

Mestna občina Celje  
Komisija Mladi za Celje

**HMELJ IN BAKTERIJE**  
RAZISKOVALNA NALOGA



Šifra: FONTANA PIVA

Letnik: 2. letnik

Celje, marec 2017

## **ZAHVALA**

Najprej bi se najlepše želela zahvaliti svoji mentorici – profesorici Majdi Kamenšek Gajšek, ki me je vedno znova spodbujala, nudila strokovno pomoč, podporo in čas, zame in mojo raziskovalno nalogo. Brez nje ne bi prišla do spoznanj, ki me bogatijo.

Zahvala tudi gospodu laborantu na Gimnaziji Celje - Center Mitji Teliču. Njegove izkušnje, pomoč in nasveti pri poskusih so mi pomagali realizirati to raziskovalno nalogo.

Zahvalila bi se tudi celotnemu učiteljskemu zboru za izkazano razumevanje glede odsotnosti od pouka, še posebej našemu ravnatelju, ki podpira mlade raziskovalce na GCC. Hvala prof. Mojci Utroša za jezikovni pregled naloge.

Hvala tudi vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri mojem raziskovanju.

## POVZETEK

Sem dijakinja Gimnazije Celje - Center in izdelala sem raziskovalno nalogo z naslovom Hmelj in bakterije.

Pivo je ena najstarejših alkoholnih pijač, kar jih pozna človeška zgodovina. Izdelujemo ga iz ječmena, koruze, ovs, pšenice ali drugih žitaric, ki so osnovni vir energije za alkoholno vrenje, ki ga opravljajo glive kvasovke. Naši predniki so se zelo zgodaj z izkušnjami naučili, da je okus piva lahko zelo različen, kljub podobnemu receptu. Zato so zgodaj začeli mešanici dodajati med in sladkor, kar je omogočilo pridobivanje piva z boljšim okusom. Med in sladkor dajeta kvasovkam hitro dostopno energijo in zato pri delovanju prednost med različnimi bakterijami, ki se lahko naselijo na osnovne sestavine za pridobivanje piva. Pri prvih vrenjih piv so naši predniki uporabljali divje seve bakterij in kvasovk. Pri takšnem vrenju so prisotni tudi drugi mikroorganizmi, predvsem mlečnokislinske bakterije, katerih delovanje daje pivu neprijeten kisel okus in aromo. Zato so sčasoma pivo začeli izdelovati po vročem postopku, katerega osnova je pasterizacija sladu in s tem uničevanje drugih mikroorganizmov (bakterije in plesni). Nezaželen kisel in grenak okus dajejo pivu najpogosteje mlečnokislinske bakterije, ki so prisotne v okolju, ki ni sterilno. Uporaba hmelja kot dodatka pivu je te probleme zmanjšala. Hmelj so naši predniki začeli uporabljati kot dodatek pivu v 9. stoletju. Njegova uporaba se je hitro razširila po vsej Evropi. Danes je hmelj »zeleno zlato« Savinjske doline. Gojimo ga tudi na naši kmetiji. Zato me je zanimalo, kako hmelj deluje na bakterije.

Predpostavila sem, da deluje antibaktericidno na vse bakterije, kar sem preverila na ječmenovih semenih. Semena ječmena sem stresala z različnimi mediji in jih tako dezinficirala. Uporabila sem navadno vodovodno vodo, sterilizirano destilirano vodo, sterilno hmeljevo raztopino in 30 % vodikov peroksid. Ugotovila sem, da je dezinfekcija s hmeljevo raztopino uspešna. Hmeljeva raztopina je odstranila bistveno več bakterij kot navadna voda in sterilizirana destilirana voda, vendar manj kot 30 % vodikov peroksid, ki se sicer uporablja za dezinfekcijo semen.

Moja druga predpostavka je bila, da hmelj zavira rast mlečnokislinskih bakterij. To sem preverila tako, da sem mlečnokislinske bakterije nacepila na navadno gojišče in gojišči z različno koncentracijo hmeljevega ekstrakta. Tudi v tem primeru je bila moja hipoteza potrjena, saj je bila rast mlečnokislinskih bakterij na gojišču z dodanim hmeljevim ekstraktom zavrta. Oboji rezultati potrjujejo, da uporaba hmelja pri pripravi piva vpliva na bakterije, ki se lahko pojavljajo v vrelni mešanici in s svojim vplivom spremenijo okus in aromo piva.

## KAZALO VSEBINE

1.	UVOD .....	8
1.1	Opis raziskovanja zastavljenega dela .....	8
1.2	Zgodovina pivovarstva in piva .....	8
1.3	Surovine pri proizvodnji piva .....	10
1.4	Tehnološki postopek izdelave piva .....	10
1.4.1	Priprava slada .....	10
1.4.2	Alkoholno vrenje ali fermentacija in zorenje piva .....	11
1.4.3	Filtracija piva.....	11
1.4.4	Stabiliziranje piva.....	11
1.4.5	Polnjenje piva.....	11
1.5	Kisla piva.....	11
1.6	Hmelj.....	12
1.7	Bakterije .....	13
1.8	Mlečnokislinske bakterije.....	13
1.9	Plesni .....	14
1.10	Vodikov peroksid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	15
1.11	Kvasovke .....	15
2	HIPOTEZE.....	16
3	METODOLOGIJA.....	16
3.3	1. FAZA: VPLIV RAZLIČNIH MEDIJEV NA DEZINFEKCIJO JEČMENOVIH SEMEN 17	
3.3.1	Material: .....	17
3.3.2	Priprava medijev za dezinfekcijo: .....	18
3.3.3	Priprava gojišča za testiranje semen: .....	19
3.3.4	Postopek dezinfekcije ječmenovih semen: .....	19
3.3.5	Testiranje semen na prisotne bakterije in plesni na gojiščih .....	20
3.3.6	Inkubiranje bakterijskih gojišč s semeni .....	20
3.3.7	Dokumentiranje rezultatov .....	21
3.3.8	Obdelava podatkov:.....	21
3.3.9	Material .....	22
3.3.10	Priprava gojišč.....	22
3.3.11	Priprava kulture mlečnokislinskih bakterij.....	22
3.3.12	Nanos mlečnokislinskih bakterij na gojišča .....	22
3.3.13	Inkubacija gojišča.....	22

4	REZULTATI.....	23
4.1	Rezultati poskusa vpliva hmeljevega ekstrakta kot antibakterijske snovi na razvoj bakterij okoli ječmenovih semen.....	23
4.2	Rezultati poskusa vpliva hmeljevega ekstrakta kot antibakterijske snovi na razvoj mlečnokislinskih bakterij .....	29
5	RAZPRAVA .....	30
6	ZAKLJUČEK.....	31
7	LITERATURA.....	32
8	VIRI SLIK.....	32

## KAZALO SLIK

Slika 1: Ekonom lonec .....	18
Slika 2: Erlenmajerice s hmeljevim ekstraktom in destilirano vodo .....	19
Slika 3: Ječmenova semena razdeljena v 4 skupine .....	20
Slika 4: Inkubirana gojišča pri sobnih pogojih .....	20
Slika 5: Razvoj bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v vodovodni vodi, po 4 dneh .....	27
Slika 6: Razvoj bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilizirani destilirani vodi, po 4 dneh .....	27
Slika 7: Razvoj bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v peroksidu (30 %), po 4 dneh .....	28
Slika 8: Razvoj bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilni raztopini hmeljevega ekstrakta, po 4 dneh .....	28

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Načrt dela – vpliv različnih medijev na dezinfekcijo semen .....	17
Preglednica 2: Načrt dela - vpliv hmeljevega ekstrakta na uspevanje mlečnokislinskih bakterij .....	21
Preglednica 3: Seštevek bakterijskih kolonij okoli ječmenovih semen spiranih, v vodovodni vodi, po treh dneh.....	23
Preglednica 4: Seštevek bakterijskih kolonij okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilni destilirani vodi, po 3 dneh.....	23
Preglednica 5: Seštevek bakterijskih kolonij okoli ječmenovih semen, spiranih v peroksidu (30 %), po 3 dneh .....	24
Preglednica 6: Seštevek bakterijskih kolonij okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilni raztopini hmeljevega ekstrakta, po 3 dneh .....	24
Preglednica 7: Seštevek bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v vodovodni vodi, po 4 dneh.....	25
Preglednica 8: Seštevek bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilizirani destilirani vodi, po 4 dneh .....	25
Preglednica 9: Seštevek bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v peroksidu (30 %), po 4 dneh. ....	26
Preglednica 10: Seštevek bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilni raztopini hmeljevega ekstrakta, po 4 dneh .....	26
Preglednica 11: Rezultati števila mlečnokislinskih bakterij na gojiščih .....	29
Preglednica 12: Rezultati kontrolnih poskusov .....	30

## 1. UVOD

### 1.1 Opis raziskovanja zastavljenega dela

Hmelj je že več stoletij ena najpomembnejših sestavin pri proizvodnji piva. Ne samo zaradi grenkobe in okusa, ki ga daje pivu, ampak tudi zaradi svojih antibaktericidnih lastnosti. Ker proizvodnja piva ne poteka v sterilnih pogojih, lahko v proces zaidejo različne bakterije, predvsem mlečnokislinske, ki lahko v pivu povzročijo mlečnokislinsko in druga vrenja, kar predstavlja napako v proizvodnji.

V preteklosti so pivovarji kot dodatek pivu, predvsem za okus in stabilizacijo, uporabljali različne rastline. Ker so ječmenova semena ena glavnih sestavin pri proizvodnji piva, saj so vir energije za kvasovke, sem jih uporabila pri raziskovanju in na njih želela preveriti, kakšne so antibaktericidne lastnosti hmelja. To sem preverila tako, da sem ječmenova semena spirala z različnimi snovmi in opazovala, koliko bakterij je na njih ostalo.

Ker so v proizvodnji piva mlečnokislinske bakterije tiste, ki lahko vplivajo na proces proizvodnje piva in alkoholnega vrenja, sem želela preizkusiti vpliv hmelja nanje.

### 1.2 Zgodovina pivovarstva in piva

Pivo je ena najstarejših pijač, kar jih pozna človeška zgodovina. Stari narodi so izdelovali pivo samo z vrenjem, s pomočjo človeške sline, ki z encimom amilazo, ki ga vsebuje, razgradi škrob in omogoči razvoj kvasovkam, ki povzročijo alkoholno vrenje. Varilno snov, semena ječmena, koruze ali drugih žit so ljudje žvečili, potem pa izpljunili v posode in pomešali z vodo in ostalimi sestavinami za proizvodnjo piva.

Nekatera ljudstva še danes varijo pivo na takšen način. Tako poznamo v Afriki pivo pombe, v Ameriki čičo, v Sahelu pri Dogonih pa koni. Kot varilno snov so različni narodi uporabljali različna žita. V Babilonu in Egiptu ječmen in pšenico, v Afriki proso, ječmen rž in oves, v Južni Ameriki koruzo.

Temu prvemu obdobju je sledil napredek, ki je izhajal iz izkušenj. Babilonci in Egipčani so iz žit začeli pridobivati slad tako, da so žita zakopali, namočili in prekrili z listjem, pustili kaliti in na koncu prepražili. Pri tem postopku se je med začetkom kalitve semen škrob z encimi kalčka pretvarjal v maltozo – sladni sladkor, kar je osnova pivovarstva. Tako so pridobili več sladkorja, pospešili alkoholno vrenje in nastanek ogljikove kisline ter s tem pivo izboljšali. Takšen je bil tudi prvi recept za varenje piva, ki so ga Babilonci zapisali leta 1800 pr. n. št.

Postopek priprave je tako napredoval od mrzle priprave na vročo, ki vsebuje kuhanje sladice. Oslajenje žita se je pospešilo in izboljšal se je okus. Pivo je imelo tudi več alkohola, vendar je bilo še vedno zelo kvarljivo. To so skušali omejiti z dodajanjem sladkorjev kalečim semenom ali sladu. Uporabljali so predvsem med in sok sladkornega trsa. Takšno pivo je imelo več alkohola in je bilo obstojnejše.



Najstarejši dokument, ki priča o proizvodnji piva je bil najden v Mezopotamiji in je star 8000 let. To je glinasta ploščica, na kateri je vrezan prizor varjenja piva v žrtvene namene. (Repe, 1993)

Vsak pivovar je imel svoj recept in svoje skrivnosti. Pivu so dodajali janež, kumino, gorčico, brinje, nageljnove žbice ... Velika sprememba v pivovarstvu je nastopila, ko so pivu začeli dodajati hmelj. Prvi so ga začeli v 8. ali 9. stoletju uporabljati Čehi. Z njegovo uporabo se je začelo obdobje modernega pivovarstva. V 15. ali 16. stoletju je bilo pivovarstvo na Češkem, Moravskem in v Šleziji že močno razvito. Sčasoma se je dodajanje hmelja pivu čedalje bolj uveljavljalo in od druge polovice 18. stoletja izpodrinilo vse ostale začimbe.

Pivovarstvo se je širilo kot obrtna dejavnost do srede 19. stoletja. Veliko mest po svetu je imelo številne manjše pivovarne in vse več tudi velikih. Dokler niso izumili hladilnih naprav in uporabe naravnega ledu, je bilo pivo predvsem sezonski izdelek. Varili so ga v zimskih mesecih in hranili do poletja v kamnitih kletah in skalnih votlinah.

Ob koncu prve polovice 19. stoletja je prišlo do izumov, ki so omogočili sodobno industrijsko proizvodnjo piva. Leta 1880 je Pusch razvil prvi strojni polnilnik za sode. Nемеc Carl Linde je leta 1876 izdelal hladilni stroj na amonijak. Leta 1905 pa je Adolf Baschofen patentiral postopek in napravo za izobarometrično polnjenje piva v sode, kar se je ohranilo do danes. Od leta 1861 se je pivo shranjevalo tudi v steklenicah in bilo tako bolj kakovostno ter ostalo dlje časa sveže kot tisto iz soda. Po letu 1960 so lesene sode zamenjali cilindrični kovinski sodi.

V razvoj pivovarstva so vključili tudi znanstvene raziskave. Nizozemec Anton van Leeuwenhoek je leta 1680 pod mikroskopom dokazal obstoj kvasovk, kar je temelj sodobnega pivovarstva. Francoz Louis Pasteur je leta 1856 odkril in razjasnil proces alkoholnega vrenja ali fermentacije. Odkril je tudi pasterizacijo, kar je omogočilo proizvodnjo piva, ki je obstojnejše in se ne kviri tako hitro.

V 20. stoletju se je pivovarska industrija razvila v eno največjih in najpomembnejših industrijskih panog. Med obema svetovnjima vojnoma je sicer proizvodnja padla, propadle so različne pivovarne, predvsem zaradi pomanjkanja surovin, najbolj pa je pivovarstvo prizadela gospodarska kriza v tridesetih letih.

V današnjem času je največja pivovarna na svetu ameriška pivovarna Anheuser – Busch. V enem letu proizvedejo 40 milijonov hektolitrov. Naslednja je pivovarna Guinness na Irskem, ki je tudi največji izvoznik piva. Med uglednejšimi so tudi danski Tuborg in nizozemski Heineken.

Pivovarstvo ima dolgo tradicijo tudi v Sloveniji, saj prvi ohranjeni dokumenti, ki pričajo o varjenju piva v naših krajih, segajo v 13. stoletje. Ob koncu 19. stoletja so se obrtne in rokodelske pivovarne hitro širile po deželi. Največje med njimi so zvarile tudi do 3000 hl piva. Po prvi svetovni vojni so se vse slovenske pivovarne počasi združile v delniško družbo. Na Vrhniki so prenehali variti pivo leta 1922, prav tako v

Mengšu, leto 1925 pa je bilo usodno še za pivovarne v Kočevju, Kranju in Žalcu. Po drugi svetovni vojni so prevladale tri velike pivovarne: Union, Laško in Talis. Pojavile pa so nove manjše pivovarne, kot so pivovarna Adam Ravbar iz Domžal, pivovarna Kratochwill in druge.

### 1.3 Surovine pri proizvodnji piva so:

- pivovarski ječmen, ki se po posebni tehnologiji predela v slad,
- kakovostna voda,
- hmelj,
- pivski kvas.

Vsaka od sestavin ima pri proizvodnji točno določeno nalogo. Voda, ki je osnovna sestavina pijač, je tudi v proizvodnji piva nepogrešljiva sestavina, saj deluje kot topilo in medij. Polnost in jakost izdelka sta odvisni od slada, hmelj pa daje pivu značilen vonj in grenak okus. Pivski kvas je osnovni vir organizmov, ki povzročajo alkoholno vrenje, med katerim se sladkor spremeni v alkohol in ogljikov dioksid. Pri tem kvasovke rastejo in se razmnožujejo.

### 1.4 Tehnološki postopek izdelave piva:

Tehnološki postopek proizvodnje piva obsega več faz.

#### 1.4.1 Priprava slada

Proizvodnja se začne v sladarni. To je postopek, s katerim se glavne sestavine ječmena razgradijo s pomočjo naravnih encimov v sladkor maltozo ali sladni sladkor, ki ga pri alkoholnem vrenju kvasovke pretvorijo v alkohol in ogljikov dioksid. Ječmenova semena namočijo, da začno kaliti. Kalček z encimi razgradi škrob v semenu v sladni sladkor. Ko je škrob razgrajen, postopek prekinejo s segrevanjem kalečih semen.

Sledi faza, ki se imenuje drozganje. Suhi slad najprej navlažijo, moko pa nato zmeljejo s štirikratno količino vode. Mešanico imenujejo drozga. To se nato prečrpa v cedilno kad, kjer sladico ločijo od plev slada. Pri tem nastane sladica, ki se zbistri. Prečrpa se v kuhhalno ponev, kjer jo kuhajo s hmeljem. Pri tem se skupaj s sladno aromo oblikuje tudi značilen okus piva. Po kuhanju imenujemo mešanico pivina. Ta se s kuhanjem pasterizira in je primerna za dodajanje kvasa, ki bo kasneje povzročil alkoholno vrenje.

#### 1.4.2 Alkoholno vrenje ali fermentacija in zorenje piva

Alkoholno vrenje poteka v zaprtih cilindro-konusnih tankih pri nižji temperaturi in majhnem nadtlatku. Vročo pivino se pretoči skozi pretočni hladilnik, kjer se ohladi. V ohlajeno pivino se doda sterilni zrak in pivske kvasovke. Takrat se pod vplivom pivskih kvasovk začne proces alkoholnega vrenja ali fermentacije. Sladkor kvasovke pretvorijo v etilni alkohol in ogljikov dioksid. Pivina spremeni okus, sestavo in vonj in se pretvori v mlado pivo. Po petih dneh alkoholnega vrenja pivski kvas odstranijo. Del pivskega kvasa ponovno uporabijo za izdelavo nove pivine.

#### 1.4.3 Filtracija piva

Po končanem zorenju je pivo še bolj ali manj motno, zato ga je za bistrost in nadaljnjo obstojnost potrebno filtrirati. Mlado pivo se filtrira skozi filter iz plasti diatomejske zemlje, ki prepušča le pivo, zadržuje pa kvasovke.

#### 1.4.4 Stabiliziranje piva

Po končanem alkoholnem vrenju dobijo mlado pivo, ki ga ohladijo na temperaturo od 0 do 1 °C. V zaprtih tankih se pri nizki temperaturi ogljikov dioksid veže v pivo in s tem dobi pivo značilno rezkost in aromo, ki sta njegovi najpomembnejši lastnosti. Proces poteka pod pritiskom, njegovo trajanje pa je odvisno od vrste piva.

#### 1.4.5 Polnjenje piva

Pivo nato v polnilnici polnijo v steklenice, pločevinke in sode. Steklenice gredo po pranju na tekoči trak, kjer sledi polnjenje, pasteriziranje (uničevanje mikrobov s segrevanjem; s tem podaljšajo trajnost piva z nekaj dni na več mesecev) in etikiranje.

### 1.5 Kisla piva

Kisla piva se pridobivajo z dodajanjem različnih kultur mikroorganizmov, ki so sicer naravni sovražnik kvasovk v klasičnih pivih. Obstajata dva glavna načina, kako se ti mikroorganizmi dodajajo. Klasično belgijsko kislo pivo se naredi tako, da pivo po kuhanju ohladijo v velikih bazenih, ki so neposredno izpostavljeni zunanjemu zraku, tako da se divji mikroorganizmi sami naselijo v pivo. Pogosto taka piva fermentirajo v lesenih sodih, kjer te kulture že bivajo in tako se menja samo vsebino, les, ki pa je prepojen z določeno kulturo omogoči, da tako dobijo vedno enako pivo, saj ostane okus vedno isti. Značilni mikroorganizmi prenašajo karakter iz prejšnjega v naslednje pivo. Novodobnejši način pa je, da se te kulture dodajajo popolnoma namensko. Tako se bolj nadzoruje in odloča, katere mikroorganizme in posledično okuse želimo prisotne v pivu. Značilni okus je odvisen od vrste fermentacije, ki jo opravljajo

določeni mikroorganizmi. Najpogostejše vrste so: lambic, gueze, flamsko rdeče in berliner weisse.

## 1.6 Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus*) je dvodomna plezalka in trajnica iz družine konopljev, ki izvira iz Azije. Uspešno raste le ob določenih pogojih. Nanj močno vplivata podnebje in zemlja, v kateri raste. Razširjen je v zmernih predelih severne poloble. V hmeljiščih gojimo samo rastline ženskega spola. Plodovi ženskih rastlin, storžki, vsebujejo več učinkovin, če semenske zasnove niso oplojene. Podzemni del rastline je korenika, imenovana štor, ki je večletna, nadzemni deli pa so: steblo oz. trta, listi in zalistniki, imenovani panoge, ter cvetovi in storžki – plodovi, ki vsebujejo lepljivo smolnato grenko snov lupulin ter grenke smole in eterična olja. Vsi nadzemni deli so enoletni. Jeseni odmrejo oziroma jih pospravimo z njive. Spomladi iz korenike ponovno odženejo novi nadzemni deli. Moške rastline zatiramo, saj oprášeni in oplojeni storžki zmanjšujejo kakovost pridelka.

Hmelj se obira pozno poleti od sredine avgusta do začetka septembra, ko storžki vsebujejo največ industrijsko zanimivih snovi. Dozorele in obrane storžke sušijo pri 65 °C 8 ur, da se vsebnost vlage zmanjša. S tem se prepreči kvarjenje in podaljša obstojnost storžkov. Nato se skladiščijo pri nizkih temperaturah ali pa predelajo v brikete, hmeljev ekstrakt ali koncentrat hmelja.

Storžke ali njihov ekstrakt uporabljajo v pivovarstvu, saj vsebujejo smole, ki preprečuje razvoj mlečnokislinskih bakterij, ki bi kvarile pivo. Na pivno mešanico učinkuje hmelj baktericidno in kot konzervans. Istočasno daje hmelj pijači grenak okus, eterično olje mu daje prijetno aromo. Za pripravo 100 l piva je potrebno od 100 do 300 g hmelja.

Pivovarstvo hmelja za izdelavo piva na začetku ni uporabljalo. Zaradi boljšega okusa so pivu dodajali pelin, žafran, glog, cimet, rožmarin, lovor in razne mešanice trav.

Za hmelj v Sloveniji je znano, da so ga že leta 1156 pridelovali na posestvu brižinskega škofa v bližini Škofje Loke. Vse do leta 1880 so hmelj gojili v skromnem obsegu na škofovskih in plemiških posestvih. Vzrok za počasen razvoj hmeljarstva je bilo slabo razvito pivovarstvo. Prvi večji poskusi hmeljarjenja v Sloveniji segajo v 19. stoletje, v okolico Ptuja, Velenja in Maribora, vendar pa so ta hmeljišča kmalu propadla. Prvi nasad hmelja v Spodnji Savinjski dolini je leta 1876 pri Dvorcu Novo Celje zasadil takratni oskrbnik graščine Josip Bilger. Za začetek pridelave savinjskega goldinga pa štejemo leto 1886, ko sta Janez Hausenbichler in Karl Haupt opravila prve poskuse gojenja hmelja. Leta 1972 so se v slovenskih hmeljskih nasadih začele širiti sorte, vzgojene na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. To so bile sorte aurora, atlas, ahil in apolon, ki so proslavile in uveljavile slovensko hmeljarstvo tudi po svetu.

Slovenija je danes šesta največja proizvajalka hmelja na svetu. V letu 2001 je bilo pri Hmeljni komisiji vpisano 201 hmeljarsko posestvo in 2.058 ha hmeljskih nasadov. Približno 5-10 % v Sloveniji pridelanega hmelja porabijo domače pivovarne, vso ostalo količino pa izvozijo, predvsem na zahodne trge. Skoraj tri četrtine hmeljskih nasadov je v Savinjski dolini, ostalo pa še na ormoško-ptujskem območju, v Račah pri Mariboru, Brežicah, Slovenj Gradcu, Radljah ob Dravi, Kozjem in Bistrici ob Sotli. Najbolj razširjene sorte hmelja so savinjski golding, aurora in bobek.

Šestega septembra 2016 so v Žalcu, ki je središče hmeljarstva v naši državi, odprli prvo fontano piva v Evropi, imenovano Zeleno zlato. Fontana je poklon hmeljarski dediščini Spodnje Savinjske doline. Fontana piv je postavljena v mestni park v središču mesta, ob tržnico. Osnova za arhitekturno zasnovo fontane je simbolna hmeljska kobula, ki se izraža v dveh polkrogih oz. dveh fontanah, eni pivski in drugi, vodni. Polkrogi so oblečeni v bakreno čipko, ki simbolizira peno na pivu.

## 1.7 Bakterije

Bakterije so mikroskopsko majhne prokariotske celice s celično steno. Po večini se razmnožujejo nespolno, s cepitvijo. Njihova razširjenost je splošna, hitro rastejo in se razmnožujejo, imajo kratko življenjsko dobo, obsežne biokemične zmožnosti in spremenljiv metabolizem.

Večina bakterij ima le eno obliko, pravimo, da so monomorfne. Nekatere pa imajo lahko več različnih oblik in so pleomorfne. Razlikujemo tri osnovne oblike:

- kroglaste so koki,
- paličaste so bacili,
- spiralne ali svedraste.

Za rast potrebujejo določene pogoje:

- kemijski pogoji: voda, hrana (vir ogljika in dušika, minerali), faktorji rasti, kisik,
- fizikalni pogoji: pH, temperatura, osmotski tlak.

(Orožen Adamič, Ser nec, 2011)

## 1.8 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije so ena najpomembnejših skupin bakterij. So fakultativni anaerobi. Uspevajo v medijih, kjer je veliko sladkorjev. Optimalna temperatura za njihovo rast je med 25 °C in 30 °C. Dobro uspevajo pri visokem pH. Ljudje jih že od nekdaj uporabljamo v biotehnoloških procesih. Kot sestavni del simbiotske bakterijske flore kože, sluznic in črevesa pa so pomembne za normalno delovanje in ohranjanje zdravja v našem telesu.

Zaradi različnega metabolizma sladkorjev jih delimo v dve skupini. Ene pretvarjajo glukozo v mlečno kislino (imenujemo jih homofermentorji), druge (imenujemo jih heterofermenterji) pa pri presnovi v anaerobnih razmerah iz glukoze izdelujejo 2,3-butandiol, etanol, očetno kislino in CO<sub>2</sub>. Slednje so pomembne v biotehnoloških

procesih pridobivanja piva in vina, saj lahko njihova prisotnost v nekaterih primerih izboljša okus pridobljene pijače ali mu da značilen okus po kislem.

Mlečnokislinske bakterije delimo v dve družini. Prva so *Lactobacillaceae* z rodovoma *Lactobacillus* in *Streptococcaceae* z rodovoma *Oenococcus* in *Pediococcus*.

Bakterije rodu *Lactobacillus* so fakultativni anaerobi, ki rastejo v okoljih z nizkimi koncentracijami kisika. Za razvoj potrebujejo okolje, bogato s hranili, predvsem sladkorji. Pogosto jih uporabljamo za kisanje mleka in drugih fermentiranih mlečnih izdelkov. Glede na presnovo sladkorjev se delijo na striktne heterofermenterje (*L. brevis*, *L. hilgardii*) in fakultativne heterofermenterje (*L. casei*, *L. plantarum*).

Mlečnokislinske bakterije rodu *Pediococcus* so homofermenterji. Mlečnokislinske bakterije rodu *Oenococcus* (*Oenococcus oeni* – po stari sistematiki imenovane tudi *Leuconostoc oeni*) pa so fakultativni acidofilni anaerobi. Razvijajo se pri pH 4,8. Idealna temperatura za njihovo rast je med 18 °C in 30 °C. Potrebujejo s hranili bogat medij. So občutljive na prisotnost alkohola, saj pri koncentracijah alkohola nad 10 % propadejo. So heterofermenterji, poleg tega pa so edini rod mlečnokislinskih bakterij, ki ob prisotnosti za presnovo uporabnega sladkorja pretvarja jabolčno kislino v mlečno kislino in CO<sub>2</sub>.

Med alkoholnim vrenjem piva ali vina so mlečnokislinske bakterije običajno vedno prisotne v majhnih količinah. Vendar med fermentacijo propadejo in v običajnih pogojih ne vplivajo na okus piva. Pri nekaterih vrstah piva pa je njihova prisotnost celo zaželena, saj nekateri produkti fermentacije mlečnokislinskih bakterij dajejo določenim vrstam piva poseben kiselkast okus.

V preteklosti, ko se je uporabljalo za proizvodnjo piva predvsem hladne postopke, so mlečnokislinske bakterije pogosto kvarile pivo. Zato se domneva, da je ravno uporaba hmelja, ki ima dezinfekcijske lastnosti, zmanjšala neželeno delovanje mlečnokislinskih bakterij.

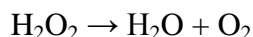
## 1.9 Plesni

Plesni so vlaknate večcelične glive. Sestavljajo jih mikroskopsko drobne cevaste celice, ki tvorijo razvejane niti, imenovane hife. Njihova debelina je približno 4 mikrometre. Rastejo kot mreža, ki ji pravimo micelij. Na gojišču imajo videz prahu, kosmov oziroma pajčevine. Za identifikacijo plesni je pomemben videz hif, ki so lahko septirane ali neseptirane. Septirane hife imajo posamezne celice ločene s pregradami (septumi). Le -te imajo odprtine (pore), ki omogočajo pretakanje citoplazme in organelov med celicami. Neseptirane hife teh pregrad nimajo. (Orožen Adamič, Serbec, 2011)

### 1.10 Vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Je razkužilo in antibaktericidna snov, ki pod vplivom toplote ali encimov katalaza in peroksidaza razpade na neškodljiva produkta vodo in kisik.

Formula razpada vodikovega peroksida:



Glavni bakteriocidni mehanizem vodikovega peroksida je posledica nastanka zelo reaktivnega hidroksilnega radikala. Njegovo antimikrobno delovanje temelji na oksidaciji sulfhidrilnih skupin in dvojnih vezi v proteinih, lipidih in drugih organskih molekulah na površinskih membranah mikroorganizmov.

Vodikov peroksid zato uporabljamo za uničenje bakterij, gliv, virusov in spor. Najbolje deluje na anaerobne bakterije, saj te nimajo encima katalaza, ki povzroča njegovo razgradnjo. Uspešen je tudi pri uničenju Gram negativnih bakterij.

Uporablja se kot dezinfekcijsko sredstvo v medicini, živilski industriji, v kozmetiki, v agronomiji in povsod, kjer je potrebna dezinfekcija površin in različnih materialov. Za dezinfekcijo semen se uporablja 10-30 % raztopina vodikovega peroksida.

### 1.11 Kvasovke

Pivski kvas *Saccharomyces cerevisiae* spada med glive kvasovke. Kvasovke so netaksonomska kategorija gliv, definirana glede na morfološke in fiziološke značilnosti. So enocelična oblika gliv, ki se pogosto pojavljajo v sokovih, zemlji, živalskem gnoju, mleku in na površini zrelih sadežev, cvetov in listov rastlin (Stušek, Škornik in Vodnik, 2011). Kvasovke imajo pomembno vlogo v biotehnoloških procesih, kot so peka kruha, varjenje piva in pridobivanje alkoholnih pijač, ter v farmacevtski industriji. So ena od najstarejših skupin mikroorganizmov, ki jih ljudje uporabljamo v biotehnološke namene pridobivanja piva, kvašenega kruha in vina. Sprava so v ta namen uporabljali divje seve kvasovk, ki so prisotni v naravi. Danes pa se za posamezne procese uporablja različne vrste kvasovk, ki se med seboj razlikujejo predvsem po temperaturnih območjih, v katerih delujejo, in po encimih, ki jih vsebujejo.

Kvasne celice so po navadi sferične do rahlo sferične, 5–12 krat 5–12 μm, občasno tudi elipsoidne do cilindrične, 5–30 krat 3–9 μm. Kadar rastejo na trdni površini, tvorijo po obliki okrogle kolonije, katerih robovi so gladki. Gladka je tudi površina kolonije, profil kolonije pa je izbokel do visoko izbokel. V tekočem gojišču je rast motna, opazimo pa tudi usedanje in lebdenje celične mase. Optimalna rast *Saccharomyces cerevisiae* je med 33 °C in 35 °C v mediju z 10 do 30 % glukoze. Minimalna temperatura, kjer raste *Saccharomyces cerevisiae*, je od 4 °C do 10 % glukoze. Pri optimalni rasti se populacija kvasovk podvoji vsakih 100 minut (Pitt in

Hocking, 1997). Kvasne celice so lahko haploidne in diploidne. Imajo preprost življenjski cikel celične rasti in se delijo z mitotskimi delitvami.

V anaerobnih pogojih kvasovke pridobivajo ATP za življenjske procese s fermentacijo sladkorjev v alkohol in ogljikov dioksid. V aerobnih razmerah uporabljajo za pridobivanje energije ATP celično dihanje. Pri proizvodnji piva, ki poteka v vrelnih kadeh v anaerobnih razmerah, kvasovke pretvarjajo sladkorje iz sladu v etanol in ogljikov dioksid. Delujejo v temperaturnem območju od 5 °C do 23 °C, odvisno od tipa kvasovk in vrste piva, ki jo želimo pridobiti.

Zato se pri izdelavi piva uporablja več vrst kvasovk, ki jih glede na način fermentacije razdelimo na dve osnovni skupini:

- **Kvasovke gornjega vrenja** (*Saccharomyces cerevisiae*), včasih imenujemo tudi Ale kvasovke. Te med vrenjem priplavajo na površje in tvorijo debelo plast nad tekočino. Njihovo optimalno temperaturno območje uspevanja je med 15 °C in 24 °C. Nižje temperature vrenje upočasnijo, pri 10 °C pa se vrenje ustavi. Ta vrsta kvasovk se uporablja za pripravo svetlega (ale), črnega (porter), močnega temnega (stout) piva ter piva Altbier in Kölsch.
- **Kvasovke spodnjega vrenja** (*Saccharomyces pastorianus*) najbolje uspevajo pri temperaturi okoli 12 °C (njihovo temperaturno območje je med 9 °C in 15 °C). Te se posedejo na dno posode in fermentirajo počasneje. Ta vrsta kvasovk se uporablja pri lahkih pivih. Z njimi so narejena piva znamk: Laško, Union, Pilsner, Lager in druga.

## 2 HIPOTEZE

V raziskovalni nalogi sem želela preveriti naslednji hipotezi:

- Hmelj vsebuje antibakterijske lastnosti, ki zavirajo rast bakterij in plesni na njem.
- Hmelj zavira delovanje mlečnokislinskih bakterij.

## 3 METODOLOGIJA

Praktični del naloge sem izvajala v dveh fazah. V prvem delu sem testirala antibaktericidne/dezinfekcijske lastnosti hmelja in drugih medijev na ječmenovih semenih. Ječmenova semena sem uporabila zato, ker so tudi pri proizvodnji piva



izhodiščni vir energije za kvasovke, ki pri varjenju piva opravljajo alkoholno vrenje. Uporabili sem kupljena ječmenova semena Panvita.

V drugi seriji poskusov pa sem testirala rast mlečnokislinskih bakterij iz kisle smetane na navadnem hranilnem gojišču pripravljenem v destilirani vodi in na hranilnem gojišču, za katerega pripravo sem namesto vode uporabila dve različni koncentraciji hmeljevega ekstrakta. Hmeljev ekstrakt je bil pripravljen iz 250 g hmeljevih briketov in 2000 ml vodovodne vode. Gojišča z mlečnokislinskimi bakterijami sem nato v petrijevkah pri temperaturi 10 °C inkubirala pet dni v hladilniku. Po tem času sem preštela razvite kolonije mlečnokislinskih bakterij kolonije.

### 3.3 1. FAZA: VPLIV RAZLIČNIH MEDIJEV NA DEZINFEKCIJO JEČMENOVIH SEMEN

<b>Načrt dela – vpliv različnim medijev na dezinfekcijo ječmenovih semen</b>			
1. Priprava hranilnega gojišča: po navodilih proizvajalca sem skuhalo hranilno gojišče in ga v epruvetah sterilizirala.			
2. Priprava semen: Semena ječmena sem preštela in razdelila v 4. skupine po 100 do 150 semen v vsaki skupini.			
3. Priprava medijev za dezinfekcijo semen: vodovodna voda, sterilizirana destilirana voda, 30 % vodikov peroksid, steriliziran hmeljev ekstrakt.			
4. Dezinfekcija semen: Semena stresam v erlenmajericah 20 minut v različnih medijih			
Kontrola		Referenčni medij	Testni medij
Nesterilizirana semena - stresam 20 minut v vodovodni vodi.	Semena stresam 20 minut v sterilizirani destilirani vodi.	Semena stresam 20 minut v 30 % vodikovem peroksidu.	Semena stresam 20 minut v sterilni raztopini hmeljevega ekstrakta.
5. 100 semen iz vsakega medija sem prerezala v sterilnih pogojih in razdelila v petrijevke z agarjem (po 10 semen na petrijevko).			
6. Inkubacija pri sobnih pogojih in po petih dneh preverjanje rezultatov s štetjem bakterijskih kolonij in kolonij plesni.			

*Preglednica 1: Načrt dela – vpliv različnih medijev na dezinfekcijo semen*

#### 3.3.1 Material:

Sterilizirane petrijevke premera 10 cm, hranilni agar Biolife, destilirana voda, ekonom lonec in epruvete z zamaški za sterilizacijo gojišča, hmeljevi briketi, destilirana voda, ječmenova semena, skalpel, pinceta, gorilnik, ekonom lonec.

### 3.3.2 Priprava medijev za dezinfekcijo:

Kot medij za dezinfekcijo semen sem uporabila vodovodno vodo, sterilizirano destilirano vodo, 30 % vodikov peroksid proizvajalca Merck KGaA, 64271 Darmstadt Germany in hmeljevo raztopino/ekstrakt .

Navadno vodovodno vodo in sterilizirano destilirano vodo sem uporabila kot kontrolo. Kot referenčno dezinfekcijsko snov sem uporabila 30 % vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), ki se uporablja za dezinfekcijo semen v kmetijstvu. Sterilizacijo destilirane vode sem izvajala v ekonom loncu 30 minut pri 121 °C. Sterilizacijo vode sem izvedla v ekonom loncu v 250 ml erlenmajericah, zamašenih z vato in prekritih z aluminijasto folijo.



*Slika 1: Ekonom lonec*

Za dezinfekcijo sem uporabila sterilno raztopino hmeljevega ekstrakta. Hmeljev ekstrakt sem pripravila iz 250 g hmeljevih briketov, ki sem jih dobila na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu, in 2000 ml vodovodne vode. Vse skupaj sem 20 minut mešala in kuhala do vretja. Nato sem zmes precedila skozi cedilo in filter iz stisnjene svile. Dobljen hmeljev ekstrakt sem nato sterilizirala. Sterilizacijo medijev sem izvedla v zaprtem ekonom loncu v 250 ml erlenmajericah zamašenih z vato in prekritih z aluminijasto folijo. Sterilizacijo medijev sem izvajala 30 minut pri 121 °C. Do uporabe sem sterilne medije hranila v sterilno zaprtih erlenmajericah v hladilniku pri 10 °C.



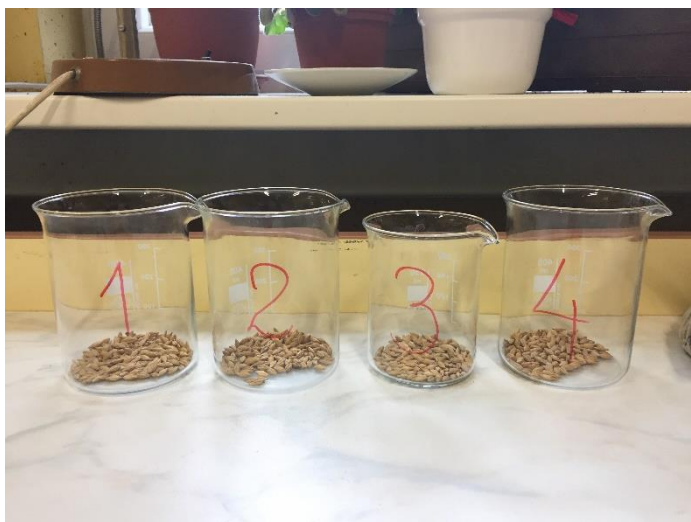
*Slika 2: Erlenmajerice s hmeljevim ekstraktom in destilirano vodo*

### 3.3.3 Priprava gojišča za testiranje semen:

Gojišče sem pripravila iz hranilnega agarja (NUTRIENT AGAR FIRME Biolife). Po navodilih proizvajalca sem hranilni agar skuhal v destilirani vodi. To je 23 g v 1000 ml destilirane vode. Petrijevke in hranilni agar sem sterilizirala v ekonom loncu, pri temperaturi 121<sup>0</sup> C 30 minut. Agar sem sterilizirala v zamašenih epruveh. Nato sem gojišče iz epruveh v sterilnih pogojih razlila na petrijevke in pustila, da se je ohladilo in strdilo.

### 3.3.4 Postopek dezinfekcije ječmenovih semen:

Semena ječmena sem razdelila v 4 skupine po 150 do 200 semen. Semena sem dala v štiri 250 ml erlenmajerice in v vsaki semena prelila z različnim medijem (navadna voda, sterilizirana destilirana voda, 30 % vodikov peroksid in sterilna raztopina hmeljevega ekstrakta). Nato sem semena v erlenmajerici v izbranem mediju stresala 20 minut. Po stresanju sem medij odlila.



*Slika 3: Ječmenova semena razdeljena v 4 skupine*

### 3.3.5 Testiranje semen na prisotne bakterije in plesni na gojiščih

Semena iz vsake arlenmajerice sem ob gorilniku s skalpelom sterilno prerezala in vsakega od njih položila na petrijevko s sterilnim hranilnim gojiščem. Za vsak medij sem uporabila 10 sterilnih gojišč. Na vsako gojišče sem dala 10 prerezanih semen. Vse postopke sem opravila v sterilnih pogojih. Delala sem ob plinskem gorilniku z žarilnim plamenom. Pinceto in skalpel sem sproti sterilizirala s 96% alkoholom in ožiganjem ob plamenu gorilnika. Vsa gojišča sem ustrezno označila.

### 3.3.6 Inkubiranje bakterijskih gojišč s semeni

Nato sem gojišča s semeni inkubirala pri sobnih pogojih 4 dni. Na gojiščih so se med inkubacijo razvile kolonije bakterij in plesni.



*Slika 4: Inkubirana gojišča pri sobnih pogojih*

### 3.3.7 Dokumentiranje rezultatov

Po petih dneh sem na vsakem gojišču preštela vse razvite kolonije bakterij in vse kolonije plesni.

### 3.3.8 Obdelava podatkov:

Glede na medij v katerem so bila semena, sem nato izračunala povprečno število bakterijskih kolonij in kolonij plesni na eno petrijevko, ki so se razvile v posamezni seriji.

## 2. FAZA: RAST MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ NA NAVADNEM HRANILNEM GOJIŠČU IN NA HRANILNIH GOJIŠČIH Z DODANIM EKSTRAKTOM HMELJA

<b>Eksperiment: Vpliv hmeljevega ekstrakta na uspevanje mlečnokislinskih bakterij</b>		
1. Pripravim kulturo mlečnokislinske bakterije.		
3. Pripravim sterilne petrijevke z navadnim gojiščem.		
4. Pripravim sterilne petrijevke z ekstraktom hmelja (dve različni koncentraciji).		
5. Nanesem mlečnokislinske bakterije (1 ml) na pripravljeno gojišče v petih serijah.		
Kontrolni poskus1	Poskus 1	Poskus 1
osnovno gojišče in mlečnokislinske bakterije pet petrijevk	Gojišče, pripravljeno s koncentriranim hmeljevim ekstraktom in mlečnokislinske bakterije pet petrijevk	Gojišče, pripravljeno z razredčenim hmeljevim ekstraktom (1:1) in mlečnokislinske bakterije pet petrijevk
6. Inkubacija v hladilniku pri temperaturi 10 °C.		
7. Štetje kolonij mlečnokislinskih bakterij na posameznih gojiščih.		

*Preglednica 2: Načrt dela - vpliv hmeljevega ekstrakta na uspevanje mlečnokislinskih bakterij*

### 3.3.9 Material

Gorilnik, sterilne petrijevke, hranilni agar, koncentrirana in razredčena raztopina hmeljevega ekstrakta, kislina smetana - Milfina, proizvajalca Gmunder Molkerei, Teresienthalstrasse 16, 4810 Gmunden Avstrija, pipeta, steklena zanka za razmaz bakterij, 96 % alkohol za sterilizacijo pipet in steklene zanke.

### 3.3.10 Priprava gojišč

Najprej sem pripravila petrijevke s sterilnim gojiščem iz hranilnega agarja (NUTRIENT AGAR Firme Biolife). Eno gojišče sem pripravila po navodilih proizvajalca iz 23 g hranilnega agarja v 1000 ml v destilirane vode. Za drugo gojišče sem namesto destilirane vode uporabila hmeljev ekstrakt, ki je bil pripravljen iz 250 g hmeljevih briketov in 2000 ml vodovodne vode. Za tretje gojišče pa sem uporabila hmeljev ekstrakt, ki sem ga razredčila v razmerju 1:1 z destilirano vodo. Petrijevke in vse tri vrste hranilnega agarja sem sterilizirala v ekonom loncu pri temperaturi 121 °C 30 minut.

### 3.3.11 Priprava kulture mlečnokislinskih bakterij

Za pripravo kulture mlečnokislinskih bakterij sem uporabila tekočino, ki se nabere na kislino smetani. 1 ml tekočine sem razredčila s 100 ml fiziološke raztopine.

### 3.3.12 Nanos mlečnokislinskih bakterij na gojišča

Nato sem po 1 ml tako pripravljene kulture nanesla na sterilne petrijevke z navadnim gojiščem, gojiščem z razredčenim in z gojiščem s koncentriranim hmeljevim ekstraktom. Delala sem v sterilnih pogojih okoli prižganega gorilnika. Na vsako gojišče sem kulturo mlečnokislinskih bakterij nanesla z novo kapalko. Steklo zanko za razmaz sem pred vsakim razmazom sterilizirala v 96 % alkoholu z ožiganjem.

### 3.3.13 Inkubacija gojišča

Gojišča z mlečnokislinskimi bakterijami sem inkubirala pri temperaturi 10 °C v hladilniku 5 dni.

### 3.3.14 Dokumentiranje rezultatov

Po treh dneh so bili rezultati opazni. Na petrijevki z navadnim hranilnim agarjem je bilo vidno veliko drobnih kolonij mlečnokislinskih bakterij, ki sem jih preštela. V gojiščih s hranilnim agarjem v razredčenem in koncentriranem hmeljevem ekstraktu pa so bile kolonije tako majhne, da jih ni bilo moč prešteti. Tudi po podaljšanji inkubaciji se rast kolonij ni nadaljevala, zato štetje ni bilo možno.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Rezultati poskusa vpliva hmeljevega ekstrakta kot antibakterijske snovi na razvoj bakterij okoli ječmenovih semen

Serijska št.	JEČMENOVA SEMENA, SPIRANA V VODOVODNI VODI										Skupaj
Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	20	34	14	11	16	40	20	21	13	56	245
2	7	15	19	25	5	13	14	23	50	33	204
3	0	4	35	32	3	19	9	25	16	54	197
4	2	1	4	11	10	8	4	7	6	15	68
5	3	35	4	3	13	26	3	20	35	3	145
6	7	7	3	14	44	23	31	16	12	79	236
7	14	7	44	10	24	15	3	39	23	0	179
8	10	14	12	43	8	26	8	87	63	9	280
9	15	6	5	14	4	1	55	20	5	63	188
10	3	1	32	57	1	49	65	8	21	51	288
Skupaj	81	124	172	220	128	220	212	266	244	363	2030
Poprečje	8,1	12,4	17,2	22,0	12,8	22,0	21,2	26,6	24,4	36,3	203,0

Preglednica 3: Seštevek bakterijskih kolonij okoli ječmenovih semen spiranih, v vodovodni vodi, po treh dneh

Serijska št.	JEČMENOVA SEMENA, SPIRANA V STERILIZIRANI DESTILIRANI VODI										Skupaj
Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	2	8	4	25	3	4	20	36	16	26	144
2	12	30	5	50	34	28	23	49	30	65	326
3	6	8	7	36	5	29	16	11	15	40	173
4	0	5	40	5	25	8	13	14	49	52	211
5	22	20	31	5	10	21	36	52	66	58	321
6	7	13	43	37	8	29	125	5	60	65	392
7	4	17	32	13	11	49	12	11	29	52	230
8	5	6	57	14	20	26	12	13	17	53	223
9	29	48	50	54	4	30	63	42	70	64	454
10	7	3	3	8	8	24	30	19	54	42	198
Skupaj	94	158	272	247	128	248	350	252	406	517	2672
Poprečje	9,4	15,8	27,2	24,7	12,8	24,8	35,0	25,2	40,6	51,7	267,2

Preglednica 4: Seštevek bakterijskih kolonij okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilni destilirani vodi, po 3 dneh

Serijska št.	JEČMENOVA SEMENA, SPIRANA V PEROKSIDU (30%)										Skupaj
Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Skupaj	1	0	0	1	0	0	4	0	0	0	6
Poprečje	0,1	0	0	0,1	0	0	0,4	0	0	0	0,6

Preglednica 5: Seštevek bakterijskih kolonij okoli ječmenovih semen, spiranih v peroksidu (30%), po 3 dneh

Serijska št.	JEČMENOVA SEMENA, SPIRANA V STERILNI RAZTOPINI HMELJEVEGA EKSTRAKTA										Skupaj
Št.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	3	16	8	7	16	3	15	6	8	9	91
2	0	3	4	6	8	7	1	8	28	18	83
3	3	2	0	0	0	0	1	6	12	3	27
4	4	1	1	3	10	5	1	1	3	1	30
5	1	4	1	5	3	6	2	4	5	2	33
6	0	5	1	8	4	5	6	4	2	4	39
7	1	2	5	7	0	12	2	10	43	52	134
8	3	4	3	7	11	8	12	6	8	17	79
9	1	5	6	14	37	18	9	4	15	11	120
10	5	4	10	16	8	8	9	6	7	10	83
Skupaj	21	46	39	73	97	72	58	55	131	127	719
Poprečje	2,1	4,6	3,9	7,3	9,7	7,2	5,8	5,5	13,1	12,7	71,9

Preglednica 6: Seštevek bakterijskih kolonij okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilni raztopini hmeljevega ekstrakta, po 3 dneh



Seriya	JEČMENOVA SEMENA, SPIRANA V VODOVODNI VODI	
Št.	Skupno število kolonij	Plesen
1	249	5
2	206	1
3	200	1
4	72	8
5	151	3
6	242	3
7	180	4
8	285	3
9	189	6
10	289	5
Skupaj	2063	39
Poprečje	206,3	3,9

*Preglednica 7: Šeštevek bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v vodovodni vodi, po 4 dneh*

Seriya	JEČMENOVA SEMENA, SPIRANA V STERILIZIRANI DESTILIRANI VODI	
Št.	Skupno število kolonij	Plesen
1	150	4
2	327	5
3	174	3
4	214	6
5	321	6
6	393	6
7	233	3
8	224	6
9	455	3
10	199	1
Skupaj	2690	43
Poprečje	269,0	4,3

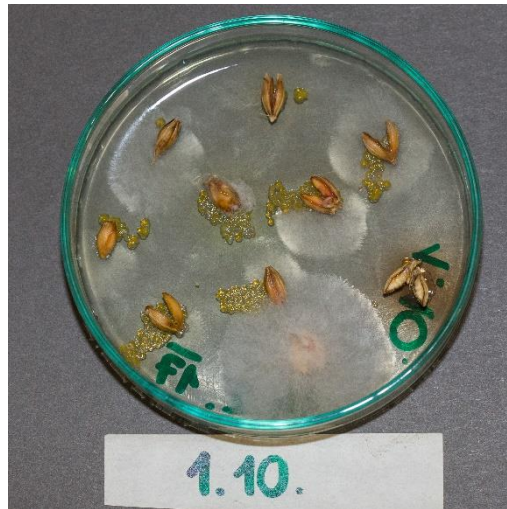
*Preglednica 8: Šeštevek bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilizirani destilirani vodi, po 4 dneh*

Seriya	JEČMENOVA SEMENA, SPIRANA V PEROKSIDU (30%)	
Št.	Skupno število kolonij	Plesen
1	0	0
2	0	0
3	0	3
4	7	1
5	0	3
6	0	3
7	0	2
8	2	1
9	2	4
10	0	2
<b>Skupaj</b>	<b>11</b>	<b>19</b>
<b>Poprečje</b>	<b>1,1</b>	<b>1,9</b>

*Preglednica 9: Seštevek bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v peroksidu (30 %), po 4 dneh.*

Seriya	JEČMENOVA SEMENA, SPIRANA V STERILNI RAZTOPINI HMELJEVEGA EKSTRAKTA	
Št.	Skupno število kolonij	Plesen
1	99	1
2	89	4
3	32	6
4	36	3
5	38	3
6	41	4
7	144	2
8	79	3
9	120	5
10	83	1
<b>Skupaj</b>	<b>761</b>	<b>32</b>
<b>Poprečje</b>	<b>76,1</b>	<b>3,2</b>

*Preglednica 10: Seštevek bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilni raztopini hmeljevega ekstrakta, po 4 dneh*



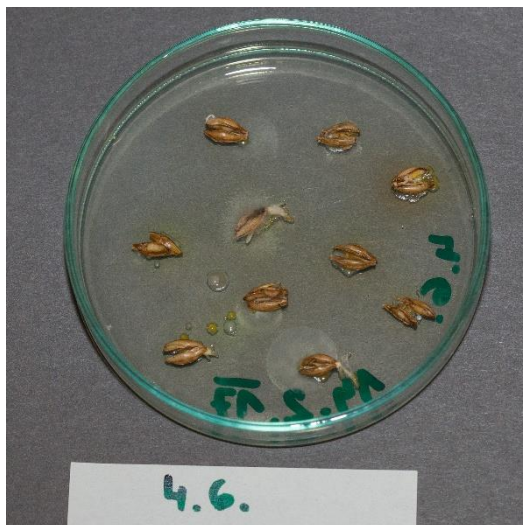
*Slika 5: Razvoj bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v vodovodni vodi, po 4 dneh*



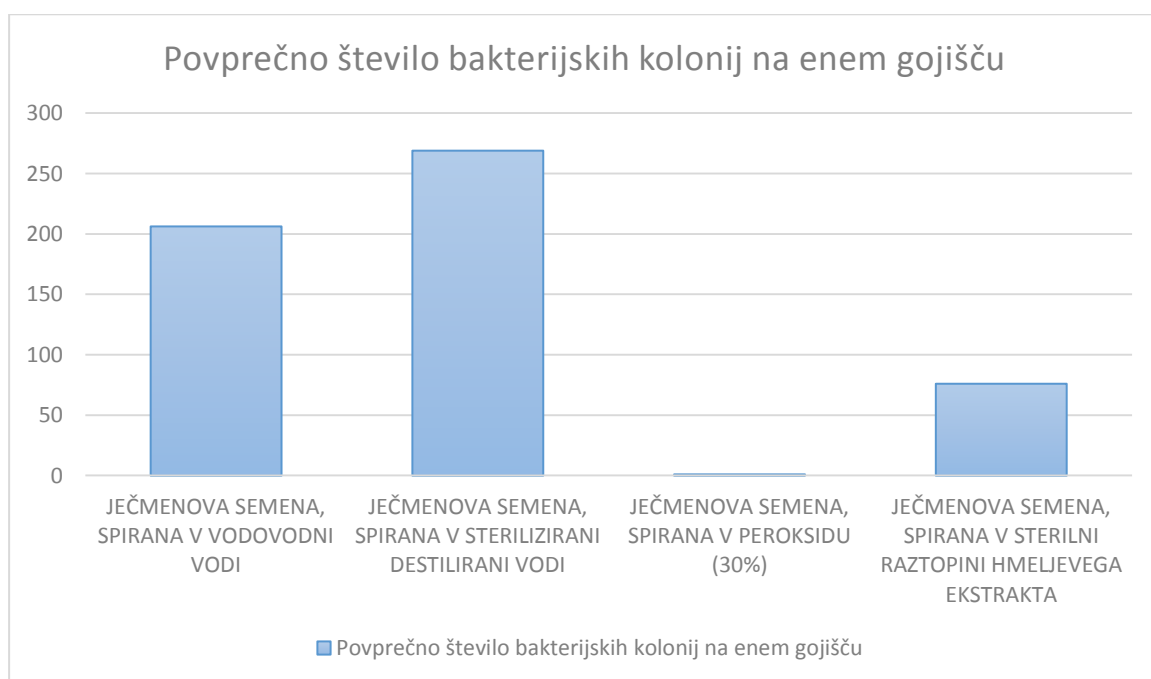
*Slika 6: Razvoj bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilizirani destilirani vodi, po 4 dneh*



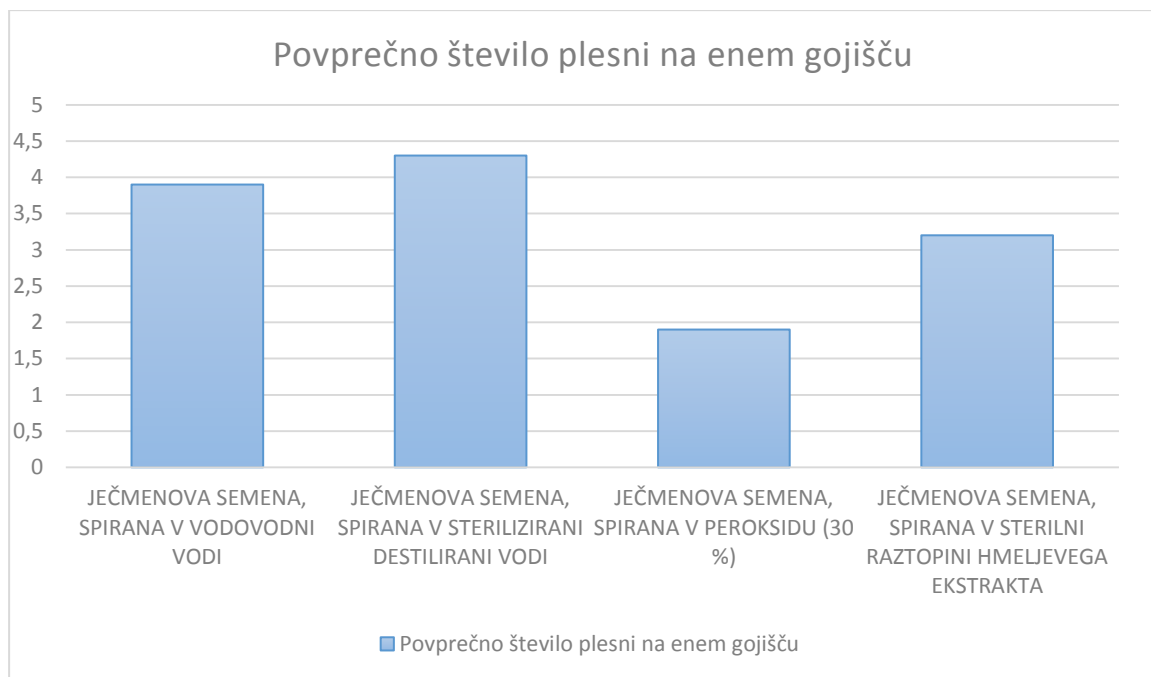
Slika 7: Razvoj bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v peroksidu (30 %), po 4 dneh



Slika 8: Razvoj bakterijskih kolonij in plesni okoli ječmenovih semen, spiranih v sterilni raztopini hmeljevega ekstrakta, po 4 dneh



Graf 1: Povprečno število bakterijskih kolonij na enem gojišču za vse 4 medije



*Graf 2: Povprečno število plesni na enem gojišču za vse 4 medije*

#### 4.2 Rezultati poskusa vpliva hmeljevega ekstrakta kot antibakterijske snovi na razvoj mlečnokislinskih bakterij

Serijska številka	1	2	3
1	2080	Mlečnokislinskih bakterijskih kolonij ni bilo možno prešteti.	Mlečnokislinskih bakterijskih kolonij ni bilo možno prešteti.
2	1900		
3	2100		
4	1308		
5	3280		
<b>Skupaj</b>	<b>10 668</b>		
<b>Poprečje</b>	<b>2133,6</b>		

*Preglednica 11: Rezultati števila mlečnokislinskih bakterij na gojiščih*

#### LEGENDA PREGLEDNICE:

- 1 – Število mlečnokislinskih bakterijskih kolonij na navadnem gojišču.
- 2 – Število mlečnokislinskih bakterijskih kolonij na gojišču s koncentriranim hmeljevim ekstraktom.
- 3 – Število mlečnokislinskih bakterijskih kolonij na gojišču z razredčenim hmeljevim ekstraktom.

Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3
navadno gojišče	gojišče s koncentriranim hmeljevim ekstraktom	gojišče z razredčenim hmeljevim ekstraktom (1:1)
sterilno	sterilno	sterilno

*Preglednica 12: Rezultati kontrolnih poskusov*

## 5 RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi sem preverjala naslednji hipotezi:

- Hmelj vsebuje antibakterijske lastnosti, ki zavirajo rast bakterij in plesni na njem.

Hipoteza je potrjena s poskusom vpliva različnih medijev na dezinfekcijo ječmenovih semen in njegovimi rezultati. Kontrolna poskusa s spiranjem z navadno vodovodno vodo in sterilizirano destilirano vodo je pokazala, da je na semenih ostalo več kot 200 bakterij in v povprečju 4 plesni. Primerjalna dezinfekcijska snov je bil 30 % vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), ki se kot dezinfekcijska snov tudi sicer uporablja za dezinfekcijo semen različnih rastlin. Njegov dezinfekcijski učinek je bil zelo očiten, saj se je v povprečju na gojiščih razvila samo ena kolonija bakterij in dve koloniji plesni, kar pomeni, da vodikov peroksid učinkovito odstrani večino bakterij in plesni. Opazno dezinfekcijsko delovanje je pokazala tudi raztopina hmeljevega ekstrakta, saj je po štirih dneh na gojiščih zraslo v povprečju 76 bakterijskih kolonij in 3 kolonije plesni na eno gojišče. To je bistveno manj kot pri semenih, ki smo jih spirali z navadno vodovodno vodo in sterilizirano destilirano vodo. Iz tega lahko zaključimo, da ima hmeljeva raztopina antibaktericidni oziroma dezinfekcijski učinek.

- Hmelj zavira delovanje mlečnokislinskih bakterij.

Tudi ta hipoteza je potrjena s poskusi rasti mlečnokislinskih bakterij na navadnem hranilnem gojišču in na hranilnih gojiščih z dodanim ekstraktom hmelja.

Iz rezultatov je razvidno, da so se mlečnokislinske bakterije na navadnem hranilnem gojišču dobro razvile. Petrijevke smo v tem primeru inkubirali v hladilniku zato, ker se tudi pri proizvodnji kislih piv, kjer sodelujejo mlečnokislinske bakterije, uporabljajo kvasovke spodnjega vrenja, ki za delovanje potrebujejo nižje temperature. Povprečno se je na enem gojišču razvilo 2134 kolonij. V gojiščih s hmeljevim ekstraktom pa je bila rast mlečnokislinskih bakterij očitno zavirana, saj je pogled od strani sicer pokazal, da so bakterije prisotne na gojišču, vendar opaznih kolonij niso oblikovale, kar potrjuje, da snovi v ekstraktu hmelja zavirajo njihovo rast. Pri tem ni bilo opaznih razlik med gojišči, pripravljenimi iz razredčenega ekstrakta, in gojišči, pripravljenimi s koncentriranim ekstraktom. Zaviralni učinek delovanja hmeljevega ekstrakta na mlečnokislinske bakterije je bil opazen tudi po podaljšani inkubaciji (1 teden). Iz tega ugotavljam, da je hmelj s svojim antibaktericidnim delovanjem zavira razvoj in delitev mlečnokislinskih bakterij.

## 6 ZAKLJUČEK

Z uporabo hmelja v pivovarstvu se je zares zgodila sprememba v kakovosti piva. S svojimi antibaktericidnimi lastnostmi je omogočil, da se pri pripravi hmelja v procesu fermentacije niso pojavljala neželena vrenja, katerih produkti bi pivu pokvarili okus. Učinkovine v hmelju so pivu dale prijeten grenak okus in ga naravno konzervirale.

Prepričana sem, da bi bil hmelj zaradi svojih lastnosti uporaben tudi v drugih biotehnoloških procesih. Znano je namreč, da snovi v hmelju delujejo zdravilno tudi na človeka. Tako se hmelj uporablja kot zdravilo pri bakterijskih vnetjih, motnjah prebave in kot pomirjevalo.

Z vsakim dnem, ki sem ga vložila v svoje raziskovalno delo, sem spoznavala področje biologije na način, ki ga imam najraje – skozi raziskovanje in neposredno opazovanje rezultatov. Menim, da lahko tako kar najbolje pridobivaš znanje in že naučeno tudi uporabljaš.

Prepričana sem, da mi bodo večšine, ki sem jih pridobila med raziskovanjem služile tudi pri nadaljnjem izobraževanju in življenju.

## 7 LITERATURA

<http://www.ekomuzej-hmelj.si/si/hmeljarstvo-in-pivovarstvo> (21. 2. 2017)

<https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/> (22. 2. 2017)

<http://www.ekomuzej-hmelj.si/si/hmeljarstvo-in-pivovarstvo> (21. 2. 2017)

<http://www.turizem-zalec.si/sl/imenik/1225/fontana-piva-zeleno-zlato> (22. 2. 2017)

PIVO, PIJAČA DOŽIVETJA, Andrej Colarič, Davor Mišmaš, Ljubljana: Kmečki glas, 2016

LEKSIKON RASTLINSKIH BOGASTEV, Tomaž Petauer, Ljubljana: Tehniška založba Slovenije, 1993

HMELJARSTVO SLOVENIJE, Kristjan Bobovnik, Žalec: Hmezad Export – Import, 1990

HMELJ IN SLAD – BOŽANSKI HLAD, Borivoj Repe, Celovec: Mohorjeva družba, 2012

KNJIGA O PIVU, Borivoj Repe, Ljubljana: Mediacarso, 1993

MIKROBIOLOGIJA, Andreja Orožen Adamič, Kristina Sernec, Ljubljana: DZS, 2011

## 8 VIRI SLIK

Slika 1: avtorica Špela Razboršek (13. 2. 2017)

Slika 2: avtorica Špela Razboršek (13. 2. 2017)

Slika 3: avtorica Špela Razboršek (13. 2. 2017)

Slika 4: avtorica Špela Razboršek (13. 2. 2017)

Slika 5: avtor Robert Gajšek (18. 2. 2017)

Slika 6: avtor Robert Gajšek (18. 2. 2017)

Slika 7: avtor Robert Gajšek (18. 2. 2017)

Slika 8: avtor Robert Gajšek (18. 2. 2017)