

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Stálost aktivních látek obsažených ve fungicidním
preparátu založeném na chmelové a tymiánové silici
určenému k hubení plísňových chorob chmele**

Diplomová práce

Bc. Václav Žatecký

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Ing. Jan Tauchen, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stálost aktivních látek obsažených ve fungicidním preparátu založeném na chmelové a tymiánové silici určenému k hubení plísňových chorob chmele" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé práce, Ing. Janu Tauchenovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracování této práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Adéle Fraňkové, Ph.D., za cenné rady a vedení při experimentální části práce.

Stálost aktivních látek obsažených ve fungicidním preparátu založeném na chmelové a tymiánové silici určenému k hubení plísňových chorob chmele

Souhrn

Chmel (*Humulus lupulus*; *Cannabaceae*) je rostlina značně náchylná k některým plísňovým onemocněním, zejména k (*Pseudoperonospora humuli*). Houbové choroby chmele se obtížně hubí. K prevenci a likvidaci plísní se používají přípravky, které představují zátěž pro životní prostředí (např. ty na bázi mědi). Používání konvenčních přípravků se stále legislativně omezuje, ale nových, šetrnějších přípravků k životnímu prostředí, se v současnosti vyrábí jen omezené množství. Postřiky na bázi chmelové a tymiánové silice, se zdají být efektivní a více environmentálně přátelskou alternativou ke konvenčním fungicidům. Vzhledem k tomu, že tento přípravek je stále používán na experimentální bázi, neexistují data, která by mapovala, zda jsou aktivní složky tohoto přípravku stabilní a nepodléhají rozkladu vlivem skladování.

Tato studie se zabývala stanovením hladin aktivních složek fungicidního postřiku na bázi chmelové a tymiánové silice v závislosti na různých skladovacích podmínkách (6 °C, 25 °C, 40 °C). Obsah hořkých kyselin, včetně jejich jednotlivých analogů, ve chmelovém postřiku, byl analyzován pomocí HPLC-UV. Množství obsahových látek silic bylo analyzováno pomocí GC-MS s následnou analýzou GC/Q-TOF. Oxidace lipidů byla zjišťována stanovením peroxidového čísla. Průměrný úbytek aktivních látek byl do 10 % ve všech skladovacích podmínkách. Výsledkem těchto měření bylo, že postřik je relativně stabilní ve všech skladovacích podmínkách a mohl by tak být zaveden do ochranné praxe chmele.

Klíčová slova: fungicid; hořké kyseliny; plísňová rezistence; skladovací pokus; thymol

Stability of active principles contained in fungicidal preparation based on hop and thyme essential oil intended for the control of fungal diseases of hops

Summary

Hops (*Humulus lupulus*; *Cannabaceae*) is a plant highly susceptible to some fungal diseases, especially (*Pseudoperonospora humuli*). Hop fungal diseases are difficult to control. Products that pose a burden on the environment (eg copper-based ones) are used to prevent and eliminate mold. The use of conventional products is still restricted by legislation, but new, more environmentally friendly products are currently produced in limited quantities. Hop and thyme essential oil sprays appear to be an effective and more environmentally friendly alternative to conventional fungicides. As this product is still used on an experimental basis, there are no data to map whether the active ingredients of this product are stable and do not degrade due to storage.

This study examined the levels of active ingredients of hop and thyme essential oil fungicides depending on different storage conditions (6 ° C, 25 ° C, 40 ° C). The content of bitter acids, including their individual analogues, in the hop spray was analyzed by HPLC-UV. The amount of essential oil content was analyzed by GC-MS followed by GC / Q-TOF analysis. Lipid oxidation was determined by determining the peroxide value. The average loss of active substances was up to 10 % in all storage conditions. The result of these measurements was that the spray is relatively stable in all storage conditions and could thus be introduced into the protective practice of hops.

Keywords: fungicide, bitter acids, fungal resistance, storage experiment, thymol

Obsah

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 8 |
| 2 | Cíl práce a vědecká hypotéza..... | 10 |
| 3 | Literární rešerše..... | 11 |
| 3.1 | Chmel otáčivý (<i>Humulus Lupulus L.</i>)..... | 11 |
| 3.1.1 | Systematické zařazení | 11 |
| 3.1.2 | Morfologie chmele..... | 12 |
| 3.1.3 | Chemické složení chmele | 12 |
| 3.1.3.1 | Chmelové pryskyřice | 13 |
| 3.1.3.1.1 | Alfa hořké kyseliny | 13 |
| 3.1.3.1.2 | Beta hořké kyseliny | 14 |
| 3.1.3.1.3 | Vlastnosti, aktivita a stálost alfa a beta hořkých kyselin..... | 14 |
| 3.1.3.2 | Chmelové silice | 16 |
| 3.1.3.2.1 | Složení chmelových silic | 16 |
| 3.1.3.2.2 | Stálost chmelových silic | 17 |
| 3.1.3.2.3 | Způsoby a kritéria hodnocení chmelových silic | 18 |
| 3.1.3.3 | Chmelové polyfenoly | 18 |
| 3.1.3.3.1 | Prenylované flavonoidy..... | 19 |
| 3.1.4 | Houbové onemocnění chmele..... | 19 |
| 3.1.4.1 | Peronospora chmelová (<i>Pseudoperonospora humuli</i>) | 19 |
| 3.1.4.1.1 | Škodlivost a bionomie peronospory chmelové..... | 20 |
| 3.1.4.2 | Padlí chmelové (<i>Sphaerotheca humuli</i>) | 21 |
| 3.1.4.2.1 | Škodlivost a bionomie padlí chmelového..... | 21 |
| 3.1.4.3 | Verticillium (<i>Verticillium albo-atrum</i>)..... | 23 |
| 3.1.4.4 | Bazální korová nekróza chmele - Fusarióza (<i>Fusarium sambucinum</i> ; <i>teleomorfa Giberella pulicaris</i>) | 24 |
| 3.2 | Konvenční přípravky | 25 |
| 3.2.1 | Konvenční přípravky na bázi mědi | 25 |
| 3.2.2 | Konvenční přípravky na bázi fosforu | 26 |
| 3.3 | Alternativní fungicidní přípravky na bázi přírodních látek | 28 |
| 3.3.1 | Wetcit – terpeny z pomerančovníku | 28 |
| 3.3.2 | Alginure-výtažky z mořských řas | 29 |
| 3.4 | Fungicidní přípravek na bázi chmelového extraktu | 30 |
| 3.4.1 | Antifungální aktivita látek obsažených ve chmelu | 30 |
| 3.4.2 | Způsoby získávání extraktu | 31 |
| 3.4.2.1 | Ethanolové extrakty | 32 |
| 3.4.2.2 | CO ₂ extrakty | 32 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.5 | Tymiánová silice | 32 |
| 3.5.1 | Složení tymiánové silice | 32 |
| 3.5.2 | Stálost tymiánové silice | 33 |
| 3.5.3 | Antifungální aktivita tymiánových silic | 34 |
| 3.5.4 | Metody izolace tymiánových silic | 35 |
| 4 | Materiál a metody | 36 |
| 4.1 | Rostlinný materiál | 36 |
| 4.2 | Skladovací pokus | 36 |
| 4.3 | Analýza alfa a beta hořkých kyselin pomocí HPLC-UV/VIS | 36 |
| 4.3.1 | Chemikálie | 36 |
| 4.3.2 | Příprava vzorků pro HPLC analýzu | 36 |
| 4.3.3 | HPLC-UV/VIS analýza | 36 |
| 4.4 | Sledování změn profilu volatilních látek v průběhu skladování | 37 |
| 4.4.1 | Příprava vzorků pro GC-MS analýzu | 37 |
| 4.5 | Analýza profilu volatilních látek pomocí head space - SPME (solid phase micro extraction) s následnou analýzou pomocí GC/Q-TOF | 37 |
| 4.6 | Analýza peroxidového čísla | 38 |
| 4.6.1 | Chemikálie | 38 |
| 4.6.2 | Příprava roztoků | 38 |
| 4.6.3 | Separace oleje pomocí Liquid-liquid extrakce (chmelový extrakt) | 38 |
| 4.6.4 | Stanovení peroxidového čísla pomocí FOX metody | 39 |
| 4.6.4.1 | Příprava kalibrace | 39 |
| 4.6.4.2 | Příprava a měření vzorku | 39 |
| 4.6.4.3 | Výpočet peroxidového čísla | 39 |
| 4.7 | Statistická analýza | 40 |
| 5 | Výsledky | 41 |
| 5.1 | Obsah alfa a beta hořkých kyselin ve chmelovém postřiku | 41 |
| 5.2 | Obsah monoterpenů a seskviterpenů ve chmelové a tymiánové silici | 42 |
| 5.2.1 | Chmelový postřik | 42 |
| 5.2.2 | Tymiánový postřik | 43 |
| 5.3 | Peroxidové číslo | 44 |
| 6 | Diskuze | 45 |
| 7 | Závěr | 47 |
| 8 | Seznam literatury | 48 |
| 9 | Samostatné přílohy | 52 |

1 Úvod

Chmel a z této suroviny vyrobené přípravky jsou doposud nezastupitelnou surovinou dávající pivu typickou hořkost a aroma (Basařová et al. 2010). V České republice se chmel pěstuje na vysoké úrovni a velká část z celkové produkce se vyváží téměř do celého světa (Kosař et al. 2000). V roce 2019, kdy výměra chmelnic v ČR tvořila 8,1 % světové plochy, zaujímá ČR třetí místo mezi pěstiteli chmele ve světě po USA (38,7 % světové plochy) a Německu (33,2 % světové plochy). V roce 2019 byla roční sklizeň v ČR 7 145 tun, při průměrném výnosu 1,43 t/ha. Celosvětově se vypěstuje 80 – 100 tis. tun chmele na 62 tis. hektarech a uvaří se z něj přibližně 1 900 mil. hl. piva (Altová 2020).

Díky variabilitě počasí jsou rostliny chmele náchylné k napadení různými houbovými chorobami, jako jsou např. peronospora chmelová, padlí chmelové či *Verticilium*. Mezi nejvýznamnější houbové choroby patří plíseň chmelová (*Pseudoperonospora humuli*) (Procházka et al. 2021). Peronospora může napadat všechny orgány chmelové rostliny, díky rozmnožování pohlavním i nepohlavním způsobem má vyšší odolnost vůči nepříznivým podmínkám a v příznivých podmínkách je schopna svého rychlého nárůstu. Výskyt peronospory je v dnešní době díky propracovanému systému ochranných fungicidů minimální, je však nutné pečlivě dodržovat agrotechnické postupy, zejména včasné preventivní ošetření, jinak může peronospora způsobit značné hospodářské ztráty (Vostřel 2008).

Jako ochrana proti houbovým onemocněním chmele, zejména peronospoře, mnoho desítek let používají konvenční přípravky na bázi mědi s účinnými látkami oxychlorid mědi a později i hydroxid mědnatý a fosforu. Na základě provedených studií, bylo zjištěno, že vysoké dávky mědnatých pesticidů opakovaně využívaných k ochraně chmelu ve chmelnicích představují závažné riziko pro půdní mikroorganismy, zejména pak pro kroužkovce. Akceptovatelná dávka mědi byla stanovena 4 kg mědi na hektar ročně, avšak tato dávka představuje pouze polovinu doposud používaného množství (Procházka et al. 2021). Přítomnost vyššího množství mědi může mít negativní vliv i na kvalitu piva. Kovové ionty mědi se podílejí na neenzymatické oxidaci nenasycených mastných kyselin za vzniku nenasycených aldehydů, které negativně ovlivňují organoleptické vlastnosti piva. Měď v procesu výroby piva představuje silně dekontaminační proces (Krofta et al. 2011). Z těchto důvodů se vyvíjejí nové alternativní prostředky, které jsou založené na přírodních látkách, ale bohužel tento vývoj není předním zájmem v příslušném vědeckém sektoru. Jednou z možností v alternativní ochraně chmele jsou přípravky založené na chmelové a tymiánové silici. Tyto zmíněné produkty nejsou prozatím zavedené do ochranné praxe chmele, nicméně vykazují dobré výsledky v polních pokusech. Ale doposud o nich nevíme to, jak moc jsou stabilní při skladování. Jako další alternativní přípravky jsou testovány Wetcit-terpeny z pomerančovníku a Alginure-výtažky z mořských řas.

Z výše uvedených důvodů je tato studie zaměřena na stanovení stability alternativních fungicidních přípravků založených na chmelové a tymiánové silici, které v polních podmínkách vykazovaly slibné výsledky při potlačení fungálních onemocnění chmele. V této práci bude

sledována stabilita alfa a beta hořkých kyselin postřiku založeném na chmelové silici, změny profilu monoterpenoidních látek a seskviterpenoidních látek přítomných v obou přípravcích (založený na chmelové i tymiánové silici) a stabilita olejů pomocí sledování peroxidového čísla (rovněž u obou přípravků). Výsledky z této studie by mohly být využitelné při praktickém zavedení přípravků založených na chmelové a tymiánové silici do ochrany chmele vůči fungálním patogenům.

2 Cíl práce a vědecká hypotéza

Cílem této práce je zhodnotit stabilitu alternativních fungicidních prostředků založených na chmelové a tymiánové silici určených pro potlačení houbových onemocnění chmele otáčivého. Cíle této práce mohou sloužit k zavedení těchto přípravků do ochranné praxe chmele. Specifické cíle této práce zahrnují:

1. Sledování stability alfa a beta hořkých kyselin v prostředku založeném na chmelové silici pomocí kapalinové chromatografie spojené s UV/VIS detektorem (HPLC-UV)
2. Sledování změn poměrů látek monoterpenoidního a seskviterpenoidního charakteru u obou prostředků (založeném na chmelové i tymiánové silici) pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS)
3. Sledování změn v peroxidovém čísle oleje izolovaného u obou prostředků (založeném na chmelové i tymiánové silici)

Hypotéza:

Oba přípravky, jak ten založený na chmelové silici, tak i ten založený na tymiánové silici, jsou i za stížených skladovacích podmínek stabilní a jsou tak vhodné pro zavedení do ochranné praxe chmele.

3 Literární rešerše

3.1 Chmel otáčivý (*Humulus Lupulus L.*)

Chmel otáčivý je vytrvalá, popínavá rostlina, která je pěstovaná v monokultuře na témže stanovišti 25 a více let. Chmel je rozšířen v celé Evropě i v ostatních světadílech. Chmel je jako jedna základních surovin pro výrobu piva. Významným způsobem spoluvytváří jeho sensorické vlastnosti a ovlivňuje i další kvalitativní parametry. Z komerčních důvodů se pěstuje v mnoha regionech mírného klimatu celého světa. Největšími chmelovými producenty na světě jsou Německo, Spojené státy americké a Česká republika. I přestože stále stoupá světová produkce piva, tak kvůli narůstajícímu podílu vysokoobsažných odrůd postupně klesá produkce zeleného chmele. Na chmelové výrobky se zpracovává více jak 95% světové produkce chmele (Prugar et al. 2008).

Kosař et al. (2000) uvádějí, že chmele vyšlechtěné v první polovině 20. století v žatecké oblasti se dlouhodobě staly světovým standardem nejvyšší kvality. Jejich hlavní předností bylo stále jemné aroma, které by bylo nějak ovlivňováno nežádoucími tóny či pachy. Od šedesátých let 20. století v důsledku inovací technologií zpracování hlávkového chmele na chmelové výrobky a současnou inovací modernizací pivovarského procesu, význam jemných aromatických odrůd poklesl.

Pěstování chmele v ČR je státně kontrolováno a řízeno. V ČR jsou povoleny tři pěstitelské oblasti: Žatecko a Ústěcko v Čechách a Tršicko u Olomouce na Moravě. Největší plochu zaujímá Žatecká chmelařská oblast, ve které se chmel pěstuje na 3815 hektarech. Ústěcká oblast zaujímá 530 hektarů a oblast Tršická má rozlohu 600 hektarů (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2017).

3.1.1 Systematické zařazení

Chmel není doposud jednoznačně systematicky zařazen v odborné literatuře. Převládá začlenění do čeledě konopovitých (*Canabaceae*), před zařazením do čeledě morušníkovitých (*Moraceae*) nebo kopřivovitých (*Urticaceae*). Na základě kritických názorů různých autorů na druhovou samostatnost chmelů podle genetických znaků se za správné dělení považuje dělení na tři samostatné druhy“

- Chmel otáčivý (*Humulus lupulus L.*) je mnohaletá rostlina, která roste v celém mírném pásu a je více či méně bohatá na lupulin. Podle různých, především morfologických znaků se rozlišují 3 poddruhy: chmel evropský, chmel novomexický a chmel srdčitolistý.

- Chmel japonský (*Humulus japonicus Sieb. et Zucc.*) je jednoletá rostlina rostlina vyskytující se ve volné přírodě ve východní Asii s nízkým obsahem lupulinu a je rovněž pěstovaná jako okrasná rostlina.

- Chmel oplétavý (*Humulus scandes Lour et. Merril*) je jednoletá rostlina, která se vyskytuje ve volné přírodě ve střední Asii, která není vhodná k pivovarskému užití.

Chmel evropský má tři různé variety: Chmel zakrslý (*Humulus lupulus* ssp. *europaeus* var. *irenae minima* Blatt.), Chmel palný (*Humulus lupulus* ssp. *europaeus* var. *spontanea* Ryb.) a kulturní (*Humulus lupulus* ssp. *europaeus* var. *culta* Ryb.). Chmel evropský kulturní je dnes pěstován výhradně v tradičních pěstebních oblastech. Název *Humulus lupulus* vznikl z původního názvu *Lupulus salictarius*, tento název byl používán Římany, což znamenalo vlk mezi vrbami. Chmel a konopí jsou jediné dva rody rostlin patřící do čeledi konopovitých (Basařová et al. 2010).

3.1.2 Morfologie chmele

Hlavní části chmelové rostliny tvoří kořenová soustava, réva s paznochtí, listy a květenství, které se během vegetace vyvíjí ve chmelové hlávky. Pro použití v pivovarství se pěstují pouze samičí rostliny, samčí se využívají pouze při šlechtění odrůd. Kořenová soustava chmele je mohutně vyvinutá. Její základ tvoří zdřevnatělá babka, která má průměrnou životnost 25 let. Hlavní kulové kořeny rostou do hloubky až 6 m, postranní letní kořeny se nacházejí těsně pod povrchem. Réva vyrůstá každý rok z babky a vytrvává jedno vegetační období. Ve výšce asi 50 cm se réva začíná pravotočivě vinout okolo vodícího drátku. Réva má šestihranný průřez na jejích hranách se nacházejí přichytné chlupy. Její růst je intenzivní v letních měsících může narůst až o 30 cm za den a dosahuje výšky 7 až 8 m. Postranní větévky nazývané pazochoy vyrůstají z révy a na nich se vyvíjí květenství, mění se na chmelové hlávky. Listy chmelové révy mají velké plochy a ve stádiu sklizně mohou dosahovat obsahu 7 až 22 m² na jednu rostlinu. Květonosné větévky se samičími květenstvími vyrůstají u paty révových a hlavně pazochových listů přibližně od poloviny června, v době kdy, chmelová rostlina dosáhne zhruba poloviny své výšky. Začátek kvetení chmele nastává po dosažení maximální výšky asi od konce června až počátku července. Doba květu trvá 15 až 30 dnů v závislosti na odrůdě, poté se postupně mění květy v plody, jsou to hlávky typického vejčitého tvaru. Chmelové hlávky jsou tvořeny stopkou, vřeténkem, pravými a krycími listeny. Při oplození což je pro kvalitu chmele používaného v pivovarství nežádoucí, obsahují ještě semeno. Ve speciálních buněčných vakuolách externího systému lupulinových žláz, se nachází bohatý rezervoár výše zmíněných pivovarsky, ale i farmakologicky cenných látek, často nazývaných sekundární metabolity (Basařová et al. 2010).

3.1.3 Chemické složení chmele

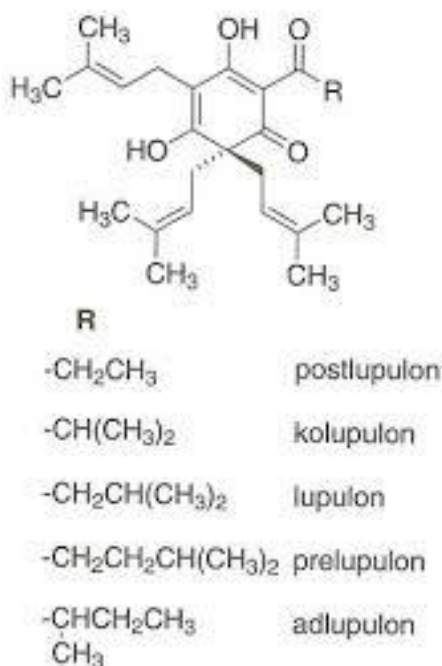
Chemické složení chmele závisí na dané odrůdě, provincienci, ročníku a způsobu posklizňové úpravy (Kosař et al. 2000). Suché chmelové hlávky obsahují technologicky a ekonomicky důležité sloučeniny, balastní látky, ale i nežádoucí složky. Mezi hlavní technologicky významné složky chmele řadíme chmelové pryskyřice, silice a polyfenoly (Basařová et al. 2010). Mezi balastní a nežádoucí látky řadíme dusičnany, rezidua postřikových látek, těžké kovy a u některých chmelových výrobků i rezidua chemických katalyzátorů (Kosař et al. 2000).

3.1.3.1 Chmelové pryskyřice

Chmelové pryskyřice patří k nejdůležitějším složkám chmele (obsah až 30 % hmotnosti) a chmelových výrobků. Pryskyřice jsou tvořeny zejména deriváty floroglucinolu. Základními složkami měkkých pryskyřic jsou měkké chmelové pryskyřice, kam patří specifické alfa hořké kyseliny a beta hořké kyseliny. Dále pak nespecifické měkké pryskyřice a tvrdé pryskyřice (Basařová et al. 2010).

3.1.3.1.1 Alfa hořké kyseliny

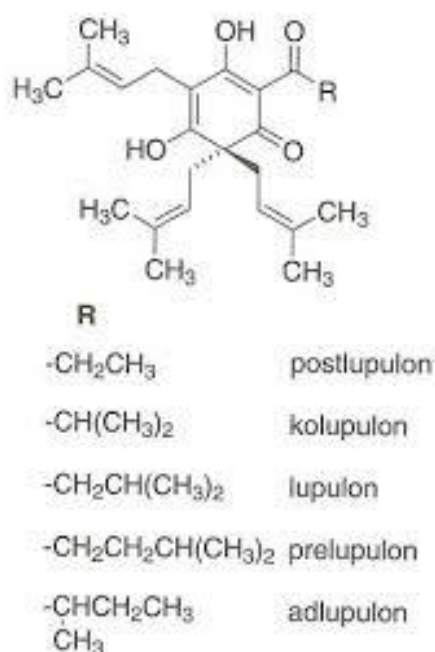
Alfa kyseliny společně s beta kyselinami tvoří specifické složky chmele a z pivovarského hlediska tvoří nejdůležitější složku chmele. Sensoricky jsou alfa kyseliny v čistém stavu bez chuti a vůně. Alfa hořké kyseliny tvoří směs sedmi dosud známými analogy humulonu: humulonu (35 - 70 %), kohumulonu (20 - 55 %), adhumulonu (10 - 15 %), prehumulonu (1 - 10 %) a posthumulonu (1 - 5 %), (viz obr. 2). Zbylé 2 nebyly dosud v publikacích pojmenovány s výjimkou knihy, kde je šestý analog nazván adprehumulon. Rozdíly v analogech jsou v acylových zbytcích (Basařová et al. 2010). Ve chmelu běžně převažují humulon, kohumulon a adhumulon, ve výsledku obsah alfa hořkých kyselin a jejich analogů ve chmelu je značně závislý na řadě faktorů, především na odrůdě, pěstebním místě, ročníku, podmínkách sklizně a skladování (Basařová et al. 2010).



Obr. 1 Alfa hořké kyseliny a jejich analogy (Basařová et al. 2010)

3.1.3.1.2 Beta hořké kyseliny

Beta kyseliny jsou důležitou složkou měkkých pryskyřic. Beta kyseliny mají silnou, antibakteriální aktivitu a tím pádem jsou schopny působit proti řadě mikroorganismů a dalších fyziologických účinků na organismus savců. V pivovarství mají menší význam, protože jsou hůře rozpustné. Menší rozpustnost, je způsobena strukturou beta kyselin. Beta kyseliny neobsahují terciární alkoholovou skupinu v aromatickém jádru a na rozdíl od alfa kyselin se nemohou při chmelovaru izomerovat (Liu et al. 2019). Obsah beta hořkých kyselin vyskytujících se ve chmelu je v množství okolo 3 až 5 %. Beta kyseliny jsou směsí pěti a více analogů nazývaných lupulon (30 - 55 %), kolupulon (20 - 55 %), adlupulon (5 - 10 %), prelupulon (1 - 3 %) a postlupulon (Verzele & De Keukeleire 1991). Obsah a zastoupení jednotlivých sloučenin je závislý stejně jako u alfa hořkých kyselin chmelové odrůdě, stádiu zralosti a pěstebních podmínkách (Basařová et al. 2010).



Obr. 2 Beta hořké kyseliny a jejich analogy (Basařová et al. 2010)

3.1.3.1.3 Vlastnosti, aktivita a stálost alfa a beta hořkých kyselin

Celkové pryskyřice jsou definovány jako látky rozpustné v etheru a metanolu, zatímco tvrdé pryskyřice jsou jednou z částí celkových pryskyřic, které jsou nerozpustné v rozpouštědlech s nízkým bodem varu. (Almaguer et al. 2015). Z obecného hlediska jsou to látky chemicky podobné, nepolárního charakteru, které mají velkou citlivost na oxidační změny, a to zvláště alfa hořké kyseliny, které se snadno mění na nespecifické až tvrdé pryskyřice, které mají menší pivovarskou hodnotu (Basařová et al. 2010).

Hlavním analogem, obsaženým v alfa hořkých kyselinách je humulon a jeho deriváty. Humulon je světle žlutá pevná látka, deriváty jsou vesměs olejovité kapaliny. Alfa hořké kyseliny jsou slabé kyseliny, které se velmi těžce disociují a z tohoto důvodu jsou ve vodě a vodných roztocích obtížně rozpustné v závislosti na pH roztoku. Alfa Hořké kyseliny jsou chemicky nestálé, podléhají snadno izomeraci, oxidaci a transformaci postranních isoprenoidních řetězců (Basařová et al. 2010).

Mezi analogy beta hořkých kyselin převládají lupulon a kolupulon. Jednotlivé analogy se liší se strukturně díky radikálu R, který se nachází na druhém uhlíku aromatického jádra. Beta kyseliny jsou bezbarvé látky krystalické struktury. Ve vodě jsou velmi málo rozpustné, což je způsobeno přítomností hydrofobních postranních řetězců v molekule. Rozpustnost beta kyselin ve vodě je velmi malá, což je dáno přítomností hydrofobních postranních řetězců v molekule. (Krofta & Mikyska 2014). Obdobně jako alfa hořké kyseliny i beta hořké kyseliny silně absorbují UV záření, což je využíváno k jejich analytickému stanovení (Basařová et al. 2010).

Obsah hořkých kyselin je největší ve fázi jeho technologické zralosti. Po sklizení se obsah hořkých kyselin přibližně po 12 dní nemění. Následně se postupně obsah hořkých kyselin snižuje. Proto ihned po sklizni probíhá sušení chmele ve speciálních sušičkách při teplotě okolo +50 °C. Během skladování dochází k přeměnám sekundárních metabolitů a dochází k degradaci hořkých kyselin. Rychlost degradace alfa hořkých kyselin závisí na řadě faktorů, z nichž jsou nejdůležitější doba skladování a podmínky skladování jako je teplota, dostupnost kyslíku a světla. Rychlost degradace alfa hořkých kyselin také závisí na jednotlivých odrůdách chmele. Během skladování dochází k oxidaci alfa hořkých kyselin. Procesy oxidace jsou urychlovány zvýšenou teplotou a neomezeným přístupem ke kyslíku. U totožných chmelů, které byly skladovány při + 20 °C byly poklesy hořkých kyselin mnohonásobně vyšší než u chmelů skladovaných při teplotách + 5 °C. Při skladovací teplotě + 5 °C a době skladování 12 měsíců, dochází ke ztrátám (0 - 10 %) alfa hořkých kyselin. Při skladovací teplotě + 20 °C po dobu 12 měsíců dochází ke ztrátám (21 - 30 %). Jedním z důležitých faktorů obsahu alfa hořkých kyselin je i doba sklizně chmele. U sklizně, která byla provedena, ve fázi neúplně technologické zralosti, byla zaznamenána vyšší degradace alfa i beta hořkých kyselin při skladování. Rychlost degradace při skladování není rovnoměrná po celou dobu skladování. Fáze stabilizace trvala 3 až 6 měsíců po níž následoval poměrně rychlý pokles těchto metabolitů. Při vyšších teplotách skladování byla ovšem tato fáze kratší a trvala maximálně 3 měsíce (Skomra & Koziara-Ciupa 2020).

Degradace beta hořkých kyselin závisí podobně jako u alfa hořkých kyselin na teplotě skladování a odrůdě, přičemž degradace beta hořkých kyselin probíhá ve větší míře, než je tomu o alfa hořkých kyselin. Beta hořké kyseliny jsou citlivé k oxidačním reakcím, které jsou vyvolány vzduchem (Krofta et al. 2013a). Již po 1 měsíci se přibližně polovina množství se rozkládá při pokojové teplotě na otevřeném vzduchu. Po 6 měsících je rychlost degradace více než 90 %. Dynamika rozkladu beta kyselin v surovém chmelu je výrazně pomalejší, zejména v průběhu prvních 6 měsíců skladování. Buněčné biomembrány jsou účinnými chrániči sloučenin obsažených v lupulinových žlázách před rychlým poškozením. Podstatný podíl produktů rozkladu beta kyselin tvoří sloučeniny vznikající při cyklizaci bočních prenylových řetězců

(tricyklolupulony a hydroxytricyklolupulony). V čerstvém chmelu po sklizni je obsah huluponů do 0,5 %, ale v průběhu stárnutí se jejich obsah stoupá až k 1 až 3 %. (Krofta et al. 2013b).

3.1.3.2 Chmelové silice

Obsah silic ve chmelu je 0,5 až 3,0 %. Silice jsou směsí několika set látek různého chemického složení, fyzikálních vlastností i aroma, které doposud nebyly zcela identifikovány (Basařová et al. 2010). Analýza pomocí kapilární plynové chromatografie ve spojení s plamenovým ionizačním detektorem zaznamenala až 1000 různých sloučenin, které mohou chmelové silice obsahovat (Almaguer et al. 2014). Celkové množství látek a zastoupení jednotlivých složek, závisí především na genetických vlastnostech odrůdy, na podmínkách pěstování, sklizně a skladování (Basařová et al. 2010). Silice chmelu dodávají jeho charakteristické aroma, aroma značně ovlivňuje daná odrůda chmele. (Almaguer et al. 2014). Tvorba silic probíhá v konečných fázích zrání rostliny (Basařová et al. 2010). Během růstu se nejdříve se nejdříve syntetizují kyslíkaté frakce, následované uhlovodíkovou frakci v podobě seskviterpenů a jako poslední dozrávají monoterpeny (myrcen). Z tohoto hlediska může být koncentrace myrcenu použita jako měřítko zralosti chmele. Na složení a obsah silic mohou mít negativní vliv houbové choroby chmele, napadení škůdci jako jsou např. Mšice chmelová (*Phorodon humuli*) či Sviluška chmelová (*Tetranychus urticae* Koch), díky kterým se rostlina stává stresovanou (Eyes & Dufour 2009).

3.1.3.2.1 Složení chmelových silic

Chmelové silice se dají rozdělit do tří základních skupin:

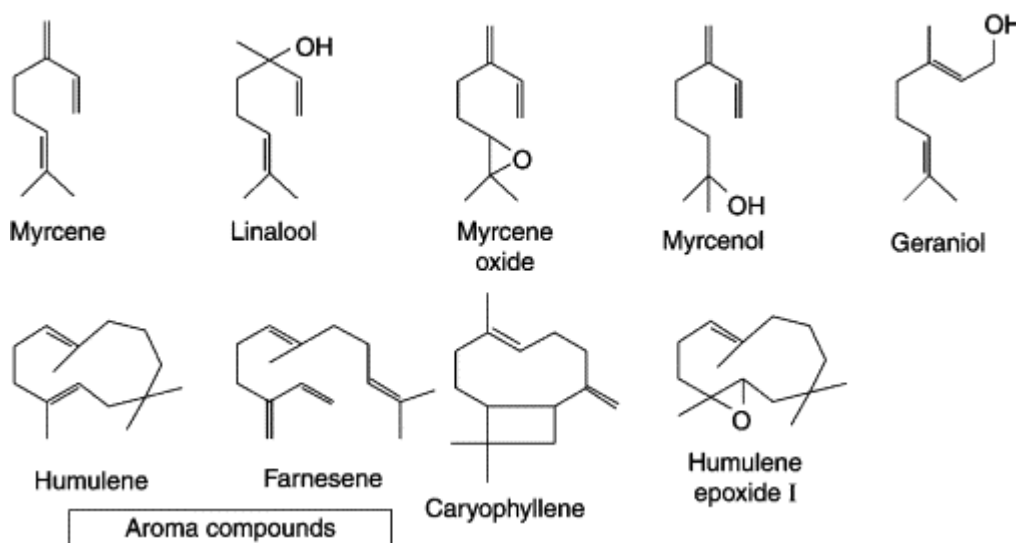
- uhlovodíková frakce
- kyslíkatá frakce (oxidovaná frakce)
- frakce sirných sloučenin

Uhlovodíková frakce tvoří v čerstvém chmelu největší podíl 70-80 %. Osahuje alifatické uhlovodíky (pentan, oktan, isopren, undekan až heptadekan a některé větvené izomery), dále monoterpeny jako myrcen, alfa a beta-pinen, beta ocimen, limonen a seskviterpeny, kam se řadí beta farnesen, alfa humulen, beta karyofylen a řada dalších acyklických mono-, di- a tricyklických seskviterpenů, které bývají zastoupeny jen v nepatrném až stopovém množství. Vzájemný poměr monoterpenů a seskviterpenů je dán genetickou vlastností jednotlivých klonů chmele (Basařová et al. 2010).

Kyslíkaté frakce, je to frakce vznikající během zrání, zpracování a skladování chmele a tvoří přibližně 30 % z celkových silic. Je složitou směsí terpenových, seskviterpenových, alifatických a aromatických alkoholů, různých aldehydů, ketonů, epoxidů, kyselin a esterů. Složení kyslíkaté frakce silic je ovlivňována hlavně posklizňovým způsobem úpravy a podmínkami skladování, kdy jejich obsah ve chmelu stoupá. V průběhu skladování se ve chmelu zvyšuje obsah alkoholů (humulol, humulenol, farnesol) a epoxidů (epoxid karyofyllenu

a a humulenepoxydy), které vznikají především oxidačními přeměnami seskviterpenů (Basařová et al. 2010).

Frakce sirných sloučenin jsou v chmelových silicích obsažené v malém množství, okolo 0,1 %. Negativně se projevují jako chuťové a vonné látky již v malých koncentracích. Zvýšené množství sirných sloučenin se vyskytuje především u chmele, který byl během vegetace ošetřen sirnými preparáty proti houbovým chorobám, popř. u chmelů konzervovaných sířením v posklizňových úpravách. Nejčastěji se vyskytující se sloučeniny sirné sloučeniny ve chmelu jsou např. sulfan, methanthiol, dimethylsulfid (Basařová et al. 2010).



Obr 3. Základní sloučeniny tvořící chmelové silice (Bocquet et al. 2018)

3.1.3.2.2 Stálost chmelových silic

Míra degradace chmelových silic závisí na několika chemických faktorech, které ovlivňují jak oxidaci, tak i průběh její reakce. Na degradaci mají z velké části vliv vnější faktory jako je teplota, světlo a dostupnost kyslíku. Stabilitu může také ovlivňovat složení silic, strukturní složení a přítomnost nečistot. Ultrafialové (UV) a viditelné světlo (VIS) je spojováno s urychlením procesů oxidace, které vede k tvorbě alkylových radikálů (Turek & Stintzing 2013). Míru degradace silic rovněž ovlivňuje posklizňové zpracování, skladování a přeprava. Stupeň degradace během skladování závisí na poškození lupulinových žláz během sklizně, lisování a sušení a velký vliv má následná skladovací teplota. Větší skladovací obaly a vyšší hustota nalisovaného chmelu zvyšuje míru poškození lupulinových žláz. Při sušení se doporučuje aby nebyly překračovány teploty 60 °C. K největším ztrátám silic může dojít během skladování. Během 6 měsíců může dojít až ke ztrátě 50 % - 70 % silic, zejména kvůli ztrátě myrcenu. Z tohoto důvodu by měl být chmel skladován při teplotách (0 - 5 °C). Negativní působení na silice má i peletizace, při které je chmel vytaven teplotám až 65 °C jako důsledek tření peletovací matrice, což způsobuje, že se silice, které se uvolní z rozdrcených lupulinových žláz, jsou náchylné k rychlé oxidaci. Z tohoto důvodu by měla být maximální granulační teplota 55 °C s následným okamžitým ochlazením a vakuovým balením v inertní atmosféře (CO₂ či

N₂). Chmelové extrakty jsou podstatně stabilnější než pelety či celý hlávkový chmel a i z tohoto důvodu mohou být skladovány při vyšších teplotách až 20 °C (Eyres & Dufour 2009).

3.1.3.2.3 Způsoby a kritéria hodnocení chmelových silic

První charakteristickou vlastností chmelové odrůdy je procentuální výtěžek silice ze sušených chmelových hlávek. Toto měření se nejčastěji provádí pomocí měření objemu oleje získaného parní destilací sušených chmelových hlávek vyjádřené v ml/g. Běžná analýza ke stanovení složení chmelového éterického oleje se provádí plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem nebo hmotnostní spektrometrií. Silice se obvykle před analýzou izolují. Rovněž se ke stanovení používá i metoda headspace. Tuto metodu lze dosáhnout statickým či dynamickým vzorkováním a těkavé látky lze koncentrovat zachycením na adsorbenty. Vhodnou, rychlou a populární technikou je mikroextrakce na pevné fázi. Běžným kritériem používaným k charakterizaci odrůdy chmele je poměr humulen:karyofylen. I když tyto poměry mohou být užitečnými markery nelze je však použít k předpovědi či vysvětlení aromatu mezi jednotlivými odrůdami. Za tímto účelem byl vytvořen seznam jednotlivých sloučenin, který byl pojmenován jako „profilová složka chmelového aroma“ (HACP). Sloučeniny byly rozděleny do tří kategorií: produkty oxidace humulenu a karyofylenu, květinové a citrusové aroma a citruso-borovicové aroma. Aromatické jednotky AU byly definovány jako kvantitativní součet 22 sloučenin HACP na gram chmele. HACP se běžně používá pro charakterizaci silic různých odrůd chmele (Eyres & Dufour 2009).

3.1.3.3 Chmelové polyfenoly

Polyfenolové látky jsou zkoumány již několik let s kontroverzními poznatky. Jedná se o velmi různorodou skupinu látek, jejíž jednotlivé skupiny látek se vyznačují různými vlastnostmi z hlediska chemické struktury, antioxidačních schopností. Patří mezi látky sekundárního metabolismu rostliny, jsou senzory aktivní a mají oxidační a antimikrobiální vlastnosti. Tvoří 3 až 6 % sušiny chmelových hlávek. Hlavní část polyfenolů je situována v listech a vřetenu chmelové hlávky. Jsou vylučovány z lupulinových žláz společně s hořkými kyselinami a silicemi (Mikyska et al. 2018). Jedná se především o směs látek s převažujícím podílem flavonových glykosidů, anthokyanogenů, katechinů a volných fenolových kyselin. Jsou to vesměs reaktivní, ve vodných roztocích rozpustné látky, snadno podléhající oxidačně – redukčním přeměnám a vykazující vysokou reaktivitu vůči bílkovinám (Kosař et al. 2000)

Chmel obsahuje 2 – 6 % polyfenolů (Prugar et al. 2008). Nejvyšší obsah celkových polyfenolů vykazují zpravidla jemné aromatické odrůdy, zejména žatecký poloraný červeňák, u něhož se obsah pohybuje v rozsahu 3,5 – 4,5 % (Kosař et al. 2000).

Kromě polyfenolových sloučenin, které jsou odvozeny od flavonu, obsahuje chmel i volné fenolové kyseliny odvozené od hydroxibenzoové kyseliny. Patří k nim kyseliny: kávová, ferulová, kumarová, skořicová, vanilová, chlorogenová a gentisová (Kosař et al. 2000).

3.1.3.3.1 Prenylované flavonoidy

Jsou to látky s estrogením účinkem, který byl popsán již v roce 1961. Patří mezi látky, které tvoří přechod mezi chmelovými pryskyřicemi a polyfenoly. Jejich zastoupení ve chmelu tvoří od desetin procenta až po několik % hmotnosti. Stárnutím chmele jejich procento klesá. Hlavní podíl z celkového množství prenylovaných flavonoidů tvoří z 80 až 90 % xanthohumol. Zbýlých 10 až 20 % tvoří desmethylxanthohumol dehydrocykloxanthumolhydrát a ostatní prenylované flavonoidy. U prenylflavonoidů byly prokázány antioxidační, protizánětlivé a protirakovinotvorné účinky. Fytoestrogeny v přiměřené dávce pomáhají při potížích v průběhu klimakteria, při depresích, bolestech hlavy (Basařová et al. 2010).

3.1.4 Houbové onemocnění chmele

3.1.4.1 Peronospora chmelová (*Pseudoperonospora humuli*)

Peronospora chmelová představuje biotrofní patogen, který se vyskytuje pouze na chmelu. Napadá všechny jeho rostlinné orgány. Radíme ho do třídy *Oomycetes*, řádu *Peronosporales*, čeledi *Peronosporaceae*. Její výskyt byl v Evropě poprvé zaznamenán v roce 1920 a v průběhu několika let se její výskyt rozšířil po celém kontinentu. V současnosti je považována za nejnebezpečnější chorobu chmele.

Výskyt a šíření peronospory úzce souvisí s průběhem počasí, a to zejména s teplotou, relativní vlhkostí vzduchu a srážkami. Teplota je hlavním faktorem při infekci hostitelské rostliny a ovlivňuje délku i průběh inkubační doby. Infekce peronosporou se může uskutečnit při teplotách 1 – 29 °C, ale i při teplotách 1 – 3 °C dochází k vegetativnímu růstu mycelia houby. Nejkratší inkubační doba peronospory je 3 dny, a to při teplotách 21 – 25 °C. S klesající, či zvyšující se teplotou se délka inkubační doby prodlužuje. Při 5 °C je inkubační doba 23 dnů a při 29 °C trvá 11 dnů. Teplota, při které se zoospory ze zoosporangií uvolňují optimálně je 19 – 25 °C.

Relativní vlhkost vzduchu z velké míry ovlivňuje tvorbu plodonošů a zoosporangií peronospory. Vlhkost nad 90 % má nejpříznivější vliv, avšak i při 40 % vlhkosti a optimální teplotě se mohou zoosporangia ojedinele vytvořit. Relativní vlhkost vzduchu během sporulace ovlivňuje i průběh uvolňování zoospor ve vodní suspenzi. Největší množství zoosporangií (96 %) schopných uvolnit zoospory vzniká při vlhkosti nad 90 %. Počet zoosporangií, které jsou schopny uvolnit zoospory, klesá s klesající vlhkostí. Při 60 % vlhkosti se tvoří již jen ojedinele skupiny plodonošů se zoosporangií, ze kterých pouze třetina je schopna uvolnit zoospory.

Vedle samotného množství srážek se uplatňuje i jejich frekvence, tj. počet srážkových dnů za určité období. Vyšší počet srážkových dnů během celého vegetačního období, má vliv na výskyt peronospory. Denní srážky ve výši 15 mm a více za jeden den, zejména v květnu a červenci přispívají k šíření peronospory. Dlouhodobé sledování počasí ukazuje, že v letech

s nižším množstvím srážek, vyšší průměrnou teplotou a nižší relativní vlhkostí je výskyt peronospor nižší. Naproti v letech s vyšším množstvím srážek, vyšší relativní vlhkostí a nižší teplotou je výskyt peronospor častější (Vostřel 2008).

3.1.4.1.1 Škodlivost a bionomie peronospory chmelové

Peronospora byla v ČR poprvé zjištěna v roce 1925. Způsobuje u chmele poměrně velké ztráty na jakosti a množství chmele. Parazituje zejména chmelu, u něhož může napadnout všechny podzemní i nadzemní orgány. Zimní výtrusy se tvoří v napadených pletivech v létě a na podzim. Do půdy se dostávají s rostlinnými zbytky, ze kterých se během podzimu a v zimě při rozkladu organické hmoty uvolňují. Ve výhonech napadených peronosporou se peronospora rozrůstá a její podhoubí vniká do listů. Potom co peronospora pronikne do rostliny se jednotlivá vlákna (hyfy) rozrůstají a vytvářejí mycelium. První příznaky napadení peronosporou se tedy v některých letech, zejména když je vlhčí jaro, mohou objevit již na mladých výhonech chmele. Jejich listy pak dostávají žlutozelenou barvu a nemocné listy jsou zakrslé, zkrácením jejich internodií dochází k nahloučení listů. Vzhledem připomínají klas, proto jim říkáme „klasovité výhony chmele“. Typický je hustý šedofialový povlak složený z plodonošů a letních výtrusnic na spodní straně listů klasovitých výhonů. Klasovité výhony se tvoří na jaře po infekci zimními výtrusy a jsou hlavním zdrojem pro další šíření peronospor na listech. Tvorba v létě je výjimečná.

V období vegetace se peronospora šíří hlavně letními výtrusy (zoosporangiemi), které vznikají nepohlavní cestou na spodní straně listů. K šíření infekce je zapotřebí kromě zralých výtrusnic také přítomnost vody na listech a vhodné teploty. Vhodné podmínky k šíření infekce jsou zejména v noci a ráno. Během vegetace dochází k infekci nejen listů, ale i květů a hlávek chmele.

Rozmnožování probíhá pohlavním i nepohlavním způsobem, což peronospoře umožňuje přetrvat nepříznivé podmínky prostředí, a naopak umožňuje velmi rychlé šíření za optimálních podmínek (Vostřel 2008).



Obr.5 Rostlina zasažená *Peronosporou* (Krofta et al. 2012)

3.1.4.2 Padlí chmelové (*Sphaerotheca humuli*)

Výskyt padlí narozdíl od peronospory je nepravidelný. V našich zeměpisných podmínkách se jedná o fakultativního patogena gradačního charakteru, což dokládá i jeho škodlivý výskyt na některých chmelnicích na přelomu tisíciletí. Poslední záznamy o výskytu padlí na Žatecku jsou z poloviny sedmdesátých let. Poslední hospodářsky významný výskyt tohoto patogena byl na českých a moravských chmelnicích zaznamenán v letech 1997 – 1999. Aktuálně je jeho výskyt v ČR omezen pouze na některé lokality, ale ani zde není pravidlem, že by se vyskytoval každoročně (Krofta et al. 2012).

3.1.4.2.1 Škodlivost a bionomie padlí chmelového

První příznaky napadení na mladých listech, zejména na chmelových rostlinách pěstovaných ve sklenicích, se projevují formou puchýřků, na kterých se později objevuje sporulující mycelium. Puchýřky jsou důsledkem hypertrofie buněk v okolí infekčního místa. Při optimálních podmínkách pro vývoj patogena může mycelium pokrývat prakticky celý list. Protože je jeho růst omezen okolními pletivy, jsou přinuceny vytvořit vychlípeniny směrem nahoru. Puchýřky nejsou tak dobře viditelné na tužších listech, které se na chmelových rostlinách vytvářejí v polních podmínkách či na starších listech v době vzniku infekce.

Negativní vliv choroby na hlávky závisí do značné míry na jejich vývojovém stádiu. Další růst je zde kvůli infekci téměř zastaven. Je-li květ (osýpka) či velmi mladé hlávky napadeny, zůstávají nadále ve formě ztvrdlých bílých paliček. Různá deformace hlávek může

probíhat při pozdějším napadení. Neobsahuje-li chmelová hlávka jádérka, zůstává po napadení ve stádiu osýpky mnohem déle než chmel, který je opylený, a to je v tomto případě stádium, ve kterém může infekce padlím způsobit největší škodu. V raných stádiích infekce se puchýřky mohou jevit jako bílé díky bohatým řetězcům konidií, které se vytvářejí díky povrchovému myceliu. V pozdější části vegetace, tj. od července do sklizně, většinou dochází k tvorbě plodnic. K tvorbě plodnic může docházet na listech, ale jejich výskyt se je běžnější na chmelových hlávkách, u kterých je chemická ochrana ke konci sezony mnohem problematičtější. Hlávky, na kterých se plodnice vytvářejí ve velké míře, získávají rezavě červenou barvu a toto stádium choroby se nazývají „bílá plísně“ v konidiovém stádiu. Bílý povlak, který se vyvíjí na listech, se obvykle odstraňuje pomocí chemického ošetření, takže nemusí mít následný negativní vliv na výnos chmele. Nejzávažnější je infekce hlávek, která je hlavní příčinou výnosových ztrát. Hlávky, které jsou napadeny v raném vývojovém stádiu se vůbec dále nevyvíjejí. Hlávky, které jsou napadeny v pozdějším vývojovém stádiu se do určité míry vyvíjejí v závislosti na intenzitě infekce. Následkem napadení je pak určité snížení výnosů, a především pak kvalitativní ztráty. Tyto ztráty se projevují jednak vizuálně a jednak nepříjemným po plísniích zapáchajícím aroma.

Padlí chmelové přezimuje obvykle ve stádiu plodnic, které jsou produkovány v pozdější části vegetačního období. Při dozrávání obsahují plodnice osm askospór, které jsou uvolňovány na jaře, kdy dochází k reinfekci chmelových listů. K uvolňování askospór z plodniček dochází pouze za přítomnosti vlhkosti. Potencionálním nebezpečím pro šíření infekce jsou pupeny, které se nacházejí přímo na povrchu půdy nebo těsně nad ním. Tyto pupeny mohou být odstraněny řezem během kultivace. Pokud není řez proveden, zůstávají pupeny zdrojem infekce, který způsobuje napadení rašících výhonů.

Jakmile dojde k primární infekci, tak se choroba šíří pomocí konidií. Zatímco aby askospory vyklíčily, tak potřebují vodu, konidie mohou vytvářet klíčící spory, které se mohou vyvíjet i na suchých listech při různých vzdušných vlhkostech. Při rychlém růstu chmelových rostlin je rychlejší i přenos patogena na těchto rostlinách. Ten se zrychluje v době tvorby paznochtů a pokračuje i později při tvorbě květů a hlávek. Starší listy jsou k infekci odolnější. Šíření sekundární infekce je podpořeno příznivými podmínkami pro rozvoj patogena. Mezi tyto podmínky patří nízká sluneční intenzita, vysoká půdní vlhkost a nadměrné hnojení dusíkem. Negativně na vývoj patogena působí déle trvající ovlhčení listů, intenzivní sluneční záření a nižší půdní vlhkost. Větrou přenášená antidepresiva, která jsou produkována asexuálně jsou primárním zdrojem infekce. Infekce je možná v rozsahu teplot 18 – 28 °C, přičemž optimální rozsah je 18 – 21 °C (Krofta et al. 2012).



Obr.6 Poškozené chmelové hlávky infikované sekundární konidiovou infekcí padlí chmelového (Krofta et al. 2012)

3.1.4.3 *Verticilium* (*Verticillium albo-atrum*)

Rod *Verticilium* je částečně saprofytický, převážně pak parazitický rod. Způsobuje tzv. hydromykózy, které ucpávají vodivé dráhy dřevní cévních svazků vedoucích vodu a rozpuštěné minerální soli. Hydromykózy na kořenech chmele způsobují hnilobu kořenů, což způsobuje hnědnutí a odumírání kořenů. V důsledku napadení dochází k nekróze cévních svazků, na révě postupně odspodu vadnou a žloutnou listy. Chlorofyl v listech je zachován pouze u listové žilnatině. V některých případech může houba vytvářet sklerociové útvary, které znamenají, že je houba v odpočinkovém stádiu. V ČR byl v roce 2017 zaznamenán vůbec první výskyt tohoto patogena, a to na odrůdě Kazbek a Sládek v produkční chmelnici v okrese Přerov. Jelikož je *Verticilium* karanténní choroba, je proto důležité zamezit přenosu infikovaných rostlinných zbytků na jiné pozemky. Napadené rostliny se doporučuje likvidovat. Při napadení patogenem se doporučuje dbát na to, aby se patogen ve chmelnicích nepřenášel pomocí zemědělské techniky a pracovníků. Z tohoto důvodu je nutno zajistit dezinfekci pracovní techniky a pracovních pomůcek. Jedno z mnoha opatření, které můžeme provést je omezení aplikace dusíkatých hnojiv.

K ochraně proti tracheóznímu onemocnění je možné využít biologických preparátů založených na antagonistických mikroorganismech založených na *Bacillus subtilis*, *Pythium oligarchum* nebo *Trichoderma harzianum*. *Bacillus subtilis* funguje na bázi antibiotických účinků. *Pythium oligarchum* a *Trichoderma harzianum* fungují na bázi kompetice s *Verticillium*. Biopreparáty, které obsahují zmíněné mikroorganismy lze použít i jako prevenci před onemocněním (Holý et al. 2017).



Obr.7 Rostliny napadené *Verticillium* (Holý et al. 2017).

3.1.4.4 Bazální korová nekróza chmele - Fusarióza (*Fusarium sambucinum*; teleomorfa *Giberella pulicaris*)

Výskyt této choroby je zejména na těžších zamokřených půdách, obvykle ve vlhčích letech. Nejčastěji bývá fusariózou napadeno mladé dřevo, ve kterém vlákna houby prorůstají cévními svazky, které ucpávají. Z napadené babky raší jen malý počet výhonů, které mají špatně vyvinuté listy, nejsou schopné vnutí a postupně zasychají. Révy lze snadno vytrhnout, mladé dřevo je naduřené a u babky zaškrcené. Při silném napadení vůbec nenaraší očka. Choroba má za následek zejména odumírání babek a tím snižování počtů jedinců na hektar. Ochrana proti fusarióze je nepřímá. Snížení možnosti napadení fusáriem je dodržení vyrovnaného hnojení, čistota chmelnice (podzimní úklid) a při výskytu ve vlhkých letech chmel nepřiorávat. Při zakládání chmelnice je dbát na optimální vodní režim chmelnice (Holý et al. 2017).

3.2 Konvenční přípravky

Má-li být ošetření fungicidy úspěšné, musí předcházet infekci (preventivní ošetření). Vzhledem k vyšší citlivosti hybridních odrůd v jarním období k houbovým onemocněním jsou správně načasované a kvalitně provedené aplikace základem úspěšného boje proti této chorobě. Pro ochranu proti houbovým onemocněním používáme jen doporučené a registrované fungicidy (Vostřel 2008).

3.2.1 Konvenční přípravky na bázi mědi

Již v roce 1882 bylo zaznamenáno používání přípravků na bázi mědi, a to proti plísni vinné révy (*Plasmopara viticola*). Používala se Bordeauxská jícha, která obsahovala síran měďnatý (Martinez et al. 2012).

Měďnaté fungicidy představují důležitý regulační faktor, proti výskytu houbových onemocnění chmele. Přestože patří k nejdéle známým fungicidům, dodnes mají ochraně rostlin proti houbovým chorobám svůj význam. Vzhledem ke kontaktnímu působení se používají k preventivním zásahům. Mechanismus účinků se objasňuje vlivem elementární mědi na buněčnou plazmu. Komplexní sloučeniny mědi rozpustné ve vodě ireverzibilně mění bílkovinu protoplazmy patogena, která není schopna vykonávat fyziologické funkce (Krofta et al. 2011). Měďnaté sloučeniny mají schopnost srážet proteiny, což způsobuje koagulaci cytoplazmy, která přestává plnit svou fyziologickou funkci. Měď reaguje s thiolovými skupinami kyselin a dalších sloučenin v buňkách některých hub, což působí nepříznivě na růst některých patogenních kmenů (Gharieb et al. 2004).

Díky tomu, že houbová onemocnění přezimují ve formě silnostěnných zimních spor (oospor). Tato skutečnost má vliv i na intenzitu tzv. primární infekce, která se může na jaře vyskytnout. Z tohoto důvodu je nezbytné v tomto období provést, alespoň preventivní ošetření systémovým fungicidem.

Mezi nejčastěji používané přípravky na bázi mědi patří Ortiva, Ridomil Gold plus 42,5 WP a Aliette Bordeaux, tyto fungicidy považujeme za systémové. V době tvorby fruktifikačních orgánů se používá zejména Cuprocaffaro, Cuproxat SC, Curenox 50, Funguran-OH 50 WP, Champion 50 WP, Kocide 2000, Kuprikol 50, Kuprikol 250 SC. Vždy však musíme vycházet z přípravků uvedených v Seznamu registrovaných přípravků a evidovaných prostředků na ochranu rostlin platném v daném roce (Vostřel 2008).

Účinné látky, které se nacházejí v ochranných přípravcích mohou negativně působit na kvalitativní vlastnosti chmele. Konkrétně měď nepříznivě působí na thioly, 4-merkapt-4-methylpentan-2-on (4MMP), 3-merkptohexan-1-ol (3MH) a 3-merkptohexyl acetát (3MHA), které se podílejí na charakteru chmelového aroma. 4MMP je typický pro chmely pěstované ve Spojených státech, Austrálii a Novém Zélandu, ve chmelech pěstovaných v Evropě se nachází v malé míře. Naproti tomu 3 MH byl detekován ve všech chmelech. Bylo zjištěno, že po použití

směsi Bordeaux na bázi síranu měďnatého byl ovlivněn obsah 4MMP což ovlivnilo vlastnosti chmelového aroma. 4MMP mají sklon vázat se na ionty mědi nebo s nimi dokonce vytvářet komplexy. Vliv na obsah 4MMP, má kromě množství mědi aplikovaného na rostlinu v přípravcích, také obsah měďnatých iontů v půdě (Morimoto et al. 2010). Dle (Krofta et al. 2011) nelze podceňovat obsah mědi na listech, ze kterých se měď dostává do sklizeného chmele ve formě biologických příměsí. Tato skutečnost může být za určitých okolností významná, uvažujeme-li, že převážná část sklizeného chmele obsahuje až 3 % biologických příměsí. Obsah mědi vyskytující se na listech, při stejné aplikační dávce, oproti hlávkám je 2 – 5krát vyšší, což je dáno vysokou hodnotou poměru plochy ku hmotnosti. Obsah mědi v samotných hlávkách má klesající trend, který je dán především postupným zvětšováním jejich velikosti během zrání. Nezvykle vysoké obsahy mědi mohou zapříčiněny např. nedodržáním technologických postupů, nedokonalou homogenizací práškovitých přípravků (Krofta et al. 2011).

3.2.2 Konvenční přípravky na bázi fosforu

Účinnou látkou ve fungicidech na bázi fosforu je tris-O-ethyl fosfonát (fosetyl-Al). Fosetyl-Al je důležitým od počátku 80. let, zejména po necitlivosti tophenylamidových fungicidů. Fosfonát působí fungicidně především proti chorobám způsobených oomycety a v menší míře proti určitým onemocněním způsobeným pravými houbami a bakteriemi. Působení fosfonátu je jedinečné v tom, že se jeho molekula v rostlinách pohybuje akropetálně i bazipetálně, což umožňuje aplikaci na list nebo těla rostliny a potlačení onemocnění v nadzemních i podzemních tkáních. Fosfonát v rostlinách setrvává poměrně dlouhou dobu, přičemž hladiny reziduí se liší, dle metody aplikace, načasování aplikace postřiku a poklesu v pletivech. Zbytky fosfonátu jsou detekovatelné v tkáních týdny až měsíce po aplikaci na list a půdu. S postupem času dochází ke snižování obsahu fosfonátu.

Způsob účinku fosfonátu zahrnuje přímou fungicidní aktivitu na růst mycelia a tvorbu spór oomycetách, přičemž úroveň aktivity je úměrná koncentraci fosfonátového iontu ve tkáni. Rovněž jsou hlášeny potencionální nepřímé účinky fosfonátu na onemocnění v důsledku stimulace obranných odpovědí hostitele. U fosfonátu byla zjištěna pouze mírné riziko rozvoje rezistence. Přímá fungicidní aktivita fosfonátu se zdá být důležitá pro vývoj rezistence u oomycet, o čemž svědčí schopnost selektovat rezistentní mutanty v kultuře, korespondence in vitro a in vivo aktivity a metabolické změny detekovatelné v patogenu při absenci hostitele. Fosetyl-Al vykazuje určitou úroveň postinfekční aktivity proti peronospoře chmelové po dobu 3 dnů v listech, ale až 8 dní ostatních částech rostliny (výhonky, odnože).

Existuje limit pro dávku fosfonátu, který lze aplikovat na chmel a jiné plodiny, aniž by došlo k fytotoxicitě. Poranění rostlin fosfonáty je hlášeno u mnoha druhů rostlin. Citlivost na fosfonát se liší dle druhu rostlin, ale obecně to koreluje s aplikovanou dávkou a koncentracemi fosfonátu. Fytotoxicita může také nastat při míchání s určitými pesticidy, adjuvanty a hnojivy. Ačkoliv nebyla pozorována fytotoxicita, byla pozorována nekróza listů na některých rostlinách ošetřených 6-ti násobnou rychlostí ve skleníkových podmínkách. Bylo zjištěno, že opakované použití vysokých dávek fosfonátu může vést k chloróze mladých listů chmele a zpomalení růstu rostlin u některých kultivarů (Gent et al. 2020).

Přípravky na bázi fosetylu se používají zejména na jaře, kdy za příznivých podmínek hrozí uvolňování oospor z rozkládajících se posklizňových zbytků pletiv a chladného počasí v zimním období. Pro tento účel používáme přípravek Aliette 80 WP při teplotách vyšších než 20 °C a nemícháme jej s jinými přípravky, stimulatory růstu, či listovými hnojivy (Vostřel 2008).

| Název přípravku (účinná látka) | Koncentr. přípravku, dávka (kg, l/ha) | Toxicita člověk | Toxicita včely | Omezení | Ochranná lhůta - dny | Pozn. |
|---|--|-----------------|----------------|---------|----------------------|-------|
| Aliette 80 WP (fosetyl-Al) | 0,3% | - | PR | - | 14 | 1 |
| Aliette Bordeaux (fosetyl-Al + oxychlorid Cu) | 0,4 – 0,5 % | - | PR | - | 14 | 4 |
| Curzate K (cymoxanil + oxychlorid-Cu) | 0,25 – 0,3 % | Xi | PR | - | 7 | - |
| Cuprocaffaro (oxychlorid-Cu) | 0,5 – 0,75 % | - | Š | - | 7 | - |
| Cuproxat SC (zásad. síran Cu) | 0,5 – 0,75% | - | PR | - | 7 | - |
| Curenox 50 (oxychlorid-Cu) | 0,5 – 0,75 % | Xn | - | - | 7 | - |
| Funguran-OH 50 WP (hydroxid Cu) | 0,5 – 0,75 % | Xn | - | - | 7 | - |
| Champion 50 WP (hydroxid Cu) | 0,5 – 0,75 % | Xn | PR | - | 7 | 3 |
| Kocide 2000 (hydroxid Cu) | 0,42 – 0,56 % | Xn | - | - | 7 | 3 |
| Kuprikol 50 (oxychlorid-Cu) | 0,5 – 0,75 % | Xn, Xi | Š | - | 7 | - |
| Kuprikol 250 SC (oxychlorid Cu) | 0,8 – 1,2 % | - | - | - | 7 | |
| Ortiva (azoxystrobin) | 0,75 – 1,6 l/ha | - | PR | - | 28 | 5,6,7 |
| Ridomil Gold Combi Pepite (folpet + metalaxyl M) | 0,2 % | Xn | N | - | 14 | 8 |
| Ridomil Gold plus 42,5 WP (metalaxyl M+oxychlorid Cu) | 0,35 – 0,4 % | Xn | PR | - | 14 | 2 |

Obr.7 Seznam povolených fungicidů pro ochranu chmele proti peronospoře chmelové (*Pseudoperonospora humuli* Miy and Tak., Wils.) v ČR

3.3 Alternativní fungicidní přípravky na bázi přírodních látek

Konvenčně používané přípravky mohou mít negativní dopad na životní prostředí. Přípravky založené na bázi mědi mohou negativně působit na půdní mikroorganismy, zejména pak na kroužkovce (Procházka et al. 2021). Používání konvenčních přípravků má rovněž negativní vliv na kvalitativní parametry piva. Mědnaté ionty obsažené ve chmelu mohou zhoršovat organoleptické vlastnosti piva či v pivu způsobovat silně dekontaminační proces (Krofta et al. 2011). Z tohoto důvodu je současný trend zaměřen na vývoj alternativních přípravků, které by měly menší zátěž na životní prostředí a kvalitu chmelových výrobků (Procházka et al. 2021).

Alternativní fungicidní přípravky jsou povětšinou založeny na silicích, ale mohou být i na bázi proteinů (Wetcit). Silice jsou těkavé přírodní sloučeniny, charakterizované silným aromatem, které jsou tvořeny rostlinami jako sekundární metabolity. Jsou známy svými antiseptickými, baktericidními, virucidními a fungicidními vlastnostmi. V přírodě hrají silice důležitou roli v samotné ochraně rostlin jako antibakteriální látky, antivirotika, fungicidy a insekticidy. Díky svým vlastnostem se často vyskytují jako alternativní produkty vedle syntetických chemických produktů, např. ve farmacii či zemědělství. Silice jsou složité sloučeniny, které obsahují přibližně 20-60 složek ve zcela odlišných koncentracích. Dvě až tři hlavní složky jsou zastoupeny ve vyšších koncentracích (20 – 70 %) ve srovnání s ostatními složkami, které jsou povětšinou přítomny ve stopových množstvích (Bakkali et al. 2008).

Sloučeniny obsažené v silicích jsou povětšinou na bázi terpenoidů. Jsou tvořeny uhlovodíky a jejich okysličenými deriváty. U některých se mohou vyskytovat deriváty dusíku či síry. Základ většiny silic tvoří monoterpeny, seskviterpeny nebo diterpeny (Berger, 2007).

Silice jsou v rostlinách produkovány speciálními buňkami či pletivy. Tyto buňky se dle čeledi mohou vyskytovat na různých místech. Mohou to být trichomy, květy, listy nebo stonky. Z udávaného počtu 17 500 existujících rostlin je pouze 5 % aromatických a pouze jedna třetina je využitelná k extrakci silic (Lawrencet 2001).

3.3.1 Wetcit – terpeny z pomerančovníku

Wetcit je alternativní přípravek na bázi přírodních terpenů z pomerančovníku. Díky terpenům rostlinného původu je zajištěna přilnavost a rovnoměrnost rozptýlení postřiku na listové ploše. Přírodní terpeny mají vedlejší účinky na omezování chorob a škůdců rostlin (Procházka et al. 2021).

V citrusových listech, plodech a květech je obsaženo velké množství aromatických a biologicky aktivních látek. Terpenoidy, a to především limonenem, nomilinem a obacumonen, patří mezi hlavní biologicky aktivní látky obsažené v pomerančovníku. Mezi seskviterpeny obsažené v citrusech patří např. gamma-bis-abolen. Zprvu byly u těchto látek objeveny pouze insekticidní účinky. Později však došlo k nalezení poznatků ukazujících na fungicidní účinky

těchto látek (Hay a Waterman, 1993). Pomerančová silice se nejčastěji vyskytuje v oválných sličných váčcích slupek plodů, či v barevných částech kůry. Silice plní funkci přírodní antimikrobiální a repelentní bariéry. Množství jednotlivých složek je ovlivněno ročníkem, pěstební oblastí a odrůdou. Obsah pomerančových silic je z 90 % tvořen D-limonenem a seskviterpeny (Unal et al. 2012).

Limonen se získává z pomerančové kůry. Při pokojové teplotě je kapalný a čirý a vyniká charakteristickou citrusovou vůní. Je nerozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v alkoholech (El-Ishaq et al., 2011).(Azar et al. 2011)

Pomerančová silice, která je lisována za studena obsahuje přibližně 90 % limonenu, 2,5 % myrcenu, 1,4 % % alfa pinenu a stopové množství dalších látek jako jsou linalol a n-oktanol. Za použití odlišné metody se výtěžnost silic zvyšuje, ale také se mění poměrné zastoupení silic, a to převážně na úkor limonenu, a to ve prospěch myrcenu a sabinenu. I při jiném způsobu extrakce zůstává obsah limonenu dominantní a jeho obsah neklesá pod 70 % (Azar et al. 2011).

3.3.2 Alginure-výtažky z mořských řas

Alginure je biologický prostředek, který obsahuje výtažky z mořských řas a rostlinné aminokyseliny a podporuje odolnost rostlin vůči napadení houbovými chorobami. Po jeho aplikování dochází v rostlině ke zvýšení obsahu fytoalexinů, PR-proteinů a dalších látek, které ovlivňují obranyschopnost rostlin vůči chorobám. Prostředek na bázi výtažků z mořských řas má preventivní působení a nemá přímý vliv na patogena (Procházka et al. 2021).

Mořské řasy představují skupinu fotosyntetizujících organismů, které se obecně přichycují k horninám či jiným tvrdým substrátům. V místech, kde se vyskytují vytvářejí husté porosty, které nejčastěji slouží jako stanoviště pro široké spektrum rostlin a živočichů, také tvoří základ mořského potravinového řetězce. Nejčastější využití mořských je v potravinářském průmyslu, k výrobě hnojiv či krmiv, jako přísada do kosmetiky nebo ve farmaceutickém průmyslu (Hu a Fraser, 2016).

Hlavní účinná látka u extraktů z mořských řas jsou fytohormony auxiny a cytokininy. Zdrojem pro výrobu extraktů jsou nejčastěji hnědé řasy (Arioli et al. 2015). Efekt spočívá ve zvýšení koncentrace fytoalexinů a mnoha dalších podpůrných látek v rostlině, díky nimž je posílena obranyschopnost rostliny vůči patogenům. Přípravek obsahuje 24 % výtažku z řasy *Ascophyllum nodosum* L. (Vostřel et al. 2018). U této řasy bylo zjištěno velké množství biologicky aktivních látek jako jsou např. cytokininy, kyselina abscisová, kyselina alginová, stopové prvky a vitamíny (Norrie & Keathley 2006). U přípravku není stanovena ochranná lhůta a je vhodný i pro režim ekologického zemědělství (Vostřel et al. 2018).

Extrakty z mořských řas stimulují účinek růstu kořenů a také optimalizují vývoj rostlin. Rovněž se podílejí na zvýšení výnosů a kvality produkce (Holdt & Kraan 2011). Dle studie Řehoře et al. (2018) a (Procházka et al. 2018) bylo zjištěno, že ošetření postřikem na bázi

výtažků z mořských řas má vliv na obsah chlorofylu v listech, to lze považovat za ukazatel zlepšení zdravotního stavu rostlin.

Antifungální efekt byl potvrzen (Rychla et al. 2012), v jejíž studii vykazoval přípravek Alginure velmi dobrou účinnost v potlačení výskytu strupovitosti jabloně. Jankura et al. (2015), který prováděl laboratorní in vitro testy, potvrdil přímý antifungální efekt. V jejich práci mělo použití přípravku Alginure prokazatelný vliv na potlačení rozvoje houby *Fusarium oxysporum*. Tímto způsobem byl potvrzen nejenom posilující efekt na zdravotní stav rostliny, ale i jeho antifungální působení.

Aplikace samotného extraktu z *Ascophyllum nodosum* L. měla fungicidní účinnost průměrně asi 85 %. Výrazné potlačení infekce houbovými chorobami vykazuje použití extraktu z *Ascophyllum nodosum* L. (Jayaraman et al. 2011).

3.4 Fungicidní přípravek na bázi chmelového extraktu

Možnost použití fungicidu na bázi chmelového extraktu v ochraně chmele proti chmelové plísni probíhá již řadu let. Nádobovými pokusy byla stanovena nejvyšší netoxická koncentrace chmelového extraktu. Bylo provedeno několik provozních pokusů, které ukázaly funkčnost fungicidu srovnatelnou s konvenčně používanými fungicidy. Používané koncentrace byly zvoleny na 0,5 % a 0,25 %. Jelikož jde o přírodní látku, je v období její aplikace nutná zvýšená agrobiologická kontrola chmelnice.

3.4.1 Antifungální aktivita látek obsažených ve chmelu

Bylo zjištěno, že pouze některé chalkony a některé acylfloroglucinoly vykazují antifungální aktivitu, přičemž nejvíce bioaktivními látkami jsou desmethylxantohohumol a kohumulon. Kohumulon a obecněji hořké kyseliny již prokázali, že vykazují protiplísňové vlastnosti proti některým lidským patogenním houbám. Bylo popsáno, že humulenové deriváty byly aktivnější než deriváty lupulonu proti *Trichophyton* sp. a *Mucor* sp. Desmethylxantohohumol zabraňuje vyživování se proti patogenním rostlinným škůdcům. Antifungální potenciál má třetí fenolová skupina v prvním cyklu desmethylxantohohumolu. Mechanismy antifungálního působení desmethylxantohohumolu a kohumulonu nejsou doposud známy. Ovšem při srovnání jejich struktury s komerčně používanými syntetickými fungicidy (např. Bixafen), vede k hypotéze, že fungují jinak. Tyto fungicidy fungují na principu inhibice komplexu sukcinátdehydrogenázy v dýchacím řetězci houby. O flavonoidech je naopak známo, že chrání buňky před poškozením, které vede k buněčné smrti zprostředkované mitochondriemi. Je proto nepravděpodobné, že by desmethylxanthohumol způsoboval dysfunkci dýchacího řetězce. Pokud jde o deriváty kohumulonu, již bylo prokázáno, že inhibují dýchací řetězec, syntézu proteinů DNA a RNA poté, co způsobily úniky v primární membráně *Bacillus subtilis*. Hydrofobicita chmelových prenylovaných fenolických sloučenin pozitivně ovlivňuje antimikrobiální aktivitu, kvůli jejich interakci s buněčnými stěnami mikroorganismů. Díky tomuto zjištění by sloučeniny obsažené ve chmelu působit na buněčnou stěnu hub.

Hodnoty MIC (minimální inhibiční koncentrace) byly podobné pro kohumulon i pro desmethylxantohohumol, ovšem byla zjištěna nižší hodnota u kohumulonu při stanovování IC₅₀ (koncentrace, při které nastane 50 % úhyn). To naznačuje, že co – humulon je proti patogenům o něco aktivnější než-li desmethylxanthohumol. Desmethylxanthohumol má nižší účinnost při nižších dávkách (< 0,3 g/l), ale nad tuto hodnotu je velmi aktivní což způsobuje více než 95 % inhibici růstu hub (Bocquet et al. 2018).

Navzdory vysoké aktivitě surových silic, nebyla zjištěna žádná významná aktivita při testování tří hlavních sloučenin samostatně, i když jsou tyto sloučeniny známé svým antimikrobiálním potenciálem proti lidským patogenům. Například bylo prokázáno, že myrcen uděluje antibakteriální aktivitu *E. coli* a *Proteus vulgaris*. Seskviterpeny, trans - karyofylen a alfa humulen, také vykazovaly významnou inhibiční aktivitu vůči několika bakteriím, včetně *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa* (Bocquet et al. 2018). Absence antifungální aktivity těchto tří hlavních sloučenin ve stejných poměrech, jaké byly zjištěny v silicích, potvrdila, že antifungální aktivita silic může být spojena s jednou nebo několika dalšími sloučeninami přítomnými v menším množství (např. alfa muurolen, sigma cadinen, limonen, beta pinen) (Karabin et al. 2015).

3.4.2 Způsoby získávání extraktu

Nejjednodušší metodou pro izolaci silic (získání extraktu) je destilace vodní parou nebo hydro destilace. Metoda používaná výhradně pro přípravu vzorku je Likens-Nickersonova simultánní parní destilace-extrakce rozpouštědlem (SDE). Metody destilace zahrnují působení tepla, a proto existuje možnost izolace teplem degradací. Složení izolovaných silic se bude lišit v závislosti, na tom, zda se destilace provádí za atmosférického tlaku nebo za sníženého tlaku v důsledku použité teploty. Je známo, že parní destilace za atmosférického tlaku způsobuje řadu degradačních změn. Extrakce pomocí rozpouštědla je další metodou získávání. Dle (Lawrence 2002) nelze striktně tyto extrakty nazývat silicemi, ale přesnější název je „těkavé koncentráty“. Jako rozpouštědla se používají hexan, methanol, ethanol, trichloethylene a methylenchlorid. Nejčastěji z těchto rozpouštědel je používán hexan. Z důsledku odpařování rozpouštědla dochází ke ztrátám těkavých sloučenin. Existují také obavy ohledně o zbytky rozpouštědel v extraktech. V současné době se k extrakci silic nejčastěji používá extrakce pomocí kapalného či nadkritického CO₂. Extrakce kapalného CO₂ se obvykle provádí při 5 - 15 °C a 60 - 65 barech, zatímco superkritický CO₂ vyžaduje vyšší teplotu (40 - 60 °C) a tlak (200 - 250 barů). Složení obou extraktů bude pravděpodobně extrémně podobné, až na to, že superkritické extrakty obsahují více tvrdých pryskyřic, polárních hořkých látek. Účinnost extrakce a flexibilita nadkritického CO₂ jsou větší, protože lze měnit vlastnosti rozpouštědla změnou teploty a tlaku. Ve srovnání s tím, lze vlastnosti kapalného CO₂ změnit pouze malými změnami teploty. Výhodou extrakce CO₂ je to, že jsou získávány kvantitativně bez vytváření vedlejších nežádoucích produktů (Eyres & Dufour 2009).

3.4.2.1 Ethanolové extrakty

Chmelové extrakty vyráběné pomocí ethanolu, který je mírně polárním rozpouštědlem a je ekologicky a hygienicky nezávadný. Výsledný extrakt se rozděluje na polární, tříslovinný extrakt (vodní podíl) a na nepolární pryskyřičný extrakt. Chemickým složením pryskyřic je ethanolový extrakt, až na vyšší koncentrace velmi blízký zpracovávanému chmelu, pozměněné má však složení silic. Malý podíl pryskyřic může být přítomen v izomerované formě. Obsah polárních složek závisí na typu extraktu, čistý pryskyřičný extrakt je prakticky neobsahuje. Hotový extrakt je vysoce homogenní s dlouhodobou trvanlivostí při skladování pod 10 °C (Kosař et al. 2000).

3.4.2.2 CO₂ extrakty

Díky charakteru používaného rozpouštědla vyplývá, že extrakt obsahuje pouze nepolární složky výchozího chmele, tedy především hořké kyseliny a silice, dále v nepatrném množství nepolární rezidua postřikových látek. CO₂ extrakt prakticky neobsahuje polární složky chmele, jako polyfenolové látky a dusičnany. Podkritický extrakt se vyrábí za mírných podmínek, ale s nižší výtěžností. Superkritický se pak vyrábí při vyšší teplotě, ale s větším výtěžkem. Oba extrakty jsou prakticky čisté pryskyřičné extrakty, vysoce homogenní s dlouhodobou stabilitou chemického složení (Kosař et al. 2000).

3.5 Tymiánová silice

Tymián (*Thymus Vulgaris L.*) je příjemně vonící vytrvalý keř, který roste v několika v oblastech světa. Je to známá aromatická rostlina s obsahem silic. Tymián má také různé příznivé účinky jako antiseptické, antimikrobiální a antioxidační vlastnosti. Obsah silic v tymiánu je 1 – 2,5 % (Shabnum & Wagay 2011). Složení silic tymiánu je z velké části ovlivněno genotypem (druh, odrůda, klon) rostliny, místem a způsobem a podmínkami pěstování (klimatické podmínky, složení půdy) a následně také technologickým zpracováním (způsob sběru, skladování, způsob zpracování) (Al-Asmari et al. 2017).

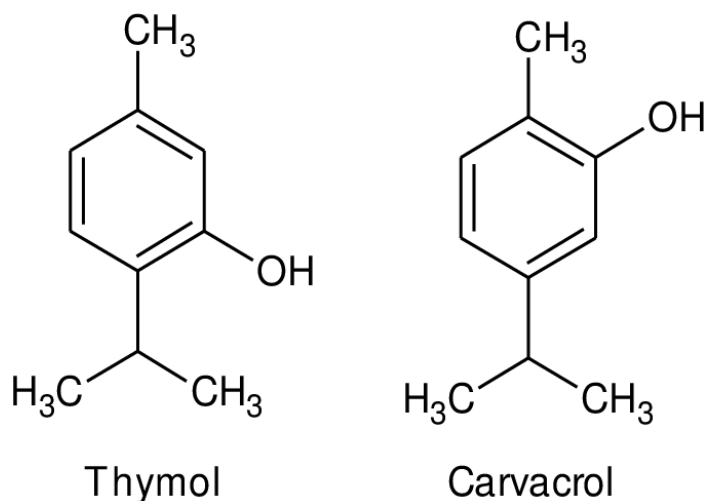
3.5.1 Složení tyamiánové silice

Pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem bylo zjištěno, že 45 složek představuje 96,75 % z celkových detekovaných složek v tymiánové silici. Hlavními sloučeninami byly thymol, p-cymen, gama-terpen, karvakrol, linalool, beta karyofylen. Množství a obsah jednotlivých složek tvořící silici je velmi variabilní (Shabnum & Wagay 2011). Hlavní skupinou složek v tymiánové silici jsou kyslíkaté monoterpeny, dále monoterpenové uhlovodíky, seskviterpenové uhlovodíky a aromatické sloučeniny (Moghaddam & Mehdizadeh 2020).

Thymol (2-isopropyl-5-methylfenol) patří mezi monoterpenické fenoly a jeho isomerem je karvakrol. V silice tymiánu obecného je nejčastěji zastoupen (44 – 58 %) (Shabnum &

Wagay 2011). Thymol má velmi špatnou rozpustnost ve vodě (Bakkali et al. 2008). P-cymen a gama terpen je meziproductem biosyntézy thymolu (Moghaddam & Mehdizadeh 2020).

Karvakrol je společně s thymolem jedna z majoritních složek obsažených v silicích tymiánu obecného. V silice se nejčastěji vyskytuje v množství (3 – 5 %). Je isomerem thymolu (Suntres et al. 2015).



Obr. 4 Strukturální vzorec thymolu a karvakrolu (Hajimehdipoor et al. 2010)

3.5.2 Stálost tymiánové silice

Podobně jako u chmelových silic závisí míra degradace tymiánových silic na mnoha chemických faktorech, které ovlivňují rychlost i průběh degradace. Patří mezi ně, teplo, světlo, přítomnost kyslíku. Stabilitu může rovněž ovlivňovat konkrétní složení tymiánové silice a přítomnost různých nečistot. Působení světla UV i VIS urychluje autooxidační změny. Avšak autooxidační změny u různých druhů silic byly rozdílné, např. tymiánové silice se téměř nezměnily, ale u rozmarýnového oleje došlo k značným chemickým změnám. Tyto změny jsou identifikovány pomocí zvýšené hladiny jednotlivých sloučenin, které silice obsahují. U tymiánové silice to jsou zejména p-cymene, karyofylen oxid, které souvisejí s degradací beta karyofylenu a monoterpenů jako jsou beta myrcen, alfa terpinen (Turek & Stintzing 2013).

Okolní teplota podstatně ovlivňuje stabilitu v několika ohledech. Zvýšením teploty se zpravidla zrychlují chemické reakce v důsledku zvýšení reakční rychlosti. Na základě van't Hoffova zákona, který říká, že nárůst teploty od 10 °C, přibližně zdvojnásobuje rychlost chemických reakcí. Autooxidace tedy roste se zvyšující se teplotou ještě více, protože teplo pravděpodobně přispěje k počáteční tvorbě volných radikálů. Při nízkých či středně vysokých teplotách převládala tvorba hydroxiperoxidů, zatímco při 50 °C to bylo naopak. Z dlouhodobého sledování silic bylo zjištěno, že stabilita klesá se stoupající dobou skladování

a zvýšením teploty. Společně se zvýšením teploty se projevily klesajícím množstvím terpenických uhlovodíků beta karyofylen, beta myrcen, beta pinen a gama terpinen a celkový vzestup p-cymenu. Terpenoidy jsou obecně známé jako termolabilní látky a jsou náchylné k přesmykovým procesům při zvýšených teplotách. Termická degradace terpenů byla klasifikována do 4 různých skupin oxidačních reakcí: štěpení dvojných vazeb, epoxidace, dehydrogenace do aromatických systémů a allylová oxidace na alkoholy, ketony a aldehydy (Turek & Stintzing 2013).

Oxidační reakce patří mezi hlavní příčiny znehodnocení silic. Během skladování v nádobách, které byly více plné docházelo k větším fyzikálním i chemickým změnám. Oxidace silic se zvyšuje s koncentrací rozpuštěného kyslíku. Podle Henryho zákona je rozpustnost kyslíku vysoká při nízkých teplotách a drasticky klesá s nárůstem ve stupních Celsia. Proto se uvádí, že peroxylové radikály jako jsou hydroperoxydy, představují nejpočetnější sloučeniny při oxidaci silic při nižších teplotách. Sloučeniny vytvořené konečnými reakcemi, jako jsou polymery, se vytvářejí až v pozdějších oxidačních fázích, když bylo vyčerpáno buď množství kyslíku nebo oxidovatelného substrátu. Rozpustnost kyslíku ovlivňuje hladinu peroxidu přítomnou v silicích tymiánu, které byly skladovány při 5 °C. Jako prevencí před oxidačními procesy může být ošetření inertním plynem, např. argon a opatrně propláchnuty, aby byl vytlačen zbývající vzduch. Tímto ošetřením účinně zabráníme tvorbě peroxidů (Turek & Stintzing 2013).

Vlhkost je považována za jednu z možností při znehodnocení silic. Bylo prokázáno, že postupy destilace vody při 100 °C narušují spektra sloučenin (Turek & Stintzing 2013). Naopak (Rajeswara Rao 2002) nedokázali odhalit významné změny v různých olejích skladovaných v přítomnosti vody, a to ani při obsahu vody 20 %. Tato úroveň je nad koncentrací, která by případně mohla být v silicích po hydrodestilaci (Rajeswara Rao 2002).

3.5.3 Antifungální aktivita tymiánových silic

Antifungální aktivitu Tymiánu obecného lze připsat vysoké koncentraci okysličených monoterpenů (thymol) a monoterpenových uhlovodíků (p-cymen) a dalších vedlejších sloučenin. Poměrně vysoká antifungální aktivita thymolu a karvakrolu naznačují, že obě sloučeniny mohou být plnohodnotnou alternativou k tradičním chemickým fungicidům. Antimikrobiální aktivita tymiánových silic byla také zjištěna proti grampozitivním bakteriím. Značná antifungální aktivita silic byla zjištěna proti mnoha houbovým parazitům, zejména proti rodům *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mucor* a *Rhizopus* (Mandal & DebMandal 2016). Thymol s karvakrolem působí tak, že inaktivují esenciální enzymy, reagují s buněčnou membránou nebo naruší funkčnost genetického materiálu. Tymiánové silice zcela inhibovaly růst mycelia *A. flavus* při 0,7 µL/ml. Antifungální aktivita silic stoupá s jejich rostoucí koncentrací. Minimální inhibiční koncentrace se pro jednotlivé druhy hub může lišit. 100 % antifungální aktivita byla zjištěna při koncentraci 200 µl/l (Amini et al. 2012).

3.5.4 Metody izolace tymiánových silic

Tymiánové silice se získávají nejčastěji destilací vodní parou nebo hydrodestilací. Vysoká teplota a vliv vody během izolace, vedou ke změně složení silic. Tomuto procesu, lze snadno zabránit izolací silic pomocí stlačeného plynu. Při extrakci kapalným CO₂ byl obsah fenolů thymolu a karvakrolu nižší než při extrakci parní destilací, ale naopak obsah p-cymenu a linaoolu byl při extrakci kapalným CO₂ o 50 % vyšší. Bylo zjištěno, že koncentrace p-cymenu, borneolu, nerolu a karvakrolu byly vyšší v destilovaném oleji než v těkavém koncentrátu získaného pomocí SFE. Také celkové procento terpenových olejů bylo nižší v extraktech pocházejících z CO₂. Superkritickou extrakci je možno provádět při nízkém tlaku 8 MPa. Největší rozpustnosti silic a nejrychlejší extrakce bylo dosaženo při 11 MPa a 50 °C, což je v souladu s tím, že síla nadkritické kapaliny jako rozpouštědla se zvyšuje s rostoucí hustotou a teplotou. Další zvýšení rozpustnosti nelze doporučit z důvodu očekávaného zvýšení obsahu vody a vosku v extraktu. Koncentrace monoterpenů (alfa pinen, beta pinen a p-cymene) byl vyšší v silicích extrahovaných parní destilací, ale naopak CO₂ extrakty byly bohatší na monoterpeny jako jsou borneol, geraniol, karvakrol. Monoterpenové uhlovodíky alfa pinen a beta pinen nebyly v SFE extraktech vůbec nalezeny. Silice získané extrakcí pomocí SFE obsahují vyšší procento sloučenin typických pro tymián než silici extrahované parní destilací. Z tohoto důvodu se superkritická extrakce pomocí CO₂ jeví jako výhodná, protože extrakt neobsahuje monoterpeny, které mohou maskovat nebo znehodnocovat přírodní aroma či aroma samotné silice (Aleksovski et al. 2001).

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Chmelový postřik

Chmelový postřik je emulze sestávající se z následujících složek, CO₂ chmelového extraktu, lecitine, slunečnicového oleje a ethanolu v následujícím hmotnostním poměru 0,36:0,1:2:1,5.

Tymiánový postřik

Tymiánový postřik je připravován jako emulze sestávající se z tymiánové silice a slunečnicového oleje v poměru 1:1.

4.2 Skladovací pokus

Jednotlivé postřiky (chmelový i tymiánový) byly skladovány po celou dobu ve třech rozdílných teplotních podmínkách. První vzorek byl skladován v při pokojové teplotě 25 °C, druhý v sušárně při 40 °C a třetí v lednici při 6 °C. Vzorky byly analyzovány 0., 1., 3. a 5. týden níže popsanými metodami.

4.3 Analýza alfa a beta hořkých kyselin pomocí HPLC-UV/VIS

4.3.1 Chemikálie

Jako rozpouštědla pro HPLC-UV/VIS byla použita rozpouštědla diethylether (EtOEt) a methanol (MeOH), která byla dodána firmou VWR International (Stříbrná Skalice, Česká republika). Mezinárodní kalibrační extrakt 3 (ICE – 3) standart obsahující kohumulon (13.88 %), kolupulon (13.44 %), adhumulon a adlupulon a jejich odpovídajících izomerů humulon a lupulon (vyjádřeno jako součet izomerů: n+adhumulon a n+adlupulon; 30.67 % and 10.84 % v tomto pořadí) byly zakoupeny od Labor Veritas (Zürich, Švýcarsko).

4.3.2 Příprava vzorků pro HPLC analýzu

Do skleněných HPLC viálek bylo odebráno 10 µl vzorku chmelového postřiku ze všech skladovacích podmínek ve třech opakováních, následovala extrakce směsí methanolu (MeOH) a diethyletheru (EtOEt) (1:5) o objemu 990 µl a podrobena analýze.

4.3.3 HPLC-UV/VIS analýza

Koncentrace hořkých kyselin v každém vzorku chmele byla stanovena pomocí mírně modifikované metody, dříve publikovanou Oladokunem et al. (2016). Analýza byla provedena přístrojem UltiMate 3000 UHPLC, který byl vybaven diodovým detektorem (ThermoFisher

Scientific, Waltham, USA). Separace hořkých kyselin byla provedena na koloně Gemini – NX C18 5 μm 110 A (250 \times 4.60 mm; Phenomenex, Torrance, USA). Byla použita Gradientová eluce s využitím mobilní fáze A (voda s 2.5 % kyselinou octovou) a B (ACN s 2.5 % kyselinou octovou) v následujících časech a poměrech: 0 min, 30:70 (A:B); 5 min, 20:80; 10 min, 10:90; 15 min, 0:100, 20 min, 0:100; 21 min, 30:70. Objem nástřiku byl 10 μl s průtokovou rychlostí 1,5 mL/min po dobu 23 minut. Teplota kolony byla udržována na 40 °C. UV spektra byla snímána při vlnových délkách 270 a 326 nm. Kvantifikace byla stanovena pomocí devítibodové kalibrace standardem ICE – 3 (koncentrační rozsah 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$).

4.4 Sledování změn profilu volatilních látek v průběhu skladování

4.4.1 Příprava vzorků pro GC-MS analýzu

Do GC vialek bylo napipetováno 200 μl chmelového postřiku a 10 μl tymiánového postřiku ve třech opakováních a následně podrobena analýze.

4.5 Analýza profilu volatilních látek pomocí head space - SPME (solid phase micro extraction) s následnou analýzou pomocí GC/Q-TOF

Změny profilu volatilních látek v postřicích v průběhu skladování byly sledovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS), konkrétně na přístroji Agilent (Santa Clara, USA) GC 7200(/qTOF 7890 B vybaveného autosamplrem Combi PAL (CTC Analytic, Švýcarsko) umožňující automatickou přípravu vzorku. Volatilní látky z postřiků byly sorbovány na SPME vlákno potažené kombinovanou fází PDMS/DVB (Supelco, Německo). Vzorky byly před samotnou sorpcí kondicionovány po dobu 5 min při teplotě 40 °C, sorpce na vlákno probíhala při stejné teplotě po dobu 30 s - 120 s v závislosti na typu postřiku. Desorpce v GC nástřiku probíhala po dobu 5 min při teplotě 250 °C v režimu splitless. Separace jednotlivých složek silic byla provedena na koloně HP-5MS (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) o následujících parametrech délka 30 m, průměr kolony 0,25 mm, tloušťka fáze 0,25 μm . Nosným plynem bylo helium, rychlost průtoku 1ml/min. Teplotní program pece byl následující: počáteční teplota pece 40 °C byla udržována 5 min, následně byla rychlostí 5 °C/min zvyšována na teplotu 180 °C, po 1 min byla teplota rychlostí 30 °C/min zvyšována na konečnou teplotu 280 °C, celková doba analýzy byla 37 min. Parametry hmotnostního detektoru byly následující teplota kvadrupólu 230°C, teplota zdroje 230, rozsah skenování hmot od 55 – 700. Identifikace jednotlivých volatilních látek byla provedena porovnáním spekter se spektry dostupných standardů, dále porovnáním spekter a vypočtených Kovatsových indexů s databází NIST (National Institute of Standards and Technology).

4.6 Analýza peroxidového čísla

4.6.1 Chemikálie

Jako rozpouštědlo při LLE (liquid – liquid extraction) byl použit hexan od firmy VWR International (Stříbrná Skalice, Česká republika). Pro přípravu roztoku ke stanovení peroxidového čísla a kalibrace byl použit roztok směsi chloroformu a methanolu (7:3) od firmy VWR International (Stříbrná Skalice, Česká republika), 10 mM xylenol orange, heptahydrát síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a peroxid vodíku (H_2O_2) od firmy Penta chemicals unlimeted, bezvodý chlorid železitý (FeCl_3) a dihydrát chloridu barnatého ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) od firmy Lach:ner.

4.6.2 Příprava roztoků

Příprava Fe (II)

Bylo rozpuštěno 0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v 50 ml vody. V jiné nádobě bylo rozpuštěno $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 50 ml vody. Následně byl roztok chloridu barnatého přidán do roztoku síranu železnatého za stálého míchání a poté bylo přidáno 2 ml 10 M HCl. Následovala filtrace sraženiny síranu barnatého gravitačně pomocí Whatmanova filtračního papíru č.1. Roztok byl před použitím skladován v tmavé nádobě při pokojové teplotě.

Příprava Fe (III)

Bylo rozpuštěno 0,5 g chloridu železitého (FeCl_3) v 50 ml 10 M HCl a přidáno 1 až 2 ml 30 % peroxidu vodíku (H_2O_2). Roztok byl vařen po dobu 5 minut, aby byl odstraněn přebytek peroxidu vodíku a poté byl zchlazen na pokojovou teplotu. Následně byl roztok zředěn vodou na objem 500 ml a z tohoto objemu bylo odlito množství 1 ml do 100 ml odměrné baňky. Odlité množství 1 ml bylo zředěn po risku roztokem chloroform/methanol (7:3) a bylo dosažen jsme konečné koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ (FeCl_3). Roztok byl před použitím skladován při pokojové teplotě.

4.6.3 Separace oleje pomocí Liquid-liquid extrakce (chmelový extrakt)

Do falkonek bylo odebráno 2,5 ml chmelového postříku a následně přidáno 2,5 ml hexanu. Tato směs byla vortexována po dobu 1 min a následně centrifugována po dobu 5 min. Díky centrifugaci bylo ve falkonce dosaženo oddělení ethanolu s vodou a oleje s hexanem, ten byl odebrán do nové falkonky. Do zbytku ethanolu s vodou, který zůstal po odebrání směsi oleje a hexanu, bylo přidáno opět 2,5 ml hexanu a celý proces byl ještě 2x opakován.

Poté co byla provedena extrakce, byl pomocí evaporátoru s dusíkem ze směsi odstraněn hexan a tímto byl získán čistý olej.

4.6.4 Stanovení peroxidového čísla pomocí FOX metody

4.6.4.1 Příprava kalibrace

Do 8 skleněných 10 ml zkumavek se zábrusem bylo napipetováno množství standardního roztoku Fe (III) viz. tabulka. Následně byla přidána směs chloroformu/methanolu (7:3) v objemech jako je uvedeno v tabulce a roztok byl vortexován po dobu 2-4 s. Poté byla přidána xylenol orange v množství 50 μ l a roztok byl vortexován po dobu 2-4 s. Po 5 min byla měřena absorbance na spektrofotometru Thermo Scientific Helios Epsilon při 560 nm. Zkumavka s nulovým obsahem roztoku Fe (III) neboli blank byl měřen jako první.

| kalibrační stupeň | koncentrace Fe (III) v μ g/ml | ml Fe (III) | chloroform/methanol (ml) | xylenol orange (μ l) |
|-------------------|-----------------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 9,95 | 50 |
| 1 | 2 | 0,2 | 9,75 | 50 |
| 2 | 5 | 0,5 | 9,45 | 50 |
| 3 | 8 | 0,8 | 9,15 | 50 |
| 4 | 10 | 1 | 8,95 | 50 |
| 5 | 12 | 1,2 | 8,75 | 50 |
| 6 | 15 | 1,5 | 8,45 | 50 |
| 7 | 20 | 2 | 7,95 | 50 |

4.6.4.2 Příprava a měření vzorku

Do 10 ml skleněných zkumavek se zábrusem bylo napipetováno cca 10-20 μ l vyextrahovaného oleje chmelového postřiku a čistého tymiánového postřiku ve třech opakováních a byla zaznamenána přesná váha. Dále byla do zkumavek přidána směs chloroform/methanol (7:3) a vše bylo promícháno. Následně bylo přidáno 50 μ l xylenol orange a roztok byl vortexován po dobu 2-4 s. Poté bylo přidáno 50 μ l Fe (II) roztoku a opět bylo vše vortexováno po dobu 2-4 s. Po 5 min byla měřena absorbance vzorku na spektrofotometru Thermo Scientific Helios Epsilon při 560 nm. Směs chloroform/methanol (7:3), která byla použita jako blank, byla měřena jako první. Naměřené hodnoty byly zaznamenány.

4.6.4.3 Výpočet peroxidového čísla

Na základě naměřených hodnot z kalibrace byla vytvořena kalibrační křivka a vyjádřena rovnice směrnic kalibrační křivky. Z rovnice směrnic kalibrační křivky byla pomocí naměřených hodnot absorbance jednotlivých vzorků vyjádřena hodnota X, která byla následně

dosažena do vzorce: $PV = X / (W \times 55,84 \times 2)$, kde za W byla dosažena hmotnost napipetovaného oleje.

4.7 Statistická analýza

Vzorky pro každou analýzu byly připraveny ve třech nezávislých opakováních. Hodnoty získané ze všech použitých metod jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD).

K vyhodnocení dat byl použit software Statistica 12 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA) a program Microsoft Office Excel. Pro sledování vlivu skladovacích podmínek a doby skladování na obsah hořkých kyselin u chmelového postříku, obsah monoterpenů, seskvitepenů a hodnoty peroxidového čísla u chmelového a tymiánového postříku byla použita analýza rozptylu (ANOVA). Pro zjištění statisticky významných rozdílů byly hodnoty analyzovány pomocí post-hoc Tukeyův test. Bylo testováno na hladině významnosti $p < 0,05$.

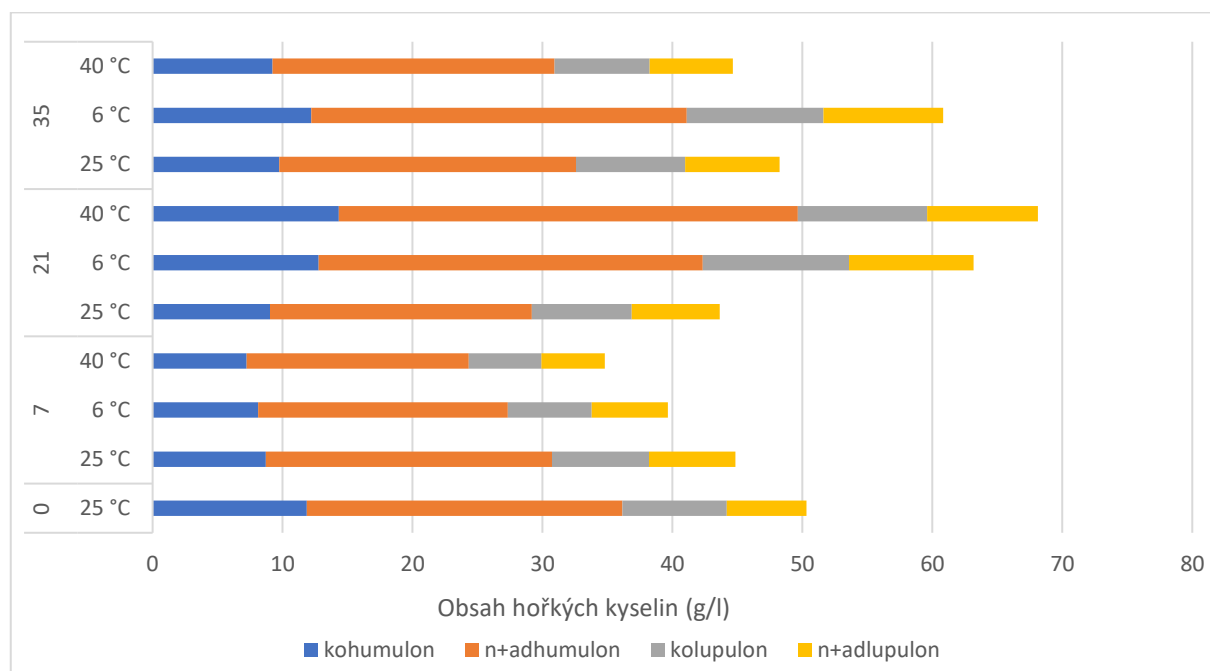
5 Výsledky

5.1 Obsah alfa a beta hořkých kyselin ve chmelovém postřiku

Výsledky obsahů alfa a beta hořkých kyselin jsou vyjádřeny v gramech na litr příslušného postřiku. Byly sledovány jednotlivé analogy hořkých kyselin a to kohumulon, n+adhumulon u alfa hořkých kyselin a kolupulon a n+adlupulon u beta hořkých kyselin.

Zdá se, že postřiky odebírané ve 21. dni měly statisticky významně vyšší obsahy všech sledovaných alfa hořkých kyselin (49,65 g/l), ($p = 0,05$) při skladování ve 40 °C ve srovnání s ostatními skladovacími teplotami. Obsah beta hořkých kyselin ($p = 0,05$), u postřiků odebíraných ve 21. dni, byl statisticky významně vyšší u postřiku skladovaného v lednici (20,82 g/l). U postřiků odebraných v 7. a 35. skladovacím dni nebyly statisticky významné rozdíly mezi obsahy hořkých kyselin ($p = 0,05$) ve srovnání s jednotlivými skladovacími teplotami. Postřik skladovaný při 25 °C vykazoval statisticky významně vyšší obsah alfa hořkých kyselin (32,58 g/l), ($p = 0,05$) ve 35. odběrovém dni ve srovnání s ostatními odběrovými dny. Postřik skladovaný při 6 °C vykazoval statisticky významně vyšší obsahy alfa i beta hořkých (42,34 g/l; 20,82 g/l) kyselin ($p = 0,05$) ve 21. odběrovém dni ve srovnání s ostatními odběrovými dny. U postřiku, který byl skladován při 40 °C nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi obsahy hořkých kyselin ($p = 0,05$) ve srovnání s jednotlivými odběrovými dny.

Z výsledků se zdá, že skladovací podmínky i doba skladování mají minimální vliv na hladiny jednotlivých komponent hořkých kyselin. Statisticky významné rozdíly v množství aktivních látek se pohybovali průměrně do 10 %.



Graf 1: Průměrné hodnoty jednotlivých analogů alfa a beta hořkých kyselin ve chmelovém postřiku v jednotlivých odběrových dnech a teplotách skladování.

5.2 Obsah monoterpenů a seskviterpenů ve chmelové a tymiánové silici

U každého postřiku byla provedena analýza silic s identifikací nejčastěji zastoupených látek. Obsahy jednotlivých látek byly z hlediska statistické významnosti hodnoceny dle jednotlivých odběrových dnů a skladovací teploty.

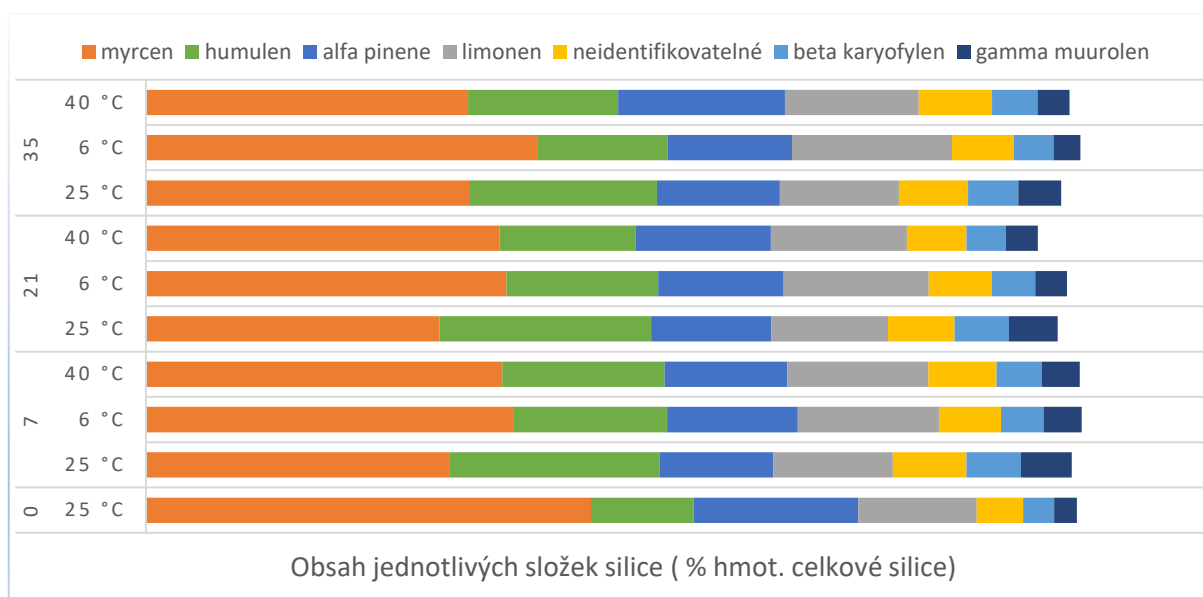
5.2.1 Chmelový postřik

U postřiku skladovaném při 6 °C se nevyskytovali statisticky významné rozdíly mezi obsahy myrcenu, humulenu a alfa pinenu ($p = 0,05$) ve srovnání s jednotlivými odběrovými dny. Statisticky významné rozdíly ostatních látek, jsou zaznamenány v příloze č.1.

U postřiku odebraném ve 35. dni skladování byly zjištěny statisticky významné rozdíly u alfa pinenu, humulenu a myrcenu ($p = 0,05$) mezi postřiky skladovanými při 25 °C a 40 °C (4,17 %; 0,5 %; 0,18 %), 6 °C a 40 °C (4,04 %; 0,52 %; 6,52 %), u myrcenu navíc ještě mezi 25 °C a 6 °C (6,34 %). Statisticky významné rozdíly ostatních látek, jsou zaznamenány v příloze č.2.

V postřiku odebraném ve 35. dni a skladovaném při 40 °C, byl detekován nižší obsah myrcenu (30,48 %) a alfa pinenu (15,78 %), ($p = 0,05$) než u ostatních skladovacích teplot. U humulenu ($p = 0,05$) byla tato hodnota nejnižší u postřiku skladovaného při 6 °C (12,37 %).

Ačkoliv mezi jednotlivými odběry existovaly statisticky významné rozdíly, tak z výsledků se zdá, že čas ani skladovací teplota nemá na hladiny jednotlivých látek významný vliv. Statisticky významné rozdíly v množství aktivních látek se opět pohybovaly průměrně do 10 %.



Graf 2: Poměrné zastoupení terpenických látek ve chmelovém postřiku v jednotlivých odběrových dnech a teplotách skladování.

5.2.2 Tymiánový postřík

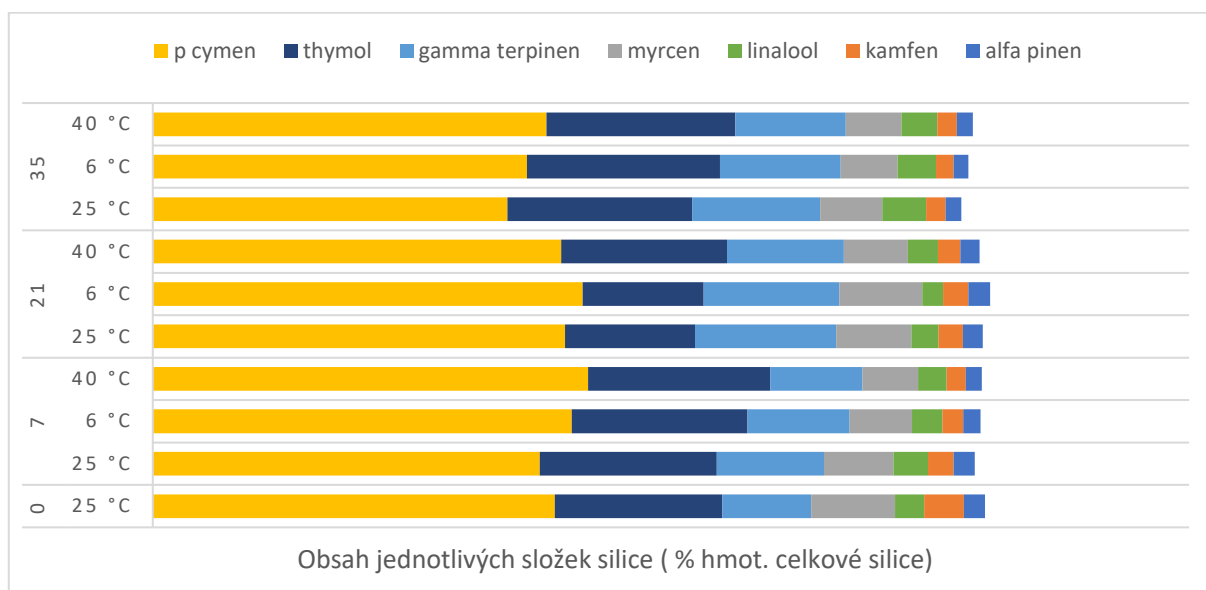
U postříku, který byl odebrán v 21. dni skladování byly zaznamenány statisticky významné rozdíly u thymolu a gamma terpinenu ($p = 0,05$) mezi postříky skladovanými při 6 °C a 40 °C (0,52 %; 0,87 %) 25 °C a 40 °C (0,46 %; 0,41 %). U p cymenu ($p = 0,05$) se nevyskytovali statisticky významné rozdíly ve srovnání s jednotlivými skladovacími teplotami. Statisticky významné rozdíly ostatních látek, jsou zaznamenány v příloze č.3.

V postříku odebraném v 21. dni a skladovaném při 40 °C, byl detekován nižší obsah p cymenu (47,30 %) a gamma terpinenu (13,54 %), ($p = 0,05$) než u ostatních skladovacích teplot. U thymolu ($p = 0,05$) byla tato hodnota nejnižší u postříku skladovaného při 6 °C (13,99 %)

U postříku skladovaném při 25 °C byly zjištěny statisticky významné rozdíly u p cymenu a gamma terpinenu ($p = 0,05$) mezi 7. a 35. (3,74 %; 2,41 %), 7. a 21. odběrovým dnem (2,93 %; 3,95 %). U thymolu ($p = 0,05$) se nevyskytovali statisticky významné rozdíly ve srovnání s jednotlivými odběrovými dny. Statisticky významné rozdíly ostatních látek, jsou zaznamenány v příloze č.4.

U postříku, který byl skladován při 25 °C byl detekován nejnižší obsah p cymenu ($p = 0,05$) u postříku odebraného v 35. odběrovém dni (41,07 %). U gamma terpinenu ($p = 0,05$), byla tato hodnota nejnižší u postříku odebraného v 7. odběrovém dni (12,41 %) U thymolu ($p = 0,05$) byla zaznamenána nejnižší hodnota ve 21. odběrovém dni (13,99 %).

Ačkoliv mezi jednotlivými odběry existovali statisticky významné rozdíly, tak z výsledků se zdá, že čas ani skladovací teplota nemá na hladiny jednotlivých látek významný vliv. Statisticky významné rozdíly v množství aktivních látek se i zde pohybovaly průměrně do 10 %.



Graf 3: Poměrné zastoupení terpenických látek v tymiánovém postříku v jednotlivých odběrových dnech a teplotách skladování.

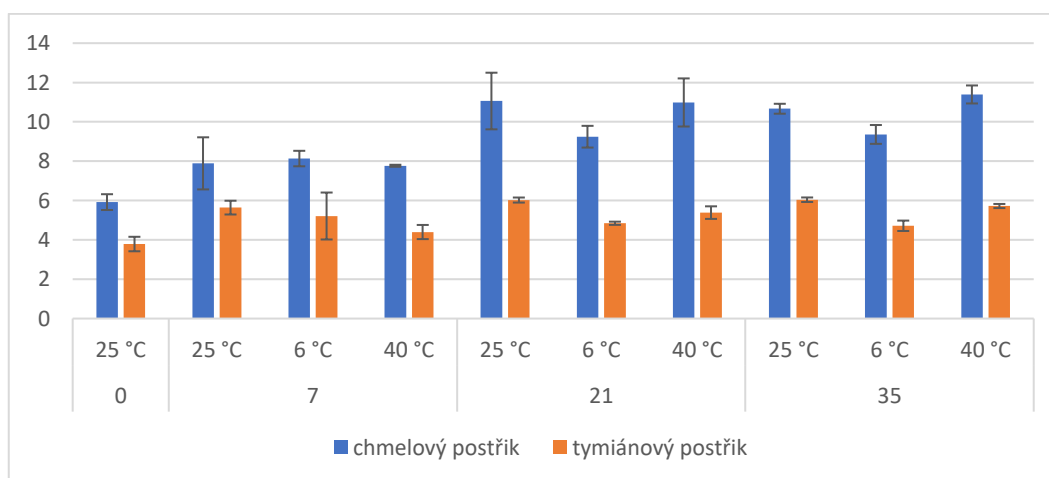
5.3 Peroxidové číslo

Analýza peroxidového čísla probíhala zvláště u chmelového a tymiánového postříku.

U chmelového postříku skladovaného při 25 °C byla hodnota peroxidového čísla ($p = 0,05$) statisticky významně vyšší ve 21. odběrovém dni (11,06) ve srovnání s ostatními odběrovými dny (7,88; 10,67) U postříku skladovaného při 6 °C hodnota peroxidového čísla ($p = 0,05$) statisticky významně vyšší ve 35. odběrovém dni (9,36) ve srovnání s ostatními odběrovými dny (8,13; 9,24). Postřík skladovaný při 40 °C měl statisticky významně vyšší hodnotu peroxidového čísla ($p = 0,05$) ve 35. odběrovém dni (11,39) ve srovnání s ostatními odběrovými dny (10,99; 7,77). Chmelový postřík odebíraný v 35. dni měl statisticky významně vyšší hodnotu peroxidového čísla ($p = 0,05$) při skladovací teplotě 40 °C (11, 39) ve srovnání s ostatními skladovacími teplotami (10,66; 9,36) U chmelových postříků, které byly odebírány 7. a 21. odběrový den, nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami peroxidových čísel ($p = 0,05$) ve srovnání s jednotlivými skladovacími teplotami.

Tymiánový postřík odebíraný v 35. dni měl statisticky významně vyšší hodnotu peroxidového čísla ($p = 0,05$) při skladovací teplotě 25 °C (6,04) ve srovnání s ostatními skladovacími teplotami (4,72; 5,72). U tymiánových postříků, které byly odebírány 7. a 21. odběrový den, nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami peroxidových čísel ($p = 0,05$) ve srovnání s jednotlivými skladovacími teplotami. Postřík skladovaný při 40 °C měl statisticky významně vyšší hodnotu peroxidového čísla ($p = 0,05$) ve 35. odběrovém dni (5,72) ve srovnání s ostatními odběrovými dny (4,39; 5,39). U tymiánových postříků, které byly odebírány při teplotách 25 °C a 6 °C, nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami peroxidových čísel ($p = 0,05$) ve srovnání s jednotlivými odběrovými dny.

Ačkoliv mezi jednotlivými odběry existovali statisticky významné rozdíly, tak z výsledků se zdá, že u tymiánového postříku nemá čas a skladovací teplota významný vliv na hladiny peroxidových čísel. U chmelového postříku má čas mírný vliv na hodnoty peroxidových čísel.



Graf 4: Průměrné hodnoty peroxidových čísel chmelového a tymiánového se směrodatnými odchylkami.

6 Diskuze

Tato studie se zabývala stabilitou alternativních fungicidních prostředků založených na chmelové a tymiánové silici určených pro potlačení houbových onemocnění chmele otáčivého. K účelu zjištění stability postřiků byly použity tři analytické metody. Metody, HPLC-UV a GC-MS, nám dovolily sledovat změny jednotlivých komponent silic a hořkých kyselin u chmelového postřiku. Díky této analýze můžeme provést detailní hodnocení jednotlivých látek. Ke zjištění oxidace použitých olejů, byla použita analýza peroxidového čísla.

Houbová onemocnění, zejména *Peronospora* chmelová představují velké riziko pro chmelové rostliny, mohou na rostlinách způsobovat velké ztráty. Jako prevence se používají konvenční přípravky, které jsou zejména na bázi mědi, tyto přípravky mají sice dobré výsledky proti houbovým onemocněním chmele, ale zároveň mohou mít negativní účinky jak na kvalitu chmele, tak i na životní prostředí a půdní mikroorganismy (Procházka et al. 2021). Používání konvenčních přípravků na bázi mědi má rovněž negativní vliv na kvalitativní parametry piva. Mědnaté ionty obsažené ve chmelu mohou zhoršovat organoleptické vlastnosti piva či v pivu způsobovat silně dekontaminační proces (Krofta et al. 2011). Postřiky na bázi mědi, skladované při vysokých teplotách (54 °C) po dobu 14 dní vykazovali úbytek aktivních látek okolo 6 % (Ramadan & Ateya 2016).

Z důvodu zátěže životního prostředí konvenčními přípravky na bázi mědi, je současný trend zaměřen na vývoj alternativních přípravků, které by měly menší zátěž na životní prostředí a neovlivňovali kvalitu chmelových výrobků (Procházka et al. 2021). Alternativní fungicidní přípravky jsou povětšinou založeny na silicích, ale mohou být i na bázi proteinů (Wetcit) (Procházka et al. 2021).

Z výsledků našich analýz byl zjištěn průměrný úbytek aktivních látek do 10 % při všech skladovacích podmínkách. Dle dokumentu vydaného společností OECD (2015) tento úbytek značí, že je postřik stabilní. Dle Fishela (2001) mohou skladovací podmínky ovlivnit stabilitu postřiku. Skladování v nižších teplotách může vést k oddělení účinných látek od rozpouštědel, či emulgátorů, což může vést až ke krystalizaci či koagulaci postřiku (Fishela 2001). Jednotlivé látky zastoupené v postřicích mohou mít také odlišnou stabilitu. Stabilita silic, může být snížena působením tepla (Baritoux et al. 1992). Dle Turka & Stintzinga (2013) se zvýšením teploty zpravidla zrychlují chemické reakce, což má za následek zvýšení rychlosti autooxidace. Rowshan et al. (2013) ve své studii zjistili, že účinek skladovacích teplot na obsah silic nebyl natolik významný, jak délka skladování. U některých zastoupených látek, např. thymol, karvakrol může během skladování docházet dokonce ke zvýšení jejich obsahu (Rowshan et al. 2013). Tuto skutečnost potvrdil i náš skladovací pokus, kde hodnota u thymolu průměrně vzrostla o 10 % (z 20 % na 22 %). Dle Rowshan et al. (2013) jsou nejlepší skladovací podmínky při pokojové teplotě (25 °C), nejenže zde nedochází ke snižování obsahu aktivních látek, dochází zde dokonce k růstům některých aktivních látek. Stabilitu alfa i beta hořkých kyselin může rovněž ovlivňovat několik faktorů. Na míru degradace hořkých kyselin má vliv doba skladování, podmínky skladování jako je teplota, dostupnost kyslíku a světla (Skomra & Koziara-Ciupa 2020). Tento fakt potvrzuje i náš skladovací pokus, kde v 21. a 35. odběrovém

dni byly u chmelového postříku skladovaného v lednici, zjištěny vyšší obsahy hořkých kyselin, oproti ostatním skladovacím podmínkám. Dle Nasirullaha & Nagaraja (1989) je slunečnicový olej, stabilní po dobu 6 měsíců při teplotě skladování (18-32 °C). Skladovní při vyšší teplotě okolo 40 °C, ukázalo, že olej po 6 měsících již tak stabilní není (Nasirullah & Nagaraja 1989). Mírně vyšší hodnotu peroxidového čísla vykazoval i náš postřík skladovaný při 40 °C, odebraný v 35. dni skladování, ostatní hodnoty se příliš neměly, což potvrzuje stabilitu oleje po dobu našeho pokusu.

V rámci této práce bylo zjištěno, že alternativní postříky založené na chmelové a tymiánové silici jsou relativně stabilní ve všech aplikovaných skladovacích podmínkách. Zdá se, že postříky na bázi chmelové a tymiánové silice by mohli být alternativou ke konvenčně používaným přípravkům a jsou tak vhodné pro zavedení do ochranné praxe chmele. Jejich hlavním přínosem by bylo snížení zátěže na životní prostředí a zároveň zvýšení kvality chmele a chmelových produktů.

7 Závěr

Kvalita chmele je velmi důležitým faktorem pro výrobu a kvalitu piva. Kvalitu chmele ovlivňuje mnoho faktorů, včetně druhu používaných fungicidů. Cílem této práce bylo zhodnotit stabilitu alternativních fungicidních postřiků založených na chmelové a tymiánové silici v různých skladovacích podmínkách a zjistit, zda jsou přípravky vhodné pro zavedení do ochranné praxe chmele.

Pro zjištění stability postřiků založených na chmelové a tymiánové silici byly využity tři různá analytická stanovení. Analýza hořkých kyselin, silic a peroxidového čísla ukázala, že je postřik stabilní ve všech skladovacích podmínkách. Díky srovnatelné účinnosti postřiků založených na chmelové a tymiánové silici s konvenčními přípravky a potvrzené stabilitě jsou postřiky vhodné pro používání v alternativní ochraně chmele.

8 Seznam literatury

- Al-Asmari AK, Athar MT, Al-Faraidy AA, Almuhaiza MS. 2017. Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **7**:147-150.
- Aleksovski SA, Sovova H, Poposka FA. 2001. Extraction of thyme oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction. *Acta Pharmaceutica* **51**.
- Almaguer C, Gastl M, Arendt EK, Becker T. 2015. Comparative Study of the Contribution of Hop (*Humulus lupulus* L.) Hard Resins Extracted from Different Hop Varieties to Beer Quality Parameters. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **73**:115-123.
- Almaguer C, Schönberger C, Gastl M, Arendt EK, Becker T. 2014. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing* **120**:289-314.
- Altová M. 2020. Situační a výhledová zpráva chmel, pivo. Ministerstvo zemědělství, Praha
- Amini, M., Safaie, N., Salmani, M. J., & Shams-Bakhsh, M. (2012). Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. *Trakia J Sci*, *10*(1), 1-8.
- Arioli T, Mattner SW, Winberg PC. 2015. Applications of seaweed extracts in Australian agriculture: past, present and future. *Journal of applied phycology* **27**:2007-2015.
- Azar PA, Nekoei M, Larijani K, Bahraminasab S. 2011. Chemical composition of the essential oils of *Citrus sinensis* cv. Valencia and a quantitative structure-retention relationship study for the prediction of retention indices by multiple linear regression. *Journal of the Serbian Chemical Society* **76**:1627-1637.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**:446-475.
- Baritoux O, Richard H, Touche J, Derbesy M. 1992. Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. Part I. Basil, *ocimum basilicum* L. *Flavour and Fragrance Journal* **7**:267-271.
- Basařová G. 2010. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Vydavatelství VŠCHT, Praha.
- Bocquet L, Rivière C, Dermont C, Samaillie J, Hilbert J-L, Halama P, Siah A, Sahpaz S. 2018. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Industrial Crops and Products* **122**:290-297.
- El- Ishaq, A., M. Tijjani a M. Katuzu, 2011. EXTRACTION OF LIMONENE FROM ORANGE PEEL [online]. 2011, 10 [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/282843770 EXTRACTION OF LIMONENE FR OM ORANGE PEEL](https://www.researchgate.net/publication/282843770_EXTRACTION_OF_LIMONENE_FR_OM_ORANGE_PEEL)
- Eyres G, Dufour J-P. 2009. 22 - Hop Essential Oil: Analysis, Chemical Composition and Odor Characteristics. Pages 239-254 in Preedy VR, editor. *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press, San Diego.
- Fishel F. University of Missouri. 2001. Temperature Effects on Storage of Agricultural Pesticides. University of Missouri, Department of Agronomy. Available from: <https://extension.missouri.edu/publications/g1921> (accessed April 2021)
- Gent DH, Block M, Claassen BJ. 2020. High Levels of Insensitivity to Phosphonate Fungicides in *Pseudoperonospora humuli*. *Plant Dis* **104**:1400-1406.

- Gharieb MI, Ali MI, El-Shoura AA. 2004. Transformation of Copper Oxochloride Fungicide into Copper Oxalate by Tolerant Fungi and the Effect of Nitrogen Source on Tolerance. *Biodegradation* **15**:49-57.
- Hajimehdipoor H, Shekarchi M, Khanavi M, Adib N, Amri M. 2010. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy magazine* **6**:154-158.
- Hay, R., P. Waterman, ed., 1993. *Volatile Oil Crops – their biology, biochemistry*. 1. Essex: Hbk Longman Group UK Ltd PO Box 88, Fourth Avenue Harlow, Essex CM19 5AA, UK. ISBN 0-582-07867-9.
- Holdt SL, Kraan S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* **23**:543-597.
- Holý K, Procházka P, Štranc J, Štranc D, Štranc P. 2017. *Integrovaná ochrana chmele. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha*.
- Hu, Z. M., C. Fraser, eds., 2016. *Seaweed Phylogeography* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands [cit. 2018-02-12]. ISBN 978-94-017-7532-8.
- Jankura E, Lakatošová J, Sák M, Máleková E. 2015. Direct antifungal effect of Algisure. NPPC - Research Institute of Viticulture and Enology, Rovinka. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Ervin_Jankura2/publication/283075691_Direct_antifungal_effect_of_AlgisureR/links/565ee71608aeafc2aac92782.pdf (březen 2021)
- Jayaraman J, Norrie J, Punja ZK. 2011. Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. *Journal of Applied Phycology* **23**:353-361.
- Kosař K. 2000. *Technologie výroby sladu a piva. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha*.
- Karabin M, Hudcova T, Jelinek L, Dostalek P. 2015. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances* **33**:1063-1090.
- Krofta K, Jezek J, Kudrna T. 2011. Content of elementary copper in hops after repeated applications of copper fungicides. *Kvasny Prumysl* **57**:417-423.
- Krofta K, Mikyska A. 2014. Beta kyseliny chmele, vyznam a vyuziti. *Kvasny Prumysl* **60**:96-105.
- Krofta K, Vrabcova S, Mikyska A, Jurkova M. 2013a. The effect of hop beta acids oxidation products on beer bitterness. *Kvasny Prumysl* **59**:306-312.
- Krofta K, Vrabcova S, Mikyska A, Jurkova M, Cajka T, Hajslova J. 2013b. Stability of Hop Beta Acids and Their Decomposition Products during Natural Ageing. *iii International Humulus Symposium* **1010**:221-230.
- Krofta K. 2012. *Integrovaný systém pěstování chmele. Petr Svoboda, [Žatec]*.
- Lawrence BM. 2002. Commercial essential oils: Truths and consequences. Pages 57-83 in Swift KAD, editor. *Advances in Flavours and Fragrances: From the Sensation To the Synthesis*. The Royal Society of Chemistry.
- Lawrencet BM. 2001. Essential oils: From Agriculture to chemistry. *International Journal of Aromatherapy* **10**:82-98.
- Liu YM, Lu N, Tang J. 2019. Synthesis, characterization, crystal structure, and antioxidant activity of hexahydro-beta-acids. *Journal of Molecular Structure* **1175**:721-727.

- Mandal S, DebMandal M. 2016. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oils. Pages 825-834. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier.
- Mikyska A, Vrzal T, Dusek M, Jurkova M. 2018. Factors affecting the polyphenol compounds and antiradical activity of hops: Long-term study of Czech hop varieties. *Kvasny Prumysl* **64**:323-330.
- Moghaddam M, Mehdizadeh L. 2020. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* Grown in Iran against Some Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **23**:1072-1083.
- Morimoto M, Kishimoto T, Kobayashi M, Yako N, Iida A, Wanikawa A, Kitagawa Y. 2010. Effects of Bordeaux Mixture (Copper Sulfate) Treatment on Blackcurrant/Muscat-Like Odors in Hops and Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **68**:30-33.
- Nasirullah, Nagaraja KV. 1989. Oxidative Rancidity in Refined Sunflower Oil with Respect to Storage Variation. *Lipid / Fett* **91**:80-82.
- Norrie J, Keathley JP. 2006. Benefits of *Ascophyllum nodosum* marine-plant extract applications to 'Thompson Seedless' grape production. *Proceedings of the Xth International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production*:243-+.
- OECD. 2015. GUIDANCE DOCUMENT FOR STORAGE STABILITY TESTING OF PLANT PROTECTION AND BIOCIDAL PRODUCTS -GUIDANCE USED IN SUPPORT OF PRE-REGISTRATION DATA REQUIREMENTS FOR PLANT PROTECTION AND BIOCIDAL END-USE PRODUCTS. Available from: [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2015\)32&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2015)32&doclanguage=en) (accessed april 2021)
- Oladokun O, Smart K, Cook D. 2016. An improved HPLC method for single-run analysis of the spectrum of hop bittering compounds usually encountered in beers. *Journal of the Institute of Brewing* **122**:11-20.
- Prochazka P, Stranc P, Pazderu K, Vostrel J, Rehor J. 2018. Use of biologically active substances in hops. *Plant Soil and Environment* **64**:626-632.
- Procházka P, Fraňková A, Řehoř J, Vostřel J, Tauchen J. 2021. Použití chmelového extraktu a tymiánové silice v ochraně chmele proti plísni chmelové: metodika pro praxi. Kurent, České Budějovice.
- Prugar J. 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, Praha.
- Rajeswara Rao B. 2002. Water soluble fractions of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) essential oil. *Bioresource Technology* **84**:243-246.
- Ramadan, Mohamed & Ateya, Izat & Said, Shima. (2016). Storage Effect on Degradation of Copper Fungicide and its Relevant Impurities. 12-16.
- Rowshan V, Bahmanzadegan A, Saharkhiz MJ. 2013. Influence of storage conditions on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products* **49**:97-101.
- Rychla K, Katrnak M, Psota V. 2012. THE TREATMENT EFFECT WITH ALGINURE ON APPLE TREE INFECTION BY *VENTURIA INAEQUALIS*. *Mendelnet* **2012**:168-177.
- Řehoř J, Procházka P, Vostřel J, Fraňková A. 2018. Vliv aplikace biopesticidů na obsah

chlorofylu v listech chmele. *Úroda* 66:94-95.

Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr* **55**:304-318.

Shabnum, S., Wagay, G. M. 2011. Essential Oil Composition of *Thymus Vulgaris* L. and their Uses. *Journal of Research & Development* [online]. 2011(11), 12 [cit. 2021-13-02]. ISSN 0972-5407. Dostupné z: <http://www.agroresearchinternational.com/wp-content/uploads/2017/11/Essential-Oil-Composition.pdf>

Skomra, U., & Koziara-Ciupa, M. (2020). Stability of the hop bitter acids during long-term storage of cones with different maturity degree. *Polish Journal of Agronomy*, (40), pp. 16-24.

Turek C, Stintzing FC. 2013. Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**:40-53.

Unal MU, Ucan F, Sener A, Dincer S. 2012. Research on antifungal and inhibitory effects of DL-limonene on some yeasts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **36**:576-582.

Verzele M, De Keukeleire D 1991. *Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids*. Elsevier, New York.

Vostřel J, Procházka P, Řehoř J, Fraňková A. 2018. Vliv biopesticidů na obsah alfa hořkých kyselin ve chmelu. *Úroda* 66: 76-77.

Vostřel J. 2008. *Metodika ochrany hybridních odrůd chmele proti peronospoře chmelové (Peronoplasmopara humuli Miy et Tak., Wils.)*. Chmelařský institut, Žatec.

XiaoMing C, Ying F, Hong Z, ZhiYong C. 2010. *Review of the nutritive value of edible insects*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

9 Samostatné přílohy

Příloha 1: Tabulky průměrných hodnot látek zastoupených v silici chmelového postřiku skladovaného při 6 °C se statistickým hodnocením.

| umístění | den | alfa pinen | SD | kamfem | SD | beta pinen | SD | myrcen | SD | limonen | SD | ocimen | SD | linalool ^a | SD | kopaen ^a | SD |
|----------|-----|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|-----------------------|--------|---------------------|--------|
| 25 °C | 0 | 0,1556 | 0,0028 | 0,0188 | 0,0006 | 0,0194 | 0,0007 | 0,4211 | 0,0125 | 0,1121 | 0,0801 | 0,0299 | 0,0008 | 0,0115 | 0,0012 | 0,0080 | 0,0026 |
| 25 °C | 7 | 0,1078 | 0,0084 | 0,0158 | 0,0009 | 0,0149 | 0,0029 | 0,2869 | 0,0121 | 0,1128 | 0,0038 | 0,0080 | 0,0097 | 0,0042 | 0,0007 | 0,0141 | 0,0004 |
| 6 °C | 7 | 0,1237 | 0,0129 | 0,0148 | 0,0023 | 0,0165 | 0,0036 | 0,3474 | 0,0233 | 0,1335 | 0,0120 | 0,0180 | 0,0115 | 0,0030 | 0,0003 | 0,0115 | 0,0005 |
| 40 °C | 7 | 0,1159 | 0,0118 | 0,0172 | 0,0022 | 0,0151 | 0,0014 | 0,3372 | 0,0122 | 0,1337 | 0,0039 | 0,0174 | 0,0135 | 0,0045 | 0,0004 | 0,0128 | 0,0011 |
| 25 °C | 21 | 0,1135 | 0,0104 | 0,0136 | 0,0004 | 0,0131 | 0,0037 | 0,2778 | 0,0132 | 0,1107 | 0,0054 | 0,0212 | 0,0005 | 0,0140 | 0,0012 | 0,0119 | 0,0008 |
| 6 °C | 21 | 0,1186 | 0,0059 | 0,0172 | 0,0023 | 0,0153 | 0,0005 | 0,3410 | 0,0148 | 0,1373 | 0,0066 | 0,0252 | 0,0028 | 0,0162 | 0,0013 | 0,0119 | 0,0007 |
| 40 °C | 21 | 0,1275 | 0,0086 | 0,0194 | 0,0031 | 0,0176 | 0,0044 | 0,3345 | 0,0321 | 0,1289 | 0,0145 | 0,0271 | 0,0018 | 0,0211 | 0,0011 | 0,0274 | 0,0275 |
| 25 °C | 35 | 0,1161 | 0,0156 | 0,0158 | 0,0010 | 0,0153 | 0,0034 | 0,3048 | 0,0283 | 0,1129 | 0,0072 | 0,0228 | 0,0014 | 0,0128 | 0,0013 | 0,0126 | 0,0009 |
| 6 °C | 35 | 0,1174 | 0,0066 | 0,0136 | 0,0046 | 0,0196 | 0,0015 | 0,3700 | 0,0153 | 0,1515 | 0,0036 | 0,0271 | 0,0014 | 0,0126 | 0,0008 | 0,0114 | 0,0007 |
| 40 °C | 35 | 0,1578 | 0,0132 | 0,0202 | 0,0061 | 0,0203 | 0,0014 | 0,3066 | 0,0119 | 0,1264 | 0,0083 | 0,0218 | 0,0011 | 0,0115 | 0,0002 | 0,0144 | 0,0013 |

| neidentifik. 1 | SD | beta karyofylen | SD | humulen | SD | gamma muurolen ^a | SD | neidentifik.2 | SD | neidentifik. 3 ^a | SD | kubeben | SD |
|----------------|--------|-----------------|--------|---------------|--------|-----------------------------|--------|---------------|--------|-----------------------------|--------|---------------|--------|
| 0,0439 | 0,0123 | 0,0294 | 0,0079 | 0,0971 | 0,0279 | 0,0217 | 0,0061 | 0,0024 | 0,0004 | 0,0176 | 0,0044 | 0,0116 | 0,0024 |
| 0,0697 | 0,0016 | 0,0513 | 0,0005 | 0,1991 | 0,0075 | 0,0482 | 0,0029 | 0,0051 | 0,0004 | 0,0373 | 0,0022 | 0,0247 | 0,0012 |
| 0,0587 | 0,0051 | 0,0404 | 0,0029 | 0,1456 | 0,0157 | 0,0358 | 0,0032 | 0,0036 | 0,0011 | 0,0284 | 0,0037 | 0,0191 | 0,0028 |
| 0,0643 | 0,0029 | 0,0431 | 0,0033 | 0,1534 | 0,0077 | 0,0357 | 0,0023 | 0,0039 | 0,0007 | 0,0266 | 0,0018 | 0,0191 | 0,0018 |
| 0,0630 | 0,0020 | 0,0515 | 0,0034 | 0,2001 | 0,0140 | 0,0459 | 0,0044 | 0,0043 | 0,0007 | 0,0342 | 0,0034 | 0,0251 | 0,0005 |
| 0,0597 | 0,0044 | 0,0412 | 0,0026 | 0,1436 | 0,0161 | 0,0298 | 0,0048 | 0,0029 | 0,0004 | 0,0218 | 0,0028 | 0,0183 | 0,0032 |
| 0,0563 | 0,0058 | 0,0372 | 0,0007 | 0,1291 | 0,0038 | 0,0304 | 0,0019 | 0,0029 | 0,0003 | 0,0223 | 0,0012 | 0,0184 | 0,0018 |
| 0,0653 | 0,0063 | 0,0477 | 0,0040 | 0,1768 | 0,0278 | 0,0403 | 0,0069 | 0,0038 | 0,0006 | 0,0288 | 0,0036 | 0,0223 | 0,0035 |
| 0,0584 | 0,0024 | 0,0375 | 0,0027 | 0,1237 | 0,0099 | 0,0254 | 0,0027 | 0,0025 | 0,0004 | 0,0166 | 0,0017 | 0,0126 | 0,0018 |
| 0,0696 | 0,0046 | 0,0427 | 0,0027 | 0,1421 | 0,0140 | 0,0304 | 0,0046 | 0,0023 | 0,0020 | 0,0209 | 0,0042 | 0,0149 | 0,0017 |

*a: značí statisticky významné rozdíly s pravděpodobností $p < 0,05$.

Příloha 2: Tabulky průměrných hodnot látek zastoupených v silici chmelového postřiku se statistickým hodnocením po 35 dnech skladování.

| umístění | den | alfa pinen ^a | SD | kamfen | SD | beta pinen | SD | myrcen ^a | SD | limonen ^a | SD | ocimen ^a | SD | linalool | SD | kopaen ^a | SD |
|----------|-----|-------------------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------------|--------|----------------------|--------|---------------------|--------|---------------|--------|---------------------|--------|
| 25 °C | 0 | 0,1556 | 0,0028 | 0,0188 | 0,0006 | 0,0194 | 0,0007 | 0,4211 | 0,0125 | 0,1121 | 0,0801 | 0,0299 | 0,0008 | 0,0115 | 0,0012 | 0,0080 | 0,0026 |
| 25 °C | 7 | 0,1078 | 0,0084 | 0,0158 | 0,0009 | 0,0149 | 0,0029 | 0,2869 | 0,0121 | 0,1128 | 0,0038 | 0,0080 | 0,0097 | 0,0042 | 0,0007 | 0,0141 | 0,0004 |
| 6 °C | 7 | 0,1237 | 0,0129 | 0,0148 | 0,0023 | 0,0165 | 0,0036 | 0,3474 | 0,0233 | 0,1335 | 0,0120 | 0,0180 | 0,0115 | 0,0030 | 0,0003 | 0,0115 | 0,0005 |
| 40 °C | 7 | 0,1159 | 0,0118 | 0,0172 | 0,0022 | 0,0151 | 0,0014 | 0,3372 | 0,0122 | 0,1337 | 0,0039 | 0,0174 | 0,0135 | 0,0045 | 0,0004 | 0,0128 | 0,0011 |
| 25 °C | 21 | 0,1135 | 0,0104 | 0,0136 | 0,0004 | 0,0131 | 0,0037 | 0,2778 | 0,0132 | 0,1107 | 0,0054 | 0,0212 | 0,0005 | 0,0140 | 0,0012 | 0,0119 | 0,0008 |
| 6 °C | 21 | 0,1186 | 0,0059 | 0,0172 | 0,0023 | 0,0153 | 0,0005 | 0,3410 | 0,0148 | 0,1373 | 0,0066 | 0,0252 | 0,0028 | 0,0162 | 0,0013 | 0,0119 | 0,0007 |
| 40 °C | 21 | 0,1275 | 0,0086 | 0,0194 | 0,0031 | 0,0176 | 0,0044 | 0,3345 | 0,0321 | 0,1289 | 0,0145 | 0,0271 | 0,0018 | 0,0211 | 0,0011 | 0,0274 | 0,0275 |
| 25 °C | 35 | 0,1161 | 0,0156 | 0,0158 | 0,0010 | 0,0153 | 0,0034 | 0,3066 | 0,0283 | 0,1129 | 0,0072 | 0,0228 | 0,0014 | 0,0128 | 0,0013 | 0,0126 | 0,0009 |
| 6 °C | 35 | 0,1174 | 0,0066 | 0,0136 | 0,0046 | 0,0196 | 0,0015 | 0,3700 | 0,0153 | 0,1515 | 0,0036 | 0,0271 | 0,0014 | 0,0126 | 0,0008 | 0,0114 | 0,0007 |
| 40 °C | 35 | 0,1578 | 0,0132 | 0,0202 | 0,0061 | 0,0203 | 0,0014 | 0,3048 | 0,0119 | 0,1264 | 0,0083 | 0,0218 | 0,0011 | 0,0115 | 0,0002 | 0,0144 | 0,0013 |

| neidentifik. 1 | SD | beta karyofylen ^a | SD | humulen ^a | SD | gamma muurolen ^a | SD | neidentifik.2 | SD | neidentifik. 3 ^a | SD | kubeben ^a | SD |
|----------------|--------|------------------------------|--------|----------------------|--------|-----------------------------|--------|---------------|--------|-----------------------------|--------|----------------------|--------|
| 0,0439 | 0,0123 | 0,0294 | 0,0079 | 0,0971 | 0,0279 | 0,0217 | 0,0061 | 0,0024 | 0,0004 | 0,0176 | 0,0044 | 0,0116 | 0,0024 |
| 0,0697 | 0,0016 | 0,0513 | 0,0005 | 0,1991 | 0,0075 | 0,0482 | 0,0029 | 0,0051 | 0,0004 | 0,0373 | 0,0022 | 0,0247 | 0,0012 |
| 0,0587 | 0,0051 | 0,0404 | 0,0029 | 0,1456 | 0,0157 | 0,0358 | 0,0032 | 0,0036 | 0,0011 | 0,0284 | 0,0037 | 0,0191 | 0,0028 |
| 0,0643 | 0,0029 | 0,0431 | 0,0033 | 0,1534 | 0,0077 | 0,0357 | 0,0023 | 0,0039 | 0,0007 | 0,0266 | 0,0018 | 0,0191 | 0,0018 |
| 0,0630 | 0,0020 | 0,0515 | 0,0034 | 0,2001 | 0,0140 | 0,0459 | 0,0044 | 0,0043 | 0,0007 | 0,0342 | 0,0034 | 0,0251 | 0,0005 |
| 0,0597 | 0,0044 | 0,0412 | 0,0026 | 0,1436 | 0,0161 | 0,0298 | 0,0048 | 0,0029 | 0,0004 | 0,0218 | 0,0028 | 0,0183 | 0,0032 |
| 0,0563 | 0,0058 | 0,0372 | 0,0007 | 0,1291 | 0,0038 | 0,0304 | 0,0019 | 0,0029 | 0,0003 | 0,0223 | 0,0012 | 0,0184 | 0,0018 |
| 0,0653 | 0,0063 | 0,0477 | 0,0040 | 0,1768 | 0,0278 | 0,0403 | 0,0069 | 0,0038 | 0,0006 | 0,0288 | 0,0036 | 0,0223 | 0,0035 |
| 0,0584 | 0,0024 | 0,0375 | 0,0027 | 0,1237 | 0,0099 | 0,0254 | 0,0027 | 0,0025 | 0,0004 | 0,0166 | 0,0017 | 0,0126 | 0,0018 |
| 0,0696 | 0,0046 | 0,0427 | 0,0027 | 0,1421 | 0,0140 | 0,0304 | 0,0046 | 0,0023 | 0,0020 | 0,0209 | 0,0042 | 0,0149 | 0,0017 |

*a: značí statisticky významné rozdíly s pravděpodobností p<0,05

Příloha 3: Tabulky průměrných hodnot látek zastoupených v silici tymiánového postřiku se statistickým hodnocením po 21 dnech skladování.

| umístění | den | alfa pinen | SD | kamfen | SD | myrcen ^a | SD | p cymen | SD | cineol ^a | SD | gamma terpinen ^a | SD | alfa trepinolen ^a | SD | beta terpinolen ^a | SD |
|----------|-----|---------------|--------|---------------|--------|---------------------|--------|---------------|--------|---------------------|--------|-----------------------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|
| 25 °C | 0 | 0,0542 | 0,0014 | 0,0460 | 0,0043 | 0,0973 | 0,0110 | 0,3455 | 0,0455 | 0,0003 | 0,0004 | 0,1031 | 0,0113 | 0,1040 | 0,0115 | 0,0654 | 0,0560 |
| 25 °C | 7 | 0,0243 | 0,0059 | 0,0299 | 0,0067 | 0,0806 | 0,0135 | 0,4481 | 0,0165 | 0,0090 | 0,0012 | 0,1241 | 0,0143 | 0,0007 | 0,0001 | 0,0012 | 0,0004 |
| 6 °C | 7 | 0,0200 | 0,0007 | 0,0242 | 0,0005 | 0,0723 | 0,0030 | 0,4852 | 0,0112 | 0,0074 | 0,0005 | 0,1180 | 0,0047 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0009 | 0,0001 |
| 40 °C | 7 | 0,0186 | 0,0017 | 0,0223 | 0,0018 | 0,0646 | 0,0034 | 0,5039 | 0,0061 | 0,0071 | 0,0002 | 0,1065 | 0,0010 | 0,0004 | 0,0000 | 0,0008 | 0,0001 |
| 25 °C | 21 | 0,0231 | 0,0001 | 0,0283 | 0,0004 | 0,0872 | 0,0039 | 0,4774 | 0,0142 | 0,0089 | 0,0012 | 0,1636 | 0,0061 | 0,0011 | 0,0001 | 0,0019 | 0,0002 |
| 6 °C | 21 | 0,0251 | 0,0030 | 0,0296 | 0,0045 | 0,0961 | 0,0104 | 0,4979 | 0,0082 | 0,0057 | 0,0005 | 0,1572 | 0,0046 | 0,0011 | 0,0001 | 0,0016 | 0,0002 |
| 40 °C | 21 | 0,0225 | 0,0013 | 0,0259 | 0,0023 | 0,0743 | 0,0059 | 0,4730 | 0,0108 | 0,0084 | 0,0005 | 0,1354 | 0,0097 | 0,0008 | 0,0001 | 0,0012 | 0,0001 |
| 25 °C | 35 | 0,0181 | 0,0015 | 0,0225 | 0,0027 | 0,0717 | 0,0012 | 0,4107 | 0,0296 | 0,0135 | 0,0011 | 0,1482 | 0,0016 | 0,0010 | 0,0001 | 0,0016 | 0,0001 |
| 6 °C | 35 | 0,0172 | 0,0015 | 0,0202 | 0,0031 | 0,0660 | 0,0068 | 0,4332 | 0,0225 | 0,0112 | 0,0009 | 0,1395 | 0,0094 | 0,0009 | 0,0001 | 0,0015 | 0,0002 |
| 40 °C | 35 | 0,0187 | 0,0019 | 0,0225 | 0,0031 | 0,0644 | 0,0086 | 0,4559 | 0,0149 | 0,0110 | 0,0007 | 0,1281 | 0,0139 | 0,0007 | 0,0001 | 0,0012 | 0,0001 |

| linalool ^a | SD | kamfor ^a | SD | iso borneol ^a | SD | endoborneol ^a | SD | terpineol ^a | SD | thymol ^a | SD | karvakrol ^a | SD | beta karyo fylen | SD |
|-----------------------|--------|---------------------|--------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|------------------------|--------|---------------------|--------|------------------------|--------|------------------|--------|
| 0,0137 | 0,0023 | 0,0019 | 0,0003 | 0,0019 | 0,0003 | 0,0012 | 0,0003 | 0,0010 | 0,0002 | 0,1237 | 0,0250 | 0,0394 | 0,0489 | 0,0015 | 0,0003 |
| 0,0398 | 0,0042 | 0,0097 | 0,0007 | 0,0041 | 0,0005 | 0,0029 | 0,0004 | 0,0025 | 0,0003 | 0,2049 | 0,0438 | 0,0158 | 0,0037 | 0,0023 | 0,0004 |
| 0,0351 | 0,0023 | 0,0080 | 0,0005 | 0,0037 | 0,0002 | 0,0026 | 0,0001 | 0,0022 | 0,0001 | 0,2036 | 0,0074 | 0,0141 | 0,0007 | 0,0021 | 0,0001 |
| 0,0329 | 0,0016 | 0,0079 | 0,0006 | 0,0034 | 0,0002 | 0,0025 | 0,0001 | 0,0022 | 0,0001 | 0,2112 | 0,0042 | 0,0137 | 0,0008 | 0,0020 | 0,0001 |
| 0,0313 | 0,0029 | 0,0073 | 0,0008 | 0,0032 | 0,0003 | 0,0021 | 0,0002 | 0,0019 | 0,0001 | 0,1502 | 0,0007 | 0,0108 | 0,0007 | 0,0018 | 0,0001 |
| 0,0238 | 0,0021 | 0,0055 | 0,0005 | 0,0025 | 0,0003 | 0,0017 | 0,0002 | 0,0015 | 0,0002 | 0,1399 | 0,0161 | 0,0093 | 0,0011 | 0,0016 | 0,0002 |
| 0,0346 | 0,0025 | 0,0081 | 0,0006 | 0,0036 | 0,0003 | 0,0025 | 0,0003 | 0,0022 | 0,0002 | 0,1918 | 0,0232 | 0,0139 | 0,0023 | 0,0020 | 0,0003 |
| 0,0510 | 0,0077 | 0,0126 | 0,0019 | 0,0053 | 0,0008 | 0,0037 | 0,0007 | 0,0033 | 0,0006 | 0,2139 | 0,0144 | 0,0200 | 0,0049 | 0,0029 | 0,0006 |
| 0,0446 | 0,0053 | 0,0106 | 0,0013 | 0,0045 | 0,0005 | 0,0032 | 0,0004 | 0,0029 | 0,0004 | 0,2237 | 0,0287 | 0,0180 | 0,0045 | 0,0028 | 0,0004 |
| 0,0415 | 0,0051 | 0,0100 | 0,0012 | 0,0044 | 0,0006 | 0,0029 | 0,0004 | 0,0026 | 0,0004 | 0,2185 | 0,0305 | 0,0156 | 0,0024 | 0,0020 | 0,0003 |

*a: značí statisticky významné rozdíly s pravděpodobností p<0,05.

Příloha 4: Tabulky průměrných hodnot látek zastoupených v silici tymiánového postřiku skladovaného při 25 °C se statistickým hodnocením.

| umístění | den | alfa pinen | SD | kamfen | SD | myrcen | SD | p cymen ^a | SD | cineol ^a | SD | gamma terpinen ^a | SD | alfa trepinolen ^a | SD | beta terpinolen ^a | SD |
|----------|-----|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|----------------------|--------|---------------------|--------|-----------------------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|
| 25 °C | 0 | 0,0542 | 0,0014 | 0,0460 | 0,0043 | 0,0973 | 0,0110 | 0,3455 | 0,0455 | 0,0003 | 0,0004 | 0,1031 | 0,0113 | 0,1040 | 0,0115 | 0,0654 | 0,0560 |
| 25 °C | 7 | 0,0243 | 0,0059 | 0,0299 | 0,0067 | 0,0806 | 0,0135 | 0,4481 | 0,0165 | 0,0090 | 0,0012 | 0,1241 | 0,0143 | 0,0007 | 0,0001 | 0,0012 | 0,0004 |
| 6 °C | 7 | 0,0200 | 0,0007 | 0,0242 | 0,0005 | 0,0723 | 0,0030 | 0,4852 | 0,0112 | 0,0074 | 0,0005 | 0,1180 | 0,0047 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0009 | 0,0001 |
| 40 °C | 7 | 0,0186 | 0,0017 | 0,0223 | 0,0018 | 0,0646 | 0,0034 | 0,5039 | 0,0061 | 0,0071 | 0,0002 | 0,1065 | 0,0010 | 0,0004 | 0,0000 | 0,0008 | 0,0001 |
| 25 °C | 21 | 0,0231 | 0,0001 | 0,0283 | 0,0004 | 0,0872 | 0,0039 | 0,4774 | 0,0142 | 0,0089 | 0,0012 | 0,1636 | 0,0061 | 0,0011 | 0,0001 | 0,0019 | 0,0002 |
| 6 °C | 21 | 0,0251 | 0,0030 | 0,0296 | 0,0045 | 0,0961 | 0,0104 | 0,4979 | 0,0082 | 0,0057 | 0,0005 | 0,1572 | 0,0046 | 0,0011 | 0,0001 | 0,0016 | 0,0002 |
| 40 °C | 21 | 0,0225 | 0,0013 | 0,0259 | 0,0023 | 0,0743 | 0,0059 | 0,4730 | 0,0108 | 0,0084 | 0,0005 | 0,1354 | 0,0097 | 0,0008 | 0,0001 | 0,0012 | 0,0001 |
| 25 °C | 35 | 0,0181 | 0,0015 | 0,0225 | 0,0027 | 0,0717 | 0,0012 | 0,4107 | 0,0296 | 0,0135 | 0,0011 | 0,1482 | 0,0016 | 0,0010 | 0,0001 | 0,0016 | 0,0001 |
| 6 °C | 35 | 0,0172 | 0,0015 | 0,0202 | 0,0031 | 0,0660 | 0,0068 | 0,4332 | 0,0225 | 0,0112 | 0,0009 | 0,1395 | 0,0094 | 0,0009 | 0,0001 | 0,0015 | 0,0002 |
| 40 °C | 35 | 0,0187 | 0,0019 | 0,0225 | 0,0031 | 0,0644 | 0,0086 | 0,4559 | 0,0149 | 0,0110 | 0,0007 | 0,1281 | 0,0139 | 0,0007 | 0,0001 | 0,0012 | 0,0001 |

| linalool ^a | SD | kamfor ^a | SD | iso borneol ^a | SD | endoborneol ^a | SD | terpineol ^a | SD | thymol | SD | karvakrol | SD | beta karyo fylen ^a | SD |
|-----------------------|--------|---------------------|--------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|------------------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|-------------------------------|--------|
| 0,0137 | 0,0023 | 0,0019 | 0,0003 | 0,0019 | 0,0003 | 0,0012 | 0,0003 | 0,0010 | 0,0002 | 0,1237 | 0,0250 | 0,0394 | 0,0489 | 0,0015 | 0,0003 |
| 0,0398 | 0,0042 | 0,0097 | 0,0007 | 0,0041 | 0,0005 | 0,0029 | 0,0004 | 0,0025 | 0,0003 | 0,2049 | 0,0438 | 0,0158 | 0,0037 | 0,0023 | 0,0004 |
| 0,0351 | 0,0023 | 0,0080 | 0,0005 | 0,0037 | 0,0002 | 0,0026 | 0,0001 | 0,0022 | 0,0001 | 0,2036 | 0,0074 | 0,0141 | 0,0007 | 0,0021 | 0,0001 |
| 0,0329 | 0,0016 | 0,0079 | 0,0006 | 0,0034 | 0,0002 | 0,0025 | 0,0001 | 0,0022 | 0,0001 | 0,2112 | 0,0042 | 0,0137 | 0,0008 | 0,0020 | 0,0001 |
| 0,0313 | 0,0029 | 0,0073 | 0,0008 | 0,0032 | 0,0003 | 0,0021 | 0,0002 | 0,0019 | 0,0001 | 0,1502 | 0,0007 | 0,0108 | 0,0007 | 0,0018 | 0,0001 |
| 0,0238 | 0,0021 | 0,0055 | 0,0005 | 0,0025 | 0,0003 | 0,0017 | 0,0002 | 0,0015 | 0,0002 | 0,1399 | 0,0161 | 0,0093 | 0,0011 | 0,0016 | 0,0002 |
| 0,0346 | 0,0025 | 0,0081 | 0,0006 | 0,0036 | 0,0003 | 0,0025 | 0,0003 | 0,0022 | 0,0002 | 0,1918 | 0,0232 | 0,0139 | 0,0023 | 0,0020 | 0,0003 |
| 0,0510 | 0,0077 | 0,0126 | 0,0019 | 0,0053 | 0,0008 | 0,0037 | 0,0007 | 0,0033 | 0,0006 | 0,2139 | 0,0144 | 0,0200 | 0,0049 | 0,0029 | 0,0006 |
| 0,0446 | 0,0053 | 0,0106 | 0,0013 | 0,0045 | 0,0005 | 0,0032 | 0,0004 | 0,0029 | 0,0004 | 0,2237 | 0,0287 | 0,0180 | 0,0045 | 0,0028 | 0,0004 |
| 0,0415 | 0,0051 | 0,0100 | 0,0012 | 0,0044 | 0,0006 | 0,0029 | 0,0004 | 0,0026 | 0,0004 | 0,2185 | 0,0305 | 0,0156 | 0,0024 | 0,0020 | 0,0003 |

*a: značí statisticky významné rozdíly s pravděpodobností p<0,05