

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Neda LAZIĆ

**PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST
EKSTRAKTOV IZ LISTOV IN STORŽKOV HMELJA
(*Humulus lupulus L.*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Neda LAZIĆ

**PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV IZ LISTOV IN
STORŽKOV HMELJA (*Humulus lupulus L.*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM LEAVES AND
CONES OF HOP (*Humulus lupulus L.*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Natašo Poklar Ulrih, za somentorico prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzenta prof. dr. Rajko Vidrih.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Somentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Neda Lazić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 633.791:547.56:575.42(043)=163.6
KG	hmelj/ <i>Humulus lupulus</i> L./rastlinski izvlečki/fenolne spojine/protimikrobnna učinkovitost
AV	LAZIĆ, Neda
SA	POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica) / SMOLE MOŽINA, Sonja (somentorica) / VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV IZ LISTOV IN STORŽKOV HMELJA (<i>Humulus lupulus</i> L.)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 36 str., 6 pregl., 9 sl., 36 vir.
IJ	sl/en
JI	sl/en
AI	V diplomski nalogi nas je zanimalo, koliko fenolnih spojin in kakšno protimikrobnno učinkovitost imajo listi in storžki hmelja dveh kultivarjev, Aurora in Hallertauer Magnum. Pripravili smo etanolne ekstrakte listov in storžkov hmelja iz štirih držav (Slovenija, Avstrija, Nemčija in Češka). Vzorci so bili nabrani leta 2008 in 2010. V etanolnih ekstraktih listov in storžkov smo določili vsebnost fenolnih spojin s Folin–Ciocalteujevo metodo. Ugotovili smo, da ekstrakti storžkov hmelja vsebujejo več fenolnih spojin od listov. Listi in storžki hmelja, nabrani leta 2010, so vsebovali več fenolnih spojin, kot nabrani in shranjeni vzorci iz leta 2008. Pokazali smo, da temperatura in intenziteta padavin vplivajo na vsebnost fenolnih spojin, in sicer se povečajo, saj je rastlina izpostavljena stresnim situacijam. Teste protimikrobnega delovanja smo naredili s svežimi vzorci listov in storžkov letnika 2010. Uporabili smo bakterijo vrste <i>Staphylococcus aureus</i> , po Gramu pozitivno in po Gramu negativno bakterijo <i>Escherichia coli</i> . Dokazali smo izredno protimikrobnno aktivnost storžkov hmelja na bakterijo vrste <i>Staphylococcus aureus</i> . Dokazali smo boljšo protimikrobnno učinkovitost storžkov od listov hmelja. Rezultat sovpada s tem, da je v storžkih koncentracija fenolnih spojin večja, razlike pa so tudi v fenolnih profilih ekstraktov storžkov in listov. Kljub nižji vsebnosti fenolnih spojin v listih smo dokazali, da listi hmelja imajo protimikrobnno učinkovitost. Liste, ki so odpadni del rastline, v hmeljiščih zavrnejo a s protimikrobnim delovanjem, imajo velik potencial za nadaljnjo uporabo v živilstvu ali drugem sorodnem področju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 633.791:547.56:575.42(043)=163.6
CX Hops/*Humulus lupulus* L./plant extracts/total phenolic compounds/antimicrobial activity
AU LAZIĆ, Neda
AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor) / SMOLE MOŽINA, Sonja (co-advisor) / VIDRIH, Rajko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2016
TI ANTIMICROBAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM LEAVES AND CONES OF HOP (*Humulus lupulus* L.)
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 36 p., 6 tab., 9 fig., 36 ref.
LA sl/en
AL sl/en
AB The aim of the graduation thesis was to determine the total phenolic content and antimicrobial activities of hop leaves and cones of two cultivars 'Aurora' and 'Hallertauer Magnum'. The ethanol extracts were prepared from leaves and cones from four hop-growing regions (Slovenia, Austria, Germany and Czech Republic). The samples were harvested in years 2008 and 2010. Higher content of phenolic compounds was determined in cone extracts as compared with leave extracts. Higher phenolic content was also determined in leave and cone extracts from 2010 samples as compared to 2008 samples. The research showed that stress, caused by climatic conditions (temperature, water) influences (increases) the contend of phenolics. The antimicrobial activity was performed using fresh leaf and cone samples, harvested in 2010. A Gram positive *Staphylococcus aureus* and Gram negative *Escherichia coli* were tested. Extraordinary high antimicrobial activity on Gram positive *Staphylococcus aureus* of hop cone extracts was determined. In comparison with hop leave extracts higher antimicrobial activity of hop cone extracts was found out. Due to higher phenolic content and different phenolic profiles of cone extracts. Hop leaves are source of phenolic compounds but are a waste product in hop processing plants. Leaves therefore represent a big potential for further use in food industry or other fields.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 HMELJ	4
2.1.1 Sorte hmelja	5
2.1.1.1 Aurora	6
2.1.1.2 H. magnum	6
2.1.2 Kemijska sestava hmelja	6
2.1.3 Fenolne spojine	8
2.1.4 Povečanje biosinteze fenolnih spojin	8
2.1.5 Ekstrakti hmelja	10
2.1.6 Protimikrobnno delovanje hmelja	11
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 MATERIAL	12
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	12
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA	12
3.2.1 Vzorci hmelja	13
3.2.2 Gojišča	14
3.2.3 Bakterijske kulture	14
3.3 METODE	14
3.3.1 Priprava fiziološke raztopine	14
3.3.2 Ekstrakcija fenolnih spojin iz listov in storžkov	15
3.3.3 Določanje skupnih fenolnih spojin	15
3.3.4 Postopek priprave gojišč	18
3.3.5 Nacepljanje kultur na MH gojišče in v MHB gojišče	18
3.3.6 Priprava 2-p-jodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolijev klorida	18
3.3.7 Priprava ekstraktov za določanje minimalne inhibitorne koncentracije	19
3.3.8 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije v ekstraktih iz listov in storžkov z bakterijo <i>S. aureus</i>	19
3.3.9 Določanje koncentracije bakterij v tekočem gojišču	20
3.3.10 Lokacije nabiranja vzorcev in karakteristika podlage	20

4	REZULTATI Z RAZPRAVO	22
4.1	VREMENSKE RAZMERE	22
4.1.1	Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih	24
4.1.2	Minimalna inhibitorna koncentracija v ekstraktih	29
5	SKLEPI	31
6	POVZETEK.....	32
7	VIRI	33
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Oštevilčenje vzorcev listov (L) in storžkov (S) hmelja	14
Preglednica 2: Priprava raztopin klorogenske kisline (KK) za umeritveno krivuljo	16
Preglednica 3: Izmerjene absorbance ekstraktov iz listov (L) in storžkov (S) hmelja dveh kultivarjev iz štirih držav.....	25
Preglednica 4: Povprečne masne koncentracije (γ) fenolnih spojin (FS) v ekstraktih iz listov (L) in storžkov (S) dveh kultivarjev hmelja iz štirih držav	26
Preglednica 5: Povprečne minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) v ekstraktih iz listov (L) in storžkov (S) dveh kultivarjev hmelja iz štirih držav z bakterijo <i>S. aureus</i>	29
Preglednica 6: Povprečne vrednosti MIK v etanolnih ekstraktih iz listov (L) in storžkov (S) dveh kultivarjev hmelja iz štirih držav z bakterijo <i>E. coli</i>	30

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Nasad hmelja (Radišek, 2012)	4
Slika 2: List (levo) in storžki hmelja (desno) (IHPS, 2016).....	5
Slika 3: Kemijske strukture grenkih kislin hmelja (Zanoli in Zavatti, 2008).....	7
Slika 4: Biosinteza pot nastanka fenolnih spojin in mesta vpliva na potek biosinteze. (Dias in sod., 2016)	9
Slika 5: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino (KK) za določanje skupnih fenolnih spojin	17
Slika 6: Povprečne temperature in padavine skozi rastno sezono hmelja leta 2008 iz vseh raziskovanih lokacij (Abram in sod., 2015)	22
Slika 7: Povprečne temperature in padavine skozi rastno sezono hmelja leta 2010 iz vseh raziskovanih lokacij (Abram in sod., 2015)	23
Slika 8: Skupne fenolne spojine (FS) v ekstraktih iz listov hmelja, dveh kultivarjev, Aurora (A) in H. Magnum (M) vseh štirih držav, leto 2008, 2010	27
Slika 9: Skupne fenolne spojine (FS) v ekstraktih iz storžkov hmelja dveh kultivarjev, Aurora (A) in H. Magnum (M), vseh štirih držav, leto 2008, 2010	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
DAPH	3-deoksi-D-arabinoheptulozonat-7-fosfat
FC	Folin-Ciocalteujev reagent
G-	po Gramu negativne bakterije
G+	po Gramu pozitivne bakterije
INT	2-iodofenil-3-nitrofenil-5-fenil tetrazolijev klorid
KK	klorogenska kislina
<i>k</i>	naklon premice v umeritveni krivulji
L1-L16	vzorci listov hmelja
MHB	bujon Mueller-Hinton
MH	gojišče (agar) Mueller-Hinton
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
S1-S16	vzorci storžkov hmelja
sd	standardna deviacija
FS	fenolne spojine
UV	ultravijolična svetloba
γ	masna koncentracija

1 UVOD

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) pripada družini *Cannabinaceae*. Je dvodomna rastlina, ovijalka in trajnica. Poleg svoje očitne lastnosti, kot je prispevek grenkega okusa pivu, hmelj deluje antimikrobnno in antioksidativno (Karabíñ in sod., 2016).

Že tisočletja poznamo rastlino *Humulus lupulus* L. V zgodovini se je uporabljala kot dodatek k pivu predvsem zaradi grenkega okusa, večinoma pa so jo poznali kot okrasno rastlino v vrtovih. Da bi prekrili grenkobo piva, so dodajali razne dišavnice, citruse in začimbe, a so to s časom opustili in tako je povpraševanje po hmelju samo še naraščalo (Haas in Barsoumian, 1994).

V hmeljarstvu se uporablajo posamezne ženske rastline, saj želijo obdržati gensko nespremenjene rastline (Neve, 1991). V nasadih hmelja naberejo cele rastline, ko dosežejo tehnološko zrelost. Storžke zborejo, liste in stebla zmeljejo in to je odpadek, ki se lahko vrne nazaj na polja ali pa bi se lahko uporabil v druge namene. Ker je ta odpadek velik (2,6 kg/rastlino), so pričeli razmišljati o nadaljnji uporabi, predvsem listov (Abram in sod., 2015).

Trendi čim manjše uporabe kemijskih konzervansov, minimalno obdelane hrane in čim večje svežosti, so pripeljali do tega, da smo začeli razmišljati o novih oblikah konzerviranja. Velik potencial imajo naravne spojine rastlin, ki kažejo protimikrobnno učinkovitost. Njihov dodatek k surovinam preprečuje kvar in povečuje varnost hrane in pijače. Zaenkrat to področje ni dovolj raziskano, večinoma zaradi nizke učinkovitosti spojin ali zaradi njihovega vpliva na organoleptične lastnosti surovine ali živila ob uporabi večjih koncentracij (Burt, 2004).

Že nekaj sto let velja pivo za varno pijačo, saj ima visoko mikrobiološko stabilnost in je težko pokvarljivo. K temu priomorejo predvsem grenke sestavine hmelja, kot so izo- α -kisline, visoka koncentracija ogljikovega dioksida, vsebnost etanola, nizek pH (3,8-4,7) in nizka koncentracija prisotnega kisika. K mikrobiološki stabilnosti priomore tudi nizka koncentracija hranil, kot so glukoza, maltoza in maltotriosa. Te ogljikove hidrate kot substrat med fermentacijo porabijo pivske kvasovke. Posledično patogene bakterije, kot so

Salmonella typhimurium in *Staphylococcus aureus*, v pivu nimajo pogojev za rast (Sakamoto in Konings, 2003).

Kemijske komponente v storžkih hmelja, ki jih uporabimo pri izdelavi piva, vključujejo terpene, imenovane tudi terpenoidi ali izoprenoidi, grene kisline in katehole. Storžki vsebujejo glikozilirane flavonole in katehine (Gorissem in sod., 1968). Grene α - in β -kisline predstavljajo največji del mase storžka. Glavna α -kislina je humulon, med β -kislinami pa lupulon (Zanolli in Zavatti, 2008).

Stresne situacije, katerim je rastlina v naravi izpostavljena, izzovejo povečanje biosinteze fenolnih spojin (FS). Sekundarni metaboliti so v rastlini prisotni v nizkih koncentracijah. *In vitro* lahko umetno pospešimo sintezo fenolnih spojin (FS) z ultravijolično svetlobo, s povečano koncentracijo težkih kovin, s spremembami pH vrednosti in temperature. Prav tako lahko vplivajo na sintezo FS tudi mikroorganizmi, kot so bakterije in glice. To je način obrambe rastlin, ki tako postanejo bolj odporne (Dias in sod., 2016).

1.1 NAMEN NALOGE

- Uporabiti vzorce dveh kultivarjev hmelja, različnih značilnosti, gojenih na štirih različnih lokacijah v štirih državah (Slovenija, Avstrija, Nemčija in Češka), nabranih v letih 2008 in 2010.
- Določiti vsebnost skupnih fenolnih spojin v etanolnih ekstraktih iz listov in storžkov hmelja.
- Preveriti protimikrobno učinkovitost dobljenih etanolnih ekstraktov pri izbranih sevih G+ in G- bakterij (*S. aureus*, *E.coli*).
- Določiti minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) rastlinskih ekstraktov.
- Primerjati učinkovitost protimikrobnega delovanja ekstraktov iz listov in storžkov hmelja.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da so listi hmelja dober vir skupnih fenolnih spojin in da so razlike predvsem v vsebnosti fenolnih spojin pri različnih kultivarjih in lokacijah gojenja.

Protimikrobnog delovanje ekstraktov je odvisno od vsebnosti skupnih fenolnih spojin. Večja kot je, boljši naj bi bil protimikroben učinek, tako pri po Gramu pozitivnih (G+) bakterijah, kot pri po Gramu negativnih (G-) bakterijah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HMELJ

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je trajnica. Zgornji del rastline jeseni propade, vendar zaradi rizomov oz. koreninskega sistema, ki zimo preživijo, vsako pomlad rastlina ponovno zraste. Je dolga, vitka rastlina, čigar steblo se vije okoli opore v smeri urinega kazalca. Oprijema se s pomočjo vitic in zraste od 6 do 9 metrov v višino (Zanoli in Zavatti, 2008; Neve, 1991) (Slika 1). Prva beseda *Humulus* naj bi izhajala iz latinske besede *humus*, kar pomeni bogato vlažno zemljo, saj tako zemlja rastlini najbolj ugaja za rast. V drugi besedi *lupulus* se skrivajo značilnosti rastline, to je plezanje po drugih rastlinah in oporah. Izhaja iz latinskega imena *Lupus*, kar pomeni »volk pleza na ovco« (Zanoli in Zavatti, 2008).



Slika 1: Nasad hmelja (Radišek, 2012).

Listi so podolgovati, temno zelene barve z dolgimi peclji. Oblika lista je srčasta, starejši listi so pernati, z ostrimi zobatimi robovi in zelo grobo površino. Na rastlini rastejo eden nasproti drugega in so tri- ali pet-krpati. Rastlina je dvodomna, pri čemer moško in žensko rastlino z lahkoto ločimo (Haunold, 1991). Moški plodovi so dolgi od 7,5 do 12,5 cm, medtem ko so ženski plodovi dolgi od 2,5 do 5 cm. Ženske plodove imenujemo tudi socvetje ali storžki, prekrivajo jih mali lističi (Slika 2). Simetrični zunanji lističi storžka in zložljivi notranji lističi dajejo storžku pravo obliko, v njih pa se skrivajo lepljive rumene žleze lupulina. Le-te najdemo tudi na spodnjih delih listov. Ženski storžki dosežejo zrelost avgusta oz. septembra. Ob tem tudi močno spremenijo barvo iz bledo zeleno-rumene barve v temno rijavkasto zeleno barvo (Zanolli in Zavatti, 2008).



Slika 2: List (levo) in storžki hmelja (desno) (IHPS, 2016)

V nasadih hmelja se večinoma uporabljam ženske rastline, saj želijo obdržati gensko nespremenjene rastline (Neve, 1991). Moške rastline se uporablja predvsem pri razvijanju novih sort rastlin pod kontroliranimi pogoji hibridizacije (Zanolli in Zavatti, 2008). Življenska doba nasadov lahko traja od 12, ponekod pa tudi do 20 let (Ferant, 2012).

2.1.1 Sorte hmelja

Poznamo zgodne, srednje pozne in pozne sorte hmelja. Med zgodne sorte uvrščamo hmelj, ki dozori v obdobju med 10. in 20. avgustom; sem spada Savinjski golding. Srednje pozne sorte, dozorijo v obdobju med 20. in 30. avgustom, sem spadajo Bobek, Aurora in

Styrian gold. Pozne sorte dozorijo v prvi polovici septembra; mednje spadata sorti Dana in Celeia (Čeh in Zmrzlak, 2012).

Hmelj lahko ločimo tudi glede na aroma oziroma količino grenčine. Delimo jih v tri skupine:

- aromatični hmelj, ki ima v suhi snovi 8 % α -kislin; sem spada Savinjski golding. Je hmelj s tipično aromo in majhno količino grenčičnih snovi;
- grenčični hmelj, ki ima v suhi snovi 8-14 % α -kislin; sem spada sorta Aurora. Ima nekoliko večjo količino grenčičnih snovi;
- visoko grenčični hmelj, ki vsebujejo več kot 14 % α -kislin. Sem spada sorta Dana (Čerenak in Ferant, 2012).

2.1.1.1 Aurora

Aurora je srednje pozna sorta, ki spada med aromatične sorte hmelja. Je križanec med angleško sorto Northern Brewer in slovenskim divjim moškim hmeljem. Ima intenzivno in prijetno hmeljno aroma. Vsebnost eteričnega olja je od 0,9-1,6 % suhe snovi. Vsebuje več kot 9 % α -kislin, med katerimi prevladuje kohumulon (24 %). Ta sorta je primerna za skladiščenje (Šuštar-Vozlič in Čerenak, 2002; Schönberger, 2009).

2.1.1.2 H. magnum

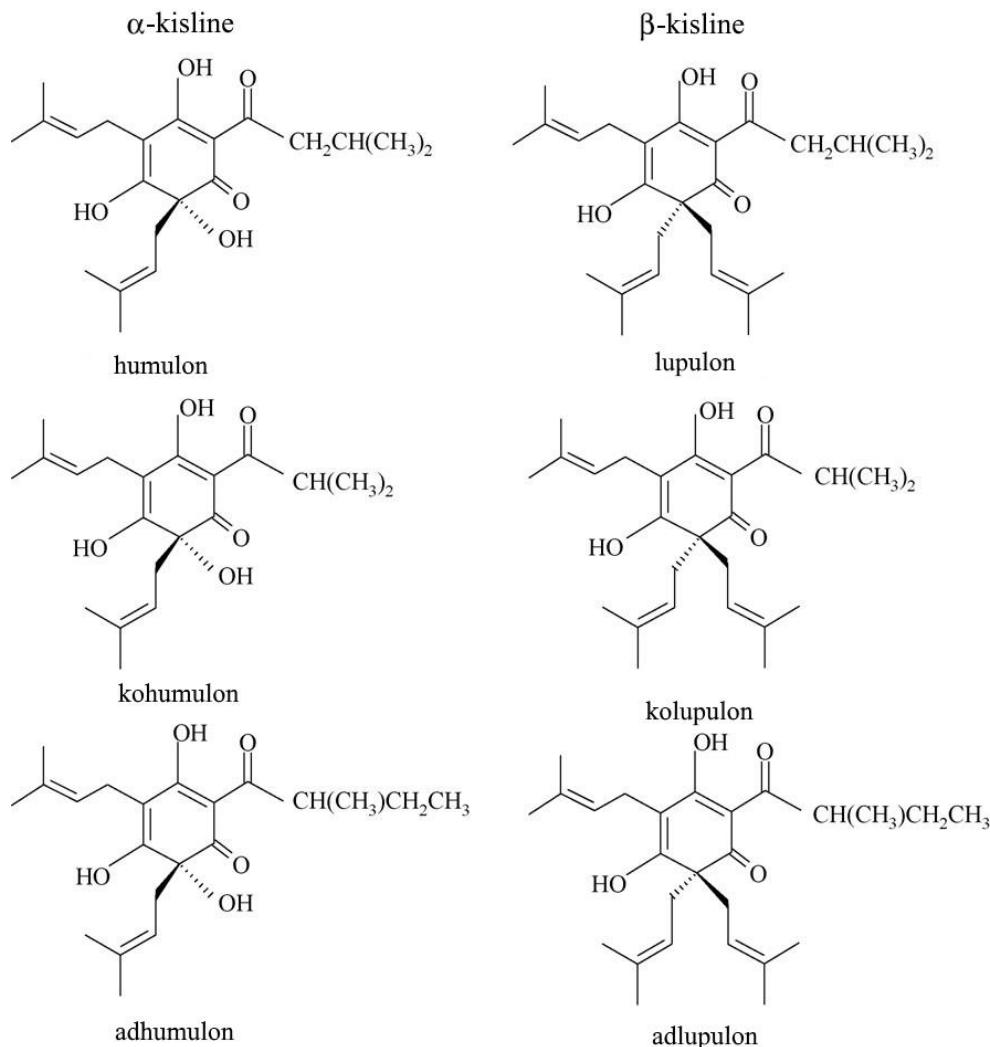
H. Magnum je srednje pozna sorta, ki spada med visoko grenčične sorte hmelja. Ima visoko in kakovostno vrednost gorčine. Je križanec med ameriško sorto Galena in moškim križancem 75/5/3. V 100 g suhe snovi je 1,8 mL eteričnega olja. Vsebuje 12-15 % α -kislin (kohumulona 25 %) (Šuštar-Vozlič in Čerenak, 2002; Ferant in Košir, 2012).

2.1.2 Kemijska sestava hmelja

Glavne kemijske komponente, identificirane v zrelih storžkih hmelja, vključujejo terpene, grenke kisline in katehole. Hmelj je bogat s flavonoli (kamferol, kvercetin, rutin) (Sägesser in Deinzer, 1996) in katehini (catechin galat, epicatechin galat) (Gorissen in sod., 1968).

V eteričnem olju hmelja so določili več kot 100 terpenoidnih komponent, med katerimi prevladujejo seskviterpeni (β -kariofilen, farnezen, humulin) in monoterpen mircen (Malizia in sod., 1999; Eri in sod., 2000).

Grenke α - in β -kisline predstavljajo 5-10 % mase storžka hmelja. Kislini se razlikujeta po tem, da ima β -kislina eno prenilno skupino več.



Slika 3: Kemijske strukture grenkih kislin hmelja (Zanolli in Zavatti, 2008)

Grenke kisline v storžkih hmelja so kompleksne mešanice različne sestave in vsebnosti. Glavna α -kislina humulon predstavlja kar 35-70 % vseh α -kislin, ostala predstavnika pa sta kohumulon (20-65 %) in adhumulon (10-15 %). Pri β -kislinah pa prevladuje lupulon, ki predstavlja 35-55 % vseh β -kislin, ostali spojini sta kolupulon in adlupulon (Slika 3) (Zanolli in Zavatti, 2008).

V pivovarski industriji ocenjujejo visoko kakovost hmelja z vsebnostjo prisotnih α -kislin. Le-te prispevajo k stabilnosti pene kot tudi k protimikrobni učinkovitosti. (Verzele in De Keukeleire, 1991). Visoke pH vrednosti in visoke temperature vplivajo na izomerizacijo α -kislin v izo- α -kisline, slednje so bolj topne in bolj grenke kot njihove matične spojine. Tako so izo- α -kisline odgovorne za tipično grenak okus piva, poleg tega pa so, tako kot α -kisline, koristne zaradi svojega protimikrobnega delovanja in so pomembne za stabilizacijo pene (Verzele in De Keukeleire, 1991).

Poleg eteričnih olj in grenkih kislin so v storžkih hmelja prisotni tudi številni prenilflavonoidi, med katerimi je najpomembnejši halkon ksantohumol (ang. xanthohumol) (Stevens in sod., 1999). Ksantohumol se kot posledica toplotne obdelave in povišanja pH pretvori v izoksantohumol (ang. isoxanthohumol). Tudi drugi halkoni izomerizirajo v ustrezne flavanole. Desmetilksantohumol (ang. desmethylxanthohumol) naj bi bil prekurzor za večino flavonoidov prisotnih v hmelju (De Keukeleire in sod., 2007).

Med dozorevanjem ženskih socvetij v zrele storžke se postopoma povečuje vsebnost α -kislin, β -kislin, desmetilksantohumola in ksantohumola. Stopnja kopiranja teh spojin je odvisna od sorte hmelja in klimatskih razmer (De Keukeleire in sod., 2007).

Grenke kisline in halkoni so prisotni tudi v zrelih listih hmelja. Njihova vsebnost v listih je nižja kot v storžkih. Listi prav tako vsebujejo hlapne komponente, vendar v nižjih koncentracijah kot storžki (< 0,05 %) (Langezaal in sod., 1990).

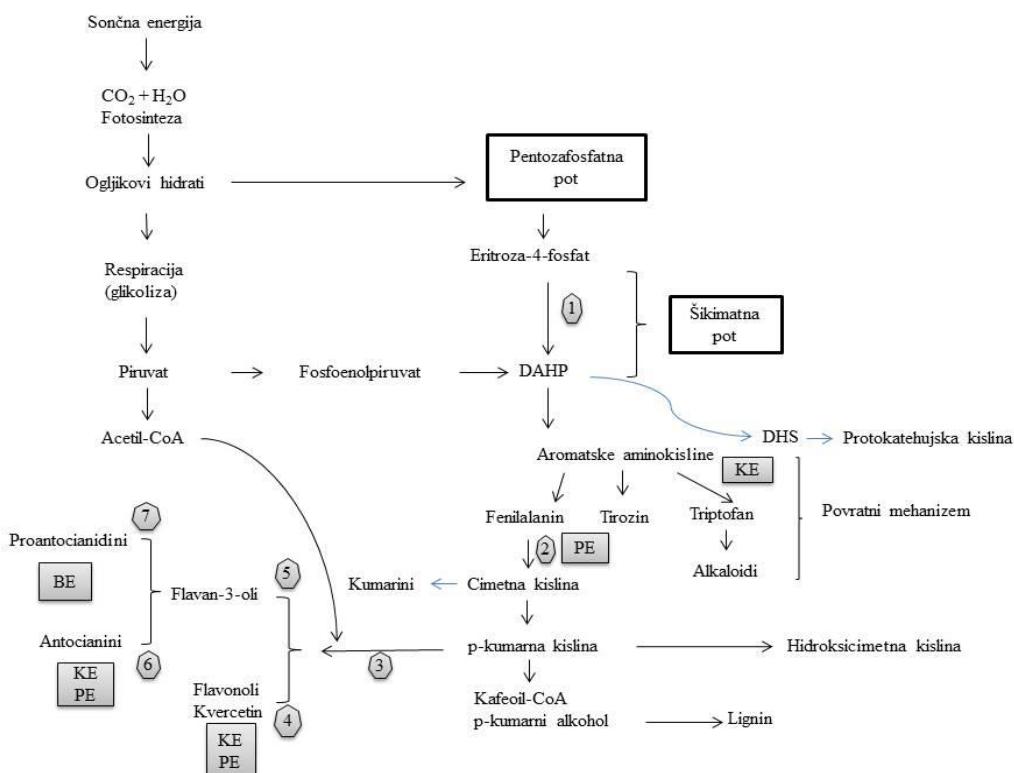
2.1.3 Fenolne spojine

Fenolne spojine (FS) so spojine, ki imajo vsaj en aromatski obroč in eno ali več hidroksilnih spojin, ki so direktno vezane na aromatski obroč. So sekundarni metaboliti, ki v rastlini delujejo kot obrambni sistem (Dias in sod., 2016).

2.1.4 Povečanje biosinteze fenolnih spojin

V metaboličnih poteh, ki potekajo v celicah rastline, kot sta glikoliza in citratni ciklus, nastajajo spojine, ki so pomembne za preživetje in obrambo rastline. V stresnih pogojih, katerim je lahko rastlina izpostavljena (nihanje temperature, pomanjkanje ali predolga izpostavljenost svetlobi, sprememba pH), in ob raznih poškodbah celičnega tkiva, FS

delujejo kot obrambni mehanizem, saj se poveča njihova biosinteza. Te spojine so sekundarni metaboliti, saj ne vplivajo na rast in razvoj celičnega tkiva. Najpomembnejša pot, po kateri se FS sintetizirajo, je šikimatna pot, v katero vstopa fosfoenolpiruvat, intermediat glikolize. Ta skupaj z eritrozo-4-fosfatom, ki nastaja v pentozafosfatni poti, tvori DAHP (3-deoksi-D-arabinoheptulozonat-7-fosfat) s pomočjo encima DAHP sintaze. Le-ta ciklizira in se reducira v šikimat, ki je pomemben intermediat FS. Biosintetična pot nastanka FS je prikazana na Slika 4 (Dias in sod., 2016).



Slika 4: Biosintezna pot nastanka fenolnih spojin in mesta vpliva na potek biosinteze.

CO_2 - ogljikov dioksid, H_2O - voda, Acetyl-CoA - acetil koencim A, DAHP - 3-deoksi-D-arabinoheptulozonat-7-fosfat, DHS - 3-dehidrokinat, BE - biološko izzvan, KE - kemijsko izzvan, PE - fiziološko izzvan. Encimi, vpleteni v biosintezo, so označeni v šestkotnikih s številko; 1-DAHS sintaza (3-dioksi-D-arabinoheptulozonat7-fosfat sintaza), 2 - FAN (fenilalanin amonijeva liaza), 3 - CHS (halkon sintaza), CHI (halkon izomeraza), F3H (flavon-3-hidrosilaza), 4-FLS (flavonol sintaza), 5-LAR (levkoantocijanidin reduktaza), 6-LDOX (levkoantocijanidin dihidrogenaza) (Dias in sod., 2016).

Šikimatna pot lahko vodi do nastanka aromatskih aminokisel, fenilalanina, tirozina in triptofana in od nastanka teh spojin dalje se začenja fenilpropanoidna pot. Nastanek aromatskih aminokisel je primer regulacije metabolične poti s povratnim mehanizmom. To pomeni, da povišanje koncentracije triptofana inducira (sproži) sintezo fenilalanina in tirozina in tako se zmanjša njegova lastna biosinteza (Verpoorte in sod., 1999).

Bolj kompleksne FS nastajajo z deaminacijo fenilalanina v cimetno kislino, pri čemer sodeluje encim fenilalanin liaza. Cimetna kislina lahko preide direktno v kumarine (biološko izzvana sinteza) ali pa se pretvori v *p*-kumarno kislino. Od *p*-kumarne kisline poteka sinteza do nastanka hidroksicimetne kisline ali preko kafeoil-CoA v lignin ali s pomočjo encima halkon sintaze v flavonole (npr. kvercetin) in flavan-3-ole, ki so prekurzorji proantocianidinov in antocianinov (Slika 4) (Dias in sod., 2016).

Sekundarni metaboliti so v normalnih pogojih v rastlinskem tkivu prisotni v razmeroma nizkih koncentracijah. V *in vitro* sistemih lahko umetno pospešimo njihovo sintezo in kopiranje. Fiziološko lahko sintezo izzovemo z UV svetlobo, tlakom, električnim poljem, povečanjem koncentracije težkih kovin, s spremembami pH ali s spremembami temperature. Biološko lahko sintezo izzovemo z mikroorganizmi, bakterijami in glivami (Mewis in sod., 2011; Baenas in sod., 2014).

Aktivnost encima fenilalanin amon liaze so stimulirali z obsevanjem z rdečo in UV svetlobo (fiziološko izzvana sinteza). Ta encim katalizira reakcijo deaminacijo fenilalanina v cimetno kislino (Boudet, 2007). Biosintezo FS izzovemo tudi z drugimi fiziološkimi spremembami, kot so sprememba temperature in pH, ali pa jo izzovemo kemijsko z dodajanjem prekurzorjev in optimizacijo hrnilnega medija (Dias in sod., 2016).

2.1.5 Ekstrakti hmelja

Ko storžke hmelja naberejo, jih morajo čimprej posušiti. Zato jih sušijo umetno, s kroženjem toplega zraka pri temperaturi 50-55 °C. Vsebnost vode v storžku se zmanjša iz začetnih 65-80 % na 8-10 %, kar je primerno za shranjevanje. V zgodnjem 19. stoletju so ekstrakcije potekale v vodi in etanolu (Hieronymus, 2012), zabeleženi so bili tudi poskusi z ogljikovim disulfidom in paro (Moir, 2000). Ko so bolje pojasnili kemijsko strukturo in reaktivnost komponent smole, so se tudi postopki ekstrakcije močno izboljšali. Zaradi njenih lipofilnih lastnosti so začeli uporabljati topila, kot so etanol, kloroform, aceton in heksan. Ker pa so ta topila strupena in zaradi tveganja, da se iz ekstraktov v celoti ne odstranijo, so začeli vedno bolj uporabljati tehnike, kot so ekstrakcije s tekočim ali s superkritičnim ogljikovim dioksidom. Ogljikov dioksid je kot močno selektivno nepolarno

topilo zelo primeren za raztplavljanje lahkoklapnih smol in eteričnih olj v hmelju, vendar pa ne razaplja polarnih komponent (Langezaal in sod., 1990).

2.1.6 Protimikrobno delovanje hmelja

Že stoletja velja pivo za dobro obstojno pijačo. Veljalo je, da hmelj ščiti pivo pred kvarom in patogenimi mikroorganizmi. Vendar je bilo v dvajsetem stoletju dokazano, da deluje hmelj samo proti po Gramu pozitivnim (G+) bakterijam in ne tudi proti po Gramu negativnim (G-) bakterijam. Prisotnost mikroorganizmov v pivu povzroča motnost in neprijetne spremembe okusa. K mikrobiološki stabilnosti pripomore tudi majhna koncentracija hrani, kot so glukoza, maltoza in maltotriosa. Te ogljikove hidrate, kot substrate med fermentacijo, porabijo pivske kvasovke. Posledično patogene bakterije, kot so *Salmonella typhimurium* in *Staphylococcus aureus*, v pivu nimajo pogojev za rast (Sakamoto in Konings, 2003)

Pogosti kvarljivci piva, ki vplivajo na spremembo okusa in motnost so, poleg G+ in G- bakterij, tudi tako imenovane divje kvasovke, ki pa sicer niso tako problematične kot prisotnost bakterij. Za kar 70 % kvara piva v pivovarnah so odgovorne G+ bakterije, predvsem mlečnokislinske bakterije rodov *Lactobacillus* in *Pediococcus* (Back, 1994). Drugi kvarljivci so G- bakterije rodov *Pectinatus* in *Megasphaera*. Te striktno anaerobne bakterije so se pojavile po tem, ko so zaradi napredka tehnologije pivu močno znižali vsebnost kisika (Sakamoto in Konings, 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

- 96 % etanol (Merck, Nemčija)
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija)
- Na_2CO_3 - natrijev karbonat (Merck, Nemčija)
- Folin-Ciocalteujev reagent (Fluka, Švica)
- INT (2- iodofenil-3-nitrofenil-5-fenil tetrazolijev klorid, Sigma, Švica)
- KH_2PO_4 - kalijevdihidrogen fosfat (Merck, Nemčija).

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

- terilnica
- centrifugirke (TPP Techno Plastic, Švica)
- tehtnica (Mettler Toledo PB 3002-S, Švica)
- vodna kopel (Kambič, Slovenija)
- ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK 52, Nemčija)
- magnetno mešalo (Ika RH Basic, Nemčija)
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- štoparica
- plastične epruvete
- spektrofotometer (Hewlet-Packard 8453, ZDA)
- centrifuga (Centric 233B, Tehnica, Slovenija)
- mešalnik (Ika MS3 Basic, Nemčija)
- hladilnik z zmrzovalnikom (Gorenje HZS 2926, Slovenija)
- veliki avtoklav (TIP 600x700 PR 1082-88, Srbija)

- mali avtoklav (TIP 600x700 PR 1082-88, Srbija)
- sterilizator (Kambič, Slovenija)
- stresalnik mikrotitrskih ploščic (Eppendorf Thermomixer, Nemčija)
- inkubator (Kambič, Slovenija)
- gorilnik
- mikrovalovna pečica (Sanyo, Japonska)
- mikropruvete (2 mL Eppendorf, Nemčija)
- inokulacijska zanka
- mikrotitrska ploščica (NUNC, Roskilde, Danska)
- urinski lončki (Golias, Slovenija)
- petrijevka (Golias, Slovenija)
- centrifugirka (50 mL TPP, Švica)
- rotavapor (Buchi R-210, Švica)
- analitska tehntica (Sartorius, TE 214s, Nemčija)
- hladilnik (Zannusi, Italija)
- laminarij (PIO SMBC 122 AV, Slovenija)
- omara za sušenje steklovine (SO-250 Elektromedicina, Slovenija)
- vrtinčnik (Yellowline TTS 2, Slovenija).

3.2.1 Vzorci hmelja

Analizirali smo po dva vzorca listov in storžkov hmelja (*Humulus lupulus* L.) dveh različnih kultivarjev ‘Aurora’ in ‘Hallertauer Magnum’ - H. Magnum. Vzorci so bili nabrani v štirih različnih državah: v Sloveniji, Avstriji, Nemčiji in Češki, in sicer v letih 2008 in 2010. Nabrani so bili v obdobju najvišje tehnološke zrelosti iz zgornjega, srednjega in spodnjega dela rastline, in sicer približno 5 litrov listov in storžkov hmelja za vsak vzorec. Zbrani vzorci so bili posušeni s toplim zrakom pri 50-55 °C in shranjeni v

papirnate vrečke do analiz. V preglednici 1 so prikazani vsi vzorci, ki smo jih uporabili pri delu, in njihovo oštevilčenje.

Preglednica 1: Oštevilčenje vzorcev listov (L) in storžkov (S) hmelja

Država:	Leto:	Sorta:	Listi:	Storžki:
Slovenija	2008	Aurora	L1	S1
		H. Magnum	L2	S2
	2010	Aurora	L3	S3
		H. Magnum	L4	S4
Avstrija	2008	Aurora	L5	S5
		H. Magnum	L6	S6
	2010	Aurora	L7	S7
		H. Magnum	L8	S8
Nemčija	2008	Aurora	L9	S9
		H. Magnum	L10	S10
	2010	Aurora	L11	S11
		H. Magnum	L12	S12
Češka	2008	Aurora	L13	S13
		H. Magnum	L14	S14
	2010	Aurora	L15	S15
		H. Magnum	L16	S16

3.2.2 Gojišča

- Mueller-Hinton agar (MH) (Oxoid CM-337, Velika Britanija)
- Mueller-Hinton bujon (MHB) (Oxoid CM 0405, Velika Britanija).

3.2.3 Bakterijske kulture

- *Staphylococcus aureus* (ŽMJ 343, NCTC 10652, enterotoksin A)
- *Escherichia coli* (ŽM 370).

3.3 METODE

3.3.1 Priprava fiziološke raztopine

V 1000 mL bučko smo k 1,25 mL KH₂PO₄ (3,4 g KH₂PO₄ je bilo predhodno raztopljenega v 100 mL destilirane vode, pH 7,2) dodali destilirano vodo do oznake. Raztopino smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 120 °C.

3.3.2 Ekstrakcija fenolnih spojin iz listov in storžkov

Suhe vzorce listov (L) in storžkov (S) hmelja smo homogenizirali v terilnici. Za ekstrakcijo FS smo v 50 mL centrifugirke natehtali po približno 400 mg vzorca in dodali po 20 mL 96 % etanola. Pripravili smo dve paralelki. Ekstrakcija je potekala 24 ur pri 60 °C v vodni kopeli (Kambič, Slovenija) s stalnim stresanjem pri 170 obratih / min. Da bi preprečili izhlapevanje topila, smo centrifugirke dobro zamašili in pokrovčke zaščitili s parafilmom. Med ekstrakcijo smo vzorčke nekajkrat tudi ročno pretresli.

Po končani ekstrakciji smo ohlajene ekstrakte prenesli v dve 15 mL centrifugirki in ju centrifugirali 10 minut pri 3900 obratov/minuto (Centric 233B, Tehnica, Slovenija). Supernatant smo uporabili za določanje FS v ekstraktih. Zato smo del supernatanta prenesli v dve centrifugirki po 5 mL in po 3 mL v kriovialo. Vse smo prepihalo z N₂ in shranili na -20 °C za ostale analize.

Med delom smo ekstrakte vedno shranjevali v hladilniku. Preden smo se lotili določevanja FS, smo opravili predposkus, v katerem smo določili primerne razredčitve vzorcev, ki smo jih nato uporabljali za nadaljnje delo.

3.3.3 Določanje skupnih fenolnih spojin

Vsebnost FS smo določili spektrofotometrično z metodo po Folin-Ciocalteuju. Folin-Ciocalteujev (FC) reagent oksidira FS v alkalni raztopini. Absorbanco modro obarvane raztopine merimo pri 746 nm po 90 min (Singleton in Rossi, 1965).

Najprej smo pripravili umeritveno krivuljo z etanolno raztopino klorogenske kisline. Natehtali smo 35,43 mg klorogenske kisline, dodali 96 % etanol in 15 minut mešali na magnetnem mešalu. Nato smo raztopino prelili v 100 mL bučko in jo razredčili s 96 % etanolom do oznake. Ker je klorogenska kislina slabše topna v etanolu, smo njen raztopljanje pospešili še s 6 minutnim ultrazvokom v ultrazvočni kopeli (Bandelin Sonorex TK 52, Nemčija).

Raztopino FC reagenta smo pripravili tako, da smo jo razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:2. V čašo smo pipetirali 6 mL FC reagenta in 12 mL destilirane vode ter 10 minut mešali na magnetnem mešalu. Pripravili smo tudi 20 % raztopino Na₂CO₃ tako, da

smo natehtali 20 g natrijevega karbonata in dodali do 100 g destilirane vode. Raztopino smo 15 minut mešali z magnetnim mešalom, dokler se ni ves Na_2CO_3 popolnoma raztopil.

V deset epruvet smo pipetirali določene volumne destilirane vode, jim dodali določene volumne klorogenske kisline (

Preglednica 2) in dobro premešali. Nato smo dodali razredčen FC reagent, ponovno premešali in sprožili štoparico. Točno po 5 minutah smo dodali 20 % raztopino Na_2CO_3 in s tem ustavili reakcijo. Po 90 minutah smo izmerili absorbanco raztopin pri 746 nm. Za slepi vzorec smo uporabili etanol. Vse meritve smo opravili v treh ponovitvah in koncentracijo skupnih fenolov podali kot ekvivalent klorogenske kisline (KK) v mg KK/mL ekstrakta.

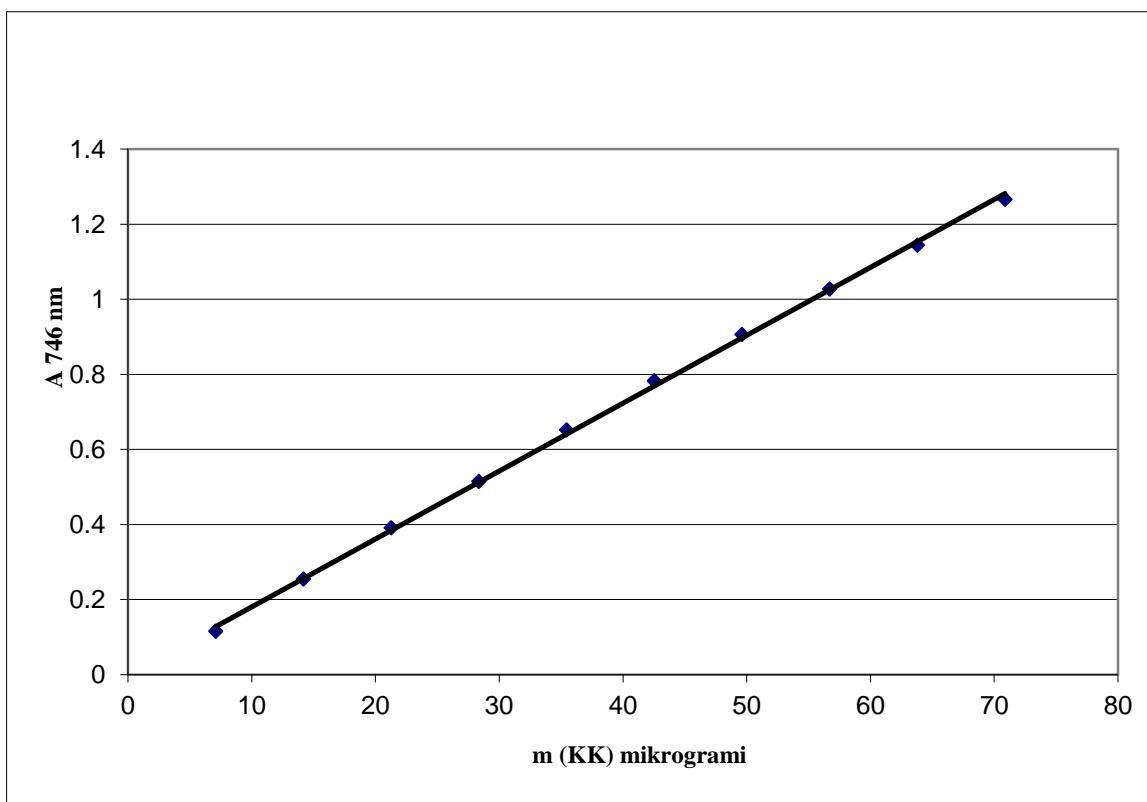
Preglednica 2: Priprava raztopin klorogenske kisline (KK) za umeritveno krivuljo

Masna koncentracija klorogenske kisline v izhodni raztopini je bila 35,43 mg/100 mL

V (KK) (µg)	V(H_2O) (mL)	V FC* (mL)	V (Na_2CO_3) (mL)	\bar{A}	m (KK) (µg)
20	2,73	0,5	0,5	0,11575	7,09
40	2,71	0,5	0,5	0,25477	14,17
60	2,69	0,5	0,5	0,39119	21,26
80	2,67	0,5	0,5	0,51491	28,34
100	2,65	0,5	0,5	0,65205	35,43
120	2,63	0,5	0,5	0,78278	42,52
140	2,61	0,5	0,5	0,90604	49,60
160	2,59	0,5	0,5	1,0275	56,69
180	2,57	0,5	0,5	1,1444	63,77
200	2,55	0,5	0,5	1,26597	70,86

*FC - Folin-Ciocalteujev reagent

Iz izmerjenih absorbanc smo narisali umeritveno krivuljo (Slika 5), v kateri smo prikazali odvisnost absorbance od mase klorogenske kisline.



Slika 5: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino (KK) za določanje skupnih fenolnih spojin

Z metodo najmanjših kvadratov smo dobili premico. Za izračun masne koncentracije FS v ekstraktih smo uporabili enačbo: $y = 0,0181 \cdot x$, katere korelacijski faktor je $R^2 = 0,9993$. Y pomeni absorbenco raztopine pri 746 nm, x pa maso klorogenske kisline (μg).

Pred vsakim določanjem smo zamrznjene ekstrakte segreli na sobno temperaturo in jih nato 10 min centrifugirali pri 3900 obratih/min (Centric 233B, Tehnica, Slovenija). Vsak dan smo pripravili sveži raztopini razredčenega FC in 20 % Na_2CO_3 . Za liste smo uporabili po 60 μL ekstrakta in 2,690 mL destilirane vode. Za storžke smo uporabili po 30 μL ekstrakta storžev in 2,720 mL destilirane vode, tako da je bil skupni volumen vedno 2,750 mL. Vsako meritev smo opravili v treh ponovitvah. Ko smo vzorce razredčili in dobro premešali, smo jim dodali 0,5 mL FC, premešali in sprožili štoparico. Po 5 minutah smo reakcijo prekinili z dodatkom 0,5 mL 20 % Na_2CO_3 . Epruvete smo pokrili z alufolijo in jih postavili v temo za 90 min. Po tem času smo izmerili absorbenco vzorcev pri 746 nm (A_{746}) s spektrofotometrom (Hewlet-Packard 8453, ZDA). Z izračunanimi povprečnimi absorbancami vzorcev in s pomočjo naklona enačbe premice iz umeritvene krivulje smo izračunali masno koncentracijo FS v 1 mL ekstrakta vzorca (enačba 2).

3.3.4 Postopek priprave gojišč

Protimikrobno učinkovitost ekstraktov hmelja smo analizirali na mikrotitrskih ploščicah in določali minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK). Za mikrobiološke analize smo uporabili G+ *S. aureus* bakterijo in G- bakterijo *E. coli*.

MHB gojišče: v 1000 mL steklenico smo zatehtali 10,5 g bujona v prahu (Oxoid CM 0405, Velika Britanija) in mu dodali 500 mL destilirane vode. Gojišče smo dobro premešali in ga 2 min segrevali v mikrovalovni pečici, da se je bujon v prahu dobro raztopil in nato gojišče sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 20 °C.

MH gojišče: 19 g gojišča v prahu (Oxoid CM-337, Velika Britanija) smo raztopili v 500 mL destilirane vode in dobro premešali. Čašo smo za 2 minuti dali v mikrovalovno pečico in nato avtoklavirali pri temperaturi 120 °C 20 minut. Po sterilizaciji smo čašo z gojiščem ohladili na 45 °C in ga po približno 15 µL prelili v sterilne petrijevke.

3.3.5 Nacepljanje kultur na MH gojišče in v MHB gojišče

Iz selektivnega trdnega gojišča smo 2 do 3 kolonije bakterij *S. aureus* ali *E. coli* prenesli v centrifugirko s 4 mL MHB gojišča, dobro premešali in inkubirali 20 ur pri 37 °C pri konstantnem tresenju 100 obratov/minuto. Za delo smo vsak dan pripravili sveže kulture bakterij *S. aureus* ali *E. coli*.

Z inokulacijsko zanko smo s selektivnega gojišča popraskali 2 do 3 kolonije bakterij in jih precepili na sterilno MH gojišče. Tako nacepljeno gojišče smo inkubirali 20 ur pri 37 °C. Nove inokulume smo si pripravljali 2 dni pred opravljanjem poskusa.

3.3.6 Priprava 2-p-jodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolijev klorida

V sterilno falkonko smo natehtali 0,40 g 2-p-jodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolijev klorid (INT) in dodali 20 mL sterilne destilirane vode. Raztopino smo takoj zavili v alufolijo in jo shranjevali v temi.

3.3.7 Priprava ekstraktov za določanje minimalne inhibitorne koncentracije

MIK je najnižja koncentracija etanolnega ekstrakta listov oz. storžkov hmelja, pri kateri po 24-ih urah nismo opazili rasti bakterij. Živost bakterij smo določali s spremeljanjem metabolične aktivnosti z uporabo INT in prisotnostjo rožnatega obarvanja.

Vzorce L3, L4, L7, L8, L11, L12, L15, L16 smo petkrat koncentrirali in sicer iz 2,5 mL ekstrakta listov na 0,5 mL za določanje MIK bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Ekstrakte S3, S4, S7, S8, S11, S12, S15, S16 smo prav tako koncentrirali, vendar samo dvakrat, z 1 mL ekstrakta na 0,5 mL, za določanje MIK bakterije *E. coli*. Za določanje MIK za bakterijo *S. aureus* vzorcev S3, S4, S7, S8, S11, S12, S15, S16 ni bilo treba koncentrirati.

3.3.8 Določanje MIK ekstraktov iz listov in storžkov za bakterijo *S. aureus*

MIK smo določali z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski plošči (Klančnik in sod., 2010). Delovne raztopine smo pripravili tako, da smo v epruveto pipetirali 375 µL MHB gojišča in 125 µL posameznega ekstrakta listov ali storžkov in jih dobro premešali. Pripravili smo tudi kontrolno raztopino, v katero smo pipetirali 375 µL MHB gojišča in 125 µL 96 % etanola. Mikrotitrsko ploščico smo ustrezno označili in pričeli s cepljenjem. V prvo vrsto smo pipetirali 100 µL delovne raztopine (375 µL MHB gojišča in 125 µL ekstrakta). V ostalih 11 luknjic z leve proti desni smo pipetirali po 50 µL MHB gojišča. Nato smo pričeli z razredčevanjem. Najprej smo 50 µL iz prve luknjice prenesli v drugo luknjico in vse 8-krat premešali z nastavkom za pipete. Ponovno smo 50 µL iz druge luknjice prenesli v tretjo in 8-krat premešali na enak način. Tako smo nadaljevali do konca vrstic (do 12 luknjice) in s tem zmanjševali koncentracijo ekstrakta v gojišču. Na koncu smo 50 µL zavrgli. Kulturo, ki smo jo cepili v tako pripravljene luknjice na mikrotitrski ploščici, smo pripravili tako, da smo v centrifugirko pipetirali 10 mL svežega MHB gojišča in mu dodali 150 µL čez noč namnožene kulture. S tem smo jo razredčili do koncentracije, primerne za delo. 50 µL tako pripravljene kulture smo dodali v vse luknjice mikrotitrsko ploščico.

Za pomoč pri vrednotenju rezultatov smo pripravili pozitivne in negativne kontrole. Pri pozitivni kontroli smo v luknjico pipetirali po 50 µL MHB in 50 µL določene kulture. Raztopina se je obarvala vijolično. Za negativno kontrolo smo pipetirali 50 µL MHB in 50

μL ekstrakta, ki pa se ne sme obarvati vijolično. S tem potrdimo, da ekstrakt ali gojišče ne vplivata na rezultate. V zadnjo luknjico smo pipetirali samo 100 μL MHB. To je bil slepi vzorec. Mikrotitrsko ploščico smo 1 minuto mešali na stresalniku mikrotitrskih ploščic (Eppendorf Thermomixer, Nemčija) pri 900 rpm in tako pripravljeno mikrotitrsko ploščico 24 ur inkubirali pri 37 °C.

Po inkubaciji smo posameznim razredčitvam in kontrolam dodali 10 μL INT barvila, ploščico zavili v alufolijo in dali inkubirati za 30 min. Tam, kjer bakterije kažejo dihalno aktivnost, se pojavi roza obarvanje.

3.3.9 Določanje koncentracije bakterij v tekočem gojišču

Bakterijske kulture smo razredčevali po Kochu. 100 μL vzorca kulture, ki smo ga uporabljali pri določevanju MIK, smo pipetirali v 900 μL fiziološke raztopine - redčitev A1 (-1) in dobro premešali. Iz A1 smo pipetirali 100 μL v drugo mikropruveto z 900 μL fiziološke raztopine - redčitev B2 (-2) in premešali. Iz B2 smo pipetirali 100 μL v 900 μL nove fiziološke raztopine - redčitev C3 (-3). S tem postopkom smo nadaljevali do redčitve E5 (-5). V petrijevko z MHB gojiščem smo na označena mesta pipetirali po 10 μL iz mikropruvet B2, C3, D4, E5 in jo inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po tem času smo prešteli kolonije in izračunali koncentracijo bakterij (CFU / mL). Upoštevali smo plošče, kjer smo dobili od 25 do 250 kolonij.

$$\text{CFU/mL} = \Sigma C/n \times d \quad \dots(1)$$

Legenda: C - število vseh preštetih kolonij na vseh števnih ploščah, n - število ponovitev, d - faktor razredčitve

3.3.10 Lokacije nabiranja vzorcev in karakteristika podlage tal

Hmelj iz Slovenije je bil nabran v nasadih v Žalcu v Savinjski Dolini. Tla so na peščeno prodnatem pobočju, barva zemlje je temno rjava. Površinski del zemlje je peščeno ilovnat do glinast, zemlja je srednja do težka. V Avstriji, v Leutschachu je zemlja peščeno ilovnata, v Nemčiji, v Huellu je zelo ilovnata, na Češkem v mestu Žatec pa rahlo ilovnata (Abram in sod., 2015).

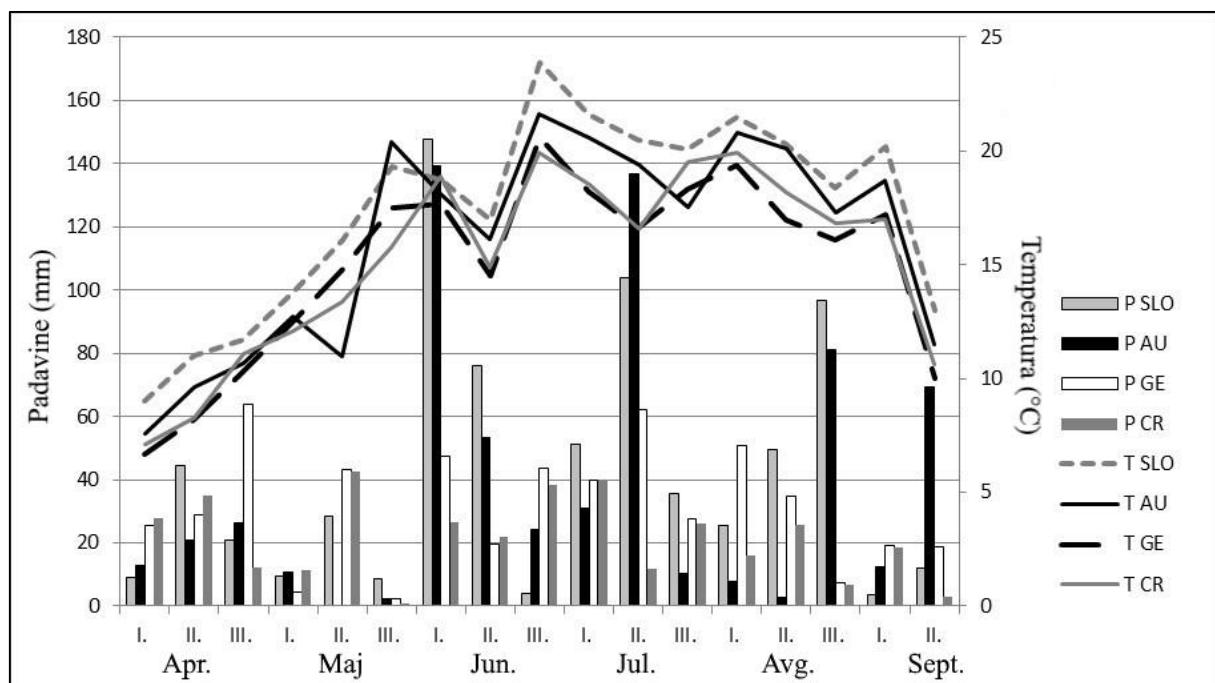
Rodovitost zemlje je bila zadovoljiva, nekoliko manjša je bila le na Češkem. Vrednost pH je varirala med 6,0 in 7,2. Vsebnost fosforjevih soli je bila najnižja v nasadih sorte Aurora v Avstriji in v nasadih obeh sort (Aurore in H. Magnuma) na Češkem. V Sloveniji in Avstriji je bila vsebnost fosforjevih soli na nasajenih področjih s sorte H. Magnum dobra. V nasadih sorte Aurora v Sloveniji ter v nasadih obeh sort v Nemčiji je bila zemlja prenasičena s fosfati (Abram in sod., 2015).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 VREMENSKE RAZMERE

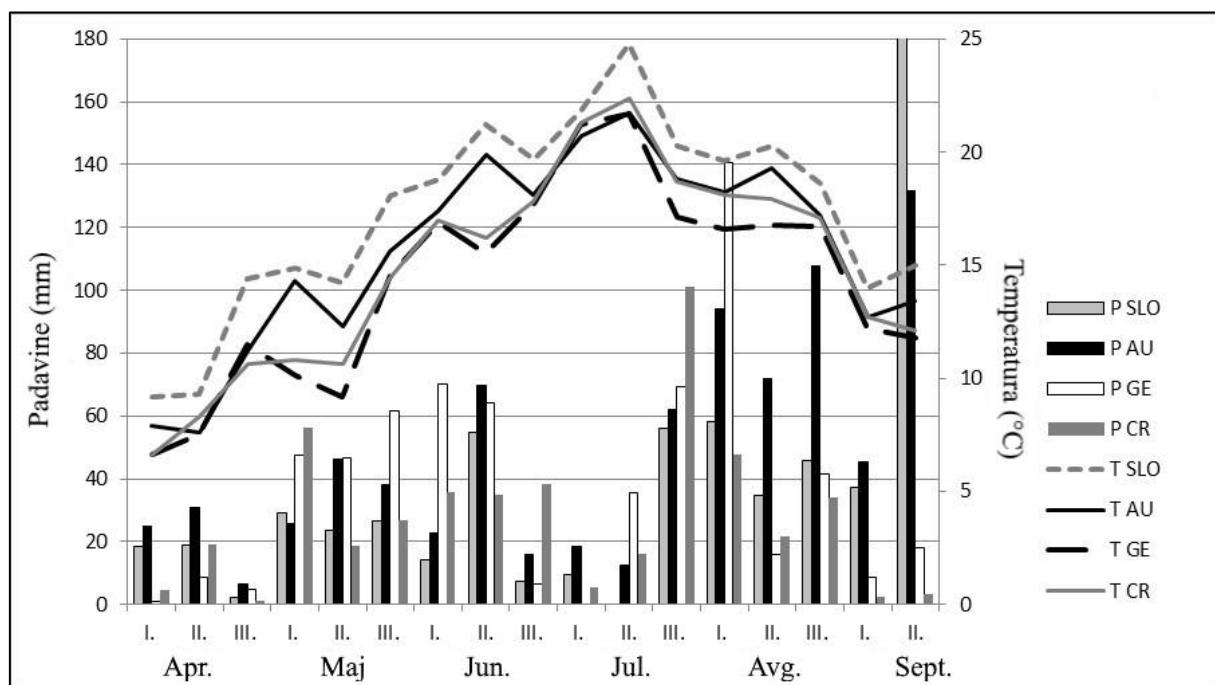
V vseh štirih državah so med rastno sezono (od meseca aprila do septembra) spremljali temperaturne in vremenske spremembe v hmeljnih nasadih. Slika 6 prikazuje spremeljanje temperature in padavin v letu 2008, slika 7 pa v letu 2010.

Temperature so se glede na lego države od juga proti severu zniževale. Povprečne temperature so bile v Sloveniji v letih 2008 in 2010 najvišje (nad 17 °C). V Avstriji so bile leta 2008 nekoliko nižje v primerjavi z letom 2010 (2008: 15,7 °C; 2010: 15,5 °C), vendar v obeh letih nižje v primerjavi s Slovenijo. V Nemčiji so bile temperature v primerjavi s Slovenijo in Češko še za stopinjo nižje (2008: 14,7 °C; 2010: 14,1 °C). Na Češkem so bile v obeh letih temperature podobne kot v Nemčiji in nižje kot v Sloveniji in Avstriji (2008: 14,9 °C; 2010: 14,6 °C) (Abram in sod., 2015).



Slika 6: Povprečne temperature in padavine skozi rastno sezono hmelja leta 2008 iz vseh raziskovanih lokacij
Podatke smo pridobili za Slovenijo; Adcon meteorološka postaja (IHPS Žalec); Avstrija, ARGE, Wetter – Stmk/Kranach, Nemčija (GE) vremenska napoved izdana iz vremenske postaje v Huell, Češka CH) meteorološka postaja v Žatcu (Abram in sod., 2015)

Na Sliki 7 so predstavljene spremembe temperatur in padavin v letu 2010. Najmanj padavin je bilo na Češkem leta 2010, sledi ji Nemčija. Največ padavin je bilo v Sloveniji leta 2008, leta 2010 pa v Avstriji.



Slika 7: Povprečne temperature in padavine skozi rastno sezono hmelja leta 2010 iz vseh raziskovanih lokacij. Podatke smo pridobili za Slovenijo; Adcon meteorološka postaja (IHPS Žalec); Avstrija, ARGE, Wetter-Stmk/Kranach, Nemčija (GE) vremenska napoved izdana iz vremenske postaje v Hull, Češka CH) meteorološka postaja v Žatcu (Abram in sod., 2015)

Zaradi trde strukture zemlje in obilnih padavin je bilo pričakovati, da v Avstriji rastline hmelja niso bile izpostavljene pomanjkanju vode in morebitnemu učinku suše. Lahko pa prevelika količina padavin predstavlja stres za rastline (Abram in sod., 2015).

Višje temperature bi lahko vplivale na kakovost nasadov v Sloveniji. V Nemčiji in na Češkem je bilo v obeh obdobjih manj padavin in nižje temperature v primerjavi s Slovenijo in Avstrijo in s tem tudi manj stresnih okoliščin za kultivarje. Znano je, da lahko različni kultivarji, drugo okolje in sestava zemlje vplivajo na sintezo FS (Čeh in sod., 2007).

4.1.1 Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih

Vzorci listov in storžkov so bili nabrani v najvišji tehnološki zrelosti v letih 2008 in 2010. V etanolnih ekstraktih listov in storžkov hmelja iz štirih držav, Slovenije, Avstrije, Nemčije in Češke, smo določili skupne FS z metodo po Folin-Ciocalteuju. S Folin-Ciocalteujevim reagentom smo dobili modroobarvan kompleks. Absorbance (A) raztopin vzorcev ekstraktov listov in storžkov so zbrane v preglednici 3.

Preglednica 3: Izmerjene absorbance ekstraktov iz listov (L) in storžkov (S) hmelja dveh kultivarjev iz štirih držav

Listi:	Zatehta: (mg)	Storžki:	Zatehta: (mg)	Izmerjene A (746 nm) Listi:			Izmerjene A (746 nm): Storžki		
L1/ 1	400,78	S1/ 1	401,83	0,22742	0,23296	0,23663	0,50691	0,51053	0,51484
L1/ 2	401,39	S1/ 2	401,02	0,23480	0,22981	0,23664	0,52430	0,53149	0,53490
L2/ 1	401,39	S2/ 1	400,40	0,27041	0,28156	0,28324	0,57403	0,57190	0,57797
L2/ 2	402,02	S2/ 2	400,67	0,22969	0,24002	0,23935	0,56470	0,56270	0,58203
L3/ 1	400,40	S3/ 1	401,23	0,46598	0,48280	0,47541	0,72660	0,72975	0,73049
L3/ 2	400,04	S3/ 2	400,47	0,44845	0,46257	0,46690	0,72598	0,72879	0,75698
L4/ 1	402,40	S4/ 1	401,43	0,27575	0,28451	0,28426	0,69738	0,69435	0,69435
L4/ 2	400,85	S4/ 2	402,62	0,27051	0,27985	0,28241	0,74971	0,72700	0,74304
L5/ 1	400,94	S5/ 1	401,07	0,27545	0,28527	0,29345	0,43750	0,45953	0,43334
L5/ 2	401,81	S5/ 2	401,75	0,27004	0,29363	0,27829	0,41674	0,43812	0,41363
L6/ 1	400,30	S6/ 1	400,95	0,33557	0,37863	0,37489	0,37895	0,39928	0,40617
L6/ 2	401,29	S6/ 2	401,42	0,33923	0,35961	0,34916	0,40558	0,40551	0,40757
L7/ 1	400,49	S7/ 1	400,68	0,40043	0,41887	0,71921	0,96534	0,95340	0,93650
L7/ 2	400,77	S7/ 2	400,56	0,41210	0,41887	0,40262	0,93214	0,92763	0,93330
L8/ 1	400,37	S8/ 1	401,87	0,45228	0,45288	0,44384	0,77025	0,77859	0,78114
L8/ 2	400,51	S8/ 2	400,60	0,43785	0,44952	0,45669	0,80276	0,79452	0,79205
L9/ 1	nd	S9/ 1	401,76	nd			0,51902	0,51502	0,54957
L9/ 2	nd	S9/ 2	400,05	nd			0,55050	0,56986	0,57661
L10/ 1	401,44	S10/ 1	400,46	0,21622	0,23186	0,23765	0,49149	0,52230	0,49149
L10/ 2	401,30	S10/ 2	401,75	0,20069	0,22269	0,22926	0,44074	0,45590	0,45747
L11/ 1	401,05	S11/ 1	400,13	0,28354	0,29423	0,30421	0,81126	0,81529	0,83068
L11/ 2	400,40	S11/ 2	401,98	0,27677	0,27283	0,29749	0,76989	0,77924	0,82262
L12/ 1	400,17	S12/ 1	401,21	0,33597	0,34201	0,33170	0,85542	0,83971	0,86187
L12/ 2	401,13	S12/ 2	401,38	0,31154	0,31305	0,32505	0,82052	0,84997	0,84967
L13/ 1	400,48	S13/ 1	401,33	0,22954	0,23089	0,23874	0,44383	0,43445	0,44617
L13/ 2	400,44	S13/ 2	400,88	0,22046	0,22596	0,23653	0,46365	0,44040	0,43871
L14/ 1	400,66	S14/ 1	401,33	0,23761	0,24654	0,24890	0,46173	0,46126	0,48020
L14/ 2	402,48	S14/ 2	401,15	0,23316	0,24540	0,23985	0,45973	0,44435	0,48336
L15/ 1	400,97	S15/ 1	401,32	0,10463	0,11020	0,10587	0,68911	0,69765	0,68694
L15/ 2	400,82	S15/ 2	400,58	0,11020	0,10591	0,10823	0,66959	0,66296	0,69929
L16/ 1	401,99	S16/ 1	400,92	0,36859	0,38504	0,39756	0,79967	0,78537	0,77128
L16/ 2	402,80	S16/ 2	401,21	0,37384	0,38244	0,39384	0,78534	0,81331	0,81579

Legenda: vzorci od L1 (S1) do L4 (S4) so iz Slovenije, od L5 (S5) do L8 (S8) iz Avstrije, od L9 (S9) do L12 (S12) iz Nemčije, od L13 (S13) do L16 (S16) Češka; nd- vzorec ni bil analiziran

Vsako meritev smo izvedli v dveh paralelkah in treh ponovitvah. Iz dobljenih absorbanc smo izračunali povprečne vrednosti. Iz povprečnih absorbanc raztopin vzorcev ekstraktov listov in storžkov in iz naklona k v enačbi premice umeritvene krivulje s klorogensko kislino - KK (glej 3.3.3) ter razredčitve (R) posameznega vzorca smo izračunali masno koncentracijo FS v mg KK/mL ekstrakta. Pri izračunu smo uporabili enačbo:

$$\gamma (\text{KK}) = A_{746}/k \times R \quad \dots(2)$$

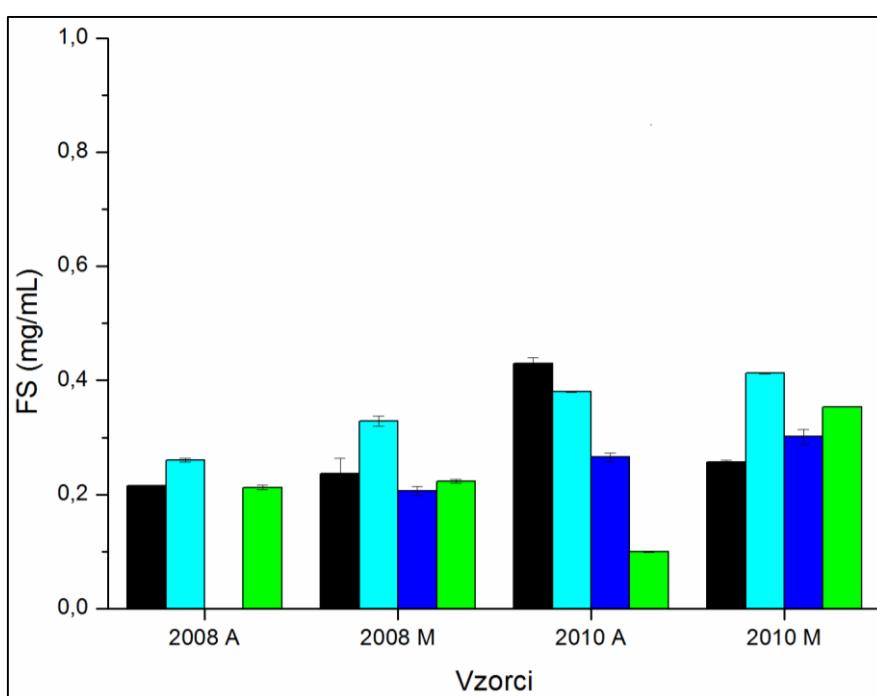
Dobljene povprečne masne koncentracije FS so prikazane v preglednici 4.

Preglednica 4: Povprečne masne koncentracije (γ) fenolnih spojin (FS) v ekstraktih iz listov (L) in storžkov (S) dveh kultivarjev hmelja iz štirih držav

Listi:	γ (mg/mL)	Storžki:	γ (mg/mL)
L1	$0,215 \pm 0,001$	S1	$0,959 \pm 0,025$
L2	$0,237 \pm 0,027$	S2	$1,054 \pm 0,006$
L3	$0,430 \pm 0,010$	S3	$1,350 \pm 0,012$
L4	$0,257 \pm 0,003$	S4	$1,322 \pm 0,058$
L5	$0,260 \pm 0,003$	S5	$0,798 \pm 0,027$
L6	$0,328 \pm 0,009$	S6	$0,738 \pm 0,012$
L7	$0,379 \pm 0,001$	S7	$1,734 \pm 0,027$
L8	$0,413 \pm 0,001$	S8	$1,449 \pm 0,026$
L9	/	S9	$1,007 \pm 0,049$
L10	$0,206 \pm 0,008$	S10	$0,878 \pm 0,066$
L11	$0,265 \pm 0,008$	S11	$1,482 \pm 0,037$
L12	$0,301 \pm 0,013$	S12	$1,558 \pm 0,016$
L13	$0,212 \pm 0,004$	S13	$0,819 \pm 0,008$
L14	$0,223 \pm 0,003$	S14	$0,857 \pm 0,007$
L15	$0,099 \pm 0,001$	S15	$1,260 \pm 0,018$
L16	$0,353 \pm 0,0$	S16	$1,464 \pm 0,025$

Legenda: vzorci od L1 (S1) do L4 (S4) so iz Slovenije, od L5 (S5) do L8 (S8) iz Avstrije, od L9 (S9) do L12 (S12) iz Nemčije, od L13 (S13) do L16 S 16) iz Češke

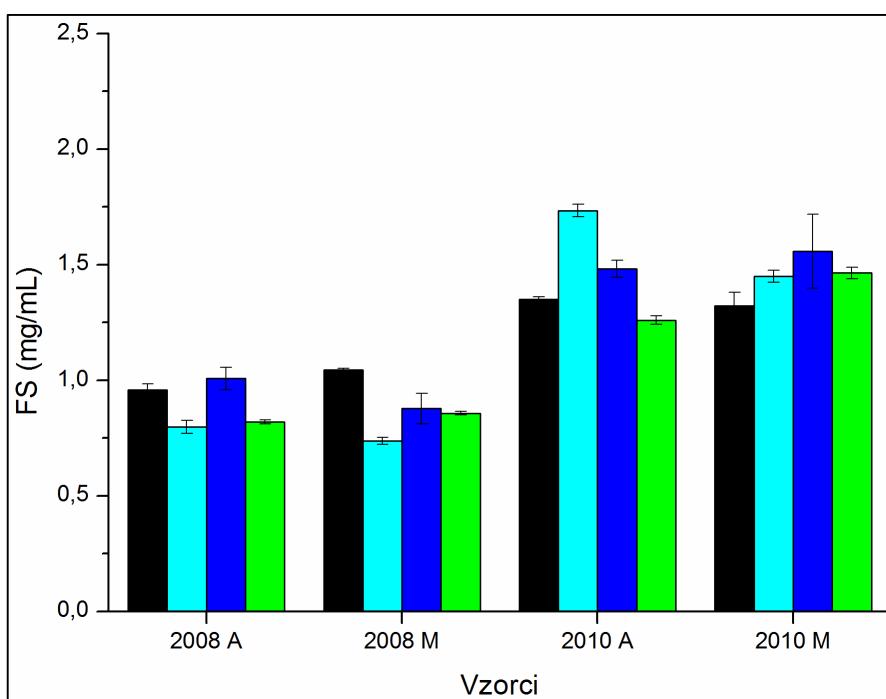
Na Slika 8 so grafično prikazane vsebnosti FS v etanolnih ekstraktih iz listov hmelja iz vseh štirih držav, nabranih v letih 2008 in 2010, na Slika 9 pa vsebnosti FS v etanolnih ekstraktih iz storžkov hmelja.



Slika 8: Skupne fenolne spojine (FS) v ekstraktih iz listov hmelja, dveh kultivarjev, Aurora (A) in H. Magnum (M) vseh štirih držav, leto 2008, 2010

Črna: Slovenija, svetlo modra: Avstrija, temno modra: Nemčija, zelena: Češka. Vzorca L9 ni bilo na voljo.

S Slika 8 je razvidno, da se masna koncentracija FS v ekstraktih, letnika 2008, iz vseh štirih držav giblje med 0,212 in 0,328 mg/mL. Pri listih Aurora je bilo najmanj FS v listih iz Češke (0,212 mg/mL), sledi ji Slovenija (0,215 mg/mL). Največ FS so vsebovali ekstrakti iz listov, nabranih v Avstriji (2,60 mg/mL). Pri vzorcih listov H. Magnum, nabranih leta 2008 iz vseh štirih držav, se masna koncentracija FS giblje med 0,205 in 0,328 mg/mL. Največ FS so vsebovali listi iz Avstrije, najmanj pa listi iz Nemčije. Vrednosti FS v vzorcih, nabranih v letu 2010, se gibljejo med 0,099 in 0,430 mg/mL. Pri listih Aurora so imeli najvišjo koncentracijo FS vzorci iz Slovenije, najnižjo pa vzorci s Češke. Pri kultivarju H. Magnum (leto 2010) so imeli najvišjo koncentracijo ekstrakti listov iz Avstrije (0,413 mg/mL), sledijo ji ekstrakti listov s Češke (0,353 mg/mL). Najnižjo koncentracijo FS (leto 2010) v kultivarju H. Magnum smo določili v etanolnih ekstraktih listov iz Slovenije. Tudi tu so bile koncentracije FS v vzorcih, pridobljenih leta 2010, večje, kot pri listih, nabranih leta 2008.



Slika 9: Skupne fenolne spojine (FS) v ekstraktih iz storžkov hmelja dveh kultivarjev, Aurora (A) in H. Magnum (M), vseh štirih držav, leto 2008, 2010
Črna: Slovenija, svetlo modra: Avstrija, temno modra: Nemčija, zelena: Češka.

Vsebnost FS v ekstraktu se pri storžkih letnika 2008 pri sorti Aurora in H. Magnum, v vseh štirih državah, giblje med 0,738 in 1,054 mg/mL. Najvišjo koncentracijo FS so imeli storžki iz Slovenije H. Magnum, najnižjo pa storžki H. Magnum iz Avstrije. Pri vzorcih, nabranih leta 2010, se vrednosti FS ekstrakta gibljejo med 1,260 in 1,734 mg/mL. Najvišjo koncentracijo FS v vzorcu letnika 2010 vsebujejo storžki Aurora iz Avstrije, najnižjo pa storžki Aurora s Češke. Najvišjo koncentracijo pri sorti H. Magnum vsebujejo storžki iz Nemčije (1,558 mg/mL), najnižjo storžki iz Slovenije (1,322 mg/mL). Če primerjamo leti 2008 in 2010, vidimo, da je koncentracija FS v storžkih Aurora in H. Magnum bistveno višja pri letniku 2010. Med najnižjo (letnik 2008) in najvišjo (letnik 2010) masno koncentracijo FS v ekstraktu je razlika skoraj 1 mg/mL, kar je lahko posledica različne podlage, vremenskih pogojev ali pa zaradi starosti suhih vzorcev. V našem primeru lahko to vsaj delno pripisemo starosti suhega vzorca, saj so bili vzorci listov in storžkov tri leta hranjeni v papirnatih vrečkah v omari pri sobni temperaturi. FS so nestabilne spojine tako med procesiranjem, kot tudi med shranjevanjem. Med shranjevanjem ali procesiranjem hitro oksidirajo, kar vodi do vizualnih sprememb in progresivnega rjavegaobarvanja (to smo opazili tudi pri naših vzorcih) in zmanjšane biološke aktivnosti (Munin in Edwards-

Lévy, 2011). Na sliki 8 in sliki 9 se vidi, da je masna koncentracija FS v listih in storžkih iz leta 2008 drugačna, kot v listih in storžkih iz leta 2010.

4.1.2 Minimalna inhibitorna koncentracija v ekstraktih

Ker je znano, da FS delujejo protimikrobnno, smo se odločili določiti protimikrobnno učinkovitost listov in storžkov hmelja. Teste smo izvedli z etanolnimi ekstrakti listov in storžkov hmelja iz vseh štirih držav, in to samo iz svežih vzorcev, nabranih leta 2010. Preverili smo protimikrobnno učinkovitost proti G+ bakteriji *S.aureus* in proti G- bakteriji *E.coli*. Rezultati so podani kot MIK v mg/mL in so zbrani v preglednici 5 in preglednici 6.

Preglednica 5: Povprečne minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) v ekstraktih iz listov (L) in storžkov (S) dveh kultivarjev hmelja iz štirih držav z bakterijo *S. aureus*

Listi:	MIK ± sd (mg/mL)	Storžki:	MIK ± sd (mg/mL)
L3	>0,28	S3	0,0026 ± 0,0000
L4	>0,16	S4	0,0026 ± 0,0001
L7	>0,24	S7	0,0021 ± 0,0006
L8	>0,26	S8	0,0016 ± 0,0007
L11	>0,17	S11	0,0029 ± 0,0001
L12	>0,19	S12	0,0013 ± 0,0005
L15	>0,06	S15	0,0025 ± 0,0000
L16	0,22 ± 0,05	S16	0,0018 ± 0,0005

Legenda: sd-standardna deviacija

MIK smo določali s ciljem, da bi ugotovili najnižjo masno koncentracijo ekstrakta, ki še učinkovito zavira rast uporabljenih bakterijskih vrst. Ekstrakti listov hmelja so pokazali bistveno slabšo protimikrobnno učinkovitost proti G+ bakterijam vrste *S. aureus*, saj testirane koncentracije le-teh niso zavirale njihovih rasti. Pač pa smo določili izredno protimikrobnno učinkovitost vseh ekstraktov storžkov hmelja proti G+ bakterijam vrste *S. aureus*. Povprečne vrednosti MIK so se gibale med 0,0013 do 0,0029 mg/mL (Preglednica 5). Te MIK so primerljive z aktivnostjo spojin hmelja (humuloni, lupuloni, izohumuloni, reducirani izohumuloni, terahidro-izohumuloni, heksahidro-izohumuloni in ksantahumuloli), testiranih proti sevu *S. aureus*, ki povzroča akne (Yamaguchi in sod., 2009) in ekstraktov storžkov proti G+ bakteriji *Paenibacillus larvae* (Flesar in sod., 2010).

Slabša protimikrobnna učinkovitost ekstraktov listov, ki prav tako vsebujejo grenke kisline halkone in hlapne komponente (Langezaal in sod., 1990), sovpada z manjšo vsebnostjo FS v nekoncentriranih ekstraktih listov hmelja, v primerjavi z ekstrakti storžkov. Sklepamo lahko, da je razlika med vrstami FS v listih in storžkih odgovorna za različni protimikrobnii učinek (Abram in sod., 2015). Slabšo protimikrobnno učinkovitost ekstraktov iz listov in storžkov smo določili tudi proti G- bakteriji vrste *E. coli* (Preglednica 6).

Preglednica 6: Povprečne vrednosti MIK v etanolnih ekstraktih iz listov (L) in storžkov (S) dveh kultivarjev hmelja iz štirih držav z bakterijo *E. coli*

Listi:	MIK ± sd (mg/mL)	Storžki:	MIK ± sd (mg/mL)
L3	>0,27	S3	0,43 ± 0,01
L4	>0,16	S4	0,33 ± 0,01
L7	>0,24	S7	0,32 ± 0,15
L8	0,26 ± 0,05	S8	0,27 ± 0,13
L11	0,17 ± 0,04	S11	0,37 ± 0,01
L12	0,19 ± 0,01	S12	0,20 ± 0,01
L15	>0,06	S15	0,32 ± 0,00
L16	0,22 ± 0,05	S16	0,37 ± 0,01

Legenda: sd-standardna deviacija

Etanolni ekstrakti storžkov so pokazali zmerno protimikrobnno učinkovitost proti G-bakteriji *E.coli* ($0,20 < \text{MIK} < 0,43 \text{ mg/mL}$), kar je primerljivo z aktivnostjo ekstraktov listov hmelja ($0,16 < \text{MIK} < 0,44 \text{ mg/mL}$). Protimikrobnna učinkovitost ekstraktov listov je bila v splošnem povezana z vsebnostjo FS, ki je bila podobna v vseh vzorcih iz vseh držav in v obeh proučevanih letih.

Kljub temu, da so imeli etanolni ekstrakti iz listov hmelja veliko slabšo protimikrobnno učinkovitost v primerjavi z ekstrakti iz storžkov, pa se moramo zavedati, da predstavljajo listi in stebla zelo velik odpadek. Količina ostanka je 2,6 kg/rastlino, kar pomeni 10-15 t/ha. Pri pridobivanju te biomase ne bi imeli dodatnih stroškov, saj pri ločevanju storžkov in ostalih odpadnih delov rastline ne bi bilo dodatnega dela. Vse se loči že direktno iz kombajnov, zato bi lahko ostanke že takoj pakirali v vreče in jih tudi dostavili uporabnikom (Abram in sod., 2015). Tako bi lahko listi postali uporabni vir bioaktivnih FS s protimikrobnim delovanjem. Zato je smiselno nadaljevati z dodatnimi raziskavami in možnostmi njihovega izkoriščanja v živilski industriji.

5 SKLEPI

Na podlagi opravljenih analiz v okviru diplomskega dela lahko zaključimo:

- Listi in storžki hmelja so vir FS.
- V listih je dosti manj FS kot v storžkih.
- V etanolnih ekstraktih iz listov in storžkov, nabranih leta 2008, je koncentracija FS nižja, kot v ekstraktih iz vzorcev, nabranih leta 2010.
- Na koncentracijo FS v etanolnih ekstraktih iz listov in storžkov hmelja vplivata kultivar in geografsko poreklo rastline. Večje razlike smo opazili pri vsebnosti FS v storžkih.
- FS v ekstraktih delujejo protimikrobi proti G+ in G- bakterijam.
- Ekstrakti storžkov (letnik 2010) bolj učinkovito zavirajo rast G+ bakterij vrste *S. aureus*, kot G- bakterij vrste *E. coli*.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo v ekstraktih listov in storžkov hmelja (*Humulus lupulus* L) v kultivarjih Aurora in H. Magnum, iz držav Slovenija, Avstrija, Nemčija in Češka določili koncentracijo FS. Tako listi, kot storžki vsebujejo FS. Kljub temu, da je FS v listih hmelja dva do trikrat manj, kot v storžkih, le-ti predstavljajo pomemben vir aktivnih učinkovin. Velike količine listov hmelja predstavljajo odpadni proizvod v hmeljiščih. V diplomski nalogi smo pokazali, da bi lahko liste hmelja uporabili kot potencialni vir FS, saj delujejo protimikrobnno, številne študije pa so pokazale tudi njihovo antioksidativno učinkovitost.

Pokazali smo, da je vsebnost FS odvisna od temperature in padavin v vegetacijski dobi, pomembna dejavnika pa sta tudi kultivar in geografsko poreklo.

Etanolni ekstrakti storžkov hmelja so pokazali izredno dobro protimikrobnno učinkovitost proti G+ bakterijam vrste *S. aureus*, proti G- bakterijam vrste *E. coli* pa je bila protimikrobnna učinkovitost slabša. Protimikrobnna učinkovitost je bila sorazmerna koncentraciji FS v ekstraktih listov in storžkov hmelja.

Da bi lahko natančno določili katere aktivne učinkovine so v ekstraktih listov in storžkov hmelja odgovorne za protimikrobnno delovanje, bi bilo potrebno natančno določiti njihovo sestavo in ovrednotiti protimikrobnno učinkovitost posameznih komponent.

7 VIRI

- Abram V., Čeh B., Vidmar M., Hercezi M., Lazić N., Bucik V., Smole Možina S., Košir I.J., Kač M., Demšar L., Poklar Ulrich N. 2015. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products*, 64: 124–134
- Back W. 1994. Secondary contamination in the filling area. *Brauwelt International*, 4: 326–328
- Bañas N., García-Viguera C., Moreno D. 2014. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19: 13541–13563
- Bouet A.-M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68: 2722–2735
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223–253
- Čeh B., Kač M., Košir I.J., Abram V. 2007. Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 989–1000
- Čeh B., Zmrzlak M. 2012. Spravilo hmelja: Obiranje hmelja. V: Hmelj-od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 105–113
- Čerenak A., Ferant N. 2012. Sorte hmelja. V: Hmelj-od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 17-20
- Dias M.I., Sousa M.J., Alves R.C., Ferreira I.C.F.R. 2016. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 82: 9–22
- Eri S., Khoo B.K., Lech J., Hartman T.G. 2000. Direct thermal desorption-gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop

- (*Humulus lupulus* L.) essential oils in support of varietal characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 1140–1149
- Ferant N. 2012. Hmelj: Rastlina hmelja. V: Hmelj-od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.) Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 13–17
- Ferant N., Košir I.J. 2012. Hmelj: Kemische lastnosti hmelja. V: Hmelj-od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 20–20
- Flesar J., Havlik J., Kloucek P., Rada V., Titera D., Bednar M., Stropnický M., Kokoska L. 2010. *In vitro* growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees. Veterinary Microbiology, 145: 129–133.
- Gorissen H., Bellink C., Vancraenenbroeck R., Lontie R. 1968. Separation and identification of (+)-gallocatechine in hops. Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 76: 932–934
- Haas G.J., Barsoumian R. 1994. Antimicrobial activity of hop resins. Journal of Food Protection, 57: 59–61
- Haunold A. 1991. Cytology and cytogenetics of hops. V: Developments in plant genetics and breeding. Vol 2, Part B. Chromosome engineering in plants genetics, breeding, evolution. Tsuchiya T., Gupta P. K. (ur.). Amsterdam, Elsevier: 551–563
- Hieronymus S. 2012. For the love of hops : the practical guide to aroma, bitterness, and the culture of hops. Boulder, Brewers Association:133-133
- IHPS. 2016. Katalog sort hmelja v Sloveniji. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo:12-12
http://www.ihps.si/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=22&Itemid=55, (18.8.2016)
- Keukeleire J. De, Janssens I., Heyerick A., Ghekiere G., Cambie J., Roldan-Ruiz I., Bockstaele E. Van, Keukeleire D. De. 2007. Relevance of organic farming and

- effect of climatological conditions on the formation of alpha-acids, beta-acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol in hop (*Humulus lupulus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 61–66
- Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P. 2016. Biologically active compounds from hops and prospects for their use. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15: 542–567
- Langezaal C.R., Chandra A., Katsiotis S.T., Scheffer J.J.C., De Haan A.B. 1990. Analysis of supercritical carbon dioxide extracts from cones and leaves of a *Humulus lupulus* L cultivar. Journal of the Science of Food and Agriculture, 53: 455–463
- Malizia R.A., Molli J.S., Cardell D.A., Grau R.J.A. 1999. Essential oil of hop cones (*Humulus lupulus* L.). Journal of Essential Oil Research, 11: 13–15
- Mewis I., Smetanska I.M., Müller C.T., Ulrichs C. 2011. Specific Poly-phenolic Compounds in Cell Culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Fréaux. Applied Biochemistry and Biotechnology, 164: 148–161
- Moir M. 2000. Hops - A millennium review. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 58: 131–146
- Munin A., Edwards-Lévy F. 2011. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. Pharmaceutics, 3, 4:793-829
- Neve R.A. 1991. Hops. Dordrecht, Springer: 1–23
- Radišek S. 2012. Žarišče viroidne zakrnelosti hmelja(HSVd). V: Hmelj-od sadike do storžka. Čeh B. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 30-30
- Sägesser M., Deinzer M. 1996. HPLC-ion spray-tandem mass spectrometry of flavonol glycosides in hops. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 54: 129–134
- Sakamoto K., Konings W.N. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. International Journal of Food Microbiology, 89: 105–124

Schönberger C. 2009. Why cohumulone is better than its reputation. Brauwelt International, 27: 159–160

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

Šuštar-Vozlič J., Čerenak A. 2002. Žlahtnenje hmelja in hmeljni kultivarji. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 31–50

Verpoorte R., van der Heijden R., ten Hoopen H.J.G., Memelink J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. Biotechnology Letters, 21: 467–479

Verzele M., De Keukeleire D. 1991. Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids. Amsterdam, Elsevier: 417 str.

Yamaguchi N., Satoh-Yamaguchi K., Ono M. 2009. *In vitro* evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus* L.) addressing acne vulgaris. Phytomedicine, 16: 369–376

Zanoli P., Zavatti M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. Journal of Ethnopharmacology, 116: 383–396

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich za vso pomoč in temeljit pregled diplomske naloge.

Za vso tehnično in strokovno pomoč se zahvaljujem somentorici prof. dr. Sonji Smole Možina.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Rajku Vidrihu za svetovanje in temeljit pregled diplomske naloge.

Posebno zahvalo namenjam prof. dr. Veroniki Abram, za vse poprave in nasvete pri pisanju moje diplomske naloge, za veliko potrpljenja in predvsem za ogromno spodbudo! Hvala.

Za pomoč pri eksperimentalnem delu in delu v laboratoriju se zahvaljujem Mateji Vidmar in Saši Piskernik.

Zahvaljujem se Lini Burkan Makivić za pomoč pri urejanju in oblikovanju diplomske naloge in predvsem za spodbudo pri pisanku.

Za veliko pomoč in delo pri diplomski nalogi bi se rada zahvalila tudi Ajdi Ota.

Iskreno se zahvaljujem mami Vesni in očiju Miomirju, sestrama Ani in Sanji, ter partnerju Andreju. Hvala za veliko potrpljenja in spodbude skozi vsa leta mojega študija.

Hvala Katji Černe in Mariji Pintar pri spodbudi in pomoči skozi vsa leta.

Hvala tudi mojim prijateljem Heleni, Petri, Simonu, Mihi vsem, ki so me spodbujali in potprežljivo čakali na ta dan.