

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Špela MOŽE

POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST V HMELJU

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

POLYPHENOLOXIDASE ACTIVITY IN HOP

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za kemijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijske komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Veroniko Abram in za recenzenta prof. dr. Marjana Simčiča.

Mentorica: prof. dr. Veronika Abram

Recenzent: prof. dr. Marjan Simčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Špela Može

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 557.15:633.791:581.18/.19(043)=863
KG encimi / polifenoloksidaze / polifenoloksidazna aktivnost / hmelj / *Humulus lupulus* L. / hmeljevi storžki / listi hmelja / velika kopriva / *Urtica dioeca* L. / navadna konoplja / *Canabis sativa* L. / stres / mehanske poškodbe / hmeljev bolhač / *Psylliodes attenuatus* Koch
AV MOŽE, Špela
SA ABRAM, Veronika (mentorica) / SIMČIČ, Marjan (recenzent)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST V HMELJU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 50 str., 6 pregl., 20 sl., 9 pril., 41 vir.
IJ sl
JI sl / en
- AI V storžkih in listih hmelja šestih različnih kultivarjev (Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding in Taurus) smo določali polifenoloksidazno aktivnost. Nekateri storžki so bili sveži nekateri pa posušeni. Nekatero liste rastlin so predhodno mehansko poškodovali, kar ponazarja grizljanje hmeljevega bolhača, na nekatero pa so nanесли hmeljeve bolhače, da jih je poškodoval. Kot primerjalne vzorce smo uporabili liste velike koprive in navadne konoplje. Iz storžkov in listov smo ekstrahirali polifenoloksidaze (PPO) in jih delno očistili s pomočjo neionskega detergenta Tritona TX-114. V supernatantih 2 smo najprej določili koncentracijo proteinov po Bradfordovi metodi. Aktivnost PPO pa smo spektrofotometrično spremljali pri valovni dolžini 412 nm, kot substrat smo uporabili 4-metil katehol. Dodali smo tudi katalazo, da smo odstranili vodikov peroksid. Primerjali smo dve metodi določanja aktivnosti PPO, prvo, ko smo katalazo dodali v reakcijsko zmes tik pred reakcijo PPO s substratom, in drugo, ko smo katalazo pustili v stiku s PPO 15 min pred reakcijo. Rezultati so pokazali, da med metodama ni razlik. Iz rezultatov aktivnosti PPO storžkov in listov smo ugotovili, da posamezen kultivar hmelja vpliva na polifenoloksidazno aktivnost. Pri naših poskusih so imeli suhi storžki večjo polifenoloksidazno aktivnost kot sveži zaradi suhe mase posušenih storžkov. Listi hmelja so imeli večjo polifenoloksidazno aktivnost kot storžki. Do sprememb polifenoloksidazne aktivnosti je prišlo po mehanskih poškodbah listov in tudi po poškodbah, ki jih povzroči hmeljev bolhač.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 557.15:633.791:581.18/.19(043)=863
CX enzymes / polyphenoloxidases / polyphenoloxidase activity / hop / *Humulus lupulus* L. / hops / hop leaves / stinging nettle / *Urtica dioeca* L. / hemp / *Canabis sativa* L. / stress / mechanical wound / hop flea beetle / *Psylliodes attenuatus* Koch
AU MOŽE, Špela
AA ABRAM, Veronika (supervisor) / SIMČIČ, Marjan (reviewer)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI POLYPHENOLOXIDASE ACTIVITY IN HOP
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 50 p., 6 tab., 20 fig., 9 ann., 41 ref.
LA sl
AL sl / en
- AB Polyphenoloxidase activity was determined in hops and leaves of six different sorts of hop (Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding, Taurus). Some hops were dried and others were fresh. Some leaves of plants were mechanical wounded, which illustrated hop flea beetle's biting and the hop flea beetles were brought on other leaves to injure them. Stinging nettle and hemp leaves were used as comparative samples. Polyphenoloxidase (PPO) was extracted from hops and leaves and partially purified with non-ionic detergent Triton TX-144. Protein concentration in supernatants 2 were measured by the Bradford method. Polyphenoloxidase activity was determined spectrophotometrically at 412 nm. 4-metilcatechol was used as the substrate and catalase was added to remove hydrogen peroxide. The two methods for determine polyphenoloxidase activity were compared, the first of two when catalase was added to the reaction mixture just before the reaction PPO with substrate and the second when catalase left in contact with PPO for 15 min before reaction. The results showed that there is no differences between these two methods. We found out that sort of hop influenced on polyphenoloxidase activity. In our experiments dried hops had larger polyphenoloxidase activity then fresh hops because of the dry mass of dried hops in our experiments. Hop leaves had larger polyphenoloxidase activity as hops. There were changes of polyphenoloxidase activity in mechanical wounded and by hop flea beetles damaged leaves.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 HMELJ	2
2.1.1 Botanika	2
2.1.2 Zgradba hmeljne rastline	2
2.1.2.1 Podzemni deli	2
2.1.2.2 Nadzemni deli	3
2.1.2.3 Razmnoževalni ali generativni organi	4
2.1.2.4 Storžek	4
2.1.3 Hmeljni kultivarji	5
2.1.3.1 cv. Savinjski golding	5
2.1.3.2 cv. Aurora	6
2.1.3.3 cv. Bobek	6
2.1.3.4 cv. Celeia	6
2.1.3.5 cv. Magnum	7
2.1.3.6 cv. Taurus	7
2.1.4 Sestava hmelja	7
2.1.4.1 Hmeljne smole	8
2.1.4.2 Eterično olje	8
2.1.4.3 Polifenoli	8
2.2 HMELJEV BOLHAČ	9
2.3 SEKUNDARNI METABOLITI RASTLIN	10
2.3.1 Fenolne spojine	10
2.4 STRES PRI RASTLINAH	11
2.4.1 Prepoznavanje stresa	12
2.4.2 Prenos signala	12
2.4.3 Herbivori so sprožilci sistemske poti	12
2.4.4 Vloga celične membrane	13
2.5 POLIFENOLOKSIDAZA	14
2.5.1 Razširjenost PPO	14
2.5.2 Reakcije, ki ji katalizirajo PPO	15
2.5.2.1 Neencimsko porjavenje	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Hmelj	17
3.1.1.1 Storžki	17
3.1.1.2 Listi	17
3.1.1.3 Vzgoja sadik hmelja	17

3.1.2 Reagenti	18
3.1.3 Aparature	18
3.2 METODE	19
3.2.1 Polifenoloksidazna aktivnost storžkov hmelja	19
3.2.1.1 Izolacija polifenoloksidaz iz storžkov	19
3.2.1.2 Določanje proteinov	21
3.2.1.3 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti	21
3.2.1.4 Statistična analiza	23
3.2.2 Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov hmelja iz hmeljišča ..	24
3.2.2.1 Izolacija polifenoloksidaz iz listov	24
3.2.2.2 Določanje proteinov	24
3.2.2.3 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti	24
3.2.2.4 Statistična analiza	24
3.2.2.5 Vpliv različnega časa dodajanja katalaze	24
3.2.2.6 Statistična analiza	25
3.2.3 Polifenoloksidazna aktivnost mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka	25
3.2.3.1 Pobiranje listov po 17. urah	25
3.2.3.2 Izolacija polifenoloksidaz iz listov	25
3.2.3.3 Določanje proteinov	26
3.2.3.4 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti	26
3.2.3.5 Statistična analiza	26
3.2.4 Polifenoloksidazna aktivnost mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka druge serije	26
3.2.4.1 Pobiranje listov po 8., 25., 50. in 75. urah	26
3.2.4.2 Izolacija polifenoloksidaz iz listov	27
3.2.4.3 Določanje proteinov	27
3.2.4.4 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti	27
3.2.4.5 Statistična analiza	27
3.2.5 Polifenoloksidazna aktivnost s hmeljevim bolhačem poškodovanih listov iz rastlinjaka	27
3.2.5.1 Indukcija polifenoloksidaz v listih rastlin po poškodbi s hmeljevim bolhačem	28
3.2.5.2 Izolacija polifenoloksidaz iz listov	28
3.2.5.3 Določanje proteinov	28
3.2.5.4 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti	28
3.2.5.5 Statistična analiza	28
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1 DOLOČANJE PROTEINOV	29
4.2 DOLOČANJE POLIFENOLOKSIDAZNE AKTIVNOSTI	30
4.2.1 Polifenoloksidazna aktivnost storžkov hmelja	31
4.2.2 Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov iz hmeljišča	33
4.2.2.1 Vpliv različnega časa dodajanja katalaze	35
4.2.3 Polifenoloksidazna aktivnost mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka	36
4.2.4 Polifenoloksidazna aktivnost v odvisnosti od časa po mehanski poškodbi listov	38

4.2.5 Polifenoloksidazna aktivnost s hmeljevim bolhačem poškodovanih listov iz rastlinjaka	43
5 SKLEPI	45
6 POVZETEK	46
7 VIRI	48
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Vpliv kultivarja hmelja in lokacije svežih storžkov na polifenoloksidazno aktivnost (model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	31
Preglednica 2:	Vpliv kultivarja hmelja in lokacije suhih storžkov na polifenoloksidazno aktivnost (model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	32
Preglednica 3:	Vpliv kultivarja hmelja in dela rastline (listov, svežih storžkov in suhih storžkov) na polifenoloksidazno aktivnost (model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	33
Preglednica 4:	Vpliv kultivarja hmelja in primerjalnih rastlin ter mehanskih poškodb listov na polifenoloksidazno aktivnost (model 1, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	36
Preglednica 5:	Vpliv kultivarja in časa trajanja mehanskih poškodb rastlin na polifenoloksidazno aktivnost (model 4, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).	38
Preglednica 6:	Vpliv kultivarja hmelja in primerjalnih rastlin ter poškodb hmeljevega bolhača na polifenoloksidazno aktivnost (model 1, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	43

KAZALO SLIK

Slika 1:	Oblike listov hmelja: 1 - rahlo deljeni, 2 - trikrpati, 3 - petkrpati (Rode in sod., 2002).....	3
Slika 2:	Storžek: 1 - zunanji videz storžka, 2 - lističi storžka, 3 - vretence (Rode in sod., 2002)	4
Slika 3:	Lističi storžka so preoblikovani krovni listi (1) ali preoblikovani prilisti (2) (Rode in sod., 2002)	5
Slika 4:	Hmeljev bolhač (Rak-Cizej, 2003).....	9
Slika 5:	Strukturna formula fenolne kisline in flavan-3-ola (monomerni prekursor kondenziranih taninov) (Hättenschwiler in Vitousek, 2000).....	11
Slika 6:	Shema signalne poti pri aktivaciji biosinteze proteinaznega inhibitorja v poškodovanih listih paradižnika (Lincoln in Zeiger, 2002).	13
Slika 7:	Reakcija katalizirana s PPO (Nicolas in sod, 2003).....	15
Slika 8:	Shema izolacije polifenoloksidaze (PPO) storžkov hmelja.....	20
Slika 9:	Reakciji, ki potekata pri določanju polifenoloksidazne aktivnosti (Esterbauer in sod., 1977)	22
Slika 10:	Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradfordu (Bradford, 1976).	29
Slika 11:	Odvisnost A_{412} od časa merjenja absorbance vzorca, primer s hmeljevim bolhačem poškodovan list Bobka.....	30
Slika 12:	Specifična aktivnost PPO v svežih in suhih storžkih hmelja, pobranih na različnih mestih na rastlinah hmelja šestih kultivarjev.....	32
Slika 13:	Specifična aktivnost PPO listov, svežih in suhih storžkov hmelja, vzgojenih v hmeljišču.....	34
Slika 14:	Specifična aktivnost PPO listov hmelja iz rastlinjaka pri poskusu, ko katalaza pride v stik s PPO tik pred reakcijo s substratom in ko smo katalazo dodali v supernatant 2 15 min pred reakcijo s substratom	35
Slika 15:	Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih listov in mehansko poškodovanih listov hmelja ter primerjalnih rastlin, vzgojenih v laboratoriju in pobranih 17 ur po povzročenih poškodbah	37

- Slika 16: Specifične aktivnosti POO nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov hmelja ter primerjalnih rastlin, ki so bili pobrani 8, 25, 50, in 75 ur po narejenih mehanskih poškodbah..... 39
- Slika 17: Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov hmelja cv. Aurore in cv. Taurusa ter velike koprive, ki so bili pobrani 8, 25, 50, in 75 ur po narejenih mehanskih poškodbah 40
- Slika 18: Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov hmelja kultivarjev Bobek, Magnum in Savinjski golding, ki so bili pobrani 8, 25, 50, in 75 ur po narejenih mehanskih poškodbah 41
- Slika 19: Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov hmelja kultivarja Celeia ter navadne konoplje, ki so bili pobrani 8, 25, 50, in 75 ur po narejenih mehanskih poškodbah 42
- Slika 20: Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih listov rastlin in listov, ki so jih poškodovali hmeljevi bolhači, kateri so bili v stiku z rastlinami 24 ur 44

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Polifenoloksidazna aktivnost storžkov
- Priloga A2: Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov iz hmeljišča
- Priloga A3: Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov iz hmeljišča, pri katerih je bila polifenoloksidaza v stiku s katalazo 15 min pred reakcijo s substratom
- Priloga A4: Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka, pobranih 17 ur po povzročenih poškodbah
- Priloga A5: Polifenoloksidazna aktivnost listov iz rastlinjaka (nepoškodovani, mehansko poškodovani in poškodovani od hmeljevega bolhača)
- Priloga B1: List hmelja – kultivar Bobek (*Humulus lupulus* L.), nepoškodovan, vzgojen v hmeljišču
- Priloga B2: Listi hmelja – kultivar Bobek (*Humulus lupulus* L.), nepoškodovani, vzgojeni v rastlinjaku
- Priloga B3: Listi hmelja – kultivar Bobek (*Humulus lupulus* L.), mehansko poškodovani, vzgojeni v rastlinjaku
- Priloga B4: Listi hmelja – kultivar Bobek (*Humulus lupulus* L.), poškodovani s pomočjo hmeljevega bolhača (*Psylliodes attenuatus* Koch), vzgojeni v rastlinjaku

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA – goveji serumski albumin

CBB – barvilo Coomassie Brilliant Blue G-250

cv. – kultivar

PMSF – fenilmetilsulfonilfluorid

PPO – polifenoloksidaza

PVPP – polivinilpolipirrolidon

SA – specifična aktivnost encima

TNB – 2-nitro-5-tiobenzojsko kislino

TX-144 – neionski detergent Triton TX-114

1 UVOD

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) so kot vrtno rastlino in zelenjavo poznali že stari Rimljani. Danes pa ga poznamo praktično že povsod, saj ga stoletja uporabljamo v pivovarstvu predvsem zaradi značilne prijetne arome in osvežilne grenkobe, ki jo hmelj daje pivu.

Rastline so v svojem naravnem okolju izpostavljene številnim stresnim dejavnikom kot so temperaturni, vodni stresi, stres zaradi prehranskih motenj, stres zaradi napada mikroorganizmov, škodljivcev, insektov in ostalih herbivorov. Za obrambo pred temi dejavniki so rastline razvile številne obrambne mehanizme. Med te obrambne mehanizme spada tudi encim polifenoloksidaza (PPO). Polifenoloksidaza ima namreč sposobnost oksidiranja fenolnih spojin v kinone, ki polimerizirajo v rjavo obarvane spojine, kar povzroči porjavenje sadja in zelenjave. Vendar pri tem povzroči zmanjšanje njihove prehranske vrednosti in slabšo senzorično kakovost.

Literarni viri kažejo, da napad herbivorov na rastline povzroči aktivacijo encima polifenoloksidaze. Mi smo želeli ugotoviti, ali pride do sprememb polifenoloksidazne aktivnosti ob napadu hmeljevega bolhača (*Psylliodes attenuatus* Koch) na hmeljeve liste. Hmeljev bolhač z grizljanjem povzroči izjede v listih, ki so videti kot sito z velikimi luknjami. Poškodbe smo ponazorili tudi z luknjačem narejenimi luknjami v listih hmelja in določili polifenoloksidazno aktivnost. Rezultate smo med sabo primerjali. Pri poskusih smo uporabili šest kultivarjev hmelja: Auroro, Bobek, Celeio, Magnum, Savinjski golding, Taurus in kot primerjalni rastlini veliko koprivo (*Canabis sativa* L.) in navadno konopljo (*Urtica dioeca* L.). Vse rastline so bile vzgojene v rastlinjaku. Merili smo tudi polifenoloksidazno aktivnost nepoškodovanih listov in storžkov hmelja, ki so bili vzgojeni v hmeljišču.

V delovni hipotezi smo predvidevali, da bi stres, ki bi ga povzročile mehanske poškodbe in hmeljevi bolhači, lahko povzročil povečanje specifične aktivnosti encima polifenoloksidaze.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HMELJ

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je rastlina, ki jo gojimo zaradi vsebnosti grenke lepljive snovi lupulina. To je rumen prah na krovnih listih storžkov, ki vsebuje grenčične in aromatične snovi. Večino pridelka - storžkov porabimo v pivovarstvu kot dodatek pri proizvodnji piva, sicer pa tudi pri izdelavi zdravil. V proizvodnji piva je nenadomestljiva surovina, saj mu daje aromo, ki mora biti primerno intenzivna, kakovostna, čista in prijetna (Čeh Brežnik in Brežnik, 2003).

2.1.1 Botanika

Hmelj je zelnata trajnica, ovijalka. Je dvodomna rastlina. Kar pomeni, da na eni rastlini najdemo le moške ali le ženske cvetove (Rode in sod., 2002). V hmeljiščih gojimo le rastline ženskega spola, moške rastline pa zatiramo, saj oploditev ni zaželena (Čeh Brežnik in Brežnik, 2003).

Botanično uvrščamo hmelj med dvokaličnice, v red koprivovcev (*Urticales*), kamor spada tudi navadna kopriva in skupaj s konopljo v družino konopljevok (*Cannabaceae*). Danes poznamo v rodu *Humulus* dve vrsti: navadni hmelj (*Humulus lupulus*) in enoletni ali japonski hmelj (*Humulus japonicus*). V Evropi prevladuje evropski hmelj (*Humulus lupulus* ssp. *europaeus*), novomehiški hmelj (*Humulus lupulus* ssp. *neomexicanus*) v Ameriki in srčastolisti hmelj (*Humulus lupulus* ssp. *cordifolius*) na Japonskem (Rode in sod., 2002).

2.1.2 Zgradba hmeljne rastline

Rastlino hmelja sestavljajo podzemni vegetativni deli, nadzemni vegetativni deli in razmnoževalni organi. Nadzemni deli na koncu vsake rastne sezone propadejo, prezimijo le podzemni deli.

2.1.2.1 Podzemni deli

Podzemni deli pri zreli rastlini so sestavljeni iz koreninskega tkiva in tkiva stebela. Skupaj tvorita tako imenovano koreniko ali štor. Koreninsko tkivo tvori dve različni obliki korenin. V globino se razrašča 6 do 12 odebeljenih glavnih korenin, so stalne in lahko segajo nekaj metrov globoko. Nekatere imajo tudi založno funkcijo, služijo kot rezervno tkivo. Na stalnih koreninah bočno izraščajo vlaknaste korenine in tvorijo koreninsko grudo. Te se neprestano obnavljajo in imajo glavno nalogo sprejemanja vode in hranil. Na spodnjem odebeljenem delu enoletnega stebela (trte), ki je še v zemlji, se razvijejo tudi nadomestne (adventivne ali rosne) korenine, ki se razpredajo tik pod površino tal. Novi

nadzemni deli se razvijejo iz brstičev na razvejanem stebelnem delu, ki leži tik pod površino. Na njem je veliko spečih brstičev (očesc). Spomladi 15 do 30 očesc začne hitro poganjati. Na koreniki se razvijejo tudi poganjki, ki ne rastejo navzgor, ampak vodoravno tik pod površino. Na določeni oddaljenosti od matične rastline se ukoreninijo in poženejo kot samostojna rastlina. Take poganjke imenujemo roparji ali tekači.

Hmeljna korenika (štor) vsako leto prirašča. Njena življenjska doba je 10 do 25 let in je odvisna od pogojev na rastišču, kultivarja in načina obdelave (Rode in sod., 2002).

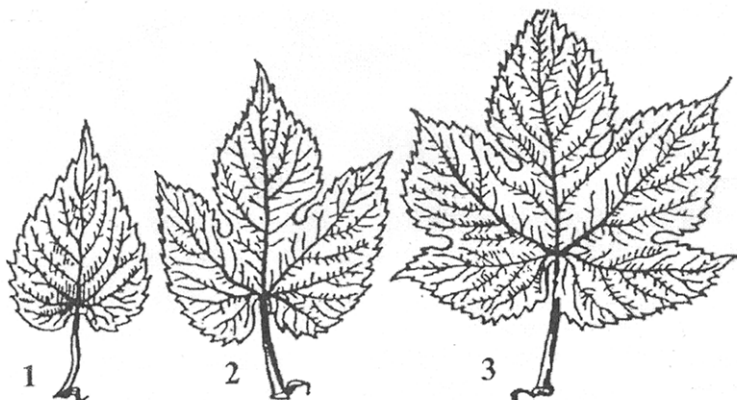
2.1.2.2 Nadzemni deli

Vegetativne nadzemne dele predstavljajo steblo, stranski poganjki in listi.

Glavno steblo ali hmeljna trta se razvije iz očesca. Ko zraste v višino okoli 50 centimetrov, dobi zmožnost ovijanja. Vzpenja se po katerikoli opori in se močno razrašča. Ob opori se trta zavija v smeri urinega kazalca in se nanjo opira s kljukastimi dlačicami, s katerimi je pokrito steblo. Steblo (trta) je šesterorobo v prerezu in je razdeljeno na kolenca in nodije. Barva je odvisna od kultivarja in rastnih pogojev, variira od zelene do rdečkaste. Steblo je na začetku zelnato in kasneje oleseni. Hmeljna trta zraste v višino 7 do 9 metrov. Ko pride rastlina do vrha opore, se razrašča še v širino. Jeseni nadzemni del hmeljne trte fiziološko dozori in odmre. Pred tem se snovi nakopičijo v podzemnem delu stebela, kjer se razvijejo dodatni brsti. Tako se korenika (štor) odebeli in rastlina prezimi.

Stranski poganjki se razvijejo iz rastnih vršičkov v zalistjih na vsakem nodiju stebela. Po zgradbi so podobni stebelu in so razvejani.

Listi so na stebelu in stranskih poganjkih razporejeni parno na vsakem kolescu in si ležijo nasprotno. Na isti rastlini so listi različno oblikovani (heterofilija). Listne ploskve se ob peclju srčaste in večkrat pernato deljene. Mladi listki so le rahlo deljeni, starejši listi so običajno trikrpati ali petkrpati. Rob listov je vedno nazobčan, listne žile so lepo vidne in površina listov je dlakava. Dlačice na listnih žilah so ostrejše. Običajno so listi toliko široki kot dolgi. Velikost je odvisna od starosti, lege na rastlini in kultivarja hmelja. Barva listov je svetlo do temno zelena. Listni peclji imajo na zgornji strani brazdo in so podobne barve kot steblo (Rode in sod., 2002).



Slika 1: Oblike listov hmelja: 1 - rahlo deljeni, 2 - trikrpati, 3 - petkrpati (Rode in sod., 2002)

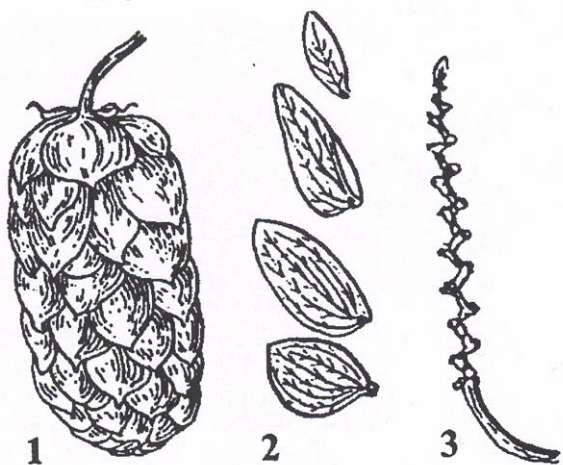
2.1.2.3 Razmnoževalni ali generativni organi

Moški cvetovi so majhni in združeni v grozdasta socvetja na zgornjih stranskih poganjkih. Cvetno odevalo sestavlja pet rumenkasto zelenih venčnih listkov in pet izrazitih prašnikov na kratkih filamentih. Ko se cvet popolnoma razvije, se prašnice odprejo. V prašnicah nastaja veliko cvetnega prahu, ki se razširja z vetrom.

Osnovo ženskega socvetja sestavlja osrednja os iz kratkih nodijev. Na vsakem nodiju je par krovnih lističev (brakteje). Vsak krovni listič podpira par prilistov (brakteole). Na dnu vsakega prilista je zelo poenostavljen cvet, ki je sestavljen iz plodnice in dveh močno podaljšanih brazd, na katere se ujame cvetni prah. Skupinica dveh krovnih listkov, štirih prilistov in štirih cvetov se imenuje klasek. Na začetku so na socvetju vidni krovni lističi in rdečkaste brazde. Ko socvetje dozoreva, se osrednja os daljša. Krovni lističi in prilisti se povečajo, se opekasto prekrijejo in oblikujejo značilno obliko hmeljevega storžka (Rode in sod., 2002).

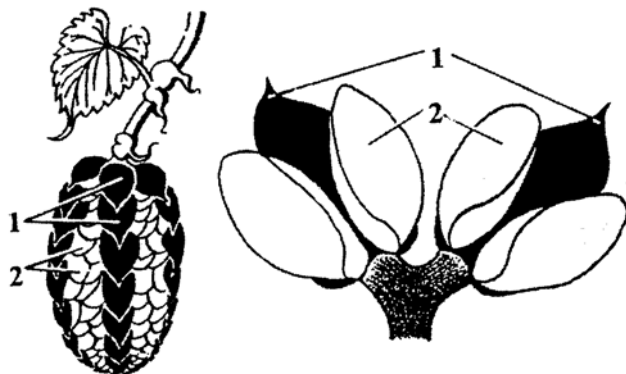
2.1.2.4 Storžek

Hmeljev storžek je dozorelo žensko socvetje. Storžki so običajno veliki od 20 do 30 mm. V naravi vsebujejo tudi razvita semena, kar pa je pri pridelovanju nezaželeno. Storžek sestavljajo pecelj, osrednje vretence in lističi storžka. Pecelj je povezava z rastlino in se nadaljuje v vretence. Vretence je podaljšano in preoblikovano osrednje vretence ženskega socvetja. Kolenca so razporejena izrazito nasprotno in premenjalno (cik-cak).



Slika 2: Storžek: 1 - zunanji videz storžka, 2 - lističi storžka, 3 - vretence (Rode in sod., 2002)

Lističi storžka so preoblikovani krovni lističi in prilisti, ki se opekasto prekrivajo. Na površini storžka lahko ločimo krovne lističe od prilistov po konici. Krovni lističi imajo koničaste zašiljene vrhove, prilisti pa so manj simetrični in topi. Na dnu krovnih listov in prilistov se razvijejo lupulinske žleze, v katerih se nakopičijo eterično olje, grenčične smole in čreslovina. Lupulinske žleze so lahko različnih tipov po obliki in so vse zelo rahlo vezane na površino.



Slika 3: Lističi storžka so preoblikovani krovni listi (1) ali preoblikovani prilisti (2) (Rode in sod., 2002)

Kakovostni pridelek predstavljajo zdravi, nezdobljeni, neosemenjeni storžki s čimveč ohranjenih lupulinskih žlez. Lupulinske žleze so pritrjene na površino prilistov in krovnih lističev z nekajcelično povezavo, ki lahko hitro razpade. Med obiranjem, sušenjem, pakiranjem in transportom se jih del olušči in izgubi. Zato pride do izgube učinkovin in zmanjšanja kakovosti pridelka. Osemenjeni storžki zmanjšajo kakovost pridelka. Semena ležijo na dnu prilistov. Osemenjeni storžki so večji in imajo grobo vretence z večjimi koti med kolenci. So manj zbiti in imajo manj lupulinskih žlez (Rode in sod., 2002).

2.1.3 Hmeljni kultivarji

2.1.3.1 cv. Savinjski golding

Savinjski golding je tradicionalni slovenski kultivar, ki ga pri nas gojimo že od leta 1924. Je zgoden, optimalni zrel od 18. do 25. avgusta. Rastline imajo obliko srednje širokega valja, 60 cm dolge zalistnike, srednje debelo in rahlo vijolično trto, imajo srednje velike in zelene liste in srednje močan koreninski sistem. Storžki so dolgi povprečno 26,5 mm, 100 storžkov tehta 14 g, so srednje gosto zraščeni, zeleni in se pri strojnem obiranju drobijo. Savinjski golding uspeva na rjavih aluvialnih tleh, ilovnate do glinaste teksture s propustnim in odcednim podtaljem. Korenika je občutljiva za hmeljno peronosporo, listi so odporni, storžki pa nekoliko občutljivi. Aroma Savinjskega goldinga je blaga, žlahtno hmeljna. Eteričnih olj je 0,7 do 0,9 ml/100 g, alfa kislin je 5,5 %, kohumulona je 28 %, razmerje med alfa in beta kislinami je okrog 0,5. Ta kultivar ima dobro skladiščno odpornost. Na svetovnem trgu je poznan kot aromatičen tip hmelja. S Savinjskim goldingom hmeljeno pivo ima dobro organoleptično oceno za grenkobo, okus in aromo. Savinjski golding gojijo v Sloveniji in Avstriji (Kralj, 1992a; Šuštar-Vozlič in sod., 2002).

2.1.3.2 cv. Aurora

Aurora je slovenski kultivar, je križanec med slovenskim divjim moškim hmeljem in kultivarjem angleškega izvora Northern Brewerjem. Je srednje zgoden kultivar, optimalno zrel od 23. do 30. avgusta. Rastline imajo obliko srednje širokega valja, 60 cm dolge zalistnike, ki odganjajo tudi na spodnjem delu trte. Trta je srednje debela, rahlo vijoličasta in ima kratke internodije. Listi so srednje veliki, gladki, v neugodnih razmerah se robovi listov sušijo. Ima šopast koreninski sistem. Storžki so dolgi povprečno 25 mm, 100 suhih storžkov tehta 15 g, so gosto zraščeni, temno zeleni in se pri strojnem obiranju ne drobijo. Uspeva na rjavih aluvialnih tleh, ilovnato glinaste teksture. Korenika je nekoliko občutljiva na hmeljevo peronosporo, listi so odporni, storžki pa nekoliko občutljivi. Je dober gostitelj za hmeljeve listne uši. Aroma Aurore je intenzivna in prijetno hmeljna. Eteričnih olj je 1,1 do 1,8 ml/100 g, alfa kislin je nad 9 %, kohumulona je 24 %, razmerje med alfa in beta kislinami je okrog 2. Aurora ima odlično skladiščno obstojnost. Organoleptična ocena piva hmeljenega z Auroro je dobra. Je zelo primerna za ekstrakcijo in za kombiniranje z drugimi kultivarji. Auroro gojijo v Sloveniji, Avstriji in na Madžarskem (Kralj, 1992a; Šuštar-Vozlič in sod., 2002).

2.1.3.3 cv. Bobek

Bobek je slovenski kultivar, je križanec med kultivarjem angleškega izvora in slovenskim divjim hmeljem. Je srednje zgoden kultivar, optimalno zrel od 25. avgusta do 1. septembra. Rastline imajo obliko valja ali koša, tanke, močno razvejane zalistnike z značilnimi kratkimi internodiji, zaradi tega je cvetni nastavek nadpovprečno velik. Trta je tanka, robata in vijolično sivkasta. Listi so majhni, temno zeleni in gosto ožiljeni. Storžki so dolgi povprečno 20 mm, 100 suhih storžkov tehta 12 g, so majhni, okrogli, zeleni, gosto zraščeni in se pri strojnem obiranju ne drobijo. Bobek ima dobro razvit koreninski sistem. Uspeva na dobrih aluvialnih tleh z ilovnato in ilovnato-glinasto strukturo. Korenika bobka je občutljiva za hmeljevo peronosporo, listi so odporni, storžki so nekoliko občutljivi. Aroma je intenzivna, prijetno hmeljna. Eteričnih olj je 1,0 do 1,2 ml/100 g, kuhumulona 23 %, razmerje med alfa in beta kislinami je okrog 1. Bobek je srednje skladiščno obstojen. Z Bobkom hmeljeno pivo ima slabšo organoleptično oceno za grenčico kot Savinjski golding. Bobek pridelujemo samo v Sloveniji (Kralj, 1992a; Šuštar-Vozlič in sod., 2002).

2.1.3.4 cv. Celeia

Celeia je slovenski triploidni kultivar, križanec med Savinjskim goldingom in večkratnim križancem 105/58. Kultivar je pozen, optimalno zrel od 6. do 12. septembra. Rastline imajo obliko širokega valja, 100 cm dolge zalistnike, debelo in zeleno trto ter velike, temnozeleno liste. Storžki so dolgi povprečno 23 mm, 100 suhih storžkov tehta 14 g, so srednje gosto zraščeni, zeleni in se pri strojnem obiranju ne drobijo. Celeia uspeva na rjavih aluvialnih tleh s slabo propustnim podtaljem. Korenika je nekoliko občutljiva za hmeljevo peronosporo, listi so odporni, storžki so nekoliko občutljivi. Aroma je prijetno hmeljna. Eteričnih olj je 1,5 ml/100 g, kohumulona 24 %, razmerje med alfa in beta kislinami je okrog 1,1. Celeia je srednje skladiščno obstojna. S Celeio hmeljeno pivo ima

prijetno grenčico, ki je harmonično povezana z aromo (Kralj, 1992b; Šuštar-Vozlič in sod., 2002).

2.1.3.5 cv. Magnum

Magnum je nemški kultivar in je križanec med ameriškim kultivarjem Galena in moškim križancem 75/5/3. V Sortno listo Slovenije je bil vpisan leta 1998. Je srednje pozen kultivar, uvrščen v skupino grenčičnih kultivarjev. Rastline so zelo gosto zraščene, v tehnološki zrelosti so valjaste oblike. Zalistniki so dolgi viseči. Trta je groba, zelene barve. Listi so veliki, 3-5 krpati, grobi, listni rob je močno nazobčan. Razporeditev socvetij na rastlini je enakomerna, socvetje je srednje veliko. Storžek je velik, valjaste oblike, temno zelene barve. Storžki so dolgi 35 mm, 100 suhih storžkov tehta 37 g, so srednje gosto zraščeni in se pri strojnem obiranju ne drobijo. Kultivar je nagnjen k enodomnosti, tako da se občasno na ženski rastlini pojavijo tudi moška socvetja. Magnum zahteva dobre rastne pogoje in uspeva na dobrih hmeljskih tleh. Toleranten je na hmeljevo uvelost, na hmeljevo peronosporo je dobro odporen, občutljiv pa je na hmeljevo pepelovko in sivo plesen. Aroma je srednja. Eteričnih olj je 1,8 ml/100 g vzorca, kohumulona je 24-25 %, razmerje med alfa in beta kislinami je okrog 2,9. Magnum je zelo dobro skladiščno obstojen. Z Magnumom hmeljeno pivo ima visoko grenčično vrednost in dobro kakovost grenčice (Šuštar-Vozlič in sod., 2002).

2.1.3.6 cv. Taurus

Taurus je nemški kultivar, križanec med dvema križancema 82/39/37 (ženska rastlina) in 85/54/15 (moška rastlina). V Sortno listo Slovenije je bil vpisan 2002. Je srednje pozen kultivar. Rastline so v tehnološki zrelosti valjaste oblike. Zalistniki so srednje dolgi. Trta je srednje debela, zelena. Rastlina je gosto olistana. Listi so srednje veliki 3-5 krpati. Storžki so ovalni, srednje veliki, dolgi 25-40 mm, 100 suhih storžkov tehta 30 g, oblika je jajčasta. So gosto zraščeni, kompaktni in se pri strojnem obiranju ne drobijo. Taurus zahteva dobre rastne pogoje in uspeva na dobrih hmeljnih tleh. Taurus je tolerant na hmeljevo peronosporo, občutljiv pa na hmeljevo pepelovko in fuzarij. Aroma je srednja. Eteričnih olj je 1,4 %, kohumulona je 23-25 %, razmerje med alfa in beta kislinami je okrog 3,7. Taurus je zelo dobro skladiščno obstojen. S Taurusom hmeljeno pivo ima kakovostno grenčico in aromo (Šuštar-Vozlič in sod., 2002).

2.1.4 Sestava hmelja

Najvažnejše sestavine hmeljevega storžka so hmeljne smole, eterično olje in polifenoli, saj dajejo pivu okus, vonj in obstojnost (Rode in sod., 2002). Vsebnost in sestavine hmeljevih smol in eteričnega olja sodita med najpomembnejše značilnosti kultivarja in sta v množici gospodarsko zanimivih hmeljnih kultivarjev odločilna kriterija za razvrščanje v kakovostne razrede (Čeh Brežnik in Brežnik, 2003).

2.1.4.1 Hmeljne smole

Za pivovarstvo so hmeljne smole najpomembnejša skupina sestavin hmelja, saj so nosilec grenkega okusa piva. Delijo se na mehke in trde smole. Celotne so topne v metanolu in dietiletru. Mehke smole so tisti del smol, ki se topi v nižjih ogljikovodikih (heksan), trde smole pa so netopni preostanek. Glavne sestavine mehkih smol so alfa in beta kisline, nekaj pa je nedefiniranega ostanka. Trde smole delimo na trde smole, ki so prisotne v svežem hmelju in trde smole, ki nastanejo kot oksidacijski produkt alfa in beta kislin oziroma mehkih smol. Trde smole nimajo prave pivovarske vrednosti, saj od znanih oksidacijskih produktov ni nobeden zelo grenak, so pa tudi zelo slabo topni v sladici, tako da jih v pivu do sedaj še niso dokazali.

Alfa kisline so zmes homologov in analogov. Trije glavni homologi so: humulon, kohumulon in adhumulon, analoga pa sta prehumulon in posthumulon. Poznavanje deleža kohumulona v alfa kislinah je zelo pomembno, saj je velika vsebnost kohumulona v neposredni korelaciji s kvaliteto hmelja. Večji delež kohumulona je odgovoren za grobo in nekvalitetno grenčico piva.

Beta kisline so drugi najpomembnejši sestavni del smol in so prav tako kot alfa kisline zmes homologov. Zaradi slabe topnosti v sladici in še slabše v pivu so pivovarsko nepomembne. Vpliv beta kislin na kvaliteto piva je nepojasnen, čeprav nekateri pivovarji smatrajo, da je kvaliteta hmeljevega kultivarja odvisna tudi od razmerja med alfa in beta kislinami (Košir, 1995).

2.1.4.2 Eterično olje

Vse rastline vsebujejo hlapne komponente, ki jih skupno imenujemo eterično olje in dajejo rastlini značilen vonj. Glavne sestavine hmeljnega eteričnega olja so terpenski ogljikovodiki, med katerimi so najbolj zastopani mircen, humulen in kariofilen. Skupaj predstavljajo do 90 % olja. Preostali del so oksidacijski produkti teh sestavin in produkti oksidacije hmeljevih smol (Košir, 1995). Ker je eterično olje hlapno, se njegova vsebnost med sušenjem in skladiščenjem zmanjšuje. Pri daljšem nepravilnem skladiščenju pa pride do oksidacije sestavin olja, kar povzroči neprijeten vonj (Rode in sod., 2002).

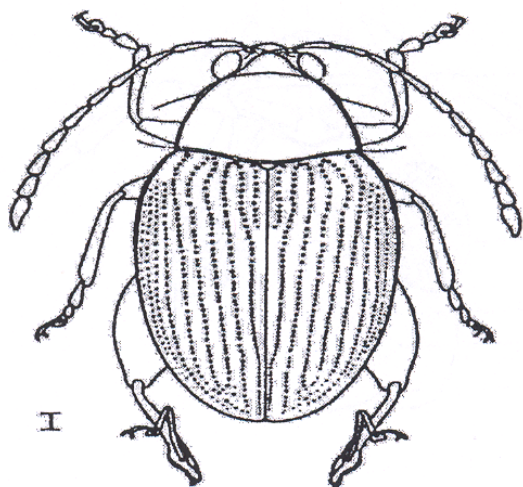
2.1.4.3 Polifenoli

Polifenoli so pomembne sestavine hmelja. Najvažnejši predstavniki skupine so: tanini, flavonoidi, antocianogeni, tanoidi. Antocianogeni so oligomeri v ječmenu in jih imenujemo flavanoli, pivovarji pa jih velikokrat poimenujejo antocianogeni. Polifenolne spojine hmelja so v pivu pomembne, saj se med varjenjem piva vežejo z beljakovinami in jih obarjajo, imajo pozitiven vpliv na okus piva, stabilizirajo grenčico, povečajo biološko in koloidno stabilnost piva ter stabilnost pene. Prevelika količina polifenolov lahko vpliva negativno, kar se kaže predvsem v povečani motnosti piva in spremembi okusa (Košir, 1995; Papagiannopoulos in Mellenthin, 2002; François in sod., 2006).

2.2 HMELJEV BOLHAČ

Hmeljev bolhač (*Psylliodes attenuatus* Koch) je škodljivec hmelja. Pojavlja se spomladi in zajeda hmeljeve liste. Pojavlja se tudi v avgustu, takrat poškoduje storžke hmelja (Rak-Cizej, 2003). Je eden od povzročiteljev zmanjšanja količine in kakovosti hmelja (Radišek in sod., 2003).

Hmeljev bolhač je majhen hrošč, dolg od 2,5 do 3,2 mm. Je temno zelene barve in se na soncu značilno kovinsko sveti. Na zadnjem paru nog ima močno razvite goleni, ki mu omogočajo skakanje na daljše razdalje. Ima tudi sposobnost letanja. Hmeljev bolhač je zelo poskočen in hiter, še posebno, v sončnem in toplem vremenu. V oblačnih in deževnih dneh pa se zadržuje na spodnji strani listov in v bližini tal. Njegovi glavni gostiteljski rastlini sta hmelj (*Humulus lupulus* L.) in konoplja (*Canabis sativa* L.), občasno pa se prehranjuje tudi na koprivi (*Urtica dioeca* L.). Hrošči prezimijo pod odpadlimi rastlinskimi deli, kamenjem, grudami zemlje in zgornji plasti tal. Spomladi, ko se dovolj otopli, pridejo hrošči na površje in se pričnejo prehranjevati s komaj odgnanimi hmeljnimi poganjki. Če se pojavijo v večjem številu, lahko naredijo na hmelju veliko škodo. Spomladi hrošči povzročajo škodo z izjedanjem zgornje povrhnjice listov, kateri v tem času hitro priraščajo. Tako se večajo tudi izjede in poškodovani listi so videti kot sito z velikimi luknjami. Pri močnejšem pojavu hrošči hmeljevega bolhača spomladi objedajo tudi stebela. Po parjenju samice hmeljevega bolhača odlagajo jajčeca v zgornjo plast zemlje, kjer tudi poteka njihov razvoj. Je holometabolna žuželka. Razvoj poteka od jajčeca preko ličink, ki se dvakrat levijo, do bube in odraslega hrošča. Nova generacija hmeljevega bolhača se pojavi poleti v času storžkanja in dozorevanja hmelja. Takrat hrošči povzročijo škodo na listih in storžkih. Škoda nastane predvsem na storžkih, poškodbe listov v tem času so skoraj nepomembne. Poškodovani storžki ostanejo razprti in zato je večja verjetnost, da se lupulinske žleze ne oblikujejo, na obiralnem stroju pa se takšni storžki tudi bolj drobijo. Lističi na hmeljnih storžkih so preluknjani, velikokrat pa hrošči pregrizejo tudi vretenca storžkov, zato se deli storžkov posušijo in porjavijo (Rak-Cizej in Žolnir, 2003).



Slika 4: Hmeljev bolhač (Rak-Cizej, 2003)

2.3 SEKUNDARNI METABOLITI RASTLIN

Rastline proizvajajo veliko različnih snovi organskega izvora, ki nimajo direktne vloge pri rasti in razvoju organizma. Te snovi ščitijo rastlino pred biotskimi (napadanje rastlin s strani škodljivcev, herbivorov, patogenih mikroorganizmov) in abiotskimi (pomanjkanje vode, poplave, vročina, mraz, slanost...) stresnimi dejavniki in jih imenujemo sekundarni metaboliti. V kraljestvu rastlin so manj razširjeni kot primarni metaboliti (aminokislina, nukleotidi, ogljikovimi hidrati, maščobne kisline). Posamezen sekundarni metabolit je kot obrambna molekula navadno le v eni vrsti ali v sorodnih vrstah rastlin. Primarni metaboliti pa so razširjeni v celotnem kraljestvu rastlin. Po mnenju biologov se je obramba rastlinam razvila preko dednih mutacij, naravne selekcije in evolucijskih sprememb. Mutacije v osnovni metabolični poti so pripeljale do nastanka novih spojin, ki toksično ali svarilno delujejo na herbivore ali patogene mikroorganizme. Če te spojine niso bile toksične do rastlin samih in jih niso proizvajale prekomerno, so imele te rastline sposobnost hitrejšega razmnoževanja kot tiste brez novih toksičnih metabolitov. Tako zaščitene rastline so imele več potomcev, so se evolucijsko razvijale in prenašale spremembe na naslednje generacije. Prav te zaščitne snovi, ki preprečujejo glivam, bakterijam, herbivorom, da bi uničile rastline in povečujejo njihovo reproduktivno sposobnost, povzročijo tudi neužitnost rastlin za človeka.

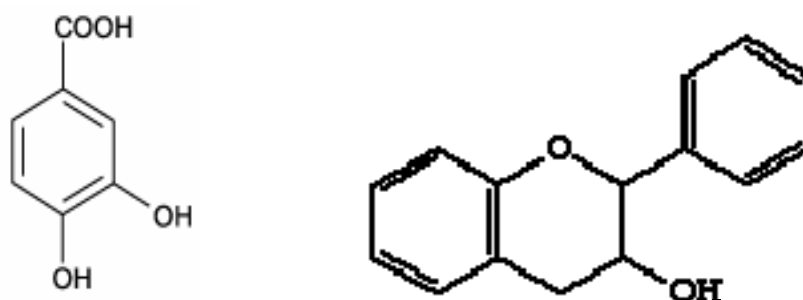
Sekundarne metabolite rastlin razdelimo v tri kemijsko različne skupine: terpenoide ali terpenoide ali izoprenoide, fenolne spojine in dušik vsebujoče komponente (Lincoln in Zeiger, 2002).

2.3.1 Fenolne spojine

Fenolne spojine so najbolj razširjena skupina rastlinskih sekundarnih metabolitov. Najdemo jih v skoraj vsem sadju in zelenjavi (Robards in sod, 1999). Sinteza fenolnih spojin se sproži iz fenotipa kot odgovor na napad herbivorov ali drugih abiotskih dejavnikov. Po kemijski definiciji so fenolne spojine tiste, ki imajo vsaj en aromatski obroč, na katerega je pripeta ena (fenoli) ali več (polifenoli) hidroksilnih skupin. V grobem lahko fenolne spojine delimo na:

- spojine z majhno molekulsko maso (enostavni fenoli (C_6), fenolne kisline (C_6-C_1) in flavonoidi ($C_6-C_3-C_6$),
- oligomere in polimere z relativno veliko molekulsko maso (tanini).

Lignini kot fenolne spojine ne spadajo v to razdelitev zaradi njihove nizke topnosti in različnih funkcij (Hättenschwiler in Vitousek, 2000).



Slika 5: Strukturna formula fenolne kisline in flavan-3-ola (monomerni prekurzor kondenziranih taninov) (Hättenschwiler in Vitousek, 2000)

Polifenoli imajo različne vloge v rastlinski fiziologiji in tudi človeškem življenju. Rastline ščitijo pred UV sevanjem, so obrambne snovi pred herbivori in patogeni, sodelujejo pri obarvanju rastlin in vplivajo na okus hrane in pijače (Hättenschwiler in Vitousek, 2000). Prispevajo k odpornosti rastlin proti mehanskim stresom (Abram in Simčič, 1997). Polifenolne spojine so kot učinkoviti antioksidanti del zdrave prehrane, ki je zdrav način življenja (Donko, 2001a).

2.4 STRES PRI RASTLINAH

Za rastline je stres vsaka sprememba v okolju, ki negativno vpliva na rast in razvoj rastline in s tem zmanjšuje produktivnost rastline. Reakcijo, ki jo vzbudi stres, imenujemo stresni sindrom, razmerje med poskusom rastline, da se prilagodi in potencialno uničujočimi procesi v celici, pa imenujemo stresna odzivnost (Majer, 2002).

Stres lahko povzročijo klimatski dejavniki (sončno sevanje, temperatura zraka, padavine, pomanjkanje hranil) ali dejavnost drugih rastlin (parazitizem), mikroorganizmov (glive, virusi, bakterije), živali (paša, teptanje) in človeka (onesnaževanje, obdelava). Ko se katerikoli od omenjenih faktorjev pojavi prvič, nastopi alarmna reakcija. V tem obdobju se rastlina odzove z velikimi odstopanji od normalnega stanja. Temu sledi stadij protireakcije oziroma rezistence, ko se začne rastlina prilagajati na stresni faktor. Sledi stadij kompenzacije ali utrditve, ko se stanje v rastlini normalizira. Če traja delovanje stresnega faktorja dalj časa, nastopi stadij izčrpanja rastline, ko se ponovno pojavijo velika odstopanja od normalnega stanja in običajno rastlina propade. Odzivnost rastline na stres je različna glede na genetsko zasnovo, starost, stopnjo prilagoditve in sezonsko oziroma dnevno aktivnost rastline. Znotraj iste rastlinske vrste so lahko na stres različni kultivarji različno odporni (Majer, 2002).

Rastline imajo razvite obrambne mehanizme proti napadalcem (herbivorom), ki povzročajo stres. Po napadu začnejo proizvajati majhne organske spojine, velike proteine ali encime, ki jih napadalci konzumirajo. Te snovi delujejo inhibitorno na prebavne proteaze, kar povzroči slabšo prebavo napadalca (Ryan, 2000).

Hmelj je občutljiv na vodni stres v kombinaciji s temperaturnim stresom kot tudi na stres zaradi prehranskih motenj. Hude poškodbe na hmeljnih rastlinah pa v rastni dobi povzročijo tudi vremenske nepravilnosti: toča, veter in močna sončna pripeka (Majer, 2002).

2.4.1 Prepoznavanje stresa

Hitro prepoznavanje potencialnega napadalca je prvi pogoj za začetek učinkovite obrambe rastline. Rastlina prepozna napadalca preko celične stene s pomočjo signalnih molekul, ki jih imenujemo elicitorji. Ločimo endogene in eksogene elicitorje. Prvi izvirajo iz celične stene, slednji pa iz napadalca (Somssich in Hahlbrock, 1998).

2.4.2 Prenos signala

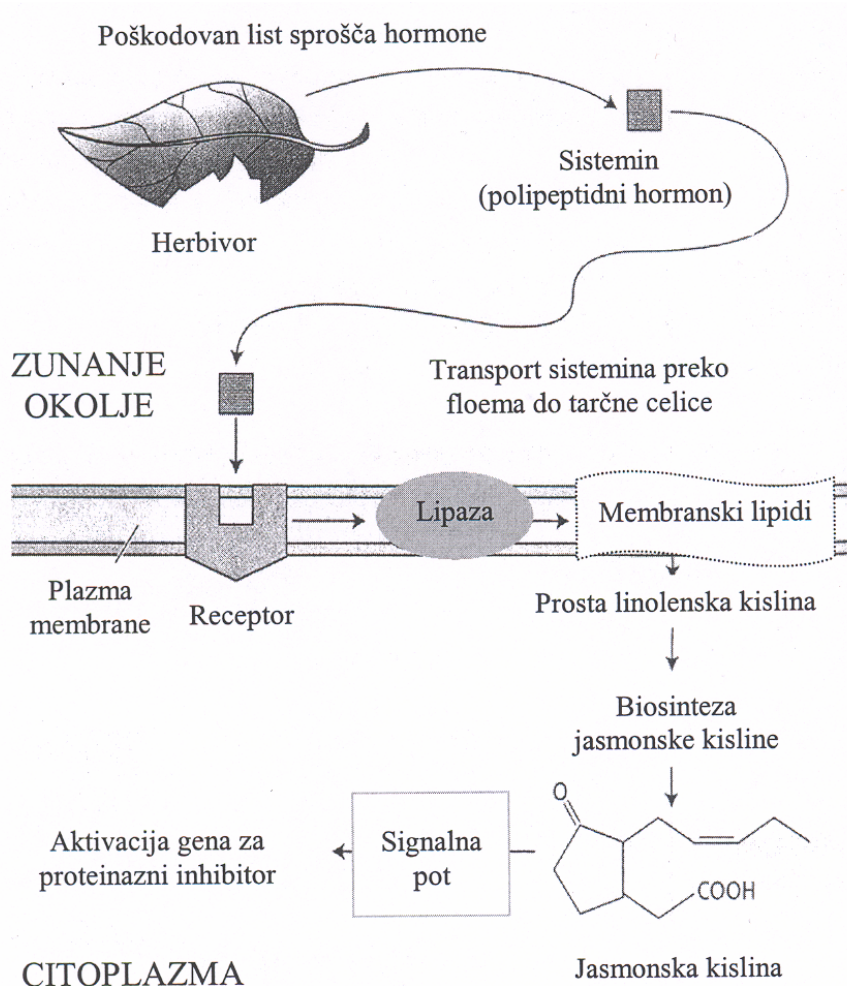
Ko rastlina preko receptorjev prepozna elicitorje, napadene celice pošljejo signale celičnim proteinom in genom v jedru. Prične se tvorba snovi, ki zavirajo rast patogenih organizmov. Nekateri signali so izključno intracelularni, v večini primerov pa se signal prenese tudi v sosednje celice ali po celi rastlini. V zadnjem primeru pravimo, da gre za sistemski odziv rastline. Najpogostejši prenašalci signala so protein kinaze, fosforilaze, fosfolipaze, ATP-aze, kalcijevi ioni, vodikov peroksid, etilen in druge molekule. Pri sistemskem prenosu signalov pa sodelujejo salicilna kislina, jasmonska kislina, sistemin, maščobne kisline, etilen in druge molekule (Agrios, 1997).

2.4.3 Herbivori so sprožilci sistemske poti

V rastlinah obrambne snovi niso konstantno prisotne, ampak se sintetizirajo po napadu herbivorov ali drugih patogenih napadalcev. Hranjenje insektov na paradižnikovih listih povzroči poškodbe tkiva, kar sproži hitro akumulacijo proteinaznih inhibitorjev po vsej rastlini, tudi na nepoškodovanih mestih. Produkcijo proteinaznih inhibitorjev v rastlini paradižnika je sprožilo kompleksno zaporedje dogodkov:

- v poškodovanih listih paradižnika se začne sinteza prekursorja proteina prosistemina, ki je sestavljen iz 200 aminokislin,
- prosistemin se proteolitično pretvori v protein 18 aminokislin, ki se imenuje sistemin in je polipeptidni rastlinski hormon,
- sistemin se sprosti iz poškodovanih celic v celično steno,
- nato se transportira iz poškodovanega lista preko floema do tarčne celice,
- v tarčni celici se poveže z določenim mestom na celični membrani in sproži biosintezo jasmonske kisline, ki je rastni regulator rastlin,
- jasmonska kislina aktivira ekspresijo genov, ki kodirajo proteinazne inhibitorje. Vloga ostalih signalnih molekul, kot so abscizinska kislina, salicilna kislina, pektinski fragmenti iz poškodovane celične stene, pa še ni povsem jasna (Lincoln in Zeiger, 2002).

Nizi kompleksne verige reakcij v signalni poti pospešijo nadaljnje reakcije. Glavna tarča signalnih molekul je jedro, kjer povzročijo aktivacijo ali inhibicijo genov (Somssich in Hahlbrock, 1998).



Slika 6: Shema signalne poti pri aktivaciji biosinteze proteinaznega inhibitorja v poškodovanih listih paradižnika (Lincoln in Zeiger, 2002).

Dovajanje sistemina v mlade rastline divjega paradižnika sproži aktivnost polifenoloksidaz (Constabel in sod., 1995).

2.4.4 Vloga celične membrane

Membrana celice zagotavlja fizično bariero med notranjostjo celice in njeno okolico ter različnimi subcelularnimi snovmi. Rastlinska celična membrana opravlja svojo nalogo kot nadaljnje funkcije celične stene, ko se le-ta odzove na biotske in abiotske vplive iz zunanosti. Njena glavna funkcija je regulirati spremembe informacij, ionov in metabolitov med celico in okoljem (Ephritikhine in sod., 2004).

Celična membrana je aktivno mesto za indukcijo obrambnih mehanizmov. Ko je rastlina izpostavljena stresu, se to pogosto kaže v strukturnih spremembah celične membrane in v spremembah njene propustnosti. Ko receptor prepozna elicitor, to sproži povečanje pritoka H^+ in Ca^{2+} ionov v celico ter povečanje iztoka K^+ in Cl^- ionov iz celice. To je predpogoj za aktivacijo specifične MAP-kinaze ter za sproščanje reaktivnih kisikovih spojin ob sodelovanju NAD(P)H-oksidge. Po vezavi elicitorja na receptor se začne sproščanje jasmonske kisline ob delovanju encima fosfolipaze. Fosfolipaza iz membrane sprosti linolensko kislino, ki se lahko pretvori v jasmonsko kislino. Spremembe na membrani imajo pomembno vlogo pri obrambi rastline pred napadalci (Agrios, 1997; Somssich in Hahlbrock, 1998).

Najpomembnejši obrambni mehanizmi, ki so povezani s celično membrano vključujejo:

- sproščanje molekul, ki so pomembne pri prenosu signalov,
- sproščanje in kopičenje lipooksigenaz,
- aktivacijo fenoloksidaz ter oksidacijo fenolnih komponent (Agrios, 1997).

2.5 POLIFENOLOKSIDAZA

Polifenoloksidaza (PPO; 1,2-benzendiol; oksidoreduktaza; EC 1. 10. 3. 1) je encim, poznan tudi po imenih kateholoksidaza, kateholaza, difenolaza, fenolaza, krezolaza in tirozinaza (Yoruk in Marshall, 2003).

Pojavlja se v obliki enojne polipeptidne verige ali pa je sestavljena iz večih podenot (Rusjan in sod., 2004). Spada med metaloencime, ki imajo vezane bakrove ione. Mesto, kjer sta na encim vezana dva bakrova iona, predstavlja aktivno mesto PPO. Vsak bakrov ion se pripenja na proteinsko verigo preko histidina. Na to aktivno mesto se veže molekularni kisik, ki ga PPO potrebuje za oksidacijo substratov (Marusek in sod., 2006).

PPO povzroča encimsko porjavenje sadja, zelenjave in gob, kar je nezaželeno, saj povzroča zmanjšanje prehranske vrednosti in slabšo senzorično kakovost. Sodeluje tudi v obrambnem sistemu rastlin (Shi in sod., 2001; Maki in Morohashi, 2005; Marusek in sod., 2006). Vpletena je v obrambno funkcijo, tako da povzroča modifikacije rastlinskih proteinov in ti povzročajo razkroj celic herbivorov ob napadu na rastlino. Številne študije kažejo, da PPO aktivnost naraste po izpostavljenosti rastline biotskim in abiotskim poškodbam (Thipyapong in sod., 1995). Znano je, da aktivnost polifenoloksidaze v rastlinah ni odvisna le od bioloških faktorjev (kultivarja, zrelosti, vsebnosti fenolnih spojin), ampak tudi od ravnanja s pridelkom po obiranju ali žetvi (Xu, 2005).

2.5.1 Razširjenost PPO

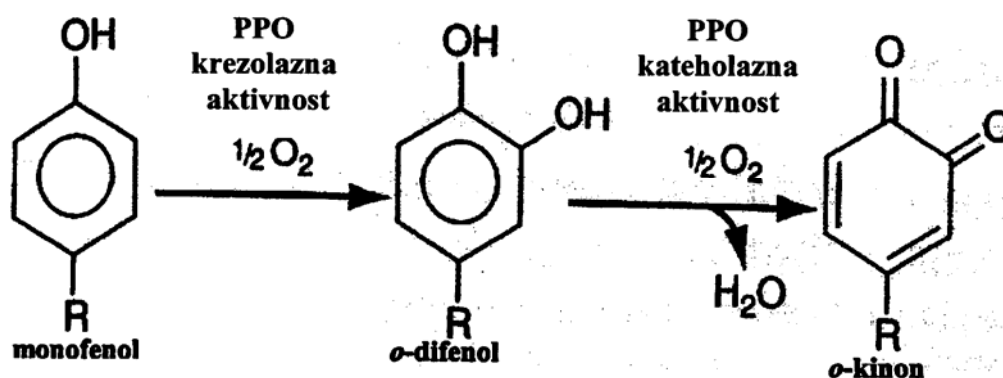
Najdemo jo v tkivih rastlin (Yoruk in Marshall, 2003). Prisotna je tudi v nekaterih bakterijah in glivah, nekaterih členonožcih in vseh sesalcih (Martinez in Whitaker, 1995). Znano je, da je aktivnost PPO višja v nezrelem sadju in mladih listih kot v zrelem sadju in starejših listih (Yoruk in Marshall, 2003). PPO je v različnih organelih: kloroplastih (tilakoidah), mitohondrijih in peroksisomih (Nicolas in sod., 2003). V rastlinah so jo našli

v topni obliki in tudi vezano na membrano. Vendar histokemijske raziskave kažejo, da je PPO vezana v kloroplastih. PPO gen je namreč kodiran v jedru, translacija poteka v citoplazmi na ribosomih, formira se prekursor PPO, ki se transportira v kloroplaste, kjer se pripne na membrano in pomočjo proteinaze preide v aktivno obliko (Martinez in Whitaker, 1995; Yoruk in Marshall, 2003). Ker je PPO močno vezana na membrano, je njena ekstrakcija težavna. Pri raziskavi ekstrakcije PPO iz listov čajevca so ugotovili, da je uporaba neionskega detergenta Triton X-114 bolj učinkovita kot uporaba Tritona X-100. Neionski detergent povzroči minimalno denaturacijo proteinov, zaradi česar pride do ločbe lipidnega sloja v membrani kloroplasta, kar povzroči sprostitev membransko vezanih proteinov (PPO) v vodno fazo (Burton in Kirchmann, 1997).

2.5.2 Reakcije, ki jih katalizirajo PPO

Oksidoreduktaze so encimi, ki katalizirajo oksidacijsko redukcijske reakcije. Substrat, ki ga oksidirajo, ponavadi imenujemo donor vodika. Znotraj skupine oksidoreduktaz imamo 14 podskupin encimov, katerih sistematično ime naj bi temeljilo na sistemu donor proti akceptorju. Med te encime spadata tudi polifenoloksidaza in peroksidaza. To sta fenoloksidazi, ki oksidirata fenolne substrate v kinone (Rusjan in sod., 2004).

PPO je splošno ime za encim, ki deluje na več načinov. Lahko katalizira nastanek *o*-kinonov iz različnih fenolov. To sta krezolazna (hidroksilaza) in kateholazna (oksidaza) aktivnost. Krezolaza najprej katalizira hidroksilacijo monofenolov v *o*-difenoole (monofenolazna aktivnost), nato kateholaza oksidira nastale *o*-difenoole v *o*-kinone (difenolazna aktivnost) ob prisotnosti kisika kot primarnega oksidanta. Prisotnost bakrovega iona kot prostetične skupine vezane na PPO je esencialnega pomena za njeno aktivnost (Yoruk in Marshall, 2003).



Slika 7: Reakcija katalizirana s PPO (Nicolas in sod, 2003)

2.5.2.1 Neencimsko porjavenje

Encimski reakciji s PPO sledi neencimska reakcija, pri kateri pride do porjavenja (Nicolas in sod., 2003). Do porjavenja pride zaradi stresnih dejavnikov (mehanske pokodbe), ki vodijo do vdora kisika do PPO. Potečeta zgoraj omenjeni reakciji. Nastali kinoni kondenzirajo ali polimerizirajo v polimere, ki jih imenujemo melanini (Yoruk in Marshall, 2003). Melanini so spojine z veliko molekulsko maso. So rjavi in črni pigmenti, ki se nahajajo v tkivih rastlin in živali (Riley, 1997; Wang in sod., 2006). Med reakcijo ne pride le do spremembe barve, ampak navadno tudi do neželenih sprememb teksture in arome (Erat in sod., 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Hmelj

3.1.1.1 Storžki

Pri poskusu smo uporabljali nepoškodovane storžke šestih različnih kultivarjev: Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding in Taurus. Vzgojili so jih v hmeljišču poleg Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec in pobrali v času tehnološke zrelosti hmelja, to je bilo v dneh od 28. avgusta do konca avgusta.

3.1.1.2 Listi

Pri poskusu smo uporabljali tudi liste hmelja šestih različnih kultivarjev: Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding in Taurus. Kot primerjalne vzorce smo uporabili liste velike koprive in navadne konoplje. Listi so bili nepoškodovani, mehansko poškodovani ali pa so jih poškodovali hmeljevi bolhači. Rastline hmelja so vzgojili v hmeljišču poleg Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. Nepoškodovane liste teh rastlin so pobrali v času tehnološke zrelosti hmelja, to je bilo v dneh od 28. avgusta do konca avgusta. Rastline hmelja, velike koprive in navadne konoplje, ki so jih kasneje mehansko poškodovali ali pustili, da jih je napadel hmeljev bolhač, pa so vzgojili v rastlinjaku na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec.

3.1.1.3 Vzgoja sadik hmelja

Jeseni meseca oktobra so narezali sadike iz enoletnega podzemnega dela stebela hmelja. Sadike so shranili v hladilnik na temperaturo 4 °C. V mesecu januarju so tako shranjene sadike posadili v lonce, katere so napolnili s 6 litri substrata za surfinije proizvajalca Gramoflor, ki vsebuje 70 % bele šote, 20 % črne šote, 10 % gramovlaken, 1 kg/m³ PG-mix (to je NPK gnojilo z dodatkom mikroelementov), 200 g/m³ železa (Fe) in 200 g/m³ protignilobnega fungicida radigena. Substrat ima pH 5,2-6,0. Lonci s sadikami so bili postavljeni v rastlinjak, kjer je bila povprečna temperatura zraka 22 °C in 70 % relativna zračna vlaga. Odgnale sadike s petimi internodiji so porezali in iz njih naredili potaknjence, katere so dali na ukoreninjenje. Ukoreninjene sadike so posadili v manjše lončke volumna 300 ml in premera 7,5 cm, v katere so dali enak substrat kot v večje lonce.

3.1.2 Reagenti

Pri delu smo uporabili analitsko čiste reagente podjetij SIGMA GmbH. in BIO-RAD LABORATORIES GmbH., Nemčija.

3.1.3 Aparature

Pri delu smo uporabljali naslednje aparature:

- tehtnici: Exacta 2200 EB, Tehnica, Železniki, Slovenija,
AT 201/A analitska tehtnica, Mettler Toledo, Trzin, Slovenija,
- mešalo za epruvete Vibromix 104 EV, Tehnica, Železniki, Slovenija,
- avtomatske pipete Eppendorf, Nemčija,
- pH meter MA 5705, Iskra, Slovenija,
- centrifuga Eppendorf 5415 C, Nemčija,
- vodna kopel, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija,
- spektrofotometer Hewlett-Packard, model HP 8453, Nemčija,
- jeklenka s tekočim dušikom, model Apollo, Messer Griesheim, Nemčija,
- posoda za tekoči dušik,
- magnetna mešala MM, Tehnica, Železniki, Slovenija,
- avtomatske pipete Eppendorf, Nemčija,
- štoparica.

3.2 METODE

3.2.1 Polifenoloksidazna aktivnost storžkov hmelja

Nepoškodovanim storžkom šestih različnih kultivarjev hmelja, ki so jih vzgojili in pobrali v hmeljišču poleg Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, smo določili polifenoloksidazno aktivnost. Storžke so pobrali na dveh mestih rastline: spodaj in zgoraj. Nekatere storžke so po obiranju takoj zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako so jih hranili do analize približno eno leto. Nekatere pa so najprej posušili. Sušenje je potekalo 24 ur pri $60 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ v sušilnikih z ventilatorji. Nato so posušene storžke zamrznili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ti pa so bili do analize shranjeni dve leti. Specifično polifenoloksidazno aktivnost smo določili tako, da smo najprej izolirali polifenoloksidazo iz vzorcev, nato smo določili masno koncentracijo proteinov in spektrofotometrično izmerili polifenoloksidazno aktivnost.

3.2.1.1 Izolacija polifenoloksidaz iz storžkov

Princip

Polifenoloksidaze smo skupaj s peroksidazami izolirali iz storžkov, ki so bili shranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri ekstrakciji in delnem čiščenju encimov smo uporabili neionski detergent Triton TX-114 (TX-114), ki je blag detergent in omogoča ekstrakcijo encimov v latentni obliki. Za izolacijo smo uporabili delno modificirano metodo, ki jo opisujejo Thipyapong in sod. (Thipyapong in sod., 1995), Burton in Kirchmann (Burton in Kirchmann, 1997) ter Donko (Donko, 2001b). TX-114 omogoča popolno odstranitev klorofila, ki bi lahko motil pri nadaljnjem delu. Po segrevanju na $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ preide klorofil v spodnjo fazo, bogato s Tritonom TX-114, medtem ko polifenoloksidaze in peroksidaze ostanejo v vodni fazi. S previdnim ločevanjem faz je mogoče encim zadovoljivo očistiti. V pufrsko mešanico smo dodali tudi polivinilpolipirrolidon (PVPP), ki veže fenolne spojine, katere bi se lahko med izolacijo oksidirale ali vezale na beljakovine in jih oborile. Ker so v rastlinah prisotni proteolitični encimi, je potrebno v ekstrakcijski pufer dodati inhibitor proteinaz. Proteinaze bi namreč lahko med izolacijo cepile polipeptidne verige izoliranih encimov in jih tako inaktivirale. Uporabili smo fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF), ki je zelo slabo topen v vodi, zato smo ga predhodno raztopili v minimalni količini n-propanola (Donko, 2001b).

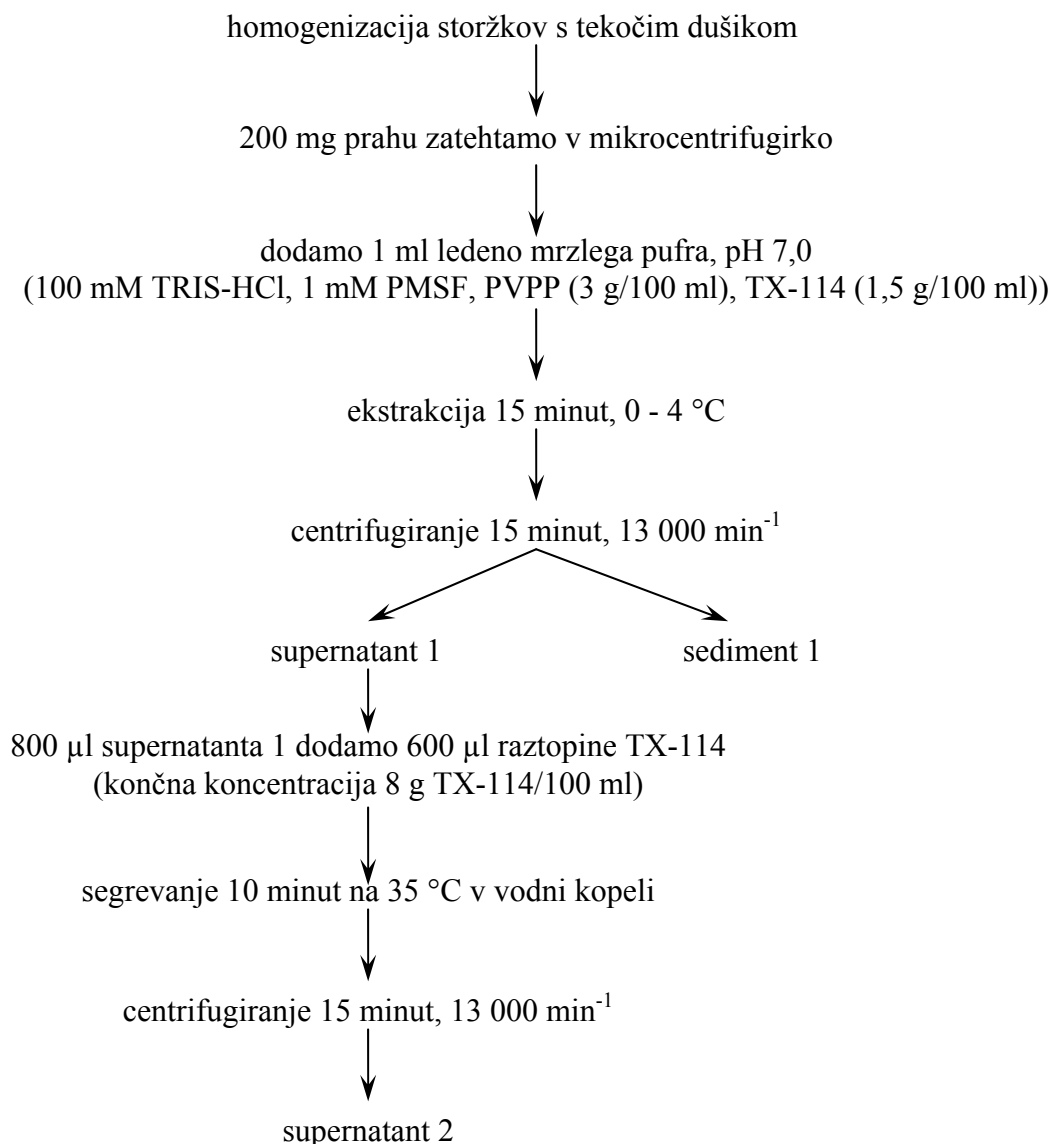
REAGENTI:

- raztopina Tritona TX-114 s koncentracijo 16,7 g/100 ml (Sigma, GmbH., Nemčija)
- polivinilpolipirrolidon (PVPP) (Sigma, GmbH., Nemčija)
- fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF) (Sigma, GmbH., Nemčija)
- ekstrakcijski pufer: 100 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF, 3 g/100 ml PVPP, 1,5 g/100 ml Tritona TX-114, pH 7,0
- 100 mM Tris-HCl pufer, pH 7,0

Izvedba

Zamrznjene storžke hmelja smo v tarilnici pazljivo prelili s tekočim dušikom in jih s pomočjo pestiča zdrobili v fin prah. V 1,5 ml mikrocentrifugirko smo zatehtali 200 mg s tekočim dušikom homogeniziranih listov ali storžkov hmelja. Dodali smo 1 ml ledeno

mrzlega ekstrakcijskega pufra, dobro premešali na mešalcu za epruvete Vibromix 104 EV in ekstrahirali 15 minut pri 0 – 4 °C. Med ekstrakcijo smo zmes večkrat pomešali. Nato smo ekstrakt centrifugirali 15 minut pri 13 000 min⁻¹ v Eppendorf 5415 C centrifugi. Zelenkast supernatant 1 smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, sediment 1 pa zavrgli. Odvzeli smo 800 µl supernatanta 1 in mu dodali 600 µl raztopine Tritona TX-114 v 100 mM Tris-HCl puftru, pH 7,0, tako da je bila končna koncentracija Tritona TX-114 v mikrocentrifugi 8 g/100 ml. Zmes smo dobro premešali na mešalcu za epruvete Vibromix 104 EV in v vodni kopeli segrevali 10 minut pri 35 °C. Tudi med segrevanjem smo zmes nekajkrat na hitro premešali. Zmes smo takoj centrifugirali 15 minut pri 13 000 min⁻¹ in previdno s kapalko ločili bister supernatant 2 od sedimenta 2, ki je bil od rumenkaste do zelene barve in smo ga zavrgli. Supernatant 2 smo uporabili za spektrofotometrično določanje beljakovin in polifenoloksidazne aktivnosti. Supernatant 2 smo po končani izolaciji do pričetka nadaljnjih analiz hranili v ledeno mrzli kopeli. Potek izolacije prikazuje sledeča shema:



Slika 8: Shema izolacije polifenoloksidaze (PPO) storžkov hmelja

3.2.1.2 Določanje proteinov

Princip

Metoda temelji na merjenju absorbance modro obarvanega produkta, ki nastane po dodatku barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) raztopini proteinov. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 595 nm, pri kateri je absorpcijski maksimum. Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili raztopino govejega serumskega albumina. Koncentracijo proteinov smo odčitali iz umeritvene krivulje (Bradford, 1976).

REAGENTI:

- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Nemčija)
- goveji serumski albumin (Sigma, GmbH., Nemčija)
- 100 mM Tris-HCl pufer, pH 7,0

Izvedba

Priprava slepega vzorca:

V plastično kiveto smo pipetirali 2,4 ml 100 mM Tris-HCl pufera, pH 7,0 in dodali 0,6 ml reagenta CBB, dobro premešali in pustili 10 do 15 minut, da se je razvila barva.

Priprava umeritvene krivulje z govejim serumskim albuminom:

Pripravili smo raztopino govejega serumskega albumina (BSA) z masno koncentracijo 100 µg/ml, tako da smo zatehtali 2,5 mg, jih kvantitativno prenesli v 25 ml merilno bučko in do oznake dopolnili s 100 mM Tris-HCl, pH 7,0 ter dobro premešali. Tako smo dobili raztopino s koncentracijo 100 µg BSA/ml.

V plastične kivete smo pipetirali: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 450 µl in 500 µl tako pripravljene raztopine BSA. Kot topilo smo dodali 100 mM Tris-HCl pufera, pH 7,0: 2,35 ml, 2,30 ml, 2,20 ml, 2,10 ml, 2,00 ml, 1,95 ml, 1,90 ml. Nato smo v vsako kiveto pipetirali še 0,6 ml CBB reagenta, tako da je bil končni volumen vedno 3 ml, dobro premešali ter po 10 do 15 minutah izmerili absorbanco pri 595 nm. Iz dobljenih podatkov smo narisali umeritveno krivuljo (slika 10).

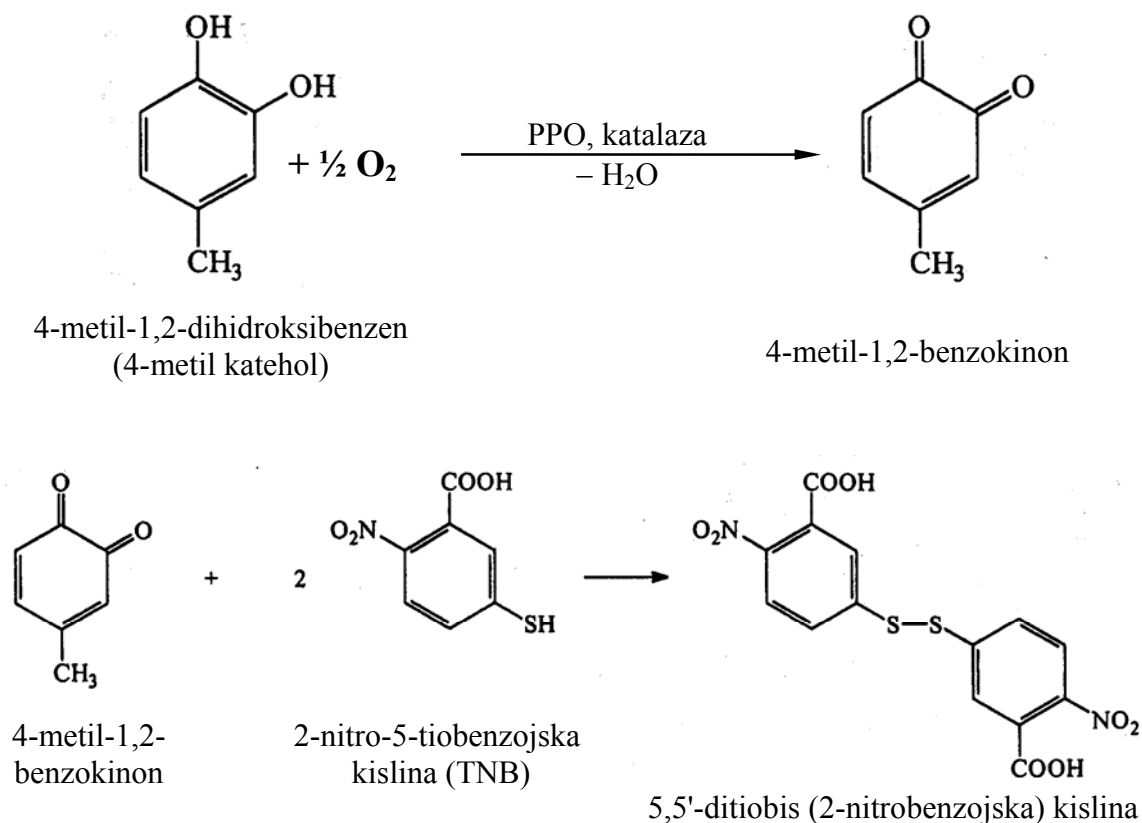
Določanje proteinov v vzorcih:

Proteine smo določali v supernatantu 2. V plastično kiveto smo dodali 2,3 ml 100 mM Tris-HCl pufera, pH 7,0, 100 µl vzorca in 0,6 ml CBB reagenta ter dobro premešali. Po potrebi smo vzorec redčili, da smo ostali v območju umeritvene krivulje. Po 10 do 15 minutah smo pri 595 nm izmerili absorbanco. Vse vzorce smo pripravili v 3 ali 4 ponovitvah. Koncentracijo proteinov smo odčitali iz umeritvene krivulje.

3.2.1.3 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti

Aktivnost polifenoloksidaz smo merili spektrofotometrično po metodi, ki jo opisujejo Esterbauer in sod. (Esterbauer in sod., 1977). Metoda temelji na spremljanju razbarvanja raztopine pod vplivom delovanja polifenoloksidaz. Metoda je posredna, ker nastali oksidacijski produkti (kinoni), ki bi inhibitorno delovali na encime, reagirajo z 2-nitro-5-tiobenzojsko kislino (TNB) v reakcijski mešanici in raztopina preide iz intenzivno rumene barve v brezbarvno.

Polifenoloksidaze oksidirajo 4-metil katehol v prisotnosti kisika v 4-metil-1,2-benzokinon. Ta reagira z 2-nitro-5-tiobenzojsko kislino (TNB), pri čemer reagirata 2 mola TNB z 1 molom kinona, kot prikazuje reakcija na sliki 9. Zmanjševanje absorbance smo spremljali pri valovni dolžini 412 nm. Ker smo spremljali samo polifenoloksidazno aktivnost, smo v reakcijsko zmes dodali katalazo, s čimer smo odstranili vodikov peroksid in tako odstranili prispevek peroksidaz k oksidaciji substrata.



Slika 9: Reakciji, ki potekata pri določanju polifenoloksidazne aktivnosti (Esterbauer in sod., 1977)

REAGENTI:

- 100 mM Tris-HCl pufer, pH 7,0
- 4-metil katehol (Sigma, GmbH., Nemčija)
- katalaza (Sigma, GmbH., Nemčija)
- 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojska) kislina (Sigma, GmbH., Nemčija)
- natrijev borhidrid (NaBH_4) (Sigma, GmbH., Nemčija)
- 2-nitro-5-tiobenzojska kislina (TNB) (19 mg 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojske) kisline + 30 mg NaBH_4 v 10 bidestilirane vode; po 1 uri se disulfidna vez kvantitativno reducira v intenzivno rumen, vodotopni tiol)

Izvedba

V 25 ml merilno bučko smo kvantitativno prenesli 6,4 mg substrata 4-metil katehola, tako da smo ga spirali z nekaj ml 100 mM Tris-HCl pufra, pH 7,0, nato smo dodali 269 μ l sveže pripravljene TNB in 789 μ l katalaze z aktivnostjo 8000 U/ml (tako, da je bila v kiveti aktivnost katalaze 244 U/ml) ter z 100 mM Tris-HCl pufrom, pH 7,0 dopolnili do oznake in dobro premešali. Takoj smo pričeli z merjenjem, saj je tako pripravljena raztopina obstojna le 20 do 30 minut, zaradi avtooksidacije substrata.

V plastično kiveto smo pipetirali 2,9 ml raztopine substrata. Postavili v spektrofotometer Hewlett-Packard HP 8453 in pričeli z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 412 nm 60 sekund vsako sekundo za slepi vzorec. Nato smo v kiveto pipetirali 100 μ l supernatanta 2, hitro premešali in nadaljevali z merjenjem absorbance še 120 sekund vsako sekundo. Spektrofotometer je meril absorbanco v odvisnosti od časa.

3.2.1.4 Statistična analiza

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software. Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Model).

Za obdelavo podatkov, pridobljenih v hmeljišču, smo uporabili statistični model 2:

$$y_{ijkl} = \mu + S_i + K_j + S*K_{ij} + L_k + e_{ijkl}$$

y_{ijkl} = opazovana vrednost;

μ = povprečna vrednost;

S_i = vpliv i-tega kultivarja; i= Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding, Taurus;

K_j = vpliv j-tega dela rastline; j= list, storžek, suh storžek;

$S*K_{ij}$ = vpliv interakcije i-tega kultivarja in j-tega dela rastline;

L_k = vpliv k-te lokacije na rastlini; k= zgoraj, spodaj;

e_{ijkl} = ostanek.

Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju.

3.2.2 Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov hmelja iz hmeljišča

Šest različnih kultivarjev hmelja so vzgajali v hmeljišču poleg Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. Nepoškodovane liste so takoj po obiranju zamrznili. Specifično polifenoloksidazno aktivnost smo določili tako, da smo najprej izolirali polifenoloksidazo iz vzorcev, nato smo določili masno koncentracijo proteinov in spektrofotometrično izmerili polifenoloksidazno aktivnost.

3.2.2.1 Izolacija polifenoloksidaz iz listov

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.1. Potek izolacije je bil enak shemi na sliki 8.

3.2.2.2 Določanje proteinov

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.2.

3.2.2.3 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.3.

3.2.2.4 Statistična analiza

Statistična obdelava podatkov je opisana v točki 3.2.1.4.

3.2.2.5 Vpliv različnega časa dodajanja katalaze

Naredili smo tudi enak poskus kot je opisan v točki 3.2.1.3, le da smo katalazo pustili v stiku s substratom 15 min pred reakcijo.

V mikrocentrifugirko smo pipetirali 10 μ l katalaze z aktivnostjo 71260 U/ml (tako, da je bila v kiveti aktivnost katalaze 244 U/ml) in dodali 100 μ l supernatanta 2, dobro premešali na mešalcu za epruvete Vibromix 104 EV ter pustili 15 minut na sobni temperaturi. Po 14 minutah smo pričeli z merjenjem absorbance slepega vzorca ravno tako pri 412 nm. Slepemu vzorcu smo pripravili tako, da smo v plastično kiveto pipetirali 2,890 ml raztopine substrata, ki smo jo pripravili po postopku kot je opisan zgoraj, le da nismo dodali katalaze. Slepemu vzorcu smo merili absorbanco 60 sekund vsako sekundo, nato pa smo v kiveto pipetirali 110 μ l zmesi supernatanta 2 in katalaze, v trenutku ko sta bila v stiku točno 15 minut, hitro premešali in nadaljevali z merjenjem absorbance še 120 sekund vsako sekundo. Polifenoloksidazno aktivnost smo nato izračunali s pomočjo naklonov premice slepega vzorca in supernatanta, masne koncentracije proteinov ter volumna vzorca.

3.2.2.6 Statistična analiza

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software. Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Model).

Za obdelavo podatkov, pridobljenih z dvema metodama, smo uporabili statistični model 3:

$$y_{ij} = \mu + M_i + e_{ij}$$

y_{ij} = opazovana vrednost;

μ = povprečna vrednost;

M_i = vpliv i -te metode; i = metoda, ko katalaza pride v stik z vzorcem in substratom hkrati, metoda, ko katalaza je katalaza v stiku z vzorcem 15 min pred reakcijo;

e_{ij} = ostanek.

Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju.

3.2.3 Polifenoloksidazna aktivnost mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka

3.2.3.1 Pobiranje listov po 17. urah

Pri poskusu smo uporabljali liste hmelja šestih različnih kultivarjev: Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding in Taurus. Kot primerjalne vzorce smo uporabili liste velike koprive in navadne konoplje. Vse rastline so vzgojili v rastlinjaku na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec.

Indukcija polifenoloksidaz po mehanski poškodbi v listih rastlin

Šest tednov stare liste so mehansko poškodovali, saj naj bi to ponazarjalo poškodbe rastlin kot jih napade hmeljev bolhač. Po obiranju so liste takoj zamrznili in jih tako hranili do analize približno en mesec. Specifično polifenoloksidazno aktivnost smo določili tako, da smo najprej izolirali polifenoloksidazo iz vzorcev, nato smo določili masno koncentracijo proteinov in spektrofotometrično izmerili polifenoloksidazno aktivnost.

Izvedba

V vsak posamezen list so z luknjačem naredili 2-5 lukenj v premeru 5-6 mm. Takrat so bile rastline stare šest tednov, to je čas od ukoreninjenja do višine 40-50 cm. Liste so poškodovali 17 ur preden so jih pobrali.

3.2.3.2 Izolacija polifenoloksidaz iz listov

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.1, potek izolacije predstavlja shema na sliki 8.

3.2.3.3 Določanje proteinov

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.2.

3.2.3.4 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.3.

3.2.3.5 Statistična analiza

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software. Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Model).

Za obdelavo podatkov, pridobljenih v rastlinjaku, smo uporabili statistični model 1:

$$y_{ijk} = \mu + S_i + P_j + S * P_{ij} + e_{ijk}$$

y_{ijk} = opazovana vrednost;

μ = povprečna vrednost;

S_i = vpliv i-tega kultivarja; i= hmelj (Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding, Taurus), velika kopriva, navadna konoplja;

P_j = vpliv j-te poškodbe; j= nepoškodovan list, mehansko poškodovan list, s hmeljevim bolhačem poškodovan list;

$S * P_{ij}$ = vpliv interakcije i-tega kultivarja in j-te poškodbe;

e_{ij} = ostanek.

Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju.

3.2.4 Polifenoloksidazna aktivnost mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka druge serije

3.2.4.1 Pobiranje listov po 8., 25., 50. in 75. urah

Izvedba

V vsak posamezen list so z luknjačem naredili 2-5 lukenj v premeru 5-6 mm. Takrat so bile rastline stare približno šest tednov, to je čas od ukoreninjenja do višine 40-50 cm. Liste so poškodovali 8, 25, 50 in 75 ur preden so jih pobrali. Po obiranju so liste takoj zamrznili in jih tako hranili do analize približno en mesec.

3.2.4.2 Izolacija polifenoloksidaz iz listov

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.1, potek izolacije predstavlja shema na sliki 8.

3.2.4.3 Določanje proteinov

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.2.

3.2.4.4 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.3.

3.2.4.5 Statistična analiza

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software. Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Model).

Za obdelavo podatkov, pridobljenih v rastlinjaku ob različnih časih, smo uporabili statistični model 4:

$$y_{ijk} = \mu + S_i + C_j + S*C_{ij} + e_{ijk}$$

y_{ijk} = opazovana vrednost;

μ = povprečna vrednost;

S_i = vpliv i-tega kultivarja; i= hmelj (Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding, Taurus), velika kopriva, navadna konoplja;

C_j = vpliv j-tega časa merjenja; j= 0h, 8h, 25h, 50h, 75h;

$S*C_{ij}$ = vpliv interakcije i-tega kultivarja in j-tega časa merjenja;

e_{ijk} = ostanek.

Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju.

3.2.5 Polifenoloksidazna aktivnost s hmeljevim bolhačem poškodovanih listov iz rastlinjaka

Pri poskusu smo uporabljali liste hmelja šestih različnih kultivarjev: Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding in Taurus. Kot primerjalne vzorce smo uporabili liste velike koprive in navadne konoplje. Rastline so vzgojili v rastlinjaku na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec.

3.2.5.1 Indukcija polifenoloksidaz v listih rastlin po poškodbi s hmeljevim bolhačem

Rastline so pustili, da jih je napadel hmeljev bolhač, saj smo želeli ugotoviti ali se po poškodbah listov, ki jih povzroča grizljanje hmeljevega bolhača, poveča aktivnost polifenoloksidaz. Po obiranju so liste takoj zamrznili in jih tako hranili do analize približno en mesec. Specifično polifenoloksidazno aktivnost smo določili tako, da smo najprej izolirali polifenoloksidazo iz vzorcev, nato smo določili masno koncentracijo proteinov in spektrofotometrično izmerili polifenoloksidazno aktivnost.

Izvedba

Rastline so bile stare šest tednov, to je čas od ukoreninjenja do višine 40-50 cm, ko so na rastline naselili hmeljevega bolhača in ga pustili v stiku z njimi 24 ur. Nato so liste pobrali in jih do analize zamrznili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5.2 Izolacija polifenoloksidaz iz listov

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.1, potek izolacije predstavlja shema na sliki 8.

3.2.5.3 Določanje proteinov

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.2.

3.2.5.4 Določanje polifenoloksidazne aktivnosti

Princip in izvedba sta opisana v točki 3.2.1.3.

3.2.5.5 Statistična analiza

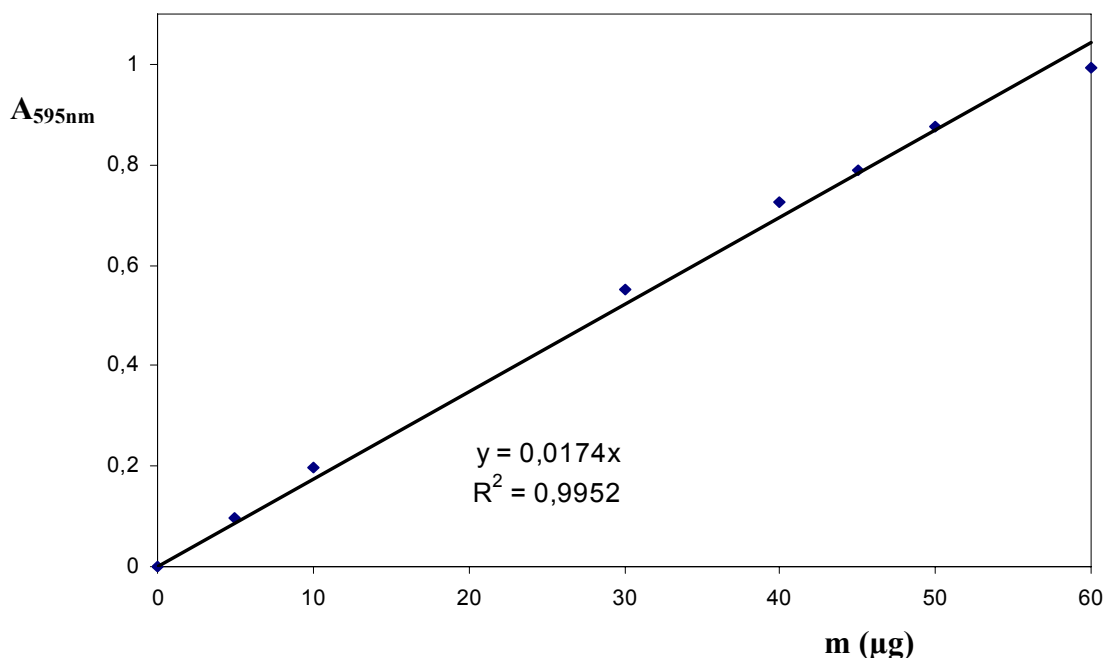
Statistična obdelava podatkov je opisana v točki 3.2.3.5.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V vseh supernatantih 2, ki smo jih pripravili po shemi na sliki 8 iz storžkov ali listov rastline hmelja, smo določili koncentracijo proteinov in specifično aktivnost polifenoloksidaz.

4.1 DOLOČANJE PROTEINOV

Koncentracijo proteinov smo določili po Bradfordovi metodi, ki je opisana točki 3.2.1.2. Maso proteinov smo odčitali iz umeritvene krivulje (slika 10), narejene iz raztopin govejega serumskega albumina.



Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradfordu (Bradford, 1976)

Enačba premice (slika 10), na podlagi katere smo izračunali koncentracijo proteinov, je:

$$A_{595} = 0,0174 \times m$$

pri čemer je bila A_{595} absorbanca pri valovni dolžini 595 nm in m masa proteinov v raztopini govejega serumskega albumina (µg). Korelacijski koeficient je bil $R^2 = 0,9952$. Masno koncentracijo smo izračunali s pomočjo naslednje enačbe:

$$\gamma_{proteinov} = \frac{m}{V_{vz}}$$

pri čemer je bila $\gamma_{proteinov}$ masna koncentracija (mg/ml), m masa proteinov v raztopini govejega serumskega albumina (μg) in V_{vz} volumen vzorca oziroma supernatanta 2 (ml). Koncentracije proteinov v vseh analiziranih vzorcih so zbrane v prilogah A1 do A5.

4.2 DOLOČANJE POLIFENOLOKSIDAZNE AKTIVNOSTI

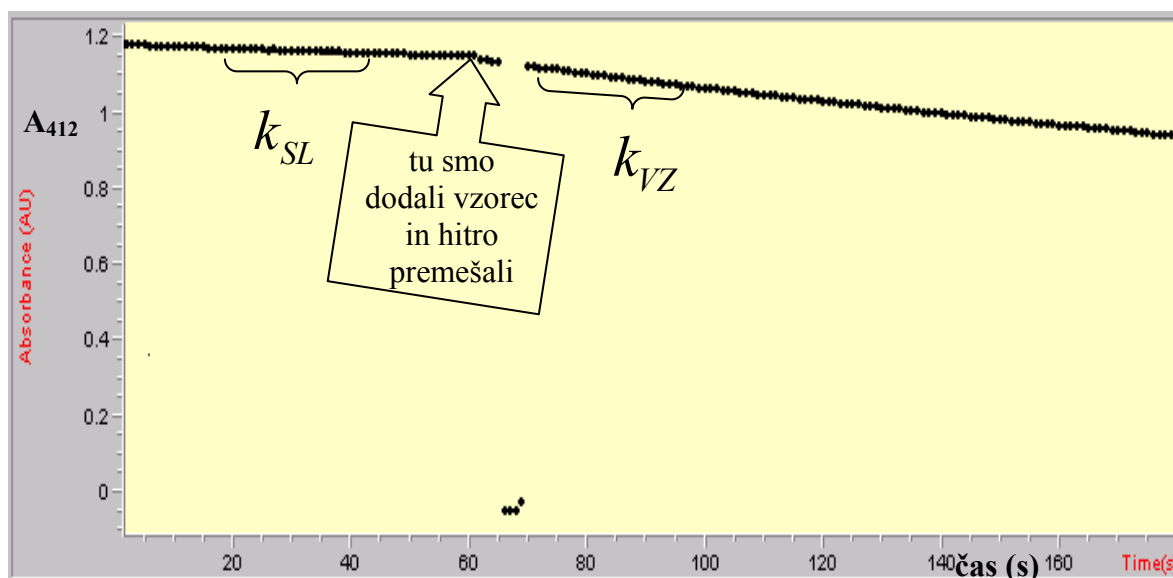
Polifenoloksidazno aktivnost smo določali spektrofotometrično s pomočjo računalniškega programa Kinetics. Po končanem merjenju smo s programom Excel izrisali graf A_{412} v odvisnosti od t (s) in izračunali naklon tangente na krivuljo slepega vzorca (k_{SL}) in supernatanta 2 oziroma vzorca (k_{VZ}). Nato smo izračunali razliko Δk :

$$\Delta k = k_{VZ} - k_{SL}$$

pri čemer Δk (s^{-1}) pomeni razliko naklonov tangente med supernatantom 2 oziroma vzorcem k_{VZ} (s^{-1}) in slepim vzorcem k_{SL} (s^{-1}). Na podlagi tako dobljenih rezultatov in podatkov o masni koncentraciji proteinov (γ) v vzorcih smo izračunali specifično aktivnost polifenoloksidaz (SA):

$$SA = \frac{|\Delta k|}{\gamma_{proteinov} \times V_{vzorca}}$$

pri čemer SA pomeni specifično aktivnost encima ($\text{mg}^{-1}\text{s}^{-1}$), $|\Delta k|$ absolutno vrednost razlike naklonov tangente med supernatantom 2 oziroma vzorcem in slepim vzorcem (s^{-1}), $\gamma_{proteinov}$ masno koncentracijo proteinov (mg/ml) ter V_{vzorca} volumen vzorca (ml).



Slika 11: Odvisnost A_{412} od časa merjenja absorbance vzorca, primer s hmeljevim bolhačem poškodovan list Bobka

4.2.1 Polifenoloksidazna aktivnost storžkov hmelja

V tem poskusu smo nepoškodovanim storžkom šestih različnih kultivarjev hmelja določili polifenoloksidazno aktivnost. Rastline hmelja so bile vzgojene v hmeljišču poleg Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec, storžki so bili pobrani v času tehnološke zrelosti hmelja.

S poskusom smo želeli ugotoviti razlike v polifenoloksidazni aktivnosti med posameznimi kultivarji hmelja, med mesti vzorčenja (spodnji in zgornji del rastline), med svežimi in posušenimi storžki ter te rezultate primerjati z rezultati analiz nepoškodovanih listov hmelja. Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili. Rezultati za sveže vzorce so zbrani v preglednici 1, za suhe pa v preglednici 2.

Preglednica 1: Vpliv kultivarja hmelja in lokacije svežih storžkov na polifenoloksidazno aktivnost (model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

kultivar	specifična aktivnost PPO [10^{-2} /mgs]		P_L -vrednost
	sveži storžki		
	zgoraj	spodaj	
Aurora	1,99±0,51 ^{ybc}	2,76±0,63 ^{xb}	0,0139
Bobek	1,85±0,81 ^{xc}	1,90±0,44 ^{xc}	0,8447
Celeia	2,90±1,79 ^{xab}	1,95±0,73 ^{xc}	0,1844
Magnum	2,17±0,46 ^{xabc}	1,77±0,07 ^{xc}	0,1199
Savinjski golding	3,12±0,18 ^{ya}	5,26±0,92 ^{xa}	0,0005
Taurus	1,67±0,53 ^{yc}	2,23±0,60 ^{xbc}	0,0252
P_K-vrednost	0,0159	<0,0001	

P_K – vpliv kultivarja, P_L – vpliv lokacije vzorčenja; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b,c, d, e, f} skupine z enako črko v indeksu znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo; ^{x,y} skupine z enako črko v indeksu znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo

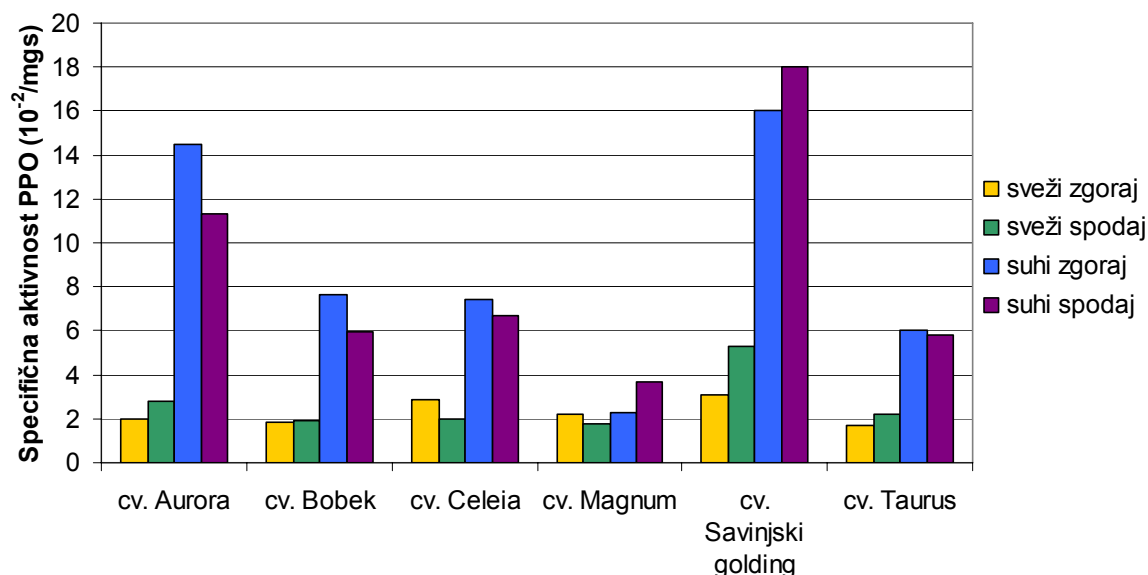
Rezultati iz preglednice 1 so grafično prikazani na sliki 12, pod katero so tudi komentirani.

Preglednica 2: Vpliv kultivarja hmelja in lokacije suhih storžkov na polifenoloksidazno aktivnost (model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

kultivar	specifična aktivnost PPO [10^{-2} /mgs]		P_L -vrednost
	suhi storžki		
	zgoraj	spodaj	
Aurora	14,46±0,81 ^{xb}	11,35±0,25 ^{yb}	0,0003
Bobek	7,63±0,06 ^{xc}	5,97±0,77 ^{xc}	0,0630
Celeia	7,39±0,10 ^{xcd}	6,66±0,96 ^{xc}	0,1577
Magnum	2,26±0,31 ^{ye}	3,65±0,72 ^{xd}	0,0122
Savinjski golding	16,00±1,55 ^{xa}	18,02±0,68 ^{xa}	0,1685
Taurus	6,06±0,95 ^{xd}	5,80±1,26 ^{xc}	0,7533
P_K-vrednost	<0,0001	<0,0001	

P_K – vpliv kultivarja, P_L – vpliv lokacije vzorčenja; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; a,b,c, d, e, f skupine z enako črko v indeksu znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo; ^{x,y} skupine z enako črko v indeksu znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo

Tudi rezultati iz preglednice 2 so grafično prikazani na sliki 12, ki ji sledi komentar. Graf smo narisali, ker bolj nazorno prikazuje razlike specifične aktivnosti PPO med svežimi in suhimi storžki ter lokacijo storžkov na rastlini.



Slika 12: Specifična aktivnost PPO v svežih in suhih storžkih hmelja, pobranih na različnih mestih na rastlinah hmelja šestih kultivarjev

Podatkov o raziskavah aktivnosti PPO v hmeljevih storžkih v literaturi ni. Iz naših rezultatov pa je razvidno, da se specifična aktivnost PPO med posameznimi kultivarji razlikuje, kar je tudi statistično ovrednoteno (preglednici 1 in 2). Torej ima posamezen kultivar vpliv na specifično aktivnost PPO. Storžki kultivarja Savinjski golding imajo pri

svežih in suhih vzorcih največjo specifično aktivnost PPO. Med suhimi storžki ima najmanjšo specifično aktivnost PPO kultivar Magnum, pri svežih pa Taurus, Magnum in Bobek. Pri primerjanju svežih in suhih storžkov istega kultivarja so imeli suhi večjo specifično aktivnost PPO kot sveži. Akissoé in sod. (2003) so opazili, da se pri sušenju jama (krompirju podoben užiten tropski gomolj) polifenoloksidazna aktivnost zmanjša. To pa je v nasprotju z našimi rezultati. Menimo, da pride pri našem poskusu do zvečanja zaradi manjše suhe mase storžkov, kar se običajno zgodi pri sušenju zaradi izgube vode.

4.2.2 Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov iz hmeljišča

V poskusu smo nepoškodovanim listom šestih različnih kultivarjev hmelja določili polifenoloksidazno aktivnost. Vzgojeni so bili v hmeljišču poleg Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. Slike listov hmelja kultivarja Bobek so v prilogi B1.

S poskusom smo želeli ugotoviti razlike v polifenoloksidazni aktivnosti med posameznimi kultivarji hmelja ter rezultate primerjati z rezultati analiz svežih in suhih storžkov hmelja. Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili in jih zbrali v preglednici 3.

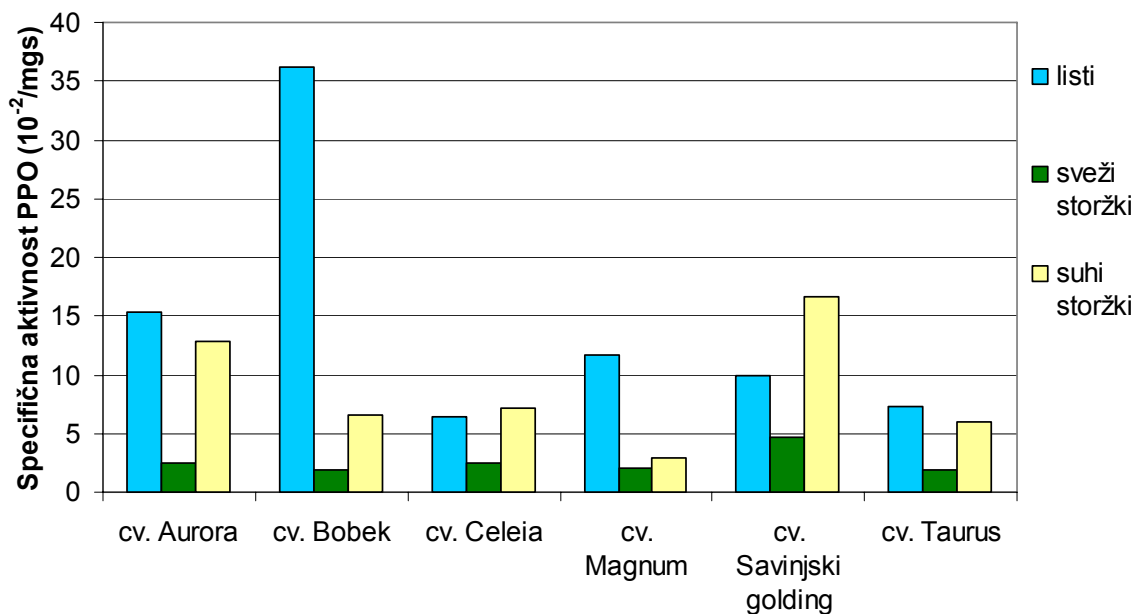
Preglednica 3: Vpliv kultivarja hmelja in dela rastline (listov, svežih storžkov in suhih storžkov) na polifenoloksidazno aktivnost (model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

kultivar	specifična aktivnost PPO [10^{-2} /mgs]			P_D -vrednost
	listi	sveži storžki	suhi storžki	
Aurora	15,29±2,89 ^{xb}	2,48±0,69 ^{zb}	12,90±1,75 ^{yb}	<0,0001
Bobek	36,25±3,42 ^{xa}	1,88±0,60 ^{zb}	6,63±0,11 ^{yc}	<0,0001
Celeia	6,43±0,13 ^{xd}	2,42±1,41 ^{yb}	7,15±0,58 ^{xc}	<0,0001
Magnum	11,62±1,94 ^{xc}	1,98±0,61 ^{zb}	2,95±0,90 ^{yd}	<0,0001
Savinjski golding	9,98±3,12 ^{yc}	4,73±1,24 ^{za}	16,68±1,62 ^{xa}	<0,0001
Taurus	7,25±1,59 ^{xd}	1,95±0,62 ^{zb}	5,93±1,04 ^{yc}	<0,0001
P_K-vrednost	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

P_K – vpliv kultivarja, P_D – vpliv dela rastline; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b,c, d, e, f} skupine z enako črko v indeksu znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo; ^{x,y,z} skupine z enako črko v indeksu znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo

V preglednici 3 so podane srednje vrednosti, ki smo jih izračunali iz treh ponovitev in standardnimi odkloni. Iz standardnih odklonov vidimo, da so odstopanja med posameznimi ponovitvami večinoma od 2 do nekaj več kot 30 %.

Rezultati iz preglednice 3 so grafično prikazani na sliki 13, saj so bolj nazorne vidne razlike specifičnih aktivnosti PPO med listi hmelja, svežimi in suhimi storžki.

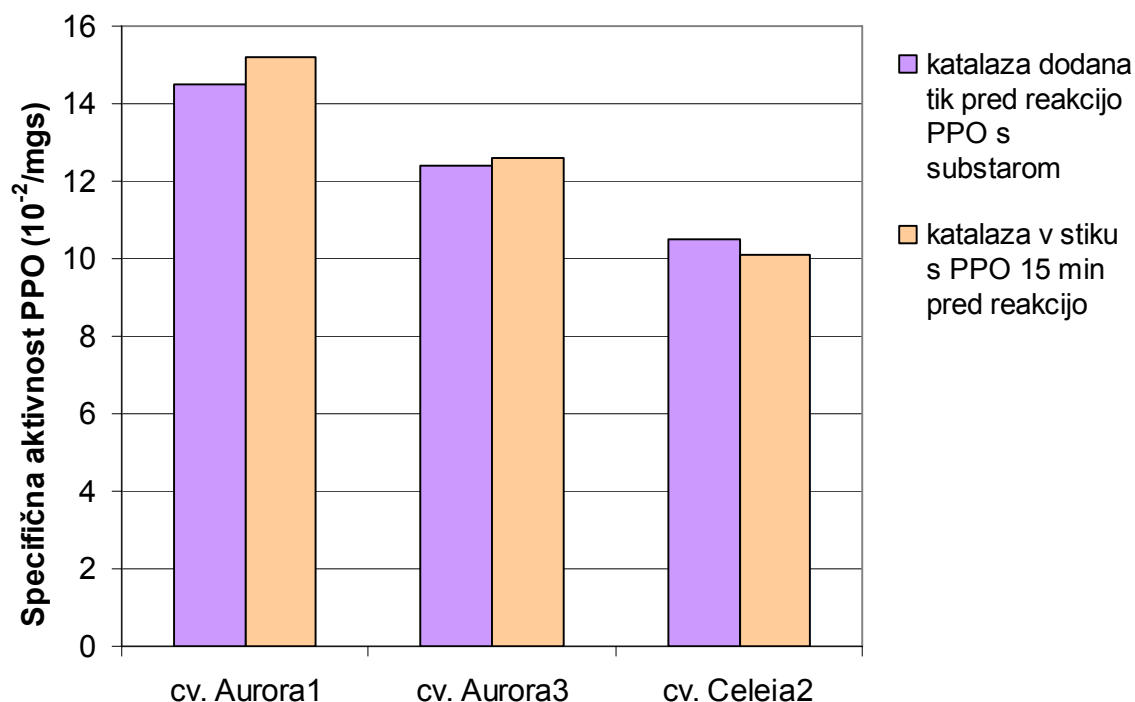


Slika 13: Specifična aktivnost PPO listov, svežih in suhih storžkov hmelja, vzgojenih v hmeljišču

Podatkov o raziskavah aktivnosti PPO v hmeljevih listih po naših podatkih v literaturi ni. Tudi tu je statistično ovrednoten vpliv kultivarja na specifično aktivnost PPO hmelja. Pri našem poskusu se je izkazalo, da je bila specifična aktivnost PPO listov večja od specifične aktivnosti PPO svežih storžkov. Največjo specifično aktivnost PPO listih je imel kultivar Bobek, najnižjo pa Celeia.

4.2.2.1 Vpliv različnega časa dodajanja katalaze

V tem poskusu smo nekaterim listom hmelja iz zgornje točke določili polifenoloksidazno aktivnost, tako da smo vzorec (supernatant 2) pustili v stiku s katalazo 15 minut pred reakcijo s substratom. S tem poskusom smo želeli preveriti ali katalaza zadostno odstrani vodikov peroksid iz vzorca in tako izniči prispevek peroksidaz k oksidaciji substrata.



Slika 14: Specifična aktivnost PPO listov hmelja iz rastlinjaka pri poskusu, ko katalaza pride v stik s PPO tik pred reakcijo s substratom in ko smo katalazo dodali v supernatant 2 15 min pred reakcijo s substratom

Meritve smo naredili na treh različnih vzorcih, vsak vzorec smo analizirali v treh ponovitvah, kar je razvidno v prilogi A3. Pri vzorcu Aurora 1 je bila PPO aktivnost večja za 4,9 % če smo katalazo dodali 15 minut pred reakcijo s substratom, kot pa tik pred dodatkom substrata. Pri vzorcu Aurora 3 je bila večja za 1,1 % in pri vzorcu Celeia 2 se je zmanjšala za 3,8 %. Pri statistični obdelavi podatkov se je izkazalo, da je vrednost t – testa ($|t| = 0,4886$) manjša od P – vrednosti ($P = 0,73$). S tem smo dokazali, da med metodama ni razlik.

4.2.3 Polifenoloksidazna aktivnost mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka

V poskusu smo nepoškodovanim in mehansko poškodovanim listom hmelja šestih različnih kultivarjev in listom velike koprive ter navadne konoplje kot primerjalnim vzorcem določili polifenoloksidazno aktivnost. Rastline so vzgojili v rastlinjaku na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec ter jih mehansko poškodovali z luknjačem, tako da so v vsak posamezen list naredili 2-5 lukenj v premeru 5-6 mm. Liste so mehansko poškodovali, saj naj bi to ponazarjalo poškodbe rastlin kot jih napade hmeljev bolhač. Hmeljev bolhač poleg listov hmelja napade tudi liste velike koprive in navadne konoplje. Liste so poškodovali 17 ur preden so jih pobrali. Sliki nepoškodovanega in mehansko poškodovanega lista hmelja kultivarja Bobek sta v prilogi B2 in B3.

S poskusom smo želeli ugotoviti, ali pride do sprememb polifenoloksidazne aktivnosti med poškodovanimi in nepoškodovanimi rastlinami. Predvidevali smo, da se bo polifenoloksidazna aktivnost pri poškodovanih listih povečala kot je v nekaterih primerih opisano v literaturi (Constabel in sod., 1995, Maki in Morohashi, 2005). Dobljeni rezultati so zbrani v preglednici 4 skupaj s statistično analizo.

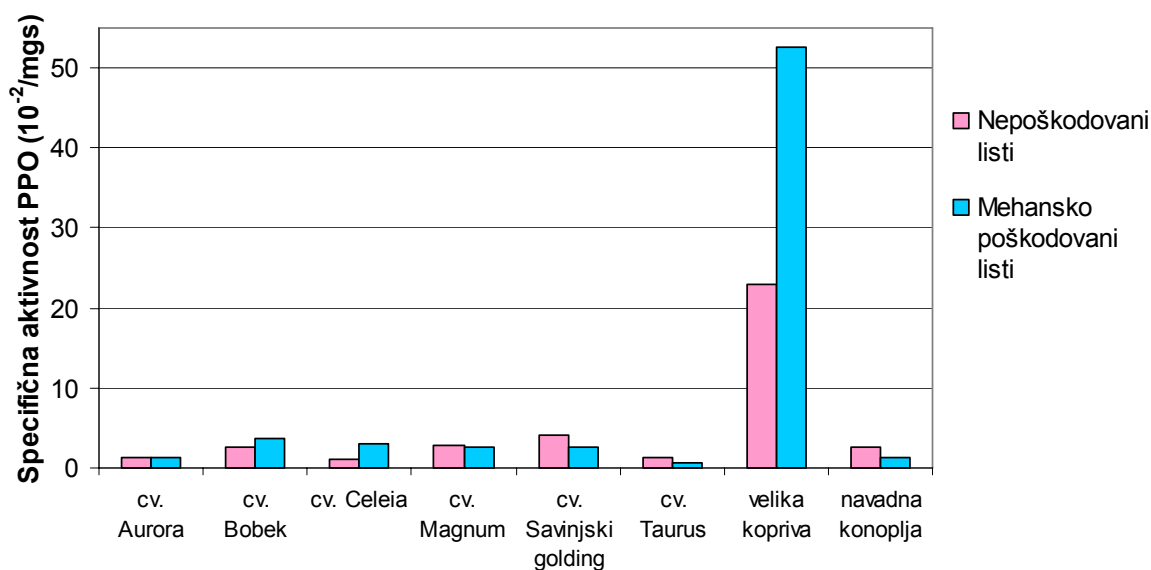
Preglednica 4: Vpliv kultivarja hmelja in primerjalnih rastlin ter mehanskih poškodb listov na polifenoloksidazno aktivnost (model 1, Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

kultivar hmelja ali primerjalna rastlina	specifična aktivnost PPO [$10^{-2}/\text{mgs}$]		P _P -vrednost
	listi		
	nepoškodovani	mehansko poškodovani	
Aurora	1,32±0,01 ^{xd}	1,40±0,05 ^{xd}	0,0722
Bobek	2,70±0,16 ^{yc}	3,62±0,34 ^{xb}	0,0135
Celeia	1,01±0,17 ^{yd}	3,06±0,08 ^{xbc}	<0,0001
Magnum	2,85±0,10 ^{xc}	2,65±0,02 ^{yc}	0,0268
Savinjski golding	4,15±0,19 ^{xb}	2,64±0,41 ^{yc}	0,0045
Taurus	1,28±0,06 ^{xd}	0,73±0,03 ^{yd}	0,0001
velika kopriva	22,90±1,23 ^{ya}	52,72±1,26 ^{xa}	<0,0001
navadna konoplja	2,47±0,11 ^{xc}	1,38±0,09 ^{yd}	0,0002
P_K-vrednost	<0,0001	<0,0001	

P_K – vpliv kultivarja, P_P – vpliv poškodbe; P ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv; P ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv; P ≤ 0,05 statistično značilen vpliv; P > 0,05 statistično neznačilen vpliv; a,b,c, d, e, f, g, h skupine z enako črko v indeksu znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo; x,y skupine z enako črko v indeksu znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo

Iz rezultatov v preglednici 4 lahko zaključimo, da se je v treh kultivarjih polifenoloksidazna aktivnost povečala, v treh pa zmanjšala po mehanski poškodbi. Pri veliki koprivi pa smo izmerili celo več kot 2-kratno povečanje. Le pri Celei so bile razlike statistično zelo značilne.

Rezultati iz preglednice 4 so grafično prikazani na sliki 15.



Slika 15: Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih listov in mehansko poškodovanih listih hmelja ter primerjalnih rastlin, vzgojenih v laboratoriju in pobranih 17 ur po povzročeni poškodbah

Podatkov o raziskavah aktivnosti PPO pri poškodbah listov hmelja v literaturi ni. Največ je znanega za paradižnik. Tako Constabel in sod. (1995) navajajo, da po poškodbah paradižnikovih listov specifična aktivnost naraste v 48 urah in tudi Maki in Morohashi (2005) ugotavljata, da specifična aktivnost PPO najbolj naraste v treh dneh po narejenih poškodbah. Ker smo pri našem poskusu poškodovane liste pobrali že 17 ur po narejenih poškodbah in do vidnega povečanja specifične aktivnosti ni prišlo, razen pri veliki koprivi in Celei, smo poskus ponovili še pri različnih časih od mehanske poškodbe. Le-ta je opisan v naslednji točki.

4.2.4 Polifenoloksidazna aktivnost v odvisnosti od časa po mehanski poškodbi listov

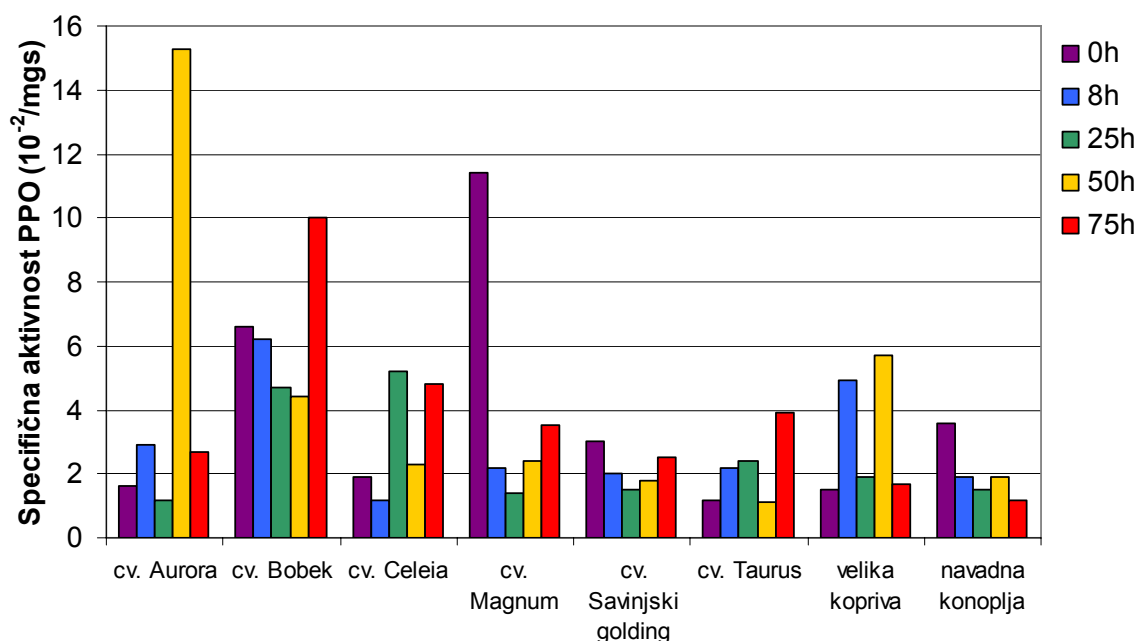
V tem poskusu smo nepoškodovanim in mehansko poškodovanim listom hmelja šestih različnih kultivarjev in listom velike koprive ter navadne konoplje kot primerjalnim vzorcem določili polifenoloksidazno aktivnost v odvisnosti od časa po mehanski poškodbi poškodovanih rastlin (preglednica 5). Rastline so vzgojili v rastlinjaku na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec ter jih mehansko poškodovali z luknjačem, tako da so v vsak posamezen list naredili 2-5 lukenj v premeru 5-6 mm. Liste so poškodovali 8, 25, 50 in 75 ur preden so jih pobrali. Luknje v listih, narejene z luknjačem, ponazarjajo grizljanje hmeljevega bolhača. S tem poskusom smo želeli ugotoviti, ali pride do sprememb polifenoloksidazne aktivnosti med poškodovanimi in nepoškodovanimi rastlinami v daljših časovnih razmakih, kot pri prvem poskusu. Novo serijo analiz (preglednica 5) smo opravili zato, ker po 17 urah ni bilo velikih sprememb v PPO aktivnosti med nepoškodovanimi in poškodovanimi listi.

Preglednica 5: Vpliv kultivarja in časa trajanja mehanskih poškodb rastlin na polifenoloksidazno aktivnost (model 4, Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

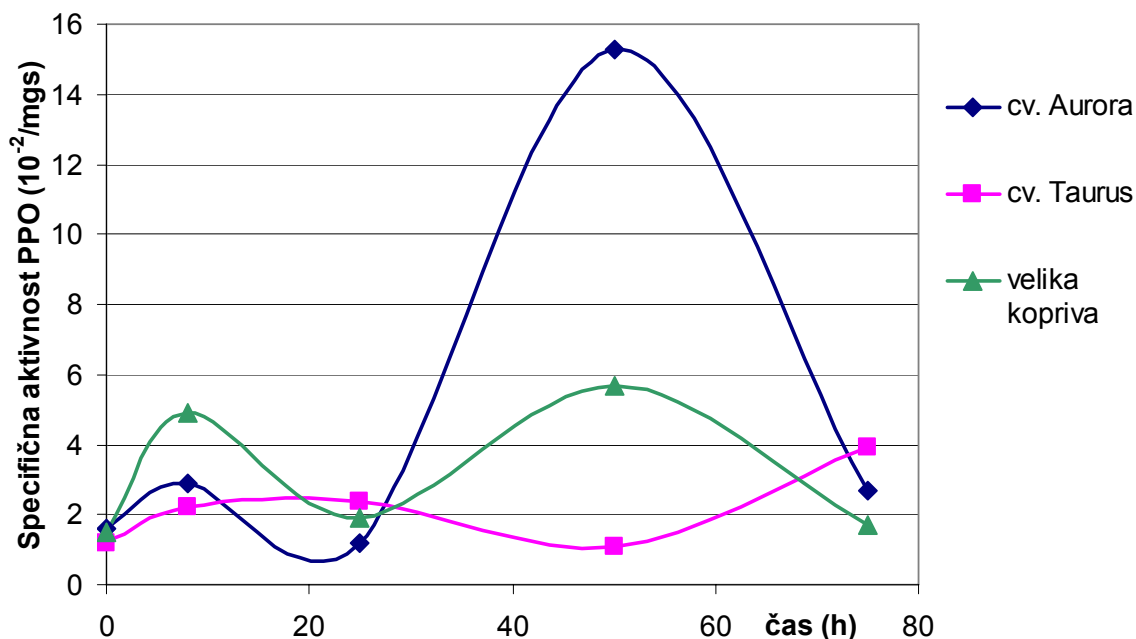
kultivar hmelja ali rastlina	specifična aktivnost PPO [$10^{-2}/\text{mgs}$]					P _C - vrednost
	listi					
	0h	8h	25h	50h	75h	
Aurora	1,65±0,30 ^{Cd}	2,85±0,21 ^{Bc}	1,24±0,06 ^{Cd}	15,34±0,57 ^{Aa}	2,70±0,74 ^{Bde}	<0,0001
Bobek	6,55±0,06 ^{Bb}	6,18±0,95 ^{BCa}	4,71±0,36 ^{BCa}	4,35±2,22 ^{Cb}	10,02±0,49 ^{Aa}	0,0007
Celeia	1,91±0,14 ^{Bd}	1,22±0,26 ^{Be}	5,17±0,41 ^{Aa}	2,28±0,91 ^{Bc}	4,77±1,06 ^{Ab}	<0,0001
Magnum	11,35±1,13 ^{Aa}	2,20±0,58 ^{Ccd}	1,37±0,41 ^{Ccd}	2,36±0,37 ^{Cc}	3,53±0,28 ^{Bcd}	<0,0001
Savinjski golding	2,96±0,34 ^{Ac}	1,95±0,12 ^{BCde}	1,45±0,60 ^{Ccd}	1,77±0,11 ^{BCc}	2,54±0,60 ^{ABde}	0,0078
Taurus	1,21±0,34 ^{Cd}	2,15±0,01 ^{Bcd}	2,45±0,07 ^{Bb}	1,11±0,13 ^{Cc}	3,92±0,19 ^{Abc}	<0,0001
velika kopriva	1,47±0,31 ^{Dd}	4,87±0,22 ^{Bb}	1,89±0,05 ^{Cbc}	5,65±0,26 ^{Ab}	1,74±0,16 ^{CDef}	<0,0001
navadna konoplja	3,65±0,08 ^{Ac}	1,90±0,05 ^{Bde}	1,53±0,05 ^{Ccd}	1,87±0,08 ^{Bc}	1,17±0,05 ^{Cf}	<0,0001
P _K - vrednost	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

P_K – vpliv kultivarja, P_C – vpliv časa trajanja poškodbe; P ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv; P ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv; P ≤ 0,05 statistično značilen vpliv; P > 0,05 statistično neznačilen vpliv; ^{a,b,c, d, e, f, g, h} skupine z enako črko v indeksu znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo; ^{A, B, C, D, E} skupine z enako črko v indeksu znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo

Iz rezultatov v preglednici 5 lahko zaključimo, da se je s časom po povzročeni mehanski poškodbi aktivnost polifenoloksidaze spreminjala. Vrednosti so statistično značilno odvisne od kultivarja in samo pri Bobku ter Savinjskemu goldingu ni bilo statistično zelo visoko značilnega vpliva. Ko smo rezultate še grafično prikazali na sliki 16 smo analizirane vzorce razdelili na tri skupine, za katere smo videli, da se pri njih polifenoloksidazna aktivnost s časom podobno spreminja. Tako smo na slikah 17, 18 in 19 predstavili te skupine vzorcev. Na sliki 17 so rezultati specifične aktivnosti PPO za Auroro, Taurus in veliko koprivo, na sliki 18 za Bobek, Magnum in Savinjski golding ter na sliki 19 za Celeio in navadno konopljo.



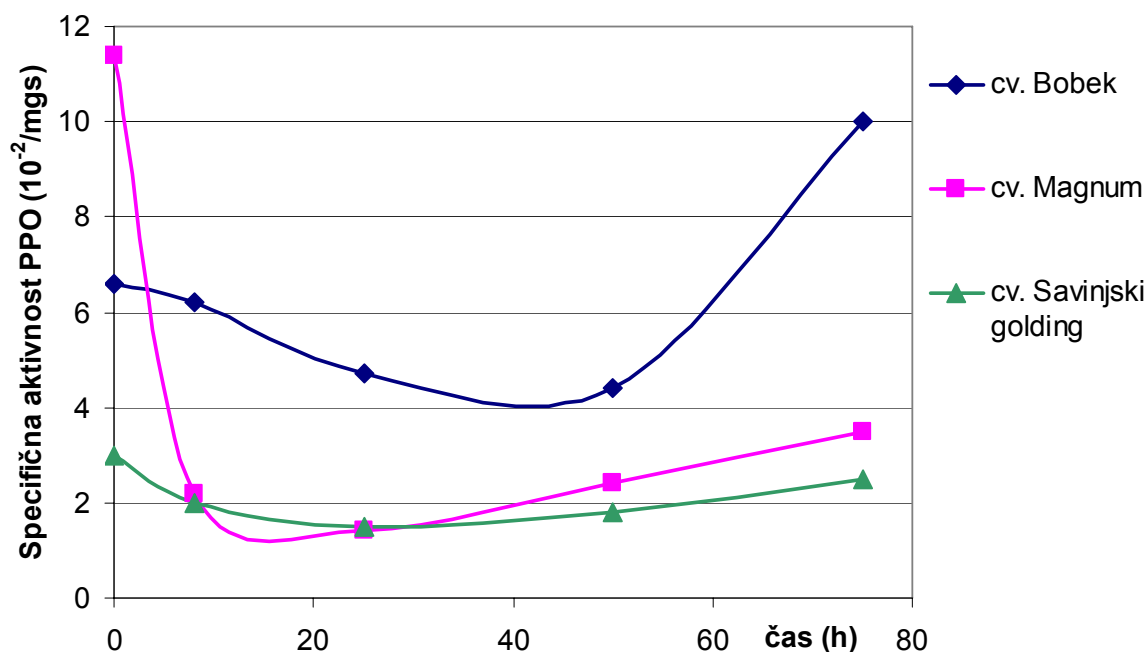
Slika 16: Specifične aktivnosti PPO nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov hmelja, ter primerjalnih rastlin, ki so bili pobrani 8, 25, 50, in 75 ur po narejenih mehanskih poškodbah



Slika 17: Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov hmelja cv. Aurore in cv. Taurusa ter velike koprive, ki so bili pobrani 8, 25, 50 in 75 ur po narejenih mehanskih poškodbah

Pri Aurori, Taurusu in veliki koprivi so krivulje specifične aktivnosti PPO v odvisnosti od časa po poškodbi podobne. Pri vseh treh pride do podobnih sprememb v vrednostih specifične aktivnosti PPO. Da ima čas vpliv na razlike specifične aktivnosti, je tudi statistično značilno ovrednoteno (preglednica 5). Po 8 urah se pri Aurori in veliki koprivi specifična aktivnost PPO poveča, po 25 urah pade in nato se pri 50 urah pri Aurori zelo poveča kar za 9-krat, pri veliki koprivi pa le za 4-krat in pri 75 urah specifična aktivnost PPO pri obeh pade. Padec specifične aktivnosti PPO lahko primerjamo z ugotovitvijo Makija in Morohashija (2005), ki sta merila specifično aktivnost PPO v mehansko poškodovanih semenih paradižnika, da 72 ur po narejenih poškodbah specifična aktivnost PPO pade. Pri Taurusu je krivulja podobna, le da pride do naraščanja in padanja specifične aktivnosti PPO s časovnim zamikom in hkrati tudi ni jasno ali bi po 75 urah specifična aktivnost PPO padla ali še naraščala.

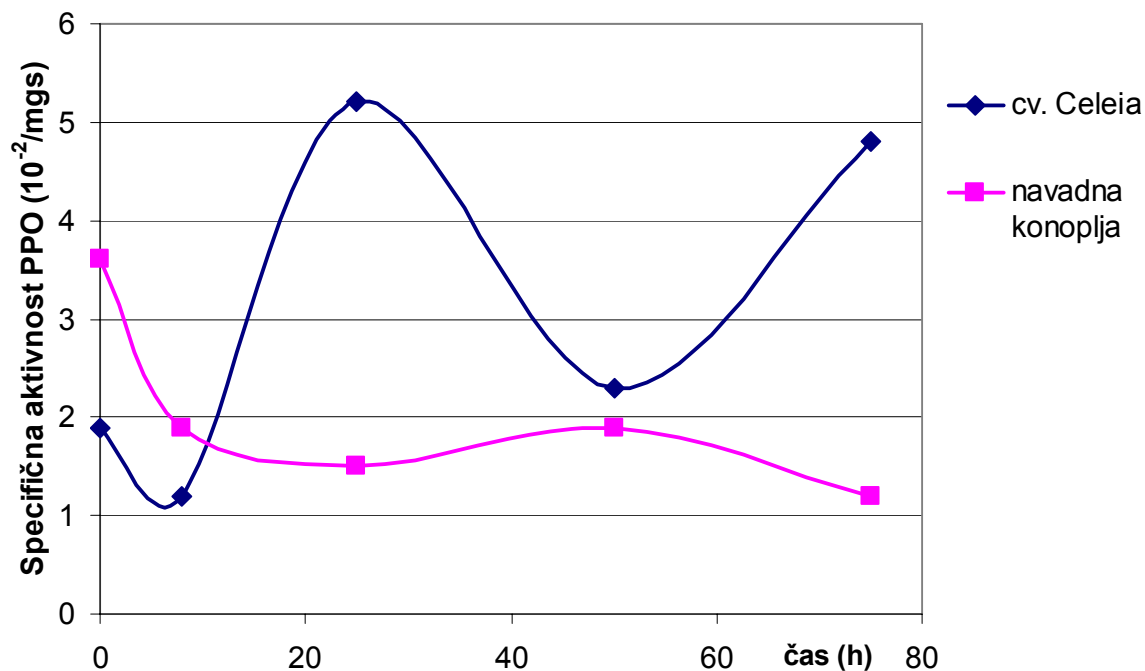
Tudi pri Bobku, Magnumu in Savinjskemu goldingu lahko iz krivulj specifične aktivnosti PPO v odvisnosti od časa zaznamo podobnosti.



Slika 18: Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov hmelja kultivarjev Bobek, Magnum in Savinjski golding, ki so bili pobrani 8, 25, 50, in 75 ur po narejenih mehanskih poškodbah

Pri vseh treh je prišlo do sprememb v vrednostih specifične aktivnosti PPO v odvisnosti od časa in pri vseh treh je bil vpliv časa statistično značilen. Iz slike 18 je razvidno, da v začetnih urah po poškodbi pri vseh treh pride do znižanja specifične aktivnosti PPO, nato pa začne naraščati. Pri Magnumu je padec specifične aktivnosti PPO največji, nato začne tudi najhitreje naraščati, vendar v 75 urah ne doseže začetne vrednosti, tako kot je tudi Savinjski golding ne doseže. Tudi pri prejšnjem poskusu (točka 4.2.3) pri teh dveh kultivarjih specifični aktivnosti PPO po 17 urah padeta. Pri Bobku pa specifična aktivnost PPO najprej pade, nato pa se za razliko od drugih dveh dvigne nad začetno vrednostjo.

Odvisnost specifične aktivnosti PPO za Celeio in navadno konopljo je prikazana na sliki 10.



Slika 19: Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov hmelja kultivarja Celeia ter navadne konoplje, ki so bili pobrani 8, 25, 50, in 75 ur po narejenih mehanskih poškodbah

Pri Celei je specifična aktivnost zelo nihala, tako kot pri prejšnjem poskusu (točka 4.2.3) je bila po 17 urah večja od začetne vrednosti. Pri navadni konoplji lahko opazimo, da specifična aktivnost PPO večinoma pada. Mehanske poškodbe očitno nimajo vpliva na aktivnost polifenoloksidaz. Tudi pri prejšnjem poskusu (točka 4.2.3) je aktivnost po 17 urah pri navadni konoplji padla.

Pri obeh poskusih (točki 4.2.3 in 4.2.4) bi lahko poskus ponovili na drugačen način, tako da bi poleg poškodovanim rastlinam določili specifično aktivnost PPO tudi nepoškodovanim rastlinam, ki bi jih pobrali v enakih časovnih razlikah kot poškodovane. Tako bi lahko spremljali spremembo polifenoloksidazne aktivnosti (ΔSA) v odvisnosti od časa. Tako so namreč poskus izpeljali Constabel in sod. (1995) na paradižnikih in dokazali, da pride do sprememb aktivnosti PPO v odvisnosti od časa tudi pri nepoškodovanih listih.

4.2.5 Polifenoloksidazna aktivnost s hmeljevim bolhačem poškodovanih listov iz rastlinjaka

V tem poskusu smo uporabljali liste hmelja šestih različnih kultivarjev in liste velike koprive in navadne konoplje kot primerjalne vzorce. Rastline so vzgojili v rastlinjaku na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec in na njih naselili hmeljevega bolhača ter ga pustili v stiku z rastlinami 24 ur. Nato so takoj liste pobrali. Slika s hmeljevim bolhačem poškodovanega lista hmelja kultivarja Bobek je v prilogi B4.

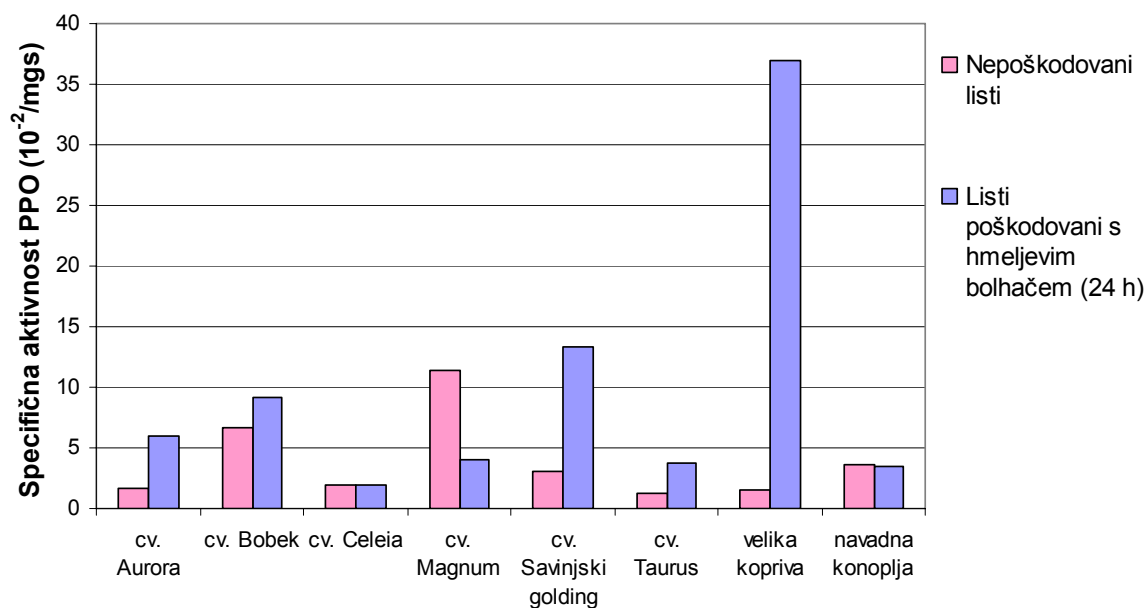
S poskusom smo želeli ugotoviti ali pride do sprememb polifenoloksidazne aktivnosti med nepoškodovanimi (čas 0) in s hmeljevim bolhačem poškodovanimi listi. V preglednici 6 so zbrani rezultati analiz.

Preglednica 6: Vpliv kultivarja hmelja in primerjalnih rastlin ter poškodb hmeljevega bolhača na polifenoloksidazno aktivnost (model 1, Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

kultivar hmelja ali primerjalna rastlina	specifična aktivnost PPO [10^{-2} /mgs]		P_H -vrednost
	listi		
	nepoškodovani	poškodovani s hmeljevim bolhačem	
Aurora	1,64±0,30 ^{yd}	6,00±0,64 ^{xd}	0,0004
Bobek	6,55±0,06 ^{yb}	9,21±0,58 ^{xc}	0,0014
Celeia	1,91±0,14 ^{xd}	1,89±0,55 ^{xf}	0,9686
Magnum	11,35±0,11 ^{xa}	3,95±0,33 ^{ye}	0,0004
Savinjski golding	2,96±0,34 ^{yc}	13,40±0,25 ^{xb}	<0,0001
Taurus	1,21±0,34 ^{yd}	3,74±0,79 ^{xe}	0,0071
velika kopriva	1,69±0,21 ^{yd}	37,02±0,91 ^{xa}	<0,0001
navadna konoplja	3,65±0,08 ^{xc}	3,52±0,05 ^{xe}	0,0869
P_K-vrednost	<0,0001	<0,0001	

P_K – vpliv kultivarja, P_H – vpliv poškodbe hmeljevega bolhača; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b,c, d, e, f, g, h} skupine z enako črko v indeksu znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo; ^{x,y} skupine z enako črko v indeksu znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo

Statistična analiza rezultatov analiz supernatantov 2 pripravljenih iz nepoškodovanih in s hmeljevim bolhačem poškodovanih listov hmelja je spet pokazala na značilno odvisnost od vrste kultivarja in poškodbe. Na sliki 20 so prikazane specifične aktivnosti nepoškodovanih listov in listov poškodovanih s hmeljevim bolhačem.



Slika 20: Specifična aktivnost PPO nepoškodovanih listov rastlin in listov, ki so jih poškodovali hmeljevi bolhači, kateri so bili v stiku z rastlinami 24 ur

Podatkov o raziskavah aktivnosti PPO pri poškodbah listov hmelja s hmeljevim bolhačem v literaturi ni. Vendar je Tschardtke s sod. (2001) raziskovala vpliv hranjenja listnega hrošča *Agelastica alni* na specifično aktivnost PPO listov črne jelše in ugotovila, da se le-ta zelo poveča. Tudi pri našem poskusu se Aurori, Bobku, Savinjskem goldingu, Taurusu in veliki koprivi aktivnost PPO pri listih poškodovanih s hmeljevim bolhačem poveča. To lahko primerjamo s prejšnjo točko (4.2.4), pri kateri pri enakih rastlinah po mehanskih poškodbah zaznamo povečanje specifične aktivnosti PPO. Pri tem lahko povečanje polifenoloksidazne aktivnosti pripisujemo obrambnemu sistemu rastline (Shi in sod., 2001; Maki in Morohashi, 2005; Marusek in sod., 2006). Pri Magnumu pride do znižanja aktivnosti PPO, tako kot pri prejšnji točki 4.2.4. Kar pomeni, da smo kar dobro zastavili poskus z mehansko poškodovanimi listi različnih kultivarjev hmelja. Pri Celei in navadni konoplji ni vidne spremembe, kar znova kaže, da poškodbe pri Celei in navadni konoplji ne vplivajo na aktivnost PPO.

5 SKLEPI

- Polifenoloksidazna aktivnost je značilna za posamezen kultivar hmelja.
- V naših poskusih imajo suhi storžki večjo polifenoloksidazno aktivnost kot sveži zaradi manjše mase posušenih storžkov.
- Listi hmelja imajo večjo polifenoloksidazno aktivnost kot storžki.
- Dodajanje katalaze 15 minut pred ali tik pred dodatkom substrata ne vpliva na polifenoloksidazno aktivnost.
- Mehanske poškodbe je potrebno narediti več kot 17 ur prej preden liste poberejo.
- Polifenoloksidazna aktivnost po mehanskih poškodbah pri kultivarjih Aurori in Taurusu najprej naraste, nato pade.
- Polifenoloksidazna aktivnost po mehanskih poškodbah pri kultivarjih Bobku, Magnumu in Savinjskemu goldingu pa najprej pade in nato začne naraščati.
- Pri navadni konoplji se polifenoloksidazna aktivnost po mehanskih poškodbah in tudi po poškodbah hmeljevega bolhača bistveno ne spremeni.
- Hmeljevi bolhači vplivajo na spremembo polifenoloksidazne aktivnosti kultivarjev hmelja: Aurora, Bobek, Magnum, Savinjski golding in Taurus ter na veliko koprivo, do čim na kultivar hmelja Celeio in na navadno konopljo ne vpliva.
- Pri nekaterih poskusih (točke 4.2.3, 4.2.4 in 4.2.5) bi bilo potrebno poskus ponoviti, tako da bi poleg poškodovanim rastlinam določili specifično aktivnost PPO tudi nepoškodovanim rastlinam, ki bi jih pobrali v enakih časovnih razmakih kot poškodovane. Tako bi lahko spremljali spremembo polifenoloksidazne aktivnosti (ΔSA) v odvisnost od časa.

6 POVZETEK

Namen naloge je bil ugotoviti ali se specifična aktivnost encima polifenoloksidaze v hmelju napadenemu s hmeljevim bolhačem, razlikuje od specifične aktivnosti tega istega encima v zdravih, nepoškodovanih rastlinah. Pri našem poskusu smo uporabili šest različnih kultivarjev hmelja (Aurora, Bobek, Celeia, Magnum, Savinjski golding, Taurus) in veliko koprivo ter navadno konopljo kot primerjalna vzorca, ker se, kakor navajata Rak-Cizej in Žolnir (2003), tudi z njima občasno prehranjuje.

V supernatantih iz nepoškodovanih svežih in suhih storžkov ter listov hmelja smo določili polifenoloksidazno aktivnost. Vse uporabljene rastline so bile vzgojene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. Določili smo tudi polifenoloksidazno aktivnost listom rastlin, ki pa so bile mehansko poškodovane tako, da so v liste z luknjačem naredili luknje ali pa so na rastline naselili hmeljevega bolhača, ki je liste z grizljanjem mehansko poškodoval. Rezultate smo med seboj primerjali. S poskusi smo želeli preveriti ali se po poškodbah listov polifenoloksidazna aktivnost spremeni. Predvidevali smo, da se zveča, saj naj bi encim polifenoloksidaza pomagala v obrambnem mehanizmu rastlinam pred stresom, ki ga povzročijo poškodbe.

Ekstrakcijo in delno čiščenje encima polifenoloksidaze (PPO) smo izvedli s pomočjo neionskega detergenta Tritona TX-114, ki je blag detergent in omogoča izolacijo encimov vezanih na membrane kloroplastov. Poleg tega pri tej metodi odstranimo klorofil in fenolne spojine, ki se vežejo na dodani PVPP, z dodatkom fenilmetilsulfonilfluorida pa inhibiramo druge proteinaze. Po razgradnji membran kloroplastov s Tritonom TX-114, pri čemer se sprostijo polifenoloksidaze in peroksidaze, se Triton TX-114 veže na hidrofobne snovi, ki se kasneje pri segrevanju raztopine na temperaturi 35 °C oborijo in preidejo v z detergentom bogato fazo. Oborino smo nato s centrifugiranjem odstranili.

Koncentracijo proteinov smo določili z metodo po Bradfordu. Metoda temelji na spektrofotometričnem merjenju absorbance modro obarvanega produkta, ki ima absorpcijski maksimum pri 595 nm. S pomočjo umeritvene krivulje smo izračunali maso proteinov v supernatantih.

Aktivnost polifenoloksidaz smo merili spektrofotometrično po metodi, ki jo opisujejo Esterbauer in sodelavci. Metoda temelji na spremljanju razbarvanja raztopine pod vplivom delovanja polifenoloksidaz. Metoda je posredna, ker nastali oksidacijski produkti (kinoni), ki bi inhibitorno delovali na encime, reagirajo z 2-nitro-5-tiobenzojsko kislino v reakcijski mešanici in raztopina preide iz intenzivno rumene barve v brezbarvno. Pri tem pride do zmanjševanja absorbance, ki smo jo spremljali pri valovni dolžini 412 nm. Da bi spremljali samo polifenoloksidazno aktivnost, smo v reakcijsko zmes dodali katalazo, s čimer smo odstranili vodikov peroksid in tako odstranili prispevek peroksidaz k oksidaciji substrata. Naredili smo tudi poskus, s katerim smo preverili metodo določanja polifenoloksidazne aktivnosti. Nekaterim istim vzorcem smo izmerili polifenoloksidazno aktivnost, tako da smo vzorec pustili v stiku s katalazo 15 minut pred reakcijo s substratom. S tem poskusom smo želeli ugotoviti ali potrebuje katalaza nekaj časa ali pa jo lahko dodamo tik pred substratom in še zadostno odstrani vodikov peroksid iz vzorca.

Zaključimo lahko, da posamezen kultivar vpliva na polifenoloksidazno aktivnost. Da imajo pri naših poskusih suhi storžki (od 3 do $16,7 \times 10^{-2} \text{ mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) večjo polifenoloksidazno aktivnost kot sveži na račun suhe mase. Da imajo listi hmelja (od 6,4 do $36,3 \times 10^{-2} \text{ mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) večjo polifenoloksidazno aktivnost kot storžki. Da pride do sprememb polifenoloksidazne aktivnosti po mehanskih poškodbah listov in tudi po poškodbah, ki jih povzroči hmeljev bolhač. Da sta metodi določanja specifične aktivnosti PPO (metoda, pri kateri pride katalaza v stik s PPO tik pred reakcijo PPO s substratom, in metoda, pri kateri pride katalaza v stik s PPO 15 min pred reakcijo s substratom) primerljivi.

Za nadaljnje poskuse pa priporočamo, da bi specifično aktivnost PPO določili poleg poškodovanim rastlinam tudi nepoškodovanim, ki bi jih pobrali v enakih časovnih razlikah kot poškodovane. Tako bi lahko spremljali spremembo polifenoloksidazne aktivnosti (ΔSA) v odvisnost od časa, saj se je pri nekaterih rastlinah izkazalo, da se specifična aktivnost PPO spreminja s starostjo rastline.

7 VIRI

- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmaceutski vestnik*, 48: 573-589
- Agrios G. N. 1997. *Plant pathology*. 4th ed. San Diego, Academic Press: 96-114
- Akissoé N., Hounhouigan J., Mestres C., Nago M. 2003. How blanching and drying affect the colour and functional characteristics of yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) flour. *Food Chemistry*, 82: 257-264
- Burton S. G., Kirchmann S. 1997. Optimised detergent-based method for extraction of a chloroplast membrane-bound enzyme: polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis*). *Biotechnology Techniques*, 11, 9: 645-648
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Constabel C. P., Bergey D. R., Ryan C. A. 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Plant Biology*, 92: 407-411
- Čeh Brežnik. B., Brežnik. M. 2003. Hmelj. *Kmetovalec*, 71, 3: 5-7
- Donko M. 2001a. Povečana vsebnost polifenolov v pivu – (dvorezen meč v pivovarstvu). *Hmeljarski bilten*, 8, 2: 27-35
- Donko M. 2001b. Indukcija oksidoreduktaz v listih paradižnika z metil jasmonatom. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 28-35
- Ephritikhine G., Ferro M., Rolland N. 2004. Plant membrane proteomics. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 943-962
- Erat M., Sakiroglu H., Kufrevioglu O. I. 2005. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. *Food Chemistry*, 95: 503-508
- Esterbauer H., Schwarzl E., Hayn M. 1976. A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid. *Analytical Biochemistry*, 77, 2: 486-494
- François N., Guyot-Declerck C., Hug B., Callemien D., Govaerts B., Collin S. 2006. Beer astringency assessed by time-intensity and quantitative descriptive analysis: Influence of pH and accelerated aging. *Food Quality and Preference*, 17: 445-452

- Hättenschwiler S., Vitousek P. M. 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 6: 238-243
- Košir I. 1995. Kemizem in analitika hmelja. *Hmeljarski bilten*, 4: 73-83
- Kralj D. 1992a. Značilnost slovenskih hmeljnih kultivarjev. *Hmeljar*, 62, 2: 36-39
- Kralj D. 1992b. Značilnost slovenskih hmeljnih kultivarjev. *Hmeljar*, 62, 3: 54-56
- Lincoln T., Zeiger E. 2002. *Plant physiology*. 3rd ed. Sunderland, Sinauer Assc. Inc.: 283-308
- Majer. D. 2002. Odzivnost in poškodbe hmeljnih rastlin ob stresnih razmerah in vremenskih nepravilnostih v rastni dobi. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 181-183
- Maki H., Morohashi Y. 2005. Development of polyphenol oxidase activity in the micropylar endosperm of tomato seeds. *Journal of Plant Physiology*, 163: 1-10
- Martinez M. V., Whitaker J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 6: 195-200
- Marusek C. M., Trobaugh N. M., Flurkey W. H., Inlow J. K. 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100: 108-123
- Nicolas J., Billaurd C., Philippon J., Rouet-Mayer M. A. 2003. Enzymatic – biochemical Aspects. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 678-686
- Papagiannopoulos M., Mellenthin A. 2002. Automated sample preparation by pressurized liquid extraction-solid-phase extraction for the liquid chromatographic-mass spectrometric investigation of polyphenols in brewing process. *Journal of Chromatography A*, 976: 345-348
- Radišek S., Rak-Cizej M., Žolnir M., Matjaž-Petek K. 2003. Najpomembnejše bolezni in škodljivci hmelja. *Sodobno kmetijstvo*, 36, 5: 24-26
- Rak-Cizej M. 2003. Bionomija hmeljevega bolhača *Psylliodes attenuatus* Koch (Coleoptera: Chrysomelidae) v Sloveniji. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 91-93
- Rak-Cizej M., Žolnir M. 2003. Hmeljev bolhač (*Psylliodes attenuatus* Koch) vse pogostejši škodljivec hmelja v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Zreče, 4. – 6. marec 2003. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 233-238

- Riley P. A. 1997. Melanin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29, 11: 1235-1239
- Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436
- Rode J., Zmrzlak M., Kovačević M. 2002. Hmeljna rastlina. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 21-30
- Rusjan D., Veberič R., Korošec-Koruza Z. 2004. Vpliv bakrovih spojin na aktivnost polifenol oksidaz v listih, vršičkih in grozdju vinske trte sorte 'Merlot' (*Vitis vinifera* L.). *Acta Agriculturae Slovenica*, 83, 2: 365-378
- Ryan C. A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 112-121
- Shi C., Dai Y., Xia B., Xu X., Xie Y, Liu Q. 2001. The purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 381a-381h
- Somssich I. E., Hahlbrock K. 1998. Pathogen defense in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, 3, 3: 86-90
- SAS Software. Version 8.01, 1999. Cary, SAS Institute Inc.: software
- Šuštar-Vozlič J., Čerenak A., Ferant N. 2002. Žlahtnjenje hmelja in hmeljni kultivarji. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 31-48
- Thipyapong P., Hunt M. D., Steffens J. C. 1995. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 40, 3: 673-676
- Tscharntke T., Thiessen S., Dolch R., Boland W. 2001. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 1025-10247
- Wang H., Yingming P., Tang X., Huang Z. 2006. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans*' seeds. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie = Food Science and Technology*, 39: 496-502
- Xu J. 2005. The effect of low-temperature storage on the activity of polyphenol oxidase in *Castanea henryi* chestnuts. *Postharvest Biology and Technology*, 38: 91-98
- Yoruk R., Marshall M. R. 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27: 361-422

ZAHVALA

Za strokovno pomoč, skrben pregled diplomske naloge, koristne nasvete in predloge se najlepše zahvaljujem prof. dr. Veroniki Abram, ki je bila mentorica v pravem pomenu besede.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Marjanu Simčiču za strokovni pregled naloge.

Iskreno se zahvaljujem delovni mentorici univ. dipl. inž. Mateji Vidmar za vse odgovore na moja vprašanja in pomoč pri laboratorijskem delu. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za kemijo, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi naloge.

Za nasvete in pomoč pri statistični obdelavi podatkov se zahvaljujem doc. dr. Lei Gašperlin.

Za pregled naloge se zahvaljujem univ. dipl. inž. Ivici Hočevnar. Zahvaljujem se tudi univ. dipl. bibl. Barbari Slemenik za pomoč pri iskanju in zbiranju literature.

Vsem svojim najbližjim pa se zahvaljujem za pomoč, podporo, razumevanje, potrpljenje in vzpodbude tekom mojega študija ter hvala ker ste mi stali ob strani.

PRILOGE

PRILOGE A: PODATKI POLIFENOLOKSIDAZNE AKTIVNOSTI

Priloga A1: Polifenoloaktivna aktivnost storžkov

Priloga A1 prikazuje podatke storžkov hmelja. Vzorci so označeni s tremi črkami in številko, pri čemer prva črka pomeni kultivar hmelja (*Humulus lupulus*): A – Aurora, B – Bobek, C – Celeia, M – Magnum, S – Savinjski golding in T – Taurus. Druga črka pomeni S – storžek. Tretja črka pomeni mesto vzorčenja na hmeljevi rastlini: Z – zgoraj in S – spodaj. Številke 1, 2, 3, 4 pomenijo število vzorcev storžkov istega kultivarja, le da so bili vzorci 1, 2 in 3 sveže pobrani in zamrznjeni, vzorci 4 pa so bili najprej posušeni in nato zamrznjeni.

LEGENDA:

- A_{595} - absorbanca pri valovni dolžini 595 nm,
- R - razrečitveni faktor,
- γ - masna koncentracija proteinov (mg/ml),
- k_{SL} - naklon premice slepega vzorca (s^{-1}),
- k_{VZ} - naklon premice vzorca (s^{-1}),
- $|\Delta k|$ - absolutna vrednost razlike naklonov vzorca in slepega vzorca (s^{-1}),
- SA - specifična aktivnost encima PPO ($mg^{-1}s^{-1}$).

Polifenoloaktivna aktivnost storžkov

Vzorec	PROTEINI			POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A_{595}	γ [mg/ml]	γ_{pov} [mg/ml]	k_{SL} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	k_{VZ} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	$ \Delta k $ [$10^{-4} \times s^{-1}$]	SA [$10^{-2}/mgs$]	SA_{pov} [$10^{-2}/mgs$]
ASZ1	0,281	0,188	0,19	-4,9445	-8,1032	3,1587	1,69343	2,22
	0,276	0,185		-3,7204	-9,4165	5,6961	3,05377	
	0,281	0,189		-3,7408	-7,7565	4,0157	2,15288	
	0,274	0,184		-3,7408	-8,1189	3,6826	1,97430	
ASZ2	0,364	0,244	0,24	-5,7268	-9,8075	4,0807	1,66946	1,68
	0,361	0,242		-5,4104	-9,8647	4,4543	1,85531	
	0,368	0,247		-4,7930	-8,5630	3,7700	1,54235	
	/	/		/	/	/	/	
ASZ4	0,197	0,133	0,13	-4,5753	-21,580	17,0047	13,4709	14,46
	0,197	0,132		-4,3882	-22,229	17,8408	14,1332	
	0,184	0,123		-3,6659	-22,699	19,0331	15,0778	
	0,174	0,117		-3,6628	-22,801	19,1382	15,1610	
ASS1	0,315	0,211	0,21	-4,7126	-10,608	5,8954	2,85573	2,44
	0,303	0,203		-6,3499	-10,878	4,5281	2,19341	
	0,297	0,199		-3,4190	-11,404	7,9850	3,86793	
	0,316	0,212		-3,7316	-10,552	6,8204	3,30380	
ASS2	0,274	0,184	0,18	-5,3875	-10,759	5,3715	2,95361	3,01
	0,267	0,179		-4,2610	-9,3535	5,0925	2,80020	
	0,275	0,185		-2,8432	-9,2527	6,4095	3,52438	
	0,268	0,180		-3,7527	-8,7750	5,0223	2,76176	

Nadaljevanje priloge A1: Polifenoloksidazna aktivnost storžkov

Vzorec	PROTEINI			POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A ₅₉₅	γ [mg/ml]	γ _{pov} [mg/ml]	k _{SL} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	k _{VZ} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	Δk [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	SA [10 ⁻² /mgs]	SA _{pov} [10 ⁻² /mgs]
ASS3	0,299	0,201	0,20	-4,4977	-8,0034	3,5057	1,74293	2,09
	0,296	0,199		-4,5868	-9,1814	4,5946	2,28430	
	0,304	0,204		-4,7881	-8,5531	3,7650	1,87185	
	0,299	0,201		-4,5763	-9,5057	4,9294	2,45076	
ASS4	0,181	0,122	0,12	-4,7139	-17,890	13,176	11,0577	11,35
	0,178	0,119		-4,6980	-18,096	13,398	11,2439	
	0,176	0,118		-4,4915	-18,162	13,671	11,4726	
	0,175	0,117		-4,6173	-18,463	13,846	11,6196	
BSZ1	0,220	0,591	0,59	-4,0610	-10,518	6,4570	1,08731	1,04
	0,230	0,607		-4,5985	-10,518	5,9195	0,99680	
	0,217	0,584		/	/	/	/	
	/	/		/	/	/	/	
BSZ2	0,219	0,294	0,30	-6,2092	-9,6642	3,4550	1,14881	1,14
	0,218	0,293		-6,0328	-9,4488	3,4160	1,13584	
	0,235	0,315		/	/	/	/	
	/	/		/	/	/	/	
BSZ3	0,411	0,276	0,27	-5,6784	-12,758	7,0796	2,62517	2,59
	0,392	0,263		-4,9133	-12,241	7,3277	2,71716	
	0,403	0,270		-5,0447	-12,177	7,1323	2,64471	
	0,404	0,271		-5,3569	-11,780	6,4231	2,38173	
BSZ4	0,465	0,312	0,31	-4,5328	-27,909	23,376	7,59199	7,63
	0,452	0,304		-4,6378	-28,269	23,621	7,67481	
	/	/		/	/	/	/	
	/	/		/	/	/	/	
BSS1	0,336	0,226	0,23	-5,8619	-11,082	5,2201	2,31873	2,20
	0,336	0,225		-5,7163	-10,919	5,2027	2,31100	
	0,333	0,223		-4,8629	-9,9746	5,1117	2,27058	
	0,337	0,226		-5,3336	-9,6333	4,2997	1,90989	
BSS2	0,320	0,214	0,30	-5,8989	-10,027	4,3711	1,43577	1,36
	0,451	0,303		-6,0343	-10,500	4,4657	1,46684	
	0,558	0,375		-4,9938	-9,6392	4,6454	1,52587	
	0,486	0,326		-6,2088	-9,2287	3,0199	0,99194	
BSS3	0,466	0,313	0,27	-6,3634	-12,655	6,2916	2,28797	2,15
	0,435	0,292		-5,6820	-11,415	6,0330	2,19393	
	0,371	0,249		-5,7188	-11,490	5,7712	2,09873	
	0,366	0,246		-5,5574	-11,061	5,5036	2,00141	
BSS4	0,191	0,128	0,13	-5,6375	-13,316	7,689	5,874	5,97
	0,198	0,133		-6,6745	-15,550	8,876	6,781	
	0,196	0,132		-6,2220	-13,084	6,862	5,243	
	/	/		/	/	/	/	
CSZ1	0,978	0,657	0,66	-5,1168	-10,184	5,0672	0,77066	1,24
	0,985	0,661		-3,9922	-12,971	8,9788	1,36557	
	1,004	0,674		-4,1724	-14,074	9,9016	1,50592	
	0,951	0,638		-4,7343	-13,505	8,7707	1,33392	
CSZ2	0,243	0,163	0,16	-4,8004	-11,782	6,9816	4,31133	4,55
	0,242	0,162		-3,5523	-11,199	7,6467	4,72205	
	0,243	0,163		-3,1044	-10,529	7,4246	4,58490	
	0,237	0,159		-4,1410	-11,590	7,4490	4,59997	

Nadaljevanje priloge A1: Polifenoloksidazna aktivnost storžkov

Vzorec	PROTEINI			POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A ₅₉₅	γ [mg/ml]	γ _{pov} [mg/ml]	k _{SL} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	k _{VZ} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	Δk [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	SA [10 ⁻² /mgs]	SA _{pov} [10 ⁻² /mgs]
CSZ4	0,120	0,133	0,13	-4,1038	-13,855	9,7512	7,31638	7,39
	0,202	0,135		-2,8676	-13,309	10,0441	7,53618	
	0,197	0,132		-3,3034	-13,078	9,7746	7,33394	
	0,198	0,133		-2,8112	-12,641	9,8298	7,37534	
CSS1	0,375	0,251	0,33	-4,7640	-11,045	6,2808	1,90533	1,77
	0,545	0,366		-5,3319	-8,5946	3,2627	0,98977	
	0,606	0,406		-6,7697	-10,198	3,4283	1,04000	
	0,287	0,192		-3,4543	-13,386	10,041	3,15726	
CSS2	0,414	0,278	0,29	-4,9746	-10,249	5,2744	1,83177	2,12
	0,491	0,330		-4,2537	-9,5763	5,3226	1,84851	
	0,448	0,301		-3,6588	-9,8279	6,1691	2,14250	
	0,362	0,243		-3,1259	-10,790	7,6641	2,66170	
CSS4	0,143	0,096	0,09	-3,2640	-8,9106	5,6466	5,97562	6,66
	0,135	0,090		-1,6232	-8,5554	6,9322	7,33613	
	0,145	0,097		/	/	/	/	
	/	/		/	/	/	/	
MSZ1	0,211	0,141	0,14	-5,2763	-8,6181	3,3418	2,44025	2,63
	0,209	0,140		-5,0004	-8,1007	3,1003	2,26390	
	0,207	0,139		-3,8232	-7,8981	4,0749	2,97557	
	0,190	0,128		-3,3217	-7,2113	3,8896	2,84026	
MSZ2	0,312	0,209	0,20	-4,6531	-9,0189	4,3658	2,19688	2,08
	0,290	0,194		-4,0277	-8,9201	4,8924	2,46187	
	0,284	0,191		-4,7134	-8,3833	3,6699	1,84670	
	0,299	0,201		-5,3515	-8,9923	3,6408	1,83206	
MSZ3	0,515	0,346	0,34	-4,4614	-9,6597	5,1983	1,52688	1,81
	0,507	0,340		-4,0444	-11,359	7,3146	2,14849	
	0,508	0,341		-3,3186	-10,071	6,7524	1,98336	
	0,498	0,334		-4,4995	-9,8620	5,3625	1,57511	
MSZ4	0,177	0,119	0,12	-5,8227	-8,7628	2,9401	2,45717	2,26
	0,188	0,126		-6,2768	-8,9385	2,6617	2,22450	
	0,180	0,121		-5,8220	-8,8213	2,9993	2,50664	
	0,168	0,113		-5,805	-8,1744	2,1939	1,83354	
MSS1	0,178	0,120	0,12	-5,4367	-8,1459	2,7092	2,26603	2,69
	0,182	0,122		-4,4945	-7,7915	3,2970	2,75183	
	0,178	0,120		-3,7571	-7,3968	3,6397	3,04432	
	0,174	0,117		/	/	/	/	
MSS2	0,377	0,253	0,25	-3,2662	-7,4436	4,1774	1,67947	1,13
	0,359	0,241		-3,4168	-6,6463	3,2295	1,29838	
	0,357	0,450		-4,0440	-7,5965	3,5525	1,42824	
	0,375	0,252		-3,5193	-6,7804	3,2611	1,31109	
MSS3	0,662	0,444	0,44	-3,1536	-9,2747	6,1211	1,38630	1,34
	0,686	0,460		-4,0241	-7,7605	3,7364	0,84621	
	0,622	0,417		-4,6696	-11,857	7,1874	1,62779	
	0,662	0,444		-3,9491	-10,519	6,5699	1,48794	
MSS4	0,152	0,102	0,11	-5,7174	-10,821	5,1036	4,64893	3,64
	0,155	0,104		-6,3635	-10,284	3,9205	3,57123	
	0,146	0,098		-6,0871	-9,5421	3,4550	3,14720	
	0,144	0,096		-6,0567	-9,4865	3,4854	3,17490	

Nadaljevanje priloge A1: Polifenoloksidazna aktivnost storžkov

Vzorec	PROTEINI			POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A ₅₉₅	γ [mg/ml]	γ _{pov} [mg/ml]	k _{SL} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	k _{VZ} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	Δk [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	SA [10 ⁻² /mgs]	SA _{pov} [10 ⁻² /mgs]
SSZ1	0,405	0,271	0,27	-4,3906	-13,038	8,6474	3,23547	3,12
	0,397	0,267		-3,6265	-11,776	8,1495	3,04918	
	0,397	0,267		-3,5313	-12,324	8,7927	3,28983	
	0,394	0,264		-3,9403	-11,695	7,7547	2,90146	
SSZ4	0,201	0,135	0,13	-5,0228	-25,822	20,799	15,5809	15,97
	0,202	0,135		-5,2403	-23,751	18,511	13,9867	
	0,196	0,131		-4,7049	-27,512	22,807	17,0850	
	0,196	0,132		-4,3572	-27,530	23,173	17,3589	
SSS1	0,234	0,157	0,16	-4,9291	-13,290	8,3609	5,34438	5,93
	0,233	0,157		-3,3520	-12,786	9,4340	6,03031	
	0,235	0,158		-3,3068	-13,593	10,286	6,57050	
	0,230	0,154		-3,4527	-12,453	9,0003	5,75309	
SSS2	0,344	0,231	0,23	-5,0493	-14,697	9,6477	4,23362	4,19
	0,344	0,231		-4,2001	-13,861	9,6609	4,23941	
	0,340	0,228		-3,8586	-13,342	9,4834	4,16152	
	0,331	0,222		-3,8219	-13,208	9,3861	4,10781	
SSS3	0,205	0,138	0,14	-4,7308	-11,136	6,4052	4,74329	5,60
	0,208	0,140		-4,2838	-12,585	8,3012	6,14735	
	0,197	0,133		-3,9973	-12,085	8,0877	5,98925	
	0,194	0,130		-3,7194	-11,199	7,4796	5,53893	
SSS4	0,340	0,228	0,22	-4,7649	-42,884	38,119	17,5411	18,02
	0,309	0,208		-4,4511	-44,660	40,209	18,5028	
	0,322	0,216		/	/	/	/	
	/	/		/	/	/	/	
TSZ1	0,229	0,154	0,15	-4,7870	-7,1490	2,3620	1,54163	1,59
	0,232	0,156		-4,4435	-7,4291	2,9856	1,94863	
	0,225	0,151		-4,4613	-7,0811	2,6198	1,70989	
	0,227	0,152		-4,3841	-6,1445	1,7604	1,14897	
TSZ2	0,308	0,207	0,21	-4,7919	-8,7741	3,9822	1,92025	1,18
	0,300	0,201		-5,8415	-7,0570	1,2155	0,86125	
	0,328	0,220		-5,0056	-7,5231	2,5175	1,21396	
	0,230	0,201		-5,2094	-6,6976	1,4882	0,71762	
TSZ3	0,274	0,184	0,18	-5,2917	-8,8275	3,5358	1,95820	2,17
	0,270	0,181		-4,8532	-8,6832	3,8300	2,12113	
	0,264	0,177		-5,0728	-8,8847	3,8119	2,11111	
	0,269	0,180		-4,2124	-8,6767	4,4643	2,47242	
TSZ4	0,141	0,094	0,09	-3,9896	-8,8907	4,9011	5,27618	6,06
	0,139	0,093		-4,2541	-9,0802	4,8261	5,19544	
	0,137	0,092		-3,4630	-9,8952	6,4322	6,92446	
	0,137	0,092		-2,9794	-9,3329	6,3535	6,83974	
TSS1	0,334	0,224	0,22	-4,7666	-10,413	5,6464	2,51344	2,71
	0,325	0,218		-4,0733	-9,7274	5,6541	2,51687	
	0,334	0,224		-4,0741	-10,684	6,6099	2,94234	
	0,345	0,232		-3,5790	-10,031	6,4520	2,87205	
TSS2	0,339	0,228	0,21	-4,3573	-6,8259	2,4686	1,16266	1,44
	0,281	0,189		-3,6855	-7,4394	3,7539	1,76801	
	0,334	0,224		-2,3609	-5,9528	3,5919	1,69172	
	0,305	0,204		-2,8567	-5,3137	2,4570	1,15720	

Nadaljevanje priloge A1: Polifenoloksidazna aktivnost storžkov

Vzorec	PROTEINI			POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A ₅₉₅	γ [mg/ml]	γ_{pov} [mg/ml]	k _{SL} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	k _{VZ} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	\Delta k [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	SA [10 ⁻² /mgs]	SA _{pov} [10 ⁻² /mgs]
TSS3	0,230	0,154	0,16	-3,0140	-7,6816	4,6676	3,00755	2,42
	0,230	0,154		-4,3921	-6,7823	3,3902	2,18446	
	0,234	0,150		-3,6153	-6,6151	2,9998	1,93291	
	0,241	0,162		-3,1061	-7,0808	3,9747	2,56108	
TSS4	0,190	0,128	0,13	-4,0380	-10,939	6,9010	5,49640	5,80
	0,185	0,124		-4,9489	-10,490	5,5411	4,41329	
	0,190	0,128		-1,6389	-11,011	9,3721	7,46454	
	0,183	0,123		-3,5449	-10,852	7,3071	5,81984	

Priloga A2: Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov iz hmeljišča

Priloga A2 prikazuje podatke nepoškodovanih listov hmelja iz hmeljišča poleg Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. Vzorci so označeni s tremi črkami in številko, pri čemer prva črka pomeni kultivar hmelja (*Humulus lupulus*): A – Aurora, B – Bobek, C – Celeia, M – Magnum, S – Savinjski golding in T – Taurus. Druga črka pomeni L – list. Tretja črka pomeni, da so listi N – nepoškodovani. Številke 1, 2, 3, pomenijo število vzorcev istega kultivarja.

LEGENDA:

- A_{595} - absorbanca pri valovni dolžini 595 nm,
- R - razrečitveni faktor,
- γ - masna koncentracija proteinov (mg/ml),
- k_{SL} - naklon premice slepega vzorca (s^{-1}),
- k_{VZ} - naklon premice vzorca (s^{-1}),
- $|\Delta k|$ - absolutna vrednost razlike naklonov vzorca in slepega vzorca (s^{-1}),
- SA - specifična aktivnost encima PPO ($mg^{-1}s^{-1}$).

Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov iz hmeljišča

Vzorec	PROTEINI				POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A_{595}	R	γ [mg/ml]	γ_{pov} [mg/ml]	k_{SL} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	k_{VZ} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	$ \Delta k $ [$10^{-4} \times s^{-1}$]	SA [$10^{-2}/mgs$]	SA_{pov} [$10^{-2}/mgs$]
ALN1	0,906	1	0,608	0,60	-4,5929	-92,845	88,2522	14,6910	14,50
	0,887		0,595		-4,8919	-91,536	87,9831	14,6412	
	0,893		0,599		-4,4332	-87,839	85,1890	14,1811	
ALN2	0,914	1	0,614	0,62	-4,7419	-118,73	113,988	18,5093	18,93
	0,927		0,622		-5,0149	-121,48	116,465	18,9115	
	0,911		0,612		-4,6713	-123,92	119,249	19,3635	
ALN3	0,618	1	0,415	0,41	-4,5701	-54,989	50,4189	12,3232	12,43
	0,614		0,412		-4,5516	-55,276	50,7244	12,3979	
	0,596		0,400		-4,5683	-56,010	51,4417	12,5732	
BLN1	0,575	3	0,992	0,97	-3,3644	-391,81	388,456	39,9904	39,27
	0,562		0,968		-3,1192	-379,06	375,941	38,7020	
	0,553		0,954		-3,1726	-383,13	379,957	39,1155	
BLN2	0,575	3	0,992	0,97	-4,3771	-288,47	284,093	29,2465	32,90
	0,562		0,968		-3,3433	-354,39	351,047	36,1393	
	0,553		0,954		-3,3938	-327,04	323,646	33,3184	
BLN3	0,484	4	1,112	0,11	-3,6435	-413,97	410,327	36,8689	35,91
	0,485		1,115		-3,0063	-395,17	392,164	35,2369	
	0,484		1,112		-2,3662	-398,85	396,484	35,6251	
CLN1	0,756	1	0,507	0,51	-3,6572	-21,592	17,9348	3,54070	3,48
	0,766		0,514		-3,8628	-21,189	17,3262	3,42055	
	0,742		0,498		-2,5390	-20,163	17,6240	3,47934	
CLN2	0,863	1	0,579	0,57	-4,4898	-64,114	59,6242	10,4009	10,45
	0,849		0,570		-3,4583	-63,175	59,7167	10,4170	
	0,851		0,571		-3,4906	-63,912	60,4214	10,5399	
CLN3	0,396	1	0,266	0,27	-4,5579	-19,872	15,3141	5,58499	5,37
	0,426		0,286		-5,1785	-18,661	13,4825	4,91701	
	0,403		0,271		-3,7375	-19,110	15,3725	5,60629	

Nadaljevanje priloge A2: Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov iz hmeljišča

Vzorec	PROTEINI				POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A ₅₉₅	R	γ [mg/ml]	γ _{pov} [mg/ml]	k _{SL} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	k _{VZ} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	Δk [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	SA [10 ⁻² /mgs]	SA _{pov} [10 ⁻² /mgs]
MLN1	0,383	1	0,257	0,26	-4,7493	-40,474	35,7247	13,7834	13,60
	0,385		0,258		-4,4659	-39,683	35,2171	13,5876	
	0,390		0,232		-4,8561	-39,677	34,8209	13,4347	
MLN2	0,436	1	0,292	0,29	-5,2157	-30,191	24,9753	8,72783	9,23
	0,429		0,288		-5,0584	-32,642	27,5836	9,63932	
	0,415		0,278		-4,7958	-31,443	26,6472	9,31209	
MLN3	0,651	4	1,497	1,49	-5,1929	-179,28	174,087	11,6601	12,05
	0,652		1,498		-4,9104	-186,29	181,380	12,1486	
	0,646		1,484		-4,6181	-188,67	184,052	12,3276	
SLN1	0,201	4	0,461	0,47	-4,7788	-34,400	29,6212	7,7542	8,28
	0,213		0,490		-3,9708	-37,324	33,3532	8,7312	
	0,196		0,451		-4,9741	-36,938	31,9639	8,3675	
SLN2	0,799	1	0,536	0,52	-4,0518	-42,672	38,6202	7,38323	7,56
	0,780		0,524		-4,3516	-44,319	39,9674	7,64078	
	0,759		0,509		-3,2383	-43,283	40,0447	7,65556	
SLN3	0,761	1	0,511	0,51	-3,8098	-76,022	72,2122	14,0457	14,11
	0,766		0,514		-4,0911	-74,891	73,7999	14,3545	
	0,771		0,517		-4,4472	-75,989	71,5418	13,9153	
TLN1	0,389	4	0,894	0,89	-5,2973	-78,692	73,3947	8,2261	8,33
	0,397		0,913		-4,9435	-79,666	74,7225	8,3749	
	0,378		0,869		-5,2240	-79,307	74,0830	8,3749	
TLN2	0,503	4	1,157	1,18	-4,6727	-100,59	95,9173	8,1515	8,28
	0,515		1,184		-4,9067	-102,12	97,2133	8,2616	
	0,517		1,189		-4,3056	-103,44	99,1344	8,4249	
TLN3	0,408	6	1,408	1,44	-4,3099	-80,284	75,9741	5,2938	5,14
	0,426		1,469		-4,3512	-81,771	77,4198	5,3945	
	0,414		1,429		-5,1399	-73,060	67,9201	4,7326	

Priloga A3: Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov iz hmeljišča, pri katerih je bila polifenoloksidaza v stiku s katalazo 15 min pred reakcijo s substratom

Priloga A3 prikazuje podatke nepoškodovanih listov hmelja iz hmeljišča poleg Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec. Vzorci so označeni s tremi črkami in številko, pri čemer prva črka pomeni kultivar hmelja (*Humulus lupulus*): A – Aurora in C – Celeia. Druga črka pomeni L – list. Tretja črka pomeni, da so listi N – nepoškodovani. Številke 1, 2, 3, pomenijo število vzorcev istega kultivarja.

LEGENDA:

- A_{595} - absorbanca pri valovni dolžini 595 nm,
- R - razrečitveni faktor,
- γ - masna koncentracija proteinov (mg/ml),
- k_{SL} - naklon premice slepega vzorca (s^{-1}),
- k_{VZ} - naklon premice vzorca (s^{-1}),
- $|\Delta k|$ - absolutna vrednost razlike naklonov vzorca in slepega vzorca (s^{-1}),
- SA - specifična aktivnost encima PPO ($mg^{-1}s^{-1}$).

Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih listov iz hmeljišča, pri katerih je bila polifenoloksidaza v stiku s katalazo 15 min pred reakcijo s substratom

Vzorec	POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	k_{SL} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	k_{VZ} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	$ \Delta k $ [$10^{-4} \times s^{-1}$]	SA [$10^{-2}/mgs$]	SA_{pov} [$10^{-2}/mgs$]
ALN1	-3,9529	-91,616	87,6631	14,5929	15,22
	-1,9113	-95,369	93,4577	15,5575	
	-2,0768	-95,178	93,1012	15,4982	
ALN3	-3,3256	-54,536	52,5064	12,8334	12,57
	-4,0827	-54,536	50,4533	12,3316	
	-2,9883	-54,343	51,3547	12,5519	
CLN2	-2,8176	-58,964	56,1464	9,89153	10,05
	-3,4824	-60,516	57,0336	10,0478	
	-2,9303	-60,959	58,0287	10,2231	

Priloga A4: Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka, pobranih 17 ur po povzročenih poškodbah

Preglednica 4 prikazuje podatke nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov rastlin iz rastlinjaka, pri čemer so bili mehansko poškodovani listi pobrani 17 ur po poškodbi. Vzorci so označeni s tremi črkami, pri čemer prva črka pomeni kultivar hmelja (*Humulus lupulus*): A – Aurora, B – Bobek, C – Celeia, M – Magnum, S – Savinjski golding T – Taurus in primerjalni rastlini V – velika kopriva (*Urtica dioica*) in K – navadna konoplja (*Canabis sativa*). Druga črka pomeni L – list. Tretja črka pomeni, da so listi N – nepoškodovani oziroma M – mehansko poškodovani.

LEGENDA:

- A_{595} - absorbanca pri valovni dolžini 595 nm,
- R - razrečitveni faktor,
- γ - masna koncentracija proteinov (mg/ml),
- k_{SL} - naklon premice slepega vzorca (s^{-1}),
- k_{VZ} - naklon premice vzorca (s^{-1}),
- $|\Delta k|$ - absolutna vrednost razlike naklonov vzorca in slepega vzorca (s^{-1}),
- SA - specifična aktivnost encima PPO ($mg^{-1}s^{-1}$).

Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka, pobranih 17 ur po povzročenih poškodbah

Vzorec	PROTEINI				POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A_{595}	R	γ [mg/ml]	γ_{pov} [mg/ml]	k_{SL} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	k_{VZ} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	$ \Delta k $ [$10^{-4} \times s^{-1}$]	SA [$10^{-2}/mgs$]	SA_{pov} [$10^{-2}/mgs$]
ALN	0,363	5	1,042	1,03	-4,2994	-13,638	13,5746	1,3154	1,32
	0,354		1,017		-3,6735	-17,874	13,5625	1,3142	
	0,361		1,037		-4,8377	-17,236	13,6763	1,3252	
ALM	0,482	5	1,386	1,38	-4,6404	-23,211	18,5706	1,3457	1,40
	0,482		1,384		-3,4526	-23,554	20,1014	1,4566	
	0,476		1,369		-4,6233	-23,781	19,1577	1,3882	
BLN	0,361	6	1,245	1,21	-4,3597	-35,441	31,0813	2,5583	2,70
	0,360		1,241		-2,8546	-37,824	34,9694	2,8783	
	0,336		1,160		-3,7349	-35,912	32,1771	2,6485	
BLM	0,390	6	1,343	1,34	-4,2195	-48,805	44,5855	3,3269	3,63
	0,386		1,329		-4,3259	-51,839	47,5131	3,5454	
	0,391		1,348		-4,6064	-48,230	43,6236	4,0013	
CLN	0,274	5	0,788	0,83	-2,8422	-12,417	9,5748	1,1287	1,02
	0,297		0,854		-3,5709	-12,636	9,0651	1,0876	
	0,299		0,859		-3,9009	-10,754	6,8531	0,8222	
CLM	0,243	5	0,699	0,72	-4,3367	-25,980	21,6433	3,0176	3,06
	0,261		0,749		-3,9125	-26,451	22,5385	3,1424	
	0,245		0,704		-4,8261	-26,382	21,5559	3,0054	
MLN	0,440	6	1,516	1,53	-3,2829	-48,241	44,9581	2,9448	2,85
	0,438		1,509		-3,6477	-47,102	43,4543	2,8463	
	0,451		1,555		-3,6839	-45,634	41,9801	2,7498	
MLM	0,460	6	1,587	1,60	-4,2976	-46,919	42,6214	2,6608	2,65
	0,466		1,607		-3,0298	-45,919	42,6312	2,6614	
	0,467		1,612		-2,5588	-44,771	42,2122	2,6352	

Nadaljevanje priloge A4: Polifenoloksidazna aktivnost nepoškodovanih in mehansko poškodovanih listov iz rastlinjaka, pobranih 17 ur po povzročenih poškodbah

Vzorec	PROTEINI				POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A ₅₉₅	R	γ [mg/ml]	γ _{pov} [mg/ml]	k _{SL} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	k _{VZ} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	Δk [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	SA [10 ⁻² /mgs]	SA _{pov} [10 ⁻² /mgs]
SLN	0,274	4	0,630	0,64	-4,1644	-31,732	27,5676	4,300	4,15
	0,275		0,633		-5,0496	-32,135	27,0854	4,225	
	0,287		0,660		-5,0654	-30,274	25,2086	3,932	
SLM	0,268	4	0,616	0,64	-5,0390	-11,235	6,1960	2,9244	2,64
	0,278		0,639		-4,3949	-8,9976	4,6027	2,1724	
	0,284		0,652		-3,9190	-9,9176	5,9986	2,8312	
TLN	0,713	4	1,639	1,58	-4,5416	-25,923	21,3814	1,3468	1,28
	0,687		1,578		-4,1615	-23,592	19,4305	1,2296	
	0,663		1,524		-4,7131	-24,703	19,9899	1,2650	
TLM	0,603	4	1,387	1,35	-4,4921	-14,673	10,1809	0,7545	0,73
	0,603		1,386		-4,8872	-14,423	9,5358	0,7067	
	0,554		1,275		-4,0207	-13,638	9,6179	0,7128	
VLN	0,668	4	1,536	1,56	-2,8655	-369,75	366,885	23,4441	22,90
	0,674		1,549		-2,8740	-374,79	371,916	23,7656	
	0,700		1,641		-1,7813	-334,44	336,221	21,4847	
VLM	0,364	4	0,837	0,93	-2,3999	-507,73	505,330	54,1585	52,72
	0,414		0,953		-4,4710	-487,91	483,439	51,8124	
	0,439		1,009		-4,0501	-490,92	486,870	52,1801	
KLN	0,848	6	2,924	2,90	-3,7985	-74,259	74,2590	2,5607	2,47
	0,848		2,925		-2,1435	-74,246	72,1025	2,4864	
	0,827		2,850		-4,6724	-72,869	68,1966	2,3517	
KLM	0,763	6	2,630	2,59	-3,8817	-41,075	37,1933	1,4355	1,38
	0,750		2,585		-2,8882	-39,765	36,8768	1,4233	
	0,742		2,558		-5,1803	-38,311	33,1307	1,2787	

Priloga A5: Polifenoloksidazna aktivnost listov iz rastlinjaka (nepoškodovani, mehansko poškodovani in poškodovani od hmeljevega bolhača)

Preglednica 5 prikazuje podatke polifenoloksidazne aktivnosti nepoškodovanih, mehansko poškodovanih in s hmeljevim bolhačem poškodovanih listov rastlin. Vzorci so označeni s tremi črkami in številko, pri čemer prva črka pomeni kultivar hmelja (*Humulus lupulus*): A – Aurora, B – Bobek, C – Celeia, M – Magnum, S – Savinjski golding T – Taurus in primerjalni rastlini V – velika kopriva (*Urtica dioica*) in K – navadna konoplja (*Canabis sativa*). Druga črka pomeni L – list. Tretja črka pomeni, da so listi N – nepoškodovani, M – mehansko poškodovani oziroma H – poškodovani s hmeljevim bolhačem. Številke 1, 2, 3, 4 pomenijo po kolikšnem času so bili vzorci po narejeni poškodbi pobrani: 1 - po 8. urah, 2 - po 25. urah, 3 - po 50. urah, 4 - po 75. urah.

LEGENDA:

- A_{595} - absorbanca pri valovni dolžini 595 nm,
- R - razrečitveni faktor,
- γ - masna koncentracija proteinov (mg/ml),
- k_{SL} - naklon premice slepega vzorca (s^{-1}),
- k_{VZ} - naklon premice vzorca (s^{-1}),
- $|\Delta k|$ - absolutna vrednost razlike naklonov vzorca in slepega vzorca (s^{-1}),
- SA - specifična aktivnost encima PPO ($mg^{-1}s^{-1}$).

Polifenoloksidazna aktivnost listov iz rastlinjaka (nepoškodovani, mehansko poškodovani in poškodovani od hmeljevega bolhača)

Vzorec	PROTEINI				POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST					
	A_{595}	R	γ [mg/ml]	γ_{pov} [mg/ml]	k_{SL} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	k_{VZ} [$10^{-4} \times s^{-1}$]	$ \Delta k $ [$10^{-4} \times s^{-1}$]	SA [$10^{-2}/mgs$]	SA_{pov} [$10^{-2}/mgs$]	
ALN	0,258	1	0,148	0,15	-5,6928	-8,6156	2,9228	1,9897	1,64	
	0,256		0,149		-5,8310	-7,9134	2,0824	1,4176		
	0,250		0,143		-5,0442	-7,2880	2,2438	1,5274		
ALM1	0,304	1	0,175	0,18	-4,6394	-9,4001	4,7607	2,7014	2,85	
	0,317		0,182		-4,5323	-9,8157	5,2834	2,9980		
	0,299		0,172		/	/	/	/		
ALM2	0,114	5	0,327	0,36	-3,4658	-45,239	41,7732	1,1670	1,24	
	0,124		0,358		-3,8899	-50,062	46,1723	1,2899		
	0,136		0,389		-3,9439	-49,184	45,2404	1,2639		
ALM3	0,382	1	0,220	0,22	-2,6982	-37,692	34,9938	15,5768	15,34	
	0,224		0,224		-3,5931	-38,979	35,3859	15,7514		
	0,230		0,230		-3,6692	-36,659	32,9898	14,6848		
ALM4	0,229	1	0,131	0,13	-4,6753	-7,3554	2,6701	2,0274	2,70	
	0,228		0,131		-3,6798	-7,0884	3,4086	2,5881		
	0,231		0,133		-2,7776	-7,3776	4,6000	3,4927		
ALH	0,847	2	0,973	0,98	-3,2381	-68,850	65,6119	6,7404	6,00	
	0,846		0,972		-3,9185	-59,005	55,0865	5,6591		
	0,856		0,984		-4,7599	-59,329	54,5691	5,6060		
BLN	0,461	1	0,265	0,26	-5,0968	-22,187	17,0902	6,5078	6,55	
	0,463		0,266		-5,6381	-22,779	17,1409	6,5271		
	0,456		0,262		-5,1455	-22,549	17,4035	6,6271		

Nadaljevanje priloge A5: Polifenoloksidazna aktivnost listov iz rastlinjaka (nepoškodovani, mehansko poškodovani in poškodovani od hmeljevega bolhača)

Vzorec	PROTEINI				POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A ₅₉₅	R	γ [mg/ml]	γ _{pov} [mg/ml]	k _{SL} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	k _{VZ} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	Δk [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	SA [10 ⁻² /mgs]	SA _{pov} [10 ⁻² /mgs]
BLM1	0,304	1	0,175	0,18	-5,9698	-15,545	9,5752	5,4333	6,18
	0,317		0,182		-4,2492	-14,586	10,3368	5,8655	
	0,299		0,172		-4,0506	-16,832	12,7814	7,2526	
BLM2	0,340	1	0,195	0,19	-3,5304	-13,340	9,8096	5,1058	4,71
	0,334		0,192		-4,6779	-13,118	8,4401	4,3930	
	0,329		0,189		-4,1997	-13,117	8,9173	4,6414	
BLM3	0,366	1	0,210	0,19	-5,2797	-12,701	7,4213	3,8418	4,35
	0,338		0,194		-7,2459	-11,942	4,6961	2,4310	
	0,305		0,175		-3,2900	-16,405	13,115	6,7893	
BLM4	0,323	1	0,186	0,20	-3,7647	-24,818	21,0533	10,3495	10,02
	0,356		0,205		-4,1045	-23,333	19,2285	9,4525	
	0,383		0,220		-3,1735	-24,037	20,8635	10,2562	
BLH	0,315	1	0,181	0,18	-5,1536	-20,604	15,4504	8,6695	9,21
	0,314		0,181		-3,6009	-19,873	16,2721	9,1305	
	0,301		0,173		-3,6867	-21,192	17,5053	9,8225	
CLN	0,396	1	0,228	0,23	-5,1472	-9,1813	4,0341	1,7431	1,91
	0,418		0,240		-5,1038	-9,6751	4,5713	1,9752	
	0,393		0,226		-5,6796	-10,310	4,6304	2,0007	
CLM1	0,422	1	0,243	0,25	-5,3147	-7,6920	2,3773	0,9685	1,22
	0,434		0,250		-4,7602	-7,7389	2,9787	1,2123	
	0,426		0,245		-5,5569	-9,2202	3,6633	1,4909	
CLM2	0,409	1	0,235	0,24	-3,6658	-16,121	12,4552	5,2331	5,17
	0,418		0,240		-2,6532	-15,836	13,1828	5,5388	
	0,416		0,239		-4,8610	-16,119	11,2580	4,7301	
CLM3	0,313	1	0,180	0,17	-1,6732	-7,3915	5,7183	3,3019	2,28
	0,294		0,169		-3,4714	-6,9007	3,4293	1,9802	
	0,297		0,171		-3,3445	-6,0601	2,7156	1,5681	
CLM4	0,187	1	0,107	0,10	-3,4402	-8,7981	5,3979	5,3356	4,77
	0,167		0,096		-3,0559	-8,5543	5,4984	5,4350	
	0,174		0,100		-3,9489	-7,5355	3,5866	3,5452	
CLH	0,315	1	0,181	0,18	-3,7139	-8,2217	4,5078	2,5160	1,89
	0,315		0,181		-5,0607	-8,0530	2,9923	1,6701	
	0,305		0,176		-5,3214	-7,9942	2,6728	1,4917	
MLN	0,514	1	0,295	0,29	-5,4589	-39,283	33,8241	11,6428	11,35
	0,508		0,292		-4,6292	-39,732	29,3440	10,1007	
	0,495		0,284		-4,4747	-40,226	35,7513	12,3062	
MLM1	0,282	1	0,192	0,19	-5,4814	-10,889	5,4076	2,8702	2,20
	0,279		0,190		-5,6892	-9,2420	3,5528	1,8857	
	0,271		0,184		-5,0518	-8,5298	3,4780	1,8460	
MLM2	0,274	1	0,158	0,16	-4,0157	-5,6426	1,6269	1,0345	1,37
	0,271		0,156		-3,3141	-6,2005	2,8864	1,8355	
	0,276		0,158		-3,7818	-5,7510	1,9692	1,2522	
MLM3	0,299	1	0,172	0,17	-3,7402	-8,5767	4,8365	2,7805	2,36
	0,307		0,177		-3,0827	-6,8443	3,7616	2,1625	
	0,302		0,174		-3,4136	-7,1212	3,7076	2,1315	

Nadaljevanje priloge A5: Polifenoloksidazna aktivnost listov iz rastlinjaka (nepoškodovani, mehansko poškodovani in poškodovani od hmeljevega bolhača)

Vzorec	PROTEINI				POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A ₅₉₅	R	γ [mg/ml]	γ _{pov} [mg/ml]	k _{SL} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	k _{VZ} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	Δk [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	SA [10 ⁻² /mgs]	SA _{pov} [10 ⁻² /mgs]
MLM4	0,183	1	0,105	0,10	-3,6025	-7,3331	3,7306	3,8305	3,53
	0,164		0,094		-3,1268	-6,5101	3,3833	3,4739	
	0,161		0,093		-2,7433	-5,9387	3,1954	3,2809	
MLH	0,974	2	1,119	1,14	-3,2733	-51,854	48,5807	4,2766	3,95
	1,002		1,151		-4,5115	-45,912	41,4005	3,6181	
	0,989		1,137		-3,2559	-48,265	45,0091	3,9615	
SLN	0,270	1	0,155	0,15	-3,8776	-8,8022	4,9246	3,3140	2,96
	0,252		0,145		-4,4355	-8,7903	4,3548	2,9305	
	0,253		0,146		-4,3152	-8,2301	3,9149	2,6345	
SLM1	0,568	1	0,326	0,33	-5,5729	-11,936	6,3631	1,9397	1,95
	0,580		0,334		-5,9261	-11,971	6,0449	1,8427	
	0,564		0,324		-4,6671	-11,495	6,8279	2,0814	
SLM2	0,466	1	0,268	0,27	-2,7212	-8,4449	5,7237	2,1438	1,45
	0,467		0,268		-4,4004	-7,2410	2,8406	1,0639	
	0,461		0,265		-5,2403	-8,3064	3,0661	1,1484	
SLM3	0,367	1	0,211	0,21	-3,2102	-7,1242	3,9140	1,8751	1,77
	0,358		0,206		-3,5324	-4,2444	3,7120	1,7783	
	0,364		0,209		-3,7456	-7,2136	3,4680	1,6614	
SLM4	0,273	1	0,157	0,15	-3,2480	-7,9988	4,7508	3,2244	2,54
	0,247		0,142		-4,7445	-7,8935	3,1449	2,1345	
	0,249		0,143		-4,1143	-7,4447	3,3304	2,2604	
SLH	0,714	2	0,820	0,83	-4,4700	-113,33	108,860	13,1765	13,40
	0,726		0,834		-2,4874	-115,46	112,973	13,6743	
	0,718		0,825		-5,6723	-116,05	110,378	13,3602	
TLN	0,333	1	0,192	0,19	-4,5200	-6,1158	1,5958	0,8212	1,21
	0,341		0,196		-3,8464	-6,6836	2,8372	1,4601	
	0,340		0,195		-4,7528	-7,3626	2,6098	1,3431	
TLM1	0,491	3	0,847	0,86	-5,3778	-24,039	18,6612	2,1619	2,15
	0,511		0,882		-5,0260	-23,618	18,5920	2,1539	
	0,499		0,861		-5,2459	-23,741	18,4951	2,1427	
TLM2	0,712	2	0,818	0,83	-4,2692	-25,074	20,8048	2,5165	2,45
	0,720		0,827		-4,3328	-24,556	20,2232	2,4461	
	0,726		0,835		-4,4781	-24,201	19,7229	2,3856	
TLM3	0,620	3	1,069	1,10	-2,9817	-16,879	13,8973	1,2613	1,11
	0,644		1,110		-3,5331	-14,982	11,4489	1,0391	
	0,654		1,127		-4,3458	-15,696	11,3502	1,0301	
TLM4	0,647	1	0,372	0,36	-4,3687	-17,971	13,6023	3,7534	3,92
	0,614		0,353		-3,9966	-18,032	14,0354	3,8729	
	0,632		0,363		-3,4320	-18,391	14,9590	4,1277	
TLH	0,226	1	0,130	0,13	-4,1232	-9,2994	5,1762	4,0089	3,74
	0,225		0,129		-5,2840	-8,9627	3,6787	2,8491	
	0,223		0,128		-4,0611	-9,7024	5,6413	4,3691	
VLN*	0,373	6	1,285	1,27	-5,5214	-8,0285	2,5071	1,1820	1,47
	0,365		1,260		-4,3779	-7,4319	3,0540	1,1440	
	/		/		-4,4391	-8,2490	3,8099	1,7964	

Nadaljevanje priloge A5: Polifenoloksidazna aktivnost listov iz rastlinjaka (nepoškodovani, mehansko poškodovani in poškodovani od hmeljevega bolhača)

Vzorec	PROTEINI				POLIFENOLOKSIDAZNA AKTIVNOST				
	A ₅₉₅	R	γ [mg/ml]	γ _{pov} [mg/ml]	k _{SL} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	k _{VZ} [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	Δk [10 ⁻⁴ × s ⁻¹]	SA [10 ⁻² /mgs]	SA _{pov} [10 ⁻² /mgs]
VLM1	0,526	5	1,510	1,50	-3,2006	-76,461	73,2604	4,8714	4,87
	0,524		1,505		-2,2079	-78,650	76,4321	5,0823	
	0,521		1,496		-4,2013	-74,126	69,9247	4,6496	
VLM2	0,254	6	0,875	0,88	-3,1916	-19,372	16,1804	1,8430	1,89
	0,255		0,878		-2,4496	-19,485	17,0354	1,9404	
	0,255		0,880		-2,8988	-19,525	16,6262	1,8937	
VLM3	0,405	6	1,398	1,40	-3,1988	-82,261	79,0622	5,6486	5,65
	0,403		1,390		-2,1550	-84,935	82,7800	5,9142	
	0,409		1,412		-4,3102	-79,737	75,4268	5,3889	
VLM4	0,264	6	0,910	0,93	-4,7834	-1,9265	14,4816	1,5609	1,74
	0,267		0,922		-3,4717	-2,0745	17,2733	1,8618	
	0,276		0,951		-3,8365	-2,0575	16,7385	1,8042	
VLH	0,594	2	0,683	0,69	-4,0040	-251,82	247,816	36,0750	37,02
	0,614		0,706		-3,7709	-258,48	254,709	37,0785	
	0,584		0,671		-5,0379	-265,40	260,362	37,9014	
KLN	0,868	4	1,996	2,02	-4,9505	-79,727	74,7665	3,7019	3,65
	0,855		2,023		-5,0273	-79,566	74,5387	3,6906	
	0,887		2,040		-5,4572	-77,151	71,6938	3,5497	
KLM1	0,933	4	2,143	2,16	-5,1296	-44,744	39,6144	1,8804	1,88
	0,959		2,205		-5,7372	-45,789	40,0518	1,8533	
	0,929		2,135		-5,6187	-47,860	42,2413	1,9547	
KLM2	0,727	5	2,090	2,15	-4,9308	-37,589	32,6582	1,5182	1,53
	0,741		2,130		-3,0055	-37,047	34,0415	1,5825	
	0,777		2,234		-3,7037	-35,663	31,9593	1,4857	
KLM3	0,822	4	1,889	1,82	-4,4945	-37,343	32,8485	1,8030	1,87
	0,820		1,885		-2,9752	-36,737	33,7618	1,8531	
	0,736		1,692		-3,4563	-39,227	35,7707	1,9633	
KLM4	0,947	4	2,177	2,19	-3,9910	-30,547	26,5560	1,2118	1,17
	0,969		2,229		-4,1402	-30,166	26,0258	1,1876	
	0,943		2,169		-4,9773	-29,481	24,5037	1,1182	
KLH	0,860	4	1,978	2,01	-4,3071	-74,311	70,0039	3,4844	3,52
	0,890		2,047		-4,4112	-74,918	70,5068	3,5094	
	0,871		2,003		-5,4937	-77,378	71,7853	3,5731	

*Vzorec VLN smo redčili šestkrat tudi pri določanju polifenoloksidazne aktivnosti, saj je bila barva supernatanta 2 pretemna.

PRILOGE B: SLIKOVNI MATERIAL



Priloga B1: List hmelja – kultivar Bobek (*Humulus lupulus* L.), nepoškodovan, vzgojen v hmeljišču



Priloga B2: Listi hmelja – kultivar Bobek (*Humulus lupulus* L.), nepoškodovani, vzgojeni v rastlinjaku



Priloga B3: Listi hmelja – kultivar Bobek (*Humulus lupulus* L.), mehansko poškodovani, vzgojeni v rastlinjaku



Priloga B4: Listi hmelja – kultivar Bobek (*Humulus lupulus* L.), poškodovani s pomočjo hmeljevega bolhača (*Psylliodes attenuatus* Koch), vzgojeni v rastlinjaku