

ANTIBAKTERIJSKI UČINKI HMELJA

Zala KOLENC¹ in Urban BREN²

Pregledni znanstveni članek / review article

Prispelo / received: 22. 6. 2020

Sprejeto / accepted: 29. 10. 2020

Izvleček

Hmelj ter hmeljni ekstrakti izkazujejo široko paleto blagodejnih bioloških aktivnosti vključno z antimikrobnimi lastnostmi. V članku so podane osnovne metode za določanje antibakterijske vrednosti naravnih ekstraktov. V nadaljevanju so sistematično predstavljene tudi znane antibakterijske lastnosti hmelja, hmeljnih ekstraktov ter posameznih hmeljnih komponent. Rezultati antimikrobnih študij so zelo uporabni zavoljo globalnega povečanja odpornosti bakterij na antibiotike. Naravni ekstrakti hmelja in drugih rastlin bi lahko učinkovito nadomestili antibiotike in pripomogli k zmanjšani antimikrobni rezistenci. Po drugi strani pa bi bili lahko hmeljni ekstrakti učinkovito uporabljeni tudi v farmacevtski, veterinarski, živilski in kozmetični industriji, saj se njihova antimikrobna aktivnost ekstraktov hmelja izkazuje na širokem spektru bakterij.

Ključne besede: hmelj, hmeljni ekstrakti, antibakterijska aktivnost

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF HOPS

Abstract

Hop and hop extracts exert a wide range of beneficial biological activities including antimicrobial properties. In this work, basic technologies to determine antibacterial activities of natural extracts, are presented. The studied antibacterial effects of hop, hop extracts and various hop components are discussed as well. Hop extracts and extracts from other plants should be effective in the fight against the increasing global antimicrobial resistance. On the other hand, hop extracts could be used in pharmaceutical, veterinary, food and cosmetic industries due to their significant antimicrobial activities against a wide range of bacteria.

Keywords: hops, hop extract, antibacterial activities

¹ asist.dr., Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor, e-pošta: zala.kolenc@um.si

² izr. prof. dr., Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor, e-pošta: urban.bren@um.si

1 UVOD

Narava nam je podarila več skupin kemijskih spojin rastlinskega izvora, ki premorejo številne blagodejne zdravstvene učinke. Mnoge lastnosti posameznih spojin so že znane, a vendar jih ne znamo popolnoma izkoriščati, saj še ne razumemo vseh njihovih mehanizmov delovanja. Po drugi strani pa se v zadnjih letih pojavljajo okužbe z bakterijami, ki jih zaradi antibakterijske odpornosti vedno težje zdravimo. Bakterije, ki so odporne na antibiotike se po svetu širijo zelo hitro, kar povzroča veliko težav pri zdravljenju infekcijskih bolezni. Antibakterijska odpornost je posledica neterapevtske uporabe ter nepravilne in prepogoste rabe antibiotikov (Kavanagh in sod., 2017). Po svetu že potekajo akcijski načrti (in tudi njihova izvedba) v obliki omejitvenih ukrepov pri uporabi antibiotikov za zdravje ljudi in živali (WHO, 2020), vendar to še zdaleč ne bo rešilo planetarnega izziva antimikrobne odpornosti. Zato je odkritje novih antibakterijskih spojin ključnega pomena. Več naravnih spojin, ki premorejo široko strukturno raznolikost, je v znanstveni literaturi navedenih kot potencialno antimikrobno sredstvo ali sredstvo za spreminjanje odpornosti (angl. resistance-modifying agent; RMA) (Gibbons, 2004). Takšne spojine bi predstavljale dragoceno vmesno rešitev, dokler ne bodo razviti novi antibiotiki (Abreu in sod., 2012).

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) predstavlja industrijsko rastlino, katere ženska socvetja (storžki) se množično uporabljajo v pivovarstvu. Storžki vsebujejo različne spojine, kot so hmeljne smole (sestavljene iz različnih grenčičnih spojin), eterična olja ter flavonoide, le-te pa igrajo pomembno vlogo v postopku varjenja piva. Hmelj se v pivovarstvu uporablja zavaljo grenčice, okusa in arome, po drugi strani pa premore še veliko drugih lastnosti (kot je na primer ohranjanje mikrobiološke stabilnosti) (Karabín in sod., 2016). Zaradi antimikrobnih učinkov hmelja, so bila močnejše hmeljena piva stila India Pale Ale v preteklosti sposobna »preživeti« ladijsko pot do angleških kolonij (Bartmańska in sod., 2018; Simpson in Smith, 1992). Te lastnosti so do nedavnega pripisovali predvsem grenčičnim kislinam. Še pred rabo hmelja v pivovarstvu, pa se je hmelj že tradicionalno uporabljal v medicinske namene predvsem za zdravljenje motenj spanja (kar s pridom koristimo še danes), za aktiviranje želodčnih funkcij in kot antibakterijsko ter antiglivično sredstvo (Bartmańska in sod., 2018; Zanolini in Zavatti, 2008). Navedene raziskave tudi dokazujejo, da predstavlja rastlina hmelja odličen vir naravnih spojin z antimikrobnimi učinki. Glede na pestro kemijsko sestavo hmelja in hmeljnih ekstraktov ter opažene antibakterijske aktivnosti bi ga bilo zelo smiselno izkoristiti tudi v farmacevtske, prehranske ter kozmetične namene kot tudi pri krmi živali. Hmelj namreč vsebuje grenčične kisline, katere vsebujejo tudi α -kisline in β -kisline, med katerimi sta najpomembnejša predstavnika humulon in lupulon (Karabín in sod., 2016). Poleg tega predstavljajo pomembno skupino spojin v hmelju tudi flavonoidi (kot na primer flavan-3-oli, proantocianidini, flavonoli, flavanoni ter prenilflavonoidi, katerih glavni predstavnik je

ksantohumul) (Bocquet in sod., 2018). Vse omenjene spojine premorejo potencialno antibakterijsko aktivnost, kar pa gre seveda pričakovati tudi pri eteričnih oljih (Karabín in sod., 2016; Zanolini in Zavatti, 2008).

Do danes je bilo objavljenih že precej raziskav (Abram in sod., 2015; Alonso-Esteban in sod., 2019; Arsene in sod., 2015; Bartmańska in sod., 2018; Bocquet in sod., 2018; Haas in Barsoumian, 1994; Jirovetz in sod., 2006; Klančnik in sod., 2010; Schurr in sod., 2015; Shen in Sofos, 2008; Weber in sod., 2019), v katerih so določali antimikrobno aktivnost več vrstam hmeljnih ekstraktov. V članku je sistematično predstavljeno katere metode najpogosteje uporabljamo za določanje antibakterijskih lastnosti rastlinskih ekstraktov, v nadaljevanju pa so sistematično podani še izsledki raziskav o antibakterijskih učinkih hmeljnih ekstraktov.

2 METODE ZA PROUČEVANJE ANTIBAKTERIJSKIH UČINKOV HMELJA

V znanstveni literaturi so objavljene različne metode za določanje antimikrobnih lastnosti rastlinskih ekstraktov (Klančnik in sod., 2010; Wiegand in sod., 2008; Andrews, 2001; Valgas in sod., 2007; Hrnčič in sod., 2019). Pri raziskavah naravnih ekstraktov metodologija ni striktno določena, kot je to vpeljeno pri določanju antimikrobne aktivnosti za antibiotike (Andrews, 2001). Metode se med seboj razlikujejo predvsem glede na vrsto ekstrakcije (topilo, čas ekstrakcije, ...), tip mikroorganizma, volumen inokuluma, potek rastne faze, uporabljeni medij in njegov pH, čas/temperaturo inkubacije ter glede na sam mikrobiološki test za ugotavljanje antimikrobnih lastnosti. Zato je rezultate posameznih študij težko neposredno primerjati med seboj in je potrebno dobro poznati različne metodološke pristope. Glavne skupine mikrobioloških metod za raziskovanje protimikrobnih učinkov naravnih ekstraktov predstavljajo difuzijske, dilucijske, bioavtografske ter nekatere novejšje uveljavljene metode (Hammud in sod., 2015).

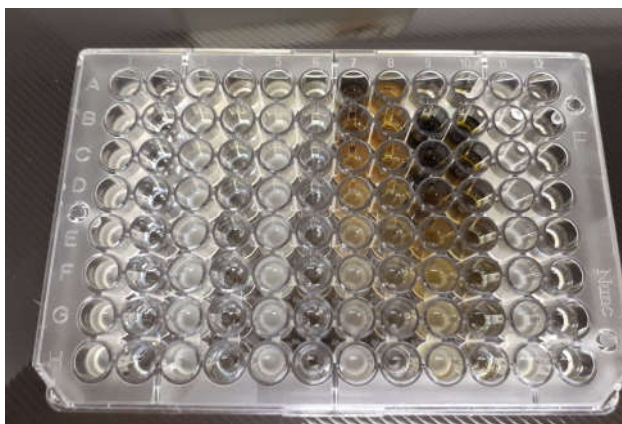
2.1 Metoda difuzije v agarju (z diski ali luknjicami)

Metoda difuzije v agarju je široko uporabna, vendar največkrat služi kot presejalna metoda za določanje antimikrobne aktivnosti, na podlagi pridobljenih rezultatov pa se izvedejo še bolj specifične metode. Osnovni potek metode difuzije v agarju z diski ali luknjicami je, da pripravimo agar (primeren glede na bakterijo, ki jo preiskujemo), ga primerno inokuliramo in nanj položimo papirnat disk ali pa vanj izrežemo luknjico (Valgas in sod., 2007; Wiegand in sod., 2008). Če torej izvajamo metodo z diski, preiskovani ekstrakt naneseemo na disk, v drugem primeru pa ekstrakt naneseemo v luknjice. Ekstrakt (ki v našem primeru predstavlja potencialno antimikrobno sredstvo) nato z diska/luknjice difundira skozi agar. Po inkubaciji se pri tem tvorijo tako imenovane inhibicijske cone brez bakterijskih kolonij, ki večji

kot imajo premer, bolj učinkovit je bil uporabljen ekstrakt (Klančnik in sod., 2010; Valgas in sod., 2007; Mazzei in sod., 2020).

2.2 Dilucijska metoda v bujonu ali agarju

Dilucijska metoda v bujonu ali agarju predstavlja najpogosteje uporabljeno tehniko za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) naravnih ekstraktov kot tudi antibiotikov ter drugih substanc, ki bi lahko izkazovale baktericidno ali bakteristatično aktivnost. MIC poda najnižjo koncentracijo testirane substance (ekstrakta), ki inhibira vidno rast mikroorganizmov po inkubaciji (Andrews, 2001). Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) pa je najnižja koncentracija substance (ekstrakta), ki prepreči rast mikroorganizma po precepljenju na sveže gojišče (Andrews, 2001). Kadar preiskovani ekstrakt redčimo v agarju, govorimo o dilucijski metodi v agarju. Kadar preiskovani ekstrakt redčimo v bujonu, pa govorimo o dilucijski metodi v bujonu. Pri slednji ločimo makrodilucijsko metodo, kadar uporabljamo volumne večje od 2 mL, in o mikrodilucijski metodi kadar raziskavo izvajamo na mikrotiterskih ploščah pri volumnih manjših od 500 μ L (Slika 1). Po inkubaciji pa motnost ali usedline označujejo rast mikroorganizmov, kar lahko izmerimo na osnovi določanja optične gostote, fluorescence ali luminiscence (Wiegand in sod., 2008; Andrews, 2001, Valgas in sod., 2007).



Slika 1: Primer mikrotiterske plošče po 24 urni inkubaciji, kjer so posamezni ekstrakti nanešeni v vsaki posamezni koloni, njihova koncentracija pa se zmanjšuje od zgoraj navzdol.

2.3 Bioavtografska metoda

Bioavtografska metoda temelji na principu, da v preiskovanem naravnem ekstraktu, posamezne spojine ločimo s tankoplastno kromatografijo (TLC) in jih z

avtobiografijo testiramo na željeni bakterijski kulturi. Posušen kromatogram prelijemo z gojiščem ter inokuliramo mikroorganizme, po inkubaciji na primerni temperaturi pa ovrednotimo nastale inhibicijske cone pri posameznih spojinah na kromatogramu (Nostro in sod. 2000, Hammud in sod., 2015).

2.4 Naprednejše metode

Učinke naravnih ekstraktov na bakterije je smiselno preučevati tudi s **krivuljo inhibirane rasti bakterij** oz. krivuljo odmiranja. Eno novejših metod pa je tudi preučevanje **post-antibiotskega učinka** (angl., post-antibiotic effect; PAE), kjer se določa čas zapoznele rasti bakterij po njihovi izpostavitvi preiskovani spojini (naravnemu ekstraktu) (Bocquet in sod., 2019). Poleg tega se pri bakterijah, s sposobnostjo tvorbe biofilmov, uporabljajo tudi tako imenovani **anti-biofilm testi**, pri katerih potrebujemo konfokalne laserske mikroskope (Liu in sod., 2015). Poleg samega raziskovanja antibakterijskih učinkov posameznih naravnih spojin, pa raziskovalci v zadnjem času dajejo velik pomen tudi raziskavam, kjer določajo njihov **sinergistični učinek** posameznih naravnih spojin z antibiotiki po metodi šahovnice (Bocquet in sod., 2019).

3 REZULTATI RAZISKAV ANTIBAKTERIJSKIH UČINKOV EKSTRAKTOV HMELJA

V Preglednici 1 so sistematično povzeti antibakterijski učinki glede na vrsto hmeljnega ekstrakta, tip mikrobiološke preiskave ter bakterij, ki so bile vključene v študijo.

Preglednica 1: Pregled objavljenih študij, kjer so preučevali antibakterijske vplive hmeljnih ekstraktov

Vrsta hmeljnega ekstrakta	Tip mikrobiološke raziskave	Uporabljene bakterije	Glavne ugotovitve	Vir
Etanolni ekstrakt hmelja (listi in storžki)	Določanje MIC vrednosti z mikrodilucijsko metodo v bujonu	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 (klinični izolat), <i>Escherichia coli</i> O157:H7ŽM 370 (klinični izolat)	Antimikrobna aktivnost za bakterijo <i>S. aureus</i> je bila izredna, saj so bile MIC vrednosti <0,003 mg/mL, po drugi strani je bila MIC vrednost za bakterijo <i>E.coli</i> >0,16 mg/mL. Prav tako so ugotovili, da je antimikrobna aktivnost ekstraktov hmeljnih storžkov znatno višja od ekstraktov hmeljnih listov.	Abram in sod., 2015
Metanolni ekstrakt hmelja (semena)	Določanje MIC in MBC vrednosti z mikrodilucijsko metodo v bujonu	<i>Bacillus cereus</i> (food isolate), <i>S. aureus</i> (ATCC11,632), <i>Listeria monocytogenes</i>	Uporabljeni ekstrakti so izkazali izjemno antimikrobno aktivnost, saj so bili pri skoraj vseh uporabljenih bakterijah boljši od pozitivnih kontrol.	Alonso - Esteban in sod., 2019

		(NCTC 7973), <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19,433), <i>E. coli</i> (ATCC35, 218), <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> (ATCC 13,311)		
Etanolni ekstrakt hmelja (storžki)	Določanje z metodo difuzije v agarju z diski	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>E. coli</i>	Rezultati so pokazali visoke inhibitorne učinke hmelja na bakterije. Največji učinek se je kazal pri <i>B. subtilis</i> in <i>S. aureus</i> . Pri <i>B. subtilis</i> je bila inhibitorna cona enaka kot pri pozitivni kontroli-antibiotik (vankomicin).	Arsene in sod., 2015
Ekstrakti ostankov hmelja (s topili: metilen klorid, etil acetat, aceton, metanol). Ekstrakti hmelja so bili z vsemi štirimi topili pripravljeni tudi z odstranitvijo ksantohumola. V analizo so bili vključeni tudi posamezni flavonoidi.	Določanje vrednosti MIC z mikrodilucijsko metodo v bujonu	<i>S. aureus</i> ATCC19095 (MSSA, enterotoksična), <i>S. aureus</i> ATCC29213 (MSSA), <i>S. aureus</i> ATCC43300 (MRSA), <i>L. monocytogenes</i> ATCC7644, <i>S. typhimurium</i> PCM2565, <i>Staphylococcus epidermidis</i> 91M (MRSE), <i>S. epidermidis</i> 4s (MSSE)	Vključeni ekstrakti so pokazali visoko antimikrobno učinkovitost, poleg tega so jo obdržali tudi po tem, ko so jim odstranili ksantohumul. Sedem izbranih flavonoidov hmelja je izkazalo pomembno antimikrobno aktivnost proti sevom <i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i> z najnižjo vrednostjo MIC80 0,5 µg/mL.	Bartma ņska in sod., 2018
Etanolni ekstrakt hmelja (storžki, listi, rizomi, stebila). Diklorometan je bil uporabljen za pripravo sub-ekstrakta storžkov. Izolirane so bile tudi posamezne komponente hmelja (humulon, kohumulon, adhumulon, lupulon, kolupulon, adlupulon).	→Metoda dilucije v agarju za določanje MIC vrednosti v ekstraktih in sub-ekstraktih →Mikrodilucijska metoda v bujonu za določanje antibakterijske aktivnosti posameznih komponent hmelja →Sinergistični učinek posameznih komponent hmelja z antibiotiki →krivulje rasti →post-	<i>S. aureus</i> (MSSA in MRSA), <i>Corynebacterium</i> (T25-17), <i>Enterococcus</i> (več sevov), <i>Mycobacterium smegmatis</i> 5003, <i>S. epidermidis</i> (več sevov), <i>Staphylococcus lugdunensis</i> T26A3, <i>Staphylococcus warneri</i> T12A12, <i>Streptococcus agalactiae</i> (več sevov), <i>Streptococcus dysgalactiae</i> T46C14, <i>Acinetobacter baumannii</i> (več sevov), <i>Citrobacter freundii</i>	Antibakterijska aktivnost etanolnih ekstraktov (stožkov) pri G+ bakterijah (<i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> in <i>Streptococcus</i>) je varirala od 39 do 156 µg/mL. Listi, stebila ter rizomi hmelja so kazali zelo šibko antibakterijsko aktivnost. Subekstrakt hmelja je bil preizkušen pri G+ bakterijah, kjer so bili enterokoki manj občutljivi kot stafilokoki in streptokoki. Sevi bakterije <i>S. aureus</i> so bili najbolj občutljivi (MIC 9,8 do 19,5 µg/mL). Lupulon se je izkazal z največjim antibakterijskim učinkom med preiskovanimi komponentami hmelja z MIC od 0,6 do 1,2 µg/mL za MRSA seve. Če izključimo lupulon, pa sta flavonoida ksantohumul in	Bocquet in sod., 2018

	antibiotski učinek posameznih komponent hmelja →anti-biofilm test	(več sevov), <i>Enterobacter cloacae</i> (več sevov), <i>E. coli</i> (več sevov), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (več sevov), <i>Proteus mirabilis</i> 11060, <i>Providencia stuartii</i> 11038, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (več sevov), <i>Salmonella</i> sp. 11033, <i>Serratia marcescens</i> (več sevov), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	desmetilksantohumul izkazala večjo protibakterijsko aktivnost kot grenčine kisline (MIC od 9,8 – 19,5 µg/mL (ksantohumul) in 19,5 – 39 µg/mL (desmetilksantohumul) za MRSA seve). Če so ksantohumul kombinirali z desmetilksantohumulom ali lupulonom, se je izkazal sinergistični učinek, medtem ko se je kombinacija desmetilksantohumola in lupulona izkazala za antagonistično. Poleg tega je večina komponent hmelja pokazala bodisi sinergističen bodisi aditiven učinek z antibiotiki, redko pa antagonističen. Posamezne komponente hmelja so povzročile tudi oteženo rast bakterij po izpostavitvi antibiotikom. Nenazadnje pa so preiskovane posamezne komponente pokazale tudi inhibitorni ter baktericidni učinek na nastanek biofilmov.	
Ekstrakt izohumulona (30 % vodna raztopina) ter ekstrakt β-kislin (48 %) z dodanimi 9 % α-kislin, olji in voski.	Štetje kolonij na trdnem gojišču ob dodatku ekstrakta	<i>S. aureus</i> ATCC 19095, <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>E. coli</i> B, <i>B. subtilis</i>	Dodatek 0,01 % do 0,03 % ekstrakta izohumulona je inhibiral rast <i>S. salivarius</i> , <i>S. aureus</i> in <i>B. megaterium</i> . Med tem ko je ekstrakt beta kislin inhibiral te mikroorganizme v koncentracijah od 0,003 % do 0,1 %.	Haas in Barsoumian, 1994
Eterično olje hmelja	Metoda difuzije v agarju ter metoda dilucije v agarju	<i>S. aureus</i> ATCC 25093, <i>E. faecalis</i> (klinični izolat), <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25517, <i>Klebsiella pneumoniae</i> (klinični izolat), <i>Proteus vulgaris</i> (klinični izolat), <i>Salmonella</i> sp. (klinični izolat)	Eterično olje izkazuje visoko antibakterijsko aktivnost za bakterije <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> in <i>Salmonella</i> sp. Ko so preiskovali tudi posamezne komponente eteričnega olja, so ugotovili, da ima zavoljo sinergističnega učinka najvišjo protimikrobno aktivnost ravno kombinacija vseh komponent eteričnega olja v primerjavi s posameznimi komponentami.	Jirovetz in sod., 2006
Etanolni ekstrakt hmelja	Metoda difuzije v agarju z diski ter mikrodilucijska metoda v agarju	<i>B. cereus</i> WSBC 10530, <i>S.s aureus</i> ATCC 25923, <i>Salmonella infantis</i> ŽM9, <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560, <i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559	Hmeljni ekstrakti so pri preiskovanih bakterijah kazali dobre rezultate in visoko protimikrobno aktivnost. Najnižja MIC vrednost se je videla pri bakteriji <i>S. aureus</i> (0,002 mg/mL).	Klančnik in sod., 2010
Izolirane	Določanje MIC	<i>Lactobacillus brevis</i>	Vsi preiskovani hmeljni derivati so	Schurr

spojine izo-/ko-/n-/ad- humulon in analogi	vrednosti z metodo mikrodilucije v bujonu ter uporabo barvila resazurin	(različni sevi)	izkazovali aktivnost. Pokazalo pa se je, da humulinska kislina pri preiskovani bakteriji nudi nižje MIC vrednosti v primerjavi z izo- α -kisljinami.	antibakterijsko in sod., 2015
30 % beta kisline v topilu (propilen glikol)	Gojenje bakterij v tekočem gojišču ob dodatku ekstrakta ter nato štetje kolonij na trdnem gojišču	Mešanica 10 sevov bakterije <i>L. monocytogenes</i>	Preiskovani ekstrakt beta kislin iz hmelja je izkazal visoko antilisterijsko aktivnost.	Shen in Sofos, 2008
CO ₂ ekstrakt hmelja	Določanje MIC vrednosti z metodo mikrodilucije v bujonu	<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> 2407, <i>S. aureus</i> 4810 (MRSA)	CO ₂ ekstrakt je pokazal visoko antibakterijsko aktivnost pri izbranih bakterijah. MIC vrednost za <i>P. acnes</i> je bila 3,1 μ g/mL, ter za <i>S. aureus</i> 9,4 μ g/mL.	Weber in sod., 2019

Različni hmeljni ekstrakti so že bili preiskovani, najde pa se zelo malo objav o antimikrobni aktivnosti njegovega eteričnega olja (Jirovetz in sod., 2006; Knez Hrnčič in sod. 2019). Znana je na primer aktivnost eteričnega olja hmelja proti tvorjenju bakterijskih biofilmov (Alibi in sod., 2020). So pa zato bolj raziskane posamezne komponente hmeljnega eteričnega olja in njihova antimikrobna dejavnost (Karabín in sod., 2016; Jirovetz in sod., 2006). V Preglednici 1 je podan pregled objav, kjer so proučevali aktivnost različnih hmeljnih ekstraktov na bakterije. Poleg teh raziskav pa je veliko člankov vključevalo tudi druge mikroorganizme kot so virusi, plesni in kvasovke (Bartmańska in sod., 2018; Bocquet in sod., 2019; Natarajan in sod. 2008; Nionelli in sod., 2018; Srinivasan in sod., 2004; Wasilewski in sod., 2016). Hmelj ima na kvasovke zelo majhen inhibični učinek, kar se smiselno izrablja tudi pri proizvodnji piva. Za antimikrobni učinek na kvasovke bi zato potrebovali ogromne količine hmelja (Karabín in sod., 2016). Po drugi strani pa je veliko objav poleg antimikrobne aktivnosti proučevalo tudi antioksidativni potencial ekstraktov hmelja (Abram in sod., 2015; Alonso-Esteban in sod., 2019; Arsene in sod., 2015; Weber in sod., 2019). Ugotovili so, da hmeljni listi izkazujejo veliko manjšo antioksidativno aktivnost v primerjavi s hmeljnimi storžki (Abram in sod., 2015). Z metodo inhibicije tiobarbiturne kisline so visoko antioksidativno aktivnost pokazala tudi hmeljna semena (Alonso-Esteban in sod., 2019). Zaradi visoke antioksidativne učinkovitosti hmeljnih ekstraktov bi jih lahko na podlagi opisanih raziskav vključili kot funkcionalno sestavino v prehranske in/ali farmacevtske produkte za podaljšanje njihove življenjske dobe (Alonso-Esteban in sod., 2019; Weber in sod., 2019).

V znanstveni literaturi so že opisani molekularni mehanizmi kako v bakterijskih celicah učinkujejo posamezne hmeljne komponente (Karabín in sod., 2016). α -kislina, β -kislina ter izo- α -kislina se vključujejo v celično membrano in tam delujejo kot mobilni ionofor, ki katalizira procese vključno z elektronevtralizacijo nedisociranih molekul, ki vstopajo v celico. Nadalje katalizirajo tudi izmenjavo protonov z divalentnimi kationi kot je Mn^{2+} , ter skrbijo za izstop nastalih kompleksov iz celice. Ti opisani procesi pa vodijo v akumulacijo protonov znotraj celice in v zniževanje transmembranskega protonskega gradienta, kar privede do manjšega privzema hranil, pomanjkanja hranil in posledično celične smrti (Sakamoto in Konings, 2003; Karabin in sod., 2016). Sakamoto in Konings (2003) sta ugotovila, da je antimikrobna aktivnost α -kislina in β -kislina mnogo večja v primerjavi z izo- α -kislina. Zelo podoben mehanizem antimikrobnega delovanja pa se je izkazal tudi za hmeljne flavonoide (predvsem ksantohumol) (Karabín in sod., 2016).

4 IZKORIŠČANJE ANTIBAKTERIJSKIH UČINKOV HMELJA

Hmelj, hmeljni ekstrakti in posamezne hmeljne komponente izkazujejo antimikrobno aktivnost na več področjih, vendar njihova učinkovitost ni enaka tej, ki jo imajo antibiotiki (Karabín in sod., 2016). Vseeno pa so raziskovalci (Natarajan in sod., 2008) ugotovili, da posedujeta lupulon in ksantohumol velik sinergistični učinek z antibiotiki (polimiksin B sulfat, tobramicin ter ciprofloksacin). MIC vrednosti, ki so jih določali, ko so antibiotike uporabili skupaj z lupulinom ter ksantohumolom, so bile znatno nižje v primerjavi s čistimi antibiotiki. Takšne rezultate so opazili tako pri gram pozitivnih (G+) bakterijah kot pri gram negativnih (G-) bakterijah. Kar nakazuje na smiselnost uporabe hmelja v medicini, farmaciji ter veterini (Karabín in sod., 2016). Nadalje so spoznali, da hranjenje piščancev (brojlerjev) s hmeljem znatno izboljša njihovo rast in prirast zavoljo njegovih antimikrobnih lastnosti. Posledično je bila izkazana veliko manjša potreba po antibiotikih, ki izboljšujejo rast živali (Cornelison in sod., 2006). Na področju živilske industrije je znana uporaba β -kislina iz hmelja v industriji sladkorja, saj so le-te izjemno učinkovite pri zaviranju tvorbe NO_2 in razvoja anaerobnih bakterij, ki kvarijo izdelke (Pollach in sod., 2002). Nadalje so ugotovili, da so β -kislina zelo uporabne pri preprečevanju razvoja bakterij v gostih sokovih. Le-te sicer niso pokazale baktericidnega učinka, vendar so uspešno preprečile razvoj novih bakterij v sokovih (Justé in sod., 2007). Takšna uporaba β -kislina je zelo smiselna, saj v primerjavi z α -kislina posedujejo manj grenčičnega okusa, ki je v živilski industriji zelo nezaželen. Prav tako pa grenkega okusa sploh nima humulinska kislina (komponenta hmeljnih ekstraktov), kar bi zelo pozitivno vplivalo na njeno uporabo v namene konzerviranja hrane. Po drugi strani pa je prav za humulinsko kislino (ki je pridobljena iz izo- α -kislina) določena najnižja MIC vrednost $1,4 \mu M$ za bakterijo *L. brevis* izmed vseh do zdaj preiskovanih hmeljnih komponent (Karabín in sod., 2016). V prehranske namene so že uspešno uporabili

hmeljne ekstrakte, ki so izkazali antilisterijski učinek (*L. monocytogenes*) v mleku in nekaterih mlečnih izdelkih (skuta, sir) (Larson in sod., 1996). Tudi ti hmeljni ekstrakti so vsebovali visoko količino β -kislin. Nedavne raziskave pa kažejo, da so imeli hmeljni ekstrakti znatno aktivnost proti bakterijam, ki povzročajo akne. Hmeljni CO₂ ekstrakti (z visokim deležem humulona in lupulona) so pri nizkih MIC vrednostih (3,1 in 9,4 μ g/mL) namreč inhibitorno delovali na bakteriji *P. acnes* ter *S. aureus* (eni izmed glavnih povzročiteljev aken) (Weber in sod., 2019). Dobljeni rezultati kažejo na smiselno uporabo hmeljnih ekstraktov v kozmetični industriji. Nenazadnje pa so v nedavni raziskavi ugotovili tudi inhibitorni učinek hmeljnih CO₂ ekstraktov na bakterije, ki se pojavljajo v toaletnih prostorih. Ko so hmeljni ekstrakt v koncentraciji 0,1 % dodali testni formuli čistila, so namreč ugotovili, da izkazuje izjemno učinkovitost proti bakteriji *S. aureus* (Wasilewski in sod., 2016). Poleg tega pa je dodatek izboljšal tudi tehnološke lastnosti čistila (viskoznost, raztapljanje v vodi ter moč lepljenja na površine) (Wasilewski in sod., 2016).

5 ZAKLJUČEK

V preglednem članku so predstavljene metode za določanje antimikrobnih lastnosti naravnih rastlinskih ekstraktov, poleg tega pa so sistematično povzete raziskave o antibakterijskih učinkih hmeljnih ekstraktov. Opisane so tudi študije, kjer so bile antimikrobne lastnosti hmelja uspešno uporabljene v praksi. Vsekakor pa hmelj zavoljo svoje antibakterijske aktivnosti poseduje še zelo velik neizkoriščen potencial za širšo rabo v živilski, farmacevtski, veterinarski in kozmetični industriji.

6 LITERATURA

- Abram V., Čeh B., Vidmar M., Hercezi M., Lazić N., Bucik V., Možina S., Košir I., Kač M., Demšar L., Poklar Ulrih N. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products*. 2015; 64: 124-134.
- Abreu A.C., McBain A.J., Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*. 2012; 29: 1007–1021.
- Alibi S., Selma W. B., Ramos-Vivas J., Smach M. A., Touati R., Boukadida J., Mansour H. B. Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*. 2020; 68(2): 59–66.
- Alonso-Esteban J., Pinela J., Barros L., Ćirić A., Soković M., Calhella R., Torija-Isasa E., de Cortes Sánchez-Mata M., Ferreira I. Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. *Industrial Crops and Products*. 2019; 134: 154-159.
- Andrews J. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 48: 5-16.

- Arsene A. L., Rodino S., Butu A., Petrache, Iordache O., Butu M. Study on antimicrobial and antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of *Humulus lupulus*. *Farmacia*. 2015; 63(6): 851-857.
- Bartmańska A., Wałęcka-Zacharska E., Tronina T., Popłoński J., Sordon S., Brzezowska E., Bania J., Huszcza E. Antimicrobial Properties of Spent Hops Extracts, Flavonoids Isolated Therefrom, and Their Derivatives. *Molecules*. 2018; 23(8): 2059.
- Bocquet L., Rivière C., Dermont C., Samaillie J., Hilbert J., Halama P., Siah A., Sahpaz S. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Industrial Crops and Products*. 2019; 122: 290-297.
- Cornelison J. M., Yan F., Watkins S. E., Rigby L., Segal J. B., Waldroup P. W. Evaluation of Hops (*Humulus lupulus*) as an Antimicrobial in Broiler Diets. *International Journal of poultry Science*. 2006; 5(2): 134-136.
- Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*. 2004; 21: 263-277.
- Haas G, Barsoumian R. Antimicrobial Activity of Hop Resins. *Journal of Food Protection*. 1994; 57(1): 59-61.
- Hammud K. K., RyadhRaheemNeema, Ali S., Hamza I. S. Direct Solid Disc as a Novel antibacterial testing method. *International journal of advances in Pharmacy, biology and chemistry*. 2015, 4(4): 844-851.
- Knez Hr    M.,  paninger E., Ko ir I., Knez  ., Bren U. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients*. 2019, 11(2): 257.
- Jirovetz L., Bail S., Buchbauer G., Denkova Z., Slavchev A., Stoyanova A., Schmidt E., Geissler M. Antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and olfactory evaluation of an essential oil of hop cones (*Humulus lupulus* L.) from Bavaria and some of its main compounds. *Scientia Pharmaceutica*. 2006; 74(4): 189-201.
- Just  A., Krause M., Lievens B., Klingeberg M., Michiels C., Willems, K. Protective effect of hop β -acids on microbial degradation of thick juice during storage. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 104: 51-59
- Karabín M., Hudcov  T., Jel nek L., Dost lek, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15(3): 542-567.
- Kavanagh K. T., Abusalaim S., Calderon L. E. The incidence of MRSA infections in the United States: Is a more comprehensive tracking system needed? *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2017; 6: 34.
- Klan nik A., Piskernik S., Jer ek B., Mo ina S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2010; 81(2): 121-126.
- Larson A. E., Yu R. R., Lee O. A., Price S., Haas G. J., Johnson E. A. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology*. 1996; 33(2-3): 195-207.
- Liu H., Zhao Y., Zhao D., Gong T., Wu Y., Han H., Qu D. (2015). Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical staphylococcus strains. *Emerging Microbes & Infections*. 2015; 4(1): 1-6.
- Mazzei R., Leonti M., Spadafora S., Patitucci A., Tagarelli G. A review of the antimicrobial potential of herbal drugs used in popular Italian medicine (1850s-1950s) to treat bacterial skin diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 2020; 250: 112443.

- Natarajan P., Katta S., Andrei I., Ambati V. B. R., Leonida M., Haas, G. Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. *Phytomedicine*. 2008; 15(3): 194–201.
- Nionelli L., Pontonio E., Gobetti M., Rizzello C. G. Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2018; 266: 173–182.
- Nostro A., Germano M., Dangelo V., Marino A., Cannatelli, M. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 2000; 30(5): 379–384.
- Pollach G., Hein W., Beddie D. Application of hop β -acids and rosin acids in the sugar industry. *Zuckerindustrie* 127. 2002; 12: 921–390.
- Sakamoto K., Konings W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 89(2-3): 105–124.
- Shen C, Sofos J. Antilisterial Activity of Hops Beta Acids in Broth with or Without Other Antimicrobials. *Journal of Food Science*. 2008; 73(9): M438-M442.
- Schurr B, Hahne H, Kuster B, Behr J, Vogel R. Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- α -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*. 2015; 46: 553–563.
- Simpson W.J., Smith A.R. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992; 72: 327–334.
- Srinivasan V., Goldberg D., Haas G. J. Contributions to the Antimicrobial Spectrum of Hop Constituents. *Economic Botany*. 2004; 5: S230-S238.
- Valgas C, Souza S, Smânia E, Smânia Jr. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38(2): 369–380.
- Wasilewski T., Czerwonka D., Piotrowska U. Effect of the Concentration of Hop Cone Extract on the Antibacterial, Physico-Chemical and Functional Properties of Adhesive Toilet Cleaners. *Tenside Surfactants Detergents*. 2016; 53(4): 368–374.
- Weber N, Biehler K, Schwabe K., Haarhaus B., Quirin K.-W., Frank U., Wölflle U. Hop Extract Acts as an Antioxidant with Antimicrobial Effects against *Propionibacterium Acnes* and *Staphylococcus Aureus*. *Molecules*. 2019; 24(2): 223.
- WHO, 2020, Global plan action on antimicrobial resistance. (22.5.2020)
<https://www.who.int/publications-detail/global-action-plan-on-antimicrobial-resistance>
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Natural Protocols*. 2008, 3(2): 163–175.
- Zanoli P., Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, 116: 383–396.