

SEKUNDADRNI METABOLITI HMELJA (*Humulus lupulus* L.) IN MOŽNOSTI UPORABE HMELJA V PREHRANI PREŽVEKOVALCEV

Siniša SREČEC¹, Vesna ZECHNER-KRPAN², Vlatka PETRAVIĆ-TOMINAC³,
Lidija KOZAČINSKI⁴, Maja POPOVIĆ⁴, Andreja ČERENAK⁵

UDC / UDK 633.791:636.084(045)

pregledni znanstveni članek / scientific review article

prispelo / received: 23.10.2011

accepted / sprejeto: 02.12.2011

Izвлеček

Hmeljne alfa- in beta-kislina so sekundarni metaboliti hmelja, katerih uporaba in funkcija je poznana predvsem v pivovarstvu in v povezavi z alfa-kislinami. Čeprav dosedanje raziskave dokazujejo, da uporaba hmelja nima večjega vpliva na povečanje proizvodnje in kvaliteto mleka, je bilo na začetku tega stoletja ugotovljeno, da imajo hmeljne kisline antibiotični učinek oz. da zmanjšujejo populacijo gram pozitivnih bakterij in praživali v prebavnem traktu prežvekovalcev. Znano je, da v primeru večjega števila gram pozitivnih bakterij v prehrani živali in/ali na pašnikih prihaja do zmanjševanja izkoristljivosti krmil in celo do obolevnosti živali. Najpogostejša terapija v takšnem primeru je uporaba antibiotikov iz razreda ionofornih antibiotikov. Hmeljne kisline imajo zaradi svoje specifične kemijske strukture enak učinek kot ionoforni antibiotiki in hmeljni peleti, ki se lahko dodajajo celo preventivno v koncentrirana krmila. Poleg neposrednega učinka na zmanjšanje populacije gram-pozitivnih bakterij se zmanjšuje tudi emisija metana iz živalskih iztrebkov. Uporaba hmelja v prehrani prežvekovalcev ima tudi ekonomski vpliv predvsem iz vidika ekološko proizvedenega mleka; celo več, zaradi prepovedi uporabe antibiotičnih stimulatorjev rasti se danes intenzivno proučujejo alternativne snovi (probiotiki, prebiotiki in imunomodulatorji) kot dodatki v prehrani, ki bi lahko nadomestili

¹ Dr., Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Milislava Demerca 1, Križevci, Hrvaška, e-naslov: ssrecec@vguk.hr

² Prof., dr., Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvaška, e-naslov: vzkrcpan@pbf.hr

³ Doc., dr., prav tam, e-naslov: vpetrav@pbf.hr

⁴ Prof., dr., Veterinarski fakultet u Zagrebu, Heinzelova 55, Zagreb, Hrvaška, e-naslov: mpopovic@vef.hr; klidija@vef.hr

⁵ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenija, Žalskega tabora 2, Žalec, Slovenija, e-naslov: andreja.cerenak@ihps.si

uporabo antibiotikov. Zaradi velikih tržnih viškov hmelja na svetovnem trgu so danes hmelj in hmeljni peleti dostopnejši kot kadarkoli prej.

Ključne besede: hmelj, hmeljne kisline, gram-pozitivne bakterije, antibiotiki, prežvekovalci

HOP (*HUMULUS LUPULUS* L.) SECONDARY METABOLITES AND POSSIBILITIES OF USING HOP IN NUTRITION OF RUMINANTS

Abstract

Hop α - and β -acids are secondary metabolites of hop whose application and function, until now, have been well known in brewing, particularly the α -acids. Despite these acids' small and insufficient effect on the productivity of dairy animals and also on the quality of the milk the animals produced, at the beginning of this century, the acids found a place in the dairy industry. It was found that the hop acids had an antibiotic effect, because they decrease the population of gram-positive bacteria and protozoa in the digestive track of ruminants. It is well known that a higher population of gram-positive bacteria in animal feed and/or on pastures causes the animals to process their feed less efficiently and even encourages infective diseases of the animal's digestive tract. In these cases, the most frequent therapy is treatment with an ionophores class of antibiotics. However, because of their specific chemical structure, hop acids have an impact equal to ionophores, with the advantage that hop pellets could be added as prophylactic hop feed. Apart from hop acid's direct effect of decreasing the population of gram-positive bacteria, it also indirectly decreases the emission of methane from animal waste. Using hops to feed ruminants also has a substantial economical impact, particularly from the aspect of organic dairy production. Moreover, today the non-clinical use of antibiotic stimulators of animal growth in intensive cattle breeding is prohibited; on the other hand, research investigating alternative matters (probiotics, prebiotics and immunomodulators) and their application as additives in animal feed has increased. In this environment and with a big surplus of hop on the world market; hops and hop pellets are more accessible than ever.

Key words: hop, hop acids, gram-positive bacteria, antibiotics, ruminants

1 UVOD

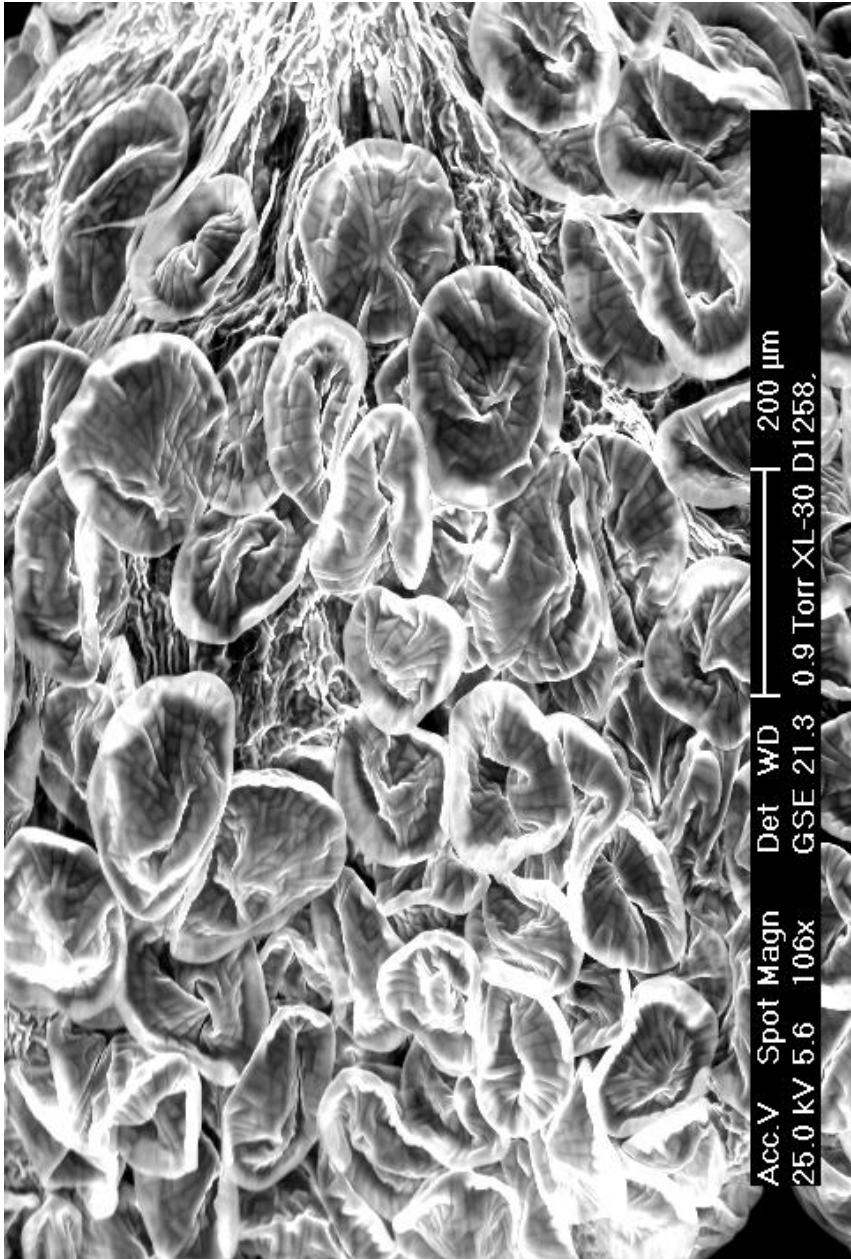
Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je dvodomna rastlina, katere storžki oz. socvetja ženskih rastlin se uporabljajo v pivovarski industriji v postopku hmeljenja sladice s hmeljem in hmeljnimi pripravki, s ciljem doseganja zelene grenčice in arome ter prav tako z antiseptičnim učinkom v pivu (Moir, 2000). Storžki hmelja imajo namreč visoko absorpcijsko kapaciteto in so primerni za izboljšanje absorpcije določenih stranskih produktov, poleg melase in sladkornih sirupov, v prehrani ovac (Davis in Sullivan, 1927). Avtorja še navajata, da je skupna prebavljivost suhih storžkov hmelja zelo nizka. Iz obroka, v katerem je hmelj pomešan z melaso, senom in lanenim semenom, je prebavljiva le 1/5 surovih proteinov in nedušikovih ekstraktivnih snovi, 1/20 surovih vlaknin in 1/5 skupne organske mase. Potrdila sta, da proizvodni škrobni ekvivalent hmelja znaša 24,5.

Na začetku tega stoletja se je zaradi prepovedi uporabe antibiotikov začelo intenzivno raziskovanje alternativnih snovi (probiotiki, prebiotiki in imunomodulatorji) kot dodatkov hrani, ki bi naj nadomestili uporabo antibiotičnih stimulatorjev rasti. Med vsemi ostalimi alternativnimi snovmi se preiskuje tudi delovanje hmelja v prehrani prežvekovalcev in patentirane so že nekatere metode uporabe hmelja v prehrani prežvekovalcev (Maye, 2004; Benchaar in sod., 2006; Al-Mamun in sod., 2009; Flythe, 2009; Meyer in sod., 2009).

2 SEKUNDARNI METABOLITI HMELJA

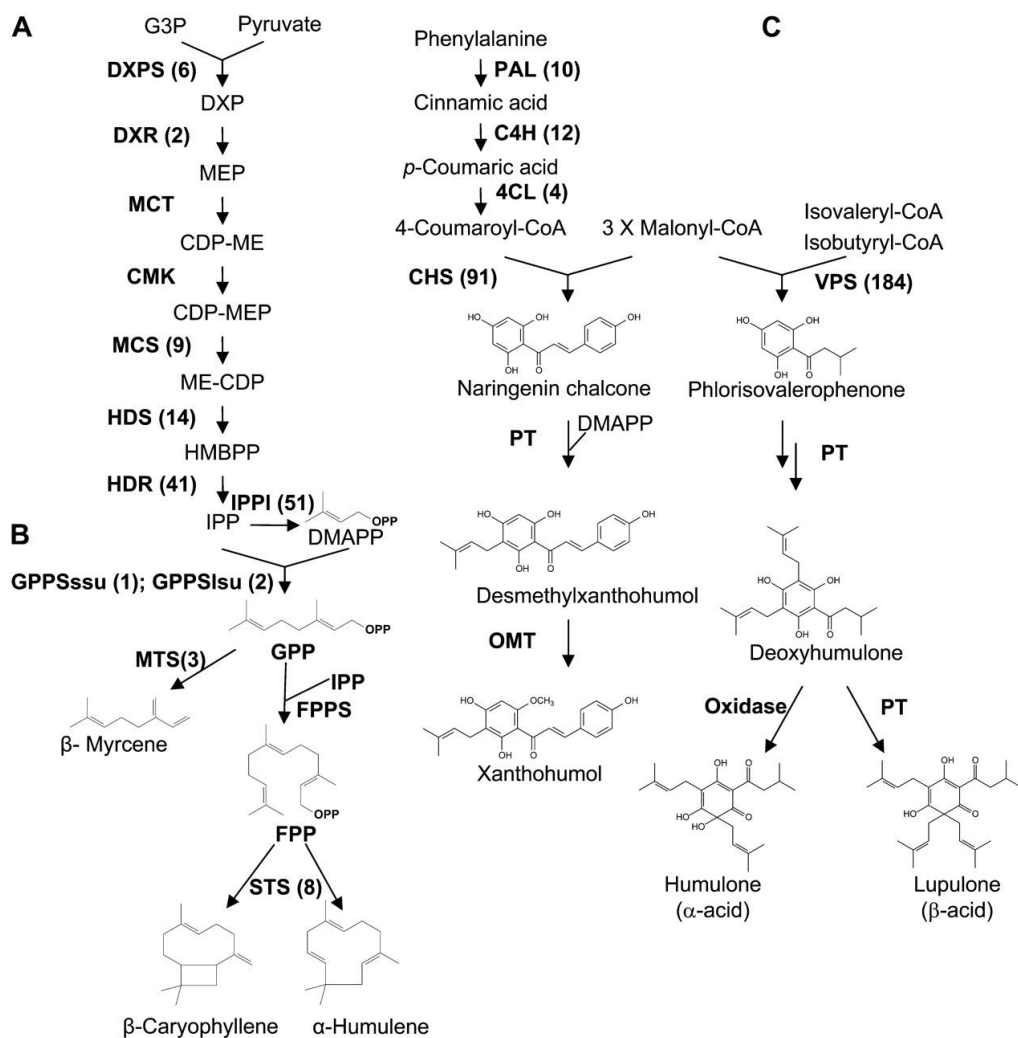
Sekundarni metaboliti hmelja so v glavnem terpenске spojine iz skupine mono- in seskviterpenov. Njihova biosinteza se prične v fazi cvetenja hmelja, takoj po formiranju braktej storžkov ali ženskih socvetij. Biosinteza vseh terpenških spojin hmelja se prične v mezofilu braktej storžkov in se zaključuje v lupulinskih žlezah (glandularnih trihomih) *ad axialne* in *ab axialne* strani braktej (Srečec in sod., 2011; 2010) v katerih se tudi akumulirajo (slika 1).

Biosinteza terpenških spojin hmelja se sestoji iz treh poti biosinteze (slika 2) v katerih se odvija tvorjenje vseh grenčin (alfa- in beta-kislina), aromatičnih snovi (eterična olja kot so: β -mircen, β -kariofilen in α -humulen), ter polifenolov in bioflavonidov (ksantohumol) (Wang in sod. 2008; Nagel in sod., 2008). Količina in delež posameznih sekundarnih metabolitov hmelja je odvisen od sorte hmelja in ekoloških vplivov med vegetacijo hmelja (Čeh in sod., 2007.; Srečec in sod., 2008.a).



Slika 1: Lupulinske žleze (peltatni žlezni trihomi) na povrhnjici brakteje storžka (Srečec in sod., 2010; 2011)

Figure 1: Lupulin glands (peltate glandular trichomes) on epidermis of hop cone bract (Srečec et al., 2010; 2011)



Slika 2: Biosintetske poti naravnih spojin v hmeljnih trihomih (Wang in sod., 2008)

A - Pot, ki vodi do biosinteze demetilalil pirofosfata (DMAPP) B - Osnovne reakcije biosinteze mono- in seskviterpenov

C - Biosinteza prenilflavonoidov in grenčic

DXPS, 1-deoksi-D-ksiluloza-5-P sintaza; DXR, 1-deoksi-D-ksiluloza-5-P reduktioizomeraza;

MCT, 2-C-metil-D-eritritol-4-P citidililtransferaza; CMK, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol

kinaza; MCS, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciklodifosfat sintaza; HDS, 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-butenil-

4-difosfat sintaza; HDR, 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat reduktaza; IPPI, izopentil

difosfat/dimetilalildifosfat izomeraza; OMT, O-metiltransferaza; PT, preniltransferaza

Se nadaljuje na naslednji strani.

Nadaljevanje s prejšnje strani:

Fig. 2: Biosynthetic pathways for natural products found in hop trichomes (Wang et al., 2008)

A, The pathway leading to dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) biosynthesis.

B, General reactions of mono- and sesquiterpene biosynthesis.

C, Prenylflavonoid and bitter acid biosynthesis.

DXPS, 1-Deoxy-D-xylulose-5-P synthase; DXR, 1-deoxy-D-xylulose-5-P reductoisomerase; MCT, 2-C-methyl-D-erythritol-4-P cytidyltransferase; CMK, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase; MCS, 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase; HDS, 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate synthase; HDR, 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase; IPPI, isopentenyl diphosphate/dimethylallyl diphosphate isomerase; OMT, O-methyltransferase; PT, prenyltransferase.

3 DELOVANJE SEKUNDARNIH METABOLITOV HMELJA V PREHRANI PREŽVEKOVALCEV IN V PREHRAMBENI INDUSTRIJI

Eden od največjih problemov v prehrani prežvekovalcev je proizvodnja metana, pri čemer je izguba od 2-12 % energije, kar nedvomno vodi k povečanju proizvodnih stroškov. Poleg tega so po nekaterih ocenah domače živali odgovorne za emisijo 15-20 % skupnega metana v atmosferi, s čimer živinorejska proizvodnja vpliva na globalno otopletev vremena (Maye, 2004).

Konec osemdesetih let prejšnjega stoletja so bili objavljeni prvi rezultati večletnih poskusov, izvedenih z uporabo tehnike simulacije vampa (Rusitec), v katerih so preverjali delovanje hmeljnih pripravkov v zmesih s stisnjenimi jabolki in senom na fermentacijo v vampu in na proizvodnjo metana (Krishna in sod., 1986). V teh poskusih je bilo potrjeno, da hmeljni peleti kot tudi hmeljni ekstrakti, dobljeni z ekstrakcijo z metilenkloridom, v mešanici sena in stisnjenih plodov jabolk statistično značilno zmanjšujejo produkcijo metana. Z *in vitro* poskusi je bilo potrjeno, da imajo hmeljne kisline (alfa- in beta- kisline) antibakterijski učinek, ki zmanjšuje rast bakterij z zniževanjem pH vrednosti medija, pri čemer večji učinek kažejo beta-kisline v primerjavi z alfa-kislinami.

Z dodajanjem 1,25 mg beta-kislin/kg ječmena se zmanjšuje skupna produkcija plinov pri kravah za približno 40 %, medtem ko ista količina beta-kislin/kg lucerne zmanjšuje produkcijo plinov za približno 30 % (Maye, 2004). Poleg tega je dokazano, da z dvigom porabe beta-kislin raste tudi količina propionata. Količina propionata se lahko poveča tudi do 97 %, kar deluje pozitivno na rast živali, vendar se pri tem zmanjšuje količina butirata lahko tudi do 84 %. Kljub temu, da butirat deluje pozitivno na zdravstveno stanje črevesja, ga lahko gram-pozitivne bakterije, kot npr. *Metizanobacterium ruminantim*, v primeru njegove velike produkcije med

fermentacijo v vampu, pretvorijo v metan, kar vodi v izgubo energije. Poleg tega se lahko s pravilnim doziranjem beta-kislin zmanjša populacija gram pozitivnih bakterij v vampu (kot sta *Rumifaococcus albus* in *R. flavefaciens*), medtem ko se istočasno kontrolira populacija bakterij *Butyrivirio fibrisolvefs*, ki so odgovorne za produkcijo butirata (Maye, 2004).

V laboratorijskih poskusih so potrdili, da nedisociirane molekule hmeljnih kislin močno vplivajo na inhibicijo rasti populacije *Lactobacillus brevis* IFO 3960 in to v širokem razponu pH vrednosti od 4-7. Pri tem je antibakterijska aktivnost odvisna tudi od stopnje izomerizacije hmeljnih kislin. Tako imajo trans-izo-alfa-kislina približno 20-krat večji antibakterijski učinek v primerjavi z neizomeriziranimi alfa-kislinami (Simpson in Smith, 1992). Poleg tega imajo heksa-hidro-izo-alfa-kislina tudi antibakterijski učinek na mikroorganizme, ki kontaminirajo hrano in povzročajo zastrupitve, kot so *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* in enteropatogena *Escherichia coli*. S čiščenjem delovnih površin in strojev v prehrabeni industriji z raztopino heksa-hidro-izo-alfa-kislinami se doseže antiseptični učinek brez uporabe kemičnih dezinfikatorjev. Glede na to, da se heksa-hidro-izo-alfa-kislina uporabljajo v hmeljnih pripravkih, kot so izomerizirani hmeljni ekstrakt in le-ti za hmeljenje pivske sladice v tehnološkem postopku proizvodnje piva, ne obstaja nobena nevarnost za zdravje delavcev v prehrabeni industriji in potrošnikov prehrabnih proizvodov (Maye in Nielson, 2005).

Čprav obstaja določeno število raziskav o vplivu eteričnih olj na mikroorganizme in fermentacijo v vampu, na metabolizem proteinov in na proizvodnjo mleka (McIntosh in sod., 2003; Bencher in sod., 2006; Calsamiglia in sod., 2007; Castillejos in sod., 2007; Meyer in sod., 2009), vpliv hmeljnega eteričnega olja na fermentacijo v vampu še vedno ni pojasnjen.

4 MOŽNOSTI UPORABE HMELJA V PRIHODNJE

Uporaba hmelja v prehrani prežvekovalcev ima tudi velik ekonomski značaj predvsem iz vidika ekološko proizvedenega mleka, zmeraj bolj pa zaradi prepovedi uporabe antibiotskih regulatorjev rasti (Regulativa 1831/2003/EC). Tako se danes intenzivno proučujejo alternative (probiotiki, prebiotiki in imunomodulatorji) kot dodatki v prehrani, ki bi morali nadomestiti uporabo antibiotskih regulatorjev rasti.

Zaradi globalnega trenda po zmanjševanju grenčic v pivu, in posledično tudi po zmanjševanju deleža hmelja v pivovarski industriji ter da so zaloge hmelja v zadnjih 3-4 letih večje kot kadarkoli prej v zgodovini hmeljarstva (Srečec in sod., 2009.) je razmišljanje o alternativni uporabi hmelja zelo zanimivo. Na trgu s

hmeljem je še vedno na razpolago hmelj ali hmeljni peleti prejšnjih letnikov proizvodnje, in sicer po zelo ugodni nabavni ceni. S staranjem hmelja prihaja do padca odstotka alfa-kislin, kar znižuje njegovo pivovarsko vrednost, vendar pa delež beta-kislin ostaja s staranjem, v pogojih brez kisika, nespremenjen (Srečec in sod., 2008.b; Virant in Majer, 2003), kar je zelo pomembno v povezavi z njihovim učinkom na mikroorganizme in fermentacijo v vampu (Maye, 2004).

Ker so količine dodanih čistih beta-kislin v zmesih z žitaricami in stročnicami zelo nizke in predstavljajo končno le 1,25 mg/kg krmil (Maye, 2004), hmelj ne predstavlja visok strošek v prehrani živali. Na primer, povprečni vzorec hmelja sorte Aurora (letnik 2011) vsebuje 4,2 % beta-kislin v zračno suhem vzorcu, kar pomeni, da je s 100 mg hmeljnih briketov možno pripraviti približno 5,25 kg krmil.

V prehrani živali se lahko hmelj uporablja v obliki hmeljnih briketov, pripravljenih predhodno pred mešanjem z ostalimi komponentami krmila in/ali v obliki ekstrudata skupaj z ostalimi komponentami krmil. Seveda pa je pri vsem tem nujno raziskati vse prednosti in slabosti posamičnih tehnoloških rešitev.

5 VIRI

- Al-Mamun, M., Goto, K., Chiba, S., Sano, H. (2009.): Responses of plasma acetate metabolism to hop (*Humulus lupulus* L.) in sheep. *International Journal of Biological Sciences* 5, 287-292.
- Bencher, C., Petiti, H. V., Berthiaume, R., Whyte, T. D., Chouinard, P. Y. (2006): Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 4352-4364.
- Davis, W. L., Sullivan, R. S. (1927): The nutritive value of dried spent hops. *The Journal of Agricultural Science* 17, 380-387.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., Ferret, A. (2007): Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* 90, 2580-2595.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R. (2007): Effects of dose and adaptation time of specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 132, 186-201.
- Čeh, B., Kač, M., Košir, I. J., Abram, V. (2007): Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and Cultivar. *International Journal of Molecular Sciences* 8, 989-1000.
- Krishna, G., Czerkawski, J. W., Breckenridge, G. (1986): Fermentation of various preparations of spent hops (*Humulus lupulus* L.) using rumen simulation technique (Rusitec). *Agricultural Wastes* 17, 99-117.
- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A., Newbold, C. J. (2003): Effects of essential oils on ruminal microorganisms and protein metabolism.

- Applied and Environmental Microbiology* 69, 5011-5014.
- Maye, J. P., Nielson, P. (2005): The use of hop acids as an antimicrobial agent to sanitise food processing facilities. *World Intellectual Property Organization, International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT)*, 2004110505 A1.
- Maye, J. P. (2004): Hop acids as replacement of antibiotics in animal feed. *World Intellectual Property Organization, International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT)*, WO 2004/026041 A1.
- Meyer, N. F., Erickson, G. E., Klopfenstein, T. J., Greenquist, M. A., Luebe, M. K., Williams, P., Engstrom, M. A. (2009): Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *Journal of Animal Science* 87, 2346-2354.
- Moir, M. (2000): Hops: a millennium review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58, 131-146.
- Nagel, J., Culley, L. K., Lu, Y, Liu, E., Matthews, P.D., Stevens, J. F., Page, J. E. (2008): EST Analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *The Plant Cell* 20, 186-200.
- Simpson, W. J., Smith, A. R. W. (1992): Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 327-334.
- Srećec, S., Kvaternjak, I., Kaučić, D., Špoljar, A., Erhatic, R. (2008a): Influence of climatic conditions on accumulation of α -acids in hop cones. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 73, 161-166.
- Srećec, S., Rezić, T., Šantek B., Marić, V. (2008b): Influence of hop pellets age on α -acids utilization and organoleptic quality of beer. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 73, 103-107.
- Srećec, S., Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Srećec, V., Marić, K. (2009): Needs of hop production restructuring by using medical characteristics of hop in modern brewing and pharmacology. *Hop Bulletin* 16, 53-64.
- Srećec, S., Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Mršić, G., Špoljarić, I., Marag, S. (2010): ESEM comparative studies of hop (*Humulus lupulus*) peltate and bulbous glandular trichomes structure. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 75, 145-148.
- Srećec, S., Zechner-Krpan, V., Marag, S., Špoljarić, I., Kvaternjak, I., Mršić, G. (2011): Morphogenesis, volume and number of hop (*Humulus lupulus* L.) glandular trichomes, and their influence on alpha-acid accumulation in fresh bracts of hop cones. *Acta Botanica Croatica* 70, 1-8.
- Virant, M., Majer, D. (2003): Hop storage index – indicator of brewing quality. *Proc. of IHGC Technical Commission, Sofia*, <http://www.czhops.cz/tc>.
- Wang, G., Tian, L., Aziz, N., Broun, P., Dai, X., He, J., King, A., Zhao, P. X., Dixon R. A. (2008): Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiology* 148, 1254-1266.