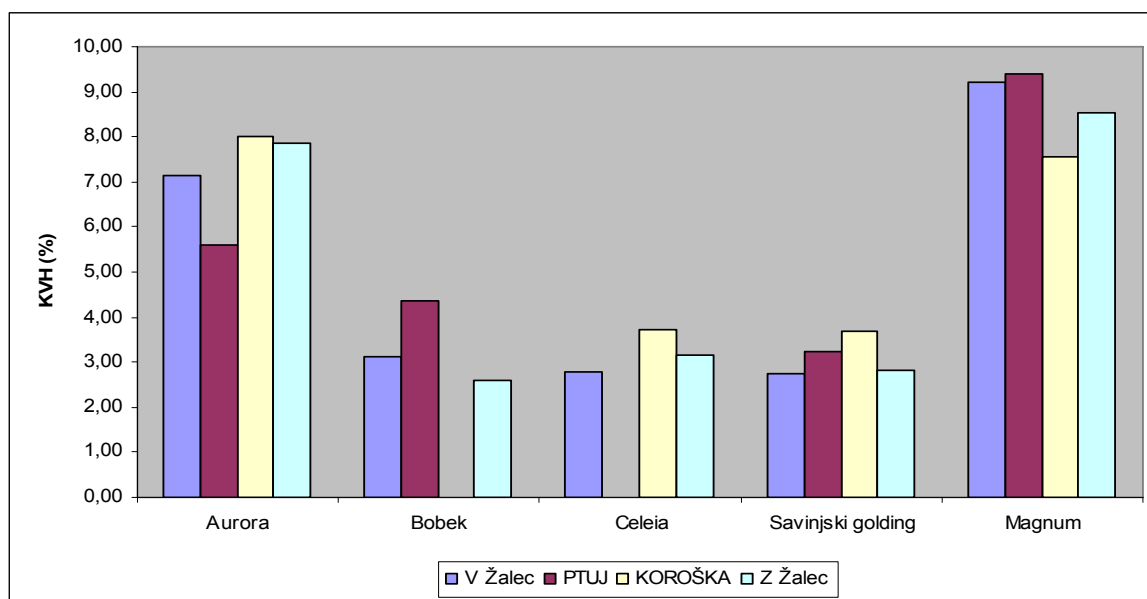
Slika 20 prikazuje vrednost HSI različnih sort hmelja glede na rastišče. Če gledamo povprečje ima najugodnejši indeks sorta Aurora (0,64), sledijo ji Savinjski golding (0,70), Magnum (0,73), Bobek (0,88) in Celeia z najmanj ugodnim indeksom (0,91). Skoraj v vseh primerih izstopajo vzorci iz V Žalca, ki imajo med vsemi vzorci znotraj sort največji indeks HSI. Prav tako so skoraj vse vrednosti vzorcev iz Z Žalca na drugem mestu z naslednjim najmanj ugodnim indeksom. Vzorcem s Ptuja (razen vzorcu sorte Bobek) se vrednost HSI malo spreminja (HSI okoli 0,60). Skoraj isto lahko rečemo za vzorce s Koroške (razen pri sorti Celeia). Vzorci iz V Žalca imajo največji indeks pri sorti Bobek, Savinjski golding in Aurora. Najmanjše indekse imajo vzorci s Ptuja in sicer pri sortah Bobek, Savinjski golding in Magnum.



Slika 20: Vrednost HSI različnih sort hmelja glede na rastišče

4.3.6 KONDUKTOMETRIČNA VREDNOST HMELJA (KVH-TE)

Slika 21 predstavlja vrednost KVH-TE različnih sort hmelja glede na rastišče. Največjo povprečno vrednost imajo vzorci sorte Magnum (8,79 %), sledijo ji vzorci sorte Aurora (7,05 %), Bobek (3,26 %), Celeia (3,12 %) in Savinjski golding (3,02 %). Vzorci sorte Magnum in Aurora (grenčične sorte) predstavljajo skupino z največjimi vrednostmi KVH-TE. Vzorci sorte Bobek, Celeia in Savinjski golding (aromatične sorte) predstavljajo drugo skupino z opazno manjšimi vrednostmi alfa-kislin.



Slika 21: Vrednost KVH-TE različnih sort hmelja glede na rastišče

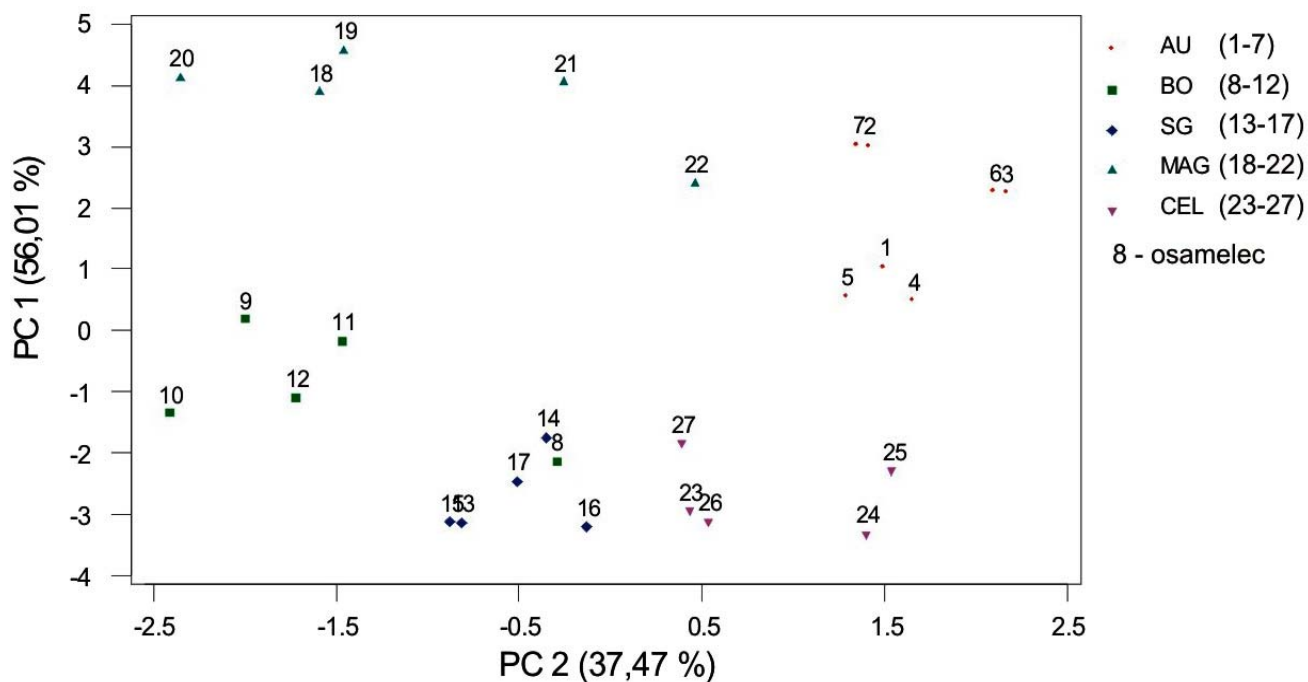
4.3.7 KEMOMETRIČNA ANALIZA

V obeh kemometričnih analizah predstavljamo 27 vzorcev petih sort (Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding in Magnum) iz štirih različnih rastišč (Koroška, Ptuj, V in Z Žalec). Vzorce od 1 do 7 predstavlja sorta Aurora, od 8 do 12 sorta Bobek, od 13 do 17 sorta Savinjski golding, od 18 do 22 Magnum in vzorce od 23 do 27 sorta Celeia. Vzorci so razvrščeni po sortah in rastiščih oziroma kot je navedeno v preglednicah od 7 do 11.

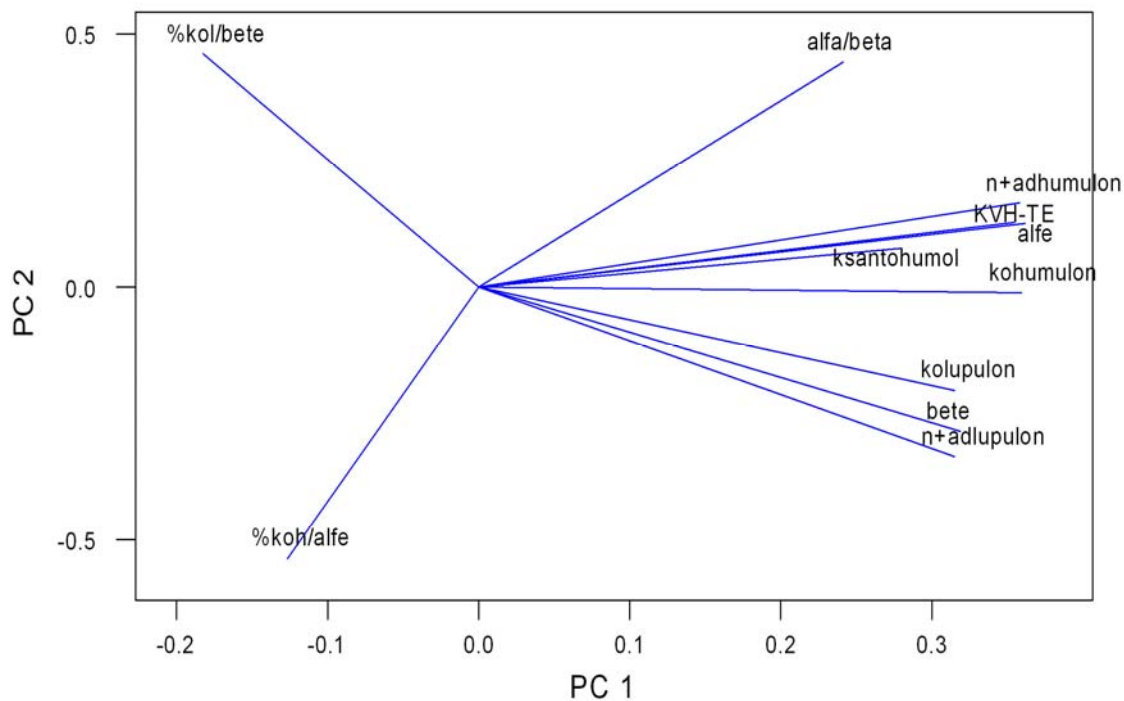
4.3.7.1 Metoda glavnih osi

Rezultati analiz so predstavljeni na osnovi vrednosti desetih spremenljivk (vse kot v preglednicah od 7 do 11, razen HSI in razmerja ksantohumol/alfa-kislina), ki karakterizirajo določeno sorto. Na sliki 22 je prikazana projekcija vzorcev hmelja v ravnini prvih dveh izračunanih glavnih osi PC1 in PC2 z metodo glavnih osi (PCA). Izračunane

vrednosti prvih treh glavnih osi PC1, PC2 in PC3 so 56,01 %, 37,47 % in 4,41 % variance. Slika 23 prikazuje medsebojno povezanost posameznih spremenljivk. Sliki 22 in 23 lahko primerjamo med seboj s tem, da položimo eno na drugo.



Slika 22: Projekcija vzorcev hmelja v ravnini definirani s prvima dvema glavnima osema PC1 in PC2, ki predstavljata 93,48 % variance

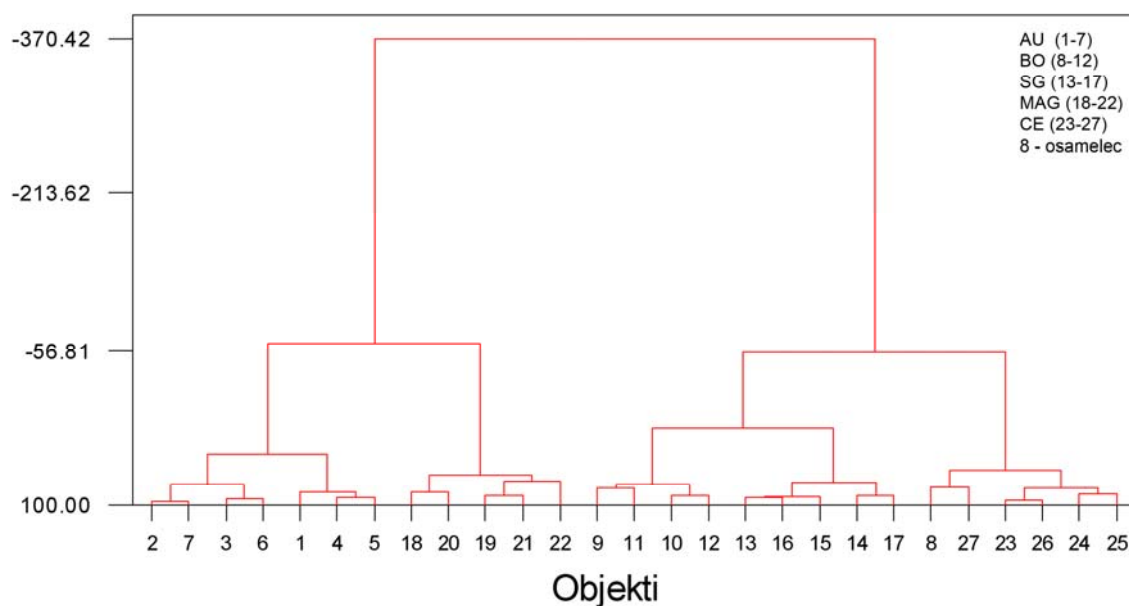


Slika 23: Prikaz pomembnosti posameznih spremenljivk na razporeditev vzorcev v ravnini definiranimi s prvima dvema glavnima osema PC1 in PC2, izračunanima z metodo PCA

4.3.7.2 Metoda analize grup

Pri hierarhičnem grupiranju smo pred kemometrično analizo poiskali primeren algoritem, ki je dal najboljše rezultate tvorjenja skupin vzorcev na osnovi njihove podobnosti. V ta namen smo preizkusili tehniko, ki za razvrščanje objektov v skupine uporablja algoritem na osnovi različnih razdalj. Najboljše rezultate je dala Wardova metoda na osnovi Manhhattanskih razdalj (Teach Me, 1999, Scan, 1995).

Podobnost



Slika 24: Dendrogram 27 vzorcev hmelja, izračunan na osnovi 11 spremenljivk

4.4 Rezultati primerjave vrednosti izmerjenih parametrov za suhe hmeljne storžke in za brikete tipa 90

Preglednica 12 prikazuje indeks vrednosti izmerjenih parametrov po briketiranju v primerjavi z vrednostmi izmerjenih parametrov pred briketiranjem.

Preglednica 12: Indeks ponovno določenih vrednosti parametrov po briketiranju

sorta	koh	n+adh	alfa	kol	n+adl	beta	ksan	KVH	HSI
Aurora	72,2	70,5	70,9	90,2	82,1	86,1	89,0	77,8	131,3
Bobek	112,4	93,4	98,2	128,8	174,1	148,1	203,5	91,3	126,6
Celeia	83,8	83,1	83,3	96,4	85,5	91,5	106,7	82,2	131,8
S. golding	104,5	127,7	120,6	138,1	120,2	129,1	113,2	118,2	130,5

Legenda: koh – kohumulon, n+adh – n+adhumulon, alfa – alfa-kislina, kol – kolupulon, n+adl – n+adlupulon, ksan – ksantohumul

5 RAZPRAVA

V poskus smo vključili 27 vzorcev hmelja (suhih hmeljnih storžkov), ki smo jim določevali vsebnost sekundarnih metabolitov z metodami HPLC, KVH-TE in HSI. Vsi rezultati so podani na suho snov. Glavni namen tega sklopa analiz je bila ugotovitev, ali sorta in rastišče vplivata na vsebnost ksantohumola in ali so metabolne poti za ksantohumol in alfa-kislino povezane. Tem analizam smo dodali še sklop analiz, kjer smo ugotavljali vpliv briketiranja na vsebnost ksantohumola v hmelju.

Validacija metod določanja alfa- in beta-kislin in določanja ksantohumola s HPLC

Validacija je nujen proces, ki potrjuje, da rezultati analize ustrezajo definiranim standardom kakovosti na predpisanem nivoju zaupanja. Še pred validiranjem smo s pomočjo Diksonovega Q-testa določil iz serije meritev enega osamelca pri določanju frakcije kolupulona (ponovljivost 1). Osamelca smo izločili iz omenjene serije meritev. Metodo HPLC smo vrednotili s pomočjo naslednjih parametrov: natančnost, linearnost in pravilnost. Natančnost določamo s pomočjo primerjave standardnega odklona (s). Za boljše interpretiranje primerjave standardnega odklona dveh dnevov (ponovljivost 1 in ponovljivost 2) smo si pomagali s F-testom. Rezultati kažejo, da so standardni odkloni iz obeh dnevov med seboj primerljivi, razen v primeru določanja ksantohumola. Vrednosti ksantohumola so pri vseh vzorcih zelo majhne (v našem primeru okoli 0,245 %), kar daje zelo majhne standardne odklone ($s_{\text{pon 1}} = 0,008$, $s_{\text{pon 2}} = 0,002$). Pri F-testu je števec zelo majhen, kar pomeni, da je $F_{\text{izrač}}$ nekajkrat večji od F_{tab} .

Za primerjavo povprečij obeh dnevov smo uporabili t-test. Na podlagi rezultatov F-testa smo izvedli enega od dveh možnih izračunov. Rezultati t-testa kažejo, da so vrednosti $t_{\text{izrač}}$ v vseh primerih, razen pri določanju frakcije n+ad humulon, večje od t_{tab} . V primeru t-testa to pomeni, da prihaja do signifikantnih razlik med povprečji dveh skupin meritev (razen v primeru n+adhumulon). Če primerjamo povprečne deleže vseh frakcij, vidimo, da ima prav n+adhumulon največji delež med vsemi.

Natančnost je odvisna od koncentracije analita (Bohanec, 1998) Iz obeh testov lahko povzamemo, da prihaja do signifikantnih razlik med standardnim odklonom in povprečjem obeh skupin meritev samo pri meritvah, ki imajo majhne vsebnosti določenih snovi. To

kaže, da sta F-test in t-test posebej občutljiva v primeru primerjanja razlik zelo majhnih vrednosti. Vrednosti pri določanju alfa- in beta-kislin ter ksantohumola so majhne. Opaznejše razlike med meritvami so verjetno posledica temperaturnih razlik med dnevnoma meritv. Temperatura pomembno vpliva na gibanje molekul in tako na rezultate HPLC meritev.

Linearnost je lastnost metode, da daje v določenem območju proporcionalne rezultate, ki so odvisni od koncentracije vzorca. V našem primeru smo pri določanju vseh frakcij v določenem območju dobili proporcionalne rezultate. Vrednost vseh korelacijskih koeficientov je bila večja od 0,99, kar interpretiramo, da sta metodi določanje alfa- in beta-kislin in določanje ksantohumola linearni.

Točnost analitske metode je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analitske metode dobimo pravilne rezultate. V našem primeru so vsi indeksi zelo blizu vrednosti 100 %. Kljub temu, da smo točnost določili samo z eno meritvijo, lahko na podlagi rezultatov, ki so med seboj primerljivi (vsi zelo blizu 100%), interpretiramo, da sta metodi določanja alfa- in beta-kislin in ksantohumola točni ali pravilni.

Validacija metode določanja HSI

Rezultati Diksonovega Q-testa kažejo, da ni osamelcev. Pri določanju natančnosti metode HSI se je na podlagi rezultatov F-testa in t-testa izkazalo, da sta standardna odklona obeh serij meritev primerljiva in prav tako sta primerljivi povprečji obeh serij meritev. Med obema serijama meritev ne prihaja niti pri standardnem odklonu, niti pri povprečju meritev do signifikantnih razlik, iz česar sklepamo, da je metoda natančna.

Rezultati analiz sekundarnih metabolitov vzorcev sort Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding in Magnum

Delež ksantohumola (HPLC)

Ksantohumol je edini polifenol iz hmelja, ki se nahaja v lupulinskih zrnih. V literaturi zasledimo podatke o deležu ksantohumola v hmeljnih storžkih tja do 1 % glede na suho snov (De Keukeleire in sod., 2003). Največji delež ksantohumola v vzorcih, ki jih zajema ta študija, ima sorta Aurora, najmanjšo vsebnost dosega sorta Celeia. Določili smo

povprečni delež ksantohumola: sorta Aurora dosega največji delež ksantohumola (0,38 %), sledijo ji sorte Magnum (0,32 %), Bobek (0,30 %), Savinjski golding (0,23 %) in Celeia (0,15 %). Podobne rezultate (preglednica 3) za sorto Celeia in Aurora je omenil tudi Biendl (2002). Pri naših vzorcih smo določili znatno manjše vrednosti le v primeru sort Savinjski golding in Bobek, kar lahko pripisujemo oksidaciji ksantohumola.

Glede na to, da pri sorti Bobek ni vzorcev s Koroške in pri sorti Celeia ni vzorcev s Ptuja, nismo mogli izračunati povprečja deležev pri posameznem rastišču, ker rezultati v tem primeru ne bi bili reprezentativni. Vseeno lahko na podlagi navidezne povprečnosti iz slike 16 določimo, da imajo vzorci s Koroške v primerjavi z drugimi rastišči največjo povprečno vrednost ksantohumola. Sledijo ji vzorci iz področja Z Žalca, V Žalca in na zadnjem mestu vzorci s Ptuja. Razlike med deleži ksantohumola glede na rastišče sicer obstajajo, vendar so te v primerjavi z razlikami med posameznimi sortami hmelja precej manjše. Do razlik med rastišč prihaja verjetno tudi zaradi različnih agrotehničnih ukrepov posameznih pridelovalcev, ki so zaradi manjšega števila vzorcev še bolj očitne. Do podobnih rezultatov je prišel tudi Biendl (2002), ki je prav tako omenjal majhen vpliv rastišča na delež ksantohumola in signifikanten vpliv sorte na delež ksantohumola v hmelju. Vpliv rastišča je opazen šele pri primerjavi vsebnosti ksantohumola pri naših vzorcih sorte Magnum (preglednica 11) in nemških vzorcev sorte Magnum (Biendl, 2002).

Delež alfa-kislin (HPLC)

Alfa-kislina so glavni sekundarni metabolit hmelja in hkrati glavni razlog, da je hmelj ena od primarnih surovin pri izdelavi piva. Največji delež alfa-kislin v sortah, ki rastejo v Sloveniji, vsebuje nemška visokogrenčična sorta Magnum (Hopfen aus Deutschland, 2002). Z istim primerom se srečamo v analizi naših 27 vzorcev. Tu ima sorta Magnum povprečni delež 9,04 % alfa-kislin glede na suho snov. Sorti Magnum sledijo sorta Aurora s 7,51 %, Bobek s 3,47 %, Celeia z 2,97 % in Savinjski golding z 2,87 % alfa-kislin. Deleži alfa-kislin vseh sort so v primerjavi z deleži, ki jih navaja Hmeljna komisija Slovenije in Hopfen aus Deutschland (2002) znatno manjši, kar lahko pripisujemo oksidaciji alfa-kislin v času od novembra 2005 do analiz, ki so bile opravljene v mesecu maju 2006. Do podobnih rezultatov je prišel tudi Verzele (1985). Vzorci s Koroške vsebujejo v povprečju največ alfa-kislin, sledijo vzorci s Ptuja, V Žalca in Z Žalca. Če primerjamo rastišča, prihaja do manjših razlik v vsebnosti alfa-kislin. Razlike v deležu alfa-kislin pa so

signifikantne, če med seboj primerjamo posamezne sorte (grenčične sorte v primerjavi z aromatičnimi).

Delež kohumulona v alfa-kislinah

Kohumulon je za pivovarja nezaželeni delež alfa-kislin, zato ga mora biti čim manj. Najmanjši delež kohumulona v alfa-kislinah izmed petih analiziranih sort ima Aurora. Sorti Aurora (22,27 %) sledijo sorte Celeia (23,84 %), Magnum (26,74 %), Bobek (27,28 %) in Savinjski golding (30,35 %). Če primerjamo deleže glede na rastišče (slika 18), vidimo, da ne prihaja do significantnih razlik (cca $\pm 0,6$ %), significantne pa so razlike med sortami. V primerjavi z vrednostmi v publikacijah Hmeljni kultivarji in Hopfen aus Deutschland (2002), vidimo močno manjši delež kohumulona v alfa-kislinah pri vzorcih sort Aurora, Bobek in Celeia. Verjetno je, da prihaja do razlik zaradi analiz vzorcev različnih starosti (objavljene vrednosti so izmerjene jeseni po obiranju, naše pa v mesecu maju naslednje leto).

Razmerje med ksantohumolom in alfa-kislinami

Razmerje med ksantohumolom in alfa-kislinami bi lahko bilo v prihodnosti ena od ključnih informacij o pivovarski vrednosti hmelja. Večje razmerje pomeni večjo pivovarsko vrednost hmelja. Največjo vrednost med vsemi analiziranimi sortami ima sorta Bobek (0,089 g/g), sledijo ji Savinjski golding (0,082 g/g), Celeia (0,053 g/g), Aurora (0,051 g/g) in Magnum (0,035 g/g). Podobne vrednosti iz leta 2001 (le sorta Celeia ima manjše razmerje) podaja tudi Biendl (2002).

Konduktometrična vrednost hmelja (KVH-TE)

Konduktometrična metoda je dandanes najpogostejša in standardna metoda pri določanju alfa-kislin. V primerjavi metod HPLC in KVH-TE so si rezultati zelo podobni. Košir (1995) dokazuje, da na vrednost KVH-TE vpliva vsebnost alfa-kislin in oksidacijskih produktov alfa-kislin. Za vzorce v maju 2006 (8 mesecev po novembru 2005) smo pričakovali velik delež oksidiranih alfa-kislin in posledično večjo KVH-TE vrednost v primerjavi s vrednostjo dobljeno s HPLC. Na podlagi analize KVH-TE bi lahko sklepali o vsebnosti alfa-kislin novembra 2005. Rezultati so lahko posledica dejstva, da oksidirane alfa-kislino niso reagirale s svinčevim acetatom.

Indeks staranja hmelja (HSI)

Ta način določitve skladiščne obstojnosti nam omogoča primerjavo skladiščnih obstojnosti posameznih kultivarjev, vendar nam ne pove veliko o dejanskem zmanjševanju pivovarske vrednosti hmelja zaradi skladiščenja. Kraljeva in Zupanec (1991) uvrščata Auroro in Savinjski golding med zelo dobro obstojne skladiščne kultivarje, medtem ko uvrščata sorti Bobek in Celeia med skladiščno dobro obstojne kultivarje. Magnum po virih nemške literature (Hopfen aus Deutschland, 2002) uvrščamo med skladiščno dobro obstojne kultivarje. Glede na vrednosti indeksov bi v našem primeru med zelo dobro skladiščno obstojne kultivarje uvrstili še sorto Magnum. Indeksi za druge sorte so podobni indeksom kot jih navajata Kraljeva in Zupanec (1991).

Kemometrična analiza

Kemometrično analizo smo izvedli na podlagi parametrov desetih spremenljivk kot so našteje v preglednicah od 7 do 11, pri čemer smo izpustili indekse HSI ter razmerje ksantohumol/alfa-kislina.

Iz podrobnega ogleda razporeditve na sliki 22 je razvidno, da je pri takšnem naboru vhodnih parametrov možno zelo dobro razločevanje med vzorci hmelja različnih sort. Jasno so definirana področja posameznih sort. Izjema je vzorec številka 8, vzorec sorte Bobek, ki je osamelec med vzorci hmelja sorte Savinjski golding.

Slika 23 določa na podlagi istih parametrov povezanost med spremenljivkami. Pomembna informacija, ki jo daje slika 23 je, da so črte spremenljivke KVH-TE, alfa-kislina, n+adhumulon, kohumulon in ksantohumol zelo blizu skupaj, kar kaže na močno povezanost med temi spremenljivkami, torej povezavo med vsebnostjo ksantohumola in vsebnostjo alfa-kislin. Do istih ugotovitev sta prišla tudi Donko in Kačeva (2006), ki povezujeta metabolno pot sekundarnih metabolitov polifenolov in alfa-kislin.

Če primerjamo sliki 22 in 23, vidimo, da so nekatere spremenljivke pomembne pri določanju posameznih sort oziroma odločajo o razlikovanju med sortami. Tako spremenljivki delež kohumulona v alfa-kislinah (% koh/alfe) in delež kolupulona v beta-kislinah (% kol/bete) igrata pomembno vlogo pri razločevanju sort Magnum in Bobek od ostalih sort in hkrati bistveno vpliva tudi na razločevanje med omenjenima sortama.

Dendrogram na sliki 24 je rezultat grupiranja 27 vzorcev hmelja. Zelo jasno so razvidne skupine, ki vključujejo vzorcev po sortah. Izjema je vzorec sorte Bobek številka 8, ki je osamelec v skupini vzorcev sorte Celeia. Za ta vzorec je značilno, da odstopa od drugih vzorcev sorte Bobek predvsem po relativno majhni vsebnosti beta-kislin v primerjavi z ostalimi vzorci sorte Bobek. Te vrednosti so že blizu vrednosti za sorto Celeia (preglednici 8 in 9).

Vpliv briketiranja

Briketiranje je proces stiskanja hmeljnih storžkov na manjši volumen. Pri briketih tipa 90 ostane masa nespremenjena. Forster in Köberlein (1998) sta na podlagi analiz ugotovila, da količina ksantohumola pri stiskanju hmeljnih storžkov v brikete tipa 90 ostaja enaka oziroma se zmanjša največ za 10 %. Preglednica 12 podaja indekse ponovno določenih parametrov (razmerje vrednosti parametra po briketiranju in pred njim). Pri interpretaciji rezultatov prihaja do velikih odstopanj med parametri vseh spremenljivk. Odstopanja so lahko posledica težavnega vzorčenja, hmelj je namreč zelo heterogen material. Čisto nasprotje je indeks HSI, ki za vse vzorce kaže približno 30 % večjo vrednost po briketiranju. Kot že navedeno, je interpretacija rezultatov vzorčenja otežkočena, vendar lahko ugotovimo, da se indeksi za ksantohumol ne zmanjšajo za več kot 10 % oziroma da briketiranje nima pomembnega vpliva na vsebnost ksantohumola. Pričakovane rezultate bi verjetno dobili na podlagi analiz večjega števila vzorcev.

6 POVZETEK IN SKLEPI

6.1 Povzetek

Ksantohumol je sekundarni metabolit hmelja (*Humulus lupulus* L.). Je glavni polifenol iz skupine prenilflavonoidov in del lupulina hmelja skupaj s hmeljnimi smolami (alfa- in beta-kislina) in aromatičnimi snovmi. Prenilflavonoidi imajo antialergijske in antioksidacijske lastnosti, delujejo proti virusom, bakterijam in glivicam.

Letina 2005 je bila za hmeljarje zelo dobra letina. Tako je bil povprečen delež alfa-kislin znatno večji v primerjavi z zadnjimi leti. Iz letine 2005 smo maja 2006 analizirali 43 vzorcev, ki smo jih glede na namen raziskav razdelili v dve skupini:

Prva skupina je zajemala 27 vzorcev sort Aurora, Bobek, Celeia, Savinjski golding in Magnum iz rastišč V Žalec, Z Žalec, Ptuj in Koroška. Glavni namen analiz te skupine vzorcev je bilo določiti, ali je vsebnost ksantohumola odvisna od sorte in rastišča.

Drugo skupino je sestavljalo 16 vzorcev, od tega 8 vzorcev hmeljnih storžkov in 8 vzorcev hmeljnih briketov tipa 90. Vsako sorto (Aurora, Bobek, Celeia in Savinjski golding) sta sestavljala dva vzorca hmeljnih storžkov in dva vzorca hmeljnih briketov tipa 90. Z analizami smo določali vpliv briketiranja na delež ksantohumola pred briketiranjem in po njem.

Za določanje parametrov smo uporabili naslednje metode: določanje vlage v zračno suhem hmelju, določanje alfa- in beta-kislin s HPLC, določanje ksantohumola s HPLC, določanje konduktometrične vrednosti hmelja (KVH-TE) in določanje indeksa staranja hmelja (HSI).

Pred analizami smo opravili postopek validacije metod določanja alfa- in beta-kislin ter določanja ksantohumola s HPLC, kakor tudi metode določanja indeksa staranja hmelja (HSI). Pri HPLC so dobljeni rezultati v nekaterih primerih kazali na nenatančnost v primerjavi standardnih odklonov in povprečij meritev med dvema dnevoma. Razlike pripisujemo vplivu temperature. V celoti ustrezne rezultate sta kazali validacijski analizi linearnosti in točnosti. Pri vrednotenju HSI so vsi rezultati kazali na natančno metodo.

Rezultati analiz iz prve skupine kažejo na močan vpliv sorte na vsebnost ksantohumola. Največji povprečni delež med sortami ima sorta Aurora (0,38 %). Rastišče le delno vpliva na delež ksantohumola. Iz grafa vidimo, da ima Koroška najbolj ugodne razmere za rast hmelja s povečanim deležem ksantohumola, vendar so razlike med rastišči majhne. Sklepamo lahko tudi, da prihaja do razlik med rastišči zaradi različnih agrotehničnih ukrepov pridelovalca. Primerjava vsebnosti ksantohumola in vsebnosti drugih sekundarnih metabolitov kot smo jih določili s HPLC in KVH-TE kaže, da vsebujejo sorte, ki vsebujejo več alfa-kislin tudi več ksantohumola. S kemometričnimi metodami smo po vsebnostih sekundarnih metabolitov uspešno grupirali vzorce hmelja po sortah.

Določanje sekundarnih metabolitov pred briketiranjem in po njem kaže, da briketiranje nima močnega vpliva na vsebnost ksantohumola in mehkih smol.

6.2 Sklepi

Na osnovi opravljenih analiz lahko povzamemo:

- Vsebnost ksantohumola v hmelju je signifikantno odvisna od sorte. Med slovenskimi kultivarji ima sorta Aurora največji delež ksantohumola
- Vzorci s Koroške so po vsebnosti ksantohumola na prvem mestu, vendar večjih razlik v vsebnosti ksantohumola med slovenskimi rastišči nismo opazili. Te razlike bi glede na majhno število vzorcev lahko pripisovali tudi različnim agrotehničnim ukrepom pridelovalcev. Prihaja pa do razlik v primerjavi s tujimi rastišči. Bolj realne ugotovitve glede vpliva rastišča bi lahko podajali le na podlagi večletnih analiz.
- Metabolne poti ksantohumola in alfa-kislin so povezane.
- V proizvodnji briketov tipa 90 ne prihaja do signifikantnih razlik v vsebnosti ksantohumola pred briketiranjem in po njem.

7 VIRI

- American Society of Brewing Chemists (ASBC). 1990. Methods of analysis. St. Paul, American Society of Brewing Chemists: loč.pag.: Hops 6
- Analytica – EBC. 1997. Nürnberg, European Brewery Convention Analysis Comitte, Verlag Hans Carl Getränke Fachverlag: 496 str.
- Back W. 2002. Herstellung von Bier mit hohem Gehalt an ernährungsphysiologisch wertgebenden Inhaltstoffen. Hopfenrundschau International, 2001/2002: 43 – 47
- Back W., Zürcher A., Wunderlich S. 2003. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. Patent publication number DE 102 56 166 A1.
- Biendl M. 2002. Untersuchungen zum Xanthohumol-Gehalt in Hopfen. Hopfenrundschau International, 2002/2003: 72 –75
- Biendl M., Mitter W., Peters U., Methner F.J. 2002. Use of a xanthohumol-rich hop product in beer production. Brauwelt International, 20: 39 – 42
- Bohanec S. 1998. Osnove statistike in statistični testi. V: Statistični testi '98. Bohanec S., Bajuk T., Gogala A., Vončina B.D., Moder M. (ur.). Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 1 – 19
- Bucke G.K., Baker C.D. 1987. Estimation of alpha and beta acids in hop extract by HPLC. Journal of the Institute of Brewing, 93: 468 – 471
- Christian G.D. 1994. Analytical chemistry. 5th ed. Mississauga, John Wiley & Sons, Inc.: 812 str.
- Dale C.J. 1987. Hops and polyphenols. English Hops, 9: 10 – 11. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 – 22
- De Keukeleire D. 1982. De chemie van de hopbitterzuren. Niet gepubliceerd proefschrift. Gent, Rijksuniversiteit Gent, Faculteit der Wetenschappen: 328 str. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 - 22
- De Keukeleire J., Ooms G., Heyerick A., Roland-Ruiz I., Van Bockstakle E., De Keukeleire D. 2003. Formation of a-acids, b-acids, desmethylxanthohumol and xanthohumol during flowering of hops. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 42 – 45

Donko M., Kač M. 2006. "Polifenoli v hmelju". Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (osebni vir, 2006)

Drewett K.B., Laws J. 1970. Chemistry of hop constituents, part 36. An improved synthesis of hop /8-acids (lupulones). Journal of the Institute of Brewing, 76: 188 – 190. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 – 22

Forster A., Beck B., Schulmeyr J. 1989. Versuche zur Hopfung von Bieren mit Bitterstoff- und Aroma-fractionen, die bei der CO₂-Hopfenextrationen anfallen. Monatschrift für Brauwissenschaft, 42: 355 – 363

Forster A., Köberlein A. 1998. Der Verbleib von Xanthohumol aus Hopfen während der Bierbereitung. Brauwelt, 37: 1677-1679

Forster A., Beck B., Schmidt R., Jansen C., Mellenthin A. 2002. Über die Zusammensetzung von niedermolekularen Polyphenolen in verschiedener Hopfensorten und zwei Anbaugebieten. Monatschrift für Brauwissenschaft, 55: 98 – 108

Hmeljni kultivarji. Žalec, Hmeljna komisija Slovenije: 22 str.

Hopfen aus Deutschland. 2002. Bonn, Centrale Marketinggesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft mbH: 74 str.

Hough J.S., Briggs D.E., Stevens R. 1982. Malting and brewing science. Vol.2. New York, Aspen Law & Business: 540 str. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 - 22

Hums N. 1973. Zur Chemie der Hopfenbitterstoffe. Brauwelt, 113: 38 – 41 Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 – 22

IHPS – Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Metoda MKH 02, MKH 06, MKH 08, MKH 13. Interno gradivo. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 30 str.

Irwin A.J. 1989. Varietal dependance of hop flavour volatiles in lager. Journal of the Institute of Brewing, 95: 185 – 194. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 – 22

- Kač M. 1967. Bolezni in škodljivci na hmelju. Žalec, Kmetijska proizvodjalna in poslovna zveza Žalec: 201 str.
- Kammhuber K. 2005. Differenzierung des Welthopfensortiments nach Bitterstoffen und polyphenolen. Hopfenrundschau International, 2005/2006: 42 – 46
- Kammhuber K., Zeidler C., Seigner E., Englehard B. 1998. "Research status on the hop component xanthohumol". Research report. Wolnzach, Verband deutscher Hopfenpflanzer e.V.: 5 str.
- Knapič M. 1996. Izbira tal za hmeljišča. Hmeljar, 65: 66 – 68
- Knez Ž. 1984. Študij separacije pivovarniško pomembnih komponent hmelja Aurora. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 123 str.
- Knorr F., Kremkow C. 1972. Chemie und Technologie des Hopfens. Nürnberg, Verlag Hans Carl: 183 str. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 – 22
- Košir I. 1995. Kemizem in analitika hmelja. Hmeljarski bilten, 4: 73 – 83
- Kralj D., Zupanec J. 1991. Die Lagerfähigkeit der slowenischen Hopfensorten. Monatsschrift für Brauwissenschaft, 5: 165 – 169
- Kralj D., Zupanec J., Vasilj D., Kralj S., Pšeničnik J. 1991. Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus* L. Journal of the Institute of Brewing, 97: 197 – 206
- Massart D.L. 1997. Handbook of chemometrics nad qualimetrics: Part A. Amsterdam, Elsevier Science: 886 str.
- Maier J. 1982. Hopfenqualität heute. Brauwelt, 11: 435 – 440
- Majer D. 1999. Vpliv vodnega stresa na pridelke hmelja (*Humulus lupulus* L.). Hmeljarski bilten, 6: 21 – 30
- Menary R.C., Doe P.E. 1983. Some morphological and chemical changes in hops during maturation. Journal of the Science and Food and Agriculture, 34: 921 – 929. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 – 22
- Microsoft Excel. 2002. Miami, Microsoft Corporation: software

- Miranda C.L., Stevens J.F., Helmrich A., Henderson M.C., Rodriguez R.J., Yang Y.H., Deinzer M.L., Barnes D.W., Buhler D.R. 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated polyphenols from hops (*Humulus Lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chemistry and Toxicology*, 37: 271 - 285
- Narziß L. 2004. Abriß der Bierbrauerei. Weinheim, Wiley-VCH: 439 str.
- Palamand S.R., Aldenhoff J.M. 1973. Bitter tasting compounds of beer. Chemistry and taste properties of some hop resin compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21: 535 – 543
- Pfenninger H., Schur F., Anderegg P. 1978. *Brewing science*. London, Academic Press: 445 str. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkrični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 – 22
- Rigby F. L. 1972. A theory on the hop flavour of beer. *Proceedings of American Society of Brewing Chemists*: 36 – 50. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkrični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 – 22
- Scan. 1995. Software for chemometric analysis. Minitab Inc., Scan: software
- Sharpe F.R., Laws J. 1981. The essential oil of hops. *Journal of the Institute of Brewing*, 87: 96 – 108. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkrični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 – 22
- SIST EN ISO 3696. Voda za analitsko laboratorijsko uporabo – specifikacija in preskusne metode. 1998: 5 str.
- Stettner G., Methner F.J., Biendl M. 2003. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 56: 245 – 252
- Stevens J.F., Page J.E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good helath!. *Phytochemistry*, 65: 1317 – 1330
- Stevens J.F., Miranda C.L., Frei B., Buhler D.R. 2003. Inhibition of peroxynitrite-mediated LDL oxidation by prenylated prenilflavonoids: the alpha, beta unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore. *Chemical Research in Toxicology*, 16: 1277 – 1286

Stevens J.F., Taylor A.W., Deinzer M.L. 1999. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 832: 97 – 107

Teach Me. 1999. SDL – Software Development Lohninger. Wien, Lohninger: software

Vandenbossche R. 1973. Beta säuren in Hopfen. Doctorarbeit. Rijksuniversiteit Gent, Laboratorium von Organische Chemie: 134 str. Cit. po: Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 6 - 22

Verzele M. 1985. Centenary review: 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 92: 32 – 48

Vinson J.A., Mandarano M., Hirst M., Trevithick J.R., Bose P. 2003. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of arteriosclerosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5528 – 5533

Zupanec J. 1987. Analiza inženirskih parametrov v procesu sušenja hmelja. Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, FNT, VTOZD kemija in kemijska tehnologija: 82 str.

Zupanec J. 1992. Vpliv procesnih parametrov pri optimizaciji sušenja in superkritični ekstrakciji na kvaliteto hmeljnega ekstrakta. Doktorska disertacija. Maribor, Univerza v Mariboru, Tehniška fakulteta Maribor, Oddelek za kemijsko tehnologijo: 119 str.

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 60 str.

ZAHVALA

Milica Kač

Iztok Jože Košir

Andrej Plestenjak

Ivica Hočevar in Barbara Slemenik

Osebjje Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Prijatelji

Mami in Ati

Kristijan, Simona, Aljaž

tebi Maja

HVALA!