



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΛΥΚΙΣΚΟΥ
(*Humulus lupulus L.*) ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗ

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

ΕΛΙΝΑ Χ. ΑΡΒΑΝΙΤΙΔΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κος ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ
ΑΘΗΝΑ, 2017

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων &
Διατροφή του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση VI: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΛΥΚΙΣΚΟΥ (*Humulus lupulus L.*) ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗ.**

Μεταπτυχιακή Ερευνητική μελέτη

ΕΛΙΝΑ Χ. ΑΡΒΑΝΙΤΙΔΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κος ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2017

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΛΥΚΙΣΚΟΥ (*Humulus lupulus L.*) ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗ.**

Μεταπτυχιακή Ερευνητική μελέτη

ΕΛΙΝΑ Χ. ΑΡΒΑΝΙΤΙΔΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κος ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πέτρος Ταραντίλης

Καθηγητής

Χρήστος Παππάς

Αναπληρωτής Καθηγητής

Οικονόμου- Αντώνικα Γαρυφαλλιά

Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής ερευνητικής εργασίας είναι η ποιοτική χημική ανάλυση τριών διαφορετικών δειγμάτων αποξηραμένου φυτικού υλικού του είδους *Humulus lupulus* (Λυκίσκος) και η σύγκριση της σύστασης αυτών σε δραστικά συστατικά, τόσο σε επίπεδο αιθερίου ελαίου όσο και σε επίπεδο εκχυλίσματος του αποξηραμένου φυτικού υλικού, το οποίο παρελήφθη με την μορφή πέλλετ από την Αθηναϊκή Ζυθοποιία. Οι ποικιλίες που μελετήθηκαν ήταν οι Lublin, Bobek και Aurora, οι οποίες ανήκουν στον γενικό τύπο λυκίσκου Aroma.

Στα δείγματα εφαρμόστηκε απόσταξη με υδρατμούς με σκοπό την παραλαβή του αιθερίου ελαίου και εκχύλιση με σκοπό την παραλαβή των σκληρών και μαλακών ρητινών λυκίσκου. Οι αποδόσεις των ποικιλιών Lublin, Bobek και Aurora σε αιθέριο έλαιο ήταν 0,2, 0,4 και 0,8%, αντίστοιχα. Τα αιθέρια έλαια μελετήθηκαν με αέριο χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Σε δεύτερο στάδιο στα τρία δείγματα προστέθηκε διαλύτης μεθανόλης-φορμικού οξέος 99:1 και ακολούθησε εκχύλιση με μηχανική ανάδευση. Τα εκχυλίσματα συγκέντρωσης 5mg/mL αναλύθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συνδυασμένης με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (HPLC-DAD). Στη συνέχεια, το εκχύλισμα της ποικιλίας Lublin, μελετήθηκε περαιτέρω με την εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματόμετρο μάζας (LC-MS). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 290,330 και 370nm και η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε σε συνδυασμό με τα φάσματα μάζας και UV.

Τα αιθέρια έλαια στο σύνολό τους παρουσιάζουν ετερογενή χαρακτήρα, με τις περισσότερες από τις ενώσεις που αναφέρονται βιβλιογραφικά, να ανιχνεύονται και σε αυτά. Μεταξύ αυτών, η ποικιλία Aurora φαίνεται να ξεχωρίζει ποιοτικά, τόσο σε ποικιλία ενώσεων όσο και στην σχετική περιεκτικότητα σε αυτές. Ωστόσο, η απόδοση των δειγμάτων σε αιθέριο έλαιο φαίνεται πως διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τις εμπορικές προδιαγραφές αυτών. Σε επίπεδο εκχυλίσματος, ανιχνεύονται 11 ενώσεις μεταξύ των οποίων α -, β - οξέα και πρενυλιωμένα φλαβονοειδή με τα υψηλότερα σχετικά ποσοστά να αποδίδονται στην πρενυλχαλκόνη ξανθοχουμόλη, και για τα τρία δείγματα. Η μελέτη των παραπάνω σε συνδυασμό με την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση στην αξιολόγηση των προϊόντων λυκίσκου τα οποία χρησιμοποιούνται στην ελληνική αγορά και θέτει τον προβληματισμό περαιτέρω μελέτης με σκοπό τον ποιοτικό και ποσοστικό προσδιορισμό των ενώσεων που μελετήθηκαν, στο επίπεδο του τελικού προϊόντος, του ζύθου. **Λέξεις κλειδιά:** Λυκίσκος, πρενυλιωμένα φλαβονοειδή, πικρά οξέα, πέλλετ, αιθέριο έλαιο, ζυθοποίηση

ABSTRACT

The purpose of the present postgraduate thesis is the qualitative chemical analysis of three different samples of dried plant material of the species *Humulus lupulus* as well as their comparison in matter of major bioactive compounds, not only as part of the essential oil produced, but also of the extracts, produced after processing the dried plant material which was received as hop pellets by the Athenian Brewery. The varieties studied are the ones of Lublin, Bobek and Aurora, of the hop type Aroma.

The samples were treated with steam distillation with the aim of obtaining the essential oil and were also extracted in order to produce the mixture of soft and hard hop resins. The essential oil yield of the varieties studied was 0,2, 0,4 and 0,8%, for Lublin, Bobek and Aurora, respectively. The essential oils were analyzed by means of Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS). On a second level, the three samples were extracted via magnetic stirring with a 99:1 mixture of methanol and formic acid. The extracts of concentration 5mg/mL were analyzed by means of High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD). Subsequently, the Lublin extract was further studied by applying liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS). The detection was held at 290,330 and 370nm and the compound identification was performed by comparing the mass and UV spectra.

All the essential oils studied present heterogeneous character, with the majority of the compounds that are bibliographically mentioned to be detected hereby. Among those, Aurora variety seems to outstand qualitatively, in terms of the variety of identified compounds and their relative percentage as part of the total sample studied. However, the samples' yield in essential oil seems to differ significantly when compared to their commercial specifications. In terms of the extract, 11 compounds were identified, among which, α - and β - bitter acids and prenylflavonoids, with the highest relative percentages to belong to prenylchalcone xanthohumol for all three samples. The study of the above, together with the bibliographic review, is a first approach to the evaluation of some of the hop products used in the greek market and is also placing a query to further study of the qualitative and quantitative determination of the compounds studied, on the final product which comes to beer. **Key Words: Hops, prenylflavonoids, bitter acids, pellet, essential oil, brewing**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Κο Χάρη Κανάκη για την πολύτιμη συμβολή του στην επιτυχή διεκπεραίωση της μελέτης. Την Κα Νάντια Αστράκα για την βοήθειά της στον εμπλουτισμό και την αμεσότητά της στην εκπλήρωση ενός σημαντικού τμήματος του πειράματος. Τις συναδέλφους μου και Υποψήφιους Διδάκτορες Ελένη και Νεφέλη, οι οποίες με την υπομονή και την δεκτικότητά τους συμβάλλουν ουσιαστικά στην οργανωμένη λειτουργία του εργαστηρίου Γενικής Χημείας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Κο Πέτρο Ταραντίλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις εκπαιδευτικές κατευθύνσεις του στην παρούσα μελέτη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	9
ΜΕΡΟΣ Α.....	10
ΤΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	10
1. Ο ΛΥΚΙΣΚΟΣ.....	11
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά, Καλλιέργεια και Εμπορική Εκμετάλλευση του φυτού και των προϊόντων του.....	11
1.1.1. Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	11
1.1.2. Καλλιέργεια και Εμπορική Εκμετάλλευση.....	11
1.1.3. Οργανική καλλιέργεια.....	15
1.2. Ιστορικά στοιχεία και Προέλευση του φυτού.....	16
1.3. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που εντοπίζονται στο φυτικό είδος του Λυκίσκου: Κατηγοριοποίηση και Διαχωρισμός των συστατικών.....	17
1.3.1. Οξέα.....	18
1.3.2. Αιθέριο Έλαιο.....	20
1.3.3. Φαινολικά Συστατικά.....	22
1.4. Βιολογική δράση και δραστικότητα των συστατικών του Λυκίσκου.....	25
1.4.1. Αντιοξειδωτική Ιδιότητα.....	25
1.4.2. Ορμονική Δράση.....	28
1.4.3. Καταπραϋντική Δράση.....	30

1.4.4. Επίδραση στον λιπιδικό μεταβολισμό.....	32
1.4.5. Άλλες δράσεις	33
1.5. Η διαδικασία της ζυθοποίησης.....	34
1.5.1. Τα πέλλετ λυκίσκου	35
1.5.2. Η Επίδραση της επεξεργασίας στην σύσταση του λυκίσκου	37
1.5.3. Αύξηση συγκέντρωσης πρενυλιωμένων φλαβονοειδών στη μύρα.....	40
1.6. Η θεωρητική βάση της πειραματικής διαδικασίας	40
1.6.1. Χρωματογραφικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών των αιθερίων ελαίων λυκίσκου με τη χρήση αέριας χρωματογραφία και φασματόμετρου μάζας (GC-MS)	41
1.6.2. Χρωματογραφικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων λυκίσκου με τη χρήση υγρής χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (HPLC-DAD).....	42
ΜΕΡΟΣ Β.....	45
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	45
2. Η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	46
2.1 Σκοπός και Αντικείμενο του πειράματος.....	46
2.2. Επιλογή και Παραλαβή των δειγμάτων.....	47
2.2.1. Εμπορικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων	47
2.3. Μελέτη του αιθερίου ελαίου Λυκίσκου	49
2.3.1. Προκατεργασία του δείγματος και Παραλαβή του αιθερίου ελαίου	49
2.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών του αιθερίου ελαίου.....	49
2.4. Μελέτη των εκχυλισμάτων Λυκίσκου.....	50
2.4.1. Παραλαβή των πολυφαινολών και των ρητινών Λυκίσκου	50
2.4.2. Ποιοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών του εκχυλίσματος λυκίσκου τριών διαφορετικών ποικιλιών.....	50
2.5 Περαιτέρω Ποιοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών του εκχυλίσματος λυκίσκου της ποικιλίας Lublin με την εφαρμογή της μεθόδου LC-MS	51

2.5.1. Εφαρμογή της μεθόδου LC-MS σε ένα εκ των υπό μελέτη δειγμάτων (ποικιλία Lublin).....	51
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
3.1. Συγκριτική ανάλυση των αιθερίων ελαίων τριών διαφορετικών ποικιλιών Λυκίσκου	53
3.2. Συγκριτική ανάλυση των εκχυλισμάτων τριών διαφορετικών ποικιλιών λυκίσκου ..	60
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	75
1. Εμπορικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων 2 και 3 βάσει του Αμερικάνικου Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης (USDA-United States Department of Agriculture).....	75
2. Αναλυτικά αποτελέσματα ταυτοποίησης LC/MS, Hop Lublin	77

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

1.1	Χημικές δομές των βασικότερων αναλόγων των πικρών οξέων λυκίσκου: (Α) α-πικρά οξέα και (Β) β-πικρά οξέα.	19
1.2	Χημικές δομές των βασικότερων συστατικών του αιθερίου ελαίου λυκίσκου: (Α) μονοτερπένια, (Β) σεσκιτερπένια, και (C) οξυγονωμένα τερπένια.	21
1.3	Χημικές δομές των βασικότερων φαινολικών συστατικών του Λυκίσκου: (Α) Φλαβονοειδή, (Β) Πρενυλιωμένα φλαβονοειδή, και (C) Φαινολικά Οξέα	24
1.4	Η μετατροπή των ουσιών ξανθοχουμόλη και δεο-μέθυλο-ξανθοχουμόλης στα παράγωγά τους.	28
1.5	Ισομερίωση των α-οξέων (Χουμουλόνες) προς ισο-α-οξέα (Ισο-χουμουλόνες) μετά από εφαρμογή θέρμανσης.	39
3.1-3.2	Χρωματογράφημα GC, ποικιλία Lublin Χρωματογράφημα GC, ποικιλία Bobek	53
3.3	Χρωματογράφημα GC, ποικιλία Aurora	54
3.4	Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Lublin, 290nm	61
3.5-3.7	Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Lublin, 330nm Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Lublin, 370nm Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Bobek, 290nm	62
3.8-3.10	Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Bobek, 330nm Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Bobek, 370nm Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Aurora, 290nm	63
3.11-3.12	Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Aurora, 330nm Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Aurora, 370nm	64
3.13	Χρωματογράφημα LC, ποικιλία Lublin	65

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

1.1	Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων των φύλλων και κώνων άγριου λυκίσκου σε φλαβονοειδή κατά την περίοδο της βλάστησης. (Urgeoná et al., 2013)	23
1.2	%αποκατάσταση των πολυφαινολών και της ξανθοχουμόλης στα προϊόντα λυκίσκου ως %ποσοστό σε συσχέτιση με τον νωπό λυκίσκο κατά τους A.Forster και A.Koberlein. (Mudura & Coldea, 2015)	36
2.1	Το πρόγραμμα έκλουσης που εφαρμόστηκε στην ανάλυση LC-MS	51
2.2	Συνθήκες λειτουργίας MS	52
3.1	Ταυτοποίηση GC στα αιθέρια έλαια λυκίσκου ποικιλιών Lublin, Bobek και Aurora.	54-58
3.2	Ταυτοποίηση των βασικότερων ουσιών του εκχυλίσματος λυκίσκου, τριών ποικιλιών (L-Lublin, B-Bobek, A-Aurora)	67-69

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

1.1	Συγκριτική απεικόνιση των δημοσιεύσεων σχετικά με το πρενυλιωμένο φλαβονοειδές ξανθοχουμόλη και τα παράγωγα αυτού, ανά έτος, σύμφωνα με τις Mudura & Coldea, 2015.	30
1.2	Διαγραμματική μεταβολή του βάρους στις τρεις ομάδες της δοκιμής ως προς τη μεταβολή του χρόνου της μελέτης.	32
1.3	Η επί τοις εκατό συγκέντρωση της ξανθοχουμόλης μεταξύ νωπού, ξηρού και πεπτιεσμένου ξηρού υλικού λυκίσκου. (Mudura & Coldea, 2015)	36
1.4	Σύγκριση διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης ως προς την απόδοση σε πρενυλιωμένα φλαβονοειδή και πικρά οξέα λυκίσκου. (Prencipe et al., 2014)	43

ΜΕΡΟΣ Α.

ΤΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

1. Ο ΛΥΚΙΣΚΟΣ

1.1. Γενικά χαρακτηριστικά, Καλλιέργεια και Εμπορική Εκμετάλλευση του φυτού και των προϊόντων του.

1.1.1. Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Ο λυκίσκος (*Humulus lupulus* Linnaeus) είναι ένα δίοικο φυτό με αιωνόβιο ριζώμα και ετήσια αναρριχώμενα στελέχη. Ανήκει στη οικογένεια Cannabaceae της τάξης Urticales. Εκτός από το πιο κοινό είδος *Humulus lupulus*, το γένος *Humulus* περιλαμβάνει δύο ακόμα είδη, τα *Humulus japonicus* και *Humulus yunnanensis* τα οποία ωστόσο δεν φαίνεται να παρουσιάζουν την ίδια εμπορική και φαρμακευτική σημαντικότητα.

Τα ριζώματα του λυκίσκου μπορούν να επιβιώσουν για περισσότερο από 25 χρόνια. Παρόλα αυτά, τα ταχέως αναπτυσσόμενα στελέχη πεθαίνουν κάθε χειμώνα. Τα στελέχη μπορεί να φτάσουν σε ύψος τα 15 με 30 πόδια (4,5-9 μέτρα) σε μία μόλις καλλιεργητική σεζόν. Το σημαντικότερο τμήμα του φυτού φαίνεται πως είναι ο θηλυκός κώνος, στον οποίο και εντοπίζονται οι ρητίνες και τα αιθέρια έλαια τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία της ζυθοποίησης με σκοπό την απόδοση της χαρακτηριστικής γεύσης και του αρώματος της μπύρας.

1.1.2. Καλλιέργεια και Εμπορική Εκμετάλλευση

Η επιλογή της τοποθεσίας και η προετοιμασία του σχεδιασμού μιας φυτείας λυκίσκου αποτελεί ένα ιδιαίτερα δύσκολο και απαιτητικό εγχείρημα. Η επιλογή του καταλληλότερου σημείου εμφύτευσης προϋποθέτει ιδιαίτερα προσεκτική μελέτη και προκατεργασία του τόπου. Παρόλο που ο λυκίσκος μπορεί να επιβιώσει περισσότερα από 25 χρόνια, οι περισσότεροι καλλιεργητές συχνά επιλέγουν την επαναφύτευση μετά από 10 με 15 χρόνια.

Το ιδανικό σημείο καλλιέργειας του Λυκίσκου φαίνεται πως είναι γόνιμο, εύκολα αποστραγγίσιμο, ηλιόλουστο, με πρόσβαση σε νερό και εύκολο για άρδευση με ψεκασμό. Ο λυκίσκος χρειάζεται μεγάλη παροχή νερού κατά την περίοδο ανάπτυξης του αλλά είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αποφευχθεί η εφύγραση των ίδιων των φυτών λόγω αύξησης της επίπτωσης πιθανών καταστροφικών παθολογιών. Ενώ οι ανοιξιάτικοι άνεμοι διευκολύνουν την καλή κυκλοφορία του αέρα με συνέπεια να βοηθούν το φύλλωμα του φυτού να διατηρείται στεγνό, εκείνοι που ακολουθούν με την πάροδο της εποχής μπορεί να προκαλέσουν καταστροφές στους ωριμότερους κώνους. Συνεπώς,

είναι θεμιτό η τοποθέτηση της καλλιέργειας να γίνει με τον κατάλληλο προσανατολισμό, έχοντας δηλαδή τους ανέμους να πνέουν ευνοϊκά. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αγρός πρέπει να προετοιμαστεί καταλλήλως από τον χρόνο πριν να εγκατασταθεί η καλλιέργεια μέσω βελτίωσης του εδάφους και ελέγχου των σπόρων.

Ο άγριος λυκίσκος, ο οποίος φύεται σε περιοχές υψηλής υγρασίας όπως για παράδειγμα κοντά σε ποτάμια, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος σε μεγάλες περιοχές της Ευρώπης, Ασίας και Βόρεια Αμερικής. Σήμερα, η παραγωγή του κοινώς καλλιεργούμενου λυκίσκου είναι συγκεντρωμένη σε περιοχές με υγρό κλίμα, με την μέγιστη να εντοπίζεται περί του 48^{ου} παράλληλου κύκλου προς το Βορρά. Οι καλλιέργειες λυκίσκου αποτελούν ένα αναπόσπαστο κομμάτι της Ευρωπαϊκής επαρχίας όπως επίσης και της Βόρειας και Νότιας Αμερικής, Νότιας Αφρικής, Αυστραλίας και Νέας Ζηλανδίας. Τα καλλιεργητικά φυτά μεγαλώνουν τυπικά, σε μεγάλες επίπεδες περιοχές με οξικό υπέδαφος. Στις μέρες μας, οι μεγαλύτεροι παραγωγοί λυκίσκου περιλαμβάνουν την Γερμανία, ΗΠΑ, Κίνα και Τσεχία με την παραγωγή το έτος 2014 να σημειώνεται ως 25.338, 38.499, 6.887 και 6.202 τόνους, αντιστοίχως.

Ο λυκίσκος είναι ένα αιωνόβιο αναρριχητικό φυτό το οποίο, όπως αναφέρθηκε, ανήκει στην οικογένεια Cannabaceae. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν το γένος της Κάνναβις και της Χάπρικας. Τα φύλλα είναι τοποθετημένα στον βλαστό, διευθετημένα εκατέρωθεν αυτού και έχουν σχήμα καρδιάς με οδοντωτές άκρες. Τα θηλυκά άνθη ή αλλιώς οι κώνοι του φυτού, αποτελούνται από κοντά μικρά πέταλα τα οποία λέγονται σπόροι κώνοι ή στρόβιλοι και εκκρίνουν μία λεία, ρητινώδη κίτρινη σκόνη από δομές που ονομάζονται λουπουλινικοί αδένες. Οι αδένες αυτοί είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση των ρητινών και του αιθερίου ελαίου, τα οποία και δίνουν τη χαρακτηριστική πικρή γεύση και το άρωμα στη μπίρα, ενώ σταθεροποιούν τον αφρό και το τελικό προϊόν της ζυθοποίησης. Ειδικά κυτταρικά κενά του εξωτερικού συστήματος των λουπουλινικών αδένων αντιπροσωπεύουν πλούσιες αποθήκες ουσιών με φαρμακευτική και ζυθοποιητική σημασία οι οποίες αποτελούν το σύνολο των δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού και θα αναλυθούν στη συνέχεια, στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Τα αρσενικά φυτά χαρακτηρίζονται από μικρά κίτρινα άνθη και είναι απαραίτητα για την δημιουργία νέων ποικιλιών. Σε περίπτωση που αυτό δεν είναι επιθυμητό, και ιδιαίτερα σε πλάνα σχηματισμού ομοιογενούς καλλιέργειας, τα αρσενικά φυτά απομακρύνονται από την καλλιέργεια ώστε να αποφευχθούν διασταυρούμενες γονιμοποιήσεις και παραγωγή σπόρων. Η απαίτηση του κοινού των καταναλωτών μπίρας σχετικά με την εξειδίκευση των γεύσεων και αρωμάτων του προϊόντος, οδήγησε στην ανάγκη δημιουργίας εκατοντάδων ποικιλιών λυκίσκου, οι οποίες διαφέρουν

ουσιαστικά στο περιεχόμενο και το φυτοχημικό προφίλ των αιθερίων ελαίων, των πικρών οξέων αλλά και των σχετικών πολυφαινολών.

Ο λυκίσκος διασπείρεται μέσω ριζωμάτων των θηλυκών κώνων τα οποία είναι τα μοναδικά που καλλιεργούνται συστηματικά λόγω της εμπορικής τους χρησιμότητας. Τα ριζώματα μπορούν να αποκτηθούν από έμπιστους προμηθευτές ή από ομοιογενείς, ήδη εγκατεστημένες, καλλιέργειες. Τα νέα φυτά, τα οποία ξεκινούν από 15,2-20,3 εκατοστά ύψος, μπορούν αρχικά να τοποθετηθούν σε θερμοκήπιο, προτού φυτευτούν στον αγρό.

Η έναρξη της καλλιέργειας προϋποθέτει πως ο αγρός που θα χρησιμοποιηθεί είναι καλά οργωμένος και ελεύθερος σπόρων πριν τη φύτευση. Τα ριζώματα λυκίσκου φυτεύονται σε λόφους την άνοιξη, όσο νωρίτερα είναι εφικτό. Ορισμένοι καλλιεργητές δημιουργούν μικρές τάφρους μεταξύ των σειρών αντί να καλλιεργούν σε λόφους, διαδικασία που έχει ένα σαφώς ανώτερο επίπεδο δυσκολίας. Είναι, επίσης, αρκετά σημαντικό να διασφαλιστεί η απουσία στάσιμου νερού καθώς τα φυτά του λυκίσκου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη σήψη. Όσο αφορά στην χωροθέτηση των φυτών, υπάρχει ποικιλία στην εφαρμογή, καθώς τα τεμάχια καλλιεργούνται με περίπου 900 φυτά ανά στρέμμα. Σε κάθε χώρο φύτευσης πρέπει να προστίθεται κομποστοποιημένο υλικό και καλά ποτισμένο φυτό. Η οργανική ύλη η οποία τοποθετείται περικλείοντας το νεαρό φυτό βοηθά στον έλεγχο της διασποράς και στη διατήρηση της υγρασίας του εδάφους.

Τα φυτά του λυκίσκου είναι ιδιαίτερα ελκυστικά σε έναν αριθμό εντόμων συμπεριλαμβανομένης της αφίδας, της αράχνης, των ακάρεων και διαφόρων τύπων ελμινθοειδών. Ο συχνός έλεγχος των πληθυσμών που επιμολύνουν την καλλιέργεια είναι καθοριστικός για την δόμηση του προγράμματος χρήσης εντομοαπωθητικών υλικών.

Η συλλογή, η συσκευασία και η αποθήκευση, διαδικασίες ιδιαίτερα χρονοβόρες στην περίπτωση του φυτικού είδους αυτού, καταλαμβάνουν ένα χρονικό διάστημα περίπου 2-3 ετών έως την τελική παραγωγή προϊόντος. Στην περίπτωση μεγάλων καλλιεργητικών εκτάσεων λυκίσκου η συλλογή των κώνων γίνεται μηχανικά με τη χρήση εξειδικευμένου εξοπλισμού ενώ σε μικρότερης κλίμακας φυτείες επικρατεί η συγκομιδή χειρωνακτικά μέσω απομάκρυνσης των κώνων που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης.

Η εποχή συγκομιδής για τον λυκίσκο ξεκινά τον Αύγουστο και τελειώνει στα τέλη Σεπτεμβρίου ανάλογα με την ποικιλία και την τοποθεσία της καλλιέργειας. Τα χαρακτηριστικά που καθορίζουν τη φυσική εικόνα του ώριμου κώνου ο οποίος είναι έτοιμος για συγκομιδή περιλαμβάνουν την εμφάνιση, την αίσθηση του εξωτερικού περιβλήματος και την οσμή. Ο λυκίσκος συγκομίζεται όταν είναι μέγιστα αρωματικός και οι κώνοι έχουν μόλις ξεκινήσει να έχουν υγρασία. Το χρώμα μπορεί επίσης να

αποτελέσει ένδειξη ωριμότητας καθώς οι κώνοι χάνουν ένταση χρώματος ενώ ωριμάζουν μεταβαίνοντας από ένα ιδιαίτερα φωτεινό σε ένα απαλό πράσινο χρώμα.

Τραυματισμοί λόγω της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία ή τους ισχυρούς ανέμους και τις ασθένειες διαφόρων ειδών μπορεί να προκαλέσουν αποχρωματισμό ή ραβδώσεις στην υφή των κώνων, γεγονός που τους καθιστά μη αποδεκτούς για συλλογή και αποθήκευση. Οι ώριμοι κώνοι έχουν παράθυρο συγκομιδής τις 5 με 10 ημέρες, πράγμα που σημαίνει πως από τη στιγμή που κριθούν κατάλληλοι για συλλογή πρέπει να συγκομιστούν εντός 10 ημερών το πολύ. Οι κώνοι λυκίσκου εισέρχονται στην αγορά σε αποξηραμένη μορφή όταν αυτό που απαιτείται είναι το επεξεργασμένο προϊόν ή όταν πρέπει να αποθηκευτούν πριν την περαιτέρω χρήση. Η διαδικασία ξήρανσης περιλαμβάνει σταθερή ροή αέρα και σε ορισμένες περιπτώσεις μια ελαφρά παροχή θερμότητας. Μετά την ξήρανση, οι κώνοι ψύχονται για να τεθούν σε διαδικασία συσκευασίας ή επεξεργασίας. Για να αποφευχθεί η γρήγορη αλλοίωση που επέρχεται λόγω φωτός, οξυγόνου ή υψηλών θερμοκρασιών, οι αποξηραμένοι κώνοι μπορούν να συσκευαστούν αεροστεγώς σε αδιαφανείς σακούλες και να αποθηκευτούν σε ψυγείο θερμοκρασίας μικρότερης από 4°C. Οι μεγάλες βιομηχανίες παραγωγής ζύθου επιλέγουν λυκίσκο σε μορφή πέλλετ (πεπιεσμένη ξηρά δρόγη σε κυλινδρική μορφή διαμέτρου 5-25mm).

Η παραγωγή του λυκίσκου είναι μια διαδικασία που προϋποθέτει πολλές ώρες εξειδικευμένης εργασίας, με τις περισσότερες να συμβαίνουν την Άνοιξη και κατά την περίοδο της συγκομιδής. Σε αυτές περιλαμβάνονται η φύτευση, το κλάδεμα των ριζών, το σκάψιμο των ριζωμάτων, η διαχείριση άλλων φυτικών ειδών που μπορεί να αναπτυχθούν περί των καλλιεργούμενων εκτάσεων και η συγκομιδή. Υπολογίζεται πως οι ώρες εργασίας που απαιτούνται ανά στρέμμα είναι περίπου 30 για την παραγωγή, 70 με 150 για τη συγκομιδή και 50 με 100 για την συσκευασία/αποθήκευση. Η απαιτούμενη χειρωνακτική εργασία εξαρτάται όπως είναι προφανές από το επίπεδο στο οποίο η μηχανοποίηση παρεμβαίνει στις επιμέρους διαδικασίες με αποκορύφωμα την συγκομιδή του φυτού.

Με βάση γενετικούς δείκτες, οι ποικιλίες λυκίσκου μπορούν να διαχωριστούν σε 4 κατηγορίες: Λυκίσκος ευρωπαϊκής προέλευσης του Saaz group, Λυκίσκος ευρωπαϊκής προέλευσης του Fuggle group, Λυκίσκος αμερικάνικης προέλευσης και Λυκίσκος μικτής προέλευσης.

Νέες ποικιλίες λυκίσκου συντίθενται μέσω διασταύρωσης διαφορετικού γενετικού υλικού με σκοπό την επίτευξη των επιθυμητών χαρακτηριστικών όπως είναι η υψηλή

απόδοση, η αντοχή σε ασθένειες και η περιεκτικότητα και σύνθεση των ρητινών και αιθερίων ελαίων.

Ενώ στην πλειοψηφία τους οι καλλιέργειες λυκίσκου έχουν ως στόχο τους την παραγωγή μιας από τις πρώτες ύλες που συμμετέχουν καθοριστικά στην διαμόρφωση του τελικού προϊόντος της ζυθοποίησης, κάποιοι καινοτόμοι καλλιεργητές έχουν ξεκινήσει την ανάπτυξη νέων αγορών για το φυτό του λυκίσκου. Συγκεκριμένα αναφέρονται περιπτώσεις χρήσης της ξηρά δρόγης του φυτού ή των εκχυλισμάτων και ελαίων αυτού, με σκοπό τη δημιουργία σαπουνιού, αρτυματικών υλών και βρώσιμων προϊόντων. Σε συνέχεια της ελαφρώς καταπραϊντικής δράσης η οποία αποδίδεται στους κώνους του λυκίσκου, η βιομηχανία έχει εισάγει το φυσικό προϊόν αυτό στην αγορά εντάσσοντάς το σε προϊόντα όπως τα ροφήματα βοτάνων και τα μαξιλάρια με εμποτισμένο εσωτερικό, με σκοπό την καταπολέμηση της αϋπνίας. Μετά την συλλογή των κώνων, τα στελέχη μπορούν να εκμεταλλευτούν χειροτέχνες καθώς η ινώδης μορφή τα καθιστά ικανά να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή χαρτιού και υφάσματος.

(Hop Cultivar Descriptions (USDA-ARS) <http://www.ars.usda.gov/pandp/docs.htm?docid=14772>)

(Hops: Organic Production (ATTRA, 2005) <https://attra.ncat.org/attra-pub/summaries/summary.php?pub=87>)

(Kaiser & Ernst, 2012). Hops, Cooperative Extension Service University of Kentucky College of Agriculture, Food and Environment, Center for Crop Diversification Crop Profile <http://www.uky.edu/Ag/CCD/intro.html>)

(Chadwick et al., 2006, Skomra , Bocianowski & Agacka, 2013, Karabin et al, 2016)

1.1.3. Οργανική καλλιέργεια

Η αυξημένη δημοτικότητα που έχουν λάβει τα οργανικά προϊόντα έχει πυροδοτήσει την απαίτηση σχετικά με την παραγωγή οργανικού ζύθου. Καταγραφές δείχνουν πως οι πωλήσεις του προϊόντος αυτού εμφανίζουν ταχύρρυθμη άνοδο, ειδικά σε σύγκριση με την αγορά οργανικών προϊόντων στο σύνολό της. Παρόλα αυτά η παραγωγή οργανικού λυκίσκου, απαραίτητη προϋπόθεση για να αποκτήσει το τελικό προϊόν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, δεν φαίνεται να μπορεί να συμβαδίσει με τη ζήτηση από τους ζυθοποιούς που ασχολούνται με την παραγωγή οργανικού ζύθου. Το κόστος δεν παύει

να είναι κρίσιμος παράγοντας καθώς υπολογίζεται πως αυξάνεται 3 φορές σε σχέση με το συμβατικό προϊόν. (Karabin et al., 2016)

1.2. Ιστορικά στοιχεία και Προέλευση του φυτού.

Ιστορικά στοιχεία φτάνουν στο συμπέρασμα ότι η προέλευση του λυκίσκου εντοπίζεται στην Ασία και πιο συγκεκριμένα στη γόνιμη γη της Μεσοποταμίας, στα υψίπεδα του Καύκασου και την νότια Σιβηρία. Από την βοτανική πλευρά ωστόσο, το φυτικό είδος του λυκίσκου θεωρείται πως κατάγεται από την Κίνα, καθώς εκείνη είναι η μόνη χώρα στον κόσμο στην οποία και τα τρία είδη λυκίσκου (*H. lupulus*, *H. japonicus*, *H. yunnanensis*) είναι ενδημικά. Ο λυκίσκος ξεκίνησε να καλλιεργείται από το ξεκίνημα της εποχής μας. Καταγραφές δείχνουν πως ο λυκίσκος χρησιμοποιούνταν από Σλάβικες φυλές μόλις το 1500-1000 πΧ συμμετέχοντας στη διαδικασία συντήρησης του ζύθου. Άλλα έθνη ξεκίνησαν να χρησιμοποιούν το φυτό στη διαδικασία της παραγωγής ζύθου από τον 13^ο μΧ αιώνα. Μέχρι τον 12^ο μΧ αιώνα ωστόσο, ο λυκίσκος συλλέγονταν από άγρια φυτά. Πολύ σύντομα, οι θεραπευτικές του ιδιότητες ήρθαν στο προσκήνιο και εντάχθηκαν στη συστηματοποιημένη χρήση των φυσικών προϊόντων στα πλαίσια της παραδοσιακής ιατρικής. Η χρήση του λυκίσκου αφορούσε κατά βάση τη θεραπεία της λέπρας, τη δυσσομία των κάτω άκρων, τις ηπατοπάθειες, τις διαταραχές ύπνου, τη δυσκοιλιότητα αλλά και την κάθαρση του αίματος. Καταγραφές από τον 7^ο και 9^ο αιώνα μΧ δείχνουν πως οι πρώτοι κήποι λυκίσκου ιδρύθηκαν κάτω από μοναστηριακή διεύθυνση, όπου ο λυκίσκος καλλιεργήθηκε μαζί με άλλα φυτικά είδη λόγω των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων. Ακόμα και σε εκείνη την εποχή, τα εκχυλίσματα λυκίσκου αναγνωρίστηκαν για τις αντιφλεγμονώδεις και αντισηπτικές δράσεις τους καθώς αφεψήματα παρασκευασμένα από λυκίσκο χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία τραυματισμών με αργή επούλωση. Ακόμα ένα παράδειγμα παρόμοιων θεραπευτικών εφαρμογών αποτελεί η χρήση πολλού λυκίσκου κατά της πνευμονίας ή του πυρετού. Αλκοολικά εκχυλίσματα λυκίσκου χρησιμοποιούνταν στα πλαίσια της κινέζικης ιατρικής για τη θεραπεία της πνευμονικής φυματίωσης ή την οξεία βακτηριακή δυσεντερία και έχουν επίσης καταγραφεί ως κομμάτι των θεραπειών της Ayurveda. Κάποιες πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως τα αλκοολικά εκχυλίσματα του λυκίσκου κατέχουν μια ισχυρή σπασμολυτική επίδραση στους λείους μύες με αποτέλεσμα να είναι αποτελεσματικοί σε περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται από τάση των υποδόριων λείων μυών, συμπεριλαμβανόμενης της σπαστικής κολίτιδας, της νευρικής δυσπεψίας, τους

νευρικούς παλμούς, του βήχα και του άσθματος. (Olsovskaja et al., 2016; Chadwick et al., 2006)

Οι πρωιμότερες καταγραφές που αναφέρουν το φυτικό είδος του λυκίσκου και τη χρήση αυτού χρονολογούνται περί του 11^{ου} αιώνα, όταν ο Αραβικής καταγωγής γιατρός Mesue, περιέγραψε την αντιφλεγμονώδη δράση του φυτού. Αργότερα, το 1158, η Γερμανίδα βοτανολόγος Hildegard von Bingen, έμμεσα επιβεβαιώνει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του φυτού, καθώς προτείνει την προσθήκη του φυτού σε ροφήματα με σκοπό την παράταση του χρόνου ημίσειας ζωής αυτού του είδους των προϊόντων.

Επίσης, σύμφωνα με ένα από τα σπουδαιότερα επιστημονικά χειρόγραφα του 15^{ου} αιώνα, "*the Garden of Health*", ο λυκίσκος χρησιμοποιούνταν και στην καταπολέμηση λοιμώξεων των ώτων. Αργότερα, τον 16^ο αιώνα, ο Γερμανός βοτανολόγος Hieronymus Bock, πιστοποιεί την πρώτη χρήση του λυκίσκου στον τομέα της γυναικολογίας. Ωστόσο αναφέρονται κατά καιρούς επιπρόσθετες φαρμακευτικές χρήσεις του όπως ενάντια της δυσπεψίας και της αϋπνίας, υπέρ της διούρησης, της γαστρικής έκκρισης (χαρακτηρίζοντας τη δράση παρόμοια με εκείνη της καφεΐνης) και της νευρικής καταπράνσης, ιδιαίτερα σε συνδυασμό του εκχυλίσματος με τη βαλεριάνα (*Valeriana officinalis*, Valerianaceae).

Στις ημέρες μας, η συστηματική μελέτη του λυκίσκου έχει βοηθήσει στην ακόμα πιο λεπτομερή χαρτογράφηση των δραστικών συστατικών του με αποτέλεσμα να αποδίδονται και νέες, πιο ειδικές φαρμακευτικές δράσεις, όπως εκείνη που συσχετίζεται με την αύξηση της δραστηριοποίησης των θηλυκών ορμονών, με αποτέλεσμα την μείωση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης ή των ορμονικών διαταραχών σε γυναίκες μετεμμηνοπαυσιακής ηλικίας. Πέραν όλων των παραπάνω, δεν παύει να αποτελεί τη βασική αρωματική ύλη που εμπλέκεται στη διαδικασία της ζυθοποίησης, με το ρόλο του να ανάγεται κατά βάση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου προσδίδοντας την χαρακτηριστική αίσθηση πικράδας και γεύσης αλλά και στα λειτουργικά, δρώντας ως μέσο σταθεροποίησης του αφρού. (Chadwick et al., 2006; Wietstock et al., 2010; Karabin et al., 2016)

1.3. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που εντοπίζονται στο φυτικό είδος του Λυκίσκου: Κατηγοριοποίηση και Διαχωρισμός των συστατικών

Το χαρακτηριστικό άρωμα και η πικρή γεύση που εμπλουτίζουν το ζύθο λόγω της προσθήκης του λυκίσκου, αποδίδονται από τους κίτρινους λουπουλινικούς αδένες του

φυτού οι οποίοι εκκρίνουν τις ρητίνες (α και β οξέα) και τα αιθέρια έλαια του φυτού. Επίσης, οι θηλυκοί κώνοι λυκίσκου περιέχουν ένα μεγάλο φάσμα πολυφαινολικών συστατικών όπως τα φαινολικά οξέα, οι προανθοκυανιδίνες και οι πρενυλιωμένες χαλκόνες τα οποία παράγονται επίσης στους λουπουλινικούς αδένες.

1.3.1. Οξέα

Τα πικρά οξέα του λυκίσκου είναι παράγωγα της φλωρογλυκινόλης και ταξινομούνται ως α - και β - οξέα. Και οι δύο κατηγορίες περιέχουν μια 3-,4-,5-, ή 6- καρβοξυ-αλκυλο πλευρική αλυσίδα και τα β - οξέα διαφέρουν από τα α - κατά μία περισσότερη ομάδα πρενυλίου.

Τα α -πικρά οξέα, είναι το πιο σημαντικό κλάσμα των ρητινών λυκίσκου. Εκκρίνονται με τη μορφή κίτρινης σκόνης και αποτελούν μείγμα 6 ουσιών, ανάλογων της χουμουλόνης (humulone). Έτσι, σε όλες τις ποικιλίες λυκίσκου, βρίσκουμε α -οξέα τα οποία αναγνωρίζονται ως τα εξής:

Χουμουλόνη (Humulone), σε ποσοστό 35-70% των ολικών α -οξέων

Συνχουμουλόνη (Cohumulone), σε ποσοστό 20-55% των ολικών α -οξέων

Αντχουμουλόνη (Adhumulone), σε ποσοστό 10-15% των ολικών α -οξέων

Άλλες ουσίες που αναγνωρίζονται σε μικρές ποσότητες και ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι η ΠοστΧουμουλόνη (Post-humulone), Πρεχουμουλόνη (Pre-Humulone) και Αντπρεχουμουλόνη (Ad-pre-humulone).

Κατά τη θερμική επεξεργασία (100 με 130 °C) η οποία εφαρμόζεται στην πρώτη ύλη κατά τη διαδικασία της ζυθοποίησης και σε συνδυασμό με την μετάβαση του pH στο εύρος 8-10, τα πικρά α -οξέα ισομεριώνονται προς *ισο- α -πικρά οξέα*. Στη βιομηχανία θεωρείται πως η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα κατά το βρασμό του λυκίσκου στους 100°C με ταυτόχρονη εφαρμογή ατμοσφαιρικής πίεσης για 90 λεπτά. Ωστόσο, μελέτες αναφέρουν πως σε αυτό το στάδιο η μετατροπή γίνεται μόλις κατά 50%.

Ομοίως με τα α -πικρά οξέα, στα β -πικρά οξέα εντοπίζονται και πάλι ανάλογες ενώσεις. Έτσι βρίσκουμε τις παρακάτω:

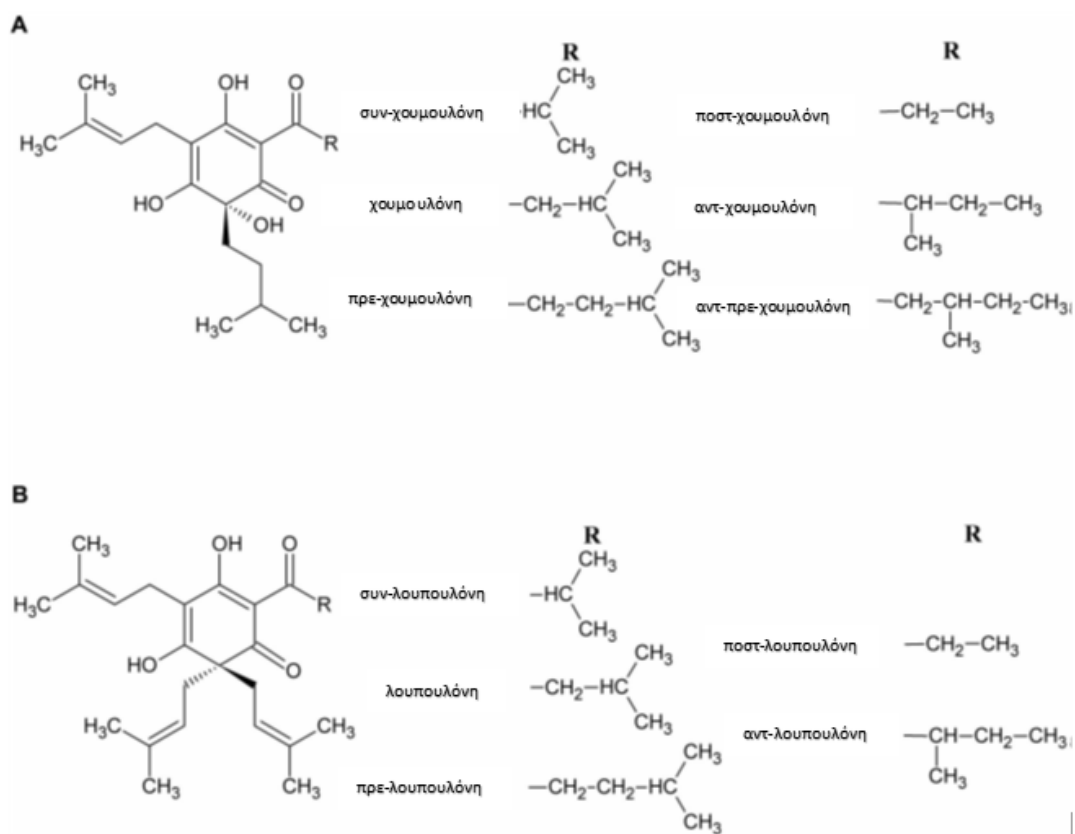
Λουπουλόνη (Lupulone), σε ποσοστό 30-55% των ολικών β -οξέων

Κολουπουλόνη (Colupulone), σε ποσοστό 20-55% των ολικών β -οξέων

Αντλουπουλόνη (Adlurulone), σε ποσοστό 5-10% των ολικών β-οξέων

Συμπληρωματικά βρίσκουμε Πρελουπουλόνη (Pre-lurulone) και Ποστλουπουλόνη (Post-lurulone).

Οι παραπάνω ενώσεις, ως μη διαλυτές στο νερό έχουν μικρή σημασία στη ζυθοποίηση. Ωστόσο, λόγω των βιολογικών δράσεων τους, μελετώνται εκτενώς για πιθανές βιοϊατρικές εφαρμογές. Σε εμπορικό επίπεδο ωστόσο, τα α- και β- οξέα στο σύνολό τους επιδρούν καθοριστικά στα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου (πικράδα, άρωμα, γεύση, υφή αφρού) ενώ συνηθίζεται η αναγραφή του ποσοστού αυτών, επί τοις εκατό, του βάρους ξηράς δρόγης ή συμπυκνωμένου εκχυλίσματος καθώς επίσης και η περιεκτικότητα σε συνχουμουλόνη, ως ποσοστό των ολικών α-οξέων. (Karabin et al., 2016)



Σχήμα 1.1. Χημικές δομές των βασικότερων αναλόγων των πικρών οξέων λυκίσκου: (A) α-πικρά οξέα και (B) β-πικρά οξέα.

1.3.2. Αιθέριο Έλαιο

Το αιθέριο έλαιο του λυκίσκου αποτελεί μια ιδιαίτερα ετερογενή ομάδα εκατοντάδων ουσιών με διαφορετικές φυσικοχημικές, βιολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες. Οι ουσίες αυτές εκκρίνονται επίσης από τους λουπουλινικούς αδένες, μαζί με τα πικρά οξέα, όταν η βιοσύνθεση εκείνων ολοκληρωθεί.

Τα έλαια του λυκίσκου κατηγοριοποιούνται σε τρία βασικά κλάσματα

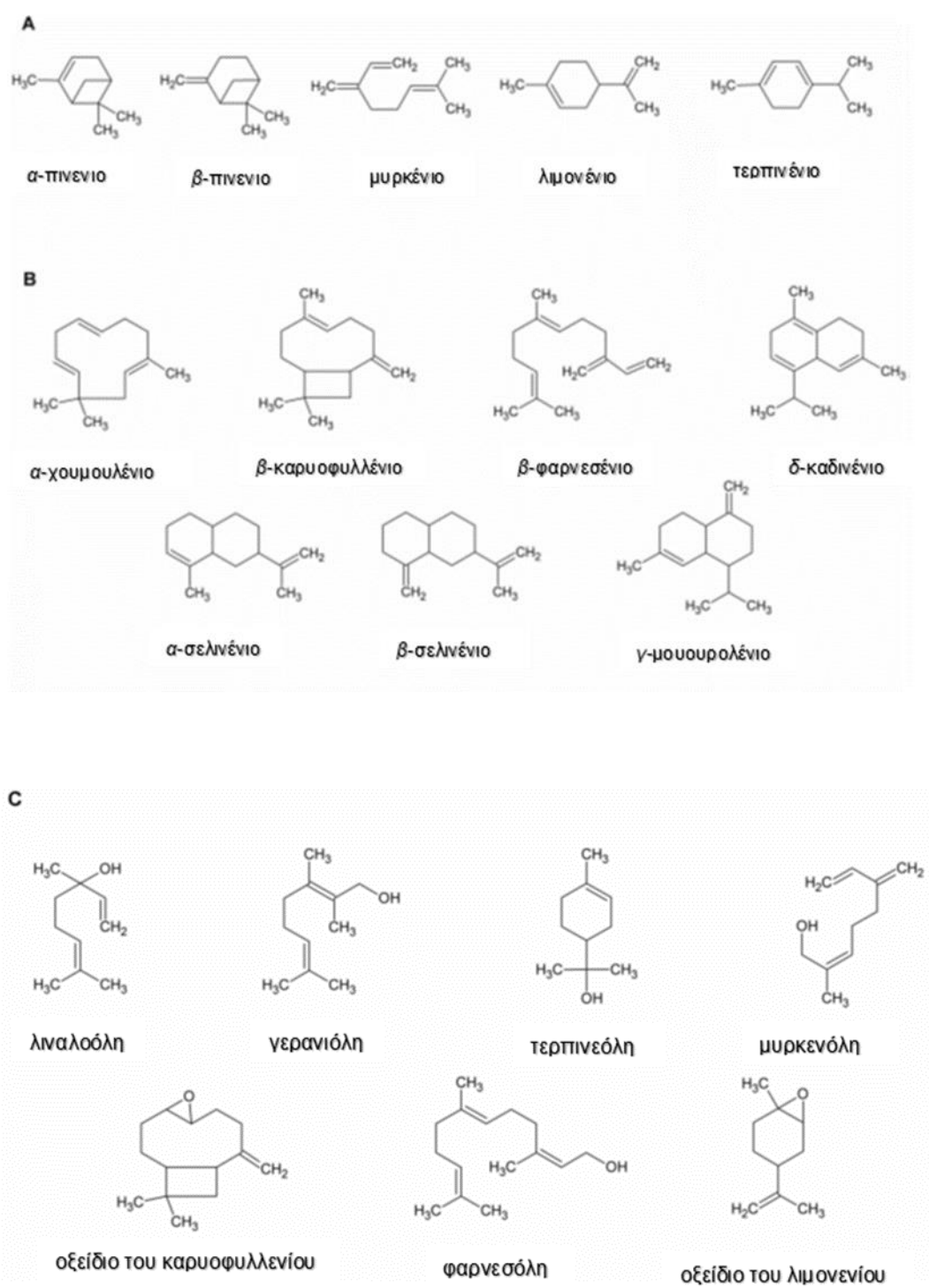
1. Υδρογονάνθρακες, οι οποίοι περιλαμβάνουν τα μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και τους αλιφατικούς υδρογονάνθρακες,

2. Οξυγονωμένες ενώσεις, οι οποίες σχηματίζονται κατά βάση κατά την ωρίμαση, επεξεργασία και αποθήκευση των κώνων και περιλαμβάνουν τις τερπεν-αλκοόλες, σεσκιτερπεν-αλκοόλες, αλδεύδες, οξέα, κετόνες, εστέρες και άλλα οξυγονωμένα συστατικά, και

3. Ενώσεις που περιέχουν την σουλφο-ομάδα, όπως οι θειοεστέρες, τα σουλφίδια και άλλες σουλφο-ενώσεις.

Οι ενώσεις της πρώτης ομάδας (υδρογονάνθρακες, 50-80% του ολικού ελαίου), οι οποίες εντοπίζονται κατά μέσο όρο, συχνότερα στο αιθέριο έλαιο του λυκίσκου είναι τα μονοτερπένια α - και β - πινένιο, μυρκένιο και λιμονένιο όπως επίσης και τα σέσκιτερπένια, α -χουμουλένιο, β -φαρνεσένιο, β -καρυοφυλλένιο, α - και β -σελινένιο και γ -μουουρολένιο.

Από το δεύτερο κλάσμα του ελαίου (οξυγονωμένες ενώσεις, 30% του ολικού ελαίου), συναντούμε συχνότερα τις ενώσεις: λιναλοόλη, οξειδίο του καρυοφυλλενίου και φαρνεσόλη ενώ το τρίτο κλάσμα (ενώσεις με σουλφο-ομάδα) συμμετέχει σε ποσοστό μικρότερο του 1% του ολικού ελαίου με ενώσεις οι οποίες δεν φαίνεται να αντιστοιχίζονται βιβλιογραφικά με κάποιον ιδιαίτερο δραστικό χαρακτήρα. (Karabin et al., 2016)



Σχήμα 1.2. Χημικές δομές των βασικότερων συστατικών του αιθερίου ελαίου λυκίσκου: (A) μονοτερπένια, (B) σεσκιτερπένια, και (C) οξυγονωμένα τερπένια.

1.3.3. Φαινολικά Συστατικά

Τα φαινολικά συστατικά του λυκίσκου αποτελούν μια ακόμη μεγάλη ομάδα βιολογικά ενεργών δραστικών συστατικών και καταλαμβάνουν το 3-6% του ξηρού βάρους των κώνων λυκίσκου. Η πλειοψηφία των πολυφαινολών εντοπίζεται στο φύλλο του μίσχου του άνθους, με την εξαίρεση των πρενυλ-φλαβονοειδών τα οποία εκκρίνονται από τους λουπουλινικούς αδένες μαζί με τα πικρά οξέα και τα αιθέρια έλαια.

Η ομάδα αυτή μπορεί να διαχωριστεί σε 4 υποομάδες: φλαβονόλες, φλαβαν-3-όλες, φαινολικά καρβοξυλικά οξέα (παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμικού οξέος) και άλλες φαινολικές ενώσεις (πρενυλιωμένα φλαβονοειδή, στυλβενοειδή κλπ). Αναλυτικά οι σημαντικότερες ενώσεις που συναντώνται από την κάθε ομάδα, είναι αντίστοιχα οι παρακάτω:

1. Φλαβονόλες: κερκετίνη, καμφερόλη, μυρικετίνη (εμφανίζονται κυρίως τα γλυκοσίδια αυτών, με την D-γλυκόζη και L-ραμνόζη να είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενες ομάδες σακχάρων)

2. Φλαβαν-3-όλες: κατεχίνη, γαλλική κατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη, μονομερή τα οποία δύνανται να σχηματίσουν διμερή, τριμερή και ολιγομερή (έως 20 μονομερικές μονάδες), ενώσεις γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες.

3. Πολυφαινολικά Οξέα: γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και σιναπτικό οξύ. Η ομάδα αυτή αποτελείται από μονές αρωματικές πολυφαινόλες, υποκατεστημένες με υδροξυλ- και μεθοξυλ- ομάδες.

4. Άλλα φαινολικά συστατικά: οι σημαντικότερες ενώσεις που απαντώνται σε αυτή την κατηγορία είναι τα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή από τα οποία συχνότερα συναντάμε την ξανθοχουμόλη, ίσο-ξανθοχουμόλη, δεσμέθυλοξανθοχουμόλη, 6 και 8 πρενυλ-ναρινγενίνη. (Chadwick et al., 2006; Karabin et al., 2015; Karabin et al., 2016)

Παρά το γεγονός ότι τα δραστικά συστατικά στην πλειοψηφία τους ανιχνεύονται στους θηλυκούς κώνους του λυκίσκου με συνέπεια εκείνοι να αποτελούν και την βασική πρώτη ύλη στην έρευνα της σύστασης του είδους, στην περίπτωση των φαινολικών συστατικών υπάρχουν κάποια επιπλέον δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα, σε αντίστοιχη μελέτη του 2013 από τους Urgeonά E. και συν., αποδεικνύεται πως στα όχι μόνο οι θηλυκοί κώνοι του φυτού σε περίοδο ανθοφορίας (Σεπτέμβρης), αλλά και το μείγμα αρσενικών με θηλυκά φύλλα αυτού κατά την πρώτη περίοδο του θερισμού (Απρίλιος) εμφανίζουν υψηλές

συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε επίπεδο μάλιστα συγκρίσιμο με εκείνο των ώριμων ανθών του λυκίσκου.

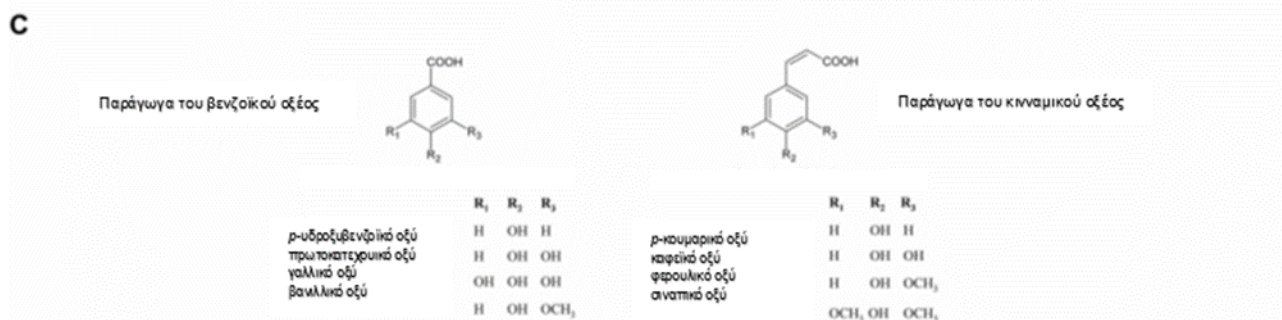
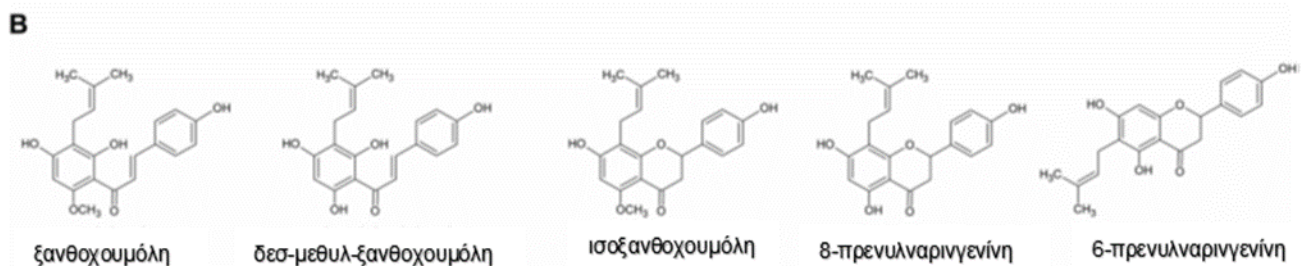
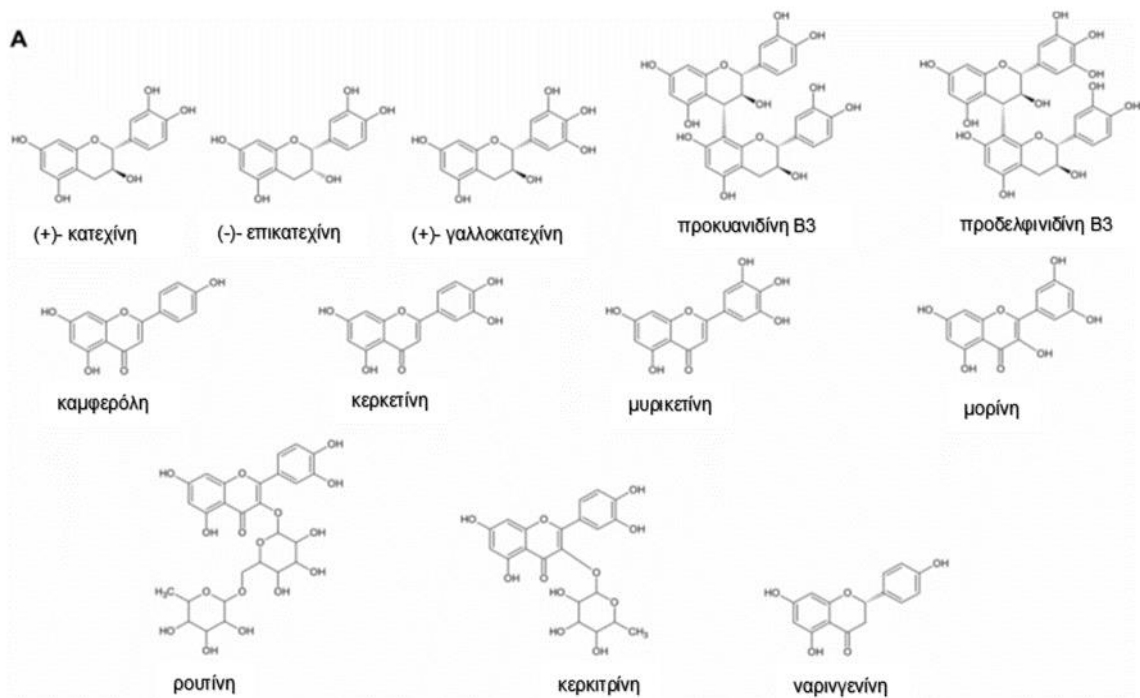
Πίνακας 1.1. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων των φύλλων και κώνων άγριου λυκίσκου σε φλαβονοειδή κατά την περίοδο της βλάστησης. (Urgeoná et al., 2013)

Περιοχή	Φύλο	Περιεχόμενο σε φλαβονοειδή				
		Φύλλα				Κώνοι
		Απρίλιος	Ιούνιος	Αύγουστος	Σεπτέμβριος	Σεπτέμβριος
mg g^{-1}						
Váh 1	♂	3.43 ± 0.25	1.62 ± 0.60	0.58 ± 0.05	1.25 ± 0.30	–
Váh 2	♀	2.99 ± 0.55	1.28 ± 0.10	0.59 ± 0.10	1.29 ± 0.20	1.89 ± 0.30
Sládkovičova street	♂	2.53 ± 0.30 ^a	1.57 ± 0.60 ^a	1.31 ± 0.10	1.48 ± 0.05	–
	♀			1.69 ± 0.50	1.43 ± 0.25	2.16 ± 0.80
Tennis courts	♂	2.28 ± 0.35 ^a	1.49 ± 0.50 ^a	0.85 ± 0.10	1.21 ± 0.25	–
	♀			0.89 ± 0.05	0.57 ± 0.80	1.86 ± 0.30

Στην περίπτωση των ρητινών, τα αποτελέσματα που επέδειξε η μελέτη δεν επιδεικνύουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην περιεκτικότητα σε α και β οξέα των φύλλων σε σχέση με προηγούμενες μελέτες. Παρόλα αυτά, τα ευρήματα που αναφέρθηκαν και αφορούν το φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων του φυτού αποτελούν ένα αρκετά ενδιαφέρον παράγοντα ο οποίος μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ολοκληρωτική εκμετάλλευση των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του φυτού, καθώς στο ευρύτερο πεδίο των καλλιεργειών λυκίσκου, η πρώτη γενιά των φύλλων πριν την έναρξη της βλάστησης, απορρίπτεται ως προϊόν μηδενικής χρησιμότητας. (Urgeoná et al., 2013)

Η παρουσία των φαινολικών συστατικών στο λυκίσκο συμβάλλει, στην τελική περιεκτικότητα του παραγόμενου ζύθου σε αυτά τα συστατικά κατά 20-30%, συμπληρωματικά της βύνης (70-80%), ποσοστό αρκετά σημαντικό λαμβάνοντας υπ' όψη την αναλογία των σχετικών συγκεντρώσεων των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της ζυθοποίησης. (Mudura & Coldea, 2015)

Παρακάτω παρατίθενται οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι των φαινολικών συστατικών που απομονώνονται από το φυτικό είδος του λυκίσκου.



Σχήμα 1.3. Χημικές δομές των βασικότερων φαινολικών συστατικών του Λυκίσκου: (A) Φλαβονοειδή, (B) Πρενυλιωμένα φλαβονοειδή, και (C) Φαινολικά Οξέα

1.4 Βιολογική δράση και δραστηριότητα των συστατικών του Λυκίσκου

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες του λυκίσκου έχουν περιγραφεί ως δυνητικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες ενάντια ενός μεγάλου εύρους μικροοργανισμών. Η σημασία του φυτού υποστηρίχθηκε με την απόδοση του βραβείου «Φαρμακευτικό φυτό της χρονιάς 2007» από την Ομάδα Μελέτης της Ιστορικής Ανάπτυξης της Επιστήμης των Φαρμακευτικών φυτών, στο Πανεπιστήμιο του Würzburg της Γερμανίας όπως επίσης και από την επιλογή του ως θεματικού φυτού του έτους 2008 του Πανεπιστημίου του Illinois, Chicago, ΗΠΑ. Ο αυξημένος όγκος των ερευνητικών δημοσιεύσεων σχετικά με τις ευεργετικές δράσεις του λυκίσκου κάνει ακόμα πιο εμφανείς τους λόγους της αναγνώρισής του.

1.4.1. Αντιοξειδωτική Ιδιότητα

Όπως παρατηρούμε στην μαζική πλειοψηφία των φυτικών ειδών, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα αποτελεί την κοινότερη ιδιότητα που εμφανίζουν χάρη στην χημική σύσταση των δραστικών τους συστατικών. Με τον ίδιο τρόπο, από τον χάρτη των ουσιών που διαδραματίζουν βασικό ρόλο τόσο στην μείωση του ρυθμού όσο και στην ολοκληρωτική αποτροπή των οξειδωτικών διεργασιών, δεν λείπουν και οι ενώσεις που συναντώνται στο φυτικό είδος του λυκίσκου. Μάλιστα, λόγω της αντιστοιχίας της συγκεκριμένης ιδιότητας με το σύνολο σχεδόν των βιοδραστικών συστατικών που εντοπίζονται, παρακάτω θα αναφερθούν και θα συγκριθούν όλες οι επιμέρους κατηγορίες εκείνων.

Είναι εξίσου σημαντικό να αναφερθεί ότι η αναγωγή των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων στα φυτά δεν αποτελεί διόλου τυχαίο γεγονός, καθώς, σε εργαστηριακό επίπεδο, είναι ίσως η ιδιότητα που μπορεί να ελεγχθεί μέσα από την λιγότερο περίπλοκη διαδικασία. Τόσο η πληθώρα των μεθόδων όσο και η εύκολη χρήση των υλικών μέσων και η γρήγορη εξαγωγή των αποτελεσμάτων, την καθιστούν άμεση και λειτουργική. Παρακάτω παρατίθενται οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι καθορισμού της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των συστατικών του λυκίσκου:

- Έλεγχος ανασταλτικής δραστηριότητας της λιπιδικής υπεροξειδωσης Lipid peroxidation inhibitory activity (LIA),
- Έλεγχος βάσει της ικανότητας μείωσης της αντιοξειδωτικής δύναμης των ιόντων σιδήρου

Ferric ion-reducing antioxidant power (FRAP),

- Έλεγχος δραστηριότητας εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών DPPH
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), radical-scavenging activities (RSA),
- Έλεγχος ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας
Total reactive antioxidant potential (TRAP),
- Δοκιμή των ελεύθερων ριζών θειοβαρβιτουρικού οξέος
The thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) assay,
- Προσδιορισμός της δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης
Determination of xanthine oxidase activity,
- Αιμόλυση περοξειδάσης του υδρογόνου
Hydrogen peroxide hemolysis

(Karabin et al., 2016)

Τόσο μελέτες σε ζώα όσο και κλινικές δοκιμές έχουν δώσει αποτελέσματα υπέρ της θετικής συσχέτισης των πολυφαινολών με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Τα αποτελέσματα αυτά αφορούν ένα μεγάλο εύρος συστημάτων χημικής οξειδωσης, όπως φαίνεται και από την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου όπως το υδροξύλιο, το υπεροξειδίο και το μονήρες οξυγόνο. Όπως γνωρίζουμε, οι ρίζες αυτές είναι άμεσα εμπλεκόμενες στη διαδικασία του οξειδωτικού στρες και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη όγκων, την αθηροσκλήρωση, το διαβήτη και την νόσο Alzheimer. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών έγκειται επίσης και στην ικανότητά τους να παρεμβαίνουν στη δράση ενζύμων, τα οποία εξειδικεύονται στον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, όπως για παράδειγμα η οξειδάση του NADPH, οι κυκλοξυγενάσες, η οξειδάση της ξανθίνης και οι λιποξυγενάσες. Κατ'επέκταση, μέσω του συστήματος παρεμπόδισης της δράσης των ενζύμων αυτών, μπορούμε να προσθέσουμε πως οι πολυφαινολικές ουσίες συμβάλλουν στη μείωση του οξειδωτικού στρες. Η δράση τους ωστόσο σχετίζεται άμεσα και με τον περιορισμό διεργασιών που σχετίζονται με την αρτηριοσκληρωτική διαδικασία καθώς δημιουργούν δεσμούς με μεταλλικά στοιχεία όπως τα ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL).

Στην ομάδα των πολυφαινολών τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα φαίνεται να εμφανίζουν: τα φλαβονοειδή κερκετίνη, μυρικετίνη και καμφερόλη και τα παράγωγα των φαινολικών οξέων, υδροξυλιωμένοι εστέρες του κινναμικού οξέος.

Αξιοσημείωτη φαίνεται πως είναι η αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζουν και τα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή με την ισχυρότερη να αποδίδεται στην ξανθοχουμόλη.

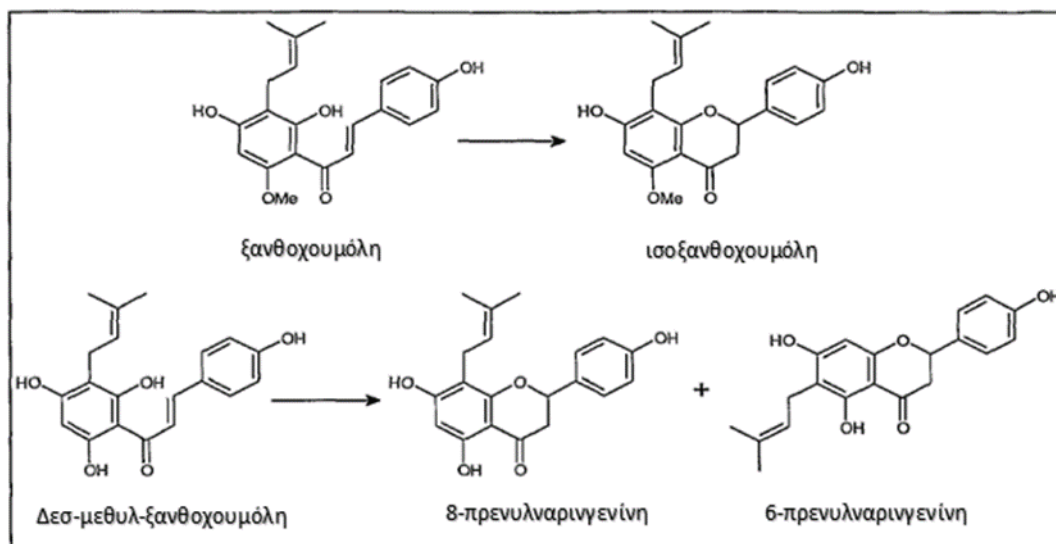
Συγκεκριμένα, σε μελέτες πειραματικού προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο ORAC, η ξανθοχουμόλη βρέθηκε να εμφανίζει έως και 9 φορές ισχυρότερη δραστικότητα σε σχέση με το παράγωγο της βιταμίνης E, trolox το οποίο χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη μέθοδο ως ένωση αναφοράς. Σε επίπεδο αναστολής της οξειδωσης της LDL, η ξανθοχουμόλη βρέθηκε να δρα ισχυρότερα από την α-τοκοφερόλη. (Miranda et al., 2000; Karabin et al., 2015)

Σε επίπεδο αιθερίου ελαίου τα πράγματα φαίνεται πως περιπλέκονται. Σύμφωνα με τους Karabin et al, 2016, στην πλειοψηφία τους οι πολυφαινόλες του λυκίσκου εμφανίζουν χαμηλότερη ή υψηλότερη δραστικότητα ανάλογα με την υπό μελέτη μέθοδο, χωρίς έτσι να συντίθεται ένα ενιαίο αποτέλεσμα στην βιβλιογραφία. Σε γενικές γραμμές, αντιοξειδωτική δραστηριότητα, με αντικρουόμενα ωστόσο αποτελέσματα μεταξύ των πρόσφατων μελετών φαίνεται πως εμφανίζουν ουσίες όπως η λιναλοόλη, η μονοτερπενικές αλκοόλες τερπινεόλη και γερανιόλη, η σεσκιτερπενική αλκοόλη φαρνεσόλη. Από την άλλη, το πιο σημαντικό μονοτερπένιο που ανιχνεύεται στο αιθέριο έλαιο του λυκίσκου, β-μυρκενίο φαίνεται πως σχετίζεται με την ενίσχυση της δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου και η περοξειδάση της γλουταθειόνης βάζοντας έτσι ισχυρή βάση σε πιθανές μελλοντικές εφαρμογές κατά του πεπτικού έλκους. Αντιοξειδωτική επίδραση εμφανίζουν επίσης μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες όπως το β-πινένιο, το γ-τερπινένιο και το λιμονένιο αλλά και οι σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες α-χουμουλένιο και β-καρυοφυλλένιο, δύο από τα πιο σημαντικά συστατικά του αιθερίου ελαίου του λυκίσκου. Όπως επισημαίνεται από τους Calleja και συν. (2013), το καρυοφυλλένιο, συγκεκριμένα, πέραν της ισχυρής δράσης του υπέρ της εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών, επέδειξε εντονότερη αποτρεπτική ικανότητα της λιπιδικής οξειδωσης σε σύγκριση με το αντιυπερλιπιδαιμικό φάρμακο ProbucoI και το φυσικό αντιοξειδωτικό α-τοκοφερόλη. (Calleja et al., 2012; Bonamin et al., 2014)

Στην κατηγορία των πικρών οξέων λυκίσκου, η αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζεται εντονότερα ανάμεσα στα συστατικά χουμουλόνη και λουπολόνη στα οποία ο έλεγχος γίνεται επίσης μέσω του ποσοστού επιτυχίας εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών DPPH και μείωσης της λιπιδικής υπεροξειδωσης. (Karabin et al, 2015; Karabin et al., 2016)

1.4.2. Ορμονική Δράση

Πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν εισάγει την διερεύνηση της ορμονικής δραστηριότητας του λυκίσκου στην ευρύτερη ανίχνευση των ευεργετικών δράσεων που μπορούν να αποδοθούν στα επιμέρους συστατικά και κατ' επέκταση στη χρήση του φυτού. Αρχικά, φαίνεται πως η συγκεκριμένη δράση αποδίδεται στις ουσίες ισοξανθοουμόλη, 8 και 6-πρενυλναρινγενίνη οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των πρενυλιωμένων φλαβονοειδών του λυκίσκου και προέρχονται από τις ενώσεις ξανθοουμόλη και δεσμεθυλοξανθοουμόλη, αντίστοιχα.



Σχήμα 1.4. Η μετατροπή των ουσιών ξανθοουμόλη και δεσ-μέθυλο-ξανθοουμόλης στα παράγωγά τους.

Ως ορμονική, χαρακτηρίζεται η δράση εκείνη η οποία ομοιάζει τη δράση της 17β-εστραδιόλης, η οποία χαρακτηρίζεται ως το πρωταρχικό οιστρογόνο του ανθρώπινου οργανισμού. Οι ουσίες εκείνες, οι οποίες εμφανίζουν το παραπάνω χαρακτηριστικό και ταυτόχρονα απομονώνονται από τους φυτικούς οργανισμούς ονομάζονται φυτοοιστρογόνα.

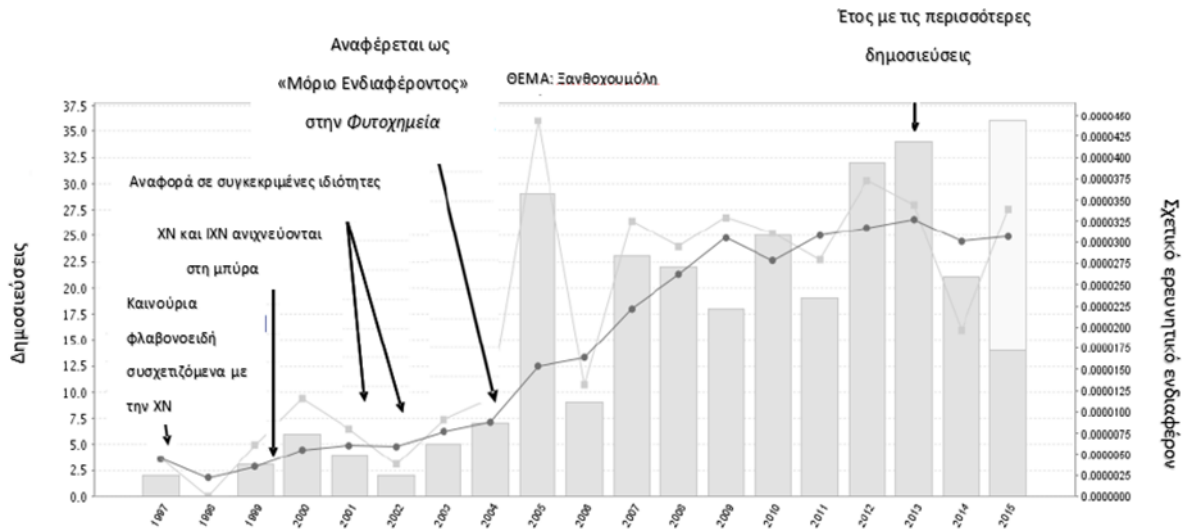
Η ορμονική ικανότητα ανάγεται, συμπερασματικά, στην ικανότητα των δραστικών ουσιών να συνδέονται, δρώντας ως προσδέματα, στους οιστρογονικούς υποδοχείς, αντικαθιστώντας με αυτό τον τρόπο τον υπάρχοντα ή εκλιπόντα φυσιολογικό οιστρογονικό παράγοντα του εκάστοτε οργανισμού. Με αυτό τον τρόπο είναι εύκολα κατανοητή η ευνοϊκή επίδραση που δύνανται να εμφανίσουν εν λόγω συστατικά σε

περιπτώσεις οργανισμών που εμφανίζουν οποιαδήποτε παθολογία ή νόσο με αποτέλεσμα την έλλειψη, ανεπάρκεια ή δυσλειτουργία οιστρογόνων.

Σε παλαιότερες καταγραφές των χωρών όπου παραδοσιακά καλλιεργούνταν το είδος λυκίσκου *Humulus lupulus*, πέραν των διαφόρων χρήσεων που αποσκοπούσαν στην ενίσχυση των θηλυκών ορμονών σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (λουτρά λυκίσκου, χρήση ειδών αισθητικής και κοσμητολογίας με βάση το λυκίσκο) καταγράφεται και ο λαϊκός μύθος που θέλει την έναρξη του έμμηνου κύκλου να τοποθετείται δύο μέρες μετά την επαφή της γυναίκας με το φυτό, γεγονός που προέκυψε από την αντίστοιχη επίδραση που φαίνεται πως είχε στις συλλέκτριες μετά τη συγκομιδή. (Chadwick et al., 2006)

Η ορμονική επίδραση των φυτοοιστρογόνων αφορά κατά κύριο λόγο άτομα τα οποία βρίσκονται σε ορμονική θεραπεία όπως γυναίκες μετεμμηνοπαυσιακής ηλικίας και μετεγχειρητικούς ασθενείς (στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού ή άλλων γυναικολογικών οργάνων). Η συμβολή τους φαίνεται πως είναι αρκετά εμφανής στην καταπολέμηση των συμπτωμάτων των ανωτέρω παθολογιών χαρακτηρίζονται ως αγγειοκινητικά και εκδηλώνονται ως διαταραχές ύπνου, κόπωση, νυχτερινή εφίδρωση και έξαψη (απότομη αίσθηση αυξημένης θερμοκρασίας). Τις παραπάνω εκδηλώσεις καλείται να αντιμετωπίσει περίπου το 50-80% των γυναικών μέσης ηλικίας ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη οποιασδήποτε σχετικής παθολογίας και επιδρούν σημαντικά στην ποιότητα ζωής εκείνων. Επιπλέον, φαίνεται πως η Θεραπεία Ορμονικής Αποκατάστασης (HRT-Hormone Replacement Therapy), η οποία αποτελεί θεραπεία εκλογής στις παραπάνω περιπτώσεις, σχετίζεται θετικά με αύξηση του κινδύνου θνητότητας και θνησιμότητας, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στη γνωσιακή λειτουργία και στον οστικό μεταβολισμό. (Karabin et al., 2015; Abdi, Mobedi & Roozbeh, 2016)

Η επιτυχία των μελετών στη διερεύνηση της ιδιότητας αυτής, μέσα από την ανάλυση των συστατικών τα οποία σχετίζονται με αυτήν, οδήγησε στην εντατικοποίηση των μελετών και στην απότομη αύξηση του ερευνητικού ενδιαφέροντος, όπως φαίνεται στην αντίστοιχη στατιστική παράθεση των Mudura & Coldea, 2015.



Γράφημα 1.1. Συγκριτική απεικόνιση των δημοσιεύσεων σχετικά με το πρενυλιωμένο φλαβονοειδές ξανθοχουμόλη και τα παράγωγα αυτού, ανά έτος, σύμφωνα με τις Mudura & Coldea, 2015.

1.4.3. Καταπραϋντική Δράση

Μια πρόσθετη λειτουργία που συζητείται έντονα σχετικά με τη χρήση του λυκίσκου είναι η ηρεμιστική-καταπραϋντική δράση η οποία συσχετίζεται με την καταπολέμηση της κατάθλιψης και του άγχους. Από τη μία πλευρά, η συσχέτιση αυτή φαίνεται πως προέρχεται από την ισχυρή παρουσία, στο αιθέριο έλαιο του λυκίσκου, ενός από τα φυσικά προϊόντα με τον αντίστοιχο χαρακτήρα. Ο λόγος εμπίπτει στο βαλερικό οξύ, ένα από τα σημαντικότερα δραστικά συστατικά του φυτικού είδους *Valeriana officinalis*, το οποίο εμφανίζει την καταπραϋντική ως κατ' εξοχήν φαρμακευτική ιδιότητα. (Chadwick et al., 2006; Negri, Di Santi & Tabach, 2010).

Ωστόσο, η ιδιότητα αυτή διερευνάται πρόσφατα και σε συνάρτηση με την παρουσία ενός άλλου συστατικού το οποίο είναι παράγωγο της οξειδωτικής υποβάθμισης των α-οξέων των ρητινών λυκίσκου, την 2-μεθυλο-3-βουτεν-2-όλη. (Zanoli et al, 2005; Butterweck et al. 2006)

Έτσι, φαίνεται πως ο λυκίσκος αυξάνει στην δραστηριότητα του νευροδιαβιβαστή γ-αμινο-βουτυρικού οξέος (GABA), διαμέσου της ενίσχυσης της προσδεσιμότητάς του με τους αντίστοιχους εγκεφαλικούς υποδοχείς. Επιπλέον, ο λυκίσκος καλείται πως επηρεάζει και τα επίπεδα της σεροτονίνης, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη

ρύθμιση του ύπνου και με τη σειρά της βελτιώνει την ορμόνη μελατονίνη, η οποία σχετίζεται άμεσα με τους κικάρδιους ρυθμούς. Ο μηχανισμός αυτός υποστηρίζεται και από τους Butterweck et al., (2006), οι οποίοι αποδεικνύουν την υποθερμική επίδραση του λυκίσκου σε επίμυες και συσχετίζουν την επίδραση αυτή στην εσωτερική θερμοκρασία των οργανισμών με την υποβοήθηση της δραστηριότητας της μελατονίνης και συνεπώς του ύπνου, καθώς δρουν ανταγωνιστικά της λουζινδόλης, ενός αγωνιστή των υποδοχέων μελατονίνης. (Butterweck et al. 2006)

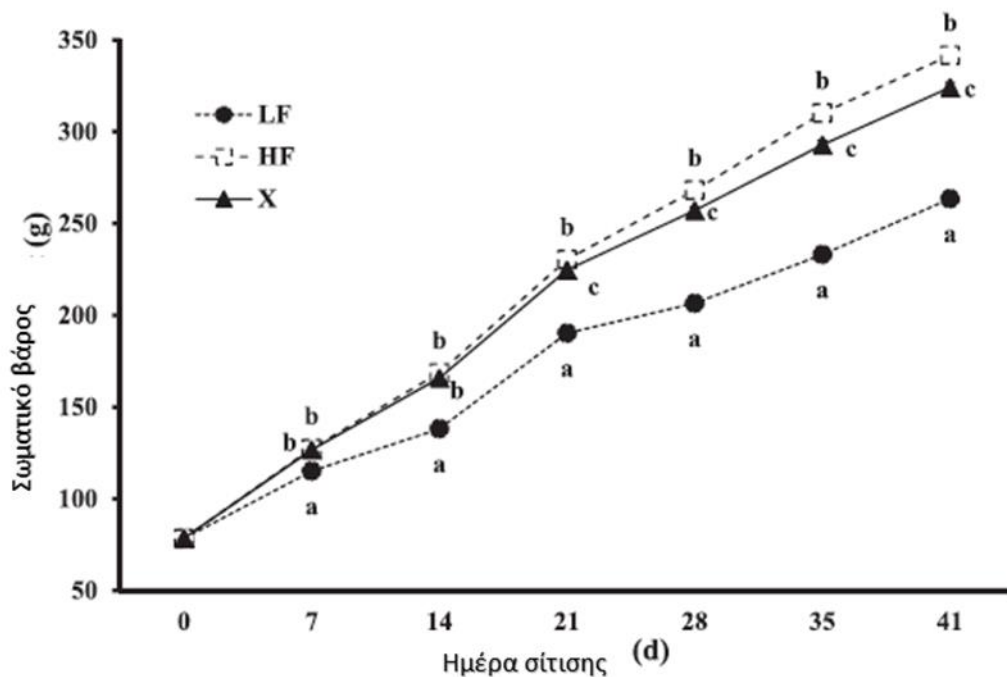
Σε κλινική δοκιμή του 2012 από τους Franco et al., μελετήθηκε η επίδραση της κατανάλωσης μπίρας χωρίς αλκοόλ σε ομάδα νοσηλευτών η οποία χαρακτηρίστηκε ως υψηλού εργασιακού στρες. Πριν τη μελέτη εκτιμήθηκε η ποιότητα του ύπνου των υποκειμένων του δείγματος καθώς και η διάρκεια σε ώρες και η αντιλαμβανόμενη ικανοποίηση/ξεκούραση. Η χορήγηση διήρκεσε 2 εβδομάδες κατά τις οποίες η ομάδα της μελέτης κατανάλωσε 330mL μπίρας μηδενικών αλκοολικών βαθμών σε καθημερινή βάση. Τα αποτελέσματα επέδειξαν μείωση των επιπέδων στρες στην ομάδα μελέτης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, μέσα από επιμέρους μετρήσεις που αφορούσαν την δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του ύπνου (μέτρηση κινητικότητας και καρδιακού παλμού) όπως και τον χρόνο που χρειάστηκαν τα άτομα πριν αποκοιμηθούν, δείκτες που σχετίζονται με την τελική ποιότητα του ύπνου. (Franco et al., 2012)

Σε μελέτη που δημοσιεύεται το 2014 οι Hejazian, Bagheri & Dashti, μελετούν την καταπραϋντική δράση του λυκίσκου ως εκδήλωση της σπασμολυτικής ιδιότητας σε επίμυες, στον ειλεό των οποίων έχει προκληθεί μέγιστη μυϊκή σύσπαση κατόπιν χορήγησης ακέτυλο-χολίνης. Σε αυτή τη μελέτη, όπως και οι Zanolli et al., (2005), οι ερευνητές επιλέγουν τη χορήγηση εκχυλίσματος λυκίσκου, στο οποίο και αποδίδουν τη συσχέτιση με την σπασμολυτική δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα του εντερικού τοιχώματος. Σε δεύτερο επίπεδο, όπως και σε προγενέστερες μελέτες, συζητείται η ενίσχυση της ευαισθησίας των υποδοχέων GABA ως μηχανισμός που εμπλέκεται στην παραπάνω διαδικασία. (Hejazian, Bagheri & Dashti, 2014)

Μένοντας στο γαστρεντερικό σύστημα και σε συνδυασμό με την αντιμικροβιακή δράση την οποία επιδεικνύει ο λυκίσκος όπως τα περισσότερα φυτικά είδη, οι Čermák et al., μελέτησαν την επίδραση του φρέσκου λυκίσκου στην καταπολέμηση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού. (Čermák et al., 2015)

1.4.4. Επίδραση στον λιπιδικό μεταβολισμό

Μια πολύ ενδιαφέρουσα δράση η οποία φαίνεται να αφορά εντοπισμένα την ξανθοχουμόλη, μία από τις σημαντικότερες ουσίες που απομονώνονται από το λυκίσκο και μελετήθηκε νωρίτερα για την οιστρογονική της δράση, είναι εκείνη που εμπλέκει το υπό μελέτη φυτό με τον μεταβολισμό των λιποειδών. Το φαινόμενο μελετήθηκε το 2014, από τους Kazuki et al., σε επίμυες. Η δοκιμή έγινε σε τρεις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε χαμηλή σε λίπος διαίτα (LF-Low Fat), υψηλή σε λίπος διαίτα (HF-High Fat), και υψηλή σε λίπος συνδυασμένη με χορήγηση 1% συμπληρώματος λυκίσκου υψηλού σε ξανθοχουμόλη (X) για 41 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερο σωματικό βάρος στις 2 περιπτώσεις χορήγησης υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος διαίτας, με εκείνη που συμπληρώθηκε από χορήγηση λυκίσκου να εμφανίζει μείωση του βάρους στα μισά της μελέτης και να εξακολουθεί μείωση ως το τέλος εκείνης. Συνολικά, οι επίμυες που καταλάωναν συμπλήρωμα είχαν μικρότερο σε βάρος μεσεντερικό λευκό λιπώδη ιστό σε σχέση με εκείνους που έλαβαν υψηλή σε λίπος διαίτα χωρίς το συμπλήρωμα και το μικρότερο σε βάρος ήπαρ σε σύγκριση με όλες τις ομάδες.



Γράφημα 1.2. Διαγραμματική μεταβολή του βάρους στις τρεις ομάδες της δοκιμής ως προς τη μεταβολή του χρόνου της μελέτης.

Ενώ η διαφορά τόσο της ολικής χοληστερόλης όσο και της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) του πλάσματος μεταξύ των δύο ομάδων πρόσληψης υψηλής σε λίπος δίαιτας δεν επιδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά, φαίνεται ότι στην περίπτωση της χορήγησης συμπληρώματος λυκίσκου, η συγκέντρωση τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα όπως και τριγλυκεριδίων στο ήπαρ είναι σημαντικά χαμηλότερη. Στην περίπτωση και πάλι αυτής της ομάδας, σημειώθηκαν αρκετά συχνότερες κενώσεις οι οποίες φάνηκε μάλιστα να έχουν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση σε τριακυλογλυκερόλες, κάτι που από τους ερευνητές συνδέεται με πιθανή παρεμπόδιση της δράσης της παγκρεατικής λιπάσης στο λεπτό έντερο, δράση που ομοιάζει εκείνη της κατεχίνης του τσαγιού. Όπως όλες οι φαινόλες, η χορήγηση ξανθοχουμόλης φάνηκε επίσης να καταστέλλει την δραστηριότητα της συνθάσης λιπαρών οξέων και της διυδρογόνωσης της 6- φώσφογλυκόζης, ένζυμα που δρουν υποστηρικτικά στον λιπιδικό μεταβολισμό. Τέλος, η χορήγηση συμπληρώματος λυκίσκου έδειξε αύξηση της αδιπνεκτίνης η οποία βελτιώνει την ευαισθησία του ήπατος και των σκελετικών μυών στην ινσουλίνη και συνεπώς προάγει αντίστοιχα την οξειδωση του λίπους. (Kazuki et al, 2014)

Η μελέτη συνεχίστηκε την ίδια χρονιά από τους Kiyofuji et al., σε επίπεδο επίδρασης του συμπληρώματος σε πρόδρομα των λιποειδικών κυττάρων, κύτταρα, των οποίων η δημιουργία φάνηκε να περιορίζεται μέσω ελέγχου της κυτταρικής διαφοροποίησης. (Kiyofuji et al., 2014)

1.4.5. Άλλες δράσεις

Σε μελέτη τους το 2011 οι Sharouri R & Rahnama M., μελετώντας την αντιμικροβιακή δράση του υδατικού, αιθανολικού και αλκοολικού εκχυλίσματος λυκίσκου έναντι των παθογόνων *Brucella abortus* και *Brucella melitensis*, γνωστούς για την πρόκληση μιας από τις σημαντικότερες νόσους των ζώων, της βρουκέλλωσης (μελιταίος πυρετός), αναλύουν τη θετική επίδραση των παρασκευασμάτων λυκίσκου στην καταστολή της ζώνης ανάπτυξης των μικροοργανισμών και συζητούν την χρήση του λυκίσκου στη συντήρηση τροφίμων. Επίσης, κρίνοντας ως ισχυρή τη δραστηριότητα των συστατικών του, και δεδομένου ότι οι μικροοργανισμοί του γένους *Brucella* χρησιμοποιούν τα μακροφάγα, κύτταρα άμυνας τα οποία ενεργοποιούνται στον οργανισμό μετά την έκθεση στον μικροβιακό παράγοντα, για να μεταφερθούν στους λεμφαδένες των οργανισμών, διερευνούν παράλληλα την επίδρασή του εκχυλίσματος σε αυτά, και τελικά απορρίπτουν τα εκχυλίσματα υψηλών συγκεντρώσεων (1:10, 1:20), προτείνοντας εκείνες του 1:40 και

1:80 ως τις ιδανικότερες για την εκμετάλλευση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του φυτού. (Sharouri & Rahnama, 2011)

Την ευεργετική δράση των συστατικών του λυκίσκου και συγκεκριμένα των πρενυλιωμένων φλαβονοειδών, υποστηρίζουν σε παλαιότερη μελέτη το 2000, οι Miranda et al. Η υπόθεση βασίζεται σε δύο επιμέρους δεδομένα. Από τη μία πλευρά, οι ετεροκυκλικές αμίνες αποτελούν ένα από τα πιο ισχυρά μεταλλαξιογόνα που έχουν βρεθεί στα επεξεργασμένα τρόφιμα και ενεργοποιούνται μεταβολικά μέσω της δράσης των παραγόντων CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 του κυτοχρώματος P450. Από την άλλη πλευρά, αρκετές φλαβονόνες και χαλκόνες οι οποίες εμφανίζουν στη δομή τους την πρενυλ- ή γερανυλ- ομάδα, δρουν ως αναστολείς έκφρασης των μεταβολικών ενζύμων των παραγόντων αυτών με αποτέλεσμα την αποτροπή της έκφρασης της μεταλλαξιογούς και καρκινογούς ιδιότητας των ετεροκυκλικών αμινών. (Miranda et. al, 2000)

1.5. Η διαδικασία της ζυθοποίησης

Ο ζύθος παράγεται από τέσσερα βασικά συστατικά: την βύνη, τον λυκίσκο, τις ζύμες του παρασκευαστή και το νερό. Μέσα από την διαφοροποίηση στην εφαρμογή και αλληλεπίδραση των παραπάνω συστατικών, οι ζυθοποιοί μπορούν να αναπτύξουν σε ποικίλα επίπεδα τη γεύση, το χρώμα, το άρωμα και την περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε αλκοόλη, συμβάλλοντας έτσι καθοριστικά τόσο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου, όσο και στην σύνθεσή του σε μικρότερης συγκέντρωσης ενώσεις όπως οι βιταμίνες, τα μέταλλα, τα αμινοξέα, τα σάκχαρα και οι πολυφαινόλες. Η βύνη κατασκευάζεται από την κατάλληλη επεξεργασία διαφόρων σιτηρών με ευρύτερη τη χρήση του κριθαριού. Ο αντικειμενικός σκοπός της βυνοποίησης είναι η βιοσύνθεση του ενζυμικού φορτίου το οποίο είναι απαραίτητο για την υδρόλυση των μακρομοριακών ενώσεων των δημητριακών που χρησιμοποιούνται ως βάση της βύνης, σε απλούστερες όπως είναι τα σάκχαρα μαλτόζη και γλυκόζη αλλά και τα αμινοξέα, τα μεταλλικά άλατα και οι βιταμίνες. Ειδικότερες κατηγορίες βύνης χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της βιοτεχνολογικής ανάπτυξης των προϊόντων ζυθοποιίας με σκοπό την παραγωγή ιδιαίτερων τύπων ζύθου. Η ανάμιξη με χλωρή βύνη αποδίδει συγκεκριμένη γεύση και άρωμα. Η καραμελοποιημένη βύνη περιέχει βιοδραστικές ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες προστατεύουν τον ζύθο ενάντια στις οξειδωτικές αντιδράσεις. Θεωρείται επίσης πως στην περίπτωση αυτή η βύνη περιέχει ουσίες οι οποίες αποτρέπουν την ισομερίωση της ξανθοχουμόλης σε ισοξανθοχουμόλη κατά τη διάρκεια

βρασμού του ζυθογλεύκου και αυξάνουν με αυτό τον τρόπο την εκχύλιση των πρενυλιωμένων φλαβονοειδών από τον λυκίσκο. (Mudura & Coldea, 2015)

1.5.1. Τα πέλλετ λυκίσκου

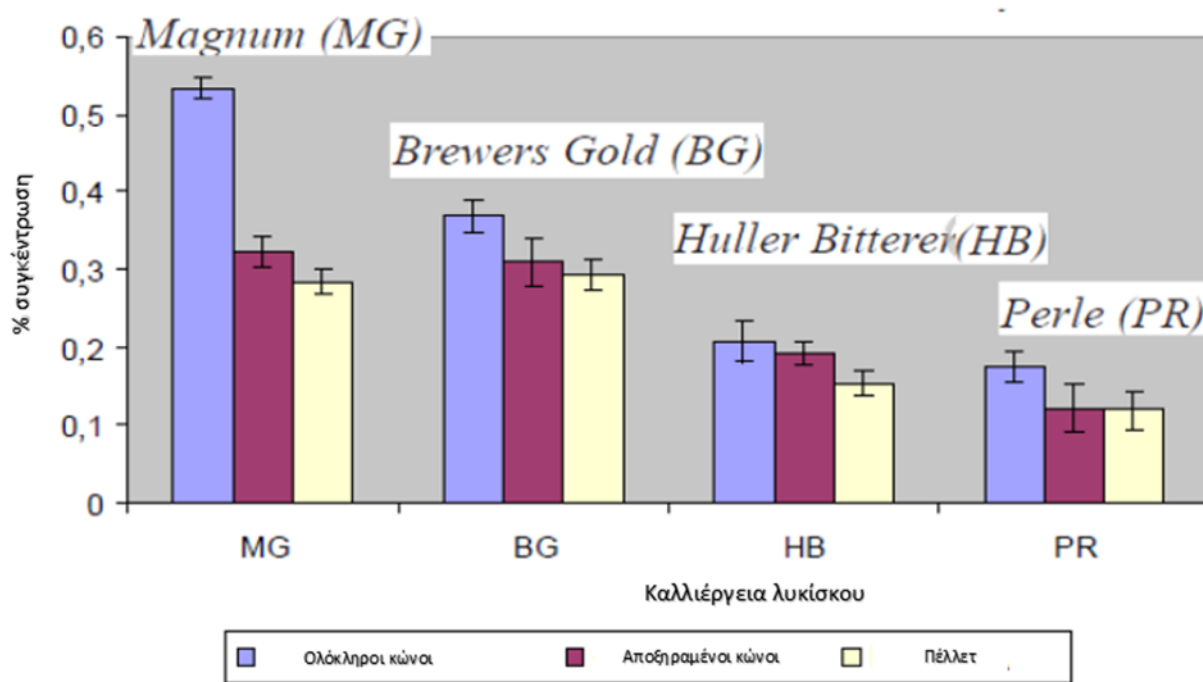
Ο λυκίσκος χρησιμοποιείται στη διαδικασία της ζυθοποίησης με τη μορφή προϊόντων του φυτικού υλικού και με συνηθέστερες εκείνες του πέλλετ και του εκχυλίσματος. Όπως έχει αναφερθεί το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιείται ως αρωματική ύλη για τον παραγόμενο ζύθο είναι ο θηλυκός κώνος. Σε αυτόν απαντώνται οι κίτρινοι λουπουλινικοί αδένες, οι οποίοι αντιστοιχούν στον ενδοκρινή παράγοντα όπου παράγονται οι σκληρές και μαλακές ρητίνες όπως επίσης και το αιθέριο έλαιο. Η μαλακές ρητίνες (υψηλό περιεχόμενο σε α και β οξέα) είναι εκείνες που προσδίδουν στο ζύθο την χαρακτηριστική πικρή γεύση ενώ το έλαιο (φαινολικά συστατικά) αποδίδει το άρωμα και τη γεύση του λυκίσκου.

Τα πέλλετ παράγονται με την κονιορτοποίηση των αποξηραμένων κώνων και συμπίεση του θρυμματισμένου υλικού προς σχηματισμό μικρών κυλινδρικών δισκίων. Τα πέλλετ τύπου P90 και τα εμπλουτισμένα πέλλετ τύπου P45, εμφανίζουν τη διαφοροποίηση ότι λόγω αφαίρεσης τμήματος του φυτικού μέρους, η περιεκτικότητά τους σε α -οξέα είναι υψηλότερη. Οι μαλακές ρητίνες μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε διαφορετικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα με σκοπό την απόκτηση διαλύματος υψηλής περιεκτικότητας σε α , β -οξέα και άλλες μαλακές ρητίνες. Από τη άλλη, οι πολυφαινόλες του λυκίσκου, βρίσκονται κατά βάση στα φύλλα του κώνου και έχουν υδατοδιαλυτές ιδιότητες. Τα πέλλετ P45, παράγονται μέσω διαχωρισμού των φύλλων από την λουπουλίνη. Αποτέλεσμα αυτού είναι η απώλεια του μεγαλύτερου μέρους της λουπουλίνης. Η ανάκτηση των δραστικών ουσιών γίνεται μέσω του εμπλουτισμού τους με ξανθοχουμόλη, η οποία είναι το βασικότερο πρενυλιωμένο φλαβονοειδές που συναντάται στους λουπουλινικούς αδένες του φυτού και είναι διαλυτό σε αιθανόλη. (Mudura & Coldea, 2015)

Πίνακας 1.2. %αποκατάσταση των πολυφαινόλων και της ξανθοχουμόλης στα προϊόντα λυκίσκου ως %ποσοστό σε συσχέτιση με τον νωπό λυκίσκο κατά τους A.Forster και A.Koberlein. (Mudura & Coldea, 2015)

%αποκατάσταση ως %ποσοστό σε συσχέτιση με τον νωπό λυκίσκο		
	Πολυφαινόλες	Ξανθοχουμόλη
Πέλλετ 90	100	±100
Πέλλετ 45	≥50-95	±95
Αιθανολικό Εκχύλισμα	≤5	±90
Εκχύλισμα με διοξείδιο του άνθρακα	0	≤5

Παρακάτω αποτυπώνεται γραφικά η διαφορά της συγκέντρωσης ξανθοχουμόλης μεταξύ του νωπού, αποξηραμένου λυκίσκου και των πέλλετ λυκίσκου σε 4 διαφορετικές ποικιλίες φυτών που καλλιεργούνται στη Ρουμανία, όπως καταγράφεται από τους Mudura & Coldea το 2015.



Γράφημα 1.3. Η επί τοις εκατό συγκέντρωση της ξανθοχουμόλης μεταξύ νωπού, ξηρού και πεπτιεσμένου ξηρού υλικού λυκίσκου. (Mudura & Coldea, 2015)

Όπως φαίνεται, τα υψηλότερα ποσοστά της ξανθοχουμόλης, αντιστοιχούν στο νωπό φυτικό υλικό λυκίσκου, το οποίο είναι και λιγότερο επεξεργασμένο σε σχέση με το

αντίστοιχο αποξηραμένο ή ξηρό και πεπιεσμένο (πέλλετ) με εμφανείς ποσοτικές διαφορές μεταξύ των επιμέρους ποικιλιών. Η εμπλοκή του φυτού στη διαδικασία της επεξεργασίας επιδρά σημαντικά στη μείωση της συγκέντρωσης του συστατικού λόγω της υψηλής ευαισθησίας αυτού στις ακραίες θερμοκρασιακές μεταβάσεις, οι οποίες προκαλούν ισομερίωση. Οι συγγραφείς αναφέρουν επίσης, πως οι αναφερόμενες συγκεντρώσεις των φυτών που μελετήθηκαν δεν διαφέρουν σε μεγάλο ποσοστό, παρά μόνο κατά 0,2-1,2%, σε σχέση με τις ανάλογές τους, οι οποίες καλλιεργούνται στη Γερμανία.

1.5.2. Η Επίδραση της επεξεργασίας στην σύσταση του λυκίσκου

Κατά τη διαδικασία της ζυθοποίησης, ο λυκίσκος γίνεται υποκείμενο πολλών φυσικών και χημικών διεργασιών με αποτέλεσμα να το προφίλ των δραστικών συστατικών του να υφίσταται μεγάλες τροποποιήσεις. Οι επιμέρους αλλαγές οφείλονται τόσο σε οξειδωτικές όσο και σε αντιοξειδωτικές αντιδράσεις, ενώ η έκθεση της πρώτης ύλης στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο, ή η συμμετοχή της στις αντιδράσεις Fenton's, Haber-Weiss και Maillard οδηγούν στη δημιουργία προ-οξειδωτικών προϊόντων. Βασικό ρόλο έναντι των οξειδωτικών διαδικασιών παίζουν τα κυριότερα αντιοξειδωτικά συστατικά του λυκίσκου, όπως οι πολυφαινόλες, τα φαινολικά οξέα και τα πικρά οξέα, καταστέλλοντας την δημιουργία ριζών, μέχρι εξάντλησης των ποσοστών που ενέχει το δείγμα. Η διαδικασία αυτή γίνεται εμφανής καθώς τα στάδια βρασμού στα οποία δεν έχει προηγηθεί προσθήκη λυκίσκου φαίνεται πως εμπεριέχουν εξαιρετικά μεγαλύτερο ποσοστό ριζών σε σύγκριση με μεταγενέστερα στάδια στα οποία το φυτικό υλικό έχει ήδη προστεθεί. Συμπληρωματικά, η διατήρηση του μείγματος της ζυθοποίησης σε υψηλές θερμοκρασίες μετά τη διαδικασία του βρασμού, φαίνεται πως μειώνει τόσο την ένταση της γεύσης όσο και τη σταθεροποίηση του αφρού του τελικού προϊόντος. Βασικός ρόλος στη συγκεκριμένη διαδικασία αποδίδεται αφενός στο προ-οξειδωτικούς παράγοντες που στην περίπτωση αυτή αυξάνονται αναλογικά αλλά και στην αποσύνθεση, από την άλλη πλευρά, των πολυφαινολών και φαινολικών οξέων τα οποία, όπως προαναφέρθηκε, δρουν ενάντια των οξειδωτικών στοιχείων. Όπως είναι φυσικό, ο σχηματισμός και η πυκνότητα των οξειδωμένων παραπροϊόντων σχετίζεται τόσο με την ένταση της θερμοκρασίας όσο και με τον χρόνο για τον οποίο αυτή εφαρμόζεται στο μείγμα, κάνοντας έτσι το στάδιο του βρασμού ένα ιδιαίτερα απαιτητικό τεχνολογικά κομμάτι της παραγωγής, στις περιπτώσεις βέβαια όπου το ενδιαφέρον του παραγωγού έγκειται στη

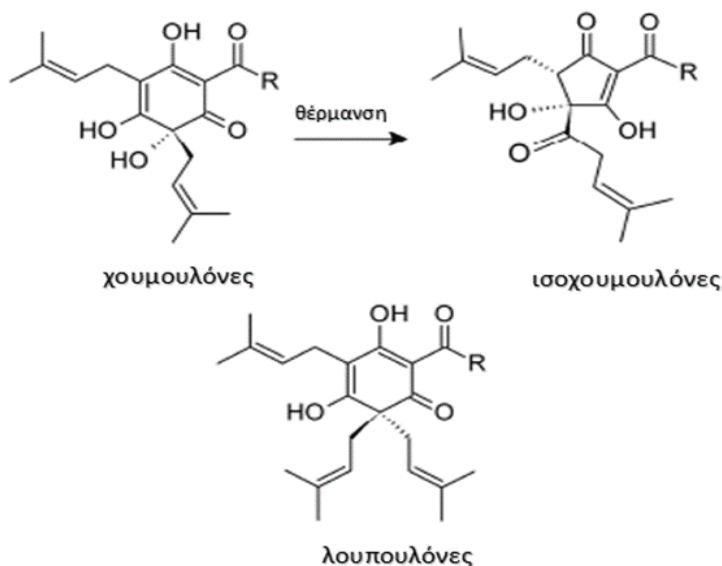
σύσταση του τελικού προϊόντος ως βασικό μέρος της ποιότητας αυτού σε συνδυασμό με τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Σημαντική θετική επίδραση κατά των οξειδωτικών μέσων αποδίδεται και στα ένζυμα καταλάση και δισμουτάση του σουπεροξειδίου, τα οποία αφενός επηρεάζουν θετικά την αναστολή σχηματισμού ριζών στο προϊόν και αφετέρου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε εκφυλισμό κατά την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες.

Συγκεκριμένα, το φλαβονοειδές ξανθοχουμόλη, λόγω της αυξημένης ευαισθησίας του στις θερμοκρασιακές μεταβολές αλλά και την απορρόφησή του από τα κύτταρα των ζυμών που λειτουργούν εντατικά κατά τη διαδικασία παραγωγής του γλεύκους, φαίνεται πως μειώνεται δραστικά με αποτέλεσμα να εμφανίζεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο τελικό προϊόν, ειδικά στην περίπτωση των συμβατικών ζύθων. Όπως είναι λογικό, με αυτό τον τρόπο όλες οι θετικές συσχετίσεις που γίνονται βιβλιογραφικά και σχετίζονται με το συστατικό αυτό, παύουν να έχουν την ίδια βαρύτητα.

Είναι γνωστό, επίσης, ότι κατά τη διαδικασία της ζυθοποίησης τα α -οξέα ισομεριώνονται προς ισο- α -οξέα με την αλλαγή αυτή να επέρχεται κατά τη διαδικασία του βρασμού του γλεύκους. Η ισομερίωση έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της αντιοξειδωτικής ικανότητας των α -οξέων και μάλιστα τη δημιουργία προ οξειδωτικών παραγώγων καθώς τα ισο- α -οξέα δρώντας σαν δότες ηλεκτρονίων συμβάλλουν στη δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου και συμμετέχουν στις επιμέρους αντιδράσεις που έχουν αναφερθεί βοηθώντας τον περαιτέρω σχηματισμό ριζών.

Σύμφωνα με τους Wietstock και συν. η χρήση εκχυλίσματος λυκίσκου με πικρά οξέα και μηδενικό (CO_2 -εκχύλισμα) ή πικρά οξέα και χαμηλό (αιθανολικό εκχύλισμα) ποσοστό πολυφαινολών ή πέλλετ με πικρά οξέα και υψηλό ποσοστό πολυφαινολών (type 90 hop pellets), εμφάνισαν αποτελέσματα όμοια με εκείνα που αναμέναμε λόγω της θεωρητικής βάσης των συστατικών του λυκίσκου. Συγκεκριμένα, σημειώθηκε σημαντική καταστολή της δράσης και του σχηματισμού ριζών κατά τη διαδικασία βρασμού του ζυθογλεύκους τόσο στο χρονικό σημείο εισαγωγής του λυκίσκου στο μείγμα όσο και καθ' όλη τη διαδικασία του βρασμού. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δεν εντοπίστηκαν ποσοτικού τύπου διαφοροποιήσεις στη δράση μεταξύ των διαφορετικών προϊόντων λυκίσκου που ελέγχθηκαν. Ωστόσο, εναλλαγές ικανότητας αποδόθηκαν λόγω της διαφοράς τους στη σύσταση σε πολυφαινόλες, μέσω της δοκιμασίας DPPH. Ο σχηματισμός ριζών τόσο ως μεμονωμένο γεγονός όσο και ως κομμάτι της οξειδωτικής διαδικασίας που επέρχεται στον ζύθο κατά την παραγωγή του ή την ωρίμανση του δίνει οργανοληπτικά το στίγμα του στον ζύθο αλλοιώνοντας τα αρώματα και την γευστικότητα που φυσιολογικά του αποδίδει ο λυκίσκος. Μπορεί επίσης να αναφερθεί ότι μπίρες στις οποίες προκαλείται

ωρίμανση και στις οποίες δεν έχει προστεθεί λυκίσκος εντοπίζονται ανεπιθύμητες αλδεΐδες όπως η 2 και 3 μεθυλ-βουτανάλη, στις οποίες και αποδίδεται η πρόκληση διαδικασιών «πρώρης γήρανσης» του ζύθου. Η μεταβολή αυτή που παρατηρείται στον ζύθο και τα αντίστοιχα προϊόντα, επέρχεται λόγω των συνθηκών και κυρίως λόγω της θερμοκρασίας αποθήκευσης του τελικού προϊόντος, ενώ μια ακόμα ουσία που χρησιμοποιείται σαν χημικός δείκτης αλλοίωσης λόγω γήρατος είναι η 2-φουρφουράλη. Τα στοιχεία αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς επιδεικνύουν την ικανότητα των δραστικών συστατικών του λυκίσκου στα οποία αποδίδεται αντιοξειδωτικός χαρακτήρας, να διατηρούν τη συμπεριφορά τους έναντι των οξειδωτικών παραγόντων ακόμα και στη φάση της ωρίμανσης ή και σε περίπτωση κακής διαχείρισης των θερμοκρασιών μεταφορά και αποθήκευσης του προϊόντος. (Wietstock et al, 2010; Mudura & Coldea, 2015)



Σχήμα 1.5. Ισομερίωση των α-οξέων (Χουμουλόνες) προς ισο-α-οξέα (Ισο-χουμουλόνες) μετά από εφαρμογή θέρμανσης.

R: n-(CH₂CH(CH₃)₂), co-(CH₂CH₃)₂, ad-(CH(CH₃)CH₂CH₃)

(Wietstock et al, 2010)

1.5.3. Αύξηση συγκέντρωσης πρενυλιωμένων φλαβονοειδών στη μπίρα

Η αύξηση της συγκέντρωσης των πρενυλιωμένων φλαβονοειδών στο τελικό προϊόν της ζυθοποίησης, μπορεί να επιτευχθεί μέσα από την εφαρμογή τεχνολογικών μέσων στα επιμέρους στάδια παραγωγής. Με αυτό τον τρόπο, οι ευεργετικές φαρμακολογικές επιδράσεις που η επιστημονική κοινότητα καλείται να αποδείξει, θα γίνουν περισσότερο εμφανείς και αντικειμενικά υπαρκτές, στο προϊόν το οποίο αποτελεί την αμεσότερη και πιο διαδεδομένη μορφή με την οποία ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή με τον λυκίσκο, την μπίρα. Στην μελέτη τους σχετικά με τη σημασία των πρενυλιωμένων φλαβονοειδών στην τεχνολογία της ζυθοποίησης το 2015, οι Mudura & Coldea προτείνουν τους παρακάτω τρόπους για τη διεκπεραίωση του σκοπού αυτού.

1. Η προσθήκη του λυκίσκου πρέπει να γίνεται σταδιακά, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διαδικασία του βρασμού έτσι ώστε η τελευταία δόση να τοποθετείται 10 λεπτά πριν το τέλος αυτού. Στη συνέχεια, το μείγμα πρέπει να ψυχρανθεί στους 80°C, με σκοπό την αποτροπή της ισομερίωσης της ξανθοχουμόλης.

2. Επειδή η σύσταση και συγκέντρωση του ζυθογλεύκου επηρεάζουν την εκχύλιση και ισομερίωση της ξανθοχουμόλης, διαδικασίες οι οποίες συνδέονται με αντιστρόφως ανάλογο τρόπο, οι ερευνητές προτείνουν τη χρήση γλεύκου 14-16°P με σκοπό τη μέγιστη απόδοση. Επίσης, κατά την παραγωγή του γλεύκου, προτείνουν τη χρήση χρωματισμένης βύνης η οποία φέρεται πως περιέχει ουσίες που δρουν ανασταλτικά της διαδικασίας ισομερίωσης.

3. Η ισομερίωση των πρενυλιωμένων φλαβονοειδών σε γενικό πλαίσιο μπορεί να κατασταλλεί και μέσω της μείωσης του pH κατά το βρασμό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί διαμέσου της χρήσης βύνης καραμέλας. (Mudura & Coldea, 2015)

1.6. Η θεωρητική βάση της πειραματικής διαδικασίας

Η μελέτη των δειγμάτων λυκίσκου βασίστηκε στον ποιοτικό προσδιορισμό των βιοδραστικών συστατικών του αιθερίου ελαίου και του εκχυλίσματος, τα οποία παρασκευάστηκαν έχοντας ως πρώτη ύλη πεπιεσμένο φυτικό υλικό (πέλλετ) τριών διαφορετικών ποικιλιών. Όπως θα αναλυθεί στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας, Τα αιθέριο έλαιο και τα εκχυλίσματα που παρελήφθησαν αναλύθηκαν με την εφαρμογή των μεθόδων αέριας και υγρής χρωματογραφίας αντίστοιχα. Παρακάτω θα

δοθούν μερικές βασικές πληροφορίες των μεθόδων και των τεχνικών που εφαρμόστηκαν.

1.6.1. Χρωματογραφικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών των αιθερίων ελαίων λυκίσκου με τη χρήση αέριας χρωματογραφία και φασματομέτρου μάζας (GC-MS)

Το αιθέριο έλαιο του λυκίσκου αποδίδει στον ζύθο χαρακτηριστικά που θυμίζουν το άρωμα λουλουδιών, φρούτων, ξύλου, βοτάνων και μπαχαρικών. Σε γενικές γραμμές, η απόδοση των αποξηραμένων κώνων των κοινών εμπορικών ποικιλιών σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται από 0,5 ως 3% με κυρίαρχες ομάδες ενώσεων τις αλκοόλες, αλδεΐδες, εστέρες, τερπένια, καρβοξυλικά οξέα και κετόνες. Η περιεκτικότητα του κάθε λυκίσκου στις ενώσεις αυτές είναι η παράμετρος εκείνη η οποία καθορίζει τελικά γευστικά και αρωματικά, τη χροιά που προσδίδει το φυτικό αυτό υλικό στον ζύθο. Έτσι, οι εστέρες και κετόνες αποδίδουν τα φρουτώδη αρώματα, οι αλκοόλες τα αρώματα που θυμίζουν άνθη και τα τερπένια εκείνα που ομοιάζουν την οσμή μπαχαρικών, βοτάνων και ξύλου. (Salanta et al,2015)

Ανάμεσα στις ενώσεις που αναμένονται στα δείγματα λυκίσκου που θα αναλυθούν παρακάτω είναι το α -χουμουλένιο, β -καρυοφυλλένιο και β -φαρνεσένιο, καθώς η παρουσία αυτών συνδέεται με την πιο χαρακτηριστική οσμή λυκίσκου, ενώ συγκεκριμένα αναφέρεται το άρωμα που αποδίδει το β -φαρνεσένιο ως ρητινώδες, πράσινο, που ομοιάζει το άρωμα του βαλσάμικο και του φρέσκου λυκίσκου. (Ligor et al., 2014)

Όπως θα περιγραφεί παρακάτω, στην πειραματική διαδικασία, η ανάλυση του αιθερίου ελαίου των τριών δειγμάτων λυκίσκου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αέριου χρωματογράφου συνδεδεμένου με φασματομέτρο μάζας. Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας βασίζεται στον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματα που εισάγεται στη στήλη με τη βοήθεια ενός αδρανούς, καθαρού από προσμίξεις φέροντος αερίου. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό. Το φέρον αέριο δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, για αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται.

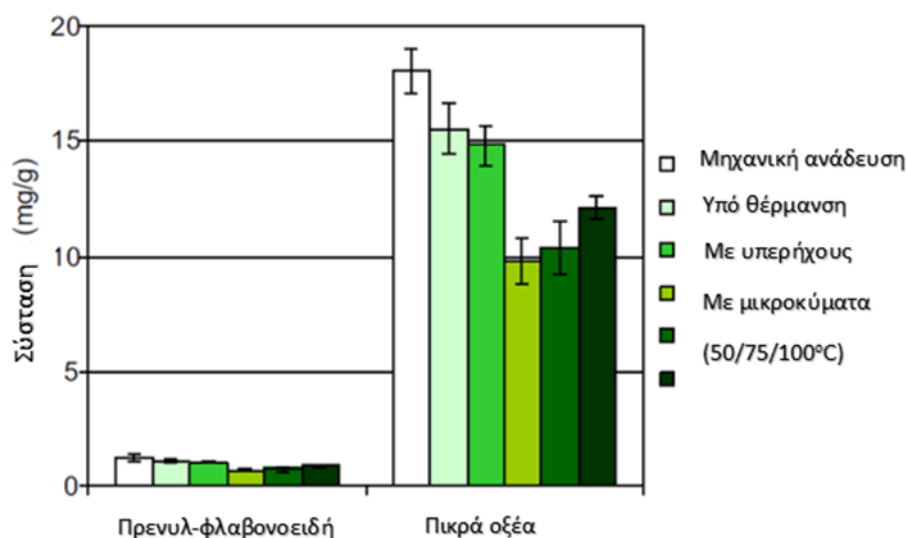
Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη χρήση φασματομέτρου μαζών ως ανιχνευτή. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα μόρια της ουσίας που αναλύεται στο φασματομέτρο μαζών βομβαρδίζονται με μια δέσμη ηλεκτρονίων και αποκτούν φορτίο. Τα ιόντα που προκύπτουν, ταξινομούνται με βάση τη μάζα τους και καταγράφονται ως ένα φάσμα. Η σχετική πληθώρα ιόντων διαφορετικών μαζών είναι, υπό συγκεκριμένες συνθήκες πειραματισμού, χαρακτηριστικό γνώρισμα της ένωσης και είναι γνωστή ως «μοτίβο θραυσματοποίησης» ή φάσμα μαζών. Στο παράρτημα 2 παρατίθενται μεταξύ άλλων και τα θραύσματα μάζας τα οποία αποκτήθηκαν μετά την ανάλυση υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας, από το δείγμα 1 (Lublin).

1.6.2. Χρωματογραφικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων λυκίσκου με τη χρήση υγρής χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (HPLC-DAD)

Ακολουθώντας την ανάλυση του αιθερίου ελαίου, η μελέτη των βιοδραστικών συστατικών του λυκίσκου επικεντρώνεται στις σκληρές και μαλακές ρητίνες, στις οποίες ανιχνεύονται τα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή και τα α και β οξέα, αντίστοιχα. Οι σκληρές ρητίνες λυκίσκου είναι αδιάλυτες στο εξάνιο, συντίθενται από τα προϊόντα οξειδωσης των μαλακών ρητινών και παράγονται κατά τις διαδικασίες ωρίμανσης, επεξεργασίας μετά τη συγκομιδή και αποθήκευσης των κώνων. Το βασικότερο συστατικό των φυσικών σκληρών ρητινών είναι η ξανθοχουμόλη. Οι μαλακές ρητίνες είναι διαλυτές στο εξάνιο και αποτελούν τον φυσικό τόπο των α -οξέων (χουμουλόνες) και β -οξέων (λουπουλόνες) σε ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ του 2-17% και 2-10%, αντίστοιχα, στους αποξηραμένους στροβίλους (θηλυκοί κώνοι). (Olsovska et al., 2006; Oladokun, Smart & Cook, 2016)

Με σκοπό τη μελέτη των παραπάνω συστατικών, οι Prencipe et al., το 2014 μελέτησαν 33 δείγματα θηλυκών κώνων λυκίσκου, ανάμεσα στους οποίους οι 10 προέρχονταν από εμπορικές καλλιέργειες διαφόρων χωρών και οι 23 από άγριους γενοτύπους της Ιταλίας. Στην συγκεκριμένη μελέτη έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της μεθόδου διαχωρισμού μέσα από τη σύγκριση των τεσσάρων επικρατέστερων τύπων εκχύλισης που εφαρμόζονται σε ερευνητικό επίπεδο στα πλαίσια της μελέτης του λυκίσκου αλλά και των χρωματογραφικών συνθηκών. Οι προτεινόμενες εκχυλίσεις περιλαμβάνουν την εκχύλιση με ανάδευση, με μικροκύματα, με υπερήχους και με εφαρμογή θερμότητας. Στην παρούσα μελέτη και όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια εφαρμόστηκε η τεχνική της εκχύλισης με ανάδευση κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε η

μεθανόλη ως διαλύτης. Λόγω της διαφοράς των πρενυλιωμένων φλαβονοειδών και των πικρών οξέων του λυκίσκου, οι αλκοόλες, και κυρίως η μεθανόλη και αιθανόλη, προτείνονται ως οι διαλύτες εκλογής για την εκχύλιση του λυκίσκου. Ταυτόχρονα, η χρήση του φορμικού οξέος σε μικρό ποσοστό ως μέρος του διαλύτη εκχύλισης θεωρείται βοηθητική για την μείωση του βαθμού υποβάθμισης και της διαδικασίας ισομερίωσης των πρενυλιωμένων χαλκονών. Στο γράφημα που ακολουθεί παρατίθεται η σύγκριση διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης ως προς την απόδοση (περιεκτικότητα εκφρασμένη σε mg/g) σε πρενυλιωμένα φλαβονοειδή και πικρά οξέα.



Γράφημα 1.4. Σύγκριση διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης ως προς την απόδοση σε πρενυλιωμένα φλαβονοειδή και πικρά οξέα λυκίσκου. (Prencipe et al., 2014)

Η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC), χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια με αυξανόμενο ρυθμό στο πεδίο της ανάλυσης των τροφίμων με σκοπό τον διαχωρισμό και την ανίχνευση πρόσθετων, μολυσματικών ουσιών αλλά και νέων συστατικών, ειδικά στο επίπεδο των φαρμακευτικών φυτών. Η μέθοδος βασίζεται στον κατακερματισμό των περίπλοκων μειγμάτων σε μεμονωμένες ενώσεις οι οποίες με τη σειρά τους προσδιορίζονται ποιοτικά και ποσοτικά από τους κατάλληλους ανιχνευτές και τα ανάλογα συστήματα επεξεργασίας δεδομένων. Καθώς ο διαχωρισμός και η ανίχνευση αποτελούν διαδικασίες οι οποίες πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία ελαφρώς υψηλότερη από την θερμοκρασία περιβάλλοντος, η μέθοδος αυτή αποτελεί μέθοδο εκλογής για ουσίες περιορισμένης θερμικής σταθερότητας. Επίσης, η δυνατότητα της τοποθέτησης μεγάλου μεγέθους δείγματος (έως 1–2 ml ανά ένεση) καθιστά την ανάλυση HPLC ιδιαίτερα ευαίσθητη. Η Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό

με τεχνικές μη καταστρεπτικής ανίχνευσης δίνουν τη δυνατότητα στον αναλυτή να επανασυλλέξει τα κλάσματα που προκύπτουν, προς περαιτέρω ανάλυση. Τέλος, η ποικιλία των τεχνικών ανίχνευσης έκανε την σύγχρονη ανάλυση όχι μόνο περισσότερο ευαίσθητη, αλλά και περισσότερο εκλεκτική σε επίπεδο ενώσεων.

Κατά τη λειτουργία του ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος ένα αχρωματικό σύστημα φακών συγκεντρώνει το πολυχρωματικό φως από το δευτέριο και τις λάμπες βολφραμίου, στο ρέον υγρό. Το φως έπειτα διαχέεται στην διαθλαστική επιφάνεια και καταλήγει σε μια συστοιχία φωτοδιόδων. Το εύρος ανίχνευσης διαφέρει μεταξύ των μηχανημάτων, με ένα γενικό εύρος να αναφέρεται μεταξύ των 190 και 950nm.

Λόγω της πολυπλοκότητας των δειγμάτων που γίνονται αντικείμενο μελέτης στην επιστήμη των τροφίμων, η μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα μείωσης των σφαλμάτων ποσοτικού προσδιορισμού μέσω του ελέγχου της καθαρότητας των κορυφών. Συνηθέστερα, γι' αυτό τον σκοπό γίνεται καταγραφή και σύγκριση διαφόρων φασμάτων που αποκτώνται στις κορυφές έκλουσης. Τα φάσματα κανονικοποιούνται και τοποθετούνται επικαλύπτοντας το ένα το άλλο με σκοπό να εκτιμηθούν υπολογιστικά μέσω του συστήματος ανίχνευσης ή και με γυμνό οφθαλμό. Η εγκαθίδρυση βιβλιοθήκης φασμάτων κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της μεθόδου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των κορυφών. Τα φάσματα των αναλυτών μπορούν σε κάθε περίπτωση να συγκριθούν με εκείνα που έχουν συνθέσει τη βιβλιοθήκη δεδομένων, αυτόματα ή χειροκίνητα, μετά από κάθε ένεση.

Θετικό στοιχείο της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα επίτευξης της μέγιστης καθαρότητας κορυφής, η ανίχνευση σε πολλαπλά μήκη κύματος, η απόκτηση των φασμάτων απορρόφησης και η ευκολία αναζήτησης στις βιβλιοθήκες των φασμάτων.

Από την άλλη, η μέθοδος υστερεί σε σχέση με την ηλεκτροχημική ανίχνευση και την ανίχνευση φθορισμού σε επίπεδο ευαισθησίας.

ΜΕΡΟΣ Β.
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

2.1 Σκοπός και Αντικείμενο του πειράματος

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής ερευνητικής εργασίας είναι η ποιοτική χημική ανάλυση τριών διαφορετικών δειγμάτων αποξηραμένου φυτικού υλικού του είδους *Humulus lupulus* (Λυκίσκος) και η σύγκριση της σύστασης αυτών σε δραστικά συστατικά, τόσο σε επίπεδο αιθερίου ελαίου όσο και σε επίπεδο αποξηραμένου φυτικού υλικού, το οποίο παρελήφθη με την μορφή πέλλετ από την Αθηναϊκή Ζυθοποιία.

Έναυσμα για την πραγματοποίηση της μελέτης αποτέλεσε το γεγονός ότι παρόλο το έντονο ενδιαφέρον που εμφανίζεται βιβλιογραφικά σχετικά με το συγκεκριμένο φυτικό είδος λόγω των σημαντικών θεραπευτικών δράσεων που πιθανολογούνται για τα επιμέρους δραστικά συστατικά του, στην πλειοψηφία των συγγραμμάτων, η καταγραφή των συστατικών δεν είναι πλήρης. Αντιθέτως, οι περισσότερες ερευνητικές εργασίες, επιλέγουν την τμηματική μελέτη συγκεκριμένων ενώσεων και των ιδιοτήτων αυτών, με τη σχετική αναφορά των ομάδων των λοιπών ουσιών χωρίς να αναφέρονται αναλυτικά και ποσοστιαία οι συστάσεις των δειγμάτων σε αυτά, παρά την χρήση μεθόδων που παρέχουν τέτοιου είδους συμπεράσματα.

Στην μελέτη των φυσικών προϊόντων, η στοχοθέτηση των πειραμάτων φαίνεται πως καθορίζει σημαντικά την επιτυχία των μελετών για την εξαγωγή καινούργιων συμπερασμάτων σχετικά με την χρησιμότητα κάποιου είδους ή δραστικού συστατικού σε επιστημονικό επίπεδο. Η αναγνώριση συγκεκριμένων ενώσεων, τις οποίες μπορούμε να απομονώσουμε από τους φυτικούς οργανισμούς και η εντατικοποίηση της μελέτης της χρήσης τους ως αντικατάστατα μη φυσικών, τεχνητών ουσιών και πρόσθετων στην βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων, ανοίγει ένα μεγάλο πεδίο έρευνας και ανάπτυξης που δύναται να φέρει σημαντικές αλλαγές τόσο σε επίπεδο πρόληψης, όσο και θεραπείας ή αποτροπής εκδήλωσης παθολογιών με τις μικρότερες αρνητικές συνέπειες στον άνθρωπο και το περιβάλλον.

Ταυτόχρονα, στα πλαίσια της εντατικοποίησης της παραγωγής και πώλησης προϊόντων που βασίζονται σε αυτό το σκεπτικό, η επιστημονική μελέτη φέρει μεγάλη ευθύνη για την εξαγωγή αντικειμενικών συμπερασμάτων με αναφορές ακριβείς και ολοκληρωμένες. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί και η ουσιαστικότητα της ανάλυσης των φυτικών υλών, ως πρωταρχικό μέλημα των ερευνητών, καθώς με αυτό τον τρόπο σκιαγραφείται το χημικό προφίλ των ειδών και έπειτα είναι δυνατή η επιμέρους

μελέτη κάθε συστατικού, όχι ως μοναδική οντότητα, μα ως μέρος του συνόλου των συστατικών, περισσότερο ή λιγότερο δραστικών.

2.2. Επιλογή και Παραλαβή των δειγμάτων

Η παραλαβή των δειγμάτων λυκίσκου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς την παρούσας ερευνητικής εργασίας, έγινε σε συνεργασία με την Αθηναϊκή Ζυθοποιία. Βασικός προμηθευτής της βιομηχανίας παραγωγής ζύθου είναι η εταιρία Barth-Haas Group με έδρα τη Νυρεμβέργη της Γερμανίας.

Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με βάση την ευρύτητα της χρήσης τους στην παραγωγή των προϊόντων της συγκεκριμένης βιομηχανίας. Οι ποικιλίες που αναλύθηκαν σε επίπεδο αιθερίου ελαίου και ξηράς δρόγης είναι οι: Lublin, Bobek και Aurora και η μορφή στην οποία παρελήφθησαν ήταν αποξηραμένο πεπτιεσμένο υλικό σε πεπλατυσμένους κυλίνδρους (pellet).

Στο παράρτημα 1 παρατίθενται οι συστηματικές πληροφορίες ταξινόμησης και εμπορικής χρήσης των ποικιλιών Lublin και Aurora, σύμφωνα με το υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης των ΗΠΑ (USDA) και ακολουθούν (παράρτημα 2) τα αντίστοιχα φύλλα εμπορικής περιγραφής των προϊόντων pellet P45 Bobek, P90 Lublin και P90 Aurora.

2.2.1. Εμπορικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων

Όπως παρατηρείται με βάση την εμπορική καταγραφή του USDA (αναλυτικός πίνακας στο παράρτημα 1), η οποία λειτουργεί ως παγκόσμιο πρότυπο των καλλιεργειών για τα περισσότερα φυτικά είδη, οι καλλιέργειες Bobek και Aurora αποτελούν εμπορικές καλλιέργειες και δεν υπάρχουν περιορισμοί στη διαθεσιμότητα και τη χρήση τους. Τα στοιχεία και οι αναλύσεις που αναφέρονται, αφορούν την καλλιέργεια με ριζώματα και στις δύο περιπτώσεις. Επίσης, η προέλευσή τους φαίνεται πως είναι κοινή, καθώς η πρώτη επίσημη καταγραφή των ποικιλιών αυτών έγινε από τον Dr Tone Wagner στην σημερινή Σλοβενία (πρώην Γιουγκοσλαβία) και περί τα μέσα της δεκαετίας του 1970. Σε επίπεδο φαινοτύπου, η ποικιλία Bobek εμφανίζει φύλλα χρώματος σκούρου πράσινου και κώνους μικρού προς ελαφρώς μεσαίου μεγέθους, γεγονός που καθιστά τη συγκομιδή τους ευκολότερη σε σχέση με άλλες ποικιλίες. Η ανθεκτικότητα των ποικιλιών αυτών σε ιούς δεν αναφέρεται πιθανά λόγω της απουσίας ομοιογένειας των αποτελεσμάτων. Η ποικιλία Bobek χαρακτηρίζεται ανθεκτική έναντι της βερτισιλίωσης

και μετρίως ανθεκτική έναντι του περονόσπορου. Όσο αφορά στην καλλιεργητική απόδοση των δύο καλλιεργειών, η ποικιλία Auora εμφανίζει καλή προς πολύ καλή απόδοση σε αντίθεση με την ποικιλία Bobek η οποία χαρακτηρίζεται από φτωχή αποδοτικότητα που αναφέρεται περί τις 800 λίβρες/στρέμμα ή 363 περίπου κιλά/στρέμμα.

Σημαντικότερο στοιχείο το οποίο θα μπορούμε στη διαδικασία να αναλύσουμε συγκριτικά στη συνέχεια της μελέτης, αποτελεί η εκτιμώμενη περιεκτικότητα σε α και β οξέα. Στην περίπτωση της ποικιλίας Bobek, η μέση περιεκτικότητα σε α -οξέα αναγράφεται περί του 8,1% με το 10ετές εύρος να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9,3%, ενώ σε β -οξέα, στο 5% με το 10ετές εύρος μεταξύ του 4 και 6,6%. Από την άλλη πλευρά, η ποικιλία Auora εμφανίζει σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε α -οξέα (10-12%) και παρόμοια περιεκτικότητα σε β -οξέα (5%).

Σε επίπεδο αιθερίου ελαίου οι τιμές είναι 1,4mL/100g αποξηραμένου φυτικού υλικού και 1,1-1,8mL/100g αντίστοιχα, στις δυο ποικιλίες, με το 10ετές εύρος να αναφέρεται στην περίπτωση της ποικιλίας Bobek ως 0,82-2,67mL/100g. Σημαντικός στη σύσταση του αιθερίου ελαίου είναι και ο λόγος της περιεκτικότητας σε χουμουλένιο προς την αντίστοιχη του καρυοφυλλενίου, ο οποίος στην περίπτωση της καλλιέργειας Auora είναι υψηλότερος υποδεικνύοντας μεγαλύτερα ποσοστά χουμουλενίου.

Όσο αφορά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, και οι δύο ποικιλίες φέρονται να ομοιάζουν τους ευρωπαϊκούς αρωματικούς λυκίσκους, αποδίδοντας ευχάριστο άρωμα στο παραγόμενο προϊόν, με τη διαφορά πως η ποικιλία Auora εμφανίζεται αρκετά πλουσιότερη σε α -οξέα και περισσότερο σταθερή ποιοτικά σε περίπτωση μακροχρόνιας αποθήκευσης. Συγκεκριμένα, η ανάλυση της σύστασης του υλικού μετά από αποθήκευση διάρκειας 6 μηνών σε θερμοκρασία δωματίου δείχνει πως το 70-75% των α -οξέων παραμένει όπως στο αρχικό υλικό. Το χαρακτηριστικό αυτό αναφέρεται ελαφρώς ηπιότερο στην καλλιέργεια Bobek (66% των αρχικών α -οξέων) χωρίς ωστόσο να απορρίπτεται η ικανότητά συντήρησης του για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

Link: <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/2450/hopcultivars/21239.html>

2.3. Μελέτη του αιθερίου ελαίου Λυκίσκου

2.3.1. Προκατεργασία του δείγματος και Παραλαβή του αιθερίου ελαίου

Η πειραματική διαδικασία της παρούσας μελέτης ξεκίνησε με την κονιορτοποίηση των πέλλετ λυκίσκου των προαναφερθέντων ποικιλιών (Lublin, Bobek, Aurora) και την ζύγιση 50g από το κάθε δείγμα. Σε πρώτο στάδιο, το υλικό που παρελήφθη (3 είδη πέλλετ λυκίσκου), υπέστη απόσταξη με υδρατμούς, μέσω της ίδιας διαδικασίας, και στα τρία δείγματα λυκίσκου, η οποία επαναλήφθηκε τρεις φορές και καταγράφεται στη συνέχεια. Τα 50g από κάθε κονιορτοποιημένο δείγμα τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φυάλη με θερμομανδύα. Ακολούθησε απόσταξη με υδρατμούς με τη χρήση συσκευής Clevenger. Ο συνολικός χρόνος της απόσταξης ήταν 3,5 ώρες για κάθε δείγμα. Ακολούθησε εκχύλιση του προϊόντος της απόσταξης με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης και την προσθήκη διαιθυλαιθέρα 1:1. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε 3 φορές σε κάθε δείγμα. Για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου, εφαρμόστηκε ροή αζώτου στην οργανική φάση με σκοπό την εξάτμιση του αιθέρα. Στο τέλος προστέθηκε μικρή ποσότητα άνυδρου θειϊκού νατρίου ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία και το τελικό προϊόν προσαρμόστηκε στα 5mL. Οι ποσότητες των αιθερίων ελαίων που παρελήφθησαν είναι 0,1 mL, 0,2 και 0,4 mL για τις ποικιλίες Lublin, Bobek και Aurora, αντίστοιχα. Ανάγοντας την ποσότητα αυτή στα αρχικά 50g δείγματος, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις είναι 0,2, 0,4 και 0,8% στα 100g δείγματος.

2.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών του αιθερίου ελαίου

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών του αιθερίου ελαίου που παρελήφθη από τα τρία διαφορετικά δείγματα πέλλετ λυκίσκου έγινε με τη χρήση της μεθόδου της αέριου χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματογραφία μάζας (GC-MS). Η θερμοκρασία στο σημείο εισαγωγής ήταν 220°C ενώ στο σημείο μεταφοράς στον ανιχνευτή, 290°C (transfer line). Βάσει του προγράμματος που εφαρμόστηκε, η διαδικασία ξεκίνησε σε θερμοκρασία 60°C και ανέβαινε κατά 3°C ανά λεπτό έως τους 240°C, με τον συνολικό χρόνο ανάλυσης να φτάνει τα 70 λεπτά.

2.4. Μελέτη των εκχυλισμάτων Λυκίσκου

2.4.1. Παραλαβή των πολυφαινολών και των ρητινών Λυκίσκου

Πριν την εφαρμογή του χρωματογραφικού προσδιορισμού, το δείγμα εκχυλίστηκε με μεθανόλη και φορμικό οξύ. Για την εκχύλιση, παρελήφθησαν 5g κονιορτοποιημένου αποξηραμένου υλικού μορφής pellet και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη, όπου προστέθηκαν 100mL διαλύτη. Ο διαλύτης ήταν μείγμα μεθανόλης και φορμικού οξέος (99:1). Ακολούθησε μηχανική ανάδευση με μαγνητικό αναμίκτη (magnetic stirring) για 30 λεπτά στις 250 στροφές. Έπειτα, το μείγμα διηθήθηκε με χωνί Buchner και το διήθημα επανεκχυλίστηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε συνολικά 3 φορές. Το σύνολο του διηθήματος τοποθετήθηκε σε φυγόκεντρο στις 8000 στροφές για 15 λεπτά και το υπερκείμενο που παρελήφθη, τοποθετήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator). Η μέθοδος βασίστηκε στην μελέτη των Prencipe et al., το 2014 και η τεχνική εκχύλισης επιλέχτηκε ως η πιο αποδοτική με βάση τα συγκριτικά δεδομένα των παραπάνω ερευνητών.

2.4.2. Ποιοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών του εκχυλίσματος λυκίσκου τριών διαφορετικών ποικιλιών

Μετά την παραλαβή του συμπυκνωμένου υλικού, ακολούθησε η προετοιμασία των τελικών δειγμάτων που εμπρόκειτο να υποτεθούν σε χρωματογραφικό προσδιορισμό. Γι' αυτό τον σκοπό, ζυγίστηκαν 10mg από το κάθε συμπυκνωμένο δείγμα σε γυάλινο δοχείο (vial), στο οποίο προστέθηκαν 2mL διαλύματος H₂O (HPLC grade) με ACN, 1:1, αντίστοιχα. Κάθε μείγμα τοποθετήθηκε για ανάδευση σε λουτρό υπερήχων και στη συνέχεια φιλτραρίστηκε, με τη χρήση ειδικού φίλτρου. Οι τελική συγκέντρωση και στα 3 εκχυλίσματα λυκίσκου ήταν 5mg/mL.

Ο χρωματογραφικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων λυκίσκου τα οποία προετοιμάστηκαν όπως προαναφέρθηκε, με την πρώτη ύλη να προέρχεται από τρεις ευρέως χρησιμοποιούμενες εμπορικές ποικιλίες του φυτού, πραγματοποιήθηκε σε συσκευή HPLC Agilent 1100 Series και το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε βασίστηκε στην μελέτη των Prencipe et al., το 2014. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν C18 25cm και η κινητή φάση αποτελούνταν από 0,25% HCOOH σε 400mL H₂O (A) και 400mL ACN (B), (δηλαδή ποσότητα 100μL σε κάθε διαλύτη) και η διαδικασία έκλουσης είχε ως εξής: 0.00min έως 41.25min από 35% B σε 75% B, από

41.25 έως 82.50min από 75% B σε 100% B το οποίο διατηρήθηκε ως τον χρόνο 92.81. Συνολικά η διαδικασία για κάθε ένεση/δείγμα διήρκεσε 120 λεπτά, μαζί με τα 30 λεπτά εξισορρόπησης της στατικής φάσης. Ο ρυθμός ροής ήταν 0,95mL/min, η πίεση που εφαρμόστηκε ήταν 98bar και ο όγκος κάθε ένεσης, 20μL. Ακολουθώντας τη μελέτη των Prencipe et al., παρελήφθησαν χρωματογραφήματα στα 290, 330 και 370nm για την ταυτοποίηση των πρενυλιωμένων φλαβονονών, πικρών οξέων και πρενυλιωμένων χαλκονών, αντίστοιχα.

2.5 Περαιτέρω Ποιοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών του εκχυλίσματος λυκίσκου της ποικιλίας Lublin με την εφαρμογή της μεθόδου LC-MS

2.5.1. Εφαρμογή της μεθόδου LC-MS σε ένα εκ των υπό μελέτη δειγμάτων (ποικιλία Lublin)

Το εκχύλισμα του δείγματος Lublin, το οποίο αναλύθηκε νωρίτερα, έγινε αντικείμενο περαιτέρω ανάλυσης (LC-MS) με σκοπό την ταυτοποίηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων με εκείνα των Prencipe et al., 2014.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος LC-DAD/MS της SHIMADZU, το οποίο αποτελείται από Αντλία LC-10ADvp, Απαιρωτή DGU-14A, Βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών FCV-10ALvp, Αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADvp, Φούρνο στήλης CTO-10Avp, Ανιχνευτή SPD-M10Avp, Φασματογράφο μάζας LC-MS 2010A, Μονάδα ελέγχου SCL-10Avp και Λογισμικό LCMS solution 3.40.307. Την στατική φάση αποτέλεσε η στήλη αντίστροφης φάσης, Supelco Discovery HS C18, μήκους 25cm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6mm και με μέγεθος σωματιδίων 5μm. Κατά τη διαδικασία της ανάλυσης η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 35°C. Η κινητή φάση συνίστατο από A= 0,25 % φορμικό οξύ σε νερό και B= 0,25% φορμικό οξύ σε ακετονιτρίλιο. Εφαρμόστηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης το οποίο είχε ως εξής:

Πίνακας 2.1. Το πρόγραμμα έκλουσης που εφαρμόστηκε στην ανάλυση LC-MS

Χρόνος (min)	% A	% B
0	35	65
41,25	25	75

82,50	0	100
92,81	0	100
93	35	65
103	35	65

Ο όγκος ένεσης του δείγματος ήταν 20μL ενώ η ροή ρυθμίστηκε σε επίπεδο 0,95 mL/min. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis) μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (DAD), με το φάσμα UV-Vis να λαμβάνεται σε εύρος 200-700nm, και το μήκος κύματος εργασίας να εφαρμόζεται στα 290, 330 και 370nm. Παρακάτω αναφέρονται οι συνθήκες λειτουργίας του φασματόμετρου μάζας απλού τετράπολου:

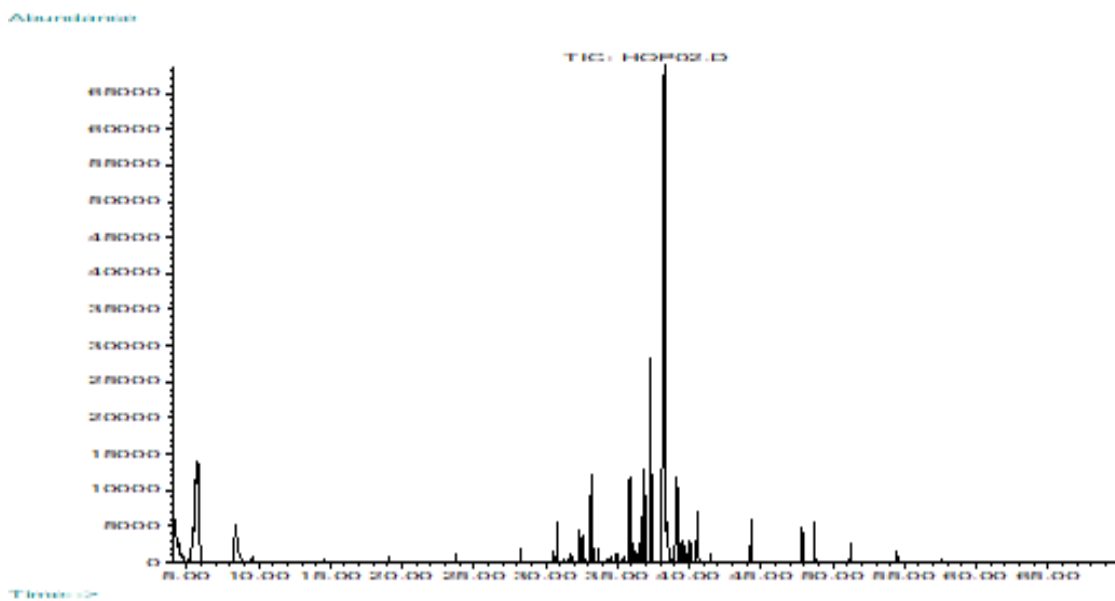
Πίνακας 2.2. Συνθήκες λειτουργίας MS

Κατάσταση Ιονισμού θετική	ESI (+) SCAN
Αρχική m/z	100
Τελική m/z	850
Ταχύτητα ανίχνευσης	4000amu/sec
Χρόνος ένεσης	0,2sec
Ροή αερίου εκνέφωσης	1,5L/min
Θερμοκρασία ελέγχου θερμότητας	200 °C
Θερμοκρασία CDL	300 °C
Δυναμικό πηγής ιονισμού	4,5kV
Δυναμικό ανιχνευτή	1,85 kV

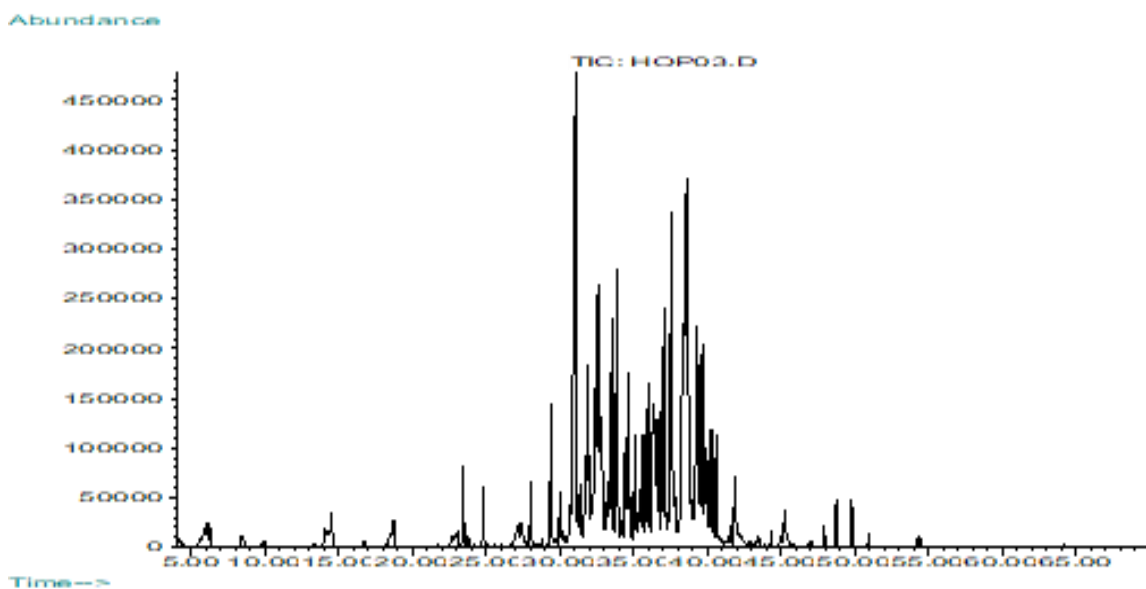
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Συγκριτική ανάλυση των αιθερίων ελαίων τριών διαφορετικών ποικιλιών Λυκίσκου

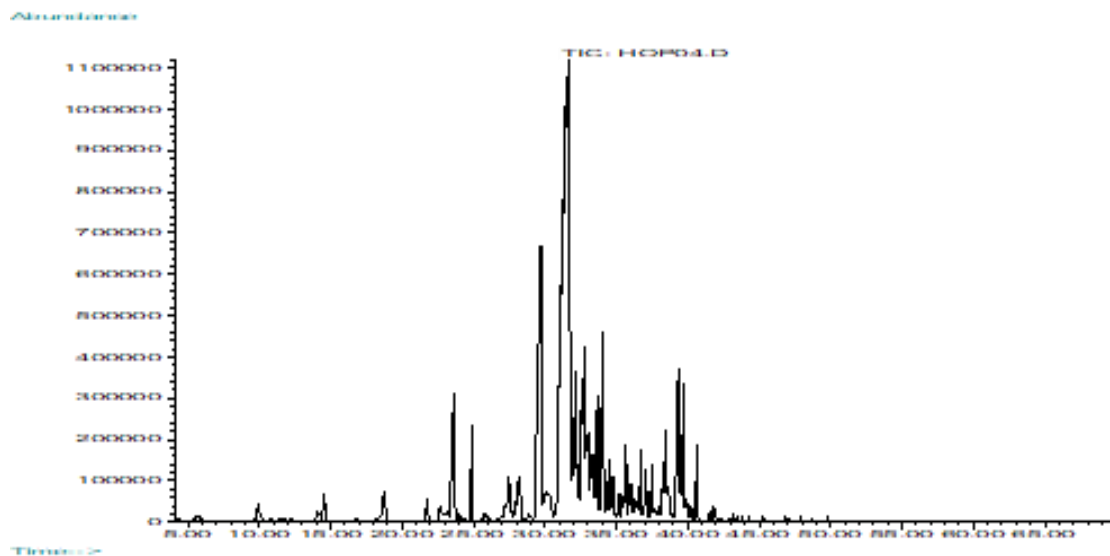
Στη συνέχεια παρατίθενται τα χρωματογράφημα των τριών ποικιλιών (Lublin, Bobek, Auropa) μετά την αέρια χρωματογραφική ανάλυση.



Σχήμα 3.1. Χρωματογράφημα GC, ποικιλία Lublin



Σχήμα 3.2. Χρωματογράφημα GC, ποικιλία Bobek



Σχήμα 3.3. Χρωματογράφημα GC, ποικιλία Aurora

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφεται το σύνολο των χημικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στις ποικιλίες Lublin, Bobek και Aurora εκφραζόμενες ως ποσοστά επί τοις εκατό του δείγματος. Επίσης αναφέρεται ο χρόνος συγκράτησης ή κατακράτησης (RT- Retention Time) στη στήλη της χρωματογραφίας, δείκτης ένδειξης που συνέβαλλε στην ταυτοποίηση των ουσιών, όπως και η σταθερά Kovats (KI- Kovats Index), όπου αυτό ήταν δυνατό. Η διαδικασία της ταυτοποίησης έγινε μετά την ολοκλήρωση της χρωματογραφίας σε συνεργασία με το αντίστοιχο υπολογιστικό πρόγραμμα και σε σύγκριση των βιβλιοθηκών αναγνώρισης Adams, Wiley 275 και Nist 98. Ο προσδιορισμός που ακολουθεί δεν είναι ποσοτικός, λόγω απουσίας προτύπων ουσιών, αλλά σχετικός γι' αυτό και τα νούμερα που ακολουθούν αποτελούν ποσοστά % του συνόλου όπως προαναφέρθηκε.

ΟΝΟΜΑ	RT	KI	HOP1 - LUBLIN	HOP2 - BOBEK	HOP3 - AURORA
3- Μεθυλοβουτανοϊκό οξύ	5.55		-	-	0,1
Ισοβαλερικό οξύ	5.64-5.76	827	14,3	1	-
2- Μεθυλοβουτανοϊκό οξύ	5.91	832	2,8	0,2	0,1

5,5 Διμεθυλο 2(5H) φουρανόνη	8.39-8.60		4,4	0,3	0,0
Εξανοϊκό οξύ	9.95		-	0,2	0,1
Μυρκένιο	9.96	991	-	-	0,5
3-Μεθυλοβούτυλο, 2-μεθυλο προπανοϊκό οξύ	10.85		-	-	0,1
Λιμονένιο	11.50	1029	-	-	0,1
β- (Ζ) Οξυμένιο	11.76	1037	-	-	0,1
β- (Ε) Οξυμένιο	12.23-12.30	1050	-	-	0,1
Οξειδίο της trans λιναλοόλης	13.33	1073	-	-	0,0
Επτανοϊκό οξύ	14.06		-	0,6	0,4
Λιναλοόλη	14.50	1097	-	0,6	0,7
Οκτανοϊκό οξύ	18.71		-	0,7	0,1
2-δεκανόνη	18.80	1192	-	-	1
Επτυλοϊσοβουτανοϊκό οξύ	21.23	1250	-	-	0,0
2- Δωδεκανόνη	21.73		-	-	0,5
Νονανοϊκό οξύ	22.64	1271	-	0,5	0,3
2-Εντεκανόνη	23.65	1294	-	0,8	3,3
Περίλλα αλκοόλη	23.75	1295	-	-	0,1
4- Μεθυλεστέρας του δεκενοϊκού οξέος	24.16		-	-	0,1
Μεθυλογερανικό οξύ	24.92		-	0,5	1,4
2-Μεθυλοκυκλοπροπανοϊκός εστέρας	25.78		-	-	0,2
2-Μεθυλοβούτυλο επτανοϊκός εστέρας	26.05		-	-	0,1
α- Υλανγένιο	27.22	1375	-	-	0,4

α-Κοπαένιο	27.45	1377	-	-	1,1
Μεθυλοδεκυλοκετόνη	28.02		-	0,7	1,7
Ε-Καρυοφυλλένιο	29.41	1409	-	1,6	9,1
β-Κοπαένιο	29.90	1430	-	-	0,45
α-trans-μπεργκαμοτένιο	30.08	1435	-	0,7	1,62
Ισοαμυλοκτανοϊκό οξύ	30.49			0,1	-
α-Χουμουλένιο	31.14	1455	1,8	10	33,1
Καντινα 1,6,4 διένιο (trans)	32.01	1475	-	-	1,1
γ-Μουουρολένιο	32.13	1480	-	2,8	2
β-Σελινένιο	32.35	1490	-	1,9	-
2-Δωδεκανοϊκό οξύ	32.36		1,1	-	-
Εντεκάνη	32.57		1	-	-
2-Τριδεκανόνη	32.78	1496	-	3,9	4,1
cis-β-γουαϊένιο	32.92	1493	-		1,1
α-Σελινένιο	32.70	1498	-	1,7	-
α-Μουουρολένιο	32.84	1500	-	1,2	1,1
β-Μπισαμπολένιο	33.16	1506	-	0,6	-
Ε-Ε α-φαρνεσένιο	33.24	1506	-	-	1
ΒΗΤ	33.31		-	0,7	-
2-Μεθυλολαβαντουίλο βουτανοϊκό οξύ	33.35	1512	-	-	1
γ-Καδινένιο	33.52	1514	-	2,8	2,2
δ-Καδινένιο	33.88	1523	-	3,8	4

<i>trans</i> καντίνα 1,4 διένιο	34.17	1535	-	0,3	0,5
α-Καδινένιο	34.56	1539	-	1,8	0,8
α-Καλακορένιο	34.67	1546	-	2,1	-
β-Καλακορένιο	34.76	1566	-	-	0,7
1,4 Κυκλονοαδιένιο	35.38		-	-	0,4
Γλενόλη	36.28	1587	-	-	0,3
Οξείδιο του καρσοφυλλενίου	36.31	1583	-	3,1	-
Λεδένιο	36.42		-	-	0,3
Τριμεθυλαμίνη	36.55		0,6	-	-
Πενταδεκάνη	36.70		1,8	-	-
2-Τετραδεκανόνη	36.72		-	-	1
1,5,8,8 Τετραμεθυλο κυκλοεντεκα 5,9 διεν 1-όλη	37.14		-	-	0,3
β-Μπισαμπολόλη	37.20		0,3	-	-
Εποξείδιο του χουμουλενίου II	37.58	1608	-	5,8	0,8
1,10 Δι-επί κουμπενόλη	37.65	1619	-	-	0,4
α-Κολοκαλένιο	37.79	1623	-	0,8	-
Επί-α-καδενόλη	38.65	1640	2	-	0,6
9,12,15 Οκταδεκατριενοϊκός μεθυλεστέρας	39.11		6,6	-	-
Μεθυλ (Z) 5,11,14,17 εικοσατετραενοϊκό οξύ	39.26		-	3	-
1,3 Κυκλοδωδεκαδιένιο	39.36		-	-	3,3
Εποξείδιο του αρωμαδενδρενίου	39.39	1639	30,9	1,9	-
2-Ένα 6Z πενταδεκένιο	39.66	1667	0,8	2,5	-

Καδαλένιο	39.91	1677	-	1,8	-
Επταδεκάνιο	40.60	1700	2,6	-	-
Μεθυλοδεκανοϊκό οξύ	41.55	1724	-	0,2	0,1
Εικοσάνιο	44.31	2000	1,6	-	-
2-Εξαδεκανόνη	44.32	1876		0,1	0,1
2,4,6 Τριμεθυλο οκτάνιο	47.87		1,3	-	-
Μεθυλεστέρας του εξαδεκανοϊκού οξέος	48.72		1,4	0,4	0,0
2,6,11,15 Τετραμεθυλο εξαδέκα 2,6,8,10 τετραένιο	49.78		-	-	0,1
E-E 7,11,15 Τριμεθυλ 3 μεθυλεν- εξαδέκα 2,6,10,14 τετραένιο	50.93		-	0,1	-
Μεθυλολινολεϊκό οξύ	54.29	2096	-	0,1	-
ΣΥΝΟΛΟ%			75,3	61,9	84,2

*τα νούμερα έχουν στρογγυλοποιηθεί στο 1^ο δεκαδικό ψηφίο

Πίνακας 3.1. Ταυτοποίηση GC στα αιθέρια έλαια λυκίσκου ποικιλιών Lublin, Bobek και Aurora.

Σε συνέχεια της παραπάνω λίστας, πρέπει να σημειωθεί πως και στα τρία δείγματα, οι ταυτοποιήσιμες ουσίες συνέθεσαν ένα σύνολο μεγαλύτερο του 50% επί του ολικού δείγματος με το αιθέριο έλαιο της ποικιλίας Aurora να ξεχωρίζει ως το περισσότερο ταυτοποιήσιμο δείγμα πέλλετ λυκίσκου, με ποσοστό 84%. Από την άλλη πλευρά, χαμηλότερη ικανότητα αναγνώρισης των συστατικών του αιθερίου ελαίου εμφάνισε η ποικιλία Bobek, με ποσοστό 62,2%.

Ωστόσο, το ποσοστό ταυτοποίησης δεν αντικατοπτρίζει την ποικιλία ουσιών που έχουν αναγνωριστεί στο δείγμα, αλλά το ποσοστό αυτού, κάτι που σημαίνει πως η αναγνώριση των ουσιών που επικρατούν στο δείγμα είναι ανεξάρτητος παράγοντας επίτευξης υψηλού ποσοστού στην παραπάνω διαδικασία. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτή στην περίπτωση του πρώτου δείγματος αιθερίου ελαίου, εκείνου της ποικιλίας Lublin, όπου συνολικά ταυτοποιήθηκαν μόλις 17 ουσίες αποδίδοντας ποσοστό αναγνώρισης 75,3% σε αντίθεση με το λιγότερο επαρκώς

χαρτογραφημένο έλαιο της ποικιλίας Bobek (61,9%), στο οποίο ταυτοποιήθηκαν συνολικά 39 διαφορετικές χημικές ουσίες. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται κατά βάση στην πληθώρα (30,9%) του συστατικού εποξειδίου του αρωμαδενδρενίου αλλά και του ισοβαλερικού οξέος (14,3%) τα οποία μαζί αποδίδουν ένα ποσοστό της τάξεως του 45,2% στο δείγμα Lublin ενισχύοντας έντονα το τελικό ποσοστό αναγνώρισης. Ταυτόχρονα, παρατηρείται πως καμία από τις δύο ουσίες δεν εμφανίζεται στο δείγμα της ποικιλίας Aurora ενώ στην περίπτωση της ποικιλίας Lublin, εμφανίζονται αμφότερες σε μικρά ποσοστά (1,9% και 1%). Επιπλέον, καμία από τις προαναφερθείσες ουσίες δεν αναφέρονται στη βιβλιογραφία ανάμεσα στα συχνότερα εμφανιζόμενα συστατικά των δειγμάτων λυκίσκου, γεγονός που θέτει περαιτέρω προβληματισμό σε σχέση με την συγκεκριμένη ποικιλία και τελικά επιβεβαιώνει την γενικότερη υπόθεση περί πολυπλοκότητας, ετερογένειας και ανομοιομορφίας των διαφορετικών ποικιλιών του ίδιου φυτικού είδους. Στην περίπτωση του αιθερίου ελαίου της ποικιλίας Aurora, ένα σύνολο 55 ταυτοποιήσιμων ουσιών απέδωσε ποσοστό αναγνώρισης 84%.

Σε γενικό πλαίσιο παρατηρείται πως οι κοινές ενώσεις οι οποίες ανιχνεύονται μεταξύ των τριών δειγμάτων (Lublin, Bobek, Aurora) αντίστοιχα είναι οι:

1. 5,5 διμεθυλοφουρανόνη (κετόνη) με ποσοστά 4,4, 0,3 και 0,04
2. μεθυλεστέρας του εξαδεκανοϊκού οξέος (εστέρας) με ποσοστά 1,4, 0,4 και 0,03
3. α-χουμουλένιο (σεσκιτερπένιο) με ποσοστά 1,8, 1 και 33,1

Επίσης, εντοπίζεται ισοβαλερικό οξύ μεταξύ των δειγμάτων Lublin και Bobek, σε ποσοστά 14,3 και 1, αντίστοιχα. Άλλες ενώσεις που ανιχνεύονται σε αξιοσημείωτο ποσοστό και είναι κοινές μεταξύ των ποικιλιών Bobek και Aurora είναι οι εξής:

1. Τερπένια: E-καρνοφυλλένιο, *α-trans*-μπεργκαμοτένιο, γ-μουουρολένιο, γ- και δ-καδινένιο

2. Κετόνες: 2-εντεκανόνη, μεθυλοδεκυλοκετόνη, α- και, 2-τριδεκανόνη

3. Εστέρες: μεθυλογερανικό οξύ
και εποξειδίου του χουμουλενίου.

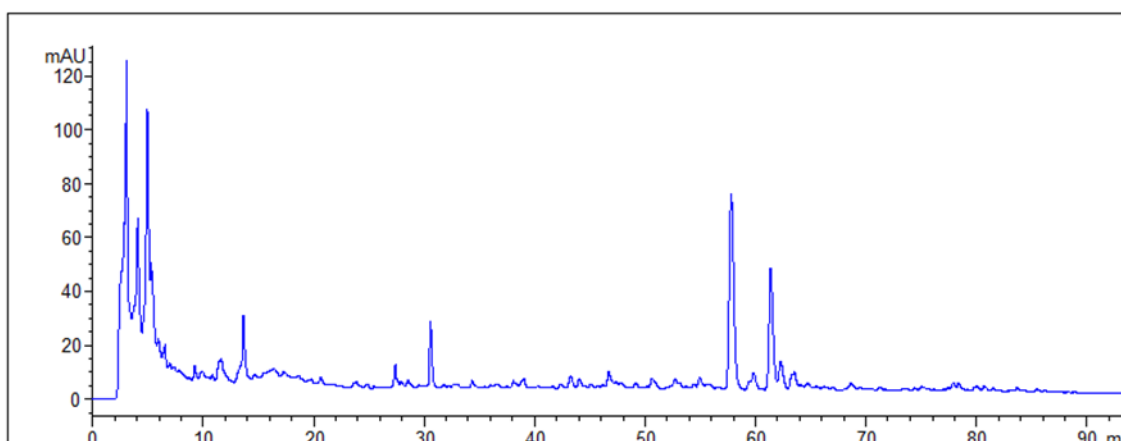
Συνεπώς, το προφίλ του αρώματος των δυο τελευταίων δειγμάτων φαίνεται παρεμφερές καθώς ανιχνεύονται αρκετές κοινές ενώσεις, με διαφορετικά ωστόσο, ποσοστά που καθιστούν την ποικιλία Aurora σχετικά ανώτερη σε περιεκτικότητα αυτών.

Οι Salanta L. et al., το 2015, ανέλυσαν με αέριο χρωματογραφία τα συστατικά του αρώματος τριών τύπων λυκίσκου (Aroma, Huller Bitterer, Magnum), παραθέτωντας τις σχετικές περιεκτικότητες διάφορων ποικιλιών που καλλιεργούνται στη Ρουμανία και κατηγοριοποιώντας τα βασικότερα ανιχνεύσιμα συστατικά ανάλογα με τα αρώματα που αποδίδουν στον ζύθο.

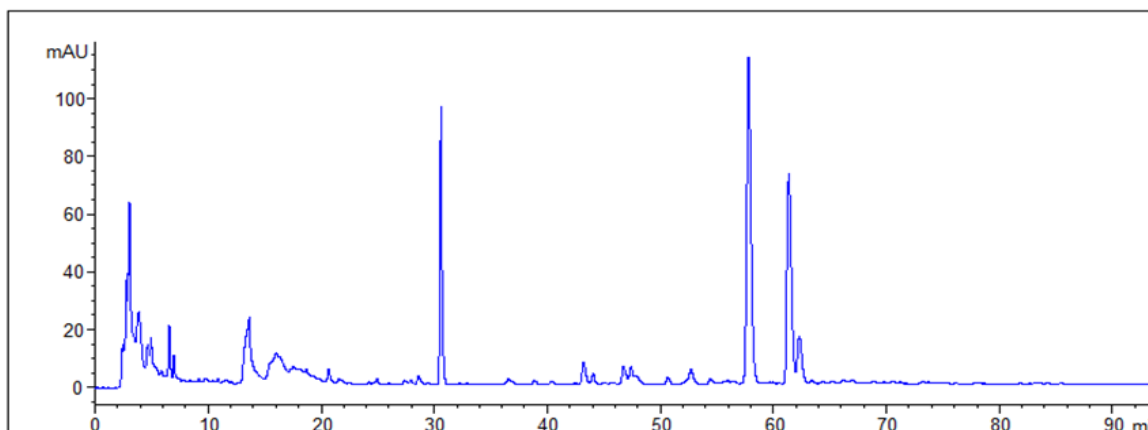
Μεταξύ των κοινών ενώσεων που έχουν ανιχνευτεί χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αερίου χρωματογραφίας με την παραπάνω και άλλες μελέτες εμφανίζονται οι εξής: μυρκένιο, α -κοπαένιο, β -καρβοφυλλένιο, α -χουμουλένιο, α - και β -σελινένιο, γ - και δ -καδινένιο, γ -μουουρολένιο, α -μπεργκαμοτένιο, α -φαρνεσένιο, 2-τριδεκανόνη (Ligor M. et al., 2014; Kaskonas P. et al., 2016)

3.2. Συγκριτική ανάλυση των εκχυλισμάτων τριών διαφορετικών ποικιλιών λυκίσκου

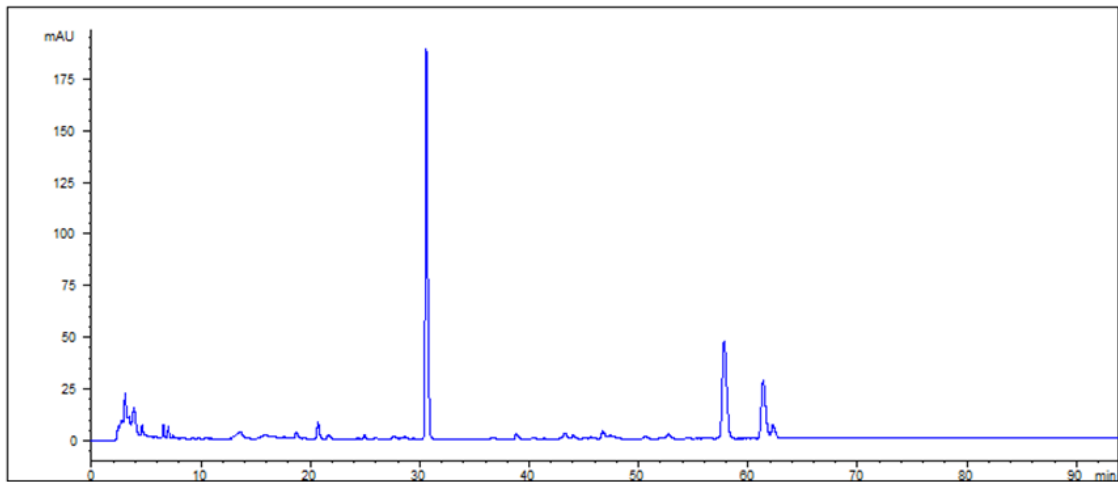
Παρακάτω παρατίθενται τα χρωματογραφήματα που παρελήφθησαν από την ανάλυση HPLC-DAD των τριών δειγμάτων λυκίσκου Lublin, Bobek, Aurora, σε μήκη κύματος 290, 330 και 370 αντίστοιχα.



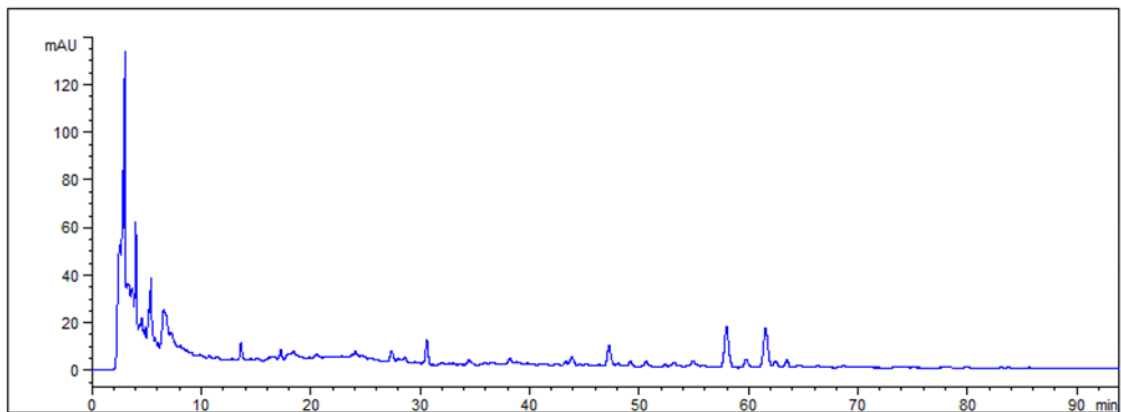
Σχήμα 3.4. Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Lublin, 290nm



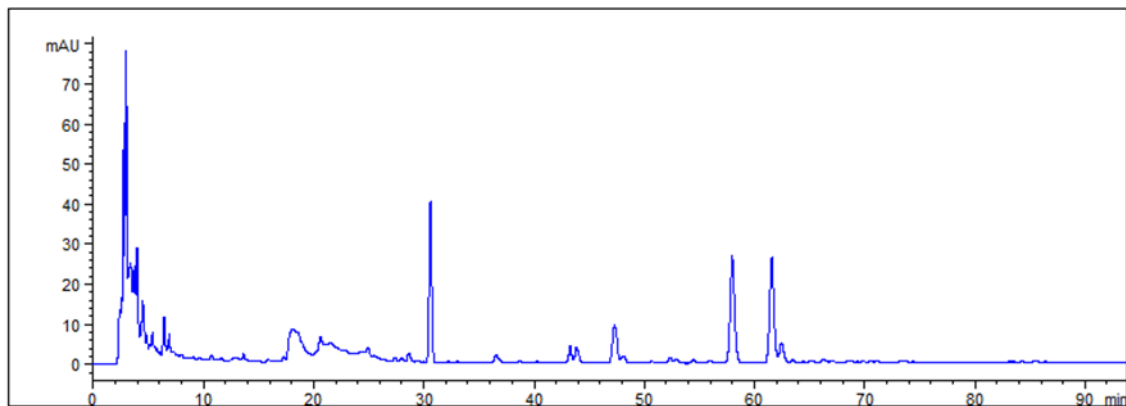
Σχήμα 3.5. Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Lublin, 330nm



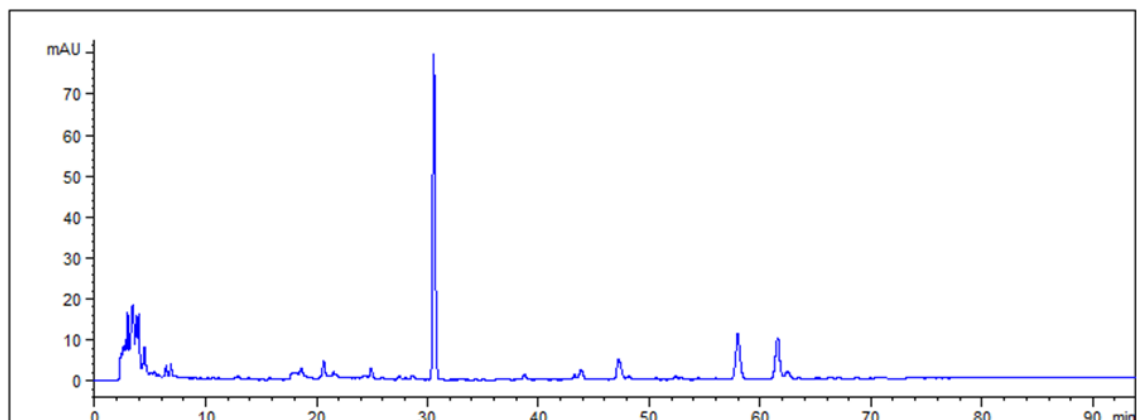
Σχήμα 3.6. Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Lublin, 370nm



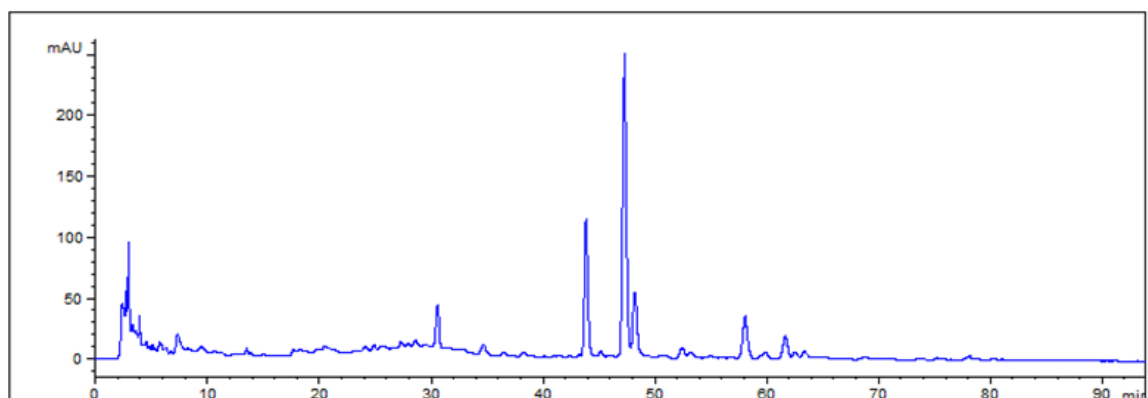
Σχήμα 3.7. Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Bobek, 290nm



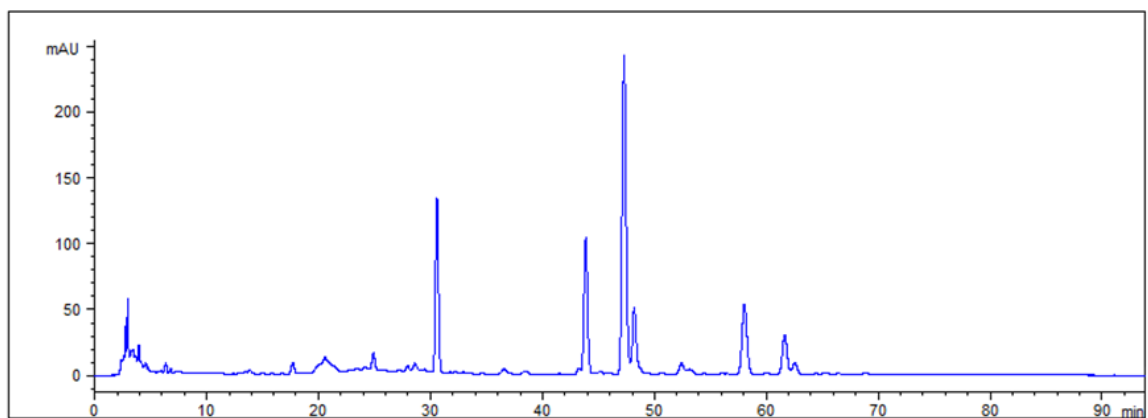
Σχήμα 3.8. Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Vobek, 330nm



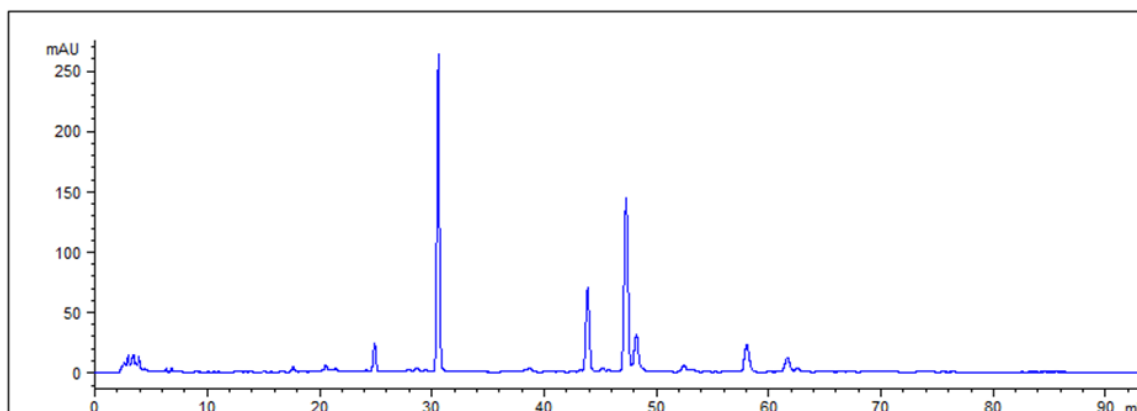
Σχήμα 3.9. Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Vobek, 370nm



Σχήμα 3.10. Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Auroga, 290nm



Σχήμα 3.11. Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Aurora, 330nm



Σχήμα 3.12. Χρωματογράφημα HPLC, ποικιλία Aurora, 370nm

Στη συνέχεια ακολουθεί το ολικό ιοντικό χρωματογράφημα LC-MS της ποικιλίας Lublin. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είναι 11, μεταξύ των οποίων: τα α -οξέα χουμουλόνη (7), συνχουμουλόνη (6) και αντχουμουλόνη (8), τα β -οξέα λουπουλόνη (10), συνλουπουλόνη (9) και αντλουπουλόνη (11) και τα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή ξανθοχουμόλη (5), ισοξανθοχουμόλη (1), δεσμεθυλοξανθοχουμόλη (3), 6-πρενυλναρινγενίνη (4) και 8-πρενυλναρινγενίνη (2).

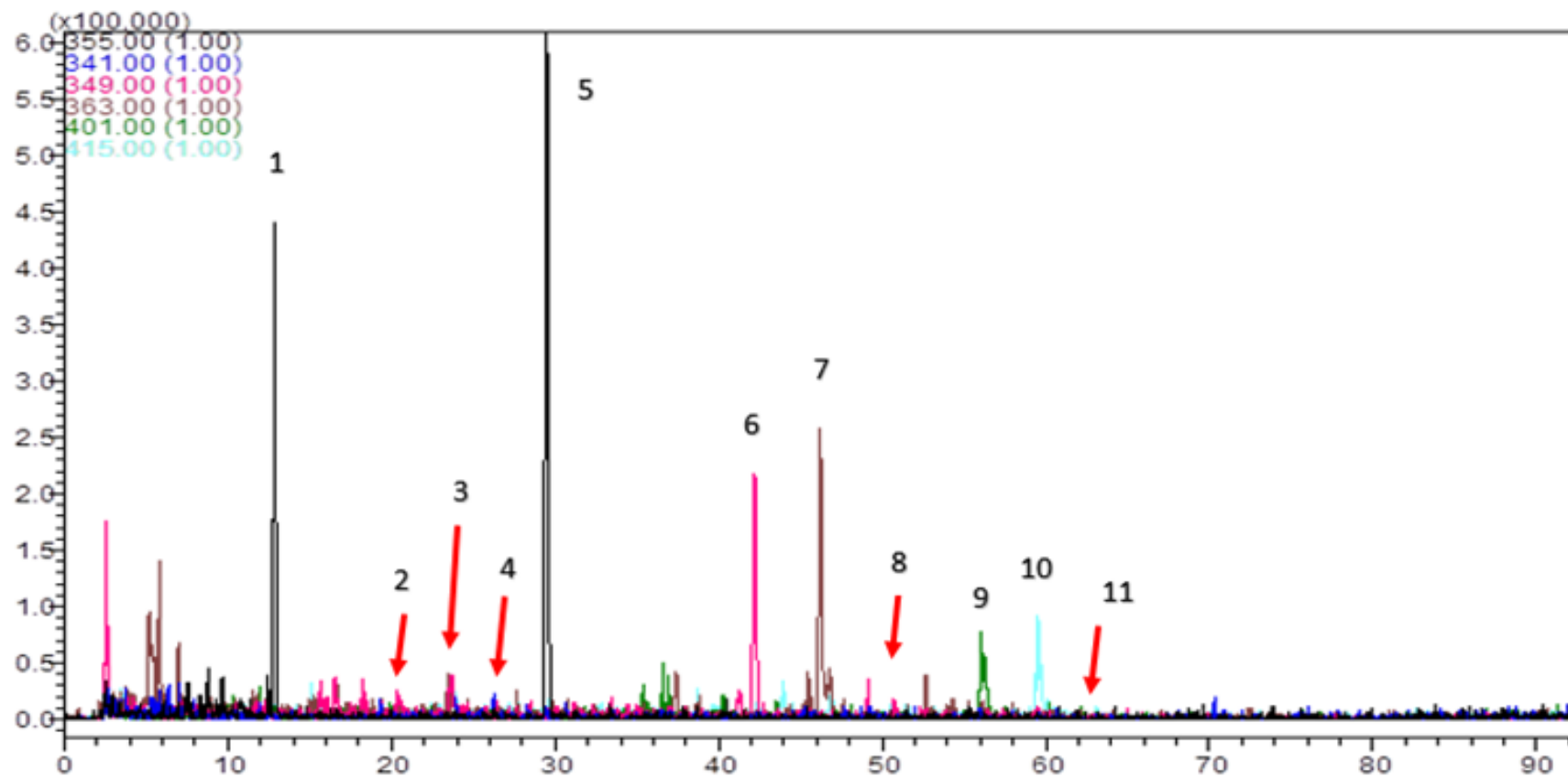
Στο χρωματογράφημα παρατίθενται οι παραπάνω ενώσεις με χρωματική διαφορά ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Έτσι, με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι ενώσεις με MB=355, 1 και 5, ισοξανθοχουμόλη και ξανθοχουμόλη, αντίστοιχα. Με μπλε χρώμα, οι ενώσεις 2,3 και 4: 8-πρενυλναρινγενίνη, δεσμεθυλοξανθοχουμόλη, 6-πρενυλναρινγενίνη, με MB=341. Με ροζ χρώμα, η ένωση 6, συνχουμουλόνη με MB=349. Με καφέ χρώμα, οι ενώσεις 7 και 8, χουμουλόνη και αντχουμουλόνη, με MB=363. Με πράσινο χρώμα, η ένωση 9, συνλουπουλόνη με MB=401. Τέλος, με γαλάζιο χρώμα, σημειώνονται οι ενώσεις 10 και 11, λουπουλόνη και αντλουπουλόνη, με MB=415.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με βάση τα αποδιδόμενα φάσματα μάζας, τα οποία δίνονται στο Παράρτημα 2, ξεχωριστά για κάθε ένωση και σε συνδυασμό με τα χρωματογραφήματα και τα αντίστοιχα φάσματα UV. Όπως αναφέρθηκε στην πειραματική διαδικασία της μελέτης, η ανίχνευση UV έγινε μεταξύ του εύρους 200-700nm, ενώ συγκεκριμένα φάσματα ελήφθησαν στα μήκη κύματος 290,330 και 370nm, στα οποία και αναμενόταν η ανίχνευση των πρενυλιωμένων φλαβονών (IX,6-PN, 8-

PN), των πικρών οξέων (η-/συν-/αντ- χουμουλόνη και λουπουλόνη) και των πρενυλιωμένων χαλκονών (XH,DMX), αντίστοιχα. Αναφορικά με τη σειρά έκλουσης, όπως φαίνεται και στο χρωματογράφημα που ακολουθεί, πρώτα εκλούνται τα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή και συγκεκριμένα οι πρενυλ-φλαβανόνες, με τις πρενυλ-χαλκόνες να ακολουθούν. Εξαιρέση αποτελεί η χαλκόνη DMX, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των εκλουόμενων φλαβανονών. Τη σειρά έκλουσης ακολουθούν τα πικρά οξέα, τα οποία διαχωρίζονται επαρκώς, με τα α -οξέα (χουμουλόνες) να προηγούνται των β - (λουπουλόνες).

Δεδομένου ότι και στις δύο χρωματογραφικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν, αναλύθηκαν δείγματα ίδιων συγκεντρώσεων, ακολουθήθηκε το ίδιο πρόγραμμα διαλυτών έκλουσης και χρησιμοποιήθηκε η ίδια στήλη ως στατική φάση, ο διαχωρισμός αναμένεται να εμφανίσει παρόμοια σειρά εκλουόμενων ενώσεων όπως και χρόνους έκλουσης αυτών. Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω χρωματογραφήματα, και στα τρία δείγματα που μελετήθηκαν εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στο προφίλ των ενώσεων, με τις ουσιαστικότερες διαφορές να σχετίζονται με το σχετικό ποσοστό της καθεμίας ξεχωριστά επί του συνόλου του δείγματος.

Σε συνέχεια του παρακάτω χρωματογραφήματος παρατίθεται ο πίνακας ταυτοποίησης των ουσιών με βάση τις αναλύσεις HPLC-DAD και LC-MS και σε συνάρτηση με τη μελέτη της βιβλιογραφίας και συγκεκριμένα την ανάλυση των Principe et al., (2014). Η ποσοτικοποίηση των ταυτοποιημένων ενώσεων έγινε ως σχετικό ποσοστό επί του συνόλου με τη χρήση υπολογιστικού προγράμματος, ως συνέχεια της ανάλυσης HPLC-DAD.



Σχήμα 3.13. Χρωματογράφημα LC, ποικιλία Lublin

Πίνακας 3.2. Ταυτοποίηση των βασικότερων ουσιών του εκχυλίσματος λυκίσκου, τριών ποικιλιών (L-Lublin, B-Bobek, A-Aurora)

AA Κορυφής	Χημική Ένωση	Χρόνος συγκράτησης t (min)	Μήκος κύματος ανίχνευσης UV λmax	Σχετικό %ποσοστό επί του συνόλου	Μοριακό Βάρος + [H ⁺] [M+H] (m/z)	Ποικιλία
1	Ισοξανθοχουμόλη	13.63	260, 290,330	6,99	355	L
		13.63	220,290	0,32		B
		13.85	240	0,34		A
2	8-Πρενυλαρινγενίνη	20.62	230,285	0,34	341	L
		20.54	220,285	0,34		B
		20.50	230,330	0,34		A
3	Δεσμέθυλ-ξανθοχουμόλη	24.94	230,367	0,48	341	L
		24.94	220,365	0,94		B
		24.91	230,370	2,84		A
4	6-Πρενυλαρινγενίνη	27.38	224,288	0,68	341	L
		27.38	220,290	0,83		B

		27.32	290,336	1,32		A
5	Ξανθοχουμόλη	30.58	218,369	36,27	355	L
		30.59	220,370	30,58		B
		30.58	234,370	33,53		A
6	Συνχουμουλόνη	43.22	225,330	1,09	349	L
		43.86	222,330	1,01		B
		43.87	238,330	11,23		A
7	η-Χουμουλόνη	47.40	226,240	1,32	363	L
		47.29	222,330	2,93		B
		47.30	237,284,325	28,05		A
8	Αντχουμουλόνη	50.66	227,330	0,31	363	L
		50.65	222,330	0,18		B
		50.68	238,330	0,18		A

9	Συνλουπουλόνη	57.82	228,275,335	19,49	401	L
		57.99	222,334	8,38		B
		58.06	237,334	7,92		A
10	η-Λουπουλόνη	61.39	225,270,333	12,11	415	L
		61.57	223,333	8,02		B
		61.67	237,331	4,46		A
11	Αντλουπουλόνη	62.30	226,330	2,89	415	L
		62.45	223,334	1,47		B
		62.56	238,334	1,42		A

Σε γενικό πλαίσιο, όλες οι ουσίες που ταυτοποιήθηκαν εμφανίζονται και στα τρία δείγματα λυκίσκου, σε ωστόσο σε διαφορετικά σχετικά ποσοστά. Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, η υψηλότερη περιεκτικότητα σε α -πικρά οξέα λυκίσκου εντοπίζεται στην ποικιλία Aurora, ενώ σε β -πικρά οξέα, στην ποικιλία Lublin. Κάποιες από τις ενώσεις ξεχωρίζουν, αποδίδοντας μεγαλύτερο σχετικό ποσοστό, όπως το πρενυλιωμένο φλαβονοειδές ξανθοχουμόλη το οποίο ανιχνεύεται και στις τρεις ποικιλίες σε σχετικό ποσοστό 30-36%. Στην ποικιλία Lublin, οι ενώσεις με τα υψηλότερα σχετικά ποσοστά είναι η ξανθοχουμόλη (36,27%) και η ισοξανθοχουμόλη (6,99%). Στην ποικιλία Aurora, τα υψηλότερα σχετικά ποσοστά αποδίδουν οι ενώσεις ξανθοχουμόλη (33,53%), συνχουμουλόνη (11,23%), η-χουμουλόνη (28,05%) και συνλουπουλόνη (7,92%). Στην ποικιλία Bobek τα σχετικά ποσοστά των ταυτοποιημένων ενώσεων είναι χαμηλά με εξαίρεση την ξανθοχουμόλη (30,58%), την συνλουπουλόνη (8,38%) και την η-λουπουλόνη (8,02%).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, αντικείμενο αποτέλεσαν τρία εμπορικά, κοινώς χρησιμοποιούμενα από την ζυθοποιία, είδη λυκίσκου, με παρόμοια χημική σύνθεση αλλά και διαφορετικά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Η μελέτη του αιθερίου ελαίου, απέδωσε ένα αναλυτικό προφίλ ενώσεων, οι περισσότερες από τις οποίες αναφέρονται και στη βιβλιογραφία αφήνοντας ωστόσο ένα ποσοστό 25-16% αταυτοποίητων. Η απόδοση των πέλλετ και στις 3 ποικιλίες, σε αιθέριο έλαιο, το οποίο παρελήφθη με απόσταξη με υδρατμούς σημειώθηκε εμφανώς χαμηλότερη σε σχέση με την αναγραφόμενη στα εμπορικά χαρακτηριστικά των ποικιλιών τα οποία αποδίδονται από την εταιρεία που τις προμηθεύει στην ελληνική αγορά. Συγκεκριμένα, η ποικιλία Lublin απέδωσε αιθέριο έλαιο της τάξης του 0,2% σε αντίθεση με το αναφερόμενο εύρος 0,5-1,1%, η ποικιλία Bobek, 0,4% αντί 0,7-4% και η ποικιλία Aurora, 0,8% αντί 0,9-1,4%. Στο εμπορικό φύλλο των ποικιλιών αναφέρεται επίσης υψηλή περιεκτικότητα αυτών σε μυρκένιο, σε ποσοστά 49-57% (Bobek), 22-29% (Lublin) και 35-53% (Aurora) επί των ολικών ελαίων. Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν ανιχνεύτηκε μυρκένιο στις δύο πρώτες ποικιλίες παρά μόνο στην τρίτη, με σχετικό ποσοστό 0,54%. Η μελέτη των αιθερίων ελαίων ανέδειξε την ποικιλία Aurora ως εκείνη με τις περισσότερες ταυτοποιήσιμες ενώσεις και τα υψηλότερα σχετικά ποσοστά των επιμέρους ταυτοποιημένων ενώσεων σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα, γεγονός που την καθιστά ανώτερη ποιοτικά σε επίπεδο αιθερίου ελαίου.

Από την άλλη, η μελέτη των εκχυλισμάτων ανέδειξε παρόμοιο χρωματογραφικό προφίλ και στα τρία δείγματα, με την σχετική περιεκτικότητα των δειγμάτων σε αυτές να εμφανίζεται ετερογενής και την ποικιλία Aurora να υπερτερεί και πάλι σε αυτό το επίπεδο. Η χρωματογραφική μελέτη υποδεικνύει την παρουσία των βασικότερων συστατικών των μαλακών και σκληρών ρητινών λυκίσκου, και στα τρία δείγματα. Σε αυτές ξεχωρίζουν τα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή ξανθοχουμόλη, ισοξανθοχουμόλη, 6- και 8-πρενυλναρινγενίνη, στα οποία και αποδίδονται οι σημαντικότερες υπό μελέτη βιολογικές δράσεις που σχετίζονται με το φυτό του λυκίσκου όπως είναι η ενίσχυση της ορμονικής δραστηριότητας και του λιπιδικού μεταβολισμού. Συγκεκριμένα, η ένωση ξανθοχουμόλη ανιχνεύεται σε υψηλά ποσοστά και στα τρία είδη λυκίσκου, γεγονός που μας προδιαθέτει θετικά σχετικά με την περαιτέρω μελέτη ανίχνευσης του συγκεκριμένου συστατικού στον ζύθο και τελικά την απόδοση άμεσων συσχετίσεων την κατανάλωσης του προϊόντος με τις βιολογικές δράσεις που αναφέρονται για την ένωση αυτή.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdi F., Mobedi H. & Roozbeh N. (2016). Hops for Menopausal Vasomotor Symptoms: Mechanisms of Action. *Journal of Menopausal Medicine*. 6(22), 62-64.

Bonamin F, Moraes T. M., Dos Santos R. C., Kushima H., Faria F. M., Silva M. A., Souza Brito A., Da Rocha L. R. & Hiruma-Lima C. A. (2014) The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of b-myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chemico-Biological Interactions*. 212, 11-19.

Butterweck V., Brattstroem A., Grundmann O. & Koetter U. (2006). Hypothermic effects of hops are antagonized with the competitive melatonin receptor antagonist luzindole in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59(4), 549–552.

Calleja M. A , Vieites J. M., Montero-Meléndez T., Torres M. I., Faus M. J., Gil A. & Suárez A. (2012). The Antioxidant Effect of β -Caryophyllene Protects Rat Liver From Carbon Tetrachloride-Induced Fibrosis by Inhibiting Hepatic Stellate Cell Activation. *British Journal of Nutrition*. 109 (3), 394-401.

Čermák P, Palečková V., Houška M., Strohalm J., Novotná P., Mikyška A., Jurková M. & Sikorová M. (2015). Inhibitory Effects of Fresh Hops on *Helicobacter pylori* Strains. *Czech Journal of Food Science*. 33(4), 302–307.

Chadwick L. R., Pauli G. F. & Farnsworth N. R. (2006). The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine*. 13(1-2), 119–131.

Franco L., Sanchez C., Bravo R., Rodriguez A., Barriga C., Eulalia Romero E., Cubero J. (2012). The Sedative Effect of Non-Alcoholic Beer in Healthy Female Nurses. *Acta Physiologica Hungarica*. 99(2),133-139.

Hejazian S. H., Bagheri S. M. & Dashti-R M. H. (2014). *Avicenna Journal Phytomedicine*, 4(1), 53-58.

Karabín M., Hudcová T., Jelínek L. & Dostálek P. (2015). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*.

Karabin M., Hudcova T., Jelinek L. & Dostalek P. (2016). Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15(3), 542-567.

Kaškonas P., Stanius Z., Kaškonien V, Obelevičius K., Ragažinskien O., Zilinskas A. & Maruška A. (2016). Clustering analysis of different hop varieties according to their essential oil composition measured by GC/MS. *Chemical Papers*. 70 (12), 1568–1577.

Kazuki Yui, Kiyofuji Ayane & Kyoichi Osada. (2014). Effects of xanthohumol- rich extract from the hop on fatty acid metabolism in rats fed a high fat diet. *Journal of Olio Science*. (63), 159-168.

Kiyofuji Ayane, Kazuki Yui, & Kyoichi Osada. (2014). Effects of xanthohumol- rich hop extract on the differentiation of prelipoadipocytes. *Journal of Olio Science*. (63), 593-597.

Ligor M., Stankevičius M., Wenda-Piesik A., Obelevičius K., Ragažinskienė O., Stanius Z., Maruška A. & Buszewski B. (2014). Comparative Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Evaluation of Hop (*Humulus lupulus* L.) Essential Oils and Extracts Obtained Using Different Sample Preparation Methods. *Food Analytical Methods*. 7, 1433–1442.

Miranda C., Stevens J. F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M. & Buhler D. R. (2000). Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48(9), 3876–3884.

Miranda C. L., Yang Y-H., Henderson M.C., Stevens J. F., Santana-Rios G., Deinzer M. L. & Buhler D. R. (2000). Prenylflavonoids From Hops Inhibit The Metabolic Activation Of The Carcinogenic Heterocyclic Amine 2-Amino-3-Methylimidazo[4,5-F] Quinoline, Mediated By Cdna-Expressed Human Cyp1a2. *Drug Metabolism And Disposition*. 28(11), 1297-1302

Mudura E. & Coldea T. (2015). Hop-Derived Prenylflavonoids and Their Importance in Brewing Technology: A Review. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*. 72(1)

Negri G., Di Santi D. & Tabach R., (2010). Bitter acids from hydroethanolic extracts of *Humulus lupulus* L., Cannabaceae, used as anxiolytic. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20(6), 850-859.

Oladokun O., Smart K. & Cook D., (2016). An Improved HPLC method for single run analysis of the spectrum of hop bittering compounds usually encountered in beers. *Journal of the Institute of Brewing & Distilling*. 122, 11-20.

Olsovska J., Bostikova V., Dusek M., Jandovska V., Bogdanova K., Cermak P., Bostik P., Mikyska A. & Kolar M. (2006). Humulus lupulus L. (hops) – A valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies. *Military Medical Science Letters*, 85(1), 19-30.

Pio Prencipe F., Brighenti V., Rodolfi M., Mongelli A., Dall'Asta C., Ganino T., Bruni R., Pellati F. (2014). Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in Humulus lupulus L. *Journal of Chromatography A*, 1349, 50–59.

Salanță L., Tofană M., Socaci S., Mudura E., Pop C., Pop A. & Fărcaș A. (2015) Evaluation and Comparison of Aroma Volatile Compounds in Hop Varieties Grown in Romania. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(6), 11049-11056.

Shapouri R. & Rahnema, M., (2011). Evaluation of antimicrobial effect of hops extracts on intramacrophages Brucella abortus and B. melitensis. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 4(Supplement 1): S51-S8

Skomra U., Bocianowski J & Agacka M., (2013). Agro-morphological differentiation between European hop (Humulus lupulus L.) cultivars in relation to their origin. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 11 (3&4), 1123-1128

Urgeová E., Vulganová K. & Polívka L. (2013). Content of selected secondary metabolites in wild hop. *Chemical Papers*, 67 (3), 249–253.

Wietstock P., Kunz T., Shellhammer T., Schön T. & Methner F. (2010). Behaviour of antioxidants derived from hops during wort boiling. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(2), 157-166.

Zanoli P., Rivasi M., Zavatti M., Brusiani F. & Baraldi M. (2005). New insight in the neuropharmacological activity of Humulus lupulus L. *Journal of Ethnopharmacology* . 102, 102–106

Ιστοσελίδες/Websites & links

1. Hop Cultivar Descriptions (USDA-ARS) <<http://www.ars.usda.gov/pandp/docs.htm?docid=14772>>
2. Hops: Organic Production (ATTRA, 2005) <<https://attra.ncat.org/attra-pub/summaries/summary.php?pub=87>>
3. Kaiser C. & Ernst M. (revised 2012). Hops, Cooperative Extension Service University of Kentucky College of Agriculture, Food and Environment, Center for Crop Diversification Crop Profile < <http://www.uky.edu/Ag/CCD/intro.html> >

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Εμπορικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων 2 και 3 βάσει του Αμερικάνικου Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης (USDA-United States Department of Agriculture)

	BOBEK (ποικιλία 2)	AURORA (ποικιλία 3)
ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗΣ USDA :	21239	21053
ΠΡΩΤΗ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ:	Η επιλογή των σπόρων έγινε από τον Δρ. Tone Wagner στο Zalec της Σλοβενίας (πρώην Γιουγκοσλαβία) στα μέσα προς τέλος της δεκαετίας του 1970	
ΓΕΝΟΣ:	Humulus	
ΕΙΔΟΣ:	lupulus	
ΠΟΙΚΙΛΙΑ:	Bobek	Aurora
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ:	Επιλογή σπόρων	-
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ:	3 Απριλίου, 1980	1972
ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ:	Ριζώματα	
ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ:	Κανένας περιορισμός, εμπορική καλλιέργεια	
ΩΡΙΜΑΝΣΗ:	Μέτρια προς μέτρια πρώιμη	Μετρίως πρώιμη προς μετρίως όψιμη
ΧΡΩΜΑ ΦΥΛΛΟΥ:	Σκούρο πράσινο	Πράσινο προς ελαφρώς σκούρο πράσινο
ΦΥΛΟ:	Θηλυκό	
ΑΣΘΗΝΕΙΕΣ:	Περονόσπορος: μερικώς ανθεκτικό	
Βερτισιλίωση:	ανθεκτικό	άγνωστο
ΙΟΙ:	άγνωστο	

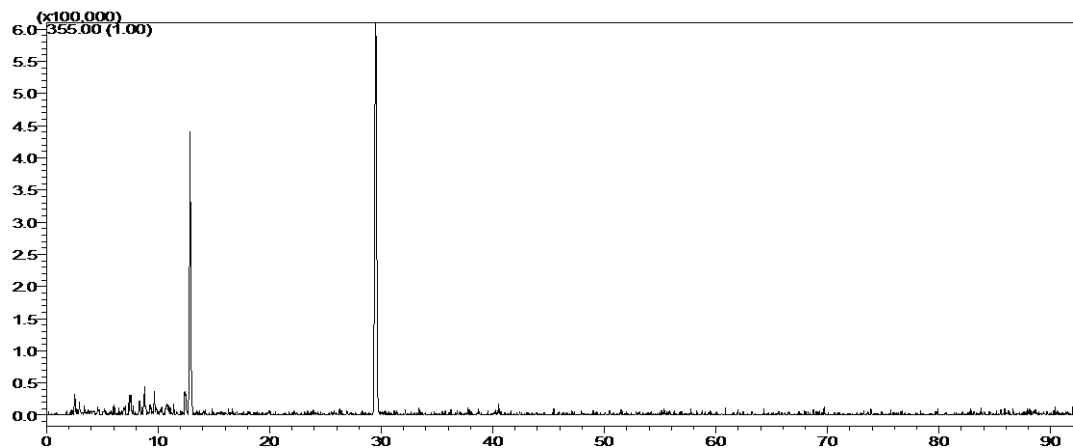
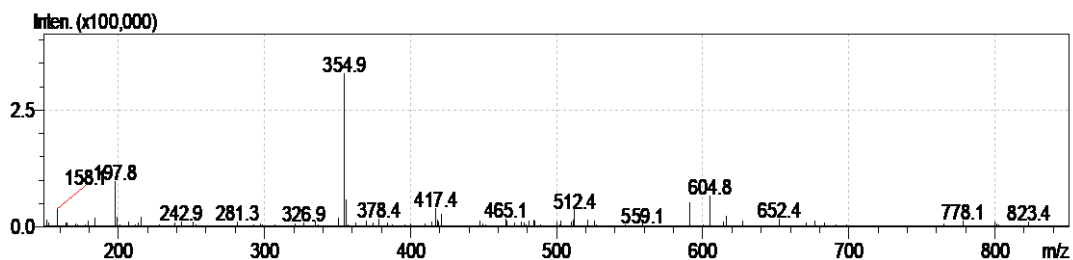
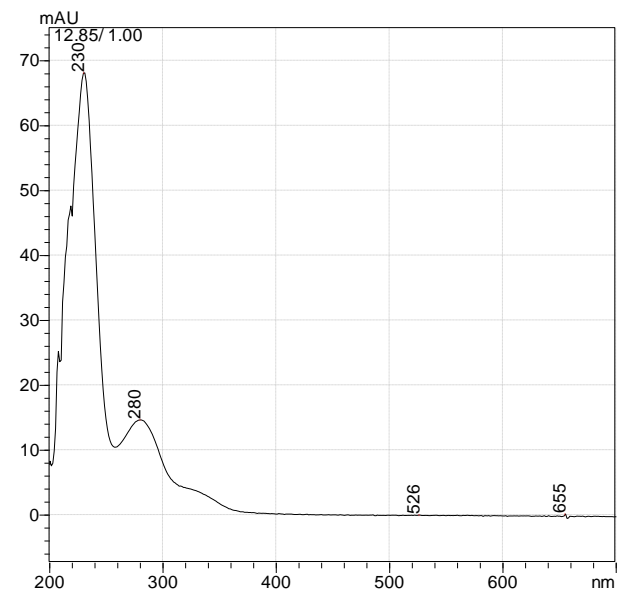
ΑΠΟΔΟΣΗ:	Φτωχή (περίπου 363 κιλά/στρέμμα)	Καλή προς πολύ καλή
Α ΟΞΕΑ:	8.1% (10-ετές εύρος 6.0 έως 9.3%)	10-12%
Β ΟΞΕΑ:	5.0% (10-ετές εύρος 4.0 έως 6.6%)	4-5%
ΣΥΝΧΟΥΜΟΥΛΟΝΗ:	26%; συνλουπουλόνη 48%	22%
ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ:	Μέτρια προς καλή (διατηρείται το 66% των αρχικών α-οξέων μετά από 6 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου)	Πολύ καλή (διατηρείται το 70-75% των αρχικών α-οξέων μετά από 6 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου)
ΕΛΑΙΟ:	1.4 ml/100 g (10-ετές εύρος 0.82 έως 2.67) χουμουλένιο 12.4%; καρυοφυλλένιο 4.3%; φαρνεσένιο 3.0%.	1.1-1.8 ml/100 g χουμουλένιο/καρυοφυλλένιο 3.27
ΒΑΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ:	Ευχάριστο άρωμα λυκίσκου, όμοιο των Ευρωπαϊκών τύπων. Κώνοι μικρού προς μέτρι μικρού μεγέθους-εύκολοι στη συλλογή	Υψηλή περιεκτικότητα σε α-οξέα, άρωμα Ευρωπαϊκών λυκίσκων, καλή σταθερότητα αποθήκευσης
ΑΝΑΦΟΡΕΣ:	Kralj, D., and Tone Wagner. New Slovene hop cultivars, Blisk, Bobek, and Buket. Institute for Hop and Brewing Research, Zalec, 1980 (mimeographed report). Kralj, D. Hop Breeding in Slovenia (in German). Report presented at the Scientific Commission, IHB, Novi Sad, Yugoslavia, 1984. J. Kisgeci, A. Mijavek, M. Acimovic, P. Spevak, and N. Vucic. 1984. Hmeljarstvo. pp. 126-138. Inst. za Ratarstvo i Povrtarstvo, Novi Sad.	Wagner, Tone. Autochthonous hop in Yugoslavia and its usability for breeding new varieties in comparison with the hop varieties grown at present. Final Research Report, USDA-Yugoslavia Cooperative Project E30-CR-90/FG Yu-186, May 1974, pp. 256-267. Wagner, Dr. Tone, and Dragica Kralj. Properties of Slovenian aroma hop varieties and new breeding lines. Talk presented to the 27th Congress of the European Union of Hop Trade, Dubrovnik, Yugoslavia, May 21-22 1979; Proceedings printed in German and English.

Link: <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/2450/hopcultivars/21239.html>

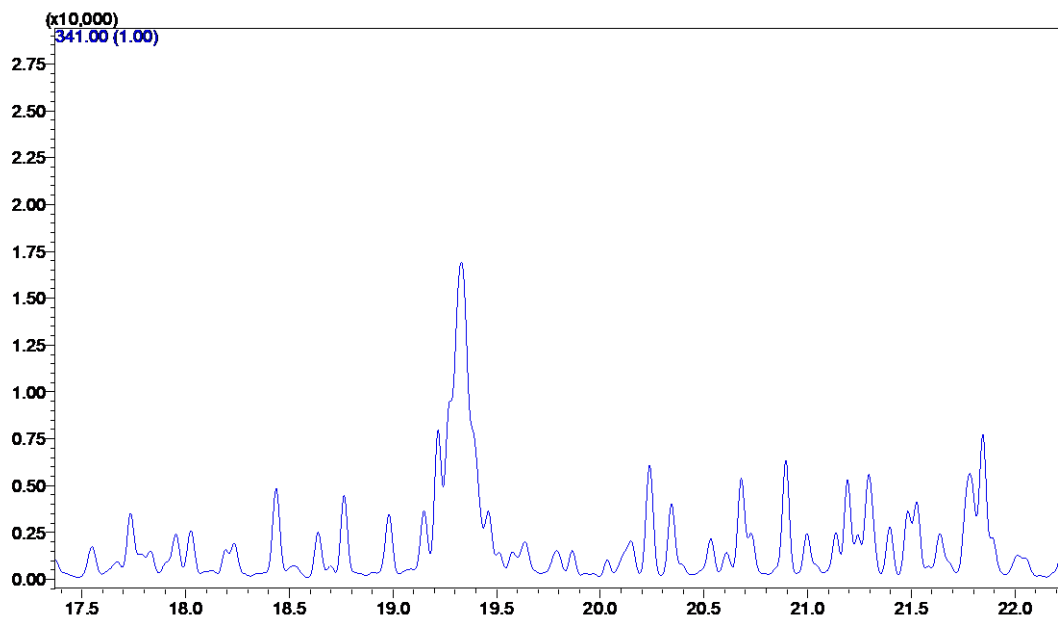
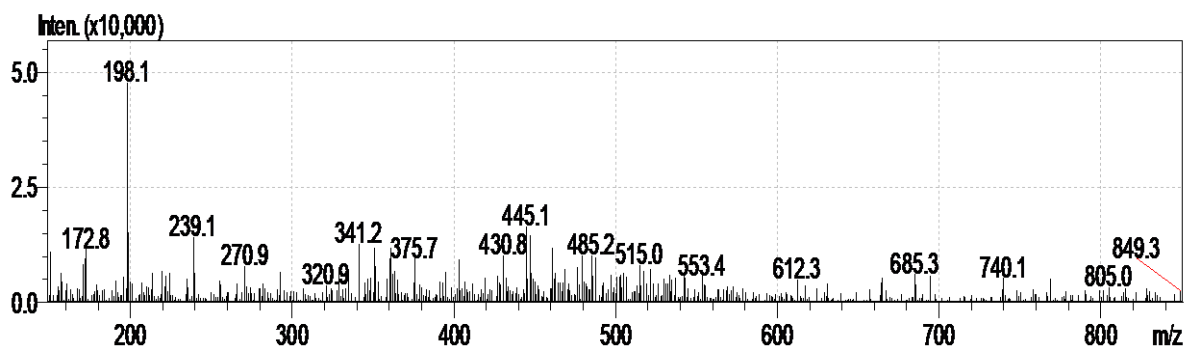
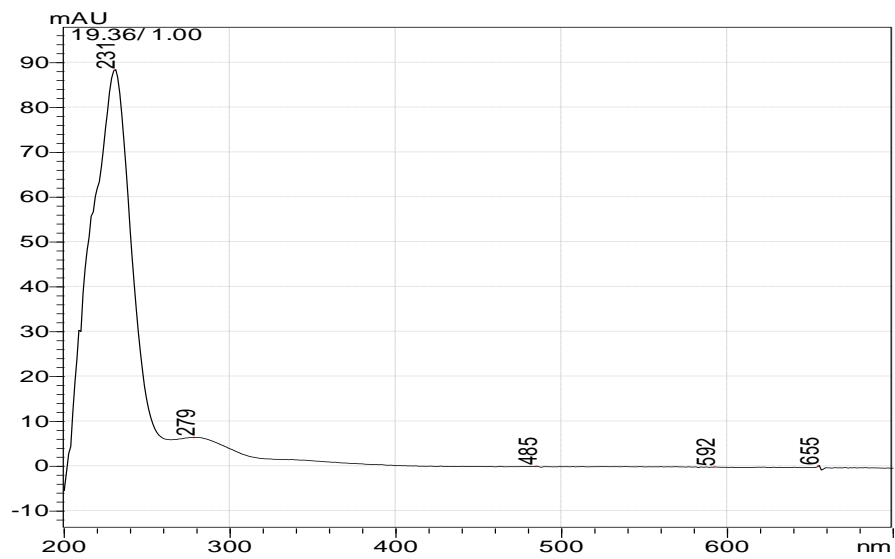
2. Αναλυτικά αποτελέσματα ταυτοποίησης LC/MS, Hop Lublin

Ταυτοποίηση των κορυφών 1 έως 11, της ποικιλίας Lublin, με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματοόμετρο μαζών (LC/MS). Για την κάθε ένωση παρατίθεται το φάσμα UV, το φάσμα μάζας και το χρωματογράφημα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην ταυτοποίηση.

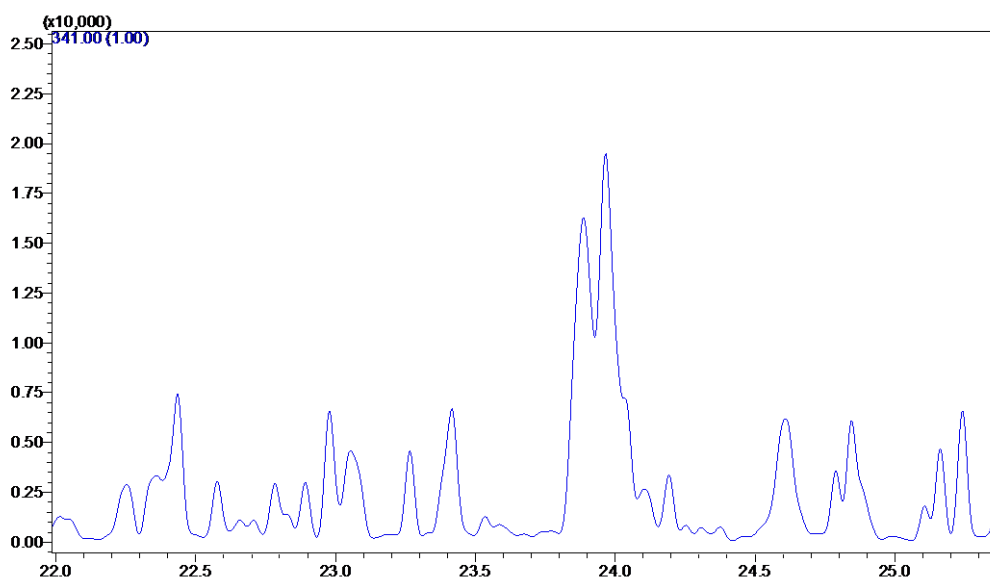
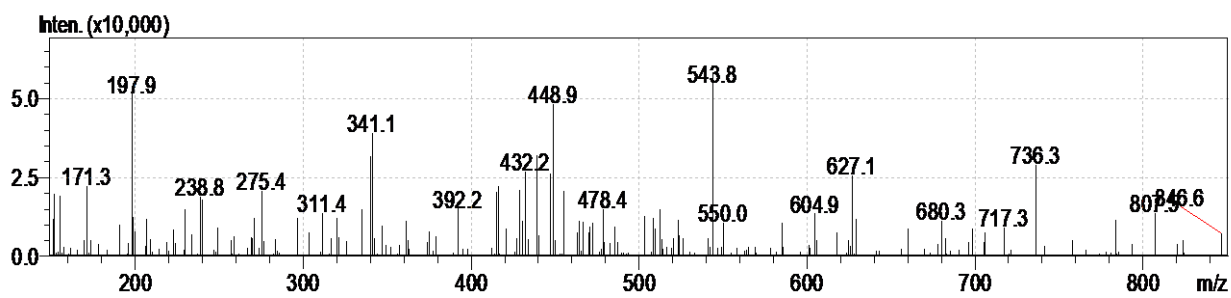
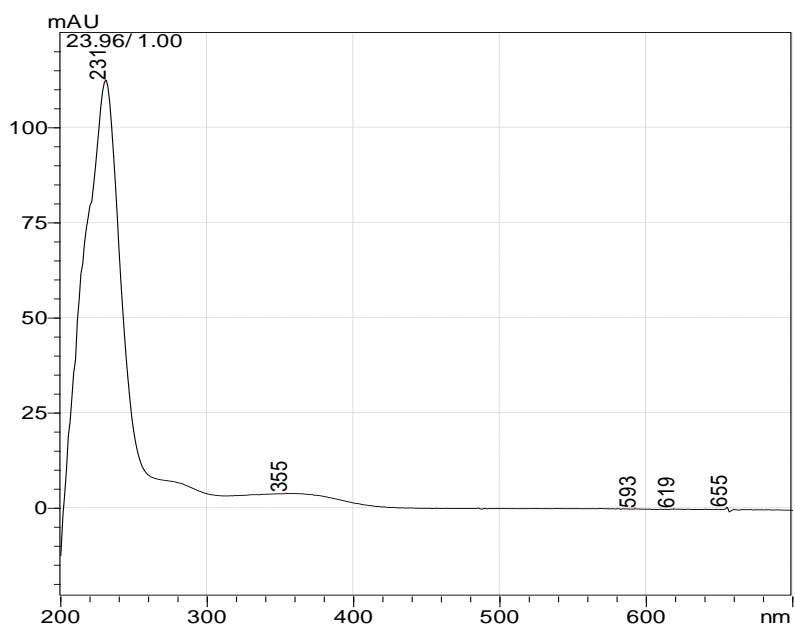
1. Ισοξανθοχουμόλη (12.85min, 330nm)



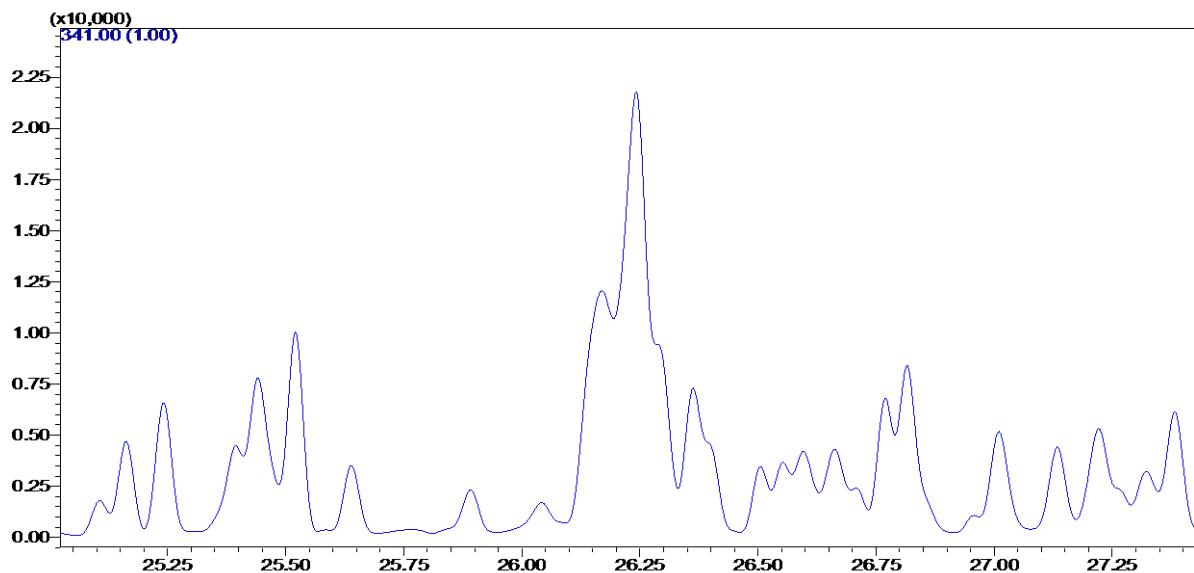
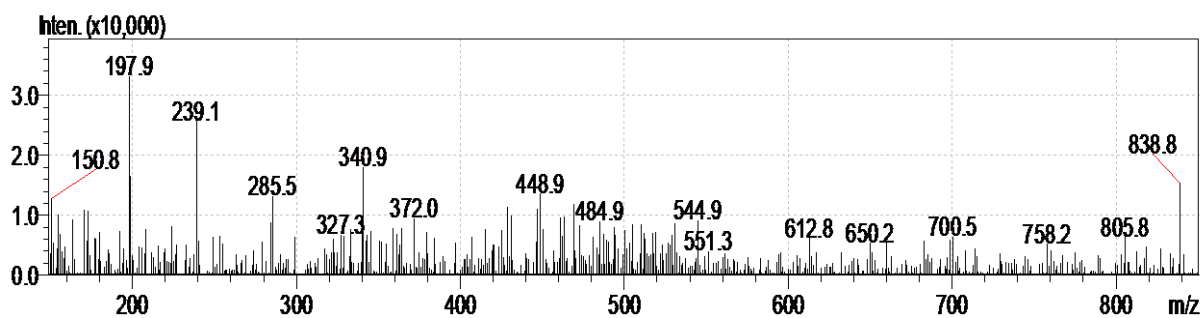
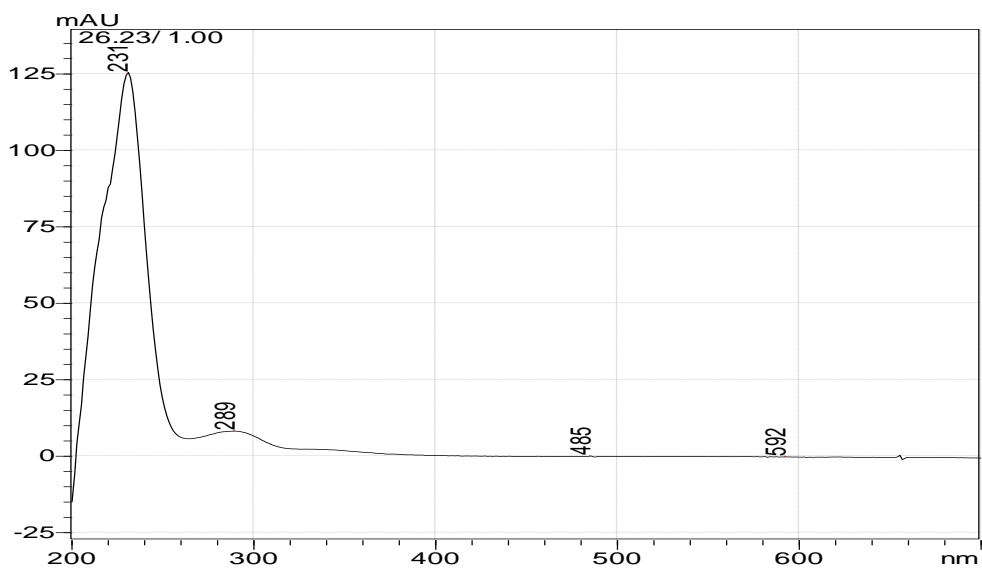
2. 8-Πρενυλναρινγενίνη (19.36min, 290nm)



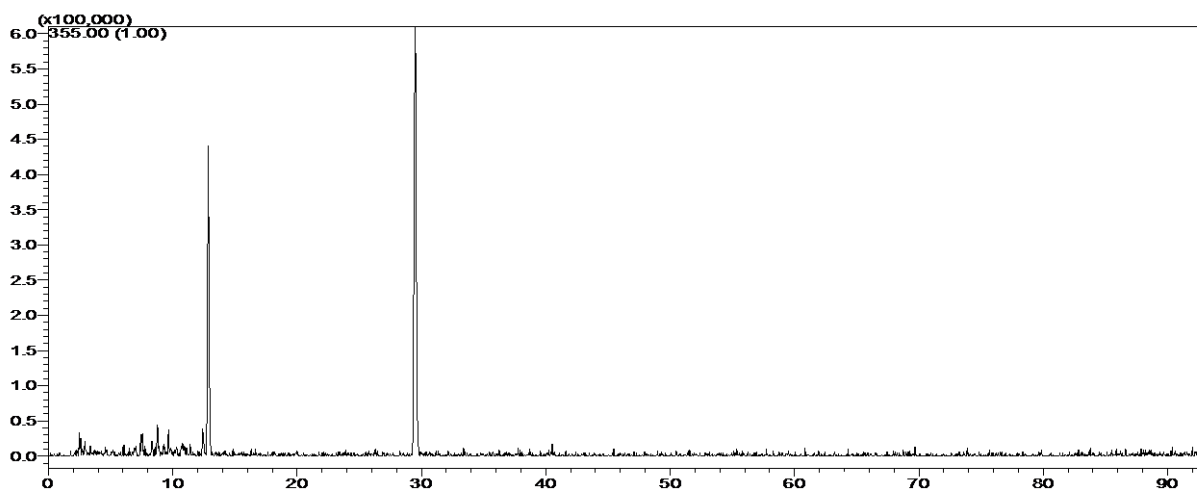
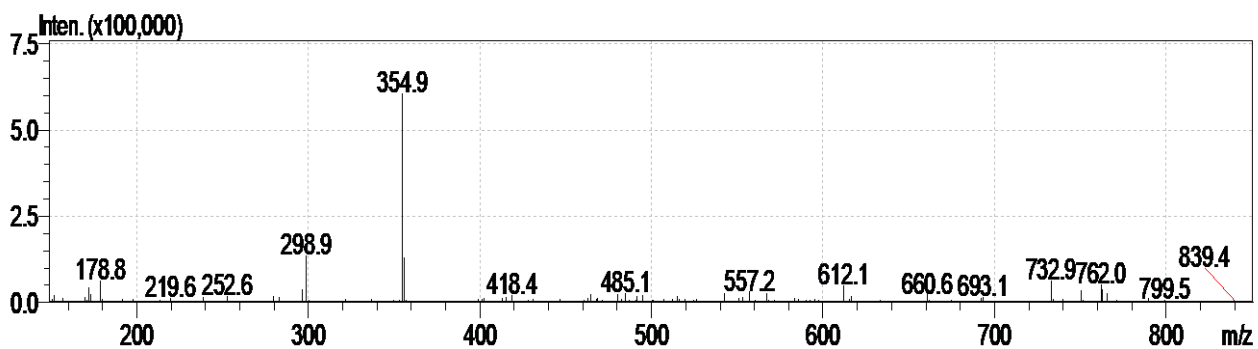
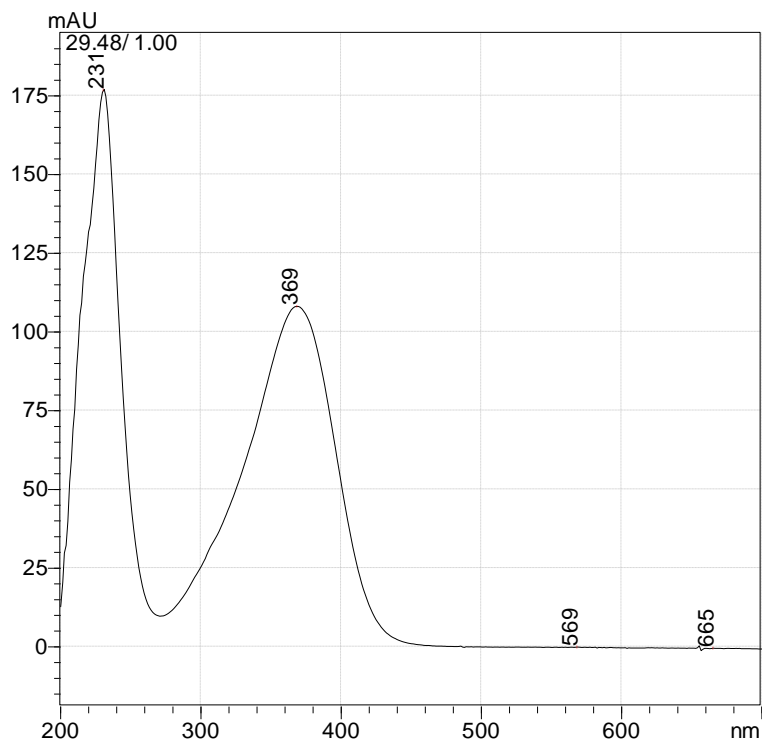
3. Δεσμεθυλ-ξανθοχουμόλη (23.96min, 370nm)



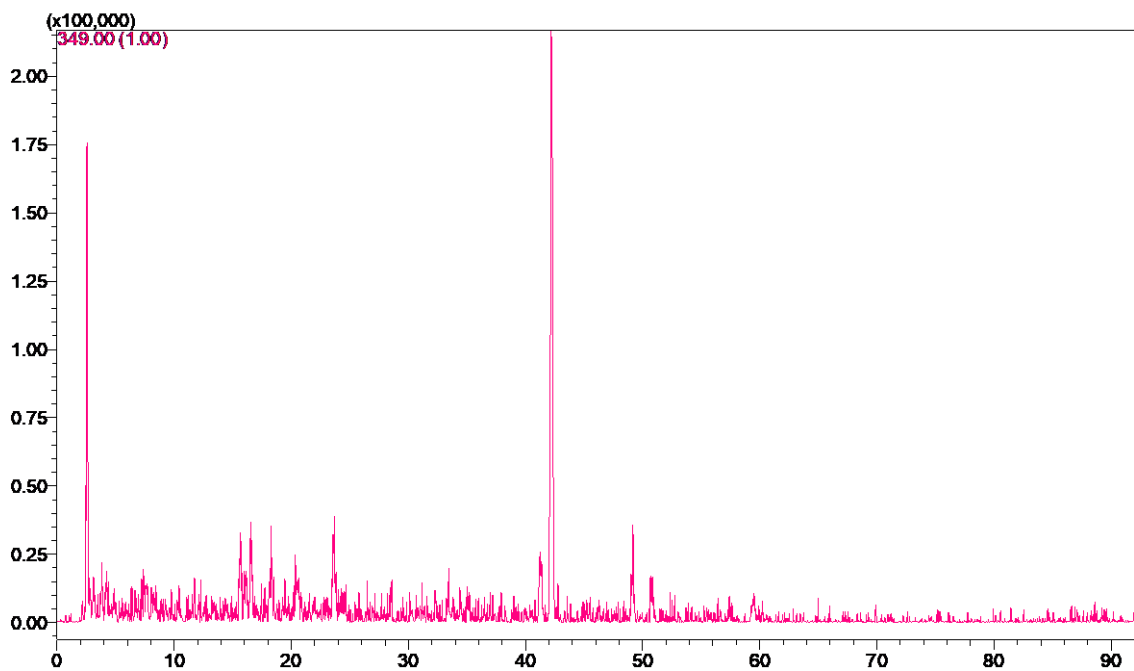
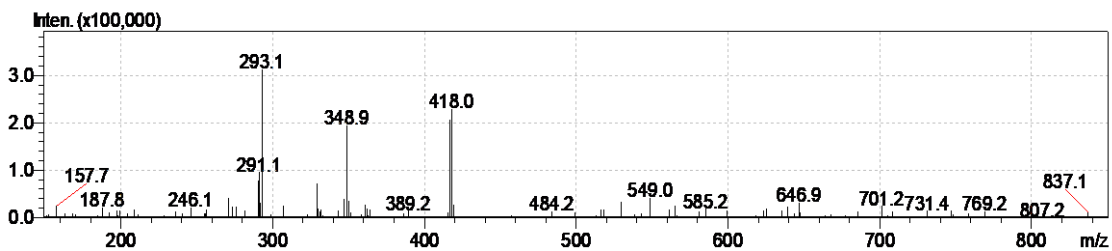
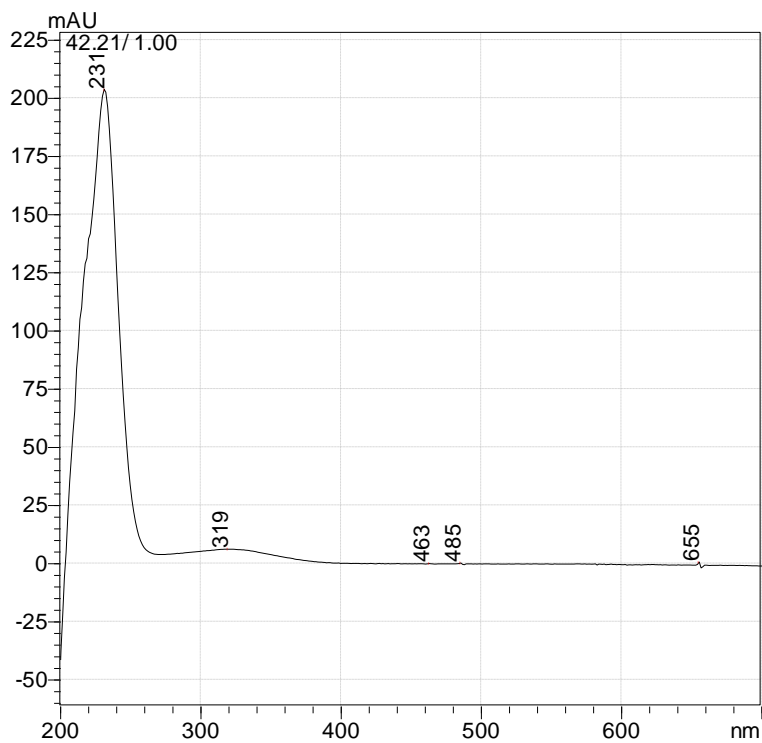
4. 6-Πρενυλναρινγενίνη (26.23min, 290nm)



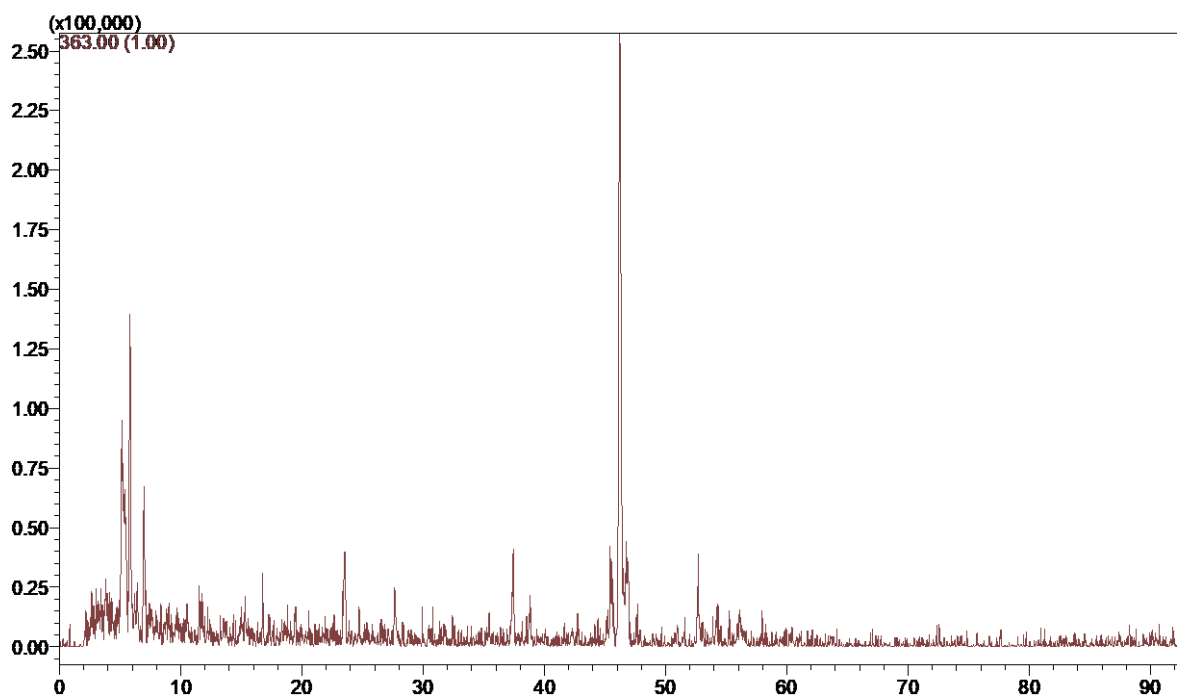
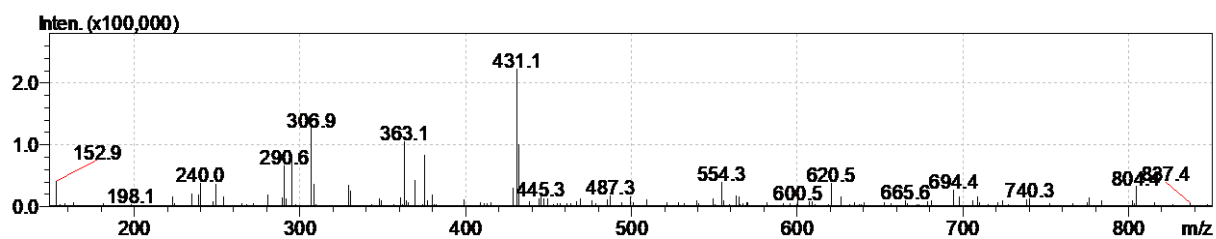
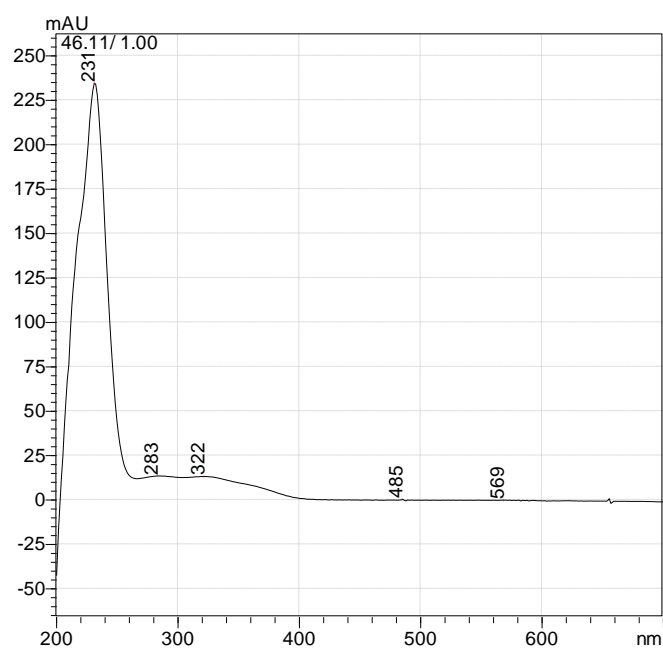
5. Ξανθοουμόλη (29.48min, 370nm)



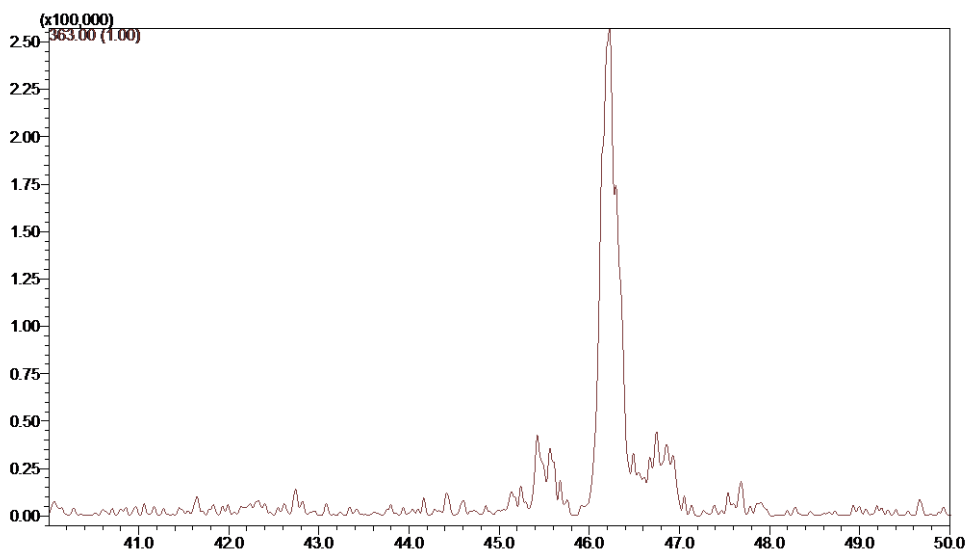
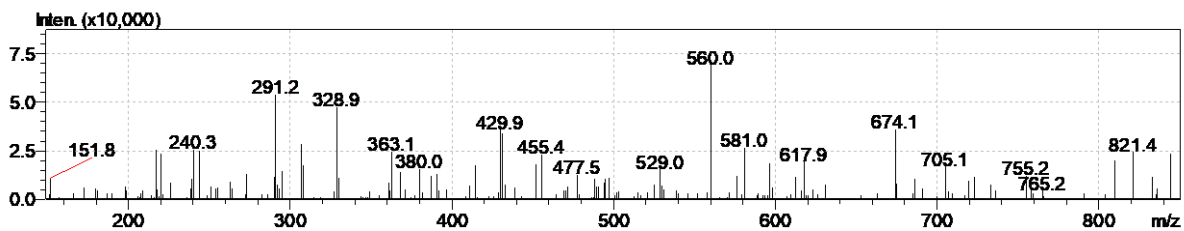
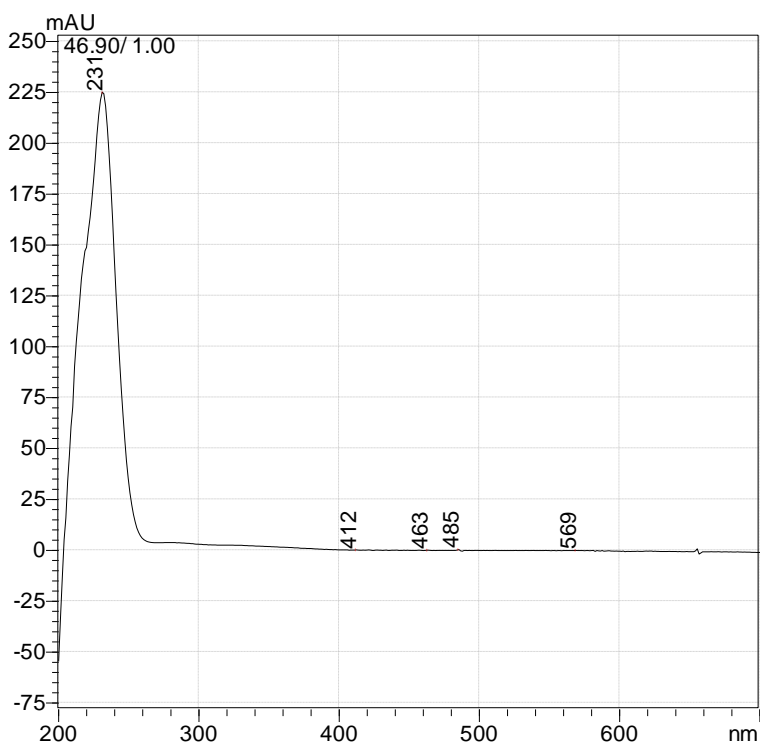
6. Συνχουμουλόνη (42.20min, 330nm)



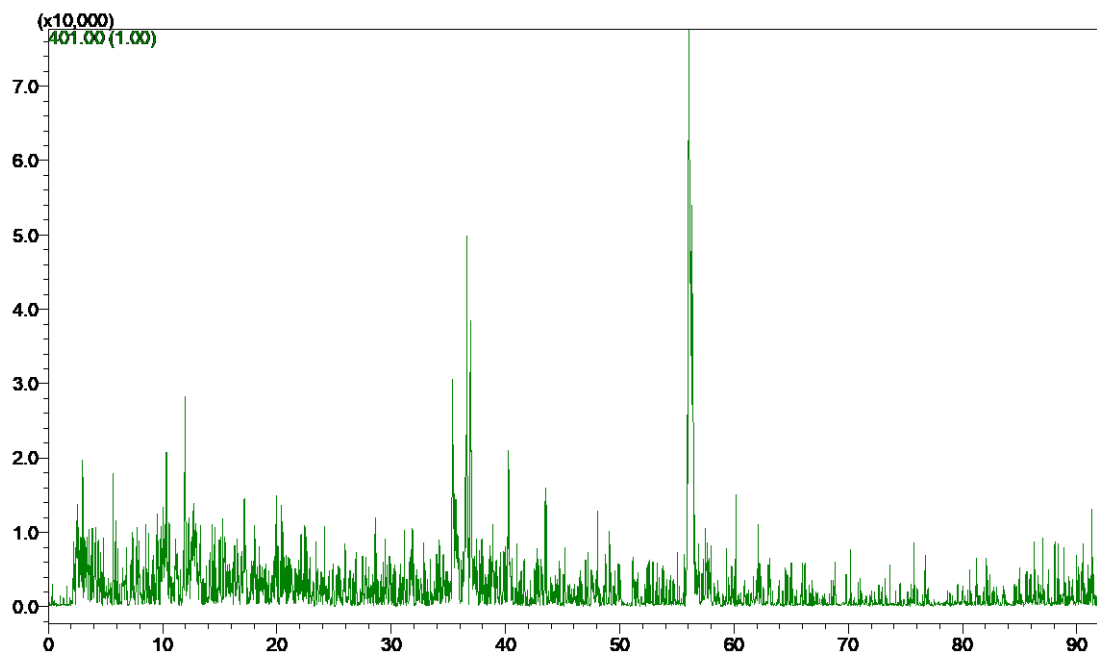
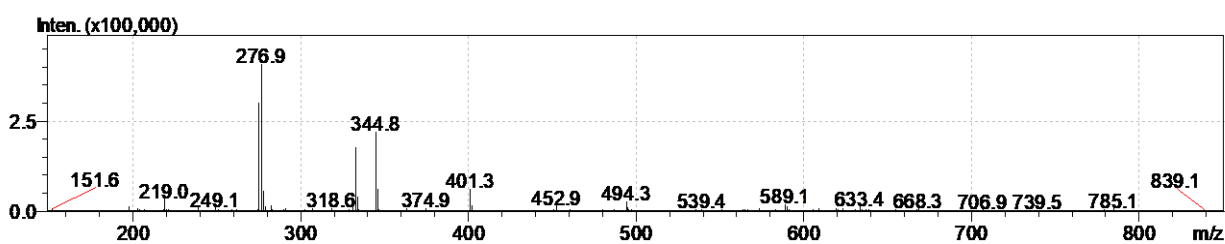
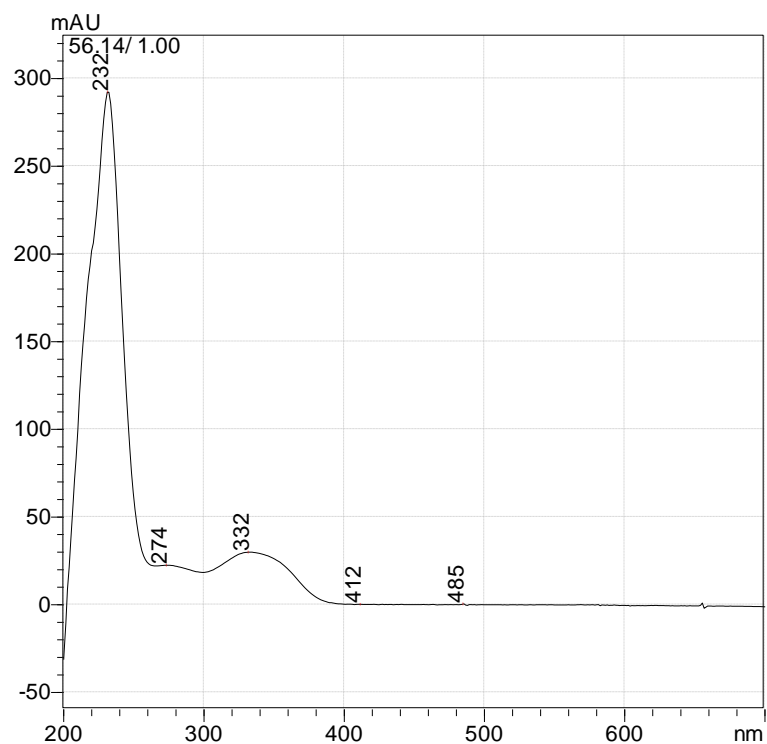
7. η-Χουμουλόνη (46.11min, 330nm)



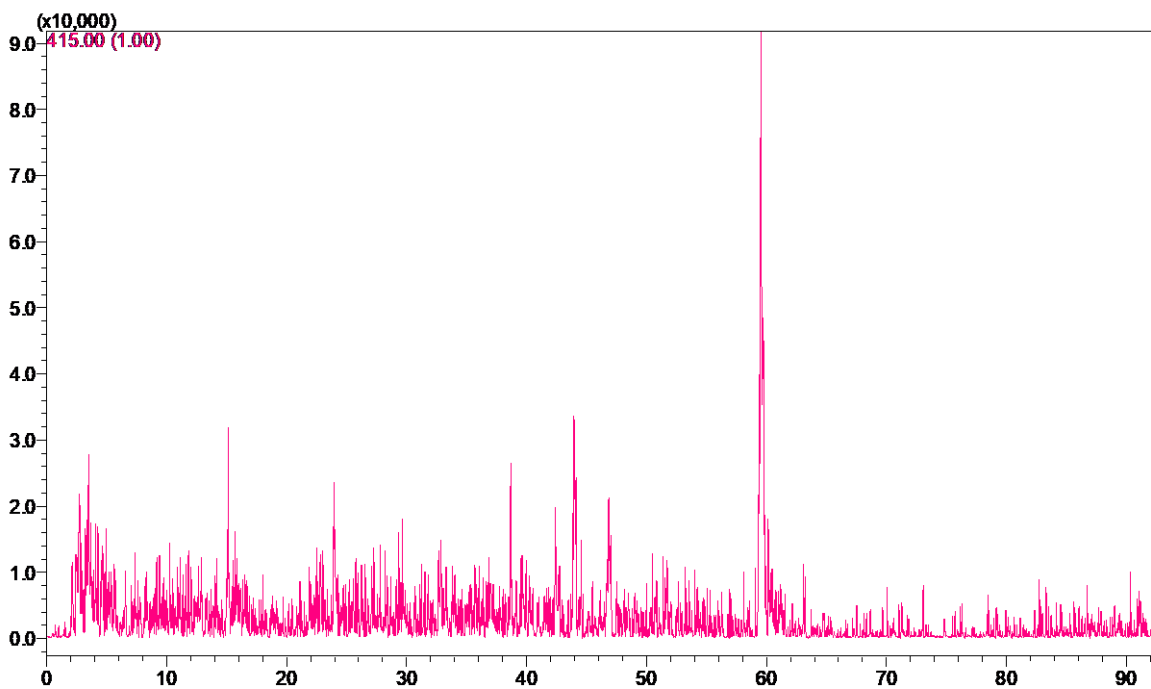
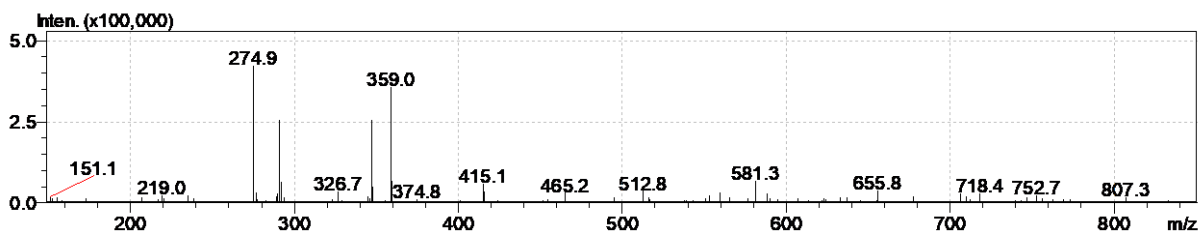
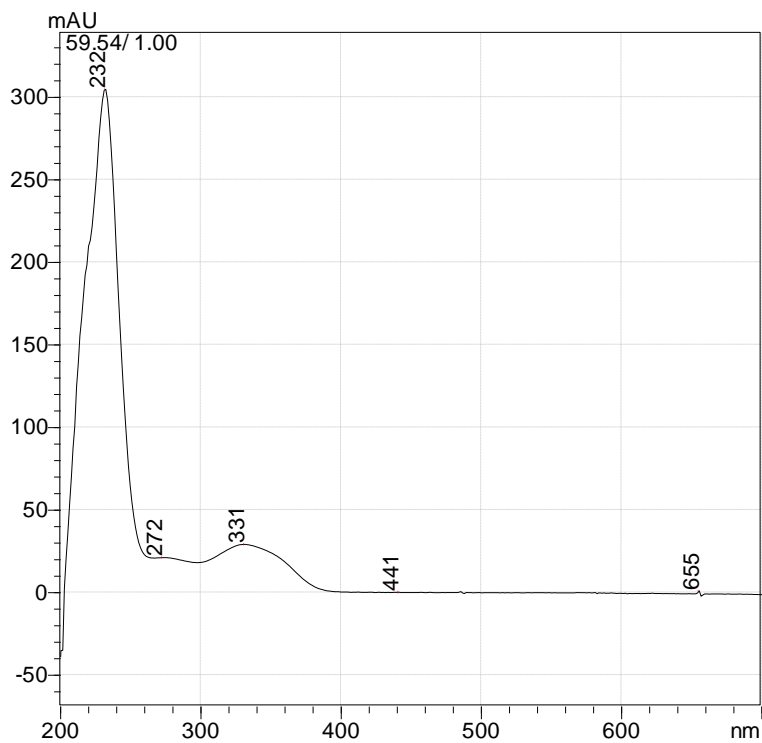
8. Αντχουμουλόνη (46.90min, 330nm)



9. Συνλουπουλόνη (56.14min, 330nm)



10. η-Λουπουλόνη (59.54min, 330nm)



11. Αντλουπουλόνη (60.39min, 330nm)

