

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Vliv alternativních fungicidních přípravků na kvalitativní
vlastnosti chmelových hlávek**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tereza Roubicová

Obor studia: Výživa a potraviny (AMD)

Vedoucí práce: Ing. Adéla Fraňková, PhD.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv alternativních fungicidních přípravků na kvalitativní vlastnosti chmelových hlávek" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. dubna 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Adéle Fraňkové, PhD. za odborné vedení, cenné rady, vstřícný přístup a čas, který mi během zpracování této práce věnovala. Dále děkuji Ing. Janu Tauchenovi, PhD. za podporu během realizace experimentů.

Vliv alternativních fungicidních přípravků na kvalitativní vlastnosti chmelových hlávek

Souhrn

Chmel je významnou surovinou v pivovarství, pro jejíž pěstování je důležité omezit výskyt houbové choroby peronospory chmelové (*Pseudoperonospora humuli* Miy. et Tak.). V současnosti se na ochranu proti peronospoře využívají především měďnaté fungicidy, jejichž používání bylo výrazně omezenou legislativou. Při hledání alternativ k měďnatým přípravkům je potřeba testovat nejen jejich účinnost proti patogenům, ale také jejich vliv na obsah biologicky aktivních látek chmele. Podle dostupné literatury zatím nejsou k dispozici informace o vlivu alternativ na obsahové látky chmele. Předkládaná práce se proto zabývá hodnocením kvality alternativně ošetřených chmelových hlávek z pivovarského hlediska.

Byl sledován obsah α -hořkých a β -hořkých kyselin a také obsah a složení chmelových silic v závislosti na ošetření chmele. Výzkum zahrnoval šest variant ošetření chmele odrůdy Žatecký poloraný červeňák. Z celkem šesti variant ošetření chmele zahrnovaly tři z nich alternativní přípravky dostupné na trhu Bajkal, Alginure a PrevB2, další dvě tymiánovou silicí a chmelový extrakt, šestá varianta pak byla ošetřena konvenčně. Obsah hořkých kyselin byl analyzován pomocí HPLC-UV/Vis při 280 nm s použitím ICE-3 standardu. Obsah α -hořkých ani β -hořkých kyselin se mezi variantami při sklizni statisticky významně nelišil. Podle průměrných hodnot obsahovala nejvíce hořkých kyselin varianta ošetřená tymiánovou silicí. Poměr α/β hořkých kyselin se pohyboval od 0,56 do 0,74. Obsah silic byl zjištěn destilací vodní parou. Silice byly následně analyzovány pomocí GC-MS pro identifikaci jednotlivých složek silice a pomocí GC-FID pro kvantifikaci těchto sloučenin. Ani v obsahu silic nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi variantami ošetření. Podle průměru obsahovala nejvíce silice varianta ošetřená konvenčně, a to 1,3 ml/100 g sušiny. Zastoupení jednotlivých složek silic bylo typické pro jemně aromatické chmele, které jsou charakteristické vysokým obsahem farnesenu. Varianty ošetřené tymiánovou silicí a chmelovým extraktem obsahovaly farnesenu nejvíce, 34 %. Alternativní přípravky měly na obsahové látky chmele stejný vliv jako konvenční a mají tedy potenciál pro komerční využití.

Klíčová slova: chmel, alternativní fungicidy, kvalitativní vlastnosti chmele

The influence of alternative fungicides on qualitative characteristics of hop

Summary

Hops is the major raw material employed in brewing. For hop cultivation is important to reduce the occurrence of its fungal disease downy mildew (*Pseudoperonospora humuli* Miy. et Tak.). Currently, copper fungicides are mainly used for protection against hop downy mildew but their use has been significantly limited by legislation. When looking for alternatives to copper pesticides, it is necessary to test not only their effectiveness against pathogens but also their influence on the content of biologically active compounds in hops. According to available literature, informations of the impact of alternatives on these compounds are not yet accessible. Therefore, the presented work follows up the evaluation of the quality of alternatively treated hop cones from the brewing point of view.

The content of α -bitter and β -bitter acids as well as content and composition of hop essential oils depending on hops treatment were monitored. The research included six variants of treatment of the Saaz hop variety. From these six variants of hop treatment, three of them were alternative preparations available on the market Bajkal, Algisure and PrevB2, two other were thyme essential oil and hop extract and the sixth variant was treated conventionally. The bitter acid content was analyzed by HPLC-UV/Vis at 280 nm using the ICE-3 standard. The content of α -bitter and β -bitter acids did not differ significantly between the variants at harvest date. According to average values, the thyme oil-treated variant contained the largest amount of bitter acids. The ratio of α/β bitter acids ranged from 0,56 to 0,74. The content of essential oils was determined by steam distillation. The essential oils were subsequently analyzed by GC-MS to identify individual components of the essential oil and by GC-FID to quantify these compounds. No statistically significant differences were found in the content of essential oils between the six variants of treatment. The conventionally-treated variant contained the largest amount of essential oil, 1,3 ml/100 g of dry matter. The composition of the essential oils was typical for the fine aromatic hops, which are characterized by a high content of farnesene. The largest amount of farnesene, 34 %, contained the variants treated with thyme oil and hop extract. Alternative preparations influenced the content of observed hop compounds equally as the conventional ones and thus they have potential for commercial use.

Keywords: hops, alternative fungicides, qualitative characteristics of hop

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíl práce a hypotéza	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Pěstování a spotřeba chmele	9
3.2	Legislativa.....	11
3.3	Chmel otáčivý (<i>Humulus lupulus</i> L.).....	12
3.3.1	Biologická charakteristika chmelové rostliny	12
3.3.2	Peronospora chmelová (<i>Pseudoperonospora humuli</i> Miy. et Tak.)..	13
3.4	Významné látky v chmelových hlávkách	15
3.4.1	Chmelové pryskyřice	15
3.4.1.1	Měkké pryskyřice	16
3.4.1.2	Tvrdé pryskyřice	18
3.4.2	Chmelová silice	19
3.4.2.1	Terpenová frakce	19
3.4.2.2	Terpenoidní frakce.....	20
3.4.2.3	Norizoprenoidy	21
3.4.2.4	Frakce sirných sloučenin	22
3.4.3	Polyfenolové látky chmele	22
3.5	Konvenčně používané fungicidní přípravky.....	24
3.6	Alternativní ošetření chmele	26
4	Metodika.....	28
4.1	Rostlinný materiál.....	28
4.2	Odběr a příprava vzorků	28
4.3	Stanovení obsahu a složení hořkých kyselin	28
4.4	Stanovení obsahu a složení silic	29
4.4.1	Stanovení obsahu silic	29
4.4.2	Stanovení složení silic	31
4.5	Stanovení sušiny	31
4.6	Statistické vyhodnocení dat	32
5	Výsledky.....	33
5.1	Obsah α -hořkých a β -hořkých kyselin.....	33
5.2	Obsah silic.....	39
5.3	Složení silic.....	40
6	Diskuze	45
7	Závěr.....	48
8	Seznam literatury	49
9	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

V počátcích pivovarské historie probíhaly pokusy ochucovat a aromatizovat pivo různými bylinami a kořením, např. rozmarýnem či koriandrem. Postupem času se však osvědčil chmel, což dokazuje již jeden z prvních normativních dokumentů o kvalitě potravin, Bavorské nařízení o čistotě piva z roku 1516, podle něhož se pivo smělo vyrábět pouze z ječmene, vody a chmele. Také proto má chmelařství v německých i českých zemích dlouholetou tradici. V současnosti lze navíc zaznamenat také potenciál chmele jako složky doplňků stravy.

Úskalím při pěstování chmele je častý výskyt choroby peronospory chmelové, která dokáže významně snížit výnos i kvalitu chmelových hlávek. Obvykle se jako ochrana proti peronospoře používají fungicidní přípravky, jejichž účinnou látkou jsou měďnaté sloučeniny. Proto chmelařství zasáhl legislativní krok vedoucí k omezení vstupu mědi do životního prostředí. Nařízení o snížení používání měďnatých fungicidů má velký přínos z hlediska ochrany přírody, nicméně pro pěstitele chmele znamená riziko napadení úrody peronosporou. Výzkum nových ekologicky šetrných přípravků neobsahujících měď se proto jeví jako přínosný z pohledu chmelařů i ochrany životního prostředí. U nově vyvíjených přípravků je stěžejní jak jejich účinnost proti patogenům, tak jejich vliv na obsah a složení biologicky aktivních látek v chmelových hlávkách. Mezi cenné látky chmele patří především α -hořké a β -hořké kyseliny a chmelová silice. České jemně aromatické odrůdy chmele jsou celosvětově ceněny právě díky jedinečně vysokému obsahu β -hořkých kyselin a charakteristickému složení silice. Pro zachování kvality českého chmele i po přechodu na alternativní ošetření je proto důležité sledovat zastoupení těchto látek v chmelových hlávkách.

2 Cíl práce a hypotéza

Cíl práce

Cílem práce je zhodnotit, zda nově vyvíjené fungicidní přípravky mají vliv na obsah α -hořkých a β -hořkých kyselin a na obsah a složení silice v chmelových hlávkách. Pro srovnání zjištěných hodnot slouží varianta ošetřená konvenčními přípravky.

Hypotéza

Alternativní fungicidní přípravky mají pozitivní nebo neutrální vliv na obsah biologicky aktivních látek v chmelových hlávkách v porovnání s konvenční variantou ošetření.

3 Literární rešerše

3.1 Pěstování a spotřeba chmele

Mezi nejvýznamnější pěstitelské oblasti chmele v 90. letech 20. století patřily Hallertau v Německu, jihovýchodní Anglie, Žatecko a Úštěcko v České republice, Slovinsko, státy Washington, Oregon a Kalifornie ve Spojených státech amerických (Verzele & De Keukeleire 1991). Za poslední desetiletí se situace změnila a nyní se k důležitým pěstitelům řadí navíc Čína a Polsko (International Hop Growers' Convention 2018).

Celosvětová plocha chmelnic v současnosti tvoří asi 60 000 ha, ze kterých se v roce 2018 sklídilo 117 633 tun chmele (viz graf 1), což je srovnatelné s předchozím rokem 2017. Od roku 2015 se tak celosvětová pěstební plocha i produkce chmele zvyšuje a v současnosti již dosahuje větších hodnot než v úspěšných letech 2008 a 2009. Česká republika se v pěstování chmele i nadále řadí na třetí místo za Německo a Spojené státy americké (International Hop Growers' Convention 2018).



Graf 1: Celosvětový vývoj pěstební plochy a produkce chmele v letech 2004-2018 (upraveno podle International Hop Growers' Convention, 2018).

V roce 2018 činila sklizňová plocha chmelnic 5 020 ha (ÚKZÚZ 2018a) a vzrostla tedy pátý rok v řadě (Svaz pěstitelů chmele ČR 2018). Absolutní většinu tvoří Žatecká oblast s 3 856 ha, plochy dalších dvou oblastí jsou podobné – Tršická má 629 ha a Úštěcká 535 ha (ÚKZÚZ 2018a). Vzhledem k nepříznivým klimatickým podmínkám však došlo k meziročnímu snížení produkce o 25 %. Výnos činil 1,02 t/ha a ročník 2018 se tak řadí mezi ty slabší (ÚKZÚZ 2018b). Tabulka 1 zobrazuje vývoj plochy chmelnic, sklizně a výnosu v letech 2010-2018. Lze sledovat pokles a následně od roku 2013 zvětšení plochy chmelnic. Výnos je významně ovlivněn počasím daného roku.

Tabulka 1: Plocha, sklizeň a výnos chmelnic v ČR v období 2010-2018 (ČSÚ 2018).

*) ČSÚ, 2016

***) ÚKZÚZ, 2018b

Ukazatel	2010	2011*	2012*	2013	2014	2015	2016	2017	2018**
Sklizňová plocha (ha)	5 210	4 632	4 366	4 319	4 460	4 622	4 775	4 945	5020
Sklizeň (t)	7 772	6 088	4 338	5 330	6 202	4 843	7 712	6 797	5126
Výnos (t/ha)	1,49	1,31	0,99	1,23	1,39	1,05	1,61	1,37	1,02

Nejpěstovanější odrůdou je Žatecký poloraný červeňák, jemně aromatická odrůda, která Českou republiku řadí celosvětově na první místo v produkci jemně aromatického chmele (Svaz pěstitelů chmele ČR 2018).

Chmel se pěstuje pro obsah pivovarsky důležitých látek jako jsou chmelové pryskyřice, silice a polyfenolové látky (podrobněji v kapitole 3.4). Klasické chmelení spočívá v přidání chmele do horké sladiny na počátku varu piva. Dalším způsobem je tzv. chmelení za studena neboli suché chmelení, kdy se chmel přidává do studeného piva a jako rozpouštědlo pak slouží vodný roztok ethanolu. Jde o širokou škálu technik, chmelové produkty se přidávají buď k primární nebo sekundární fermentaci, před filtrací nebo případně až do ležáckých sudů (Rettberg et al. 2018).

3.2 Legislativa

V posledním desetiletí byla na celoevropské úrovni řešena problematika vstupu mědi a jejích sloučenin do životního prostředí, na kterém se nemalou měrou podílí také zemědělství. Došlo ke snížení povoleného množství sloučenin mědi, což má mimo jiné vliv i na pěstování chmele. Měďnaté fungicidy byly totiž doposud stěžejní při ochraně chmele proti jeho nejčastější houbové chorobě. Účinné látky, včetně sloučenin mědi, používané v přípravcích na ochranu rostlin prochází schvalovacím legislativním procesem na celoevropské úrovni. Postup při obnovení schválení účinných látek podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009, pokud jde o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh, je stanoven v prováděcím nařízení Komise (EU) č. 844/2012 (Evropská komise 2012).

Podle prováděcího nařízení (EU) č. 540/2011 mělo schválení účinných látek sloučeniny mědi skončit 31. ledna 2019. Pracovní skupina Evropské unie zabývající se mědí (European Union Copper Task Force) však podala žádost o obnovení schválení účinných látek sloučenin mědi. Zpravodajský členský stát vypracoval po konzultaci se spoluzpravodajským členským státem hodnotící zprávu o obnovení a dne 16. prosince 2016 ji předložil Evropskému úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) a Komisi. 20. prosince 2017 oznámila EFSA Komisi své závěry, na základě čehož pak 25. května 2018 předložila Komisi Stálému výboru pro rostliny, zvířata, potraviny a krmiva návrh zprávy o obnovení schválení sloučenin mědi (Evropská komise 2018).

V souladu s nařízením (ES) č. 1107/2009 a s ohledem na současné vědeckotechnické poznatky se však považuje za nezbytné stanovit určité podmínky a omezení sloučenin mědi. Podle uvedeného nařízení se totiž jedná o perzistentní a toxické látky, jelikož poločas rozpadu v půdě je delší než 120 dnů a dlouhodobá koncentrace bez pozorovaného účinku u vodních organismů je menší než 0,01 mg/l (Evropská komise 2018). Proto byly sloučeniny mědi již dříve zařazeny na tzv. seznam látek, které se mají nahradit. Takovými látkami se rozumí pesticidy, u nichž mají vnitrostátní orgány posoudit, zda existují příznivější alternativy k používání těchto přípravků. Cílem těchto opatření je podpořit udržitelnější ochranu plodin (Andriukaitis 2015).

Zejména se považuje za vhodné omezit používání přípravků na ochranu rostlin obsahujících sloučeniny mědi na maximální aplikační dávku 28 kg/ha mědi na dobu sedmi let (tj. v průměru 4 kg/ha/rok z původních 8 kg/ha/rok), aby se minimalizovala potenciální akumulace v půdě a expozice necílových organismů, přičemž je třeba brát v úvahu zemědělsko-klimatické podmínky, které se objevují periodicky a které vedou ke zvýšení infekčního tlaku plísni. Při povolování přípravků by členské státy měly věnovat pozornost určitým otázkám a měly by usilovat o minimalizaci aplikačních dávek. Tímto nařízením bylo prodlouženo schválení účinných látek sloučeniny mědi do 31. prosince 2025 (Evropská komise 2018). Sloučeniny mědi se tedy mohou používat následujících sedm let, ovšem pouze v uvedeném množství. Navíc z evropské legislativy vyplývá, že je potřeba tyto látky postupně nahradit alternativními prostředky.

3.3 Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.)

Chmel otáčivý je řazen do rodu chmel (*Humulus*) a spolu s konopím (*Cannabis*) do čeledi konopovitých (*Cannabaceae*) (Verzele & De Keukeleire 1991), řádu kopřivotvarých (*Urticales*) (Neve 1991).

3.3.1 Biologická charakteristika chmelové rostliny

Chmel je víceletá dvoudomá bylina dorůstající výšky 6 až 10 m, u níž se rozlišují čtyři orgánové soustavy. Kořenová soustava a soustava podzemních lodyžních orgánů, tzv. babka, se nachází v podzemní sféře. Důležitá úloha chmelové babky spočívá ve funkci jejích spících pupenů. Ty jsou základem víceletého života rostliny, neboť si životaschopnost udržují několik let. Soustava nadzemních vegetativních orgánů a soustava generativních orgánů se nachází v nadzemní sféře. Základem nadzemní části jsou lodyhy, které se dělí na hlavní révu a postranní větve – pazochy (Rybáček et al. 1980).

Pravotočivé lodyhy se během růstu obtáčejí kolem vhodné opory za pomoci křemičitých háčků. Z každé uzliny révy či pazochy vyrůstá po jednom páru listů srdčitého tvaru (Neve 1991), na jejichž spodní straně se nachází světlé žlázy obsahující pryskyřice a silici (Rybáček et al. 1980).

Osu samičího květenství tvoří mnohokrát zalomené věténko. Z každého zalomení pak vyrůstají dva páry kvítků, které chrání krycí listeny. Kvítek se skládá ze semeníku, těsně obklopeného okvětím, ze kterého vyrůstají dvě nitkovité blizny. Květenství dozrává v plodenství – šištice, které se nazývají chmelové hlávky (Neve 1991).

Pro pivovarskou výrobu se pěstují samičí rostliny, samčí rostliny se využívají při šlechtění odrůd. Oplodněné samičí rostliny sice poskytují větší výnos, ale jejich hlávky mají nižší obsah lupulinu a horší pivovarskou kvalitu (Basařová et al. 2010). Z tohoto důvodu se výskyt samčích rostlin v okolí chmelnic přísně kontroluje a jejich odstranění se zpravidla provádí totálním herbicidem (Ježek et al. 2015). Rozdíly mezi samčím a samičím květenstvím chmele jsou patrné z obrázků 1 a 2.



Obrázek 1: Samičí květenství chmele (Dostupné z: https://www.suntory.com/sic/img/research/t_hop/hop03.jpg).



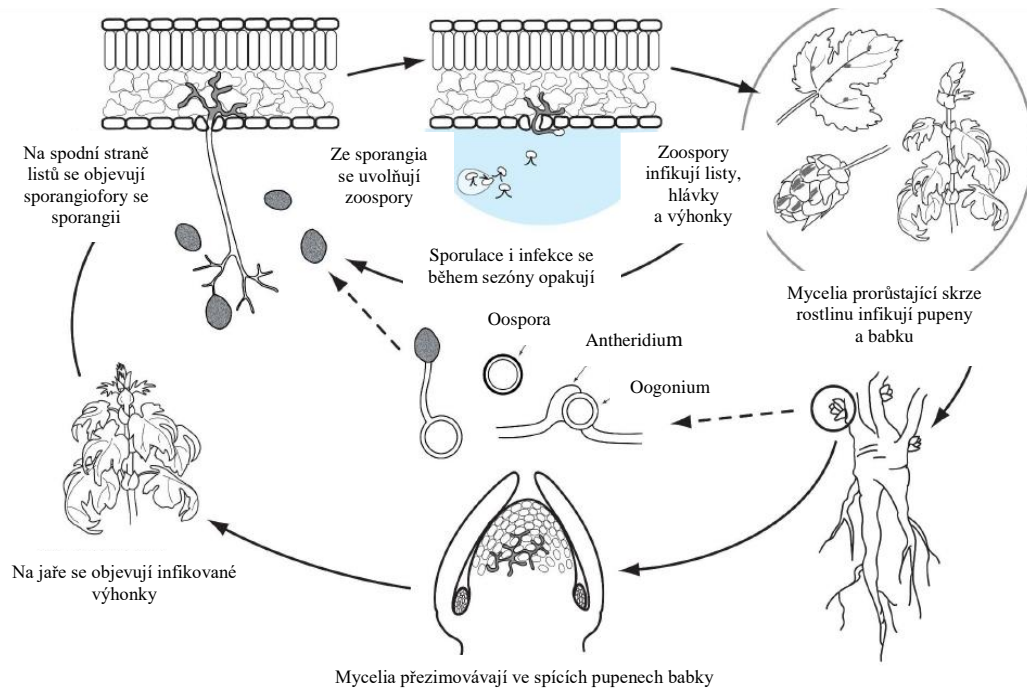
Obrázek 2: Samčí květenství chmele (Dostupné z: http://www.aphotoflora.com/d_humulus_lupulus_hop.html).

3.3.2 Peronospora chmelová (*Pseudoperonospora humuli* Miy. et Tak.)

Peronospora chmelová (*Pseudoperonospora humuli* Miy. et Tak., též *Peronoplasmopara humuli* Wils.) je jednou z nejrozšířenějších chorob chmele ve většině chmelařských oblastí severní polokoule (Gent et al. 2015). Jedná se o patogen ze třídy řasovky (*Oomycota*) (Calderwood et al. 2015). Peronospora má schopnost rozmnožovat se pohlavním i nepohlavním způsobem, což jí umožňuje přetrvat nepříznivé podmínky a rychle se šířit v optimálních podmínkách (Vostřel et al. 2008).

V napadených rostlinných pletivech se tvoří zimní výtrusy, které se s rostlinnými zbytky dostávají do půdy a při rozkladu organické hmoty se uvolňují. Na jaře tyto výtrusy mohou infikovat mladé výhony prorůstající půdou, v nichž se pak rozrůstají vlákna (hyfy) peronospory a vzniká mycelium (Vostřel et al. 2008). Z infikovaných výhonů následně vyrůstají zakrslé žlutozelené listy se zkrácenými internodii. Tyto výhony se pak podobají klasu, podle čehož také dostaly své označení „klasovité výhony chmele“, a jsou zdrojem primární infekce (Skotland & Johnson 1983). Na spodní straně poškozených listů vzniká hnědý povlak (Calderwood et al. 2015) složený z plodonošů (sporangiofor) a letních výtrusnic (zoosporangií), jimiž se v průběhu vegetace peronospora šíří. Pokud se zoosporangia dostanou do vodního prostředí, uvolňují výtrusy (zoospory), které infikují další rostliny. Zoospory začnou klíčit, prorůstají do průduchů listů a postupně dochází i k infekci květů a hlávek (Vostřel et al. 2008). Peronospora přezimuje v podobě mycelia v chmelové babce. Na jaře z takové rostliny vyrůstají již infikované výhonky. V takovém případě se jedná o systémové napadení peronosporou, které se v chmelnici může dále šířit (Calderwood et al. 2015). Vedle uvedeného nepohlavního rozmnožování se peronospora rozmnožuje také pohlavním způsobem, který probíhá splynutím dvou hyf odlišného pohlaví za vzniku oospor, které jsou odolné vůči nízkým teplotám a vyschnutí. Oospory se mohou tvořit v průběhu celé vegetace a mají infekční schopnost až dva roky

(Vostřel et al. 2008). Nejrozsáhlejší škody způsobuje peronospora ve vlhkých letech (Calderwood et al. 2015). Schéma životního cyklu peronospery je znázorněno na obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma rozmnožovacího cyklu peronospery. (Dostupné online z: https://www.canr.msu.edu/news/managing_hop_downy_mildew_early_in_the_season_is_critical).

3.4 Významné látky v chmelových hlávkách

Mezi pivovarsky nejcennější látky v suchých chmelových hlávkách patří chmelové pryskyřice, silice a polyfenoly. Obsah uvedených složek se mezi autory liší. Tyto rozdíly jsou způsobeny přirozeně se lišícími obsahy složek různých odrůd z různých chmelařských oblastí, jistou roli mohou hrát i odlišné způsoby stanovení obsahových látek (Basařová et al. 2010).

V tabulce 2 jsou uvedeny průměrné obsahy složek v sušených hlávkách chmele podle Almaguer et al. (2014), které uvádí na základě pěti studií různých autorů z let 1967 až 2006.

Tabulka 2: Průměrné chemické složení chmelových hlávek (Almaguer et al. 2014).

Složka	Obsah složky (% hmotnosti sušených hlávek)
Celulosa	43
Celkové pryskyřice	15-30
Proteiny	15
Voda	10
Minerální látky	8
Polyfenoly	4
Silice	0,5-3,0
Pektiny	2
Aminokyseliny	0,1

3.4.1 Chmelové pryskyřice

Chmelové pryskyřice se nachází v lupulinových žlázkách, které se vyskytují především v samičích chmelových hlávkách (De Keukeleire et al. 2003). Jsou definovány jako frakce rozpustná v diethyletheru a studeném methanolu. Po chemické stránce se jedná o deriváty floroglucinu, které vznikají jeho acylací některými nepolárními aminokyselinami (isoleucin, leucin, valin). Podle rozpustnosti v hexanu se rozlišují měkké (rozpustné) a tvrdé (nerozpustné) pryskyřice (viz obrázek 4). Měkké pryskyřice tvoří 10-25 % hmotnosti sušiny hlávek a mají významnou pivovarskou hodnotu. Rozdělují se dále na α -hořké kyseliny a frakci β , kterou tvoří β -hořké kyseliny a nespecifické měkké pryskyřice. Tvrdé pryskyřice tvoří 3-5 % hmotnosti sušiny (Almaguer et al. 2014).

Poměr α -hořkých a β -hořkých kyselin se pohybuje od 1 do 4. U zralých chmelů je tento poměr obvykle konstantní a velmi závisí na odrůdě. Tzv. vysoce kvalitní chmele obsahují téměř srovnatelné množství α -hořkých a β -hořkých kyselin (Verzele & De Keukeleire 1991).



Obrázek 4: Extrakt měkkých pryskyřic, který má hustou viskózní konzistenci podobnou medu – A, extrakt tvrdých pryskyřic připomínající tmavý hnědozelený prášek – B (Almaguer et al. 2014).

3.4.1.1 Měkké pryskyřice

α -hořké kyseliny

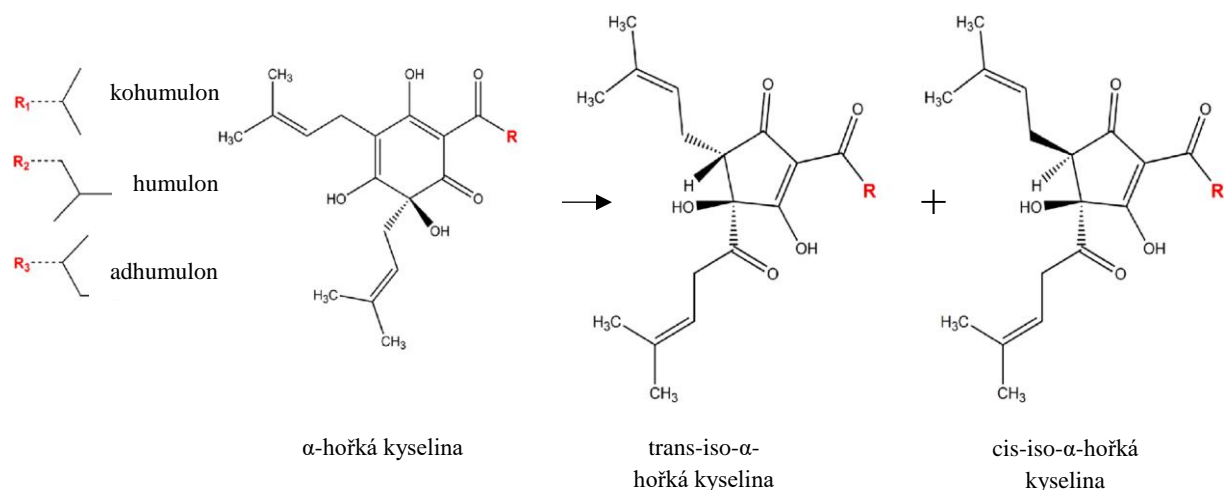
α -hořké kyseliny se v lupulinových žlázkách chmelových hlávek vyskytují ve formě žlutého prášku (Karabín et al. 2016). Jedná se o slabě obtížně disociující kyseliny, jsou proto ve vodě a vodných roztocích obtížně rozpustné v závislosti na pH roztoku. α -hořké kyseliny jsou tvořeny směsí sedmi dosud známých analogů humulonů: humulonů (35-70 % směsi), kohumulonů (20-55 %), adhumulonů (10-15 %), prehumulonů (1-10 %) a posthumulonů (1-5 %), další dva dosud nebyly pojmenovány (Basařová et al. 2010).

α -hořké kyseliny obsažené v hlávkách vykazují pouze mírně hořkou chuť. Až během varu mladiny s chmelem podléhají α -hořké kyseliny tepelné izomeraci a vznikají iso- α -hořké kyseliny s podstatně výraznější hořkostí. Jejich hlavními složkami pak jsou isohumulon, isokohumulon a isoadhumulon. Z každé α -hořké kyseliny vznikají dva stereoizomery cis- a trans- (viz obrázek 5). Pro odhad výsledné hořkosti konkrétní várky piva je proto důležité znát nejen obsah α -hořkých kyselin v daném chmelu, ale také rozsah jejich následné izomerace (Baker et al. 2008).

Intenzivní hořkost iso- α -hořkých kyselin je téměř srovnatelná s chininem – referenční sloučeninou pro hodnocení hořkosti. Prahová hodnota vjemu hořké chuti iso- α -hořkých kyselin ve vodě se odhaduje na 6 $\mu\text{l/l}$. Koncentrace v pivech se značně liší, od 15 $\mu\text{l/l}$ v amerických ležácích až po 100 $\mu\text{l/l}$ v anglických pivech typu Ale (De Keukeleire 2000).

Obsah α -hořkých kyselin v jednotlivých odrůdách se významně liší, např. sušené hlávky odrůdy Žatecký poloraný červeňák obsahují 2,5-5,0 % hm. α -hořkých kyselin, odrůdy Agnus 9-12 % hm. (Krofta & Patzak 2011), a pro srovnání některé, tzv. super- α -hops, obsahují až 19 % hm. α -hořkých kyselin (De Keukeleire et al., 2003).

Zastoupení jednotlivých složek α -hořkých kyselin je pro každou odrůdu charakteristické, závisí však také na době sklizně. Obsah prehumulonů a posthumulonů je dokonce nezávisle na odrůdě tím vyšší, čím později je chmel sklizen. Obsahy humulonů a kohumulonů jsou značně variabilní a závisí především na odrůdě, naopak množství adhumulonů se příliš neliší ani mezi odrůdami, ani mezi způsoby sklizně (De Keukeleire 2000; Almaguer et al. 2014).



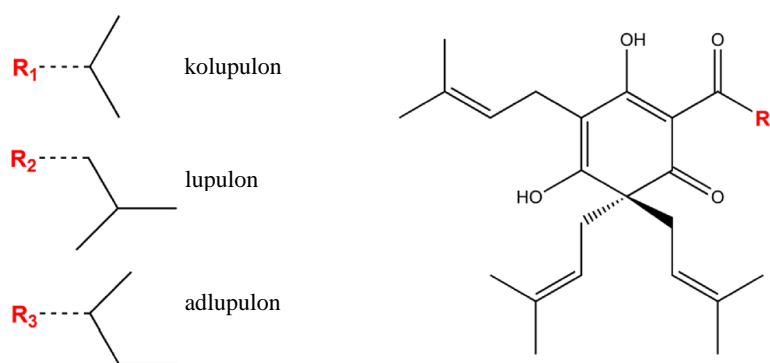
Obrázek 5: Vznik stereoizomerů iso- α -hořkých kyselin během varu mladiny s chmelem (Almaguer et al. 2014).

β -frakce

β -hořké kyseliny

β -hořké kyseliny vykazují menší kyselost než α -hořké, z chmelových hlávek mohou být izolovány po odstranění silnějších α -hořkých kyselin octanem olovnatým. Jedná se rovněž o směs analogů, a to: lupulonu, kolupulonu, adlupulonu, prelupulonu a postlupulonu (Almaguer et al. 2014).

Lupulon, kolupulon a adlupulon (viz obrázek 6) tvoří 95 % celkových β -hořkých kyselin. Podobně jako u obsahu adhumulonu v α -hořkých kyselinách je množství adlupulonu v β -hořkých poměrně konstantní okolo 10-15 % (Verzele & De Keukeleire 1991).



Obrázek 6: Chemická struktura β -hořkých kyselin (Almaguer et al. 2014).

β -hořké kyseliny se během varu s mladinou na rozdíl od α -hořkých neizomerují, ale většinou dochází k jejich oxidaci. Jejich oxidační produkty sice mají vliv na výslednou chuť a aroma piva, ovšem ve značně menším rozsahu než produkty α -hořkých kyselin. Navíc se předpokládá, že některé z nich mohou způsobovat nepříjemnou příchut' piva (Baker et al. 2008).

Nejvýznamnějšími oxidačními produkty β -hořkých kyselin jsou hulupony. Ve chmelu vznikají autooxidací β -hořkých kyselin na vzduchu, dále vznikají také během varu mladiny. Jsou to stabilní hořké sloučeniny olejovité konzistence, které ovlivňují povrchové napětí a tím stabilitu pивní pěny. Celkově je však tento jejich účinek značně nižší než iso- α -hořkých kyselin, jelikož se v pivu nachází v nízkých koncentracích (zpravidla < 10 mg/l) (Verzele & De Keukeleire 1991).

Podle výzkumu De Keukeleire et al. (2003) bylo zjištěno, že obsah β -hořkých kyselin v rané fázi kvetení může překvapivě převyšovat obsah α -hořkých. Obsah všech sledovaných látek se během dozrávání zvyšoval, výjimku však tvořily právě β -hořké kyseliny, jejichž obsah dosáhl maxima v době, kdy byly hlávky malé a nedozrálé a poté klesal. Předpokládá se, že tuto výjimku zapříčiňuje vysoká náchylnost β -hořkých kyselin k oxidaci.

Specifikem českých odrůd je vyšší obsah β -hořkých kyselin a z nich vznikajících huluponů, a tak mohou pozitivně ovlivňovat nejen intenzitu, ale také charakter hořkosti piva. Ve zralém chmelu po sklizni bývá huluponů obsaženo okolo 0,5 % hmotn. v sušině, během skladování se pak díky oxidačním procesům může jejich obsah zvýšit až na 4 % (Basařová et al. 2010).

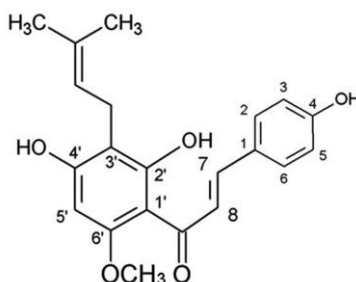
Nespecifické měkké pryskyřice

Tuto frakci lze získat po odstranění α -hořkých kyselin a vykrytalizování β -hořkých kyselin. Mezi nespecifické měkké pryskyřice patří např. chmelový vosk. Tato frakce zatím nebyla dostatečně prozkoumána, a tak není známa ani její pivovarská hodnota (Almaguer et al. 2014).

3.4.1.2 Tvrdé pryskyřice

Tvrdé pryskyřice lze definovat jako tu část celkových chmelových pryskyřic, která se rozpouští v methanolu a diethyletheru, avšak nerozpouští se v hexanu. Obecně se předpokládá, že tvrdé pryskyřice vznikají oxidací pryskyřic měkkých. Určité množství tvrdých pryskyřic se však ve chmelu nachází již během rané fáze vývoje. Proto je nutno rozlišovat tvrdé pryskyřice přirozeně se ve chmelu vyskytující a pak ty, které vznikají až během skladování oxidací měkkých pryskyřic. Rozlišují se α -tvrdé pryskyřice a β -tvrdé pryskyřice, které tvoří většinu tvrdých pryskyřic (Almaguer et al. 2014).

Hlavní složkou β -tvrdých pryskyřic je xanthohumol (viz obrázek 7), prenylovaný flavonoid, který patří mezi polyfenoly chalkonové řady. V posledních letech se stal předmětem výzkumů, jelikož vykazuje potenciální chemopreventivní účinky (De Keukeleire et al. 2003; Hirata et al. 2012; Yong et al. 2015).



Obrázek 7: Strukturní vzorec xanthohumolu (Yong et al. 2015).

Tvrde pryskyrice prispivaji k hořke chuti piva spolu s izomery mekkych pryskyric, konkretně se jedná o xanthohumol a jeho izomer isoxanthohumol, desmethylxanthohumol a jeho izomerizační produkty 8-prenylnaringenin a 6-prenylnaringenin (Dresel et al. 2015).

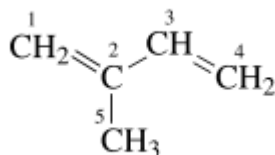
3.4.2 Chmelová silice

Chmelová silice se stejně jako pryskyrice nachází v lupulinových žlázkách chmele a obvykle tvoří 0,5-3,0 % hmotnosti sušených hlávek. Jedná se o směs několika set sloučenin, z nichž bylo dosud 485 identifikovaných. Na základě probíhajících výzkumů se ukazuje, že může jít až o 1000 různých chemických látek (Eyres & Dufour 2009).

Chmelovou silici lze rozdělit na čtyři základní skupiny, a to terpenovou frakci, terpenoidní frakci, frakci sirných sloučenin (Basařová et al. 2010) a norizoprenoidy (Rettberg et al. 2018).

3.4.2.1 Terpenová frakce

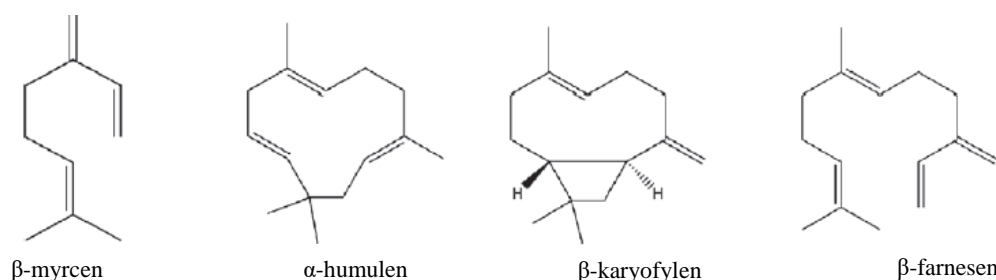
Terpenová frakce zahrnuje především sloučeniny, jejichž základními stavebními prvky jsou izoprenové jednotky (Nuutinen 2018) tvořené pěti atomy uhlíku a obsahující dvě dvojné vazby (viz obrázek 8) (Sanadze 2004). Podle počtu těchto jednotek lze terpeny dále rozdělit na monoterpeny, které obsahují dvě izoprenové jednotky, a seskviterpeny, které obsahují tři (Rettberg et al. 2018). Právě monoterpeny a seskviterpeny tvoří naprostou většinu (99 %) terpenové frakce chmelové silice (Nuutinen 2018). Izoprenové jednotky jsou typicky nepolární a dávají tak sloučeninám terpenové frakce hydrofobní vlastnosti, což způsobuje jejich omezenou rozpustnost ve vodných roztocích, např. mladině (Rettberg et al. 2018).



Obrázek 8: Strukturální vzorec jednotky izoprenu (Sanadze 2004).

Biosyntézy monoterpenů se účastní prenyltransferasy, které katalyzují kondenzaci isopentenyldifosfátu a dimethylallyldifosfátu na geranylpyrofosfát a neryldifosfát. Geranylpyrofosfát je pak prekurzorem nocyklických monoterpenů (např. myrcen), neryldifosfát je prekurzorem cyklických monoterpenů (např. limonen). Při biosyntéze seskviterpenů dochází ke kondenzaci isopentenyldifosfátu a dvou molekul dimethylallyldifosfátu za vzniku farnesylypyrofosfátu. Eliminací kyseliny difosforečné z farnesylypyrofosfátu pak vzniká β -farnesen, zatímco cyklizace kyseliny difosforečné vede ke vzniku α -humulenu a β -karyofylenu (Rettberg et al. 2018).

Mezi hlavní složky terpenové frakce a zároveň i celkové chmelové silice patří monoterpen myrcen, seskviterpeny α -humulen a β -karyofylen a v žateckých odrůdách navíc také seskviterpen β -farnesen, jejichž chemické struktury jsou znázorněny na obrázku 9 (Eyres & Dufour 2009; Almaguer et al. 2014; Rettberg et al. 2018).



Obrázek 9: Chemická struktura významných seskviterpenů a monoterpenu chmelové silice (Almaguer et al. 2014).

V samotném chmelu je nejvíce zastoupen monoterpen β -myrcen, který může tvořit dokonce 30-60 % hm. celkového obsahu chmelových silic v sušených hlávkách (Almaguer et al. 2014). Jeho vůně lze charakterizovat jako pryskyřičné, bylinné, balzámové nebo podobné muškátu (Eyres & Dufour 2009). Podle Basařové et al. (2010) způsobuje β -myrcen nevyrovnanou a méně příjemnou hořkost piva. V žateckých odrůdách bývá jeho obsah nízký. Nejvíce zastoupený seskviterpen α -humulen tvoří 15-42 % silice, následuje β -karyofylen, který tvoří 2,8-18,2 % silice (Almaguer et al. 2014). α -humulen způsobuje balzámovou vůni, β -karyofylen hřebíčkovou nebo terpentýnovou vůni (Eyres & Dufour 2009). Seskviterpen β -farnesen typický pro žatecké odrůdy se v nich nachází v množství 14-20 % hm. silice a přispívá k jemnosti jejich aroma (Kovařík 2015).

Přestože právě zmíněný β -myrcen, α -humulen a β -karyofylen tvoří většinu chmelové silice, v hotovém pivu se téměř vůbec nenachází. Během varu piva totiž dochází k jejich intenzivnímu vypařování, jelikož kvůli svým hydrofobním vlastnostem nepřechází do mladiny. Navíc se jejich obsah snižuje tím, že se adsorbují na rostlinný materiál, který je později odstraněn. Výjimkou jsou pouze piva chmelená za studena, ve kterých bývají detekovány i tyto sloučeniny (Eyres & Dufour 2009). K menším ztrátám uvedených terpenů dochází i během skladování chmele na vzduchu vypařováním (Rettberg et al. 2018).

Jelikož během výroby piva probíhá velké množství fyzikálních, chemických a biochemických reakcí, a ne všechny byly doposud dostatečně vysvětleny, nelze význam β -myrcenu, α -humulenu a β -karyofylenu vyloučit. Jak již bylo uvedeno, ne všechny složky chmelové silice se vyskytují v hotovém pivu. Zde je však potřeba zmínit, že existují také sloučeniny, které se sice nenachází v samotné chmelové silici, ale jsou odvozeny z jejích sloučenin a v hotovém pivu je lze detekovat (Eyres & Dufour 2009; Rettberg et al. 2018). Kupříkladu výsledky studie Dieckmann & Palamanda (1974) ukazují, že autooxidací β -myrcenu vzniká až 40 dalších sloučenin. U žateckých aromatických chmelů se zase uvádí, že pro jejich typické ušlechtilé aroma je důležitý poměr seskviterpenových složek (Basařová et al. 2010), z čehož lze usoudit, že přestože tyto sloučeniny během výroby piva vytěkají, mohou být částečně prekurzory jiných, pro aroma piva důležitých látek.

3.4.2.2 Terpenoidní frakce

Terpenoidní frakce chmelové silice obsahuje řadu sloučenin různé chemické povahy a bývá považována za podstatně složitější komplex látek než frakce terpenová (Almaguer et al. 2014). Obecně se molekuly terpenoidů skládají z terpenových uhlíkových řetězců, na něž jsou

navázány hydroxylové, karboxylové, esterové nebo etherové funkční skupiny. Biosyntéza chmelových terpenoidů probíhá za účasti řady terpenových synthas a cyklas. Některé minoritně zastoupené terpenoidy mohou pocházet také ze sekundárních reakcí, jakými je např. oxidace vzdušným kyslíkem nebo hydrolýza esterů (Rettberg et al. 2018). Sloučeniny terpenoidní frakce lze obecně rozdělit podle těkavosti. Skupina těkavých je charakterizována jako sloučeniny, jejichž bod varu je nižší než bod varu α -humulenu, netěkavé sloučeniny pak mají bod varu vyšší než α -humulen (Almaguer et al. 2014).

Nejvýznamnější terpenoidy chmelové silice jsou monoterpenové alkoholy. Patří mezi ně především linalool a geraniol a jejich izomery nerol a α -terpineol, které se ve chmelu mohou vyskytovat ve formě volné, esterově vázané nebo vázané v glykosidech. Volné a esterově vázané monoterpenové alkoholy jsou těkavé, pokud jsou ale vázané glykosidickou vazbou, netěkají. Vlivem zvýšené teploty, působením enzymů anebo kyselin během varu piva dochází k hydrolýze glykosidické vazby, monoterpenové alkoholy se tak odštěpí z molekuly glykosidu, a tím se v dané chvíli zvýší množství těkavých látek (Rettberg et al. 2018).

Monoterpenové alkoholy linalool a geraniol, jejich izomery a sloučenina β -citronellol jsou terpenoidy, které se v pivu vyskytují nejčastěji. Přestože uvedené látky mají velmi podobnou chemickou strukturu, významně se liší intenzita jejich aroma. Prahová hodnota vjemu linaloolu, geraniolu a β -citronellolu bývá nižší než 10 mg/l piva, zatímco prahová hodnota vjemu nerolu a α -terpineolu je 10krát až 50krát vyšší (Rettberg et al. 2018). Celkové aroma těchto sloučenin je převážně květinové. Linalool vykazuje citrusovou nebo koriandrovou vůni, geraniol a nerol voní po růžích, β -citronellol voní po růžích, jablkách a citrusech (Eyres & Dufour 2009). Samotnému pivu pak dávají květinové, svěží a citrusové aroma (Rettberg et al. 2018).

Seskviterpenové alkoholy jako např. farnesol nebo terpenové aldehydy jako např. citral a další se ve chmelu vyskytují ve výrazně nižších koncentracích než monoterpenové alkoholy (Rettberg et al. 2018).

Mezi sloučeniny terpenoidní frakce patří také cyklické ethery nazývané epoxidy. Během skladování chmele totiž může docházet k oxidaci dříve zmiňovaného monoterpenu humulenu, při čemž mohou vznikat 3 různé monoepoxidy (označované jako humulenepoxidy I-III) a 12 různých dieoxidů. Během fermentace piva a jeho následného skladování pak mohou z těchto epoxidů vznikat humulenol II a humulol. Aroma humulenepoxidů, humulenolu II a humulolu bývá popisováno různě, od vůně sena, cedru a šalvěje až po plísňové aroma (Rettberg et al. 2018). Eyres et al. (2007) uvádí, že sice existuje korelační závislost mezi zvyšujícím se obsahem humulenepoxidů a ušlechtilostí chmelového aroma, ale není prokázáno, že ji skutečně způsobují.

3.4.2.3 Norizoprenoidy

Ve chmelu se vyskytují rostlinné pigmenty karotenoidy, které obsahují 8 izoprenových jednotek. Jejich degradací vznikají vonné norizoprenoidy, např. β -ionon podporující v pivu ovocné a květinové vůně a β -damascenon, který způsobuje ovocné a medové aroma (Rettberg et al. 2018). β -damascenon bývá považován za poměrně významnou složku aroma chmele i piva (Eyres et al. 2007). Obsah β -damascenonu v pivu se zvyšuje především dlouhodobým skladováním (Rettberg et al. 2018).

3.4.2.4 Frakce sirných sloučenin

Mezi sirné sloučeniny vyskytující se ve chmelu patří methylthioestery, thiofeny, methylsulfidy, polysulfidy, sirné addukty myrcenu, α -humulenu nebo β -karyofylenu a další (Rettberg et al. 2018). Methylthioestery se v chmelové silici vyskytují běžně a předpokládá se, že vznikají při degradaci methioninu. Další sloučeniny jako thiofeny a sirné addukty myrcenu a α -humulenu pravděpodobně vznikají reakcemi s elementární sírou, která je aplikována na chmelnice během růstu chmele. Množství sirných sloučenin se může zvětšovat v závislosti na posklizňových úpravách, výrazně se zvyšuje při sušení v peci a v rámci analýzy se pak může zvýšit při přípravě vzorků. Při destilaci vodní parou se jejich obsah obvykle zvyšuje, naopak vakuová destilace nemá na jejich množství velký vliv (Eyres & Dufour 2009).

Sloučeniny síry se ve chmelu nachází většinou pouze ve stopových množstvích, přesto však mohou negativně ovlivnit chmelové aroma, protože jsou senzorycky postřehnutelné i v těchto nízkých koncentracích (Eyres & Dufour 2009). Prahová hodnota vjemu těchto sloučenin se pohybuje okolo 1 ng/l. Většina sirných sloučenin způsobuje nepříjemné sýrové, zeleninové, cibulové nebo česnekové aroma (Almaguer et al. 2014). Existují však také výjimky jako např. alkoholy a ketony obsahující síru, které vykazují ovocné, citrusové, broskvové nebo muškátové aroma chmele. Sloučenina 4-merkapt-4-methylpentan-2-on (4MMP) má dokonce prokazatelně pozitivní vliv na typickou chmelovou vůni piva (Rettberg et al. 2018).

Podle aroma lze složky chmelové silice rozdělit na pozitivní a negativní pro tzv. evropské aroma. Mezi pozitivní se řadí humulen, karyofylen, karvon, methylester dec-4-enové kyseliny, undekan-2-on, β -farnesen a humulenepoxid. K negativním patří myrcen, α -muurolen, germakren D, kurkumen, β -selinen, p-cymen, geraniol a další (Basařová et al. 2010).

Celkový obsah chmelové silice je ovlivněn mnoha faktory. Záleží na genetických vlastnostech odrůdy chmele, přičemž i rostliny stejné odrůdy se mohou lišit v závislosti na klimatických, geografických a agrotechnických faktorech. Rozdíly v obsahu silice lze pozorovat také mezi sklizněmi v jednotlivých letech, v tomto případě záleží především na množství srážek, teplotě a počtu slunečných dnů. V neposlední řadě hraje roli také čas sklizně v rámci roku. Měřítkem zralosti hlávek může být obsah myrcenu, který se postupně zvyšuje. Výjimkou je poměr humulenu a karyofylenu, který bývá pro každou odrůdu charakteristický. Obsah silice ovlivňují choroby chmele a škůdci, kteří se v dané oblasti v daném období vyskytují. Významně se může množství silice měnit během posklizňových úprav a skladování (Eyres & Dufour, 2009).

3.4.3 Polyfenolové látky chmele

Polyfenoly jsou sloučeniny, které v molekule obsahují alespoň jeden fenol (Aron et al. 2011). Podle základní chemické struktury lze polyfenoly rozdělit do více než 10 různých skupin. Za hlavní skupiny bývají považovány jednoduché fenoly, benzochinony, fenolové kyseliny, acetofenony, fenyloctové kyseliny, hydroxyskořicové kyseliny, fenylpropany, kumariny a isokumariny, chromony, naftochinony, xanthy, stilbeny, antrachinony, flavonoidy, lignany a neolignany, ligniny a další (Bravo 1998).

Polyfenolové látky chmele lze rozdělit do čtyř skupin: flavonoly, flavan-3-oly, fenolické karboxylové kyseliny (deriváty benzoové a skořicové kyseliny) a další fenolické sloučeniny

(např. prenylflavonoidy a stilbenoidy) (Karabín et al. 2016) a celkově tvoří 3-6 % hmotnosti sušiny chmelových hlávek. Z polyfenolických látek obsažených v chmelu jsou nejvíce reaktivní proantokyanidiny, které se skládají z katechinových jednotek, např. prokyanidin B-3 obsahující dvě a prokyanidin C-3 obsahující tři katechinové jednotky (Neve 1991). Proantokyanidiny a flavan-3-oly se podílejí na charakteru chuti, stabilitě pěny, barvy a koloidních vlastnostech piva (Aron et al. 2011).

Pouze 20-30 % polyfenolických látek obsažených v pivu pochází z chmele, zbývajících 70-80 % pochází ze sladu (Neve 1991).

Biosyntéza α -hořkých a β -hořkých kyselin a polyfenolových látek chmele zahrnuje některé společné meziprodukty, např. malonylkoenzym A a izopren difosfát, a tak mohou být způsoby vzniku těchto látek navzájem kompetitivní. De Keukeleire et al. (2003) se proto zabývali změnami obsahu jednotlivých složek chmele v průběhu růstu a tvorby hlávek. Kromě předpokládaných rozdílů mezi odrůdami byly zjištěny také některé obecné závěry. Koncentrace sledovaných látek se nejvýznamněji zvyšovaly během rané tvorby hlávek. Biochemická syntéza vedoucí ke vzniku α -hořkých kyselin začne obvykle převládat, jakmile se květenství začne přeměňovat v hlávky.

3.5 Konvenčně používané fungicidní přípravky

Konvenční ochrana chmele proti peronospoře chmelové (*Pseudoperonospora humuli*) spočívá především v aplikaci vhodných fungicidů v optimálním termínu. Aplikace ošetřujících přípravků značně závisí na meteorologických podmínkách, které jsou významným faktorem výskytu peronospory (Vostřel et al. 2008). V tabulce 3 jsou uvedeny některé vybrané fungicidní přípravky a množství účinných látek v nich používané v České republice.

Tabulka 3: Fungicidní přípravky k ošetření chmele proti peronospoře chmelové (Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/index.php>).

*) uvedeno v g/l

Přípravek	Účinná látka			
	cymoxanil (g/kg)	chlorid-trihydroxid diměďnatý (g/kg)	fosetyl-Al (g/kg)	síran měďnatý (g/l)
Aliette 80 WP	-	-	800	-
Aliette Bordeaux	-	420	250	-
Cuproxat SC	-	-	-	345
Curenox 50	-	877	-	-
Curzate K	40	773	-	-
Kuprikol 250 SC	-	420*)	-	-

Z tabulky 3 je patrné, že konvenční přípravky pro kontrolu výskytu peronospory jsou především na bázi mědi.

Používání přípravků na ochranu rostlin na bázi mědi je doloženo již v roce 1882, kdy se proti plísni vinné révy (*Plasmopara viticola*) prokazatelně používala Bordeauxská jícha obsahující síran měďnatý (Martinez et al. 2012).

Vzhledem k tomu, že účinné látky fungicidních přípravků uvedených v tabulce 3 působí kontaktně, jsou vhodné zejména pro preventivní ošetření. Mechanismus účinku chloridu trihydroxidu diměďnatého a síranu měďnatého spočívá v působení elementární mědi na buněčnou plazmu patogena (Krofta et al. 2011). Sloučeniny mědi mají schopnost srážet proteiny, čímž dochází ke koagulaci cytoplazmy, která tak přestává plnit své fyziologické funkce. Měď totiž reaguje s thiolovými skupinami kyselin a dalších sloučenin v buňkách některých hub, což způsobuje její nepříznivé účinky na růst některých patogenních kmenů (Gharieb et al. 2004).

Ošetřující přípravky na bázi mědi nemají systemický ani eradikační účinek a musí se proto aplikovat dříve, než dojde k infekci. Účinnost jednotlivých přípravků se liší, také zpravidla nezabezpečují úplnou kontrolu chorob a je proto potřeba přijímat i další ochranná opatření (Ghorbani & Wilcockson 2004). Navíc se podle legislativy (viz kapitola 3.2) jedná o přípravky, které se mají nahradit (Evropská komise 2018).

Cymoxanil neboli 1-(2-kyano-2-methoxyiminoacetyl)-3-ethyl močovina působí jako foliární fungicid s ochranným i hojivým účinkem. Inhibuje sporulaci patogenů z řádu vřetenatkovité (*Peronosporales*) (FAO 2006).

Fosetyl-Al (aluminium tris-ethylfosfonát) má systemický fungicidní účinek. Fosfát funguje jako allosterický regulátor některých enzymů, čímž inhibuje klíčení spór a rozvoj mycelia patogenu (WHO & FAO 2018).

Účinné látky ošetřujících přípravků mohou negativně ovlivnit kvalitativní vlastnosti chmele, přičemž konkrétně měď nepříznivě působí na thioly 4-merkapt-4-methylpentan-2-on (4MMP), 3-merkaptohexan-1-ol (3MH) a 3-merkaptohexyl acetát (3MHA), které přispívají k charakteru chmelového aroma. Bylo zjištěno, že evropské chmele obsahují velmi malá množství 4MMP na rozdíl od chmelů pěstovaných v jiných částech světa. Předpokládá se, že na obsah 4MMP mají vliv ošetřující přípravky se síranem měďnatým, které se v Evropě typicky používají. 4MMP má totiž tendenci vázat se na ionty mědi nebo s nimi tvořit komplexy. Vliv na obsah 4MMP má nejen množství mědi aplikované na rostlinu v přípravcích, ale také obsah měďnatých iontů v půdě (Morimoto et al. 2010).

3.6 Alternativní ošetření chmele

Měď se sice považuje za esenciální prvek pro většinu organismů, nicméně v příliš vysokých koncentracích vykazuje stejně jako jiné látky toxicitu. Při ochraně rostlin měďnatými prostředky vstupuje nezanedbatelné množství mědi do životního prostředí, především do půdy. Dochází k ohrožení půdních mikro- i makroorganismů a poruchám jejich rozmnožovacího cyklu (Ghorbani & Wilcockson 2004). Trendem je proto omezit vstupy uvedených fungicidů do životního prostředí a výrazně snížit rezidua pesticidů v potravinách prostřednictvím alternativních možností ochrany rostlin (Gerbore et al. 2014).

V rámci pěstování chmele dosud příliš mnoho alternativ k pesticidům neexistuje (Ježek et al. 2012). Obecně se využívají spíše přípravky, které mají komplexně posílit obranyschopnost rostliny, většinou však nepůsobí cíleně proti chorobám či škůdcům. Následující kapitola tedy shrnuje dostupné informace o látkách, které jsou pro alternativní ochranu chmele v současnosti k dostání. Pozornost je věnována také látkám, které by mohly mít potenciál zabezpečovat ochranu chmele v budoucnu.

Při ošetření chmele proti peronospoře, především v ekologické produkci, se využívá podpůrná látka Alginure, která obsahuje výtažky z mořských řas a rostlinné aminokyseliny (Ježek et al. 2012). Účinnou látkou je fosfonát draselný v množství 324 g/kg (Biocont Laboratory 2018). Jedná se o sůl kyseliny fosfonové obsahující vazbu mezi kyslíkem a fosforem, což dává této sloučenině odlišné vlastnosti od fosfonátů obsahujících vazbu mezi uhlíkem a fosforem, které inhibují cholinesterasu a používají se jako insekticidy (Speiser et al. 2000). Alginure podporuje tvorbu fytoalexinů a dalších látek, čímž zvyšuje celkovou rezistenci rostlin proti peronospoře (Holý et al. 2017).

Pro zlepšení celkové obranyschopnosti chmelových rostlin proti chorobám lze využít také hnojiva. Konkrétně se jedná např. o hnojivo Farm-Fos 44 s obsahem fosforitanu draselného (32 % P_2O_5 a 29 % K_2O), které zvyšuje přirozenou odolnost rostlin proti houbovým patogenům. Podobné účinky má také kapalné hnojivo PrevB2, které obsahuje ethanolanin boritý (2,1 %) a terpenové sloučeniny z pomerančovníku (Holý et al. 2017).

V rámci ochrany nejen chmelových rostlin se využívá vlastností houbového mikroorganismu *Pythium oligandrum*, který patří do třídy řasovky (*Oomycota*). Parazituje na široké škále houbových patogenů (Takenaka 2015), snižuje jejich počet prostřednictvím vzájemné kompetice o živiny i prostor a u některých rostlin může indukovat jejich rezistenci (Gerbore et al. 2014). Při ochraně chmele bývá mikroorganismus *Pythium oligandrum* aplikován v přípravku Polyversum (Ježek et al. 2012). Mikrobiologická kontrola patogenních organismů však ještě v praxi není plně využívána, což bývá vysvětlováno nedostatečnou a proměnlivou účinností (Gerbore et al. 2014).

V minulosti probíhaly výzkumy zabývající se ochranou chmele proti peronospoře použitím antibiotika streptomycinu. Tato ochrana sice byla účinná (Coley-Smith 1966; Griffin & Coley-Smith 1971, 1975), ovšem v současnosti je již zakázáno používat antibiotika při ochraně rostlin, jelikož by mohla vznikat rezistence fytopatogenních populací (Pouvová et al. 2009).

Alternativní možností ochrany rostlin by mohlo být ošetření pomocí rostlinných silic. Byly zkoumány např. účinky silic na bakteriální kroužkovitost bramboru způsobenou bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Mezi nejúčinnější patřily silice z rostlin

pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*), hřebíček (*Eugenia caryophyllata*), dobromysl obecná (*Origanum vulgare*) a tymián obecný (*Thymus vulgaris*) (Pouvová et al. 2008). Silice *Origanum vulgare* a *Thymus vulgaris* byly účinné také proti chorobám způsobovaným plísní šedou (*Botrytis cinerea*) a fusariovou hnilobou bramboru (*Fusarium solani* var. *coeruleum*) (Daferera et al. 2003) a jejich složky thymol a karvakrol působily proti tabákovému škůdci blýskavce (*Spodoptera litura*) a mšici broskvoňové (*Myzus persicae*) (Isman 2000). Thymol, hlavní složka tymiánové silice (Rota et al. 2008), dokonce vykazovala srovnatelné antifungicidní účinky jako konvenční fungicid proti kořenomorce bramborové (*Rhizoctonia solani*), srpovničce špičatovýtrusé (*Fusarium oxysporum*), štetičkovci (*Penicillium digitatum*) a kropidláku černému (*Aspergillus niger*) (Marei et al. 2012). Většina rostlinných silic spadá pod označení „GRAS – generally recognized as safe“, tedy obecně považovány za bezpečné a lze je tak používat i v potravinářství a při ochraně rostlin (de Souza et al. 2016).

Antimikrobiální účinky vykazují také látky extrahované z chmele, jejichž aktivita byla zatím sledována především v potravinách. Již Mizobuchi & Sato (1985) uvádí, že α -hořké a β -hořké kyseliny a jim příbuzné sloučeniny mají antifungální účinky, konkrétně že inhibují růst patogenních hub trichofytonů (*Trichophyton* spp). Jako ekologický zdroj účinných chmelových látek může sloužit také chmelový odpad z pivovaru, ze kterého lze získat např. myrcen, α -humulen a β -karyofylen, které účinkují proti skladištním škůdcům potravin korovníkovi obilnému (*Rhizopertha dominica*) a pilousovi černému (*Sitophilus granarius*) (Bedini et al. 2015). Chmelové extrakty obsahující buď β -hořké kyseliny nebo xanthohumol účinkovaly proti bakteriím podílejícím se na kažení masa, listérii (*Listeria monocytogenes*) a zlatému stafylokokovi (*Staphylococcus aureus*) (Kramer et al. 2015). Zkoumání dalšího využití chmelových rostlin a posklizňových zbytků podporuje také fakt, že pouze okolo 15 % organické hmoty chmele bývá využito v pivovarnictví (Bedini et al. 2015).

4 Metodika

4.1 Rostlinný materiál

V rámci experimentální části práce byl sledován vliv šesti různých ošetření na kvalitativní vlastnosti chmelových hlávek odrůdy Žatecký poloraný červeňák. Tři varianty byly ošetřeny alternativními přípravky, které jsou v současnosti dostupné na trhu (a, b, c), dvě varianty byly ošetřeny nově vyvíjenými alternativními přípravky (d, e) a jedna varianta byla ošetřena konvenčně (f):

- a) přípravek Bajkal (*Lactobacillus brevis* 10^8 KTJ/ml, *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 KTJ/ml, *Lactobacillus buchneri* 10^7 KTJ/ml, *Pichia* sp. 10^3 KTJ/ml, *Bacillus licheniformis* 10^3 KTJ/ml, EM-Kooperacija, Rusko),
- b) přípravek Alginure (výtažek z mořských řas 24 %, fosfonát draselný v množství 324 g/kg, Tilco-Alginure GmbH, Německo),
- c) přípravek PrevB2 (ethanolamin boritý 2,1 %, terpenové sloučeniny z pomerančovníku, ORO AGRI International Ltd., Nizozemsko),
- d) tymiánová silice (vyvíjený přípravek),
- e) chmelový extrakt (vyvíjený přípravek),
- f) konvenční ošetření.

Ošetřující látky a) až e) byly aplikovány dvakrát během vegetačního období. Sled ošetření jednotlivých variant je uveden v příloze 1 a kompletní ošetření všech variant je uvedeno v příloze 2. Chmel byl pěstován v lokalitách Čínov a Liběšovice, které se obě nachází v Žatecké chmelařské oblasti.

4.2 Odběr a příprava vzorků

Chmelové hlávky byly na obou lokalitách odebírány v několika termínech v průběhu srpna 2018. V Čínově proběhl odběr ve dnech 7. 8., 13. 8. a 20. 8. (sklizeň), v Liběšovicích ve dnech 7. 8., 13. 8., 23. 8. a 30. 8. (sklizeň). Odebraný rostlinný materiál byl skladován při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a před jednotlivými analýzami byl vždy homogenizován v nožovém laboratorním mlýnku IKA A 11 basic (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Německo).

4.3 Stanovení obsahu a složení hořkých kyselin

Chemikálie

Acetonitril, diethylether a methanol pro HPLC-UV byly dodány společností VWR International (Stříbrná Skalice, Česká republika). Jako standard byl použit International Calibration Extract 3 (ICE-3) obsahující kohumulon (13,88 %), kolupulon (13,44 %), adhumulon a adlupulon a jejich izomery humulon a lupulon (vyjádřeno jako součet n+adhumulon, 30,76 %, a n+adlupulon, 10,84 %), který byl zakoupen od Labor Veritas (Zürich, Švýcarsko). Kyselina chlorovodíková byla dodána společností Penta (Chrudim, Česká republika).

Příprava vzorků pro HPLC analýzu

α - a β - hořké kyseliny byly ze vzorků chmele extrahovány podle upravené metody dle Hermans-Lokkerbol & Verpoorte (1994). Bylo odebráno 0,5 g homogenizovaného vzorku a extrahováno 1 ml methanolu, 5 ml diethyletheru a 2 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové. Vzorky byly 60 minut třepány na orbitální třepačce a následně centrifugovány při 9000 ot./min. po dobu 10 minut. Poté bylo odebráno 250 μ l z horní organické fáze a doplněno 2,25 ml methanolu. Tento roztok byl filtrován přes membránový PTFE filtr o velikosti pórů 0,45 μ m (Fischer Scientific, Pardubice, Česká republika) a převeden do skleněných HPLC vialek. Každý vzorek byl stanovován ve třech opakováních.

HPLC-UV/Vis analýza

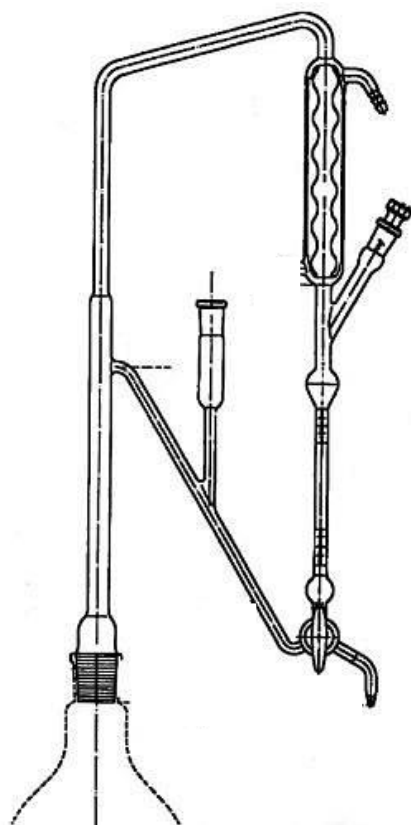
Koncentrace hořkých kyselin byla stanovena pomocí upravené metody dle Oladokuna et al. (2016). Analýza byla provedena na UltiMate 3000 UHPLC systému s detektorem diodového pole (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). K separaci byla použita kolona Gemini-NX C18 5 μ m 110 A (250 \times 4,60 mm, Phenomenex, Torrance, USA). Ke gradientové eluci byla použita mobilní fáze A (voda s 2,5% octovou kyselinou) a B (acetonitril s 2,5% octovou kyselinou) následovně: 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. Vstříkovaný objem byl 10 μ l při průtoku 1,5 ml/min po dobu 23 minut. Teplota kolony byla udržována na 40 °C. UV spektra byla zaznamenávána při 280 nm. Kvantifikace byla prováděna s použitím devíti kalibračních bodů ICE-3 standardu (koncentrační řada: 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 μ g/ml).

4.4 Stanovení obsahu a složení silic

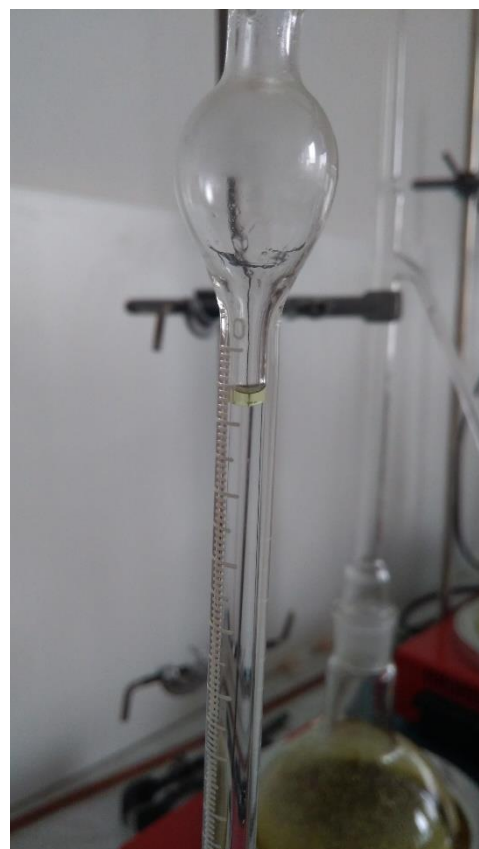
4.4.1 Stanovení obsahu silic

Obsah silic byl stanoven destilací vodní parou podle upravené metody Krofity (2008). Schéma použité destilační aparatury je znázorněno na obrázku 10. Při varu je odpařována voda společně s rostlinnou silicí, která je zachytávána v clevengeru a protože má nižší hustotu než voda, zůstává na hladině vodního sloupce a po ukončení destilace tak lze ze stupnice clevengeru odečíst hodnotu získaného objemu silice (viz obrázek 11).

Do zábrusové varné baňky o objemu 1000 ml bylo naváženo 10 g homogenizovaného materiálu a po přidání varného kamínku a 500 ml destilované vody se zahájila destilace. Po 120 minutách destilace byl odečten objem získané silice, která byla následně odebrána a skladována při teplotě -20 °C. Každý vzorek byl destilován ve třech opakováních.



Obrázek 10: Schéma destilační aparatury (Verkon 2019).



Obrázek 11: Odečítání objemu silice (vlastní fotografie).

4.4.2 Stanovení složení silic

Příprava vzorků pro GC-FID a GC-MS analýzu

Bylo odebráno 50 µl silice a přidáno 950 µl methanolu s interním standardem (n-oktanol v koncentraci 100 ng/ml). Každý vzorek byl stanovován ve třech opakováních.

GC-FID analýza

Analýza byla provedena na Agilent 7890A GC systému s plamenově ionizačním detektorem (Agilent, USA). K separaci byla použita kolona Agilent 19091S-433 5% phenyl methyl silox HP-5MS (30 m × 250 µm × 0,25 µm, Agilent, USA). Teplotní program byl nastaven na 60 °C po dobu 3 minut a teplota se následně zvyšovala o 3 °C za minutu, až bylo dosaženo 231 °C po dobu 10 minut (celkový čas 70 minut). Objem nástřiku byl 1 µl se split poměrem 50:1 při teplotě 250 °C a průtoku nosného plynu helia 1 ml/min.

GC-MS analýza

Analýza byla provedena na Agilent 7890A GC systému s hmotnostním detektorem s kvadrupólovým analyzátozem Agilent 5975 C (Agilent, USA). K separaci byla použita kolona Agilent 19091S-433 5% phenyl methyl silox HP-5MS (30 m × 250 µm × 0,25 µm, Agilent, USA). Teplotní program byl nastaven na 60 °C po dobu 3 minut a teplota se následně zvyšovala o 3 °C za minutu, až bylo dosaženo 231 °C po dobu 10 minut (celkový čas 70 minut). Teplota transfer line byla 231 °C. Objem nástřiku byl 1 µl se split poměrem 12:1 při teplotě 250 °C a průtoku nosného plynu helia 1 ml/min. Teplota kvadrupólu byla 150 °C s maximem 200 °C. Byl analyzován rozsah hmot 40-400.

Hledané látky byly identifikovány pomocí GC-MS. Jednotlivé píky byly identifikovány pomocí standardů, srovnáním spekter s knihovnou NIST (Národní institut pro standardy a technologie) a porovnáním Kovátsových indexů s dostupnou literaturou. Ke kvantifikaci identifikovaných látek pak bylo využito výsledků z GC-FID analýzy.

4.5 Stanovení sušiny

Byly naváženy 3 g homogenizovaného rostlinného materiálu a vysušeny v peci (KBC G-100/250) při 105 °C do konstantní hmotnosti (viz obrázek 12). Výsledná sušina byla následně vyjádřena v g/100 g hmotnosti chmelových hlávek.



Obrázek 12: Vzorky po stanovení sušiny.

4.6 Statistické vyhodnocení dat

K vyhodnocení dat byl využit software Statistica 12 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA) a program Microsoft Office Excel. Pro sledování vlivu ošetření na kvalitativní vlastnosti chmele byla použita metoda analýzy rozptylu (ANOVA). Při zjištění statisticky významných rozdílů byly hodnoty následně analyzovány pomocí post hoc testu – Tukeyův test.

5 Výsledky

Vyhodnocen byl obsah α -hořkých a β -hořkých kyselin ve vzorcích chmele všech šesti sledovaných ošetření: Bajkal, Alginure, PrevB2, tymiánová silice, chmelový extrakt a konvenční. Obsah silic byl vyhodnocen v závislosti na jednotlivých ošetřeních v termínu sklizně. Bylo hodnoceno složení silic v závislosti na termínu odběru ve vzorcích jednotlivých ošetření a pak vyjádřeno jako procentuální podíl celkového obsahu silice v termínu sklizně.

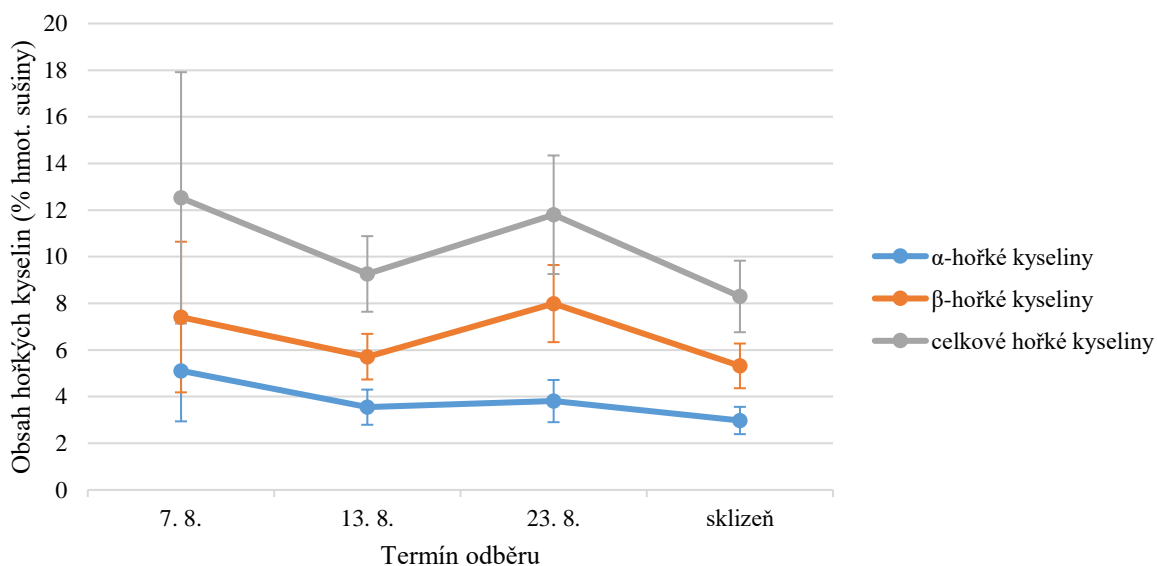
Až na výjimky neexistoval statisticky významný rozdíl mezi vzorky v závislosti na lokalitě, proto byly výsledky z Čínova a Liběšovic vyhodnocovány jako jeden statistický soubor. Případy, kdy byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi lokalitami, jsou uvedeny v přílohách 3-5.

5.1 Obsah α -hořkých a β -hořkých kyselin

Výsledky obsahů α - a β -hořkých kyselin jsou vyjádřeny jako procento hmotnosti sušiny chmelových hlávek. Obsah byl nejprve sledován zvlášť u α -hořkých a zvlášť u β -hořkých kyselin a poté i jako souhrn α - a β -hořkých kyselin dohromady. Byl sledován časový vývoj těchto obsahů v rámci jednotlivých ošetření.

Ošetření přípravkem Bajkal

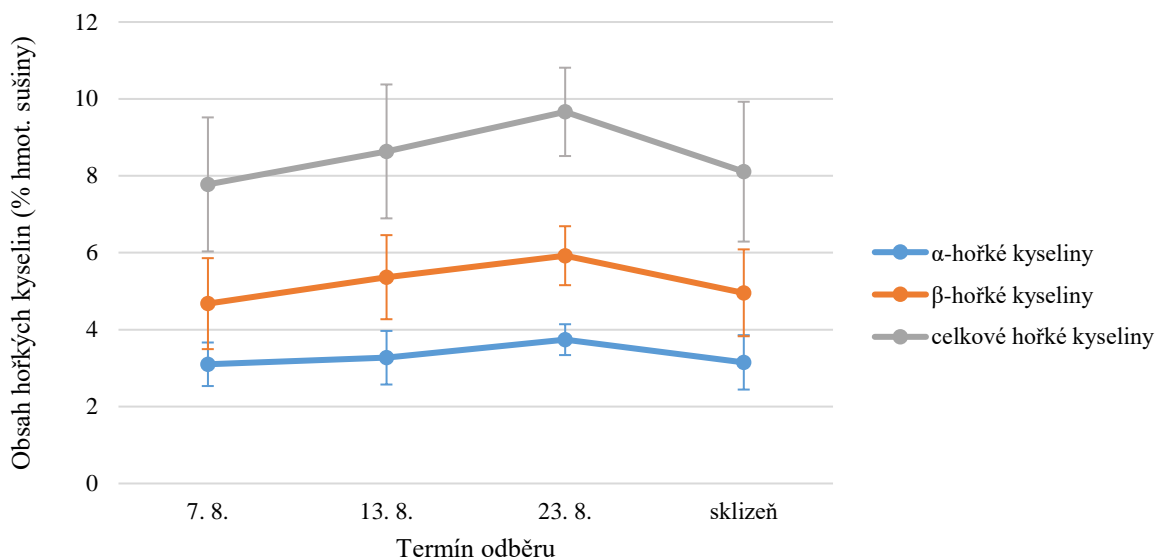
Mezi obsahy hořkých kyselin v různých termínech při ošetření přípravkem Bajkal neexistovaly statisticky významné rozdíly (viz graf 2). Nejvyšší obsah α -hořkých (5,1 %) a celkových hořkých kyselin (12,5 %) byl zaznamenán u vzorků ze 7. 8. a nejnižší při sklizni, kdy obsah α -hořkých klesl na 3 % a celkový obsah hořkých kyselin se snížil na 8,3 %. Obsah β -hořkých kyselin byl nejvyšší v termínu 23. 8. (8 %) a nejnižší taktéž při sklizni (5,3 %).



Graf 2: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu u chmele ošetřeného přípravkem Bajkal.

Ošetření přípravkem Alginure

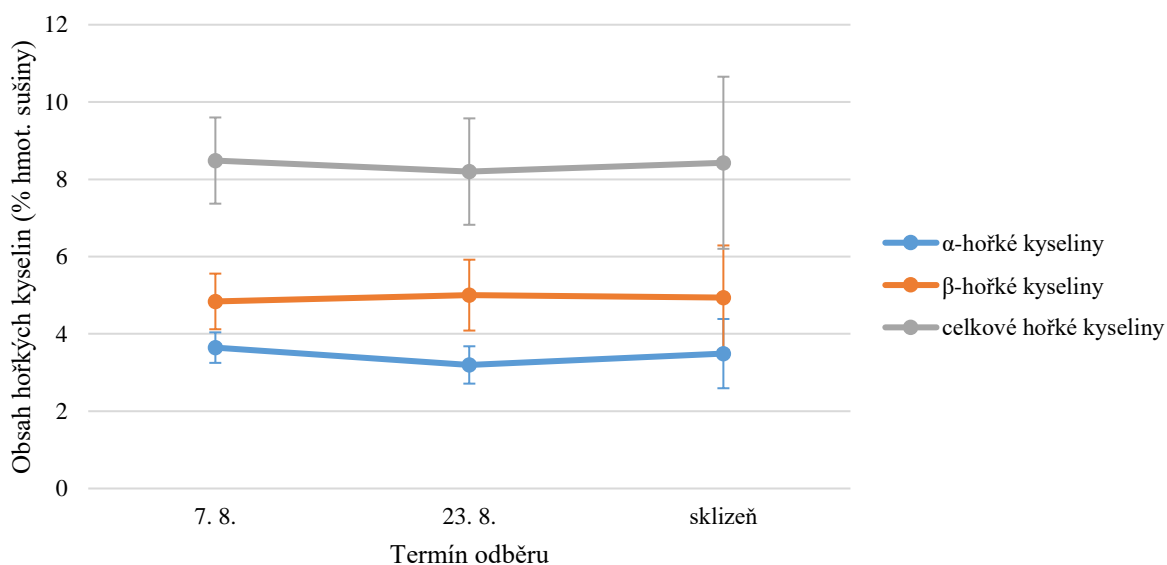
Přestože nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi termíny, lze z grafu 3 podle průměrných hodnot vidět trend zvyšování obsahu α - i β -hořkých kyselin do 23. 8. až na celkových 9,7 % a následný pokles v termínu sklizně na průměrných 8,1 %.



Graf 3: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu u chmele ošetřeného přípravkem Alginure.

Ošetření přípravkem PreVB2

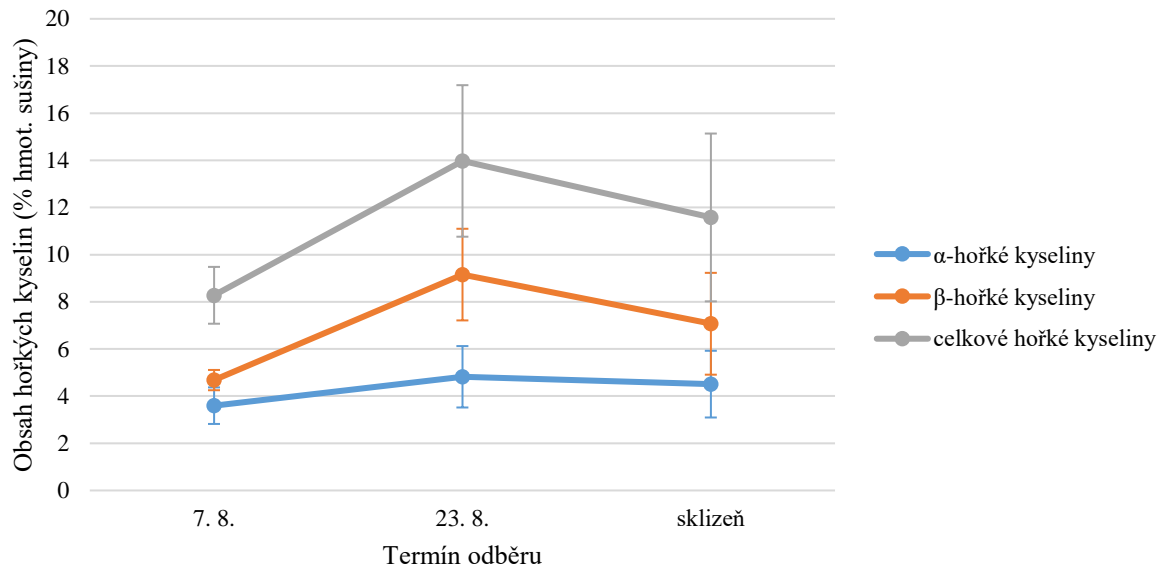
U vzorků odebraných v termínu 13. 8. existoval statisticky významný rozdíl mezi lokalitami (viz příloha 3). Z grafu 4 lze podle průměrných hodnot vidět, že obsah α -hořkých i β -hořkých kyselin byl mezi 7. 8. a sklizní poměrně konstantní okolo 8,3 %. Mírné snížení lze pozorovat u průměrné hodnoty obsahu α -hořkých kyselin v termínu 23. 8.



Graf 4: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu u chmele ošetřeného přípravkem PreVB2.

Ošetření tymiánovou silicí

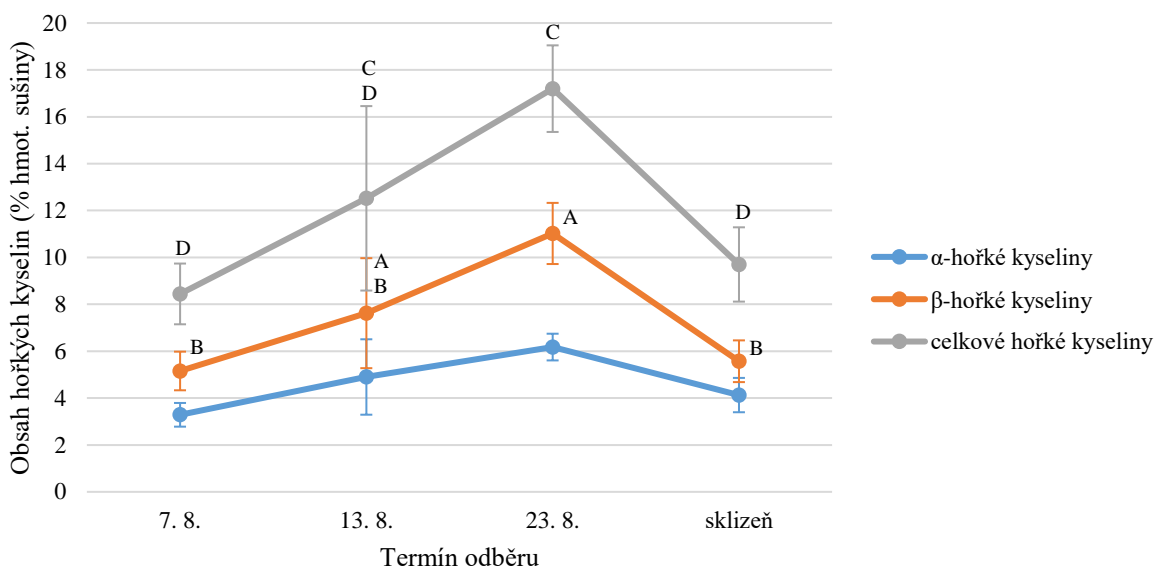
U vzorků ze 13. 8. byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi lokalitami (viz příloha 4). Přestože mezi vzorky různých termínů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly, lze z grafu 5 podle průměrů pozorovat trend nárůstu obsahu hořkých kyselin od 7. 8. z 8,3 % do 23. 8. na 14 %. Při sklizni byl obsah nižší (11,6 %).



Graf 5: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu u chmele ošetřeného tymiánovou silicí.

Ošetření chmelovým extraktem

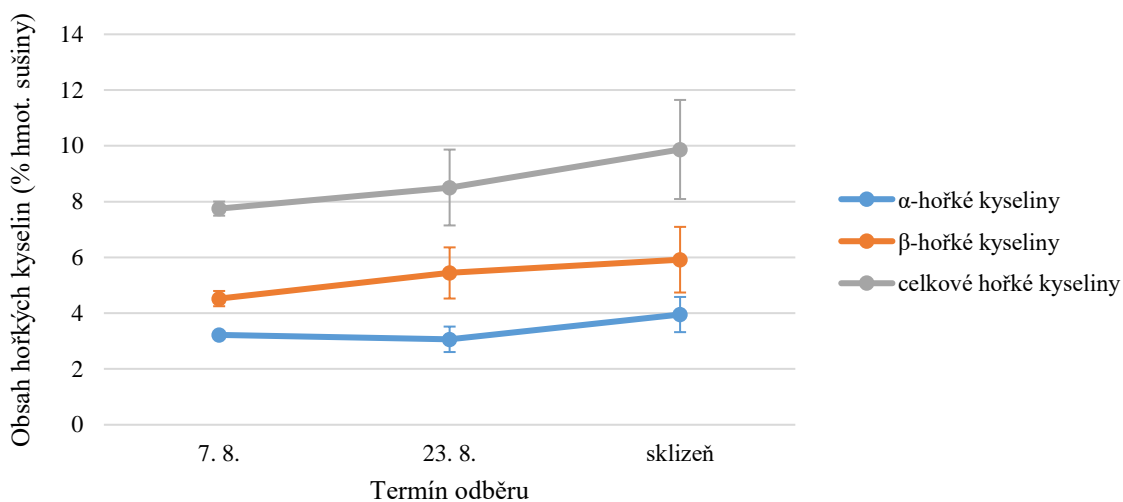
Ve vzorcích ošetřených chmelovým extraktem sice nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi lokalitami, existovaly ale rozdíly mezi termíny v obsahu β -hořkých a celkových hořkých kyselin (viz graf 6). Nejvyšší obsah β -hořkých kyselin (11 %) a celkových hořkých kyselin (17,2 %) měly vzorky z termínu 23. 8. a statisticky významně se lišily od termínu 7. 8. (5,2 %, resp. 8,4 %) a sklizně (5,6 %, resp. 9,7 %), kdy byl obsah látek nižší. Zároveň lze podle průměrů sledovat stoupající trend obsahů do 23. 8. a významný pokles v termínu sklizně.



Graf 6: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu u chmele ošetřeného chmelovým extraktem. Písmena značí skupiny, mezi kterými byl prokázán statisticky významný rozdíl s pravděpodobností $p < 0,05$.

Konvenční ošetření

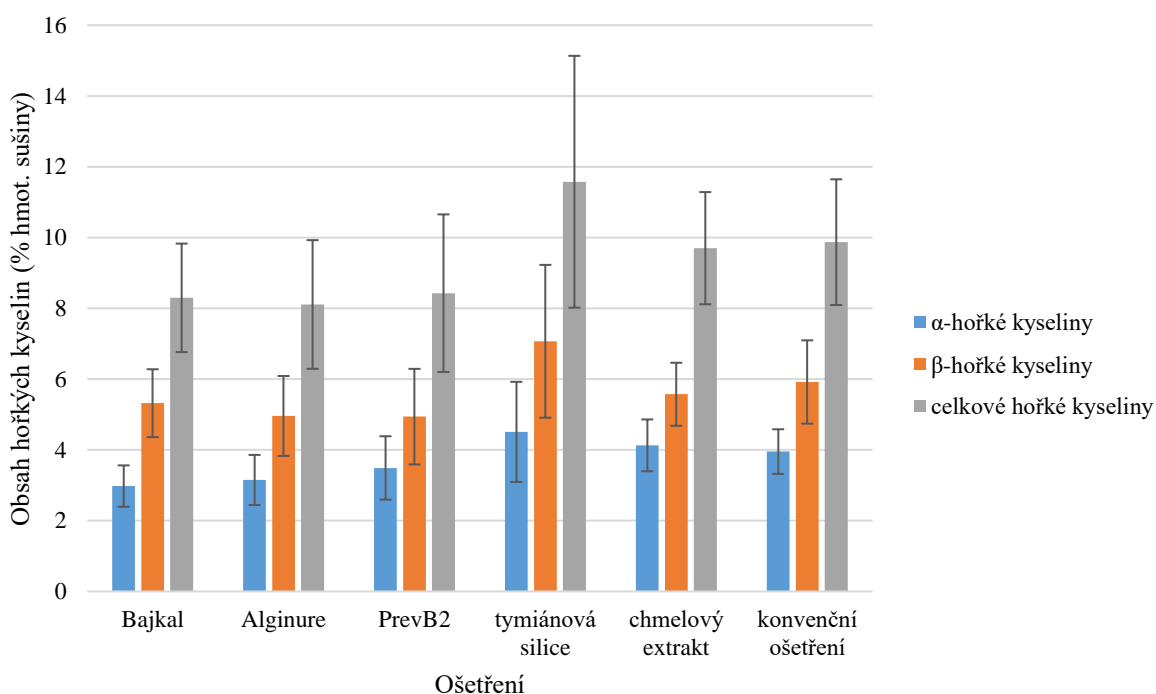
V konvenčně ošetřených vzorcích z 13. 8. byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi lokalitami a tyto výsledky jsou uvedeny v příloze 5. Podle průměrných hodnot obsah hořkých kyselin v konvenčně ošetřených vzorcích postupně stoupal a nejvyšší byl při sklizni (viz graf 7). Obsah α -hořkých kyselin tvořil průměrně 4 % a β -hořkých 6 %.



Graf 7: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu u chmele ošetřeného konvenčně.

Obsah hořkých kyselin při sklizni

V grafu 8 jsou znázorněny obsahy α -hořkých, β -hořkých a celkových hořkých kyselin ve vzorcích jednotlivých ošetření v termínu sklizně. Mezi jednotlivými ošetřeními nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly, podle průměrných hodnot lze nicméně sledovat nejvyšší obsah α -hořkých (4,5 %), β -hořkých (7 %) i celkových hořkých kyselin (11,6 %) po ošetření tymiánovou silicí. Podobné obsahy byly ve vzorcích ošetřených chmelovým extraktem a konvenčně, obsah α -hořkých se u nich pohyboval okolo 4 %, β -hořkých okolo 5,7 % a celkových hořkých kyselin okolo 9,7 %. Nejnižší obsahy byly pozorovány u vzorků ošetřených alternativními přípravky Bajkal, Alginure a Prev B2, průměrný obsah α -hořkých kyselin se u nich pohyboval kolem 3,2 %, β -hořkých kyselin kolem 5 % a celkových hořkých kyselin okolo 8,3 %. Poměr α -hořkých a β -hořkých kyselin, který má také význam pro charakteristiku vzorků chmele, je uveden v tabulce 4. Tento poměr byl nejvyšší u vzorků ošetřených chmelovým extraktem, nejmenší u vzorků ošetřených přípravkem Bajkal.



Graf 8: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami v závislosti na ošetření při sklizni.

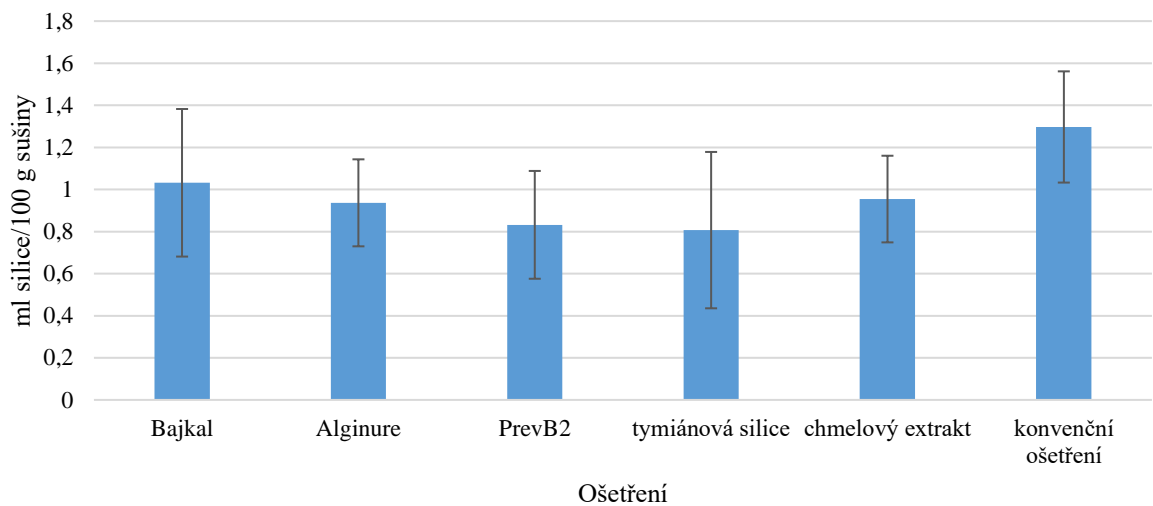
Tabulka 4: Poměr obsahů α -hořkých a β -hořkých kyselin při sklizni v závislosti na ošetření.

Varianta ošetření	Poměr α/β
Bajkal	0,56
Alginure	0,64
PrevB2	0,71
tymiánová silice	0,64
chmelový extrakt	0,74
konvenční ošetření	0,67

5.2 Obsah silic

Pro vyhodnocení obsahu silice ve vzorcích podle jednotlivých ošetření byl obsah silice zjištěný po destilaci přepočítán na obsah silice ve 100 g sušiny daného vzorku.

Mezi obsahem silic ve vzorcích ze sklizně neexistovaly statisticky významné rozdíly mezi variantami ošetření (viz graf 9). Nejvyšší průměrný obsah silice byl zaznamenán u konvenčního ošetření (1,3 ml/100 g sušiny), naopak nejnižší obsah silice byl naměřen u ošetření tymiánovou silicí (0,8 ml/100 g sušiny).



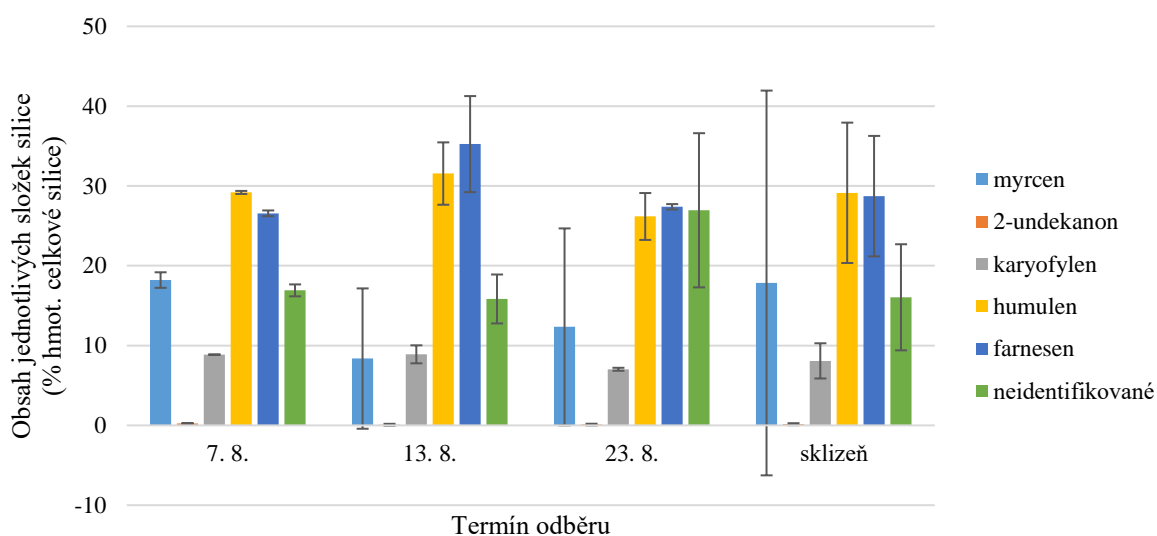
Graf 9: Průměrné hodnoty obsahu silice se směrodatnými odchylkami v závislosti na ošetření při sklizni.

5.3 Složení silic

V každém vzorku byly identifikovány nejčastěji zastoupené složky silice. Složení silice se mezi lokalitami statisticky významně nelišilo, proto byly výsledky z obou lokalit vyhodnocovány dohromady. Hodnoty jsou uváděny jako procento celkového obsahu silice v daném vzorku.

Ošetření přípravkem Bajkal

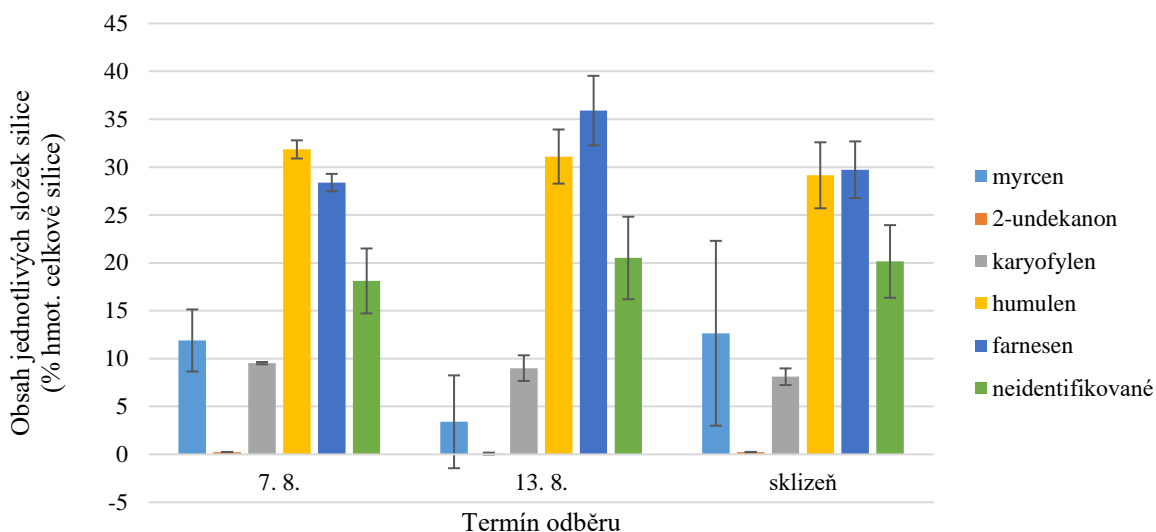
Zastoupení jednotlivých složek silice se u vzorků ošetřených přípravkem Bajkal během sledovaného období vegetace měnilo, ne však výrazně (viz graf 10). Nejvíce zastoupen byl farnesen a humulen, u myrcenu byly zaznamenány významné odchylky. 2-undekanon se ve vzorcích vyskytoval ve velmi nízkých množstvích kolem 0,14 %.



Graf 10: Průměrné hodnoty obsahu složek silice se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu při ošetření přípravkem Bajkal.

Ošetření přípravkem Alginure

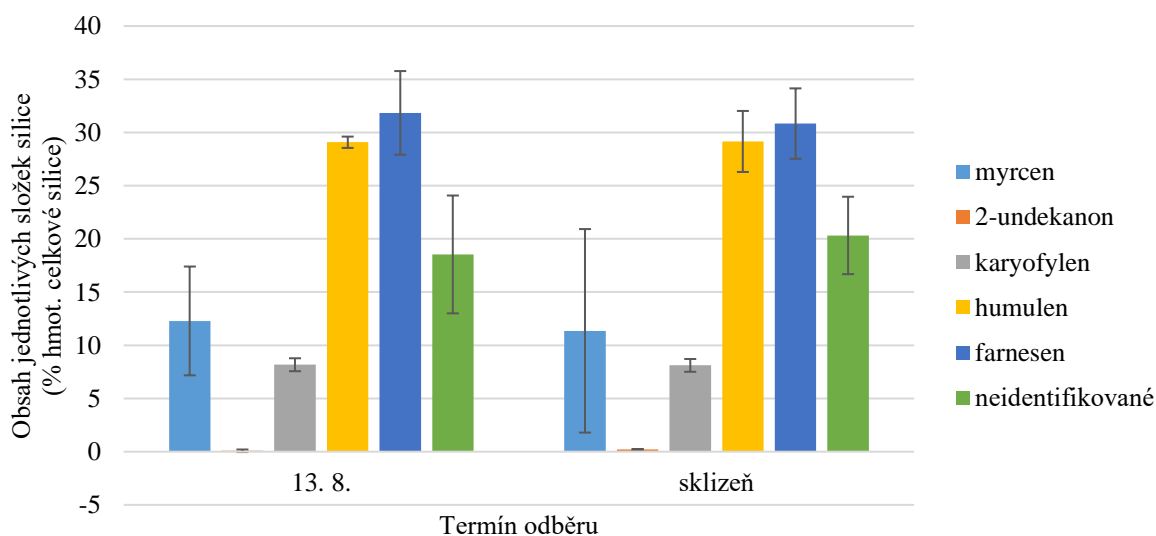
Humulen i farnesen tvořily ve všech termínech odběru více než 20 % celkového množství silice (viz graf 11). U obsahu myrcenu byly zaznamenány největší odchylky, u ostatních čtyř látek byly odchylky nižší a jejich procentuální obsah se příliš neměnil. Obsah 2-undekanonu byl nízký okolo 0,19 %.



Graf 11: Průměrné hodnoty obsahu složek silice se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu při ošetření přípravkem Alginure.

Ošetření přípravkem PreVB2

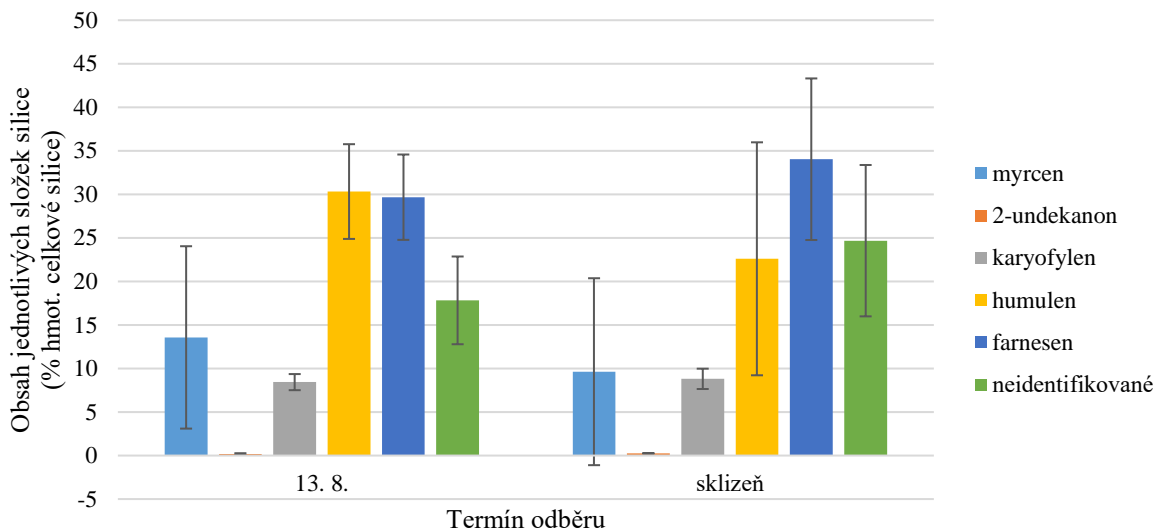
Obsah myrcenu vykazoval výrazné odchylky (viz graf 12). Obsahy farnesenu a humulenu byly podobné okolo 30 %. Zastoupení karyofyleny bylo srovnatelné v obou termínech 8,1 %. Průměrný obsah 2-undekanonu byl 0,15 %.



Graf 12 Průměrné hodnoty obsahu složek silice se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu při ošetření přípravkem PreVB2.

Tymiánová silice

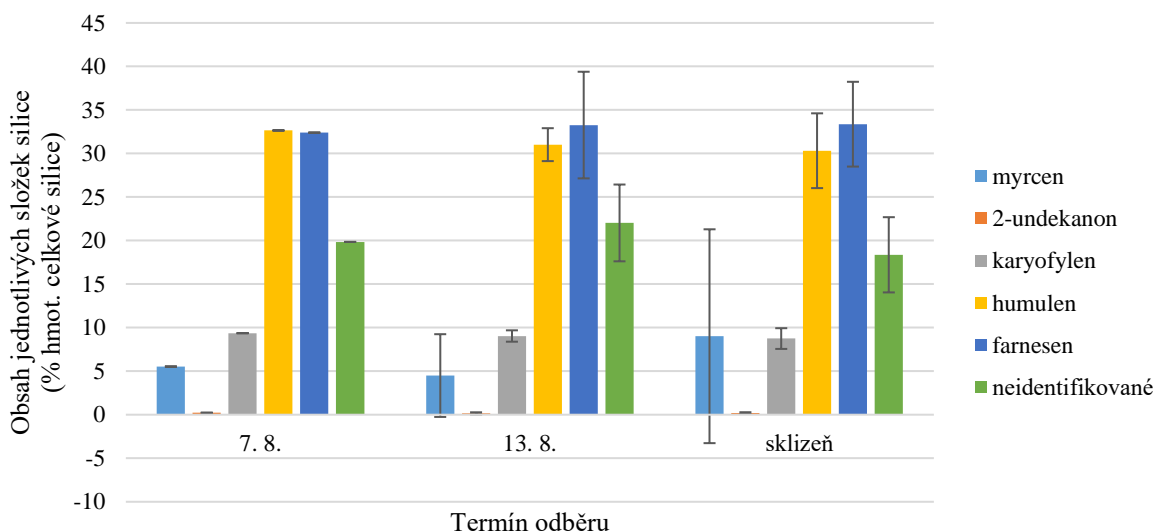
Nejvíce zastoupen byl farnesen a humulen, vykazovaly však poměrně velké odchylky v termínu sklizně (viz graf 13). Největší odchylky byly pozorovány u obsahu myrcenu. 2-undekanon byl průměrně zastoupen 0,2 %.



Graf 13: Průměrné hodnoty obsahu složek silice se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu při ošetření tymiánovou silicí.

Chmelový extrakt

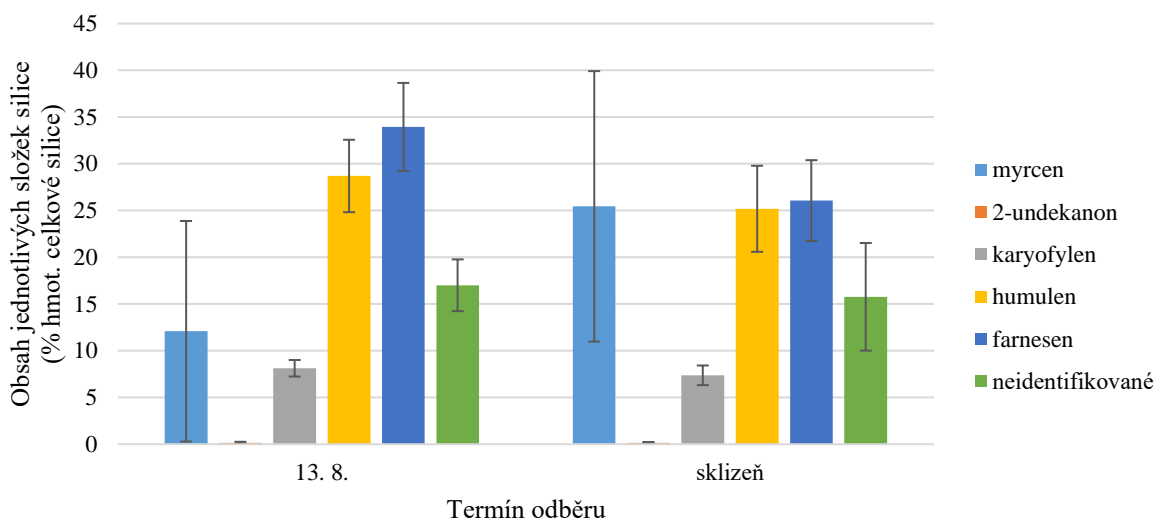
Procentuální zastoupení sledovaných složek se v průběhu růstu příliš neměnilo (viz graf 14). Více než 30 % byly zastoupeny farnesen a humulen. Karyofylen dosahoval téměř 10 % s poměrně malými odchylkami. Odchylky obsahu myrcenu byly nejvýraznější.



Graf 14: Průměrné hodnoty obsahu složek silice se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu při ošetření chmelovým extraktem.

Konvenční ošetření

Největší odchylky byly zaznamenány u obsahu myrcenu, jehož obsah se během růstu zvýšil a při sklizni byl srovnatelný s obsahem farnesenu a humulenu (viz graf 15). Naopak obsah farnesenu a humulenu se během růstu snížil. Obsahy ostatních látek se během růstu příliš neměnily.

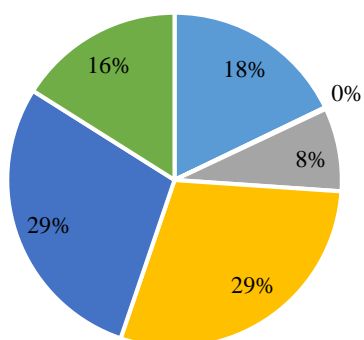


Graf 15: Průměrné hodnoty obsahu složek silice se směrodatnými odchylkami v závislosti na termínu při konvenčním ošetření.

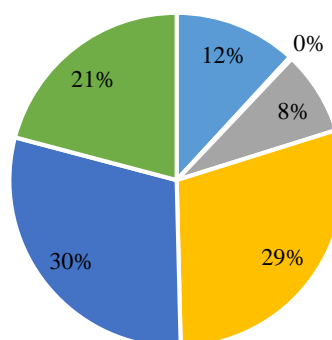
Zastoupení jednotlivých složek silice při sklizni

V grafu 16 je znázorněno zastoupení jednotlivých sledovaných složek silic při sklizni: myrcenu, 2-undekanonu, karyofylenu, humulenu a farnesenu a také neidentifikovaných složek. Mezi jednotlivými ošetřeními nebyly zaznamenány statisticky průkazné rozdíly v obsahu těchto složek. Podle průměrných hodnot je však patrný vyšší obsah myrcenu v konvenčně ošetřených vzorcích (26 %) a nízký v případě ošetření tymiánovou silicí (10 %) a chmelovým extraktem (9 %). Obsah 2-undekanonu byl u všech variant nízký a v tomto grafu je proto vyjádřen 0 %. Obsah karyofylenu se mezi vzorky příliš nelišil. Obsah humulenu byl nejnižší při ošetření tymiánovou silicí, a naopak nejvyšší po ošetření chmelovým extraktem, vzorky ošetřené přípravky dostupnými na trhu obsahovaly shodně 29 % humulenu. Nejnižší obsah farnesenu byl zaznamenán u konvenčně ošetřených vzorků a nejvyšší pak u vzorků ošetřených tymiánovou silicí a chmelovým extraktem. Obsah složek, které se nepodařilo identifikovat, se pohyboval od 16 % u vzorků ošetřených přípravkem Bajkal a konvenčně po 25 % v případě ošetření tymiánovou silicí.

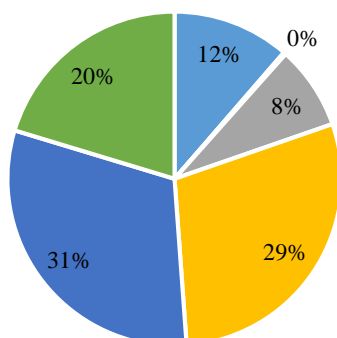
Bajkal



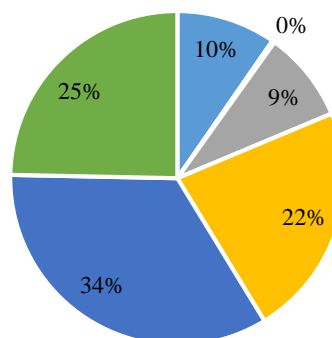
Alginure



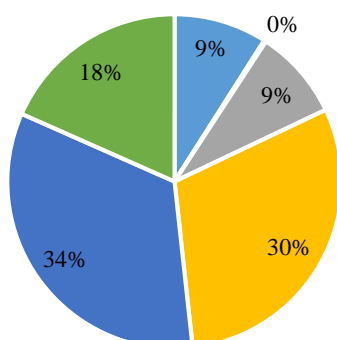
PrevB2



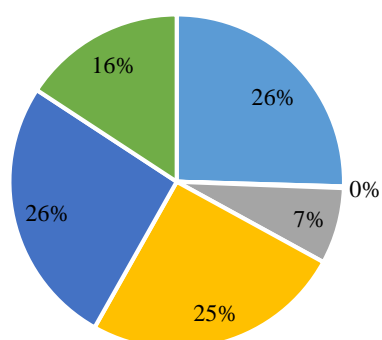
Tymiánová silice



Chmelový extrakt



Konvenční ošetření



■ myrcen ■ 2-undekanon ■ karyofylen ■ humulen ■ farnesen ■ neidentifikované

Graf 16: Zastoupení jednotlivých terpenů v silici všech šesti variant ošetření při sklizni (% celkové silice).

6 Diskuze

Tradičně používané fungicidní ošetřující přípravky obsahující měď jsou sice efektivní pro kontrolu houbových patogenů, mají ovšem některé negativní účinky jak na kvalitu chmele samotného, tak na životní prostředí a organismy žijící v půdě. Nepříznivé působení mědi je podloženo také faktem, že používání sloučenin mědi při ochraně rostlin bylo významně omezeno evropskou legislativou s doporučením vstup uvedených látek do prostředí v budoucnu úplně vyloučit (Evropská komise 2018).

Některé alternativní postupy, jako je např. aplikace mikrobiálních přípravků, kompetitivních mikroorganismů, extraktů z rostlin nebo přípravků přirozeně posilujících imunitu rostlin, zmiňují Ghorbani & Wilcockson (2004) s tím, že však zatím nejsou k dispozici takové prostředky, které by byly vhodné i z ekonomického hlediska, a je proto podle nich žádoucí zabývat se dalšími možnostmi ochrany rostlin a jejich vlivem na rostliny samotné.

Průměrné hodnoty obsahů α -hořkých kyselin ve vzorcích všech šesti ošetření odpovídaly hodnotám 3,0-4,5 %, které uvádí pro Žatecký poloraný červeňák Krofta (2003). Nejvíce α -hořkých kyselin bylo zjištěno ve vzorcích ošetřených tymiánovou silicí (4,5 %), což je více než 2,32 % uváděných Jelínkem et al. (2010) a 2,85 % zjištěných Kroftou & Patzakem (2011). K těmto hodnotám se blíží výsledky vzorků ošetřených přípravkem Bajkal, které zároveň obsahovaly α -hořkých kyselin nejméně. Vzorky ošetřené tymiánovou silicí obsahovaly také nejvíce β -hořkých kyselin (7,0 %), což je dokonce více než pro Žatecký poloraný červeňák uváděných 4,5-6,5 % (Krofta 2003). Jelínek et al. (2010) uvádí obsah β -hořkých kyselin 3,4 %, což je méně než 4,9 % zjištěných u vzorků ošetřených přípravkem PrevB2, ve kterých byl obsah β -hořkých kyselin v rámci této práce nejnižší. Krofta & Patzak (2011) uvádí obsah β -hořkých kyselin 5,56 %, který je srovnatelný se vzorky ošetřenými chmelovým extraktem (5,57 %) a blíží se vzorkům ošetřeným přípravkem Bajkal (5,32 %) a konvenčně (5,92 %).

Chmelové odrůdy jsou charakterizovány také poměrem α - a β -hořkých kyselin, přičemž pro jemně aromatické odrůdy je typický poměr menší než 1. Pro odrůdu Žatecký poloraný červeňák se udává typický rozsah 0,6-0,8 (Krofta 2003). Kromě chmele ošetřeného přípravkem Bajkal, v němž byl poměr α/β hořkých kyselin 0,56, se poměry vzorků nacházely v uvedeném rozmezí. Největší poměr 0,74 byl u chmele ošetřeného chmelovým extraktem. Zjištěné poměry korespondují také s hodnotou 0,68 uváděnou Jelínkem et al. (2010). Nižší poměr (0,51) než byl zjištěn v jiných studiích a této práci uvádí Krofta & Patzak (2011).

Princip analýzy hořkých kyselin byl srovnatelný s uvedenými autory, v některých případech se lišila mobilní fáze, průtok a teplota kolony a spektra v uvedených studiích byla zaznamenávána při vlnové délce 314 nm. Obsahem α -hořkých a β -hořkých kyselin ve chmelu se zabývali také De Keukeleire et al. (2003), nicméně stanovovali tyto obsahy u jiných chmelových odrůd, které na rozdíl od Žateckého poloraného červeňáku obsahují více α -hořkých než β -hořkých kyselin a konkrétní srovnání výsledků proto v tomto případě není vhodné. Lze však s jejich prací porovnat trendy vývoje obsahů látek v průběhu času. Uvádí např., že obsah látek u odrůdy Wye Target se v posledních 2 týdnech téměř neměnil a lze usoudit, že tato odrůda je raná a teoreticky by mohla být sklizena již od poloviny srpna. Podobný trend lze pozorovat u vzorků ošetřených přípravkem PrevB2, u kterých se v tomto období obsah hořkých kyselin taktéž téměř nezměnil. U odrůdy Golding bylo zjištěno, že v posledních 14 dnech před sklizní se obsah β -hořkých kyselin snížil o 15 %, v této práci bylo dokonce u vzorků ošetřených

chmelovým extraktem zjištěno předsklizňové snížení obsahu β -hořkých kyselin o polovinu. U vzorků ošetřených přípravky Bajkal a Alginure lze zase vidět, že obsah hořkých kyselin se v období těsně před sklizní snížil. Lze uvažovat o tom, zda na to neměly největší vliv nestandardní klimatické podmínky roku 2018, kdy plodiny obecně dozrávaly dříve, než je běžné. Autoři navíc uvádí, že každá odrůda vykazuje velmi specifický časový vývoj obsahových látek.

V roce 1989 byl proveden výzkum zabývající se vlivem ošetření na obsah těžkých kovů a pivovarsky důležitých látek ve chmelu (Šovljanski et al. 1989). Chmel byl ošetřen různými variantami fungicidů a insekticidů. K pokusu sice byla využita jiná odrůda chmele, nicméně výsledky ukazují, že se statisticky významně nelišil obsah hořkých kyselin mezi variantami ošetřenými měďnatými fungicidy a jejich alternativami, což odpovídá i výsledkům této práce.

Obsah silice v aromatické chmelové odrůdě Hallertauer Mittelfrueh, která je podobná odrůdě Žatecký poloraný červeňák, se pohybuje od 0,70 do 1,30 ml/100 g sušiny (Bailey et al. 2009), což je srovnatelné s hodnotami zjištěnými v rámci této práce, které se pohybovaly od 0,45 do 1,56 ml/100 g sušiny. Pokud se obsah silice přepočítá pomocí vztahu uvedeného Aberl & Coelhan (2012), podle kterého 1 ml silice přibližně odpovídá 0,82 g silice, je pak výsledný obsah 0,37-1,28 g/100 g sušiny. Výsledných 0,37-1,28 % hmot. sušiny odpovídá údajům Krofta (2003), podle nichž chmelové odrůdy střední Evropy typicky obsahují nízká množství silice od 0,4 do 1,0 % hmot sušiny. V obsahu silice mezi jednotlivými ošetřeními nebyl statisticky významný rozdíl a zároveň zjištěný obsah koresponduje s obsahem uváděným pro příbuzné aromatické chmelové odrůdy. Alternativní přípravky tedy podle těchto výsledků mají neutrální vliv na obsah silice v chmelových hlávkách. Vliv na obsah silice má celá řada faktorů, jak oblast pěstování a klimatické podmínky, tak následný způsob zpracování chmele a teplota skladování (Eyres & Dufour 2009).

Zastoupení jednotlivých složek chmelové silice je pro každou odrůdu specifické a existují dokonce výzkumy zabývající se zjišťováním autenticity odrůd chmele podle některých obsahových látek (Jelínek et al. 2010; Krofta & Patzak 2011). Pro Žatecký poloraný červeňák uvádí Krofta & Patzak (2011) jako jednu z typických vlastností obsah farnesenu, který bývá zastoupen více než 10 % hmot. silice, podle výsledku autorů se pohybuje od 13 do 17 %. V dřívějším výzkumu byl zjištěn obsah farnesenu v rozmezí 14-20 % (Krofta 2003). V této práci se výsledný obsah farnesenu pohyboval okolo 30 %, což se blíží spíše výsledkům Jelínka et al. (2010), kteří uvádí výsledný obsah farnesenu 24,87 %. Zároveň nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu farnesenu mezi jednotlivými variantami ošetření, alternativní přípravky by tedy na obsah farnesenu měly mít neutrální vliv. Nejvyšší obsah byl zjištěn ve vzorcích ošetřených tymiánovou silicí a chmelovým extraktem (oba 34 %) a naopak nejméně farnesenu obsahoval konvenčně ošetřený chmel (26 %).

Zastoupení jednotlivých složek chmelové silice sledovali také Aberl & Coelhan (2012), podle nichž se obsah humulenu v jednotlivých odrůdách liší a bývá zastoupen 15-42 %. Výsledný obsah humulenu zjištěný v této práci se pohyboval od 23 % u vzorku ošetřeného tymiánovou silicí po 30 % u vzorku ošetřeného chmelovým extraktem, což odpovídá hodnotám zjištěným pro Žatecký poloraný červeňák v literatuře, kde se uvádí obsah humulenu 15-25 % (Krofta 2003), případně 23,4 % (Jelínek et al. 2010). Ve výzkumu Aberl & Coelhan (2012) byly sledovány obsahové látky několika chmelových odrůd a pro porovnání s touto prací byla vybrána odrůda Hallertauer, která mívá podobné obsahy biologicky aktivních látek jako

Žatecký poloraný červeňák. Humulen byl v odrůdě Hallertauer zastoupen 27 %, což koresponduje s výsledky této práce. Pro další příbuznou odrůdu, Hallertauer Mittelfrueh, je uváděno významnější zastoupení humulenu (45-55 %) (Bailey et al. 2009).

Myrcen bývá v příbuzných odrůdách zastoupen 35 % (Aberl & Coelhan 2012), případně 20-28 % (Bailey et al. 2009). Pro odrůdu Žatecký poloraný červeňák se uvádí obsah myrcenu 21,7 % (Jelínek et al. 2010), přičemž výsledky této práce se pohybují od 10 % u vzorku tymiánové silice do 25 % v případě konvenčního ošetření. Při stanovení myrcenu byly zjištěny největší směrodatné odchylky a výsledky jeho obsahu proto mají největší rozptyl. Alespoň střední hodnoty obsahu myrcenu korespondují s hodnotami uváděnými v literatuře.

Obsah karyofylenu se pohyboval od 7,4 % u konvenčně ošetřeného chmele po 8,7 % u chmele ošetřeného tymiánovou silicí. Tyto hodnoty se shodují s obsahy 8 % (Jelínek et al. 2010) a 5-10 % (Krofta 2003) zjištěnými v literatuře. V příbuzných odrůdách je karyofylen zastoupen 10-15 % (Bailey et al. 2009; Aberl & Coelhan 2012).

Nejméně zastoupenou identifikovanou složkou silice byl 2-undekanon, jehož obsah se uvádí okolo 0,98 %. V této práci byl jeho obsah stanoven od 0,15 % u chmelu ošetřeného přípravkem Bajkal po 0,25 % u chmele ošetřeného tymiánovou silicí. V odrůdě Hallertauer Mittelfrueh byl 2-undekanon zastoupen 0,5 % (Aberl & Coelhan 2012).

U všech pěti sledovaných složek chmelové silice (farnesen, humulen, myrcen, karyofylen, 2-undekanon) figuroval chmel ošetřený tymiánovou silicí. Obsahoval totiž nejvyšší množství farnesenu, karyofylenu a 2-undekanonu a naopak nejnižší množství humulenu a myrcenu. Výsledky jsou tedy pro tymiánovou silici jako ošetřující přípravek příznivé, jelikož myrcen, kterého takto ošetřené vzorky obsahovaly nejméně, bývá považován za sloučeninu negativní pro tzv. evropské aroma chmele (Basařová et al. 2010). Naopak chmel ošetřený konvenčně obsahoval myrcenu nejvíce a zároveň obsahoval nejnižší množství pozitivních složek farnesenu a karyofylenu.

Diskutované práce se zabývaly stanovením obsahů biologicky aktivních látek ve chmelu, nicméně se nepodařilo najít aktuální studii, která by informovala o vlivu alternativních ošetření na tyto obsahy. V rámci této práce bylo zjištěno, že alternativní přípravky mají na obsah biologicky aktivních látek chmele srovnatelný vliv jako konvenční způsoby ošetření, a v několika případech dokonce alternativně ošetřené rostliny chmele vytvářely více hořkých kyselin a složek silice než po klasickém konvenčním ošetření.

Zdá se tedy, že by tyto přípravky mohly sloužit jako alternativa pesticidů pro ochranu rostlin. Významným přínosem by bylo snížení zátěže životního prostředí omezením konvenčních přípravků a zároveň zvýšení kvality zemědělských plodin a potravin díky snížení reziduí pesticidů. V budoucnu by bylo vhodné zaměřit se mj. na účinnost těchto látek proti jiným chorobám zemědělských plodin.

Překážku by ovšem mohla tvořit legislativa a registrace těchto přípravků, která je poměrně náročnou a dlouhodobou záležitostí vyžadující větší množství studií nejen na účinnost proti patogenům a vliv na kvalitativní vlastnosti chmele, ale také z hlediska účinků na půdní a vodní organismy, hmyz, ptáky a kumulaci v životním prostředí. Pro obhájení komerčního používání těchto látek tak bude pravděpodobně potřeba provést další pokusy.

7 Závěr

Cílem předložené práce bylo stanovit obsah α -hořkých a β -hořkých kyselin a obsah a složení silic v chmelových hlávkách a zjistit, jaký vliv mají na obsah těchto látek alternativní fungicidy ve srovnání s konvenční variantou ošetření.

Na základě výzkumu bylo zjištěno, že alternativní fungicidní přípravky mají neutrální vliv na obsah hořkých kyselin i na obsah a složení silice ve chmelu. Na základě průměrných hodnot lze dále uvést, že chmel ošetřený tymiánovou silicí obsahoval nejvíce α -hořkých kyselin (4,5 % hmot. sušiny) i β -hořkých kyselin (7,0 % hmot. sušiny). Poměr α -hořkých a β -hořkých kyselin v rozmezí 0,56-0,74 u všech variant ošetření odpovídá typickému poměru pro jemně aromatické chmele. Největší obsah chmelové silice byl podle průměrných hodnot zjištěn u chmele ošetřeného konvenčně: 1,3 ml/100 g sušiny. Chmel ošetřený tymiánovou silicí a chmelovým extraktem obsahoval největší podíl farnesenu (34 % hmot. silice), který je typický pro jemně aromatické odrůdy chmele. Chmel ošetřený konvenčně naopak obsahoval nejvíce myrcenu (26 % hmot. silice), jehož vysoký podíl ve chmelové silici není žádoucí.

Podle zjištěných výsledků byla přijata hypotéza: Alternativní fungicidní přípravky mají neutrální vliv na obsah biologicky aktivních látek v chmelových hlávkách v porovnání s konvenční variantou ošetření.

8 Seznam literatury

- Aberl A, Coelhan M. 2012. Determination of volatile compounds in different hop Varieties by headspace-trap GC/MS-in comparison with conventional hop essential oil analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**:2785–2792.
- 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.
- Andriukaitis V. 2015. Odpověď komisaře Andriukaitise jménem Komise E-004245/2015. Available from http://www.europarl.europa.eu/doceo/document/E-8-2015-004245-ASW_CS.html.
- Aron PM, Shellhammer TH, Brew JI. 2011. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. *J. Inst. Brew.* **116**:369–380.
- Bailey B, Schönberger C, Drexler G, Gahr A, Newman R, Pöschl M, Geiger E. 2009. The Influence of Hop Harvest Date on Flavor Stability in Dry-hopped Beers. *Master Brewers Association of the Americas*:1–7. Available from <http://www.mbaa.com/publications/tq/tqPastIssues/2010/Abstracts/TQ-47-1-0219-01.htm>.
- Baker GA, Danenhower TM, Force LJ, Petersen KJ, Betts TA. 2008. HPLC Analysis of α - and β -Acids in Hops. *Journal of Chemical Education* **85**:954. Available from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed085p954>.
- Basařová G, Šavel J, Basař P, Lejsek T. 2010. Pivovarství. Vydavatelství VŠCHT, Praha.
- Bedini S, Flamini G, Girardi J, Cosci F, Conti B. 2015. Not just for beer: evaluation of spent hops (*Humulus lupulus* L.) as a source of eco-friendly repellents for insect pests of stored foods. *Journal of Pest Science* **88**:583–592.
- Biocont Laboratory. 2018. Alginure. Available from https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/eshop-cz-admin/system/470/attachments/data/000/000/215/original/Alginure_etiketa_CLP_2018.pdf?1542286592.
- Bravo L. 1998. Polyphenols : Chemistry , Dietary Sources , Metabolism , and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **56**:317–333.
- Calderwood LB, Lewins SA, Darby HM. 2015. Survey of northeastern hop arthropod pests and their natural enemies. *Journal of Integrated Pest Management* **6**:1–14.
- Coley-Smith JR. 1966. Early-season control of hop downy mildew, *Pseudoperonospora humuli* (Miy. and Tak.) Wilson, with streptomycin and protectant fungicides in severely infected plantings. *Annals of Applied Biology* **57**:183–191.
- ČSÚ. 2016. Statistická ročenka ČR 2016. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/13-zemedelstvi-0k8gqnbra0>.
- ČSÚ. 2018. Statistická ročenka ČR 2018. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/13-zemedelstvi-rp3zwooggx>.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* **22**:39–44.
- De Keukeleire D. 2000. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quimica Nova* **23**:108–112.
- De Keukeleire J, Ooms G, Heyerick A, Roldan-Ruiz I, Bockstaele E Van, De Keukeleire D. 2003. Formation and accumulation of alpha-acids; beta-acids; desmethylxanthohumol; and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **51**:4436–4441.
- de Souza EL, da Cruz Almeida ET, de Sousa Guedes JP. 2016. The Potential of the Incorporation of Essential Oils and Their Individual Constituents to Improve Microbial Safety in Juices: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*

- 15:753–772.
- Dieckmann RH, Palamand SR. 1974. Autoxidation of some constituents of hops. I. Monoterpene hydrocarbon, myrcene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **22**:498–503. Available from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60193a033>.
- Dresel M, Dunkel A, Hofmann T. 2015. Sensomics Analysis of Key Bitter Compounds in the Hard Resin of Hops (*Humulus lupulus* L.) and Their Contribution to the Bitter Profile of Pilsner-Type Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**:3402–3418.
- Evropská komise. 2012. Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 844/2012. Pages 26–32. Úřední věstník Evropské unie, EU.
- Evropská komise. 2018. Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 2018/1981. Pages 8–26. Úřední věstník Evropské unie, EU.
- Eyres GT, Dufour J-P. 2009. Hop Essential Oil: Analysis, Chemical Composition and Odor Characteristics. *Beer in Health and Disease Prevention*:239–254. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123738912000225>.
- Eyres GT, Marriott PJ, Dufour J-P. 2007. Comparison of Odor-Active Compounds in the Spicy Fraction of Hop (*Humulus lupulus* L.) Essential Oil from Four Different Varieties §. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:6252–6261. Available from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf070739t>.
- FAO. 2006. FAO Specifications and Evaluation for Agricultural Pesticides (Cymoxanil).
- Gent DH, Twomey MC, Wolfenbarger SN, Woods JL. 2015. Pre- and Postinfection Activity of Fungicides in Control of Hop Downy Mildew. *Plant Disease* **99**:858–865. Available from <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-14-1004-RE>.
- Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, Le Floch G, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. 2014. Biological control of plant pathogens: Advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research* **21**:4847–4860.
- Gharieb MM, 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.
- Ghorbani R, Wilcockson S. 2004. Reducing copper-based fungicide use in organic crop production systems. Page Handbook of organic food safety and quality. Pergamon Press Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-84569-010-6.50018-4>.
- Griffin MJ, Coley-Smith JR. 1971. Some Effects of Streptomycin on *Pseudoperonospora humuli*, the Downy Mildew of Hop. *Journal of General Microbiology* **69**:117–134.
- Griffin MJ, Coley-Smith JR. 1975. Uptake of streptomycin by sporangia of *Pseudoperonospora humuli* and the inhibition of uptake by divalent metal cations. *Transactions of the British Mycological Society* **65**:265–278. British Mycological Society. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000715367580009X>.
- Hermans-Lokkerbol ACJ, Verpoorte R. 1994. Development and validation of a high-performance liquid chromatography system for the analysis of hop bitter acids. *Journal of Chromatography A* **669**:65–73.
- Hirata H, Yimin, Segawa S, Ozaki M, Kobayashi N, Shigyo T, Chiba H. 2012. Xanthohumol Prevents Atherosclerosis by Reducing Arterial Cholesterol Content via CETP and Apolipoprotein E in CETP-Transgenic Mice. *PLoS ONE* **7**:1–8.
- Holý K, Procházka P, Štranc J, Štranc D, Štranc P. 2017. Integrovaná ochrana chmele. Praha. International Hop Growers' Convention. 2018. Economic Commission - Summary Reports. Nuremberg.
- Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* **19**:603–608.
- Jelínek L, Šneberger M, Karabín M, Dostálek P. 2010. Comparison of czech hop cultivars based

- on their contents of secondary metabolites. *Czech Journal of Food Sciences* **28**:309–316.
- Ježek J, Klupal I, Krofta K, Nesvadba V, Patzak J, Pokorný J, Svoboda P, Veselý F, Vostřel J. 2015. Chmel 2015. Chmelařský institut s.r.o., Žatec.
- Ježek J, Vostřel J, Krofta K, Klupal IVO. 2012. Ekologické pěstování chmele v České republice a ve světě Organic Hop Farming in Czech Republic and Worldwide. *Kvasný průmysl* **58**:294–302.
- Karabín M, Hudcová T, Jelínek L, Dostálek P. 2016. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **15**:542–567.
- Kovařík M. 2015. Český chmel. Ministerstvo zemědělství ČR, Žatec.
- Kramer B, Thielmann J, Hickisch A, Muranyi P, Wunderlich J, Hauser C. 2015. Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. *Journal of Applied Microbiology* **118**:648–657.
- Krofta K. 2003. Comparison of quality parameters of Czech and foreign hop varieties. *Plant, Soil and Environment* **49**:261–268.
- Krofta K. 2008. Hodnocení kvality chmele Metodika pro praxi. Chmelařský institut s.r.o., Žatec, Žatec.
- Krofta K, Ježek J, Kudrna T. 2011. Content of elementary copper in hops after repeated applications of copper fungicides. *Kvasný průmysl* **57**:417–423. Available from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/CZ/CZ1202.xml;CZ2012000155>.
- Krofta K, Patzak J. 2011. Investigation of Czech hop varieties authenticity by means of chemical and genetic analyses. *Kvasný průmysl* **57**:296–304. Available from <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2011035.html>.
- Marei GIK, Abdel Rasoul MA, Abdelgaleil SAM. 2012. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **103**:56–61. Elsevier Inc. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.03.004>.
- Martinez AG, Cisneros LEB, Toledo PD, Franco RS. 2012. United States Patent Copper-based fungicide/bactericide. US 8,192,766 B2. United States.
- Mizobuchi S, Sato Y. 1985. Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**:399–403.
- 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. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1094/ASBCJ-2009-1118-01>.
- Neve RA. 1991. Hops. Chapman and Hall.
- Nuutinen T. 2018. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **157**:198–228. Elsevier Masson SAS. Available from <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.076>.
- Oladokun O, Tarrega A, James S, Smart K, Hort J, Cook D. 2016. The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer. *Food Chemistry* **205**:212–220. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.023>.
- Pouvová D, Kokošková B, Pavela R, Ryšánek P. 2008. Effectivity of plant essential oils against *Clavibacter michiganensis*, in vitro. *Zemdirbyste-Agriculture* **95**:440–446.
- Pouvová D, Kokošková B, Pavela R, Ryšánek P. 2009. Ochrana proti bakteriálním patogenům. *Zahradnictví* **13**:39–40.
- Rettberg N, Biendl M, Garbe LA. 2018. Hop aroma and hoppy beer flavor: Chemical backgrounds and analytical tools—A review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **76**:1–20. Taylor & Francis.

- Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* **19**:681–687. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671350700151X>.
- Rybáček V et al. 1980. *Chmelařství*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Sanadze GA. 2004. Biogenic isoprene (a review). *Russian Journal of Plant Physiology* **51**:729–741.
- Skotland CB, Johnson DA. 1983. Control of Downy Mildew of Hops. *Plant Disease* **67**:1183–1185.
- Šovljanski R, Obradović S, Kišgeci J, Lazić S, Mačko V. 1989. The Heavy Metals Contents And Quality Of Hop Cones Treated By Pesticides During The Vegetation. *Acta Horticulturae* **249**:81–88.
- Speiser B, Berner A, Häseli A, Tamm L. 2000. Control of Downy Mildew of Grapevine with Potassium Phosphonate: Effectivity and Phosphonate Residues in Wine. *Biological Agriculture and Horticulture* **17**:305–312.
- Svaz pěstitelů chmele ČR. 2018. Tisková zpráva 9. 8. 2018, Pěstování chmele v roce 2018. Stekník.
- Takenaka S. 2015. Studies on biological control mechanisms of *Pythium oligandrum*. *Journal of General Plant Pathology* **81**:466–469. Springer Japan.
- ÚKZÚZ. 2018a. Přehled ploch chmele ČR - podle okresů. Available from http://eagri.cz/public/web/file/595090/Prehled_ploch_chmele_dle_oblasti_okresu_k_20_8_2018.pdf.
- ÚKZÚZ. 2018b. Tisková zpráva 10. 12. 2018, Sklizeň chmele v roce 2018 byla jedna z nejnižších. Available from <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/trvale-kultury/sklizen-chmele-v-roce-2018-byla-jedna-z.html>.
- Verkon. 2019. No Title. Available from <https://www.verkon.cz/pristroj-na-stanoveni-silic-v-rostlinnych-drogach-simax/>.
- Verzele M, De Keukeleire D. 1991. Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids. Elsevier Science Publishers B. V., Gent.
- Vostřel J, Klapal I, Kudrna T, Fořtová H. 2008. Metodika ochrany hybridních odrůd chmele proti peronospoře chmelové (*Peronosplasmopara humuli* Miy et Tak., Wils.). Chmelařský institut s.r.o., Žatec.
- WHO, FAO. 2018. Fosetyl-Aluminium (302) Phosphonic acid (301). FAO and WHO, Rome.
- Yong W, Ho Y, Abd Malek S. 2015. Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. *Pharmacognosy Magazine* **11**:275. Available from <http://www.phcog.com/text.asp?2015/11/44/275/166069>.

9 Samostatné přílohy

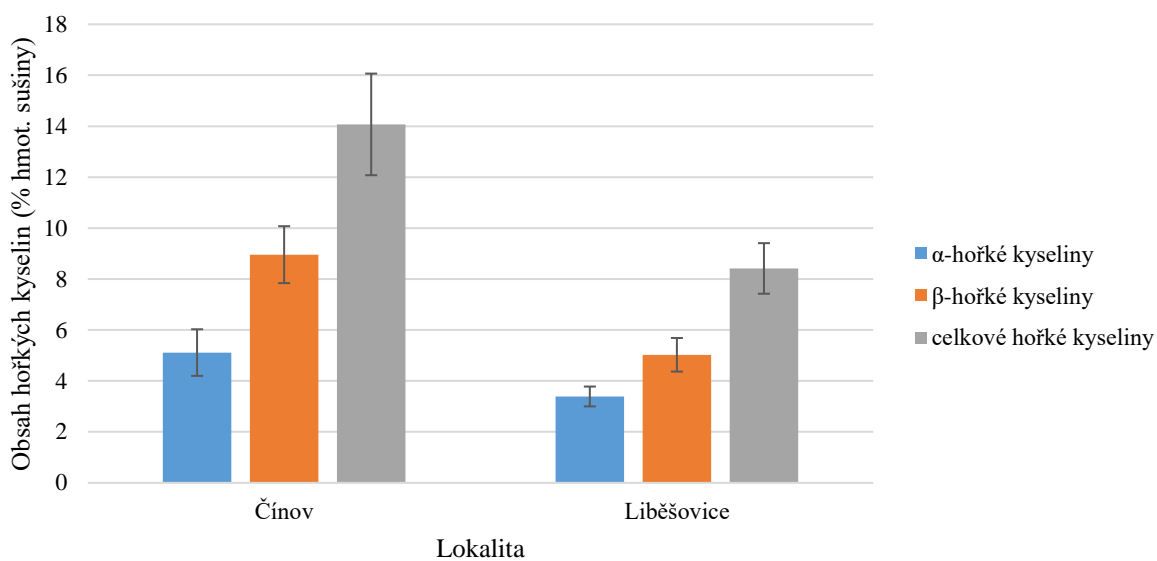
Příloha 1: Sled ošetření pokusných variant (varianta f označuje konvenční ošetření).

*) ke každé variantě bylo aplikováno 2000 l vody/ha

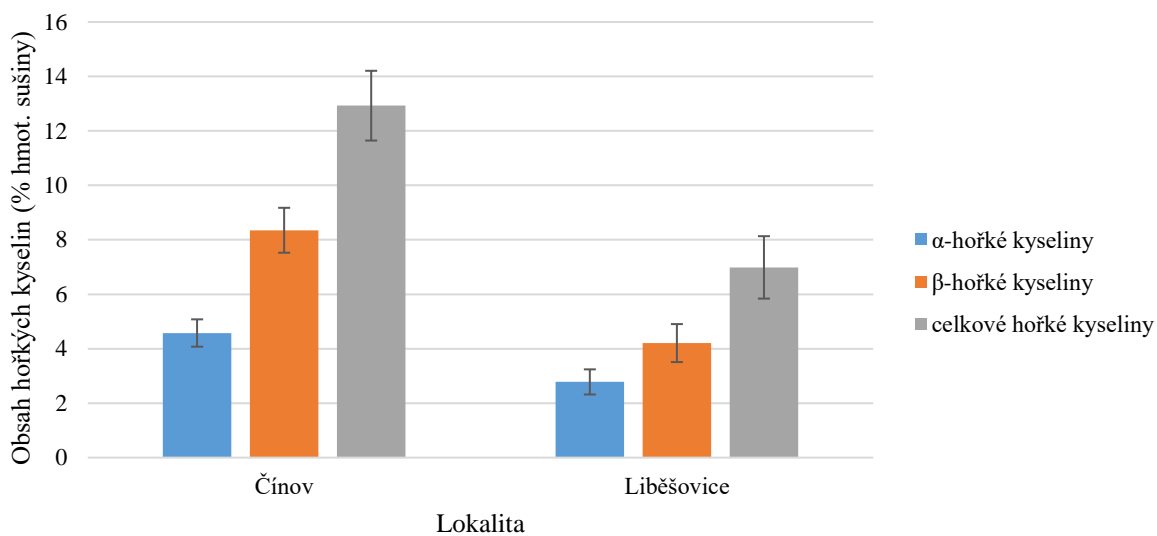
Lokalita a termín	Varianta	Ošetřující přípravek	Dávka, koncentrace*)
Čínov 25. 6. 2018	a	Bajkal	0,1 %
	b	Alginure	1 %
	c	PrevB2	0,5 %
	d	tymiánová silice	0,5 %
	e	chmelový extrakt	1 %
	f	Revus (mandipropamid 250 g/l)	1,6 l/ha
Liběšovice 19. 6. 2018	a	Bajkal	0,1 %
	b	Alginure	1 %
	c	PrevB2	0,5 %
	d	tymiánová silice	0,5 %
	e	chmelový extrakt	1 %
	f	Bellis (pyraclostrobin 128 g/l, boscalid 252 g/l)	2 kg/ha
Čínov 10. 8. 2018	a	Bajkal	0,1 %
	b	Alginure	1 %
	c	PrevB2	0,5 %
	d	tymiánová silice	0,5 %
	e	chmelový extrakt	1 %
	f	Funguran progress (hydroxid měďnatý 537 g/kg)	4 kg/ha
Liběšovice 22. 8. 2018	a	Bajkal	0,1 %
	b	Alginure	1 %
	c	PrevB2	0,5 %
	d	tymiánová silice	0,5 %
	e	chmelový extrakt	1 %
	f	Kuprikol 250 SC (oxychlorid mědi 420 g/l)	10 l/ha

Příloha 2: Kompletní sled ošetření společný pro všechny varianty a-f na lokalitách Čínov a Liběšovice během sledovaného roku 2018.

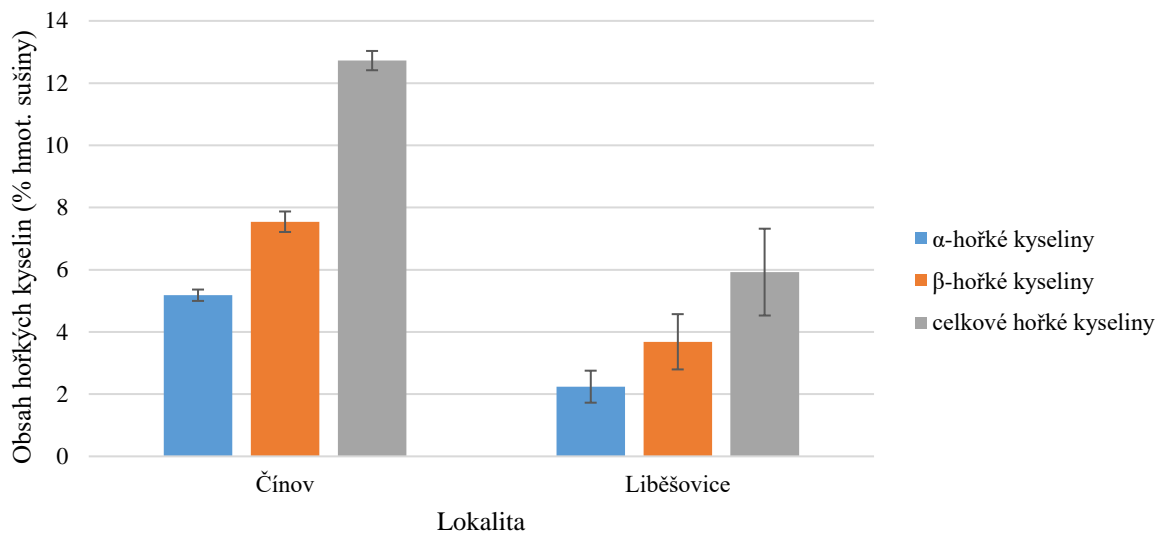
Čínov		Liběšovice	
Pořadí ošetření	Aplikované přípravky	Pořadí ošetření	Aplikované přípravky
1. ošetření	Aliette 80 WG (2,5 kg/ha), Karate se Zeon technologií 5 CS (0,12 l/ha)	1. ošetření	Actara 25 WG (0,1 kg/ha), Plant aktiv (4,0 kg/ha)
2. ošetření	Bellis (1 kg/ha), Borosan forte (1,0 l/ha), Vegaflor (4,0 l/ha), Zinkosol forte (2,0 l/ha)	2. ošetření	Curzate K (4,5 kg/ha), Ortiva (1,5 l/ha), hořká sůl (10,0 kg/ha), Zintrac (0,5 l/ha), močovina (10,0 kg/ha)
3. ošetření	Ortiva (1,6 l/ha), Movento 150 OD (1,0 l/ha), Nissorun 10WP (1,2 kg/ha), hořká sůl (6,0 l/ha)	3. ošetření	Ridomil Gold Combi Pepite (4,0 kg/ha), Ortus 5 SC (2,5 l/ha), hořká sůl (10,0 kg/ha), Zinkosol (2,0 kg/ha), Borosan (2,0 l/ha)
4. ošetření	Revus (1,6 l/ha), Vegaflor (6,0 l/ha)	4. ošetření	Bellis (2,0 kg/ha), Agroleaf power (5,0 kg/ha), močovina (10,0 kg/ha), TS Květa (1,5 l/ha), Zinkosol forte (2,0 l/ha)
4. ošetření	1. aplikace pokusných variant a-f (viz příloha 1)	4. ošetření	1. aplikace pokusných variant a-f (viz příloha 1)
5. ošetření	Ortiva (1,6 l/ha), Karate se Zeon technologií 5 CS (0,12 l/ha), Vegaflor (5,0 l/ha)	5. ošetření	Revus (1,6 l/ha), Movento 150 OD (1,0 l/ha), hořká sůl (5,0 kg/ha), Calcinit (5,0 kg/ha)
6. ošetření	Cuproxat SC (10,0 l/ha), Acramite 480 SC (1,5 l/ha), Vegaflor (5,0 l/ha)	6. ošetření	Bellis (2,0 kg/ha), Vegaflor (4,0 l/ha)
7. ošetření	Funguran progress (4,0 kg/ha)	7. ošetření	Ortiva (1,6 l/ha), hořká sůl (10,0 kg/ha), Farmfos (3,0 l/ha)
7. ošetření	2. aplikace pokusných variant a-f (viz příloha 1)	8. ošetření	Kuprikol 250 SC (10,0 l/ha), Silwet star (0,4 l/ha)
-	-	8. ošetření	2. aplikace pokusných variant a-f (viz příloha 1)
20. 8. 2018	sklizeň pokusů	30. 8. 2018	sklizeň pokusů



Příloha 3: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami ve vzorcích z 13. 8. ošetřených přípravkem PreVB2, u kterých byl zjištěn statisticky významně vyšší obsah hořkých kyselin na lokalitě Čínov.



Příloha 4: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami ve vzorcích z 13. 8. ošetřených tymiánovou silicí, u kterých byl zjištěn statisticky významně vyšší obsah hořkých kyselin na lokalitě Čínov.



Příloha 5: Průměrné hodnoty obsahu hořkých kyselin se směrodatnými odchylkami ve vzorcích z 13. 8. ošetřených konvenčně, u kterých byl zjištěn statisticky významně vyšší obsah hořkých kyselin na lokalitě Čínov.