

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška GOLOB

**VSEBNOST PROLINA IN BELJAKOVIN V RAZLIČNIH VRSTAH  
SLOVENSKEGA MEĀU**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**PROLINE AND PROTEIN CONTENT IN DIFFERENT TYPES OF  
SLOVENIAN HONEY**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Terezijo Golob in za recenzentko prof. dr. Natašo Poklar Ulrich.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Recenzentka: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Urška Golob

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 638.16:543.635:547.96(043)=863  
KG med/beljakovine/aminokislina/prolin  
AV GOLOB, Urška  
SA GOLOB, Terezija (mentorica) / ULRIH, Nataša Poklar (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2006  
IN VSEBNOST PROLINA IN BELJAKOVIN V RAZLIČNIH VRSTAH SLOVENSKEGA MEDU  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XIII, 74 str., 16 pregl., 22 sl., 8 pril., 52 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Z našim delom smo želeli ovrednotiti delež aminokislina prolina in skupnih beljakovin v sedmih najpogosteje zastopanih vrstah medu slovenskega porekla. Preučili smo njuno povezanost, in preverili ali sta omenjeni spremenljivki vrstno značilna parametra. Vrste medu so bile predhodno določene s senzorično analizo. Vsebnost prolina smo določali spektrofotometrično, vsebnost skupnih beljakovin pa s Kjeldahlovo metodo. Vsebnost prolina se v analiziranih vzorcih medu giblje od 197 do 776 mg/kg, vsebnost skupnih beljakovin pa od 0,13 do 0,49 g/100 g. Največjo povprečno vsebnost prolina in skupnih beljakovin smo izmerili v kostanjevem medu (617 mg/kg oz. 0,35 g/100 g), najmanjšo povprečno vsebnost prolina v lipovem (300 mg/kg) ter najmanjšo povprečno vsebnost skupnih beljakovin v akacijevem medu (0,16 g/100 g). Primerjava vsebnosti prolina v naših vzorcih s podatki tujih avtorjev je slaba in potrjuje botanično ter geografsko specifičnost te aminokislina. Naši rezultati se dobro ujemajo z rezultati navedenimi v domači literaturi. Vsebnost skupnih beljakovin se je izkazala kot izredno variabilen parameter, ki ga ni moč povezati z vrsto ali poreklom medu. Splošna zveza med vsebnostjo prolina in skupnih beljakovin vseh 101 vzorcev je statistično značilna vendar zmerno močna. Močni in statistično značilni sta zvezi za medove nektarnega in nektarno-maninega izvora, med tem ko zveza za manine medove ne obstaja. Med regresijskimi modeli za posamezno vrsto je močen in statistično značilen le model kostanjevega medu.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 638.16:543.635:547.96(043)=863  
CX honeys/proteins/amino acids/proline  
AU GOLOB, Urška  
AA GOLOB, Terezija (supervisor) / ULRIH, Nataša Poklar (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2006  
TI PROLINE AND PROTEIN CONTENT IN DIFFERENT TYPES OF SLOVENIAN HONEY  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XIII, 74 p., 16 tab., 22 fig., 8 ann., 52 ref.  
LA SI  
AL sl/en  
AB In this work the amount and the relationship between the protein and amino acid proline is presented for seven the most frequent types of Slovenian honey. The types were determined by the sensory analysis. The amount of proline was measured spectrophotometrically. The total amount of protein was determined by the Kjeldahl method. The estimated values of protein and proline content were within intervals 0.13-0.49 g/100g and 197-776 mg/kg, respectively. The largest average proline and protein content was obtained for chestnut honey (617 mg/kg, 0.35 g/100g). The average proline content in lime honey is the smallest (300 mg/kg), while the smallest average protein content was obtained for acacia (0.16 g/100g). The amount of proline determined for the samples of honey is not comparable to the one reported by the authors abroad, which shows the amount of proline in honey is geographically and botanically specific. However our results are in agreement to the results reported by the Slovenian authors. The variations in protein content can not be explained with the type of honey. The relationship between the amount of protein and proline is statistically significant and moderate for 101 samples. It is strong and statistically significant for nectar and nectar-honeydew honey, but it is not specific for honeydew honeys. Among the regression models for single types of honey only the model obtained for chestnut shows strong and statistically significant relationship between the content of proline and protein.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ŽIVLJENJE ČEBEL IN BIOLOŠKI NASTANEK MEDU .....	3
2.2 IZVOR MEDU .....	4
2.2.1 Nektar .....	4
2.2.2 Mana .....	5
2.3 VRSTE MEDU .....	5
2.3.1 Akacijev med .....	6
2.3.2 Cvetlični med .....	6
2.3.3 Gozdni med .....	6
2.3.4 Hojev med .....	6
2.3.5 Kostanjev med .....	7
2.3.6 Lipov med .....	7
2.3.7 Smrekov med .....	8
2.4 SESTAVA MEDU .....	8
2.5 PROLIN .....	9
2.5.1 Prolin splošno .....	9
2.5.2 Prolin v medu .....	10
2.5.2.1 Vir prolina – čebela .....	11
2.5.2.2 Vir prolina – cvetni prah .....	14
2.5.3 Pregled literature o vsebnosti prolina v medu .....	14
2.6 BELJAKOVINE .....	16
2.6.1 Beljakovine - splošno .....	16
2.6.2 Beljakovine v medu .....	17
2.7 METODE DELA .....	20
2.7.1 Spektrofotometrija .....	20
2.7.2 Določanje prolina v medu .....	21
2.7.3 Metode za določanje deleža beljakovin v medu .....	22
2.7.3.1 Lowrijeva metoda .....	22
2.7.3.2 Bradfordova metoda .....	23
2.7.3.3 Kjeldahlova metoda .....	23
2.8 DOLOČANJE BOTANIČNEGA POREKLA MEDU .....	23
2.8.1 Pelodna analiza .....	23
2.8.2 Senzorično ocenjevanje medu .....	24
2.8.3 Specifična elektrolitska prevodnost (SEP) .....	25
<b>3 MATERIALI IN METODE DELA .....</b>	<b>26</b>
3.1 VZOREC .....	26
3.2 FIZIKALNO KEMIJSKE METODE .....	26
3.2.1 Določanje vsebnosti prolina .....	26

3.2.2	Določanje skupnih beljakovin .....	28
<b>3.3</b>	<b>STATISTIČNA ANALIZA</b> .....	<b>30</b>
3.3.1	Osnovni statistični parametri .....	31
3.3.1.1	Aritmetična sredina ali povprečje .....	31
3.3.1.2	Varianca in standardni odklon.....	31
3.3.1.3	Koeficient variabilnosti .....	32
3.3.1.4	Mediana in kvantili .....	32
<b>3.4</b>	<b>VEČVZORČNA ANALIZA ENE SPREMENLJIVKE</b> .....	<b>33</b>
3.4.1	Levenov test homogenosti varianc .....	33
3.4.2	Analiza variance (ANOVA).....	34
3.4.3	Duncanov test .....	34
<b>3.5</b>	<b>ANALIZA POVEZANOSTI DVEH SPREMENLJIVK</b> .....	<b>35</b>
3.5.1	Koeficient korelacije po Pearsonu.....	36
3.5.2	Koeficient determinacije.....	37
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>38</b>
4.1	REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI PROLINA V MEDU .....	38
4.1.1	Ponovljivost metode za določanje prolina v medu.....	38
4.2	VSEBNOST PROLINA V MEDU - PRIMERJAVA MED VRSTAMI .....	39
4.2.1	Večvzorčna analiza prolina .....	42
4.2.1.1	Normalna porazdelitev .....	42
4.2.1.2	Levenov test.....	42
4.2.1.3	Analiza variance .....	43
4.2.1.4	Duncanov test .....	43
4.3	REZULTATI DOLOČANJA SKUPNIH BELJAKOVIN V MEDU .....	44
4.3.1	Ponovljivost metode za določanje skupnih beljakovin v medu.....	44
4.3.2	Vsebnost skupnih beljakovin v medu - primerjava med vrstami .....	44
4.3.3	Večvzorčna analiza skupnih beljakovin .....	47
4.3.3.1	Normalna porazdelitev .....	47
4.3.3.2	Levenov test.....	48
4.4	PRIMERJAVA VSEBNOSTI PROLINA IN SKUPNIH BELJAKOVIN .....	48
4.5	ZVEZA MED VSEBNOSTJO SKUPNIH BELJAKOVIN IN PROLINA .....	51
4.5.1	Zveza med vsebnostjo beljakovin in prolina v medu .....	52
4.5.2	Zveza med vsebnostjo beljakovin in prolina glede na vrsto medu.....	53
4.5.3	Zveza med vsebnostjo beljakovin in prolina glede na izvor medu .....	57
4.6	PRIMERJAVA NAŠIH REZULTATOV Z REZULTATI DRUGIH DOMAČIH AVTORJEV .....	60
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>61</b>
5.1	RAZPRAVA.....	61
5.2	SKLEPI.....	65
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>70</b>
	<b>ZAHVALA</b> .....	<b>1</b>

<b>PRILOGE</b> .....	<b>2</b>
----------------------	----------

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1. Najmanjše in največje predpisane količine kriterijev kakovosti, ki jih določa slovenski Pravilnik o medu (2004).....	9
Preglednica 2. Vsebnost prolina in vode ter vrednosti SEP v medu čebel, vključenih v poskus von der Ohe in sod. (1991).....	12
Preglednica 3. Vsebnost prolina v medu glede na izbrano vrsto čebel (Joshi in sod. 2000).....	13
Preglednica 4. Vsebnost prolina v medu različnih vrst, kot jih navajajo tuji avtorji.....	15
Preglednica 5. Vsebnost prolina v medu različnih vrst, kot jih navajajo domači avtorji.....	16
Preglednica 6. Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti (Seljak, 1996).....	36
Preglednica 7. Vsebnost prolina in pripadajoče povprečne vrednosti, standardni odkloni in koeficienti variabilnosti v testnem vzorcu 115.....	38
Preglednica 8. Povprečna vsebnost prolina (mg/kg) in nekateri statistični parametri v različnih vrstah medu.....	39
Preglednica 9. Duncanov test za vsebnost prolina v posamezni vrsti medu.....	43
Preglednica 10. Vsebnost beljakovin ter pripadajoča povprečna vrednost, standardni odklon in koeficient variabilnosti v testnem vzorcu 115.....	44
Preglednica 11. Povprečna vsebnost skupnih beljakovin (g/100 g) in nekateri statistični parametri v različnih vrstah medu.....	45
Preglednica 12. Linearni regresijski modeli ter pripadajoče vrednosti $R^2$ in $R$ za izbrane vrste medu.....	54
Preglednica 13. Analiza determinacijskih koeficientov s testom t.....	56
Preglednica 14. Vsebnost skupnih beljakovin brez deleža prolina.....	56
Preglednica 15. Linearni regresijski modeli ter pripadajoče vrednosti $R^2$ in $R$ za izbrane skupine medu glede na poreklo.....	58
Preglednica 16. Analiza determinacijskih koeficientov s testom t.....	58



## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1. Kemijska zgradba aminokislina prolina (Proline, 1998).....	9
Slika 2. Produkti ninhidrinske reakcije (Friedman, 2004) .....	22
Slika 3. Povprečne vsebnosti prolina in standardni odkloni za posamezne vrste medu.....	39
Slika 4. Koeficienti variabilnosti glede na vrsto medu.....	40
Slika 5. Eksperimentalne določitve vsebnosti prolina in aritmetične sredine, izmerjene za posamezne vrste medu.....	41
Slika 6. Prikaz vsebnosti prolina v posamezni vrsti medu s kvartili in mediano .....	41
Slika 7. Frekvenčna porazdelitev vzorcev medu za posamezno vrsto .....	42
Slika 8. Povprečne vsebnosti skupnih beljakovin in standardni odkloni - primerjava med vrstami .....	45
Slika 9. Koeficienti variabilnosti skupnih beljakovin - primerjava med vrstami.....	45
Slika 10. Eksperimentalne vrednosti skupnih beljakovin in aritmetične sredine - primerjava med vrstami .....	46
Slika 11. Prikaz vsebnosti skupnih beljakovin v posamezni vrsti medu s kvartili in mediano .....	46
Slika 12. Frekvenčne porazdelitve za vsebnost beljakovin v različnih vrstah medu .....	47
Slika 13. Povprečne vsebnosti prolina in skupnih beljakovin s pripadajočimi <i>SD</i> - razvrstitev vrst glede na naraščajoče aritmetične sredine prolina. ....	48
Slika 14. Koeficienti variabilnosti vsebnosti prolina in beljakovin v različnih vrstah medu .....	49
Slika 15. Razmerje med prolinom in skupnimi beljakovinami glede na vrsto medu.....	50
Slika 16. Okvirji z ročaji glede na razmerje med vsebnostjo prolina in skupnih beljakovin v posamezni vrsti medu .....	50
Slika 17. Korelacijski diagram povezanosti skupnih beljakovin in prolina v sedmih vrstah medu .....	51
Slika 18. Zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina v analiziranih vzorcih medu .....	53
Slika 19. Zveze med vsebnostjo beljakovin in prolina v posameznih vrstah medu .....	54

Slika 20. Zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina v medovih različnega porekla .....	58
Slika 21. Zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina v vzorcih medu nektarnega in nektarno-maninega izvora .....	59
Slika 22. Povprečne vsebnosti prolina v različnih vrstah medu slovenskega porekla - primerjava z rezultati domačih avtorjev .....	60

## KAZALO PRILOG

	str.
Priloga A 1. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih akacijevega medu .....	2
Priloga A 2. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih cvetličnega medu.....	2
Priloga A 3. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih gozdnega medu.....	3
Priloga A 4. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih hojevega medu.....	3
Priloga A 5. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih kostanjevega medu .....	4
Priloga A 6. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih lipovega medu .....	4
Priloga A 7. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih smrekovega medu.....	5
Priloga A 8. Vsebnost prolina v vzorcu medu 115.....	6

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- $\alpha$  – stopnja oz. meja tveganja pri statističnem sklepanju  
ANOVA – (ang. analysis of variance), kratica za analizo variance  
B – skupne beljakovine  
kDa – kilo Dalton  
KV – koeficient variabilnosti  
mS/cm – enota SEP, mili Simens na centimeter  
n – število statističnih enot  
nm – nano meter  
Pro - prolin  
R – Pearsonov koeficient korelacije  
 $R^2$  – koeficient determinacije  
Sig. – signifikanca, statistična značilnost  
SD – standardna deviacija  
SDS-PAGE – natrijev dodecilsulfat poliakrilamidni gel  
SEP – specifična elektrolitska prevodnost  
ss – suha snov  
 $\bar{x}$  - povprečna vrednost  
 $x_{\max}$  - največja vrednost  
 $x_{\min}$  - najmanjša vrednost

## SLOVARČEK

A akacijev med

C cvetlični med

G gozdni med

H hojev med

K kostanjev med

L lipov med

S smrekov med

## **1 UVOD**

Čebela in človek sta povezana že od pradavnine, kar dokazujejo jamske risbe nastale pred 20 do 30 tisoč leti v času paleolitika. Tisočletja je med predstavljal edino sladilo, vse dokler niso v 3. stoletju našega štetja v Indiji pričeli zgoščati sok sladkornega trsa. Med je tako dobil tekmeča in svojo vlogo skoraj prepustil sladkorju.

Danes je znano, da kompleksna sestava medu blagodejno vpliva na naše zdravje, zato ne zaseda pomembnega mesta le v prehrani, ampak je visoko cenjen tudi v zdravilstvu.

Poleg različnih sladkorjev, ki predstavljajo kar 95 % suhe snovi, vsebuje med tudi druge snovi, kot so organske kisline, protibakterijske snovi, vitamini, minerali, encimi in številne dušikove spojine. Prav ugotavljanju vsebnosti slednjih, skupnih beljakovin in prevladujoče aminokislina prolina, je namenjena ta diplomska naloga. Predstavlja del obsežne raziskave medu slovenskega porekla, ki poteka pod okriljem Katedre za vrednotenje živil.

## 1.1 Namen dela

Namen diplomskega dela je bil določiti vsebnosti aminokislina prolina in skupnih beljakovin v izbranih vzorcih medu slovenskega porekla, sedmih različnih vrst: akacijevega, cvetličnega, gozdnega, hojevega, kostanjevega, lipovega in smrekovega.

Prolin smo določali po navodilih harmonizirane Oughove metode, ki je od leta 1999 potrjena iz strani mednarodne komisije za med, skupne beljakovine pa smo ovrednotili s prilagojeno Kjeldahlovo metodo ob pomoči sodobnega, delno avtomatiziranega sistema Büchi. Zaradi narave dela smo pričakovali boljšo ponovljivost pri določanju vsebnosti skupnih beljakovin in nekoliko slabšo pri prolinu, saj je metoda za določanje vsebnosti prolina dolgotrajna, sestavljena iz več faz, kemijska reakcija pa izredno temperaturno in časovno odvisna.

Zastopanost dušikovitih spojin v medu je manjša od 1 %. Znano je, da je njihov izvor tako rastlinskega (cvetni prah, nektar, rastlinski - floemski sok), kot tudi živalskega izvora (metabolizem sesajočih insektov in predvsem čebel). Ker je ozemlje današnje Slovenije izvorno območje kranjske sivke (*Apis mellifera carnica*), ki je zaščiten in pri nas edina dovoljena pasma čebel, smo predpostavili, da se njen doprinos dušikovitih spojin v različnih vrstah analiziranih vzorcev medu ne spreminja. Na podlagi omenjenega dejstva smo predvidevali, da razlike v vsebnosti prolina in skupnih beljakovin v posameznih vrstah medu izvirajo predvsem iz različnega botaničnega porekla cvetnega prahu ter nektarja oziroma mane. Nadalje smo pričakovali linearno zvezo med deležem skupnih beljakovin in deležem prolina, ki je prevladujoča aminokislina.

Eksperimentalne podatke obeh spremenljivk ter njune zveze smo tudi statistično obdelali in tako preverili značilnost razlik med posameznimi vrstami medu. Pričakovali smo, da se bodo naši rezultati ujemali s sicer skopimi podatki tujih in domačih raziskovalcev.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 Življenje čebel in biološki nastanek medu

Osnovno poznavanje življenja čebel in nastanka medu pokriva področje biologije, vendar pripomore k lažjemu razumevanju teme, ki je predmet te naloge.

Po zoološki sistematiki spadajo čebele v razred žuželk. Večina izmed približno 20.000 vrst, ki so predstavnice rodu čebele (*Apis*), so čebele samotarke. Za pridelavo medu, cvetnega prahu in voska pa je pomembna predvsem vrsta medonosnih čebel (*Apis mellifera*). Le-te živijo v visoko razvitih socialnih skupnostih - družinah, z 20.000 do 80.000 člani. Med njimi je ena matica, nekaj sto trotov, ostalo pa predstavljajo nereproduktivne čebele delavke (Gregorc, 2002).

Za prebivalce panja je značilna delitev dela, ki je genetsko pogojena (matica, troti, delavke) in hkrati specifična za posamezne linije, kar je najbolj razvidno iz življenja delavk.

Čeprav v poletnem obdobju čebele delavke živijo le od 15 do 35 dni, se njihova vloga, torej aktivnosti, ves čas spreminjajo. Določene so s starostjo, predvsem z razvojem posameznih žlez: čeljustne, slinske, krmilne, prsne, voskovne. Ko se iz ličinke oz. bube izleže *mladica*, začne spremljati matico pri izleganju jajčec in hkrati prevzame skrb za novo zalego. V tem času krmilne in čeljustne žleze intenzivno izločajo matični mleček. Ta predstavlja glavni vir energije matici in je pomemben dodatek v prehrani ličink, sicer pa ličinke kar 80 % fizioloških potreb pokrijejo s cvetnim prahom in medom. V fazi razvoja sledi obdobje *panjske - hišne* čebele z razvitimi voskovnimi žlezami in žlezami slinavkami. Panjske čebele opravljajo številna opravila, med drugim gradijo satje, čistijo panj, ga z utripanjem kril prezračujejo, odstranjujejo odvečno vlago, uravnavajo temperaturo in kar je za nastanek medu najpomembnejše, poskrbijo za medicino (nektar, mana) in cvetni prah, ki ga ob vrnitvi v panj prevzamejo od starejših predstavnic svojega delavskega razreda. Imenujemo jih *nabiralke - pašne čebele*, ker se posvečajo le še paši (Božič, 1998; Gregorc, 1998; Gregorc, 2002).

Pašne čebele nabirajo cvetni prah v posebne koške, ki se nahajajo na zadnjem delu nog. V panju ga panjske čebele shranijo v satne celice, od koder ga predvsem za potrebe zalege jemljejo mladice, viški pa predstavljajo zalogo za zimo oziroma brezpašno obdobje (Gregorc, 2002).



Med pašo nabrane sladke sokove - medicino čebele skladiščijo v medno golšo, ki je nekakšen podaljšek požiralnika. V panju vsebino izbljuvajo, posesajo jo panjske čebele in prične se približno 20 minut trajajoč postopek ponavljajočega bljuvanja sladke kapljice na konico rilčka (jezička) in srkanja v medno golšo (Božič, 1998).

Med tem poteka:

- izhlapevanje vode, saj se vsebnost vode z začetnih 60 % zmanjša na 30-35 % in
- vnašanje sline, ki jo obilno izločata slinski žlezi v glavi in oprsju. Slina je bogata zlasti s prebavnimi encimi, ki pospešujejo biokemično razgradijo sestavljenih sladkorjev nektarja in mane do enostavne, invertne oblike, dostopne metabolizmu čebel (Gregorc, 2002).

Po odlaganju predelane medicine v satje, sledi proces zorenja. Fizikalno osnovo zorenja predstavlja dokončno izhlapevanje vode na približno 18 %, biokemično zorenje pa je posledica delovanja prisotnih encimov na strukturo sladkorjev. Iz medicine nastane med (Božnar in Senegačnik, 1998).

Izredno kompleksna sestava medu je torej posledica snovi, ki izvirajo iz rastlin, komponent, ki jih dodajo čebele, sprememb, ki potekajo med zorenjem, in seveda podnebnih razmer, okolja ter dela čebelarja (Božič, 1998; Božnar in Senegačnik, 1998; Gregorc, 1998; Gregorc, 2002).

## **2.2 Izvor medu**

Od zgodnje pomladi do poznega poletja ponuja narava bogat vir sladkih sokov, ki ga s pridom izkoriščajo tudi čebele. Ti se spreminjajo glede na cvetenje različnih rastlin in pojavljanje mane. Med pašo nabrani nektar in mano, katerih skupni izraz je medicina, čebele v panju predelajo v med (Slovar slovenskega knjižnega jezika, 1991).

### **2.2.1 Nektar**

Nektar je od 5 do 40 % vodna raztopina sladkorjev, ki jo izločajo posebne žleze cvetočih rastlin, imenovane medovniki. Med sladkorji prevladujejo saharoza, glukoza in fruktoza, ki se nahajajo v različnih razmerjih. Poleg njih so v nektarju prisotne tudi manjše količine beljakovin (manj kot 0,2 %), mineralov, organskih kislin, vitaminov, lipidov, pigmentov in aromatičnih komponent (Gregorc, 2002).

Najpomembnejše nektarne paše na območju Slovenije predstavljajo:

- teloh, leska, zvončki, trobentice, vrba, spomladanska resa, številne rastline gozdne podrasti in sadno drevje v prvem pomladnem obdobju, ter
- akacija, pravi in navadni divji kostanj, lipa, travniške rastline, rastline gozdnih obronkov in rečnih bregov v osrednjem spomladanskem in poletnem obdobju (Božič, 1998).

### 2.2.2 Mana

Mana je floemski sok, t.j. sladka vodna raztopina, ki se pretaka po žilah rastlin in jo v bolj ali manj predelani obliki izločajo sesajoče žuželke. To so predvsem različne ušice iz reda kljunatih žuželk (*Rhynchota*) in kaparji, ki živijo na iglavcih, pa tudi listavcih, ter povzročajo gozdno medenje (Šivic, 1998).

Drevesni sok vsebuje od 10 do 30 % suhe snovi. Majhen delež predstavljajo mineralne snovi (1 - 3 %), beljakovine (0,03 - 0,27 %), organske kisline in vitamini, glavna pa pripada disaharidoma saharozi in maltozi. Žuželke za potrebe svojega metabolizma porabijo le nekaj odstotkov sladkorjev. Večji del izločijo, vendar zaradi prisotnih encimov v slini in drugih prebavnih sokovih, v povsem spremenjeni obliki. Mana tako vsebuje predvsem enostavna sladkorja fruktozo in glukozo, lahko pa tudi nekatere višje sladkorje kot sta melicitoza in fruktomaltoza, ki sta rezultat spajanja enostavnih sladkorjev (Gregorc, 2002; Šivic, 1998).

Zanimiva je ugotovitev, da je sladkorni spekter odvisen predvsem od vrste sesajoče žuželke in manj od rastline gostiteljice. Včasih je veljajo zmotno prepričanje, da žuželke, ušice in kaparji, srkajo drevesne sokove zaradi oskrbe z beljakovinami. Danes je znano, da za potrebe svojega organizma porabijo le del sladkorjev, zato ostajata količina dušikovitih spojin v mani zelo podobni tistim v izvornem floemskem soku, sestava pa nekoliko spremenjena, saj namesto beljakovin prevladujejo aminokisline in amidi. V redkih primerih so raziskovalci odkrili povečano količino novih dušikovitih spojin in prisotnost vitamina B<sub>12</sub>, za katere predvidevajo, da so jih proizvedle v žuželkah živeče simbiotske bakterije, sposobne vezave dušika iz zraka (Božnar in Senegačnik, 1998; Šivic, 1998).

Manino pašo v naših krajih zagotavljajo:

- različne vrste ušic in kaparjev na hoji, t.j. navadni jelki, smreki, macesnu, boru in nekaterih drugih iglavcih,
- različne vrste ušic na lipi, kostanju, hrastu, javoru, vrbi, bukvi in sadnem drevju ter
- na Primorskem tudi medeči škržat na robidi, koprivi, rdečem drenu in nekaterih gojenih rastlinah (Šivic, 1998).

### 2.3 Vrste medu

V našo preiskavo smo vključili 7 najbolj zastopanih vrst medu v Sloveniji: akacijev, cvetlični, gozdni, hojev, kostanjev, lipov in smrekov.

Glede na izvor medicinske razlikujemo nektarne in manine medove. Upoštevajoč, koliko različnim rastlinskim vrstam pripada medicina, pa medove uvrščamo med sortne (ena prevladujoča rastlinska vrsta) ali mešane (dve rastlinski vrsti ali več).

### 2.3.1 Akacijev med

Čebelja paša na robiniji ali akaciji (*Robinia pseudoacacia* L.) predstavlja na območju celotne Slovenije enega najbolj obilnih in zanesljivih virov medicinske - nektarja med vsemi medonosnimi drevesnimi vrstami, a z malo cvetnega prahu (Božič, 1998).

Rezultat dela čebel je akacijev sortni nektarni med, skoraj brezbarvne do svetlo rumene barve, šibko sadežnega vonja in nežne, fine arome. Je zelo tekoč in se nerad ali le delno strjuje (Golob in sod., 2002; Božnar in Senegačnik, 1998).

### 2.3.2 Cvetlični med

Travniška paša na medovitih rastlinah kot so travniška kadulja (*Salvia pratensis* L.), materina dušica (*Thymus* L.), njivski grabljišč (*Knautia Arvensis* (L.) Coult.), navadna kokota (*Lotus corniculatus* L.), plazeča detelja (*Trifolium repens* L.), meteljka (*Medicago* sp. L.) in mnoge druge rastline predstavljajo vir nektarja in cvetnega prahu, iz katerega čebele pridelujejo cvetlični med (Božič, 1998).

Kot cvetlični med pogosto označujemo tudi medove drugih cvetočih rastlin (ne le travniških), ki ne ustrezajo zahtevam sortnih nektarnih medov. Vir medicinske in cvetnega prahu so torej različne rastline, kar se kaže v relativno velikih razlikah v sestavi, ter pestrosti barv, vonjev in okusov. Po eni od delitev - glede na specifično elektrolitsko prevodnost (SEP) - medove razločujemo le na cvetlične (manj kot 0,8 mS/cm) in gozdne oz. manine (več kot 0,8 mS/cm) (Božnar in Senegačnik, 1998).

Barva cvetličnega medu je zelo raznolika, od rumene do rjave. Vonj in aroma sta prijetni, precej intenzivni, sadežni, zeliščni ali po travniku (Golob in sod., 2002).

### 2.3.3 Gozdni med

Gozdni med je rezultat čebeljih paš na manah različnih iglavcev (hoja, smreka, macesen, bor) in listavcev (kostanj, lipa, hrast, javor, leska) (Božnar in Senegačnik, 1998).

To je med mešanega maninega porekla, svetlo do temno rjave barve, včasih tudi rdečkastega ali zelenkastega odenka. Vonj in aroma sta precej intenzivni, po smoli, a zelo različni glede na vrsto mane. Kristalizacija je srednja in navadno zavzame vso količino, prijetnega sladkega okusa in polne arome. Značilnost vseh maninih medov je, da smejo vsebovati le majhne količine pelodnih zrn (Golob in sod., 2002).

### 2.3.4 Hojev med

Navadna jelka ali hoja (*Abies alba* Mill) predstavlja za slovensko čebelarstvo drugo najpomembnejšo drevesno vrsto. Hojevo mano povzročajo zelena (*Cinara pectinatae* Noerdl), velika rjava (*Todalachnus abieticola* Chol) in brstna (*Mindarus abietinus* Koch)

hojeva ušica, ter mali hojev kapar (*Physokermes hemycrypus* Dalm). Izrazito dobre letine so sicer redke, vendar izdatnejše kot na kateri koli drugi rastlini (Šivic, 1998).

Hojev med po izvoru opredeljujemo kot sortni in manin hkrati. V tekočem stanju je precej gost in temno rjav z zelenim odsevom, strjen pa sivo rjav in nenavadno trd. Običajno ne oblikuje kristalov. Je srednje intenzivnega in karakterističnega vonja po smoli, žganju, mleku v prahu. Aroma je srednje do precej intenzivna, prav tako karakteristična, po smoli, žganju, mentolu ali sladju (Golob in sod., 2002; Božnar in Senegačnik, 1998).

### 2.3.5 Kostanjev med

Paša na pravem kostanju (*Castanea sativa* Mill.) je najzanesljivejša paša na območju Slovenije, vendar nekoliko manj obilna od akacijeve. Moška in ženska socvetja predstavljajo najbogatejši vir cvetnega prahu in hkrati obilo nektarja. Med cvetenjem svoj vrhunec doživi tudi kostanjeva ušica (*Lachnus longipes* Dofour), ki izloča kostanjevo mano (Božič, 1998; Šivic, 1998).

Kostanjev med je bolj ali manj temne jantarne barve z rdečkastim ali zelenkastim odtenkom. V kostanjevem medu je vselej prisotno veliko cvetnega prahu, ki mu daje značilno grenkobo. Vonj je intenziven, po kostanjevem cvetju, oster in včasih celo odbijajoč. Tudi aroma je izrazita, zelo karakteristična, po zeliščih ali pelinu (Golob in sod., 2002; Božnar in Senegačnik, 1998).

Med, v katerem prevladuje mana, je nekoliko temnejši od čistega cvetnega (nektarnega) medu, vsebuje nekoliko manj peloda, okus in aroma pa sta intenzivnejši (Šivic, 1998).

Najpogosteje sortni kostanjev med sestavljata tako nektar, kot mana, zato ga uvrščamo med nektarno-manine.

### 2.3.6 Lipov med

Lipa (*Tilia platyphyllos* Scop.) in lipovec (*T. Cordata* Mill.) rasteta v gozdovih po vsej Sloveniji, zaslediti pa ju je tudi v parkih in drevoredih. Kljub precejšnji količini nektarja pa zaradi relativno redkega pojavljanja lipe in lipovca govorimo o zmerni lipovi paši. Za obe drevesni vrsti je značilen tudi pojav mane (Božič, 1998).

Lipov med je rumen, zeleno-rumen ali kremno bel z zelenim ali rumenim odtenkom. Aroma je značilna za lipo, srednje intenzivna, po lipovem čaju, mentolu, svežih oreh in rahlo astringentna. Vonj je zelo karakterističen, močan, svež, po lipovem cvetju (Golob in sod., 2002).

Med iz nektarja kristalizira hitro in tvori velike kristale, iz mane pa počasi. Kristali so neenakomerno razporejeni (Božnar in Senegačnik, 1998).

Lipov med je prav tako primer sortnega medu, ki je lahko nektarnega ali maninega izvora, najpogosteje pa mešanica obeh.

#### 2.3.7 Smrekov med

Mana navadne smreke (*Picea excelsa* Link.) je v Sloveniji precej pogosta in izdatna. Povzročajo jo veliki (*Physokermes piceae* Schrk.) in mali (*Physokermes hemicryptus* Schrk.) smrekov kapar, ter velika črna (*Cinara piceae* Panz.), rdeče rjava puhasta (*Cinara pilicornis* Htg.), zeleno progasta (*Cinara cistana* Bckt.), sivo zelena lisasta (*Cinara pruinoso* Htg.) in močno puhasta smrekova ušica (*Lachniella costata* Zett.) (Šivic, 1998).

Smrekov med je srednje do temno jantarne sijoče barve z rdečim odtenkom. Vonj in aroma sta precej intenzivni, po smoli, spominjata tudi na zeliščne bombone (Golob in sod., 2002). Običajno kristalizira počasi, včasih pa zelo hitro (Božnar in Senegačnik, 1998).

Na podlagi izkušenj lahko zapišemo, da sta akacijev in cvetlični med nektarna, gozdni, hojev in smrekov med pa manini. Medove lipe in kostanja običajno ne moremo uvrstiti v nobeno od omenjenih skupin, pač pa ju obravnavamo kot mešane nektarno-manine.

O dejanskem poreklu oziroma vrsti medu se prepričamo z mikroskopsko preiskavo peloda in s senzorično analizo, v pomoč pa je tudi podatek o specifični elektrolitski prevodnosti (SEP). Več o omenjenih metodah, predvsem omejitvah, s katerimi se srečujemo pri izvajanju le-teh, je zapisano v 2.7.

## 2.4 Sestava medu

Med je brez dvoma primer izjemno kompleksnega živila, ki je povsem naraven in kot tak, v nepredelani obliki, primeren za sladilo v prehrani ljudi (Iglesias in sod., 2004). Zaradi svoje sestave je tudi za diabetike ugodnejši od sladkorja.

Osnovne kakovostne (parametre) o sestavi medu navaja Pravilnik o medu (2004) in so podani v preglednici 1. Pravilnik je usklajen z evropsko zakonodajo (Council directive, 2002).

Glavni sestavini medu predstavljata približno 80-85 % delež različnih sladkorjev in 20 % delež vode. Ostale snovi so različne kisline, hidroksimetilfurfural, encimi, beljakovine, aminokisline, elementi, v vodi topni vitamini ter barvila (Plestenjak, 1999).

Po nekaterih podatkih naj bi med vseboval več kot 200 različnih komponent (White, 1978).

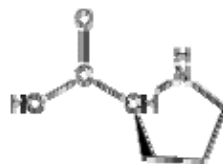
Preglednica 1. Najmanjše in največje predpisane količine kriterijev kakovosti, ki jih določa slovenski Pravilnik o medu (2004)

KRITERIJI SESTAVE	VRSTA MEDU	KOLIČINA	
		min	max
vsebnost fruktoze in glukoze – vsota (g/100 g)	cvetlični	65	-
	gozdni in mešanice gozdnega s cvetličnim	45	-
vsebnost saharoze (g/100 g)	vse vrste razen izjem	-	5
vsebnost vode (%)	vse vrste razen izjem	-	20
vsebnost v vodi netopnih snovi (g/100 g)	vse vrste	-	0,1
	vse vrste razen izjem	-	0,8
SEP (mS/cm)	gozdni in kostanjev ter njune mešanice	0,8	-
proste kisline (miliekivalenti/1000 g)	vse vrste	-	50
diastazno število	vse vrste	8	-
hidroksi metil furfural (mg/kg)	vse vrste	-	40

## 2.5 Prolin

### 2.5.1 Prolin splošno

Prolin (Pro) je ciklična aminokislina s sistematskim imenom pirolidin-kislina in ima kemijsko zgradbo, ki jo prikazuje slika 1.



Slika 1. Kemijska zgradba aminokislina prolin (Proline, 1998)

Na  $\alpha$ -ogljikov atom vezana alifatska veriga, t.j. veriga ogljikovodikov, se hkrati spaja z  $\alpha$ -amino skupino in tako oblikuje značilno obročasto strukturo. Posledično amino skupina nima prostega vodikovega atoma, zato prolin, kot gradbena enota beljakovin, ne tvori klasičnih vodikovih vezi, s katerimi bi prispeval k stabilizaciji sekundarne strukture  $\alpha$ -heliksa. Pogosto se nahaja kot začetna oziroma končna aminokislina, ali pa z oblikovanjem posebnih zank ustvarja visoko urejene sekundarne strukture peptidov (Nelson in Cox, 2005).

Kot del polipeptidov se nahaja v *cis* ali *trans* konfiguraciji, kar ga prav tako ločuje od ostalih, izključno *trans* aminokislin. V naravi se tako, kot vse ostale aminokislina s kiralnim centrom, nahaja v L-stereoisomerni obliki. Linearno polarizirano svetlobo pri 25 °C suče v levo smer, kar označuje predznak (-), za -86,2° (Lehninger, 1982).

Amino in karboksilna skupina dajeta prolinu amfoterni značaj, zato lahko deluje kot kislina (donor protonov) ali baza (akceptor protonov). Disociacijska konstanta pri 20 °C v kislem

( $pK_{COOH}$ ) je 1,99, v bazičnem ( $pK_{NH^{3+}}$ ) 10,60, vrednost izoelektrične točke ( $pI$ ) pa je pri 6,30. Prolin je edina aminokislina, ki je topna v alkoholu in v vodi (Nelson in Cox, 2005).

Kot smo zapisali uvodoma, ima med 20 bazičnimi aminokislinami le prolin sekundarno vezano amino skupino, od koder izhajajo še druga poimenovanja, npr.:

- sekundarni amin, kar pomeni, da sta dva vodikova atoma amoniaka zamenjana z alkilno oziroma arilno skupino ter
- imino kislina, zaradi imido (-NH) skupine.

Izjemne lastnosti te ciklične nepolarne aminokislina s pridom izkoriščamo v analitiki. Pri reakciji s kemijskim reagentom ninhidrinom nastaja kompleks rumene barve, pri ostalih  $\alpha$ -aminokislinah pa modro vijoličen. Kemizem reakcije je opisan v 2.7.2.

V prehrani ljudi spada prolin med neesencialne aminokislina, ker ga za potrebe organizma telo proizvaja samo. Kljub temu zaseda prolin v medu posebno mesto.

#### 2.5.2 Prolin v medu

V literaturi je moč zaslediti različne podatke o aminokislinski sestavi medu. White (1978) navaja, da so z uporabo papirne kromatografije že leta 1960 uspeli identificirati 17 aminokislin v medu. Z razvojem separacijskih tehnik in analiznih metod, predvsem v smeri plinske in visoko tlačne tekočinske kromatografije, v zadnjem času poročajo o 27 različnih aminokislinah (Hermosin in sod., 2003; Iglesias in sod., 2004; Gonzalez Paramas in sod., 2006).

Čeprav je prostih aminokislin v medu povprečno le 0,3 % (Gonzalez Paramas in sod., 2006), je delež prolina glede na ostale izstopajoč. Kljub precejšnjemu variiranju je prav prolin tisti, s pomočjo katerega ocenjujemo delež skupnih aminokislin v medu (Meda in sod., 2005). Raziskovalci različnih časovnih obdobj, med njimi tudi White (1979) ter Gonzalez Paramas in sod. (2006), so si enotni, da predstavlja prolin od 50 do 85 % skupnih aminokislin v medu.

Objavljene so bile še mnoge raziskave, katerih sklepna misel pravi, da je prolin prevladujoča aminokislina v medu. Izjeme, ki potrjujejo pravilo, pa so med sivke, timijana in rožmarina (Hermosin in sod., 2003).

Z raziskavami naravno prisotnih antioksidativnih snovi v medu, dobiva prolin nov pomen. Meda in sodelavci (2005) so namreč dokazali pozitivno korelacijo med vsebnostjo prolina in sposobnostjo odstranjevanja prostih radikalov (RSA, radical scavenging activity). Le-ta se je izkazala celo boljše od korelacije s skupnimi fenolnimi snovmi.

Lucchesi je leta 1979 prvi predlagal prolin kot indikator potvorjenosti medu, sicer pa raziskovalci vztrajno iščejo povezavo med vsebnostjo prolina in kakovostjo, zrelostjo, pristnostjo ter pripadajočim botaničnim poreklom medu.

Mnenja o izvoru prolina v medu so deljena. Ta naj bi namreč izviral tako iz cvetnega prahu rastlin, kot tudi iz samih čebel oziroma njihovega metabolizma.

#### 2.5.2.1 Vir prolina – čebela

Ena izmed predpostavk pravi, da je prolin osmoregulator, ki ga čebele vnašajo v med hkrati z encimi in sicer z namenom, da izenačuje visok osmotski tlak nektarja (Sporns, 1992).

Kako pomembna je vloga čebel za prisotnost prolina v medu so s skrbno načrtovanim poskusom dokazali von der Ohe in sodelavci (1991). Njihovo delo se je pričelo z vzrejo ustreznega števila čebeljih družin, ki so pripadale istemu genetskemu izvoru. Temu je sledil 6-tedenski poskus. V prvem 3-tedenskem obdobju, imenovanem tudi čas izgradnje, so bile družine izpostavljene enakim življenjskim pogojem. V nadzorovanem laboratorijskem okolju (*in vitro*) je vsaka prejela 6 litrov sladkornega sirupa (72,5 % suhe snovi, od tega 40 % fruktoze, 33 % saharoze, 27 % glukoze) in pelodni nadomestek, ki naj bi vseboval le beljakovine, potrebne za rast in razvoj, ne pa takšnih, ki bi neposredno vplivale na sestavo medu. Nato so družine razdelili v 5 skupin, ki so nadaljnje 3 tedne živele v različnih bivalnih okoljih in imele različen način prehranjevanja:

- 1. skupina S1 (2 družini) je še naprej živel v *in vitro* okolju, uživala pelodni nadomestek in sladkorni sirup (vsaka družina 2,54 kg v ss);
- 2. skupina S2 (2 družini) je prav tako še naprej živel v *in vitro* okolju, ter uživala pelodni nadomestek in sladkorni sirup, vendar drugačno količino (vsaka družina 4,24 kg v ss);
- 3. skupina S3 (3 družine) je živel na prostem, paša je predstavljala naravni vir nektarja, mane in peloda, hkrati pa je vsaka družina dobivala tudi sladkorni sirup (5,08 kg v ss);
- 4. skupina S4 (3 družine) je živel v enakih pogojih kot tretja, le da je njen zunanji vir sladkorja predstavljala pogača. Vsaka družina je prejela 2,51 kg (89,5 % suhe snovi, od tega 89 % saharoze in 11 % glukoze);
- 5. skupina S5 (3 družine) je živel na prostem in se samooskrbovala izključno s pašo.

Vzorci medu so iz panjev odvzemali tedensko. Po četrtem in petem tednu so ga pridobili iz vrhnjega sloja satja, po šestem, to je ob zaključku eksperimenta, pa so med iztočili na klasičen način. Laboratorijske rezultate treh parametrov podaja preglednica 2.



V primeru prolina rezultati dokazujejo, da je njegova vsebnost tesno povezana z metabolizmom čebel. Skupini S1 in S2 sta kljub življenju v *in vitro* okolju, kar vključuje izoliran prostor in povsem umetni način prehranjevanja, pridelali med z znatnim deležem prolina. Ta dosega približno polovično vrednost prolina v naravnem (S5) ali delno naravnem medu (S3 in S4). Iz navedenega sledi, da se drugi pomembni vir prolina nahaja v naravi - v cvetnem prahu.

Preglednica 2. Vsebnost prolina in vode ter vrednosti SEP v medu čebel, vključenih v poskus von der Ohe in sod. (1991)

med	SKUPINE ČEBEL GLEDE NA NAČIN PREHRANJEVANJA									
	S1 (2 družini)		S2 (2 družini)		S3 (3 družine)		S4 (3 družine)		S5 (3 družine)	
	$\bar{x} \pm SD$ (n=6)	$x_6$	$\bar{x} \pm SD$ (n=6)	$x_6$	$\bar{x} \pm SD$ (n=9)	$x_6$	$\bar{x} \pm SD$ (n=9)	$x_6$	$\bar{x} \pm SD$ (n=9)	$x_6$
Prolin (mg/kg)	150,0 ±20,8	149,9	115,7 ±10,5	92,1	155,1 ±38,9	106,0	256,2 ±56,6	298,4	207,6 ±1,8	246,1
Voda (%)	20,1 ±2,0	21,7	20,9 ±1,6	21,5	18,6 ±1,4	20,0	18,3 ±0,93	18,6	18,8 ±0,80	18,5
SEP (mS/cm)	0,13 ±0,02	0,1	0,11 ±0,01	0,1	0,14 ±0,04	0,1	0,20 ±0,04	0,2	0,24 ±0,04	0,3
$\bar{x} \pm SD$ - povprečna vrednost in standardni odklon analiziranih parametrov v vzorcih medu po 4. in 5. tednu, standardni odklon $x_6$ - vrednost analiziranih parametrov v vzorcu medu ob zaključku poizkusa, po 6. tednu										

Iz preglednice 2 je tudi razvidno, da na delež prolina pomembno vpliva količina dodanih sladkorjev. Skupini S1 in S2 sta živeli v enakih pogojih, le da je imela slednja na voljo skoraj dvakrat večjo količino sladkornega sirupa kot prva. Izobilje hrane ni doprineslo k večjemu deležu prolina v medu, nasprotno. Med tem, ko je povprečna in končna vrednost opazovane aminokislina pri S1 ostala skoraj nespremenjena, je pri S2 v 3-tedenskem obdobju strmo padala. Navedeno se sklada s predpostavko, da je prolin kakovostni parameter, zato izobilje vhodne surovine ni pozitivno vplivalo na kakovost končnega izdelka.

Na delež prolina pomembno vpliva tudi sestava sladkorjev, namenjenih za prehrano čebel. V ta namen je smiselno primerjati skupini S3 in S4. Obe sta imeli možnost paše na prostem in hkrati dobivali umetni vir sladkorja: S3 sirup, sestavljen iz približno enakih razmerij fruktoze, glukoze in saharoze ter S4 pogačo, ki je bila skoraj izključno iz saharoze. Delež prolina v skupini S3 se je v času poskusa manjšal, pri S4 pa strmo večal. Kljub temu, da količina dodanih hranil ni primerljiva, saj je skupina S3 v obliki sirupa zaužila 5,08 kg suhe teže sladkorja, S4 pa v obliki pogače le 2,51 kg, lahko najdemo ponovno razlago v metabolizmu čebel. Glede na to, da se nahajajo v medu predvsem enostavni sladkorji, torej monosaharida glukoza in fruktoza, morajo čebele vse sestavljene sladkorje ustrezno

predelati. To dosežejo ob pomoči encimov, ki se nahajajo v njihovi slini, tako kot tudi aminokislina prolin. Več dodanih encimov najverjetneje pomeni tudi več prolina.

To je bila prva znanstvena raziskava, ki je preučevala vpliv različnih načinov prehranjevanja na delež prolina. Von der Ohe in sodelavci (1991) zaključujejo, da je prolin, skupaj z nekaterimi drugimi kriteriji, primeren parameter za določanje zrelosti in pristnosti medu.

Ameriški raziskovalec Joshi in sodelavci (2000) so preučevali fizikalno kemijske lastnosti medu, ki so ga pridelale tri vrste čebel rodu *Apis*: *A. dorsata*, *A. cerana* in *A. mellifera*. Poskus oziroma paša čebeljih družin je potekala v pokrajini Chitwan v osrednjem Nepal, odvzemanje vzorcev pa je bilo vselej opravljeno na isti dan. Med analiziranimi parametri je bil tudi prolin, pri katerem so vidne značilne razlike. Rezultate prikazuje preglednica 3.

Preglednica 3. Vsebnost prolina v medu glede na izbrano vrsto čebel (Joshi in sod. 2000)

VRSTA ČEBEL	PROLIN (mg/kg medu)
<i>A.dorsata</i> (28 družin)	875,8
<i>A.cerana</i> (26 družin)	323,0
<i>A.mellifera</i> (27 družin)	610,2

Rezultati poizkusa ponovno kažejo, kako velik je pomen čebele, natančneje njena vrsta. Iz opisane študije sledi, da bi morali vsi znanstveni prispevki o vsebnosti prolina v medu podajati ne le njegovo botanično poreklo, ampak tudi vrsto izbranih čebel, še boljše njeno podvrsto (pasma). Na osnovi naših ugotovitev ob pregledu literature lahko zapišemo, da je opis metodologije, z izjemo redkih avtorjev, s tega vidika v večini primerov pomanjkljiv.

Znano je, da igra prolin pomembno metabolno vlogo pri izmenjavi produktov aerobnega mišičja vseh insektov (White, 1978). Vgrajen je v mišice in hkrati v velikih količinah prisoten v hemolimfi, t.j. tekočini, ki obliva telesna tkiva. Berger in sodelavci (1997) menijo, da je prolin pri nekaterih žuželkah ključen v začetni fazi letenja, neke vrste iniciator, za tem pa vir energije predstavljajo ogljikovi hidrati. Pri tem ne gre pozabiti, da v razred *Insecta* ne uvrščamo le čebele, ampak tudi proizvajalce mane, ušice in kaparje.

Diez in sodelavci (2004) so prepričani, da so večje količine prolina značilne za manine medove. Tudi to trditev lahko obrazložimo s prej omenjeno hipotezo, ki pravi, da so manini medovi, za razliko od nektarnih, dvakrat zapored izpostavljeni metabolizmu insektov.

### 2.5.2.2 Vir prolina – cvetni prah

Cvetni prah ali pelod je moška zarodna plazma rastlin. Čebelam, predvsem pa čebelji zalegi, predstavlja edini naravni vir beljakovin, ki jih potrebujejo za rast in razvoj (Gregorc, 2002). Vsebuje od 11 do 35 % beljakovin, od 20 do 40 % ogljikovih hidratov, od 1 do 20 % maščob, od 1 do 7 % mineralnih snovi, poleg tega pa tudi vitamine, pigmente, aromatske snovi in inhibine, naravne zaščitne snovi, ki preprečujejo razvoj nekaterih patogenih bakterij. Med vitamin naj omenimo provitamin A, vitamine B-kompleksa ter vitamine C, D, E in K (Rihar, 1998). Tudi v cvetnem prahu več kot polovico prostih aminokislin predstavlja prolin (Gonzalez Paramas in sod., 2006).

Davies (1975) sicer trdi, da le 1,5 % vseh aminokislin v medu dejansko izvira iz peloda, a izjava kaže na precejšnje posploševanje. Na tem mestu naj opomnimo, da je za posamezne rastlinske vrste, ter iz njih pridelan med, značilna nadpovprečno velika ali majhna količina prisotnega cvetnega prahu. Tako v naših krajih kostanj slovi po izdatni količini cvetnega prahu, ki ga je vselej veliko tudi v medu, ne glede na to, ali je nektarnega ali maninega izvora. Z mikroskopsko preiskavo kostanjevega nektarnega medu visoke kakovosti naj bi določili več kot 90 % pelodnih zrn kostanja, med tem ko je splošno predpisana meja za ostale sortne nektarne medove 45 % pelodnih zrn vodilne botanične vrste. Našim čebelarjem je dobro znana tudi paša na akaciji, ki daje največje količine nektarja, vendar izjemno malo cvetnega prahu. Še manj cvetnega prahu pa premorejo cvetovi citrusov in tako za sortnost teh medov zadostuje že 10 % pripadajočih pelodnih zrn (Anklam, 1998).

Gonzalez Paramas in sodelavci (2006) v svojem članku omenjajo izjemno teorijo, ki pravi, da je v medu prisotni prolin izključno rastlinskega izvora. Izhajal naj bi namreč iz telesnih zalog, ki so jih le-te ustvarile v prvem življenjskem obdobju, ko so se kot ličinke intenzivno prehranjevale s cvetnim prahom.

Pravilnik o medu (2004) prolina ne vključuje. Mednarodna komisija za med pa omenja prolin le kot dodatni parameter kakovosti, katerega vsebnost naj bi bila večja od 180 mg/kg, hkrati pa opozarja, da je potrebno upoštevati možnost velikih odstopanj.

### 2.5.3 Pregled literature o vsebnosti prolina v medu

Podatki o vsebnosti prolina, ki jih najdemo v tuji literaturi, za nas ne predstavljajo posebne uporabne vrednosti. Na to nas opozarjajo:

- imena medov, ki pripadajo povsem tujim botaničnim vrstam (evkaliptus, oranževец, bela vrba, božje drevce, rožmarin, sivka, timijan, sončnica, rožičevец, meta);
- imena držav, kot so Alžirija, Maroko in Burkina Faso;
- avtorji praviloma ne navajajo vrste ali pasme čebel.

Rezultat vseh naštetih dejstev so veliki razponi v vsebnosti prolina. Boljši vpogled nam omogoča preglednica 4.

Preglednica 4. Vsebnost prolina v medu različnih vrst, kot jih navajajo tuji avtorji

	ŠPANJA (Hermosin in sod., 2003)	ŠPANJA (Serrano in sod., 2004)	ŠPANJA (Sanchez in sod., 2001)	ŠPANJA (Iglesias in sod., 2004)	ITALIJA (Conte in sod., 1998)	MADŽARSKA (Földhazi in sod., 1996)	MAROKO (Terrab in sod., 2002; Terrab in sod., 2003)	BURKINA FASO (Meda in sod., 2005)	ALŽIRIJA (Ouchemokh in sod., 2006)
VRSTA MEDU	$\bar{x}$ (mg/kg)								
cvetlični	-	-	817	672	-	-	741	852	354
evkaliptusov	493	430	470	-	-	-	561	-	-
kostanjev	-	-	839	-	641	733	-	-	-
manin	-	-	-	905	-	563	2270	-	680
resov	-	-	364	-	-	-	220	-	-
citrusov	350	185	-	-	-	-	250	-	-
sončnični	-	-	-	-	-	419	554	-	-
lipov	-	-	-	-	351	199	-	-	-
akacijev	-	-	-	-	223	426	-	-	-
<i>Combretaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	981	-
<i>Vitelaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	1655	-

Razlike v vsebnosti prolina obstajajo med različnimi vrstami in znotraj njih. Najbolj izrazita odstopanja so nedvomno pri maninih medovih iz Španije, Madžarske in Maroka. V teh člankih, ne le da ni podatkov o vrsti čebel, tudi vrsta rastline gostiteljice in sesajočih žuželk ni podana, zato podatki pravzaprav ne presenečajo. Znatne razlike so opazne tudi pri cvetličnih medovih, vendar so glede na ohlapno definiranost botaničnega porekla prav tako pričakovane. Cvetlični med je namreč splošno poimenovanje nektarnih medov in predstavlja sliko cvetočih rastlin nekega ožjega geografskega območja. Nenazadnje, ne smemo pozabiti na:

- neprimerljivost podnebnih danosti različnih dežel in
- nikoli ponovljive vremenske pogoje (količina padavin, temperatura in veter).

Povzamemo lahko sledeče:

- povezava med vrsto medu in vsebnostjo prolina vsekakor obstaja, vendar ostrih meja ni moč določiti,
- enotna predpisana ali priporočena vrednost za vse vrste medu je nesmiselna,
- za medsebojno primerjavo rezultatov je potrebno ustvariti bazo podatkov na osnovi večletnega analiziranja značilnih medov nekega področja.

V Sloveniji, ki pokriva relativno majhno območje 20.000 km<sup>2</sup>, so bile v obdobju od leta 1990 do 2004 narejene 4 pomembnejše raziskave o vsebnosti prolina v najpogosteje zastopanih sortnih in mešanih medovih slovenskega porekla (Kobal, 1990; Veljanovski, 1993; Pučko, 1995; Jamnik in sod., 2004). Rezultati so zbrani v preglednici 5, ki ji bomo v poglavju 4.6 dodali še najnovejše.

Preglednica 5. Vsebnost prolina v medu različnih vrst, kot jih navajajo domači avtorji

	Kobal, 1990	Veljanovski, 1993	Pučko, 1995	Jamnik in sod., 2004
VRSTA MEDU	$\bar{x}$ (mg/kg)			
akacija	276	-	314	386
cvetlični	354	-	569	713
gozdni	-	-	530	402
hoja	-	-	501	509
kostanj	541	579	627	553
lipa	-	368	396	350
smreka	-	-	340	570

## 2.6 Beljakovine

### 2.6.1 Beljakovine - splošno

Beljakovine so visokomolekulske spojine, sestavljene iz kemijskih elementov ogljika, kisika, dušika, vodika, izjemoma pa tudi žvepla in fosforja. Sintetizirajo se v živi celici, ob navzočnosti nukleinskih kislin celičnega jedra in so nepogrešljive za obstoj in ohranitev vseh živih bitij našega planeta. Beljakovine so v osnovi dolge polipeptidne verige, sestavljene iz 100 do več 1000 aminokislinskih enot, ki so med seboj povezane s peptidnimi vezmi. Molekulska masa manjših beljakovin znaša približno 12 kDa, doseže pa lahko vrednosti večje od 1000 kDa (Nelson in Cox, 2005).

Poznamo na tisoče različnih beljakovin, vendar vsaka igra svojo v naprej določeno vlogo, ki je zapisana v aminokislinskem zaporedju 20 različnih  $\alpha$ -aminokislin. Glede na biološko funkcijo razvrščamo beljakovine v sedem razredov: encimi, transportne, prehranske in založne, kontraktilne in gibalne, strukturne, zaščitne ter regulacijske beljakovine. Glede na obliko ločujemo ravne fibrilarne in kroglaste globularne (Nelson in Cox, 2005).

Beljakovine, ki jih sestavljajo izključno aminokisliline, imenujemo enostavne beljakovine ali proteini. Drugo veliko skupino oblikujejo sestavljene beljakovine, ki v strukturo vključujejo tudi nebeljakovinski del. To so različni kovinski ioni, maščobne in ogljikohidratne komponente, fosfatne skupine in drugo (Nelson in Cox, 2005).

Za beljakovine je značilno, da se njihova visoko organizirana struktura poruši, kadar so izpostavljene topilom, kot sta etanol in aceton, detergentom, močnim kislinam in bazam, ter visoki ali nizki temperaturi. Govorimo o denaturaciji.

V tehnološkem smislu predstavljajo beljakovine površinsko aktivne snovi, odlične emulgatorje in pomembno vplivajo na reološke lastnosti, kot so viskoznost, elastičnost, oblikovanje pene in drugo. Nenazadnje so nosilci senzoričnih lastnosti živil in vse pogosteje tudi pokazatelj kakovosti, pristnosti.

Za natančnejše preučevanje beljakovin je potrebno zmes beljakovin najprej izolirati in nato razstaviti na posamezne frakcije. Separacija je možna na osnovi različnih molekulskih mas, oblik ali naboja. Pri tem so nam v pomoč predvsem različne kromatografske tehnike in elektroforeza.

Metode za določanje beljakovin ločujemo na neposredne in posredne.

Med neposredne - direktne uvrščamo:

- vse kromatografske metode (ionsko izmenjevalna temelji na različnih nabojih, gelska na različnih velikostih oziroma molekulskih masah, kromatografija na reverzni fazi izkorišča različne hidrofobnosti beljakovinskih molekul oziroma aminokislinskih ostankov),
- elektroforezo, kapilarno elektroforezo (ločevanje delcev na osnovi naboja),
- imunokemijske metode (reakcije antigen - protitelo, vezava encimov),
- kolorimetrično določanje beljakovin na osnovi vezanja barvil,
- UV spektroskopijo (za merjenje motnosti ali za določanje koncentracije beljakovin),
- biuretsko reakcijo, Lowrijevo metodo, ksantoproteinsko reakcijo, formolno titracijo in druge.

Med posredne metode za določanje beljakovin spadata Dumasova in Kjeldahlova. Nekaj metod, ki se uporabljajo za določanje beljakovin v medu bomo opisali v 2.7.3.

### 2.6.2 Beljakovine v medu

V literaturi so prispevki o beljakovinah v medu bolj kot ne skromni, najverjetneje tudi zato, ker so količine vselej izredno majhne in jim ne pripisujejo posebne prehranske vrednosti. White je že leta 1978 poročal o povprečno le 0,04 % dušika, ter 0,2 % beljakovin v medu in hkrati opozarjal na velike standardne odklone. Anklam (1998) v svojem preglednem članku navaja, da je delež beljakovin v medu običajno manjši od 0,5 %. Vit Oliver (1987) pa je z določanjem skupnega dušika v naravnih medovih in medovih z dodatkom ogljikovih hidratov predlagal spodnjo še sprejemljivo mejo 10 mg dušika v 100 g medu, to je 0,01 %.

Perez in sodelavci (1987) so s HPLC analizo beljakovinske frakcije po kislinski hidrolizi določili 16 različnih aminokislin v vzorcih španskega medu. Podrobnejša obdelava rezultatov je pokazala, da se ti med seboj razlikujejo glede na rastlinsko in krajevno pripadnost.

S pomočjo visoko ločljivostne dvodimenzionalne SDS-PAGE (natrijev dodecilsulfat-poliakrilamid gelske) elektroforeze sta Marshall in Williams (1987) ugotavljala poreklo beljakovin v naravnih avstralskih medovih. Menita, da izvirajo predvsem od čebel, le v redkih primerih pa so tudi rastlinskega izvora.

Abdel-Aal in sodelavci (1993) so z analizo naravnih in nadzorovano potvorjenih medov z 10 do 50 % visoko fruktoznega koruznega sirupa dokazali, da je delež skupnega dušika v obratnem sorazmerju z dodanim sladkorjem.

V Avstriji so poreklo beljakovin v medu raziskovali v sklopu medicinske raziskave. Tako kot vse sistemske alergijske reakcije, tudi alergija na med, nastane kot posledica vnosa tujih beljakovin v preobčutljiv organizem. Imunski sistem jih zazna in sproži obrambne mehanizme - nastajanje specifičnih protiteles. Bauer in sodelavci (1996) so dokazali, da alergijo na med ne povzroča le prisotni cvetni prah, kar je bilo dolgoletno zmotno prepričanje. Alergeni in najverjetneje tudi druge beljakovine v medu so rastlinskega in živalskega izvora.

Raziskava je vključevala skupino oseb, z alergijo na med, skupino oseb, alergičnih na čebelje pike - čebelji strup in kontrolno skupino zdravih. Z različnimi postopki izolacije so pripravili beljakovinske frakcije kostanjevega, sončničnega, gozdnega in mešanega gozdnega s kostanjevim medom, poleg teh pa še frakcijo beljakovin čebeljih glav, ki naj bi zajemala bogat encimski sistem žlez slinavk, ter frakcijo beljakovin iz čebeljih zadkov, v katerih se nahajajo mošnjički čebeljega strupa. Z uporabo SDS-PAGE elektroforeze in barvila komasin briljantno modrega, so v območju molekulskih mas od 10 do 72 kDa ugotovili pestro beljakovinsko sestavo vseh štirih preiskovanih medov. V nadaljnje preiskave so vključili le sončnične beljakovine, beljakovine glave in zadka, ter ponovno z elektroforezo spremljali nastajanje kompleksov antigen - protitelo. Vir protiteles so predstavljali serumi preiskovanih oseb, odvzeti po zaužitju medu. Pri vseh osebah prve skupine, je bila potrjena vezava protiteles na območju specifičnih vrednosti molekulskih mas beljakovin sončničnega medu, v 48 % pri beljakovinah čebeljih glav in v 30 % pri beljakovinah zadkov. Pri vseh osebah so se pojavili tudi značilni simptomi srbečice v ustni sluznici in drugi znaki anafilaktičnega šoka. Reakcije kontrolne skupine so bile negativne.

V Braziliji so Azeredo in sodelavci (2002) iskali zvezo med beljakovinami in pripadajočim botaničnim poreklom medu. Vrsta preiskovanih medov je bila določena z mikroskopsko preiskavo peloda. Vsi vzorci so bili nektarni in glede na prevladujočo količino peloda označeni kot mešani cvetlični ali vrstni. Količino beljakovin so ovrednotili po Bradfordovi metodi, opisani v 2.7.3.2, ki se je izkazala za učinkovito v precejšnjem razponu preiskovane snovi (od 0,0199 g/100 g do 0,2336 g/100 g). Deleži beljakovin 15 analiziranih vzorcev medu so se pri 0,05 stopnji tveganja Tukeyjevega testa razvrstili v sedem statistično značilnih razredov (od *a* do *g*). Glede na vsebnost beljakovin in statistični razred so preiskovane vzorce uvrstili v tri skupine. V prvi so bili vzorci statističnih razredov *a* in *b* ter visoko vsebnostjo beljakovin, nad 0,100 g/100 g. V drugi skupini so bili vzorci s srednje visoko vsebnostjo od 0,050 do 0,100 in so pripadali statističnim razredom *c*, *d*, *e* in *f*. V tretji skupini so bili vzorci statističnega razreda *g* z nizko vsebnostjo beljakovin, pod 0,050 g/100 g. Pri tem je potrebno poudariti, da vzorce medu znotraj posamezne skupine ni povezoval le primerljiv delež beljakovin, ampak tudi skupno ali podobno botanično poreklo. Najvišji vrednosti beljakovin sta presegali 0,2 % in sta bili določeni vzorcema medu s skupnim botaničnim izvorom, rastlino *Borreria verticillata*. Omenjena vrsta medu je v Braziliji izredno cenjena, saj ji pripisujejo pozitivne učinke na zdravje in zato priporočajo kot dodatek vsakodnevni prehrani. Poleg kvantitativne analize je raziskava vključevala tudi Lundov kvalitativni test za prisotnost beljakovin, ki je v Braziliji uradno predpisana metoda. Količine nastalih beljakovinskih usedlin vseh vzorcev so bile v območju predpisanih vrednosti, vendar se niso skladale z vrednostmi Bradfordove metode in prav tako ne z botaničnim poreklom oz. vrsto. Azeredo in sodelavci so zato predlagali zamenjavo predpisane Lundove metode za določanje beljakovin v medu in kot primerno navedli Bradfordovo.

Küçük in sodelavci (2006) so s posredno Lowrijevo metodo, katere princip je opisan v 2.7.3.1, določali skupne beljakovine trem vrstam medu iz turške pokrajine Anatolije. Mešani cvetlični med je vseboval 0,16 g/100 g, sortni kostanjev 0,17 g/100 g in sortni rododendronov 0,07 g/100 g. Precejšnja pomanjkljivost te raziskave je slaba reprezentativnost, saj je imela vsaka preiskovana vrsta medu le enega predstavnika. Avtorji v svojem članku navajajo tudi vrednost, ki jo določa turški pravilnik o medu. Nenavadno je, da se skupnim beljakovinam določa zgornjo še dopustno mejo, 0,2 g/100 g, kar je v nasprotju s predpostavljanim, da so skupne beljakovine, med katere uvrščamo tudi prevladujočo aminokislino prolina, parameter kakovosti in pristnosti medu.

Za biološki nastanek medu so najpomembnejši encimi, med njimi prevladujejo invertaza, amilaza - diastaza, glukoza oksidaza in katalaza (Anklam, 1998). Deleža encimov ne podajamo v utežnih enotah, temveč v enotah encimske aktivnosti. Čeprav običajno omenjamo le encime za hidrolizo sladkorjev, se v medu nahajajo tudi encimi, ki



razgrajujejo beljakovine na krajše peptidne enote in proste aminokislino. Značilnost vseh encimov pa je omejen čas aktivnosti. Inaktivacija lahko nastopi kot posledica neustreznih pogojev.

Majhne količine beljakovin in prostih aminokislin imajo svoj izvor v nektarju, floemskem soku in proizvajalcih mane, večje pa v cvetnem prahu.

Količine beljakovin in prostih aminokislin v medu so majhne, zato jih pogosto določamo kot skupne dušikove spojine. Primer takšne metode, ki je v živilski praksi najpogosteje uporabljena in smo jo izbrali tudi mi, je Kjeldahlova metoda. Princip je opisan v 2.7.3.3.

## **2.7 Metode dela**

### **2.7.1 Spektrofotometrija**

Spektrofotometrija je še vedno ena najpogosteje uporabljenih instrumentalnih metod v analizi praksi, saj omogoča hkratno kvalitativno in kvantitativno ovrednotenje preiskovane snovi. Odlikuje jo enostavnost merjenja, zanesljivost in široka paleta merjenih snovi (Pihlar, 2001).

Spektroskopske metode so osnovane na interakciji analita z elektromagnetnim valovanjem, t.j. valovanjem električnega in magnetnega polja, ki delujeta pravokotno eno na drugo, v vakuumu potujeta s hitrostjo svetlobe in pri tem skozi prostor nosita energijo - vsako polje polovico (Pihlar, 2001).

Spektroskopijo delimo glede na vrsto delcev, ki jih vzbujamo, na molekulsko oziroma atomsko, ter z oziroma na vrsto interakcije na absorpcijske in emisijske tehnike.

V primeru določanja aminokislino prolina gre za molekulsko absorpcijsko spektrometrijo v vidnem področju monokromatske svetlobe. Ozadje reakcije je sledeče. V normalnih okoliščinah se večina atomov in molekul nahaja v osnovnem stanju, kar pomeni, da elektroni zasedajo mesta nižjih energijskih nivojev. Z dovajanjem svetlobne energije lahko povzročimo, da elektroni zunanjih orbital preidejo v nestabilno vzbujeno stanje. V tem se zadržijo le od  $10^{-9}$  do  $10^{-6}$  sekunde in nato energijo oddajo (emitirajo). Kadar nihanje svetlobe in elektronov preide v območje resonance, nastopi absorpcija. To se zgodi v primeru tistih snovi, ki ustrezne barve, natančneje valovne dolžine svetlobe, ne prepuščajo. Za analitiko je posebej pomembno vidno področje elektromagnetnega spektra (med 400 nm in 800 nm), saj to energijo absorbirajo številne naravne in sintetične organske spojine, ter biološko pomembne snovi. Za določitev analita je zato potrebno vnaprej poznati njegov absorpcijski maksimum in izbrano valovno dolžino svetlobe tudi zagotoviti. Govorimo o monokromatski svetlobi, ki je sestavljena iz ene same valovne dolžine ( $\lambda$ ) oziroma

frekvence ( $\nu = 1/\lambda$ ). Dobimo jo tako, da poleg izvira svetlobe, ki daje zvezni spekter, uporabimo še optično napravo monokromator (optični filter, prizmo ali uklonsko mrežico), ki prepušča le zeleno valovno dolžino (Pihlar, 2001).

Osnovna zakona praktične fotometrije sta Lambertov in Beerov zakon. Prvi pravi, da je intenziteta prepuščenega žarka, ki vstopa pravokotno na absorbirajočo snov, odvisna od dolžine optične poti. Beerov zakon pravi, da intenziteta prepuščenega žarka monokromatske svetlobe pri potovanju skozi raztopino eksponentno pojema z razdaljo. Če oba zakona združimo, dobimo Beer - Lambertovo enačbo (1), ki podaja intenziteto prepuščene svetlobe v odvisnosti od dolžine optične poti in koncentracije raztopine (Pihlar, 2001).

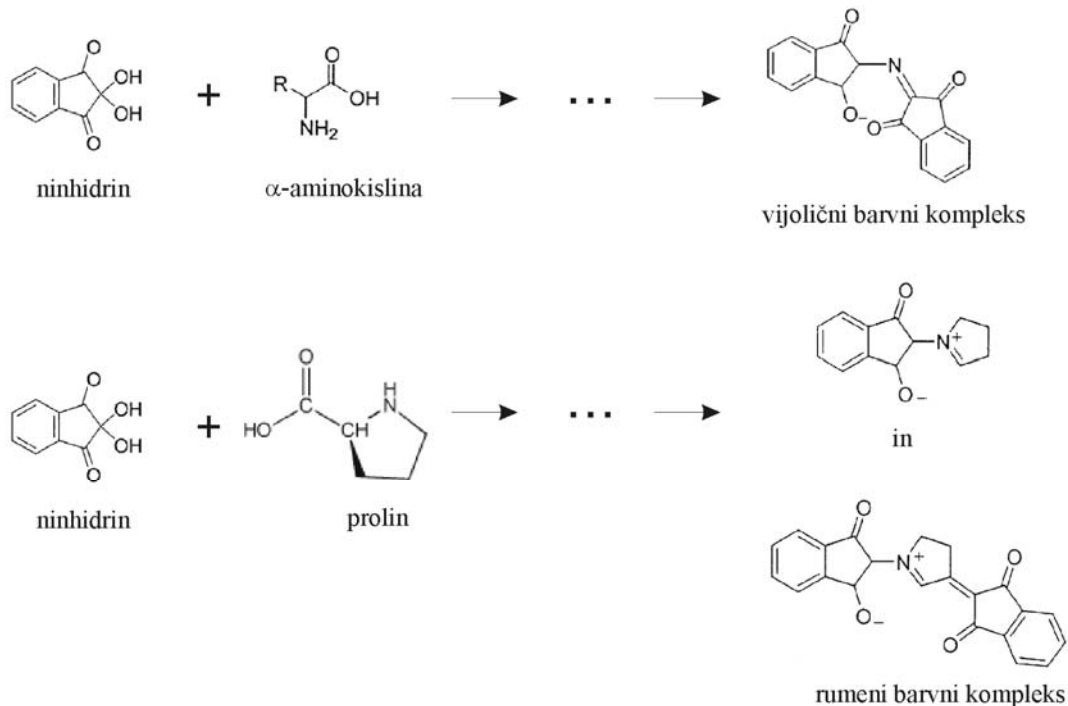
$$\log T = \epsilon lc = \log(I_0/I) = A \quad \dots(1)$$

Parametri v enačbi imajo naslednji pomen:

- $A$  = absorbanca, sinonima sta tudi ekstinkcija in optična gostota, vendar IUPAC priporoča opuščanje slednjih izrazov
- $T$  = transmitanca ali prepustnost
- $I_0$  = intenziteta vpadnega žarka
- $I$  = intenziteta prepuščenega žarka
- $\epsilon$  = molarna absorptivnost

### 2.7.2 Določanje prolina v medu

Uradno predpisana metoda za določanje aminokislina prolina v medu je Oughova fotometrična metoda, prilagojena po Bogdanovu, ki je bila leta 1999 potrjena s strani mednarodne komisije za med. Metoda je osnovana na tvorbi barvnega kompleksa med preiskovano aminokislino prolino in reagentom ninhidrinom, ki je rumene barve, medtem ko ostale  $\alpha$ -aminokislina dajejo modro vijolično obarvan kompleks. AOAC postopek navaja, da je interferenca ostalih aminokislina zanemarljiva, manjša kot 5 %. Po dodatku 2-propanola merimo absorbanco v raztopini vzorca in referenčni (standardni) raztopini pri maksimumu valovne dolžine, 510 nm. Delež prolina določimo računsko, ob upoštevanju razmerij. Kemijsko reakcijo opisuje slika 2.



Slika 2 Produkti ninhidrinske reakcije (Friedman, 2004)

### 2.7.3 Metode za določanje deleža beljakovin v medu

#### 2.7.3.1 Lowrijeva metoda

Lowrijeva metoda za kvantitativno določanje beljakovin je neposredna metoda. Dušikovi peptidi v alkalnem okolju reagirajo z bakrovimi (II) ioni. Bakrovi (II) ioni se reducirajo v bakrove (I) ione, pri tem pa se sproščajo oksidirane aminokisliline, ki povzročijo nadaljnjo redukcijo reagenta Folin-Ciocalteu fosfomolibdenofosfotunksične kisline v heteropolimolibdeno modro.

Absorbanca nastalega oksidacijsko-redukcijskega kompleksa modre barve se določa pri maksimumu valovne dolžine, v območju od 745 do 750 nm. Metoda ima odlično občutljivost in je primerna zlasti za določanje majhnih koncentracij beljakovin. Po besedah Azereda in sodelavcev (2002) je to najpogosteje uporabljena metoda za kvantitativno določanje beljakovin, vendar se sami niso odločili zanjo. Razlogi so številne substance, tudi ogljikovi hidrati, ki ovirajo kemijsko reakcijo, občutljivost na pH, ki mora biti v mejah med 10,0 in 10,5, poleg tega pa še počasnost reakcije, nestabilnost nekaterih reagentov in nelinearna standardna krivulja.

### 2.7.3.2 Bradfordova metoda

Večini zgoraj naštetih težav se je moč izogniti z izbiro Bradfordove metode za določanje skupnih beljakovin. Tudi slednja je neposredna in kolorimetrična. Temelji na proporcionalni vezavi barvila na beljakovine, kar pomeni, da se v primeru več prisotnih beljakovin, veže več barvila in posledično nastaja intenzivnejša barva. Reagent, Comassie Brilliant Blue, nastopa v dveh barvnih odtenkih: v kislem okolju je najbolj obstojen v protonirani rdeči obliki, po vezavi z beljakovino pa preide v neprotonirano modro obliko. Reakcija je specifična in hitra. Proteinsko vezan kompleks, ki je obstojen približno eno uro, ima visok absorpcijski koeficient. Merjenje absorbance poteka pri 595 nm proti standardni raztopini govejega serumskega albumina.

### 2.7.3.3 Kjeldahlova metoda

V praksi najpogosteje uporabljena in uradno predpisana za določanje skupnih beljakovin je Kjeldahlova metoda. Temelji na določanju beljakovin preko dušika, ki ga je v ta namen potrebno sprostiti iz vzorca. To dosežemo z mokrim sežigom ob pomoči kisline, katalizatorja in visoke temperature. Sledi destilacija z vodno paro. Ob dodatku močne baze sprostimo amoniak ( $\text{NH}_3$ ), ga lovimo v prebitek borne kisline in nato nastali amonijev borat titriramo s standardno klorovodikovo kislino. S tem ovrednotimo količino skupnega organskega dušika, pri končnem izračunu pa upoštevamo povprečno 16 % delež dušika v beljakovinah.

Anorganski dušik, ki se nahaja v obliki amoniaka, nitratov in nitritov navadno izpari že med mokrim sežigom in ne moti dejanskega rezultata. Pomanjkljivost Kjeldahlove metode izhaja iz neselektivnosti za organsko vezan dušik, ki je tako beljakovinskega, kot tudi nebeljakovinskega izvora. Med slednje sodijo proste aminokisline, amini, amidi, peptidi, vitamini B-kompleksa, dušik iz arom in drugo.

## 2.8 Določanje botaničnega porekla medu

Glede na predpise, veljavne v Republiki Sloveniji, botanično poreklo oz. vrsto medu določamo s pelodno in senzorično analizo, v pomoč pa so nam tudi podatki o nekaterih fizikalno-kemijskih lastnostih, kot npr. SEP (Pravilnik o medu, 2004).

### 2.8.1 Pelodna analiza

Referenčna metoda za določanje botaničnega porekla medu temelji na mikroskopskem pregledu pelodnih zrn. S tem se ukvarja veda melisopalinologija, ki sicer proučuje determinacijo rastlinskih vrst na osnovi preiskave cvetnega prahu (Gregorc, 2002). Glede na vrsto in količino pelodnih zrn izvemo, kje so se čebele pasle in s tem poleg botaničnega še geografsko poreklo (Plestenjak, 1999).

Žal je analiza povezana s številnimi slabostmi, ki se v prvi vrsti nanašajo na njeno izvajanje, deloma pa tudi na verodostojnost. Te slabosti so:

- zaradi dolgotrajnega postopka priprave preparata je analiza izredno zamudna (priprava raztopine medu, centrifugiranje, nanos na objektno stekelce),
- prepoznavanje in štetje pelodnih zrn pod mikroskopom zahteva izurjenega analitika,
- količina peloda ene rastlinske vrste se tekom leta spreminja,
- donos peloda v ženskih in moških cvetovih se v nekaterih primerih zelo razlikuje,
- čebele lahko nabirajo pelod neodvisno od medicīne,
- čebele nabirajo pelod tudi na rastlinah, ki nimajo medicīne npr. leska in koruza,
- nekatere vrste, npr. citrusi in akacija, vsebujejo izredno malo peloda,
- med tehnološkim postopkom filtracije je pelod odstranjen in
- nenazadnje, pelod je možno dodati neposredno v med (Anklam, 1998; Terrab in sod., 2002).

#### 2.8.2 Senzorično ocenjevanje medu

Senzorična analiza je že več kot 30 let priznana znanstvena disciplina, enakovredna ostalim (analitskim) metodam, s katero izšolani preskuševalci z enim ali več čuti analizirajo in ovrednotijo preiskovano živilo. Senzorična analiza medu obsega ocenjevanje naslednjih lastnosti: čistost, barva, bistrost, vonj, okus, obstojnost arome in sortno značilnost. Posamezna lastnost vzorca se ovrednoti glede na pričakovano - torej tisto, ki je vrstno značilna. Zaključna ocena predstavlja povprečno oceno senzorične komisije, ki šteje 3 - 6 članov.

Omejitve, s katerimi se srečujemo pri izvajanju senzorične analize so naslednje:

- pomanjkanje izšolanih preskuševalcev in strokovnjakov z ustrezno izobrazbo ter izkušnjami,
- težave pri zagotavljanju mirnega prostora z določeno stalno temperaturo, relativno vlažnostjo, brez prisotnih tujih vonjev, ki je primerno velik, z neodvisno razporeditvijo in enakomerno osvetljenostjo ocenjevalnih mest, kar omogoča ponovljivost analiz in primerljivost rezultatov
- organizacijsko zahtevna in dolgotrajna izvedba (Pravilnik o ocenjevanju medu, 2002).

Iz navedenega sledi, da je senzorična analiza primernejša za ocenjevanja na tekmovanjih oz. srečanjih in manj kot vsakodnevna rutinska metoda za določanje vrste medu, če laboratorij ne more zagotoviti stalnega zadostnega števila preskuševalcev.

### 2.8.3 Specifična elektrolitska prevodnost (SEP)

Pravilnik o medu (2004) vključuje tudi merjenje elektrolitske prevodnosti, ki je hitro, zanesljivo in poceni. Pravilnik predpisuje eno samo vrednost SEP in sicer 0,8 mS/cm, na osnovi katere medove različnih vrst deli v dve skupini: skupina nektarnih medov in skupina maninih, vključno s kostanjevim. S tem omogoča le delno preverjanje vrste medu, kakovosti in pristnosti.

Botanično poreklo medu postaja vse bolj pomembno. Omejeni viri in posledično relativno visoka cena tega povsem naravnega sladila so razlog, da je med vse pogostejša tarča potvorb in napačnega označevanja. Poznavanje vrste medu, zagotovilo o pristnosti, kakovosti in seveda brezpogojni zdravstveni ustreznosti so želja, zahteva in pravica ozaveščenega potrošnika na pragu 21. stoletja.

Ker so vse znane metode povezane s slabostmi oz. omejitvami, navedenimi v 2.8.1, 2.8.2 in 2.8.3, raziskovalci po vsem svetu iščejo nove parametre in metode za hitrejše, bolj preprosto in zanesljivejše določanje botaničnega porekla medu ter kontrolo pristnosti. Strokovni članki na to temo so številni. Vrsto medu mnogi povezujejo s flavonoidnimi in fenolnimi komponentami, oligosaharidi, proteini in aminokislinami. Med omenjenimi je že več kot štiri desetletja izjemne pozornosti deležna aminokislina prolin.

### 3 MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 Vzorec

Raziskava je bila opravljena na skupno 101 vzorcih medu slovenskega porekla, sedmih različnih vrst: akacijevega (15 vzorcev), cvetličnega (15 vzorcev), gozdnega (14 vzorcev), hojevega (15 vzorcev), kostanjevega (12 vzorcev), lipovega (15 vzorcev) ter smrekovega (15 vzorcev). Vzorci so bili letnik 2004 in so izvirali iz vseh štirih fitogeografskih območij Slovenije: alpskega, submediteranskega, dinarskega in subpanonskega. Pridobljeni so bili neposredno od čebelarjev in nato hranjeni v ustrezni PVC embalaži, pri sobni temperaturi, zaščiteni pred svetlobo. V času eksperimentalnega določanja so bili stari od 4 do 6 mesecev. Vrsta medu je bila predhodno določena s strani čebelarjev in potrjena s senzorično preiskavo, opravljeno na Katedri za vrednotenje živil. Pelodna analiza ni bila vključena. Ker na območju Slovenije čebelarimo skoraj izključno s kranjsko čebelo (*Apis Mellifera carnica*) lahko predpostavimo, da je morebitni vpliv pasme, predvsem glede doprinosa prolina, enak pri vseh vrstah medu.

#### 3.2 Fizikalno kemijske metode

V dveh vzporednih določitvah so bile na izbranih vzorcih opravljene naslednje analize:

- določitev aminokislina prolina z Oughovo metodo prilagojeno po Bogdanovu ter
- določitev skupnih beljakovin z metodo po Kjeldahlu.

##### 3.2.1 Določanje vsebnosti prolina

Vsebnost prolina v medu smo določali z Oughovo fotometrično metodo (1969), prilagojeno po Bogdanovu, ki je bila leta 1999 sprejeta s strani mednarodne komisije za med. AOAC postopek navaja, da je interferenca ostalih aminokislina zanemarljiva, manjša kot 5 %.

##### Princip:

Prolin in ninhidrin tvorita rumen barvni kompleks. Po dodatku 2-propanola, merimo absorbanco v raztopini vzorca in referenčni (standardni) raztopini pri maksimumu valovne dolžine, 510 nm. Delež prolina določimo računsko ob upoštevanju razmerij.

##### Reagenti:

- 3 % raztopina ninhidrina: 3,0 g ninhidrina raztopimo v 100 ml etilenglikolmonometil etra. Raztopino hranimo v temi (obstočnost 1 teden).
- L (-) prolina: vakuumsko osušen prolina hranimo do uporabe v eksikatorju.
- a) Standardna raztopina prolina (0,8 mg/ml): 40 mg vakuumsko osušenega prolina, do uporabe hranjenega v eksikatorju razredčimo z destilirano vodo do volumna 50 ml. Pripravljamo ga tedensko in do uporabe hranimo v hladilniku.

- b) Delovna raztopina prolina (0,032 mg/ml): 1 ml standardne raztopine prolina z destilirano vodo razredčimo do volumna 25 ml. Vsak dan pripravljamo svežo delovno raztopino.
- Izopropanol (2-propanol): izopropanol razredčimo z enakim volumnom destilirane vode (1:1).
  - Mravljična kislina (HCOOH): 98 - 100 % mravljična kislina.

#### Aparatura:

Meritve smo opravili na spektrofotometru Cecil CE 2021 pri valovni dolžini 510 nm.

#### Izvedba analize:

- Priprava raztopine vzorca medu: 2,5 g medu odtehtamo v čašo, dodamo ca 10 ml destilirane vode ter vzorec kvantitativno prenesemo v 50 ml bučko. Bučko dopolnimo do oznake z destilirano vodo in vsebino dobro pretresemo.
- Določanje. V dve epruveti odpipetiramo 0,5 ml raztopine vzorca medu, v drugi dve epruveti 0,5 ml dest. vode (slepi vzorec) in v tri epruvete 0,5 ml standardne raztopine prolina. V vsako epruveto dodamo še 1 ml mravljične kisline, 1 ml raztopine ninhidrina, dobro zapremo in 15 minut mešamo na stresalniku. Temu sledi 15 minutno termostatiranje v vreli vodni kopeli in nato 10 minut pri temperaturi 70 °C. Po dodatku 5 ml raztopine izopropanola, epruvete ponovno zapremo in pustimo na sobni temperaturi. Po 45 minutah merimo absorbanco pri valovni dolžini 510 nm, v kivetah premera 1 cm.

#### Izračun:

Rezultat je podan kot masni delež in sicer v miligramih prolina na kilogram medu, kar izračunamo po enačbi (2).

$$\text{prolin (mg / kg)} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \times \frac{E_1}{E_2} \times R \quad \dots(2)$$

Pri tem imajo oznake naslednji pomen:

- $A_{vz}$  = izmerjena absorbanca raztopine vzorca,
- $A_{st}$  = izmerjena absorbanca standardne raztopine prolina,
- $E_1$  = miligrami prolina za pripravo standardne raztopine prolina (40 mg v 50 ml)
- $E_2$  = gram medu za pripravo raztopine vzorca (2,5 g v 50 ml)
- $R$  = faktor razredčevanja:
- $R_{vzorca} = 100$  (2,5 g medu v 50 ml H<sub>2</sub>O → od tega v analizo 0,5 ml raztopine vzorca)
- $R_{standarda} = R_1 \times R_2 = 2500$
- $R_1 = 50$  (40 mg standarda v 50 ml H<sub>2</sub>O → odvzamemo 1 ml )



- $R_2 = 50$  (odvzeti 1 ml v 50 ml  $H_2O \rightarrow$  v analizo 0,5 ml standardne raztopine)
- $R' = 1000$  (1 kg = 1000 g)

$$R = \frac{R_{vzorca}}{R_{standarda}} \times R' = \frac{100}{2500} \times 1000 = 40 \quad \dots(3)$$

Končna enačba (4) z upoštevanjem razredčitev:

$$\text{prolin (mg / kg)} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \times \frac{40}{2,5} \times 40 = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \times 640 \quad \dots(4)$$

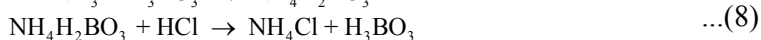
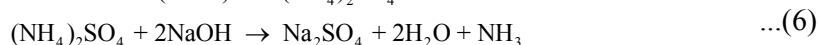
### 3.2.2 Določanje skupnih beljakovin

Skupne beljakovine v medu smo določali s Kjeldahlovo metodo (Golob in Plestenjak, 2000).

#### Princip:

Metoda temelji na posrednem določanju beljakovin preko dušika, ob upoštevanju, da je ves, v živilu prisoten, dušik beljakovinski. Za preračunavanje dušika v beljakovine uporabljamo ustrezne empirične faktorje. Vzorec pred analizo razklopimo z mokrim sežigom ob pomoči kisline, katalizatorja in visoke temperature. Z destilacijo z vodno paro ob dodatku močne baze sprostimo amoniak ( $NH_3$ ), ki ga lovimo v prebitek borne kisline in nato nastali amonijev borat titriramo s standardno klorovodikovo kislino.

Pri tem potekajo naslednje kemijske reakcije:



Če enačbi (7) in (8) združimo dobimo:



Iz enačbe (9) sledi:

- 1 mol HCl = 1 mol N = 14 g N
- 1 ml 0,1 M HCl = 0,0014 N

#### Reagenti:

- koncentrirana  $H_2SO_4$
- katalizator Kjeltabs Cu / 3,5 (305 g  $K_2SO_4$  + 0,4 g  $CuSO_4 \times 5 H_2O$ )
- nasičena raztopina  $H_3BO_4$  (ca 3 %)
- 30 % raztopina NaOH
- 0,1 M HCl

#### Aparatura in pribor:

- blok za razklop oz. mokri sežig vzorca (Digestion Unit K-426, Büchi)
- enota za odvod zdravju škodljivih hlapov (Scrubber, Büchi)
- destilacijska enota (Distillation Unit B-324, Büchi)
- titracijska enota (Titrino 702 SM, Metrohm)
- sežigne epruvete

#### Izvedba analize:

Delo razdelimo na štiri faze:

- priprava vzorca,
- mokri sežig pripravljenega homogeniziranega vzorca,
- destilacija,
- titracija.

##### a) Priprava vzorca

V čašo odtehtamo 3 g vzorca medu, ga raztopimo v ca 10 ml vode in kvantitativno prenesemo v sežigno epruveto. Sežigne epruvete postavimo v stojalo ter nepokrite prenesemo v blok za razklop vzorca in pri nizki temperaturi peči odparimo večji del v začetku dodane vode. V nasprotnem primeru bi presežek vode lahko povzročal nekontrolirano penjenje med mokrim sežigom. V blok za razklop lahko postavimo največ 6 sežignih epruvet. Ker vsak vzorec analiziramo v dveh vzporednih določitvah, lahko mokri sežig opravimo na 3 vzorcih medu hkrati.

##### b) Razklop

Po odparevanju v vsako sežigno epruveto dodamo 1,5 tablete bakrovega katalizatorja in 20 ml koncentrirane  $H_2SO_4$ . Epruvete pokrijemo s steklenimi zvonci in postavimo v ogreto enoto za razklop (Digestion Unit), kjer je temperatura 370 °C. Z vodno črpalko odvajamo zdravju škodljive hlape prek enote imenovane Scrubber, kjer se del hlapov utekočini, preostanek pa nevtralizira v ca 15 % raztopini NaOH in končno vodi preko aktivnega oglja. Sežig je opravljen v približno 1 uri oziroma takrat, ko se vsebina v epruveti preneha peniti in postane bistro zelena.

c) Destilacija

Vzorci se ohladijo v epruveti na sobno temperaturo. Epruveto vstavimo v destilacijsko enoto (Distillation Unit), kjer poteka doziranje 50 ml destilirane vode in 70 ml baze (NaOH) v vzorec. V destilacijsko predložko se dozira 60 ml borne kisline ( $H_3BO_4$ ). Nato se začne dovajati para v vzorcev. Destilacija traja 4 minute.

d) Titracija

Raztopino nastalega amonborata v predložki titriramo z 0,1 M HCl do vrednosti pH 4,65. Titracija poteka avtomatsko po vnosu odtehte vzorca (podano v mg) v titracijsko enoto (Titrino). V končni točki titracije se zabeleži poraba kisline, iz katere se izračuna % dušika v vzorcu ter % beljakovin v vzorcu. V primeru medu se uporabi splošni empirični faktor za preračun dušika v beljakovine, ki je enak 6,25.

Rezultati izhajajo iz enačb (10) in (11):

$$\% \text{ beljakovin} = \frac{V_{0,1 M HCl \times 1,4} \text{ (ml)}}{m_{\text{odtehta}} \text{ (mg)}} \times 100 \times 6,25 \quad \dots(10)$$

$$\% \text{ beljakovin} = \% N \times F \quad \dots(11)$$

Pri tem velja:

- $V_{HCl}$  (ml) = poraba 0,1 M HCl
- 1,4 = ekvivalent (1 ml 0,1 M HCl 1,4 mg N)
- 6,25 = F = splošni empirični faktor za preračun N v beljakovine

### 3.3 Statistična analiza

Statistika je znanstvena veda, ki z njej lastnimi metodami zbira, obdeluje in analizira statistične podatke. Na ta način proučuje masovne pojave v skupini statističnih enot, odkriva njihove zakonitosti, ter jih poizkuša prenesti na širšo množico - statistično populacijo.

Med eksperimentalnim delom pridobljene numerične vrednosti o vsebnosti prolina in skupnih beljakovin strokovno imenujemo statistične enote. Večje število teh enot, ki predstavljajo posamezno vrsto medu, oblikuje statistični vzorec. Ker smo meritve vselej opravljali v dveh vzporednih določitvah, vzorcev medu pa je bilo 101, je statistična obdelava obsegala 202 statističnih enot za prolina in prav toliko za skupne beljakovine. Za proučevanje sedmih različnih vrst medu, smo oblikovali sedem statističnih vzorcev za prolina in sedem statističnih vzorcev, ki so predstavljali skupne beljakovine.

Pri statistični analizi so bile uporabljene naslednje metode:

- a) Ovrednotenje statističnih vzorcev za prolina in skupne beljakovine z opisnimi statističnimi parametri:
  - aritmetično sredino ( $\bar{x}$ ),
  - standardnim odklonom ( $SD$ ) ter
  - koeficientom variabilnosti ( $KV$ ).
- b) Analiza statističnih vzorcev za posamezno statistično spremenljivko prolina in skupne beljakovine z:
  - Levenovim testom homogenosti varianc,
  - analizo varianc (ANOVA),
  - Duncanovim testom.
- c) Analiza povezanosti dveh spremenljivk s:
  - Pearsonovim korelacijskim koeficientom ( $R$ ) in
  - regresijskim koeficientom determinacije ( $R^2$ ).

### 3.3.1 Osnovni statistični parametri

#### 3.3.1.1 Aritmetična sredina ali povprečje

Aritmetična sredina vzorca ( $\bar{x}$ ) je najpogosteje izbrano merilo srednje vrednosti. Predstavlja nekakšno težišče podatkov, saj je vsota odklonov posameznih vrednosti spremenljivke od povprečja navzgor enaka vsoti odklonov navzdol. Vsota vseh odklonov od aritmetične sredine je tako vedno enaka nič. Hkrati je tudi vsota kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine manjša kot vsota kvadratov teh odklonov od katerega koli drugega števila. Aritmetično sredino vzorca izračunamo iz (12) tako, da seštejemo vrednosti spremenljivke vseh statističnih enot in vsoto delimo s številom enot (Adamič, 1989):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots(12)$$

#### 3.3.1.2 Varianca in standardni odklon

Varianca vzorca ( $s^2$ ) je merilo variiranja oziroma razpršenosti podatkov okoli aritmetične sredine. Izračunamo jo iz (13) kot povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Kadar je število statističnih enot vzorca manjše od 30, je imenovalec v enačbi zmanjšan za ena (Adamič, 1989).

Varianca je za statistično analizo podatkov zelo pomembna, kot opisni parameter pa manj, saj kvadrat merske enote spremenljivke pogosto nima pravega smisla. V ta namen se pogosto uporablja kvadratni koren variance (14), ki ga imenujemo tudi standardna deviacija ali standardni odklon in ga izračunamo po naslednji enačbi (Adamič, 1989).

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2 \quad \dots(13)$$

$$SD = \sqrt{s^2} = s \quad \dots(14)$$

### 3.3.1.3 Koeficient variabilnosti

Absolutne mere variacij, kot sta npr. varianca in standardni odklon, za primerjavo variiranja več statističnih spremenljivk z različnimi povprečnimi vrednostmi, običajno niso primerne. Objektivno primerjavo takšnih statističnih spremenljivk nam omogoča koeficient variabilnosti (15), ki ga izračunamo tako, da standardno deviacijo delimo z aritmetično sredino opazovanega vzorca in dobljeno vrednost izrazimo v odstotkih (Adamič, 1989).

$$KV[\%] = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \dots(15)$$

### 3.3.1.4 Mediana in kvantili

Mediana ali centralna vrednost je tista vrednost spremenljivke, od katere ima polovica enot manjše, polovica pa večje vrednosti spremenljivke. Pri statističnem sklepanju je v splošnem mediana manjšega pomena kot aritmetična sredina, saj ni povezana z nobeno teoretično porazdelitvijo. Prav slednje pa se izkaže kot prednost v primeru asimetrične porazdelitve statistične mase (Adamič, 1998).

Mediano lahko izračunamo, preprosteje pa jo določimo, kadar so podatki rangirani, t.j. urejeni po velikosti od najmanjše do največje vrednosti. Če je število enot liho, je mediana enaka srednji vrednosti enote v ranžirni vrsti, če pa je število enot sodo, je mediana povprečje srednjega para podatkov (Adamič, 1998).

Kvantilni razmiki, v katerih se nahaja določen odstotek vseh analiziranih podatkov, so neparometrično merilo razpršenosti podatkov okoli mediane. Mejne vrednosti, ki ločujejo posamezne kvantilne razmike imenujemo kvantili. Poznamo jih več vrst, med najpogosteje uporabljenimi pa so. centile, decile in kvantili. Slednjih so trije in razdelijo niz podatkov na štiri enake dele (Adamič, 1998).

Nazoren in v praksi pogosto uporabljen je grafični prikaz porazdelitve številskih podatkov z uporabo okvirjev z ročaji (angl. box plot), ki temeljijo prav na kvartilih in mediani kot srednji vrednosti. Spodnji ročaj določata najmanjša vrednost na eni strani ( $x_{min}$ ) ter prvi kvartil na drugi, zgornji ročaj pa določata tretji kvartil in največja vrednost ( $x_{max}$ ). Prvi in tretji kvartil sta hkrati stranici okvirja, znotraj katerega se nahaja polovica vseh podatkov, prečka okvirja pa je enaka vrednosti drugega kvartila oziroma mediane (Košmelj, 2001).

### 3.4 Večvzorčna analiza ene spremenljivke

Metode statistične analize temeljijo na postavljanju, preverjanju, sprejemanju ali zavračanju domnev. Vselej natančno definiramo osnovno domnevo ( $H$ ), ki v splošnem pravi, da se preiskovane vrednosti med seboj statistično značilno razlikujejo. Tej poiščemo nasprotno, ničelno domnevo ( $H_0$ ), ki trdi, da razlik ni ali pa so zgolj naključne. Ker si osnovna in ničelna domneva nasprotujeta, ima zavrnitev ničelne domneve za posledico sprejetje osnovne domneve. Pred preverjanjem domnev je potrebno določiti kritično oz. zgornjo mejo tveganja ( $\alpha$ ), pri kateri sprejmemo ali zavrnemo ničelno hipotezo. V biostatistiki so najpogosteje izbrane vrednosti 0,05, 0,01 ali 0,001, glede na to govorimo tudi o 5 %, 1 % ali 0,1 % stopnji značilnosti rezultatov oziroma stopnji tveganja. Nato za podatke, ki jih želimo analizirati, izberemo ustrezen statistični test. Če je izračunana vrednost izraza manjša od kritične vrednosti, ki jo pri izbrani stopnji tveganja in številu prostostnih stopinj odčitamo iz ustrezne statistične preglednice, zavrnemo ničelno domnevo in sprejmemo osnovno. V nasprotnem primeru, ničelne domneve ne moremo zavrniti in osnovna ostane nepotrjena (Adamič, 1989).

Večvzorčne analize vsebnosti skupnih beljakovin in prolina v sedmih vrstah medu smo opravili s pomočjo računalniškega statističnega programa (SPSS, 2001), pri 0,05 stopnji tveganja. Rezultati obdelav eksperimentalnih podatkov so podani v obliki vrednosti statistične značilnosti - signifikance (*Sig*) in predstavljajo izračunano vrednost izraza, ki ji je bila pripisana verjetnost, odčitana iz ustrezne statistične preglednice vzorčnih podatkov pri 0,05 stopnji tveganja. Kadar je vrednost signifikance manjša od 0,05, sprejmemo osnovno hipotezo, saj je tveganje, s katerim zavrnemo ničelno hipotezo, dovolj majhno. Signifikanca večja od 0,05 pomeni, da je tveganje zavrnitve ničelne domneve preveliko.

#### 3.4.1 Levenov test homogenosti varianc

Pri Levenovem testu iz vsakega vzorca zgradimo nov vzorec, v katerem so združene absolutne vrednosti odmikov od povprečne vrednosti opazovanega vzorca. Na tako dobljenih novih vzorcih, ki opisujejo disperzije statističnih enot znotraj posameznih vzorcev, izvedemo analizo variance, s katero preverimo homogenost varianc neodvisnih vzorcev. Osnovna domneva (16) pri Levenovem testu pravi, da med vsaj enim parom varianc obstaja statistično značilna razlika, ničelna pa (17), da razlik med variancami ni:

$$H_0 : s_1 = s_2 = \dots = s_n \quad \dots(16)$$

$$H : s_1 \neq s_2 \quad \dots(17)$$

Vrednost signifikance, ki nam jo vrne test, pove, katera izmed domnev je prava. Vrednost signifikance, ki je manjša od stopnje tveganja 0,05 vodi k sprejetju osnovne domneve, vrednost večja od 0,05 pa k potrditvi ničelne. Ničelna domneva je tista, ki si jo v danem

primeru želimo, saj pomeni, da smemo vzorce medsebojno primerjati z dejansko analizo variance, ki sledi.

Prednost Levenovega testa je manjša občutljivost za morebitna odstopanja podatkov od normalne porazdelitve, zato je primeren tudi takrat, ko za obravnavano spremenljivko ne moremo privzeti normalne porazdelitve.

### 3.4.2 Analiza variance (ANOVA)

Pri uporabi analize variance domnevamo, da so porazdelitve posameznih vzorcev ene statistične spremenljivke normalne in da se variance statističnih vzorcev med seboj statistično ne razlikujejo. Enakost varianc med vzorci imenujemo tudi homogenost varianc in smo jo predhodno preverili z Levenovim testom.

Analiza variance proučuje variabilnost vseh statističnih vzorcev hkrati. Z merjenjem vsote kvadratov odklonov opazovanih vrednosti od aritmetične sredine določa skupno variabilnost, ki jo nato razčleni na dele, opredeljene z različnimi viri variiranja. Celotno varianco enot iz vseh vzorcev tako razstavi na varianco enot v posameznem vzorcu in na varianco med temi vzorci (Košmelj in sod., 2002).

$$H_0 : x_1 = x_2 = \dots = x_n \quad \dots(18)$$

$$H : x_1 \neq x_2 \quad \dots(19)$$

Ničelna domneva (18) pravi, da vsi statistični vzorci izhajajo iz populacije z enakim povprečjem, osnovna (19) pa, da med opazovanimi statističnimi vzorci obstajata vsaj dva, katerih povprečji sta statistično različni. Kadar je vrednost signifikance dovolj majhna, manjša od 0,05, sklepamo, da vzorci pripadajo različnim populacijam oziroma, da med statističnimi vzorci obstaja vsaj en par, ki ima različni povprečji. S tem je zavrnjena ničelna hipoteza, ki pravi, da razlike ne obstajajo in posledično je sprejeta osnovna. V primeru določanja prolina in skupnih beljakovin v medu to pomeni, da statistični vzorci predstavljajo različne vrste medu. Kadar med seboj primerjamo le dva statistična vzorca, analizo variance nadomestimo s testom t, ki daje enak rezultat (Adamič, 1989).

### 3.4.3 Duncanov test

Duncanov test je zaključni test, namenjen analizi večjega števila vzorcev, za katere je znano, da so homogeni - Levenov test, a ne pripadajo isti populaciji - ANOVA. Razlikovanje vzorcev je osnovano na večkratnem preizkušanju variacijskih razmikov. Stopnja značilnosti - signifikance temelji na številu neodvisnih primerjav med aritmetičnimi sredinami. S pomočjo tega testa razdelimo posamezne vzorce v več podskupin, v katerih se vzorci glede na opazovano statistično spremenljivko ne razlikujejo.

### 3.5 Analiza povezanosti dveh spremenljivk

Medsebojno zvezo dveh spremenljivk ( $x$  in  $y$ ) preučujemo z metodo korelacije in regresije. Na ta način lahko preučujemo odnos med spremenljivkama, ali obstaja povezanost in kakšne vrste je, ali pa poizkušamo na osnovi ene spremenljivke napovedati vrednost druge. O regresiji govorimo, kadar imamo neodvisno spremenljivko ( $x$ ), katere vrednost izberemo sami in je v naprej določena, ter drugo spremenljivko, ki je od prve odvisna in jo opisuje matematična funkcija  $y = f(x)$ . Regresijsko analizo je moč predstaviti v grafični obliki. Najpreprostejša in hkrati najbolj zaželeno je linearna funkcija, kar pomeni, da je zveza dveh spremenljivk podana z enačbo premice. Uporabiti jo je moč tudi v primeru posplošene regresije. Enačba regresijske premice predstavlja nekoliko spremenjeno enačbo premice (20). Kako dobro se posamezne vrednosti parametrov skladajo z enačbo premice nam pove koeficient determinacije ( $R^2$ ) (Adamič, 1989).

$$y = a + bx = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \quad \dots(20)$$

Korelacija je prav tako metoda za statistično analizo dveh spremenljivk, vendar obe spremenljivki obravnava kot neodvisnih. To pomeni, da vrednosti spremenljivk ne moremo izbrati vnaprej, sta naključni, odvisni od napak pri merjenju, na obe delujejo biološki in drugi dejavniki variabilnosti. Korelacija je lahko pozitivna ali negativna, velika ali majhna, ali pa sploh ne obstaja. Korelacijo opisujejo različni koeficienti korelacije, med katerimi je tudi Pearsonov ( $R$ ) (Adamič, 1989). Ostre meje med uporabnostjo regresije in korelacije so pri praktičnem delu zabrisane in tako iste statistične podatke pogosto analiziramo s pomočjo obeh metod (Adamič, 1989).

Vsebnost aminokislinske prolina in vsebnost skupnih beljakovin sta količini, ki smo ju določali neodvisno eno od druge in na nobeno izmed njiju nismo mogli vnaprej vplivati. Hkrati vemo, da delež aminokislinske prolina neposredno vpliva na količino skupnih beljakovin. Na osnovi slednjega dejstva smo določili prolina za neodvisno spremenljivko ( $x$ ), skupne beljakovine pa od prolina odvisno spremenljivko ( $y$ ).

Analizo dveh spremenljivk, prolina in skupnih beljakovin, naredimo v naslednjem zaporedju:

- Podatke vnesemo v korelacijski diagram, v katerem na abscisi predstavimo neodvisno spremenljivko prolina ( $x$ ), na ordinati pa odvisno spremenljivko skupne beljakovine ( $y$ ).
- Nadaljujemo z metodo regresije, katere namen je določiti enačbo krivulje, ki se najbolje prilega podatkom dveh spremenljivk, prikazanih na korelacijskem diagramu. Pri tem si pomagamo z računalniškim programom Microsoft Office Excel 2003, ki na osnovi najmanjše vsote kvadratov odklonov posameznih točk izračuna regresijsko enačbo premice ter koeficient determinacije ( $R^2$ ).



- Moč povezave preverimo tudi s Pearsonovim koeficientom ( $R$ ), ki ga poda korelacijska analiza računalniškega programa SPSS.

### 3.5.1 Koeficient korelacije po Pearsonu

Pearsonov koeficient korelacije ( $R$ ) je merilo linearne povezanosti dveh številskih spremenljivk, ki sta naključni, med seboj povezani, vendar ne nujno odvisni ena od druge. Enak je (21) razmerju med kovarianco ( $c_{xy}$ ) in zmnožkom standardnih odklonov obeh spremenljivk  $x$  in  $y$  ( $s_x$  in  $s_y$ ).

$$R = \frac{c_{xy}}{s_x \times s_y} \quad \dots(21)$$

Kovarianca ( $c_{xy}$ ) je povprečni produkt odklonov dveh naključnih spremenljivk od njihovih povprečij in pravzaprav predstavlja varianco podatkov zaradi korelacije. Računamo jo po (22), ki je podobna enačbi za varianco.

$$c_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n [(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})] \quad \dots(22)$$

Koeficient korelacije po Pearsonu lahko zasede vse vrednosti med -1 in +1. Pozitivne vrednosti koeficienta pomenijo, da vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, negativne pa, da vrednost ene spremenljivke raste, med tem ko vrednost druge pada. Vrednost -1 predstavlja maksimalno negativno korelacijo, vrednost +1 maksimalno pozitivno in vrednost 0 nam pove, da med spremenljivkama ni povezanosti. Izračunani koeficient se praviloma le približuje eni izmed omenjenih skrajnih vrednosti (Adamič, 1998). Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti so navedene v preglednici 6.

Preglednica 6. Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti (Seljak, 1996)

Če je korelacijski koeficient	potem
od 0,00 do $\pm 0,20$	povezanosti ni,
nad $\pm 0,20$ do $\pm 0,40$	povezanost je šibka,
nad $\pm 0,40$ do $\pm 0,70$	povezanost je zmerna,
nad $\pm 0,70$ do do $\pm 1,00$	povezanost je močna.

Na osnovi velikosti korelacijskega koeficienta lahko sklepamo le o tem, kako močna je povezava med statističnimi enotami, nič pa nam ne pove, ali je povezava značilna.

Značilnost korelacije ocenjujemo s t-testom. Test je osnovan na postavitvi dveh hipotez:

- osnovne hipoteze ( $H$ ), ki pravi, da med spremenljivkama obstaja značilna povezava in
- ničelne hipoteze ( $H_0$ ), ki pravi, da med obema spremenljivkama ni značilne povezanosti oz. da je korelacija med spremenljivkama enaka nič.

Ničelno hipotezo preverimo tako, da po (23) izračunamo vrednost  $t$ , ki jo nato primerjamo s kritično vrednostjo  $t$  odčitano iz statistične preglednice pri  $m$  stopnjah prostosti.

$$t = \sqrt{\frac{R^2(n-2)}{1-R^2}} \quad \dots(23)$$

Pri tem je  $m = n - 2$ , kjer je  $m$  je število stopenj prostosti,  $n$  pa število spremenljivk. V primeru, ko je izračunana vrednost večja od kritične, ničelno hipotezo zavrnilo in sprejmemo osnovno, ki pravi, da je povezanost med spremenljivkama značilna (Adamič, 1989).

### 3.5.2 Koeficient determinacije

Koeficient determinacije ( $R^2$ ) je merilo povezanosti in izraža delež variance odvisne številske spremenljivke  $Y$ , ki je pojasnjen z eno ali več neodvisnimi številkimi spremenljivkami in se izračuna po obrazcu (24):

$$R^2 = \frac{S_{Y.X_1, X_2, \dots, X_p}^2}{S_Y^2} \quad \dots(24)$$

Števec predstavlja varianco odvisne številske spremenljivke, ki je pojasnjena z več neodvisnimi številkimi spremenljivkami  $X_1, X_2, \dots, X_p$ , imenovalec pa varianco, ki je podana samo za odvisno številkico spremenljivko  $Y$ . V primeru enostavnega linearnega regresijskega modela je koeficient determinacije enak kvadratu Pearsonovega korelacijskega koeficienta (Košmelj in sod., 2002).

## 4 REZULTATI

Praktični del naloge je obsegal kvantitativno ovrednotenje aminokislinske prolina in skupnih beljakovin v 101 izbranih vzorih, za katere menimo, da so značilni predstavniki sedmih najpogostejše zastopanih vrst medu v Sloveniji: akacijevega, cvetličnega, gozdnega, hojevega, kostanjevega, lipovega in smrekovega medu. Analize smo opravili v dveh vzporednih določitvah. Vrednosti posameznih meritev so podane v prilogi A (A1 - A7). Opisali smo jih z osnovnimi statističnimi parametri, jih z različnimi metodami statistično obdelali, ter iskali morebitne povezave med njimi. Rezultate smo primerjali tudi z razpoložljivimi podatki domače in tuje literature.

### 4.1 Rezultati določanja vsebnosti prolina v medu

#### 4.1.1 Ponovljivost metode za določanje prolina v medu

Izbrana Oughova metoda za določanje prolina je že uveljavljena in posebej prilagojena za med, spektrofotometer ter ostali laboratorijski instrumenti pa so verificirani. Zaradi določenih slabosti metode, kot so izredna časovna in temperaturna odvisnost sicer specifične ninhidrinske reakcije, dolgotrajnost postopka in obsežnost ročnega dela, zahteva le-ta izurjenega analitika. Da bi ovrednotili ponovljivost metode oziroma zagotovili nadzorovane pogoje med izvajanjem posameznih določitev, smo opravili naslednji poskus.

Testni vzorec medu 115, smo analizirali 6 dni, v 6 vzporednih analizah, v katerih smo ovrednotili po 2 paralelni določitvi. Rezultati meritev so podani v prilogi A8, srednje vrednosti paralelnih določitev pa so zbrane v preglednici 7. Z uporabo (12) smo izračunali povprečne vrednosti 6 vzporednih določitev znotraj posameznega dneva ( $n = 6$ ) in povprečje vseh 36 določitev ( $n = 36$ ), ter z (14) in (15) ovrednotili pripadajoče standardne odklone in koeficiente variabilnosti.

Preglednica 7. Vsebnost prolina in pripadajoče povprečne vrednosti, standardni odkloni in koeficienti variabilnosti v testnem vzorcu 115

	vsebnost prolina											
	x paralelne določitve						n = 6			n = 36		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	SD	KV	$\bar{x}$	SD	KV
	(mg/kg)						(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)		
1.dan	328	331	329	326	330	336	330	3,4	1,0	335	5,7	1,7
2.dan	334	334	335	336	328	332	333	2,9	0,9			
3.dan	337	333	325	326	333	330	331	4,6	1,4			
4.dan	343	342	337	334	342	340	340	3,5	1,0			
5.dan	338	347	336	340	342	345	341	4,2	1,2			
6.dan	341	329	335	328	338	338	335	5,3	1,6			

Med izvajanjem paralelnih določitev smo poskušali zagotoviti enake pogoje za vse meritve. Vrednosti KV se za povprečja paralelnih določitev, opravljenih v enem dnevu,

gibljejo med 0,9 in 1,6 %, iz česar lahko zaključimo, da so bile določitve znotraj posameznega dne opravljene pod ponovljivimi pogoji. Skupni  $KV$ , ki ocenjuje variabilnost vseh določitvev glede na skupno povprečno vrednost, je le nekoliko višji in znaša 1,7 %, iz česar lahko povzamemo, da je bila ponovljivost rezultatov boljša od 98 %.

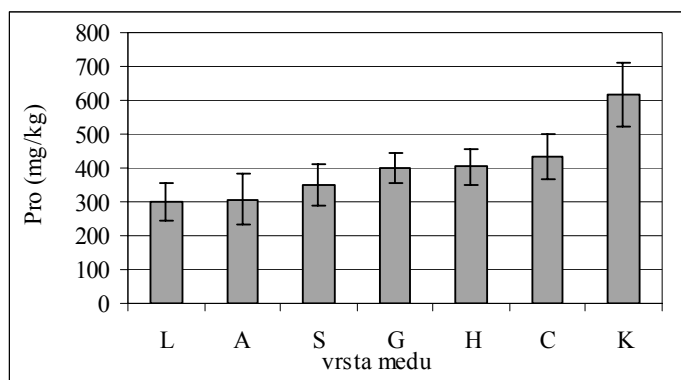
#### 4.2 Vsebnost prolina v medu - primerjava med vrstami

V preglednici 8 so zbrani rezultati vsebnosti prolina v različnih vrstah medu.

Preglednica 8. Povprečna vsebnost prolina (mg/kg) in nekateri statistični parametri v različnih vrstah medu

VRSTA MEDU	$n$	vsebnost prolina			
		$\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	$x_{min}$ (mg/kg)	$x_{max}$ (mg/kg)	$KV$ (%)
akacijev	15	307 ± 75	197	447	24
cvetlični	15	432 ± 67	309	534	16
gozdni	14	401 ± 43	322	461	11
hojev	15	404 ± 52	323	506	13
kostanjev	12	617 ± 97	457	776	16
lipov	15	300 ± 58	225	398	19
smrekov	15	351 ± 60	231	495	17

Aritmetične sredine vzorcev ( $\bar{x}$ ), standardne odklone ( $SD$ ) in koeficiente variabilnosti ( $KV$ ) smo izračunali z enačbami (12, 14, 15) podanimi v poglavju 3.3.1.  $x_{min}$  ter  $x_{max}$  označujeta najmanjšo in največjo določitev prolina v statističnem vzorcu in sta hkrati mejni vrednosti izbranega intervalnega območja, znotraj katerega se nahajajo tudi vse ostale ( $n - 2$ ) določitve. Povprečne vrednosti prolina s pripadajočimi standardnimi odkloni prikazuje stolpni diagram na sliki 3.

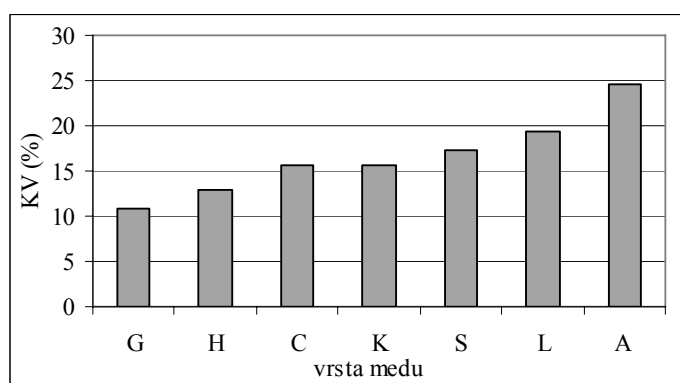


Slika 3. Povprečne vsebnosti prolina in standardni odkloni za posamezne vrste medu

Najmanjšo povprečno vsebnost prolina smo določili v lipovem medu in znaša 300 mg/kg medu. Sledi mu akacijev med s povprečno 307 mg/kg, smrekov s 351 mg/kg, gozdni s 401 mg/kg, hojev s 404 mg/kg, cvetlični s 432 mg/kg in kostanjev kot zadnji, s 617 mg/kg. Sedem aritmetičnih sredin, za katere pričakujemo, da so značilne za izbrane vrste medu, se nahaja na relativno ozkem intervalu širine 317 mg/kg (617 mg/kg - 300 mg/kg). Iz

stolpnega diagrama lahko ocenimo, da se aritmetične sredine vsebnosti prolina v maninih medovih porazdelijo v skladu s pričakovanjem. Povprečne vrednosti prolina mešanega gozdnega medu se namreč nahajajo med povprečnima vrednostma sortnih medov smreke in hoje. Podobne ugotovitve ni mogoče povzeti za nektarna cvetlični in akacijev med ter nektarno-manina lipov in kostanjev med.

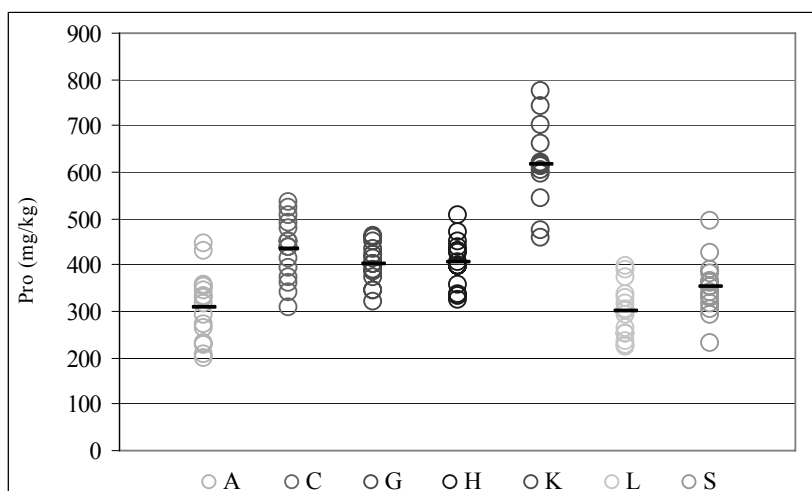
Absolutna vrednost standardnih odklonov nam ne nudi ustrezne informacije o razpršenosti statističnih enot v različnih vrstah medu, zato smo med seboj primerjali relativne mere variacije oziroma koeficiente variabilnosti. Vrednosti  $KV$  iz preglednice 8 so grafično prikazane na sliki 4.



Slika 4. Koeficienti variabilnosti glede na vrsto medu

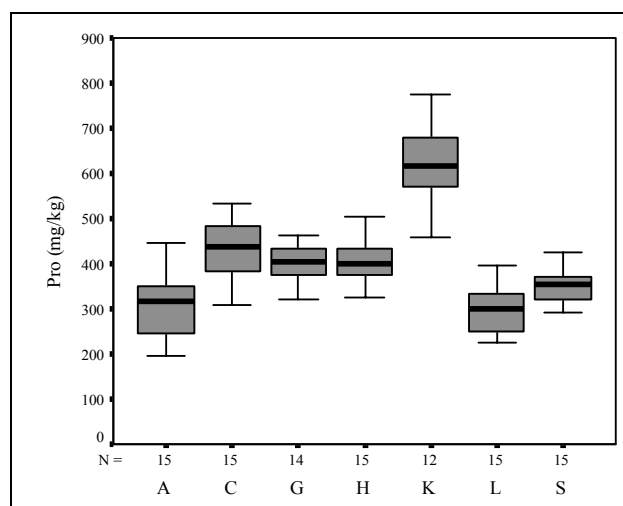
Na osnovi koeficientov variabilnosti zmanjšamo iščemo smiselno povezavo med vrednostmi, značilnimi za manine in nektarne medove ter mešane in sortne medove. Čeprav smo pričakovali, da bosta  $KV$  cvetličnega in gozdnega medu presegala  $KV$  vrstnih, dejanska slika kaže nasprotno. Vzorci sortnega akacijevega in lipovega medu so najbolj razpršeni ( $KV$  akacija 24 % in  $KV$  lipa 19 %), medtem ko je razpršenost vzorcev pri gozdnem medu skoraj pol manjša ( $KV$  11 %) in hkrati najnižja izmed vseh sedmih določenih  $KV$ . Koeficient variabilnosti mešanega cvetličnega medu je tretji najnižji. Izredno visoki  $KV$  akacijevega in lipovega medu in hkrati najnižji aritmetični sredini nakazujeta, da je relativno variiranje večje pri nižjih vsebnostih prolina.

Vrednosti vseh eksperimentalnih določitev prolina glede na vrsto medu so zbrane na sliki 5. Izračunane povprečne vrednosti so označene s črno odebeljeno vodoravno črto. Vsebnosti prolina preiskovanih vzorcev medu se nahajajo v razponu od 197 mg/kg ( $x_{min}$ ) v akacijevem, do 776 mg/kg ( $x_{max}$ ) v kostanjevem medu. Prekrivanje intervalov, znotraj katerih se nahajajo vrednosti eksperimentalnih določitev za posamezno vrsto medu, je najopaznejše pri akacijevem, lipovem in smrekovem medu, ter cvetličnem, gozdnem in hojevem medu.



Slika 5. Eksperimentalne določitve vsebnosti prolina in aritmetične sredine, izmerjene za posamezne vrste medu

Na sliki 6 je grafični prikaz v obliki okvirov z ročaji, ki nam še na nekoliko drugačen način predstavi določitve prolina znotraj posamezne vrste medu.



Slika 6. Prikaz vsebnosti prolina v posamezni vrsti medu s kvartili in mediano

Med vzorci smrekovega medu sta dva, ki bistveno odstopata od večine ostalih, in sicer v pozitivno in negativno smer. Vrednosti  $x_{min}$  ter  $x_{max}$  smrekovega medu imenujemo tudi ekstremna osamelca. Od tod sledi, da sta primernejši mejni vrednosti intervalnega območja smrekovega medu druga najvišja in druga najnižja določitev prolina, ki predstavljata pogojni maksimum oziroma pogojni minimum.

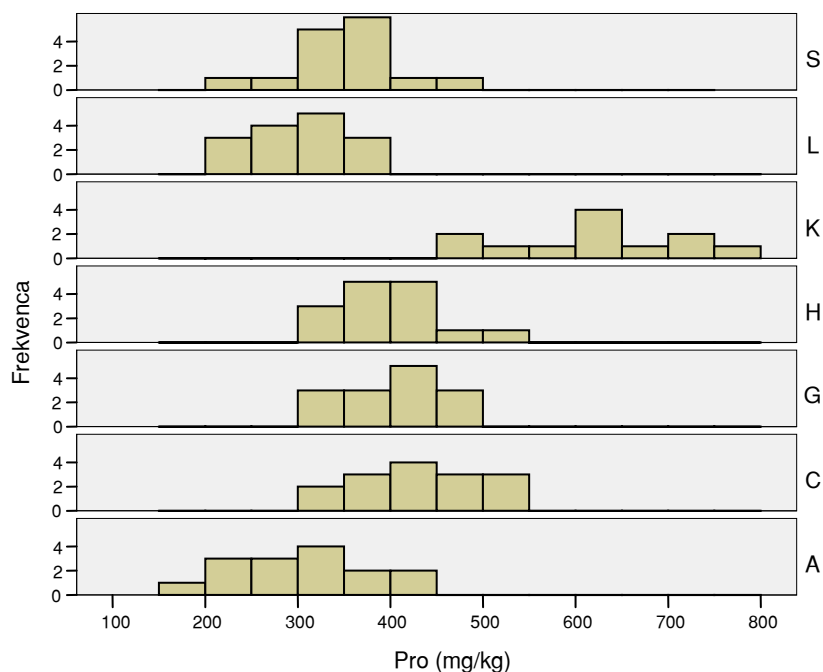
Iz slik 5 in 6 je razvidno, da so vrednosti aritmetične sredine (odebeljene črte na sliki 5) primerljive z medianami, ki predstavljajo sredino po velikosti razvrščenih vrednosti,

grafično pa jih predstavljajo črte znotraj posameznih okvirjev. Nahajajo se nekako na sredini intervalov in v območju največje zgoščenosti podatkov, kar deloma že nakazuje na normalno porazdelitev vsebnosti prolina znotraj vrste. Med sedmimi preučevanimi vrstami medu po vsebnosti prolina brez dvoma najbolj izstopa kostanjev. Aritmetična sredina, kot tudi posamezne določitve, so visoko nad ostalimi.

#### 4.2.1 Večvzorčna analiza prolina

##### 4.2.1.1 Normalna porazdelitev

Večina statističnih testov se nanaša na normalno porazdelitev statističnih enot znotraj statističnega vzorca, to je porazdelitev v skladu z Gaussovo krivuljo. Da bi preverili, kako se porazdeljujejo vsebnosti prolina za posamezno sorto medu, smo izrisali frekvenčne histograme. Ti so prikazani na sliki 7. Iz njih je razvidno, da porazdelitve vsebnosti prolina v preiskovanih vrstah medu nakazujejo bolj ali manj simetrično zvonasto porazdelitev.



Slika 7. Frekvenčna porazdelitev vzorcev medu za posamezno vrsto

##### 4.2.1.2 Levenov test

Levenov test za prolin, ki smo ga opravili s pomočjo programa za statistično obdelavo podatkov SPSS, nam je podal vrednost signifikance 0,24. Ker je bila statistična značilnost večja od izbrane meje tveganja 0,05, ničelne domneve nismo mogli zavrniti. S tem smo potrdili, da so variance statističnih vzorcev prolina sedmih vrst medu med seboj primerljive, iz česar sledi, da so vzorci homogeni in zato primerni za analizo variance.

#### 4.2.1.3 Analiza variance

Na osnovi vrednosti signifikance 0,00, ki jo je po izračunu podal test, smo zavrnili ničelno domnevo pri 0,05 stopnji tveganja. Posledično smo sprejeli osnovno domnevo, ki pravi, da sta med sedmimi preiskovanimi vrstami medu vsaj dve, ki se statistično značilno razlikujeta glede na povprečno vrednost prolina, lahko pa jih je tudi več. Za nadaljnje razvrščanje vzorcev v skupine s podobnimi statističnimi značilnostmi smo uporabili zaključni Duncanov test.

#### 4.2.1.4 Duncanov test

Rezultati Duncanovega testa so podani v preglednici 9. Sedem preiskovanih vrst medu, za katere smo preverili, da jih predstavljajo relativno normalno porazdeljeni, homogeni statistični vzorci, ki ne pripadajo isti populaciji, se po Duncanovi analizi razvrsti v 4 razrede: a, b, c in d.

Preglednica 9. Duncanov test za vsebnost prolina v posamezni vrsti medu

VRSTA MEDU	n	$\alpha \leq 0,05$			
		a	b	c	d
lipov	15	300			
akacijev	15	307	307		
smrekov	15		351		
gozdni	15			401	
hojev	14			404	
cvetlični	15			432	
kostanjev	12				617
Sig		0,78	0,07	0,23	1,00

Vrste medu, ki so uvrščene v različne razrede, se med seboj statistično značilno razlikujejo glede na povprečno vrednost prolina, vrste v istem razredu pa ne. Razredu *a* pripadata lipov in akacijev med. Akacijev med je uvrščen tudi v razred *b*, skupaj s smrekovim. Razred *c* si delijo gozdni, hojev in cvetlični med, v razredu *d* pa je kostanjev med. Za vsak statistično značilen razred je podana tudi vrednost statističnega ujemanja – signifikanca, ki nam pove, kolikšna je razlika med povprečnimi vrednostmi vzorcev znotraj enega razreda.

Signifikanca kostanjevega medu je 1, kar teoretično pomeni, da je ujemanje vzorca s samim seboj popolno, 100 %. Od tod sledi, da ima vrednost signifikance praktični pomen le tedaj, kadar sta v razredu vsaj dva vzorca ali več. V našem primeru so tovrstni razredi *a*, *b* in *c*. Razred *a* ima med opazovanimi razredi najvišjo vrednost statistične značilnosti. Signifikanca 0,78 je veliko večja od mejne vrednosti statističnega zaupanja ( $\alpha$ ) 0,05. S tem je potrjena ničelna hipoteza, ki pravi, da se aritmetični sredini akacijevga in lipovega medu statistično ne razlikujeta. Signifikanca razreda *c* je 0,23 in glede na vrednost razreda *a* pomeni, da so razlike med povprečji gozdnega, hojevega in cvetličnega medu izrazitejše kot pri lipovem in akacijevem. Signifikanca, ki opisuje ujemanje akacijevga in



smrekovega medu je najmanjša, 0,07. V primeru, ko bi bila vrednost signifikance omenjenih vzorcev manjša od  $\alpha = 0,05$ , bi pomenilo, da se vzorca statistično razlikujeta in program bi uvedel nov razred.

### 4.3 Rezultati določanja skupnih beljakovin v medu

#### 4.3.1 Ponovljivost metode za določanje skupnih beljakovin v medu

Skupne beljakovine smo določali po Kjeldahlovi metodi z uporabo sistema Büchi, ki vključuje blok za razklop vzorca, destilacijsko in titracijsko enoto. Postopek analize je delno avtomatiziran, zato nas je bolj kot delo analitika zanimala ponovljivost sistema Büchi pri določanju mikro količin skupnih beljakovin. Predposkus je obsegal pet analiz vzorca medu 115. Pri dveh analizah smo za razklop vzorca uporabili 20 ml koncentrirane žveplove (VI) kisline in 2 tableti katalizatorja, pri treh analizah pa 15 ml kisline in 1 tableto katalizatorja. Vrednosti določitev so podane v preglednici 10. Z uporabo enačb (12, 14, 15), podanih v 3.3.1, smo izračunali aritmetično sredino ter absolutni in relativni odklon.

Preglednica 10. Vsebnost beljakovin ter pripadajoča povprečna vrednost, standardni odklon in koeficient variabilnosti v testnem vzorcu 115

n	reagenti za razklop	vsebnost beljakovin			
		x	$\bar{x}$	SD	KV
		(g/100 g)			(%)
1	20 ml H <sub>2</sub> SO	0,294	0,287	0,005	1,6
2	2 tableti	0,287			
3	15 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 tableta	0,287			
4		0,287			
5		0,281			

Na podlagi rezultatov, povzetih v preglednici 10, lahko zaključimo, da izmerjene vrednosti ne kažejo večjih odstopanj glede na količino dodanih reagentov. Koeficient variabilnosti petih določitev je 1,6 %, kar kaže na več kot 98 % ponovljivost metode. Na osnovi predposkusa smo za nadaljnje razklope izbrali količino 20 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 1,5 tablete katalizatorja.

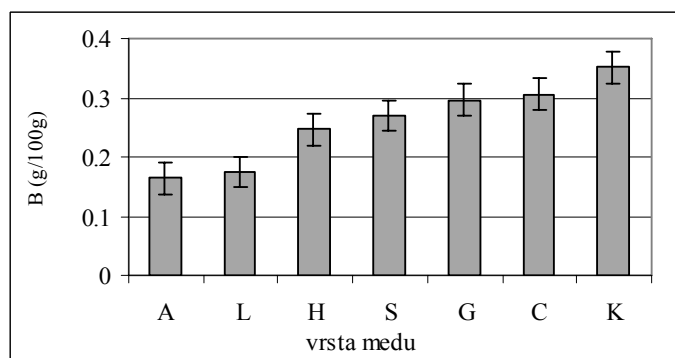
#### 4.3.2 Vsebnost skupnih beljakovin v medu - primerjava med vrstami

V preglednici 11 so zbrani osnovni rezultati vsebnosti skupnih beljakovin v sedmih preiskovanih vrstah medu. Aritmetične sredine vsebnosti skupnih beljakovin in absolutne mere variiranja (SD) prikazuje slika 8.

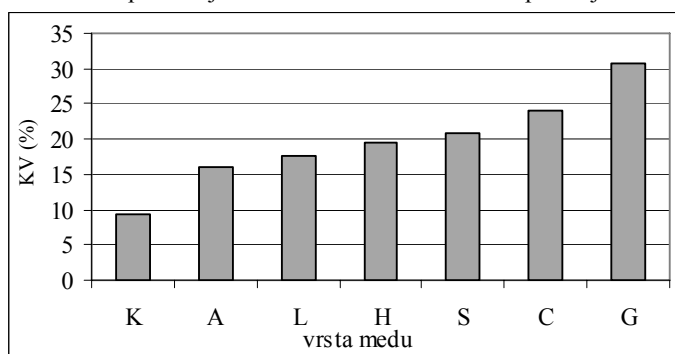
Preglednica 11. Povprečna vsebnost skupnih beljakovin (g/100 g) in nekateri statistični parametri v različnih vrstah medu

VRSTA MEDU	n	vsebnost skupnih beljakovin			
		$\bar{x} \pm SD$ (g/100 g)	$x_{min}$ (g/100 g)	$x_{max}$ (g/100 g)	KV (%)
akacijev	15	0,16 ± 0,03	0,13	0,21	16
cvetlični	15	0,31 ± 0,07	0,18	0,42	24
gozdni	14	0,30 ± 0,09	0,20	0,49	31
hojev	15	0,25 ± 0,05	0,18	0,36	19
kostanjev	12	0,35 ± 0,03	0,31	0,40	9
lipov	15	0,17 ± 0,03	0,13	0,24	18
smrekov	15	0,27 ± 0,06	0,18	0,38	21

Najmanjša povprečna vrednost skupnih beljakovin znaša 0,16 g/100 g in je bila določena v akacijevem medu. V naraščajočem zaporedju ji sledijo povprečja skupnih beljakovin v lipovem medu z 0,17 g/100 g, hojevem z 0,25 g/100 g, smrekovem z 0,27 g/100 g, gozdnem z 0,30 g/100 g, cvetličnem z 0,31 g/100 g ter kostanjevem z 0,35 g/100 g. Širina intervalnega območja, na katerem se nahajajo aritmetične sredine skupnih beljakovin znaša 0,19 g/100 g. Iz slike 8 je razvidno izrazito nesorazmerje med naraščajočimi povprečji in pripadajočimi standardnimi odkloni. Za dejansko oceno variiranja statističnih enot znotraj statističnega vzorca je potrebno izhajati iz koeficientov variabilnosti, ki so podani v preglednici 11 in grafično prikazani na sliki 9.



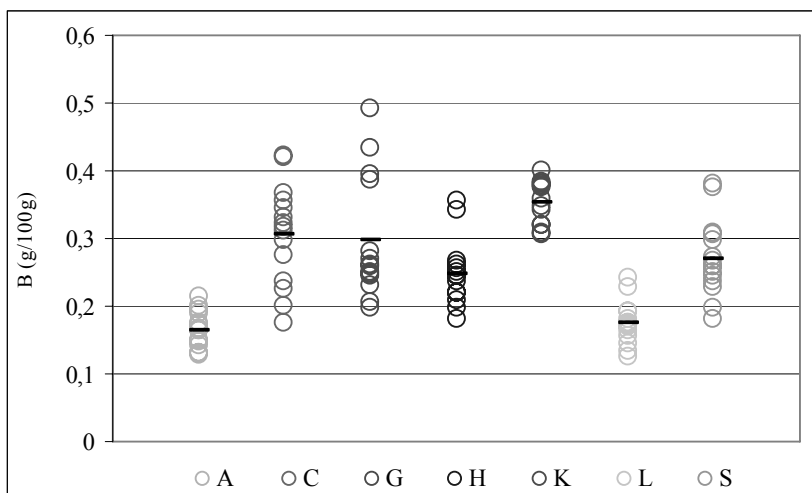
Slika 8. Povprečne vsebnosti skupnih beljakovin in standardni odkloni - primerjava med vrstami



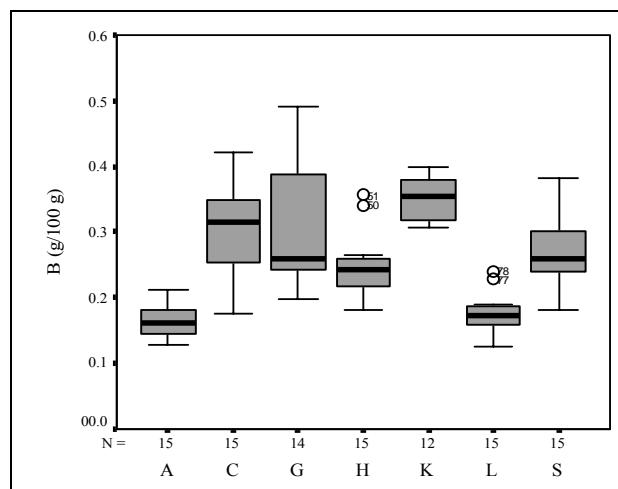
Slika 9. Koeficienti variabilnosti skupnih beljakovin - primerjava med vrstami

*KV* lipovega medu (18 %) je dvakrat večji od *KV* kostanjevega (9 %), čeprav sta vrednosti standardnih odklonov enaki, 0,03 g/100 g. Izstopajoče visok *KV* gozdnega medu je dokaz velike variabilnosti vzorcev znotraj vrste. Zgornjo mejo intervalnega območja skupnih beljakovin vseh vrst medu določa prav  $x_{max}$  gozdnega medu, čeprav je povprečje komaj tretje najvišje. Naraščanje relativnega variiranja določitev skupnih beljakovin se sklada z naraščajočimi povprečnimi vrednostmi, izjemi sta kostanjev in gozdni med.

Posamezne določitve skupnih beljakovin s pripadajočimi povprečnimi vrednostmi za posamezne vrste medu prikazuje slika 10. Povprečne vrednosti so prikazane s črnimi odebeljenimi vodoravnimi črtami.



Slika 10. Eksperimentalne vrednosti skupnih beljakovin in aritmetične sredine - primerjava med vrstami



Slika 11. Prikaz vsebnosti skupnih beljakovin v posamezni vrsti medu s kvartili in mediano

Najmanjši vsebnosti skupnih beljakovin, 0,13 g/100 g ( $x_{min}$ ), smo določili vzorcema akacijevega in lipovega medu, največjo pa v gozdnem in sicer 0,49 g/100 g ( $x_{max}$ ). Celotno intervalno območje obsega 0,36 g/100 g (0,49 g/100 g - 0,13 g/100 g). Najožji intervalni območji in posledično največja zgoščenost podatkov sta pri akacijevem in kostanjevem

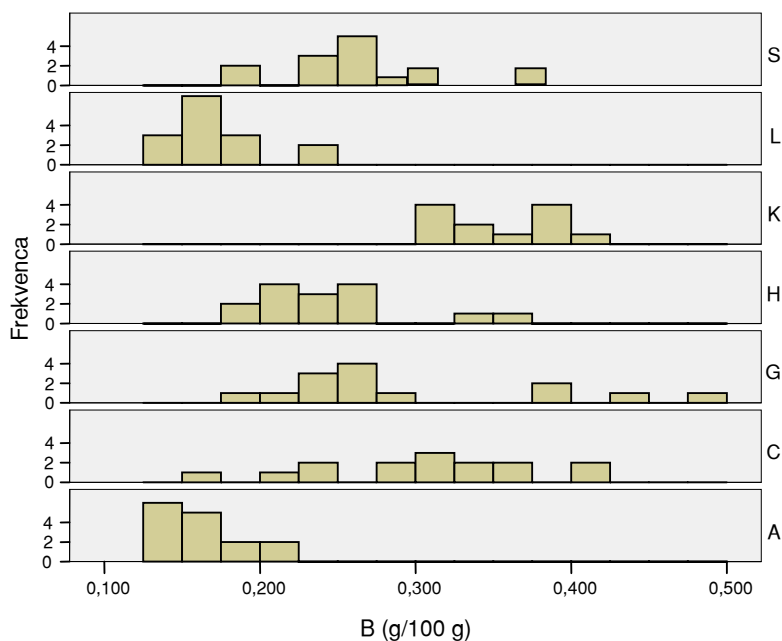
medu. Najširši intervalni območji pripadata gozdnemu in cvetličnemu medu, kar je v skladu s pestro sestavo mešanih medov. Intervalno območje cvetličnega medu (0,24 g/100 g) predstavlja dve tretjini (2/3) celotnega, intervalno območje gozdnega medu (0,29 g/100 g) pa več kot 80 %. Pri tem ne gre spregledati, da cvetlični med nakazuje večjo homogenost statističnih enot kot gozdni, kar potrjujejo tudi okvirji z ročaji na sliki 11.

Med 14 predstavnikih gozdnih medov so štirje, ki odstopajo v pozitivno smer in pomembno vplivajo na zvišanje aritmetične sredine. Ker je statistična masa v primeru gozdnega medu porazdeljena izrazito asimetrično, bi bila namesto povprečja, primernejše merilo srednje vrednosti mediana, kar je prav tako razvidno iz slike 11. Aritmetična sredina gozdnega medu znaša 0,30 g/100 g, mediana pa 0,26 g/100 g. Pri ostalih vrstah medu se obe srednji vrednosti (povprečje in mediana) nahajata v območju največje zgoščenosti določitev, absolutne razlike med njima pa so manjše od 0,10 g/100 g. Ob upoštevanju osamelcev hojevega in lipovega medu, sta se tudi ti vrsti izkazali kot relativno homogeni glede na vsebnost skupnih beljakovin, žal pa podobnega ne moremo navesti za sortni kostanjev med.

### 4.3.3 Večvzorčna analiza skupnih beljakovin

#### 4.3.3.1 Normalna porazdelitev

Slika 12 prikazuje histograme frekvenčnih porazdelitev skupnih beljakovin glede na opazovano vrsto medu.



Slika 12. Frekvenčne porazdelitve za vsebnost beljakovin v različnih vrstah medu

Za statistične vzorce skupnih beljakovin ne moremo privzeti, da se njihova porazdelitev ujema z Gaussovo. Slednjega se moramo zavedati pri interpretaciji rezultatov statističnih testov, ki za svoje zanesljivo delovanje zahtevajo normalno porazdeljene vzorce.

#### 4.3.3.2 Levenov test

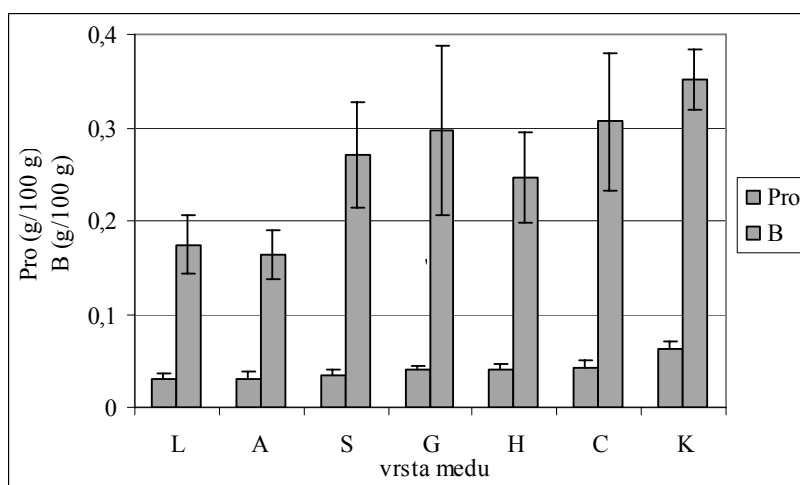
Levenov test homogenosti varianc ne zahteva normalne porazdelitve statističnih enot, zato ga smemo opraviti. Statistična značilnost, ki jo je podal Levenov test za vzorce skupnih beljakovin je znašala 0,00. Ker je bila izračunana signifikanca manjša od stopnje tveganja 0,05, smo zavrnilo nično in sprejeli osnovno domnevo, ki pravi, da se variance statističnih vzorcev beljakovin v posameznih vrstah medu statistično razlikujejo.

Deleži skupnih beljakovin v različnih vrstah medu torej ne predstavljajo homogenih vzorcev. Zaradi neizpoljenih temeljnih zahtev, kot sta normalna porazdelitev in homogenost statističnih vzorcev, nadaljnjih statističnih testov (ANOVA, Duncan) nismo opravili. Statistično potrjena nehomogenost vzorcev pravzaprav ni presenečenje, saj so se v to smer nagibale vse dosedanje ugotovitve - različno široka intervalna območja in visoki *KV*.

#### 4.4 Primerjava vsebnosti prolina in skupnih beljakovin

Do sedaj smo povprečja, standardne odklone in koeficiente variabilnosti opazovali glede na vrsto medu, vendar ločeno za prolin in beljakovine.

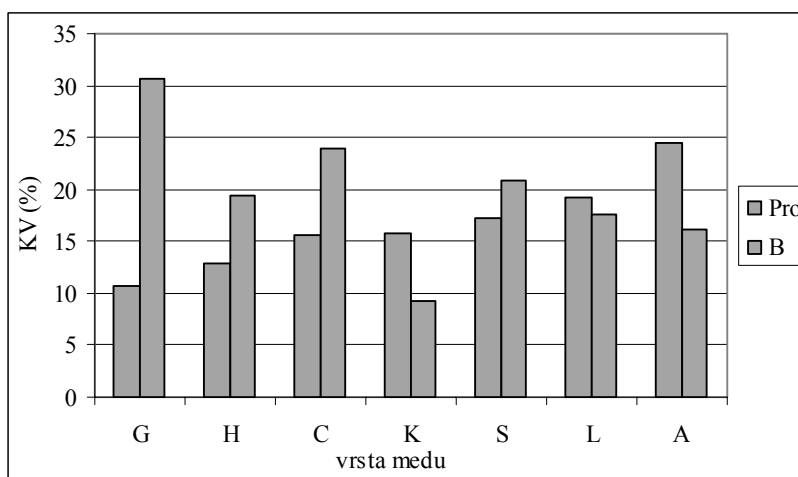
Povprečja in standardne odklone obeh spremenljivk, ki so podani v preglednici 7 in 10, prikazuje slika 13. Za lažje primerjanje smo enote za prolin (mg/kg) poenotili z enotami za beljakovine (g/100 g), vrste medu pa so urejene glede na povprečno vsebnost prolina, od najmanjše do največje.



Slika 13. Povprečne vsebnosti prolina in skupnih beljakovin s pripadajočimi *SD* - razvrstitev vrst glede na naraščajoče aritmetične sredine prolina.

Sorazmerja med povprečnimi vrednostmi, kar pomeni hkratno povečanje vsebnosti prolina in beljakovin, se v splošnem ujemajo, a ne v celoti. Tako je v skupini maninih medov hojev tisti, ki vsebuje največ prolina in hkrati najmanj skupnih beljakovin. Obratno sorazmerje med povprečnimi vrednostmi prolina in beljakovin je opazno tudi pri lipovem in akacijevem medu.

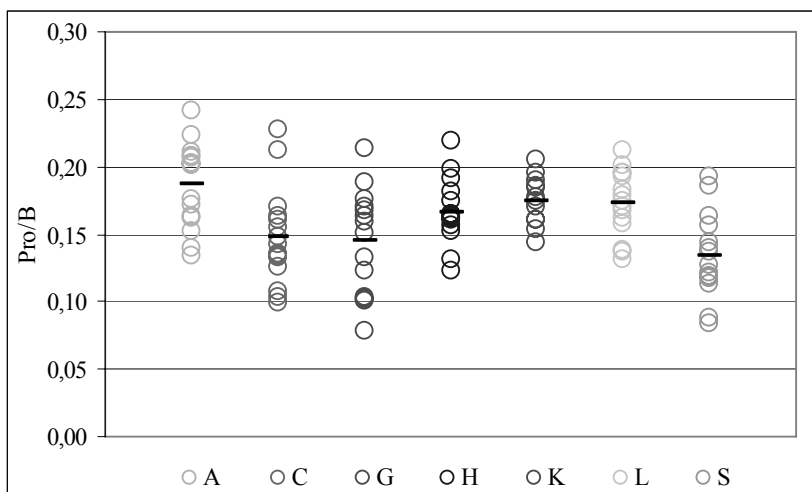
Variabilnost obeh spremenljivk v vseh vrstah medu prikazuje slika 14. Sorte medu so urejene glede na velikost koeficientov variabilnosti, ki smo jih izračunali za prolina.



Slika 14. Koeficienti variabilnosti vsebnosti prolina in beljakovin v različnih vrstah medu

Variabilnost vsebnosti skupnih beljakovin je pri gozdnem medu največja, variabilnost vsebnosti prolina pa najmanjša. Tudi za cvetlični med, ki je tako kot gozdni predstavnik mešanih medov, smo izračunali veliko variabilnost vsebnosti beljakovin in majhno variabilnost vsebnosti prolina. Nasprotno pa velja, da ima sortni akacijev med največji *KV* prolina, a hkrati drugi najmanjši *KV* beljakovin. Iz povprečnih vrednosti in koeficientov variabilnosti prolina in skupnih beljakovin v različnih vrstah medu ni moč razbrati značilnih povezav glede na pripadajoče botanično poreklo. Podobno velja tudi razlikovanje med sortnimi in mešanimi medovi.

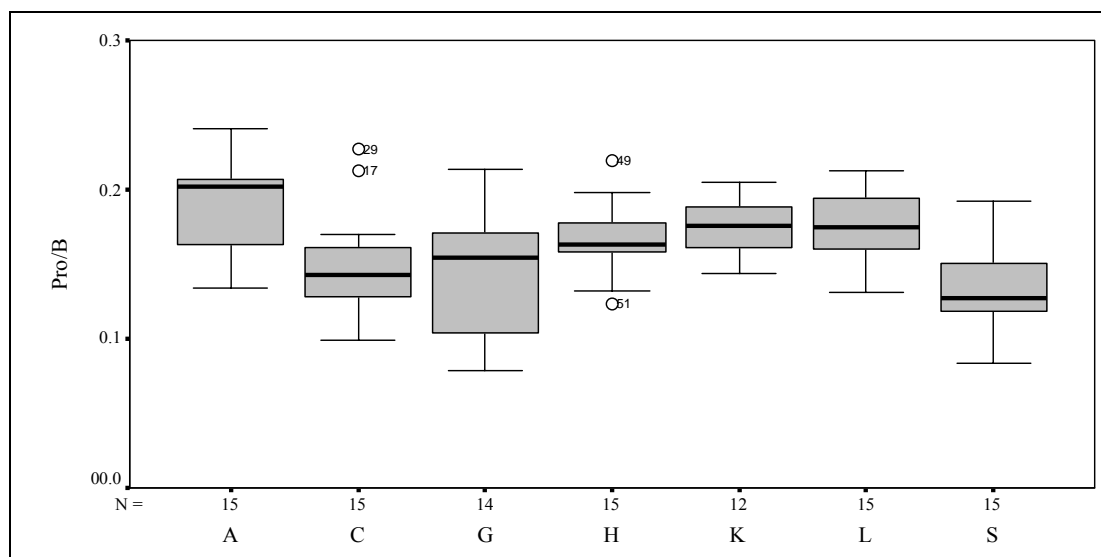
Povprečne vrednosti prolina in skupnih beljakovin v analiziranih vrstah medu pa ne povejo ničesar o relativni vsebnosti prolina glede na skupne beljakovine v posameznem vzorcu. Razmerje med vsebnostjo prolina in skupnih beljakovin v posameznem vzorcu medu prikazuje slika 15.



Slika 15. Razmerje med prolinom in skupnimi beljakovinami glede na vrsto medu

Širina posameznega intervala nam pove, kako dobro se ohranjajo razmerja med prolinom in beljakovinami znotraj opazovane vrste medu. Iz slike 15 je razvidno, da je ohranjanje razmerij najboljše pri kostonjevem medu, kljub temu, da je bilo intervalno območje določitev prolina najširše. Razmerje prolina in skupnih beljakovin se najbolj spreminja pri gozdnem in cvetličnem medu, ki jima sledita tudi smrekov in akacijev.

Ilustrativen grafični prikaz ohranjanja razmerij med opazovanima spremenljivkama v posamezni vrsti medu je prikazan na sliki 16 z okvirji z ročaji. Velika odstopanja - osamelci - so prikazani ločeno od ročajev.



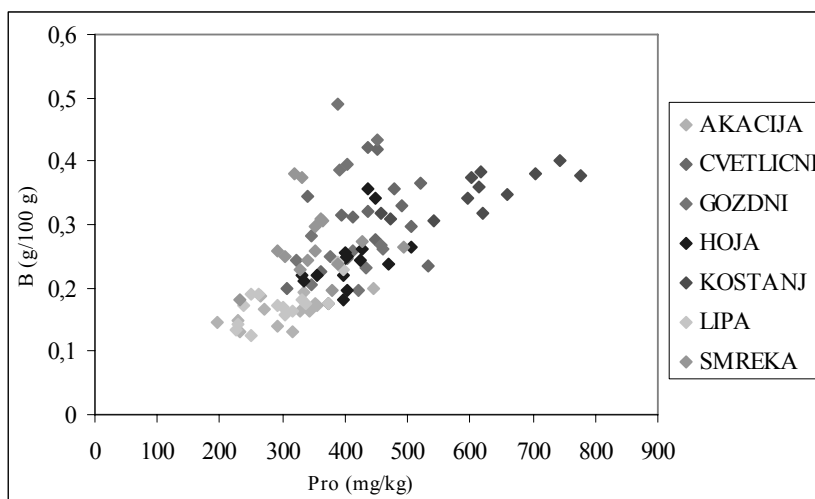
Slika 16. Okvirji z ročaji glede na razmerje med vsebnostjo prolina in skupnih beljakovin v posamezni vrsti medu

Največja okvirja in hkrati dolgi ročaji, nakazujejo najslabše ohranjanje razmerja med prolinom in skupnimi beljakovinami v primeru akacijevega in gozdnega medu. Ob upoštevanju oziroma izločitvi dveh osamelcev, sta postali intervalni območji cvetličnega in hojevega medu veliko ožji, velikosti okvirjev pa primerljivi z večjim delom ostalih okvirjev - kostanjevega, lipovega in smrekovega. Razmerja se najbolj ohranjajo pri kostanjevem medu. Velikost okvirja je sicer nekoliko večja od okvirja hojevega medu, a je intervalno območje ožje, brez prisotnih osamelcev, mediana pa okvir razpolavlja tako, da sta drugi in tretji kvartil približno enako visoka.

Iz slike 15 in 16 lahko povzamemo, da se intervalna območja, ki opisujejo razmerje med prolinom in skupnimi beljakovinami v posamezni vrsti medu, v celoti ali deloma prekrivajo. Razmerja se v širšem smislu sicer ohranjajo, vendar niso vrstno značilna.

#### 4.5 Zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina

Da bi dobili boljši pregled nad podatki, vse eksperimentalne določitve vnesemo v razsevni grafikon, ki ga prikazuje slika 17.



Slika 17. Korelacijski diagram povezanosti skupnih beljakovin in prolina v sedmih vrstah medu

Iz razsevnega grafikona je razvidno, da se s povečanjem ene spremenljivke poveča tudi delež druge, kar lahko opišemo s preprosto linearno zvezo. Statistično analizo povezanosti prolina in skupnih beljakovin bomo v nadaljevanju podrobneje preučili.

Pri regresijski analizi je potrebno definirati odvisno in neodvisno spremenljivko. V našem primeru smo izbrali za neodvisno spremenljivko ( $x$ ) prolin, ki je ena izmed aminokislin v skupnih beljakovinah. Praktično to pomeni, da večja vsebnost prolina v medu zagotovo doprinese k povečanju skupnih beljakovin, česar pa v obratni smeri ne moremo trditi z gotovostjo. Razlog povečanja skupnih beljakovin so lahko tudi druge aminokisliline,



peptidi, beljakovine, encimi, nekateri vitamini B-kompleksa in še mnoge organske snovi, ki imajo v svojo strukturo vključen dušik. Skupne beljakovine smo zato izbrali za odvisno spremenljivko. Z metodo linearne regresije smo določili enačbe premic, ki so se kar najbolj prilegale individualnim podatkom opazovanih spremenljivk. Analize smo opravili z računalniškim programom Excel 2003, ki je poleg grafičnih izrisov podal tudi izračunane enačbe premic in vrednosti koeficientov determinacije ( $R^2$ ), ki nam povedo, kolikšen delež variabilnosti skupnih beljakovin pojasnjuje vsebnost prolina.

Pri korelacijski analizi smo prolin in skupne beljakovine obravnavali kot naključni, odvisni spremenljivki. Na osnovi vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta ( $R$ ), ki je pri linearni zvezi enak kvadratnemu korenu determinacijskega koeficienta, smo ovrednotili stopnjo povezanosti obeh spremenljivk, statistično značilnost korelacije pa preverili s testom  $t$ .

Del korelacijske analize smo opravili s pomočjo statističnega računalniškega programa (SPSS, 2001), večino pa s klasičnim statističnim sklepanjem in uporabo ustreznih preglednic (Adamič, 1989).

Pri regresijski in korelacijski analizi smo opazovali zvezo med skupnimi beljakovinami in prolinom upoštevajoč vse rezultate meritev, nato pa še za posamezne statistične vzorce, ki se med seboj razlikujejo glede na vrsto in poreklo medu.

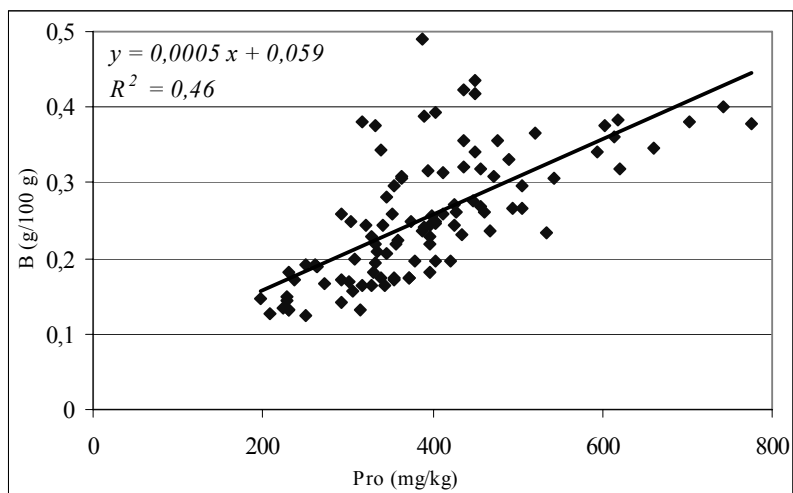
#### 4.5.1 Zveza med vsebnostjo beljakovin in prolina v medu

Slika 18 prikazuje odvisnost skupnih beljakovin od aminokislina prolina v analiziranih vzorcih medu, ne glede na vrsto. Odnos med spremenljivkama vseh v raziskavo vključenih vrst medu opisuje linearni regresijski model  $y = 0,0005x + 0,059$ . Izredno majhni vrednosti regresijskega koeficienta in odseka premice na ordinatni osi sta posledica majhnih vrednosti spremenljivk.

Regresijski koeficient znaša 0,0005. To je vrednost, za katero se spremeni vsebnost skupnih beljakovin (podanih v g/100 g medu), kadar se vrednost prolina spremeni za 1 mg/kg medu ali drugače, da bi se skupne beljakovine povečale za 0,05 %, se mora vsebnost prolina povečati za 100 mg/kg.

Koeficient determinacije ( $R^2$ ) znaša 0,46, kar pomeni, da neodvisna spremenljivka prolina pojasnjuje le 46 % variance skupnih beljakovin. Vrednost korelacijskega koeficienta ( $R$ ) v primeru linearne regresije izračunamo kot kvadratni koren regresijskega koeficienta in znaša 0,68.  $R$  se nahajajo v območju od 0,4 do 0,7, kar kaže na zmerno povezanost med beljakovinami in prolinom.

Vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta smo izračunali s programom SPSS za 101 vzorcev medu ter znaša 0,67 (manj kot 0,70). Zveza je označena kot statistično značilna pri 0,01 stopnji tveganja.

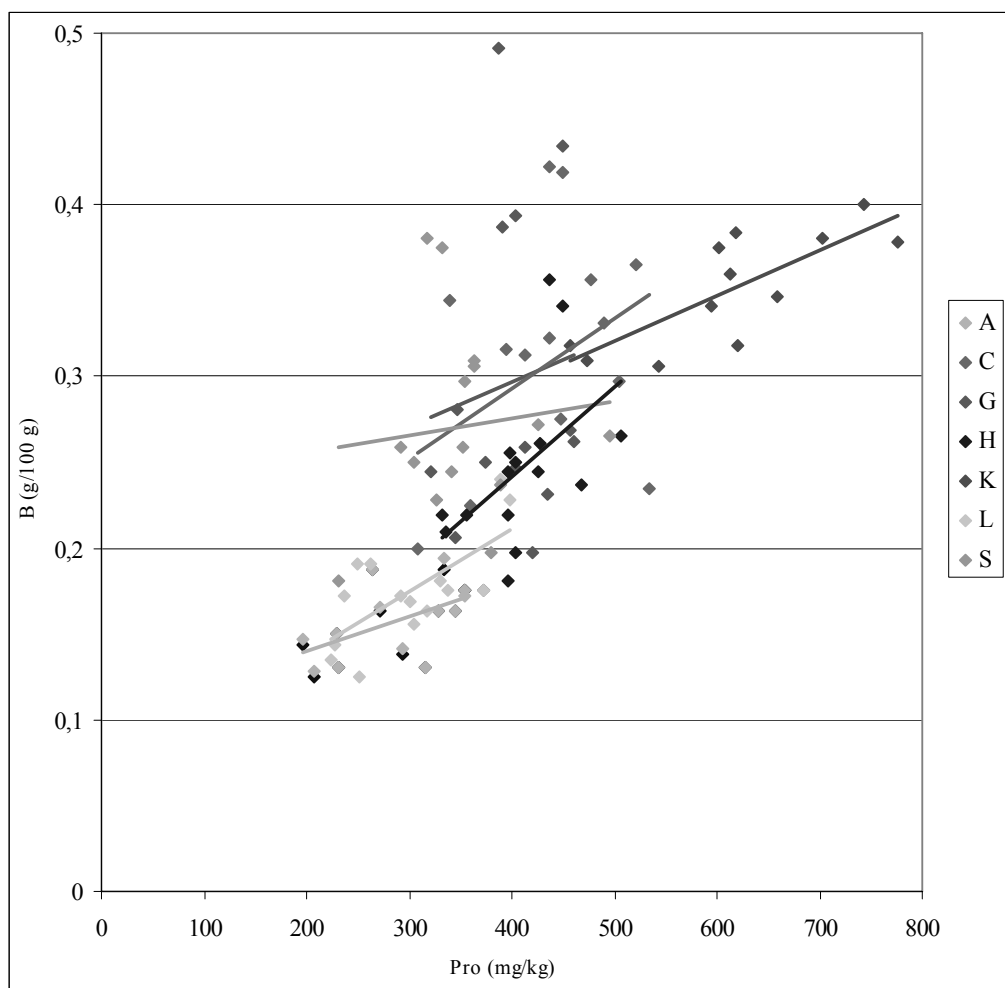


Slika 18. Zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina v analiziranih vzorcih medu

Na osnovi regresijskega modela in korelacijske analize za 101 vzorcev medu sedmih različnih vrst lahko povzamemo, da zveza med opazovanima spremenljivkama obstaja, je statistično značilna pri 0,01 stopnji tveganja, vendar ni močna (manjša od 0,7).

#### 4.5.2 Zveza med vsebnostjo beljakovin in prolina glede na vrsto medu

V nadaljevanju sledijo regresijske analize po posameznih vrstah medu. Za določitev sedmih vrstno značilnih linearnih regresijskih modelov oziroma zvez med skupnimi beljakovinami in prolinom smo uporabili povprečne vrednosti paralelnih določitev prolina in skupnih beljakovin, ki so zbrane v preglednicah priloge A (A1 do A7).



Slika 19. Zveze med vsebnostjo beljakovin in prolina v posameznih vrstah medu

Preglednica 12. Linearni regresijski modeli ter pripadajoče vrednosti  $R^2$  in  $R$  za izbrane vrste medu

VRSTA MEDU	LIN. REGRESIJSKI MODEL ( $y = bx + a$ )	KOEFICIENT DETERMINACIJE ( $R^2$ )	KOEFICIENT KORELACIJE ( $R$ )
akacijev	$y = 0,0002 x + 0,099$	0,25	0,50
cvetlični	$y = 0,0004 x + 0,130$	0,14	0,37
gozdni	$y = 0,0003 x + 0,192$	0,02	0,12
hojev	$y = 0,0005 x + 0,033$	0,26	0,51
kostanjev	$y = 0,0003 x + 0,188$	0,61	0,78
lipov	$y = 0,0004 x + 0,061$	0,49	0,70
smrekov	$y = 0,00001 x + 0,236$	0,01	0,11

Regresijski modeli akacijevega, lipovega, cvetličnega, hojevega in smrekovega medu temeljijo na 15 vrstno značilnih vzorcih, regresijski model gozdnega medu na 14 vzorcih ter kostanjevega medu na 12 vzorcih. Ker so modeli linearni, smo s kvadratnim korenjenjem determinacijskih koeficientov ( $R^2$ ) izračunali tudi korelacijske ( $R$ ). Grafični prikaz regresijskih modelov je predstavljen na sliki 19, v preglednici 12 pa so zbrane enačbe regresijskih premic ter vrednosti regresijskih in korelacijskih koeficientov.

Vse premice so naraščajoče, kar potrjujejo pozitivno predznačeni regresijski naklonski koeficienti  $b$ . Vrednosti  $b$  se spreminjajo na četrtem decimalnem mestu, pri smrekovem medu pa šele na petem decimalnem mestu, kar je posledica že omenjenih majhnih vrednosti spremenljivk oziroma izbranih enot. Večji naklonski koeficienti  $b$  kažejo, v katerih sortah medu igra prolin pomembnejšo vlogo glede na delež skupnih beljakovin.

Vrednosti parametrov  $a$  predstavljajo povprečne deleže skupnih beljakovin, ki bi jih izmerili, če v medu ne bi bilo prolina. Na grafih so te vrednosti vidne kot odseki, ki jih regresijske premice opišejo na ordinatni osi.

Vrednosti determinacijskih koeficientov se med vrstami medu sicer zelo razlikujejo, na splošno pa velja, da so majhne. V smrekovem medu tako vsebnost prolina pojasnjuje le 1 % variabilnosti skupnih beljakovin, v mešanem gozdnem medu pa 2 %, kar pomeni, da ostaja kar 99 oz. 98 % variabilnosti skupnih beljakovin, ob poznavanju samo vsebnosti prolina, nepojasnjenih. Po drugi strani vsebnost prolina v lipovem medu opisuje 49 % ter pri kostanjevem medu več kot 60 % variabilnosti skupnih beljakovin. Na osnovi Pearsonovega koeficienta pa smo prišli do ugotovitve, da je korelacija med prolinom in beljakovinami močna le v primeru kostanjevega medu. R lipovega medu je namreč enak 0,70, kar je zgornja mejna vrednost zmernih korelacij.

Ker Pearsonov koeficient korelacije podaja le stopnjo povezanosti med opazovanima spremenljivkama, ne pa tudi statistične značilnosti, smo le-to preverili s testom  $t$ . Po enačbi (23) izračunane vrednosti  $t$  smo primerjali s kritičnimi vrednostmi, odčitanimi iz statistične preglednice (Adamič, 1998) pri določeni velikosti vzorca in stopnji značilnosti 0,05. V primeru, ko je izračunana vrednost  $t$  presejala kritično mejo, smo s 5 % tveganjem zavrnilo ničelno hipotezo, ki pravi, da med opazovanimi vzorci medu znotraj vrste ni statistično značilne povezanosti. Rezultati testa  $t$  so zbrani v preglednici 13.

Preglednica 13. Analiza determinacijskih koeficientov s testom t

VRSTA MEDU	$t = \sqrt{\frac{R^2(n-2)}{1-R^2}}$	$t_{kritična}$ $\alpha = 0,05$	statistična značilnost regresijskega modela
akacijev	2,07	2,16	NE
cvetlični	1,46	2,16	NE
gozdni	0,43	2,18	NE
hojev	2,14	2,16	NE
kostanjev	3,97	2,23	DA
lipov	3,53	2,16	DA
smrekov	0,38	2,16	NE

Na podlagi rezultatov t-testa lahko s 5 % tveganjem potrdimo le statistično značilno povezanost vsebnosti prolina in skupnih beljakovin v kostanjevem ter lipovem medu.

Ker naj bi regresijski parameter  $a$  predstavljal vsebnost skupnih beljakovin brez aminokislinske prolina, smo preverili, kakšno je ujemanje (parametra  $a$ ) z dejanskimi vrednostmi, ki smo jih izračunali kot razlike med povprečji skupnih beljakovin in prolina za posamezno vrsto medu.

Iz preglednice 14 je razvidno, da so z regresijo določene skupne beljakovine brez prolina (parameter  $a$ ) v vseh primerih manjše od izmerjenih oziroma računsko določenih ( $B - Pro$ ). To pomeni, da vsi regresijski modeli pripisujejo prolinu večji delež, kot ga dejansko zaseda. Glede na slabo ujemanje dejanskih vrednosti z vrednostmi parametra  $a$  lahko sklepamo, da regresijski modeli, ki opisujejo zvezo med beljakovinami in prolinom, niso povsem linearni oziroma, da so beljakovine odvisna spremenljivka, na katero ne vpliva le prolin, pač pa tudi drugi nepojasneni oziroma nam neznani dejavniki.

Preglednica 14. Vsebnost skupnih beljakovin brez deleža prolina

VRSTA MEDU	$B - Pro$	$a$	$\frac{a}{(B-Pro)} (\%)$
	g/100g		
akacijev	0,13	0,10	77
cvetlični	0,27	0,13	48
gozdni	0,26	0,19	73
hojev	0,21	0,03	14
kostanjev	0,29	0,27	93
lipov	0,14	0,06	43
smrekov	0,23	0,19	83

Vrednost  $a$  v primeru hojevega medu zajema le 14 % dejanske vrednosti skupnih beljakovin brez prolina, pri lipovem in cvetličnem približno 45 %, pri gozdnem in akacijevem približno 75 %, pri smrekovem in kostanjevem pa nad 80 %. Zanimivo je ujemanje koeficienta  $a$  in eksperimentalno določenih vrednosti beljakovin brez prolina pri

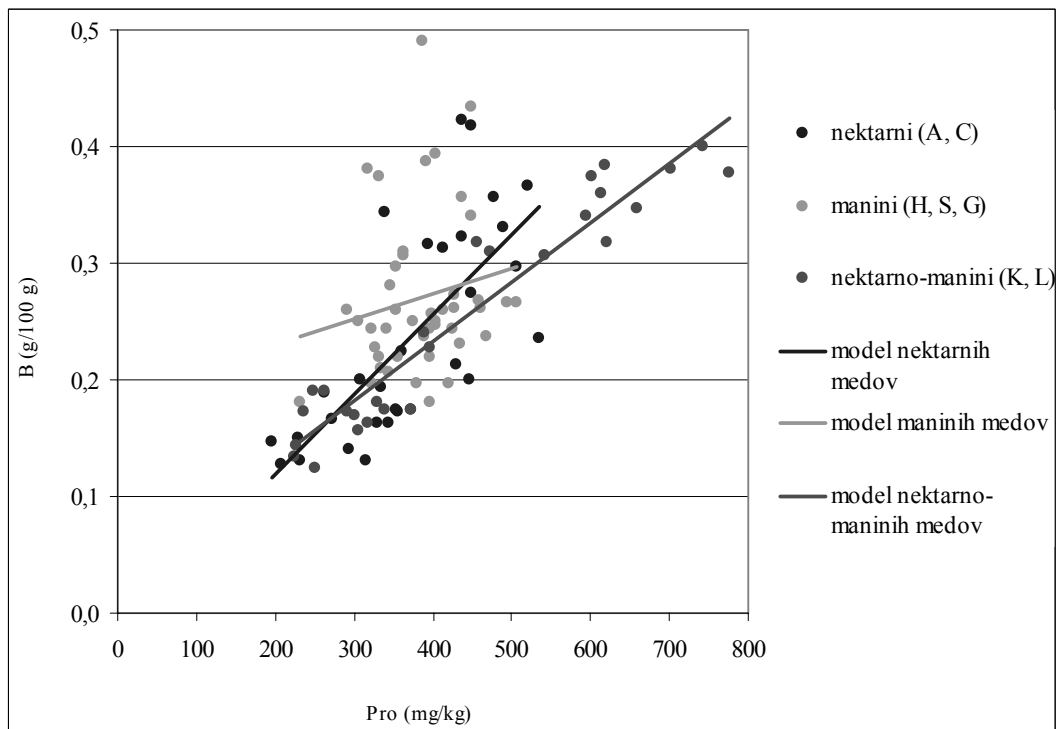
smrekovem in gozdnem medu, za katera smo pokazali, da je povezava med vsebnostjo prolina in beljakovin zelo slaba ( $R^2 = 0,01$  oz.  $R^2 = 0,02$ ) in hkrati neznačilna (test t).

Povzamemo lahko, da je enačba  $y = a + bx$  le ocena regresijske premice, dejanski model pa zapišemo kot  $y = a + bx + \varepsilon$ , kjer parametra  $a$  in  $b$  ostajata takšna, kot smo ju določili z regresijo,  $\varepsilon$  pa predstavlja slučajne, nepojasnjene, neznane vplive, ki so se izkazali kot poglavitni pri večini opazovanih vrst medu.

#### 4.5.3 Zveza med vsebnostjo beljakovin in prolina glede na izvor medu

Linearni regresijski modeli, ki opisujejo zvezo med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina, se v splošnem niso izkazali kot primerni za razlikovanje medov po vrstah. Preverili smo, ali bi bili uspešnejši ob manj strogi zahtevi in sicer, ločevanju medov glede na izvor. Skupina nektarnih medov je vključevala skupno 30 vzorcev akacijevega in cvetličnega medu, skupina maninih skupno 44 vzorcev hojevega, gozdnega in smrekovega medu ter skupina nektarno-maninih 27 kostanjevih in lipovih vzorcev medu.

Zvezo med skupnimi beljakovinami in prolinom v medovih različnega izvora prikazuje slika 20 ter preglednici 17 in 18. Linearna regresijska modela za prolin in skupne beljakovine v nektarnih in nektarno-maninih medovih sta statistično značilna in nakazujeta močno linearno povezanost teh dveh spremenljivk. Pri nektarnih medovih neodvisna spremenljivka prolina pojasnjuje 58 % variabilnosti skupnih beljakovin. Še boljši je regresijski model nektarno maninih medov, kjer prolina pojasnjuje kar 91 % variabilnosti skupnih beljakovin v medu.



Slika 20. Zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina v medovih različnega porekla

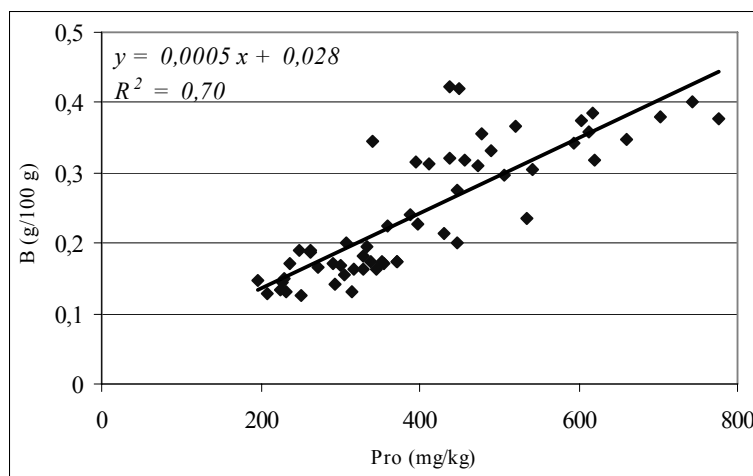
Preglednica 15. Linearni regresijski modeli ter pripadajoče vrednosti  $R^2$  in  $R$  za izbrane skupine medu glede na poreklo

VRSTA MEDU	LIN. REGRESIJSKI MODEL ( $y = bx + a$ )	KOEFICIENT DETERMINACIJE ( $R^2$ )	KOEFICIENT KORELACIJE ( $R$ )
nektarni (A, C)	$y = 0,0007 x - 0,031$	0,58	0,76
manini (G, H, S)	$y = 0,0002 x + 0,187$	0,03	0,18
nektarno-manini (K, L)	$y = 0,0005 x + 0,028$	0,91	0,96

Preglednica 16. Analiza determinacijskih koeficientov s testom t

VRSTA MEDU	$t = \sqrt{\frac{R^2(n-2)}{1-R^2}}$	$t_{\text{kritična}} \alpha = 0,05$	statistična značilnost regresijskega modela
nektarni (A, C)	6,22	2,04	DA
manini (G, H, S)	1,19	2,02	NE
nektarno-manini (K, L)	16,35	2,06	DA

Iz navedenega je razvidno, da predstavniki maninih medov, kadar obravnavamo vse vzorce medu skupaj, zabrišejo povezavo med prolinom in beljakovinami, zato ta ni jasno izražena oziroma statistično značilna. Če izvzamemo vzorce maninih medov in upoštevamo samo akacijev, cvetlični, kostanjev ter lipov med, dobimo model  $y = 0,0005x + 0,0278$ , katerega vrednost  $R^2$  znaša 0,70 in  $R$  0,83. Omenjena zveza je močna, saj le 30 % variabilnosti skupnih beljakovin ni pojasnjene z deležem prolina, izračunana vrednost  $t$  ( $t = 11,22$ ) pa presega kritično vrednost ( $t_{kritično} = 2,00$ ), zato lahko to zvezo potrdimo kot statistično značilno.

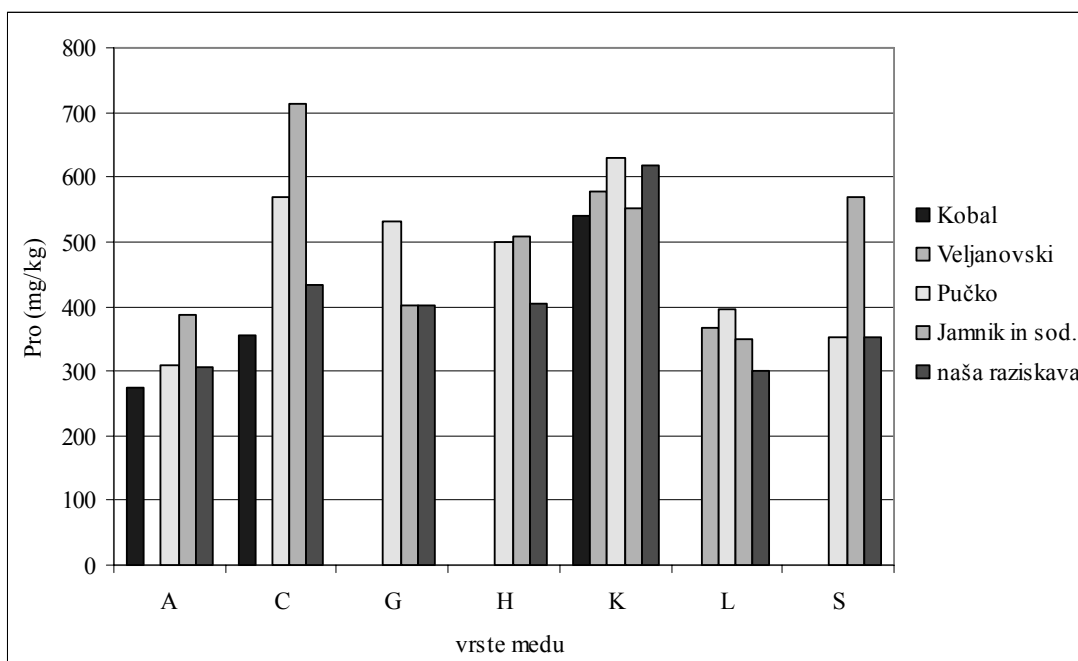


Slika 21. Zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina v vzorcih medu nektarnega in nektarno-maninega izvora



#### 4.6 Primerjava naših rezultatov z rezultati drugih domačih avtorjev

Za našo raziskavo je bila najpomembnejša primerjava z rezultati drugih domačih avtorjev (Kobal, 1990; Veljanovski, 1993; Pučko, 1995; Jamnik in sod., 2004), ki so zbrani v preglednici 5. Primerjavo prikazujejo stolpni grafikoni na sliki 21.



Slika 22. Povprečne vsebnosti prolina v različnih vrstah medu slovenskega porekla - primerjava z rezultati domačih avtorjev

Vsebnost prolina v naših vzorcih je najbolj primerljiva z ostalimi vsebnostmi prolina v akacijevem, kostanjevem in lipovem medu. Ujemanje vsebnosti prolina v cvetličnem, gozdnem in smrekovem medu je nekoliko slabše.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Eksperimentalni del raziskave je obsegal kvantitativno ovrednotenje v medu prevladujoče aminokisliline prolina in skupnih beljakovin v vzorcih medu, letnik 2004, sedmih najpogostejše zastopanih vrst pri nas: akacijevega, cvetličnega, gozdnega, hojevega, kostanjevega, lipovega in smrekovega. Temu je sledila statistična analiza, s katero smo preučili, ali sta opazovani spremenljivki vrstno značilna parametra, ob koncu pa smo ovrednotili tudi njune medsebojne zveze.

Prilagojena Oughova metoda za določanje vsebnosti prolina v medu je dolgotrajna, zahteva veliko ročnega dela, vendar je ob zahtevani natančnosti analitika ponovljivost rezultatov več kot 98 %. Menimo, da je metoda primerna za tovrstno analizo.

Delno avtomatizirana Kjeldahlova metoda, prilagojena za določanje majhnih količin skupnih beljakovin v medu, je prav tako relativno dolgotrajna, a prijaznejša za uporabo, saj je prisotnost analitika potrebna le v posameznih fazah večstopenjskega procesa. Ponovljivost rezultatov je več kot 98 %, iz česar ponovno sledi, da je metoda primerna.

Posamezna vsebnost prolina se je v analiziranih vzorcih medu nahajala v razponu od 197 do 776 mg/kg medu. Vse vrednosti so večje od priporočene spodnje meje 180 mg/kg medu, ki jo je določil Bogdanov in nato privzela tudi Mednarodna komisija za med (1999). Ne glede na ustreznost naših vzorcev menimo, da je enotna mejna vrednost za vsebnost prolina nesmiselna. Prolin namreč služi kot dodatni parameter kakovosti, pokazatelj zrelosti in pristnosti medu, a s tem postavlja medove različnih vrst v neenoten položaj. Iz naše raziskave je razvidno, da je vsebnost prolina v posameznih vzorcih akacijevega medu le malo nad priporočeno, med tem ko so največje vsebnosti prolina v kostanjemem medu približno štirikrat večje od priporočene. Predvidevamo, da bi bil nezrel ali načrtno potvorjen kostanjev med po tem kriteriju še vedno ustrezen.

S statistično analizo pri 5 % stopnji tveganja smo ugotovili, da se povprečne vsebnosti prolina nekaterih vrst medu med seboj značilno razlikujejo in glede na to uvrščajo v štiri razrede: a, b, c in d. Povprečna vsebnost prolina v akacijevem medu ( $307 \pm 75$  mg/kg) je edina, ki je hkrati uvrščena v dva razreda, a in b. To pomeni, da se glede na povprečno vsebnost prolina statistično ne razlikuje od lipovega medu ( $300 \pm 58$  mg/kg) v razredu a ter smrekovega medu ( $351 \pm 60$  mg/kg) v razredu b, čeprav razlike med slednjima obstajajo. Razred c si delijo gozdni ( $401 \pm 43$  mg/kg), hojev ( $404 \pm 52$  mg/kg) in cvetlični med ( $432 \pm 67$  mg/kg), katerih povprečne vrednosti prolina se med seboj prav tako ne razlikujejo.

Kostanjev med z izstopajoče visoko povprečno vsebnostjo prolina ( $617 \pm 97$  mg/kg) je edini, ki je uvrščen v svoj razred, razred d.

Povprečne vsebnosti prolina v medu ne nakazujejo pripadnosti nektarnim oziroma maninim izvorom medicīne. Nektarno-manina medova lipe in kostanja sta tista, v katerih smo določili najmanjšo in največjo povprečna vsebnost prolina. Po velikosti drugo najmanjšo in drugo največjo povprečno vsebnost prolina imata akacijev in cvetlični nektarni med, vmes pa se nahajajo manini medovi - smrekov, gozdni in hojev.

Primerjava med povprečnimi vsebnostmi prolina naše raziskave in podatki tujih avtorjev je omejena zaradi številnih dejavnikov, med katerimi izpostavljamo vpliv podnebnih danosti, različnost vegetacije, pasme čebel ter, v primeru maninih medov, še vrste sesajočih insektov. Glede na razpoložljive podatke lahko zapišemo, da povprečne vrednosti prolina v cvetličnih medovih znašajo od 354 mg/kg v alžirskem medu (Ouchemoukh in sod., 2006) do 852 mg/kg v medu iz Burkine Faso (Meda in sod., 2005), naša določitev (432 mg/kg) pa je med šestimi druga najmanjša. Izredno veliki razponi so opazni v skupini maninih medov, kjer največja povprečna vsebnost prolina dosega 2270 mg/kg in je bila določena v Maroku (Terrab in sod., 2002). Povprečne vsebnosti prolina, ki smo jih določili našim sortnim (hojev, smrekov) ter mešanim (gozdni) maninim medovom so v primerjavi z ostalimi najnižje. V kostanjevem medu, kjer je botanični izvor natančneje določen, je vsebnost prolina nekoliko bolj enotna, čeprav gre za primerjavo vzorcev širšega evropskega prostora (Španije, Italije, Madžarske, Slovenije) in severne Afrike (Maroka, Alžirije, Burkine Faso). Povprečna vsebnost prolina v našem kostanjevem medu letnika 2004 se nahaja med vsebnostma, določenima v madžarskem (1996) in maroškem medu (2002). Povprečna vsebnost prolina v našem akacijevem medu je približno 50 % večja od vrednosti, ki jih navaja madžarska študija (Foldhazi in sod., 1996) in skoraj 40 % večja od italijanskih podatkov (Conte in sod., 1998). Nasprotno pa je povprečna vsebnost prolina v naših vzorcih lipovega medu manjša za približno 40 % od madžarskih in 20 % od italijanskih rezultatov. Glede na to, da sodi Madžarska v isti podnebni pas kot Slovenija, bi pričakovali boljše ujemanje rezultatov, hkrati pa so velika odstopanja dokaz izredne specifičnosti te aminokislinae.

Rezultati naše raziskave so primerljivi s starejšimi domačimi rezultati, ki jih navajajo Kobal (1990), Veljanovski (1993), Pučko (1995) ter Jamnik in sod. (2004). Najboljše je ujemanje povprečnih vrednosti prolina v akacijevem, kostanjevem in lipovem medu. Ujemanje rezultatov za cvetlične medove je nekoliko slabše. V naših analizah smo določili manjše vsebnosti prolina od tistih, ki jih navajajo Pučko (1995) ter Jamnik in sod. (2004) za vse sorte, z izjemo kostanjevega medu. Če je aminokislina prolin dejansko parameter kakovosti medu, lahko zaključimo, da je bil letnik 2004, ki je predmet naše raziskave,

slabši od letnika 1994, o katerem piše Pučko in prav tako slabši od letnika 2002, ki ga navajajo Jamnik in sodelavci.

Ob poznavanju teoretičnega ozadja in znanem dejstvu, da je vsebnost prolina vrstno značilna, lahko interpretiramo posamezne vrednosti. Največjo vsebnost prolina v kostanjevem medu pripisujemo v prvi vrsti cvetnemu prahu, ki je vselej prisoten v velikih količinah, ne glede na to, ali je medicina pretežno nektarnega ali maninega izvora. Za cvetni prah namreč velja, da vsebuje do 35 % skupnih beljakovin (Rihar, 1998), med katerimi prevladuje aminokislina prolin (Gonzalez Paramas in sod., 2006). Relativno veliko prolina je tudi v cvetličnem medu. Menimo, da je vsebnost le-tega pogojena tako s prisotnostjo cvetnega prahu, kot tudi sestavo cvetličnega nektarja, saj naj bi po eni izmed teorij (Sporns, 1992) čebele izločale prolin z namenom zniževanja visokega osmotskega tlaka medicine, s tem pa olajšale vnos encimov. Hkrati predvidevamo, da omenjena hipoteza pojasnjuje tudi nasprotno majhno vsebnost prolina v lipovem in akacijevem medu. Za čebeljo pašo na rastlini akaciji naj opomnimo, da je po količini nektarja ena najbolj izdatnih, vendar izredno skromna s pelodom. V akacijevem medu zato ne moremo pričakovati povečanja ali zmanjšanja količine prolina na račun cvetnega prahu. Lahko pa vpeljemo še tretjo teorijo, ki pravi, da sta kvantiteta medicine in vsebnost prolina oziroma kakovost pridelanega medu v obratnosorazmerju (von der Ohe, 1991). Ker so si povprečne vrednosti prolina treh opazovanih maninih medov podobne in nekako v sredini glede na ostale vrste medu, predvidevamo, da ušice in kaparji v naših gozdovih izločajo primerljive deleže prolina oziroma, da glede na vrsto insektov in rastlin gostiteljic ni bistvenih razlik v osmotskih lastnostih mane.

Vsebnost skupnih beljakovin analiziranih vzorcev medu se nahaja znotraj intervalnega območja od 0,13 do 0,49 g/100 g. Intervali za večino opazovanih vrst medu se med seboj prekrivajo, vsebnost skupnih beljakovin gozdnega medu pa zavzema kar 80 % celotnega območja. S frekvenčnimi histogrami smo ugotovili, da se posamezne določitve vsebnosti skupnih beljakovin glede na pripadajočo vrsto ne porazdeljujejo normalno, t.j. v skladu z Gaussovo krivuljo. Za gozdni med, ki se je izkazal kot najbolj variabilen (KV = 31 %), smo ugotovili, da bi bila mediana (0,26 g/100 g) najverjetneje primernejše merilo srednje vrednosti kot aritmetična sredina (0,30 g/100 g). Ostali koeficienti variabilnosti se nahajajo med 9 % v kostanjevem medu in 24 % v cvetličnem medu. Izrazito nehomogenost vzorcev smo tudi statistično potrdili, kar pomeni, da na osnovi povprečne vsebnosti skupnih beljakovin v medu ni moč sklepati na vrsto.

Rezultate vsebnosti skupnih beljakovin v medu smo primerjali le s podatki Küçüka in sodelavcev (2006). Povprečna vsebnost beljakovin v naših cvetličnih vzorcih je večja za 52 %, pri kostanjevem medu pa presega vrednosti turške študije za 55 %.

Ker smo prolin določali neodvisno in kot del skupnih beljakovin, smo predpostavili, da predstavlja neodvisno spremenljivko, skupne beljakovine pa od njega odvisno spremenljivko. Slednja trditev pomeni, da povečanje deleža prolina, ki predstavlja do 85 % vseh aminokislin v medu (White, 1979; Gonzalez Paramas in sod., 2006), doprinese k povečanju vsebnosti skupnih beljakovin. Eksperimentalni podatki naših vzorcev so potrdili, da se sorazmerje med povprečnimi vsebnostmi prolina in skupnih beljakovin znotraj različnih vrst medu praviloma ohranja, vendar ne v celoti. Tako je bila med maninimi medovi povprečna vsebnost prolina v hojevem medu največja, vsebnost skupnih beljakovin pa najmanjša. Manjše obratnosorazmerje je opazno tudi pri akacijevem in lipovem medu.

Z regresijsko, korelacijsko in statistično analizo smo ovrednotili posamezne linearne zveze med opazovanima spremenljivkama. Splošna zveza med neodvisno spremenljivko prolinom in odvisno spremenljivko skupnimi beljakovinami, ki je vključevala 101 vzorcev medu je sicer statistično značilna pri  $\alpha < 0,01$ , vendar vsebnost prolina pojasnjuje le 47 % variabilnosti skupnih beljakovin, koeficient korelacije ( $R = 0,68$ ) pa dodatno potrjuje, da je zveza zmerno močna in zato neprimerna. Nadaljnje raziskave so pokazale, da gre slabo izraženo oziroma statistično neznačilno povezanost splošne zveze pripisovati maninim medovom.

Linearna zveza maninih medov, ki vključuje posamezne določitve vsebnosti prolina in skupnih beljakovin v gozdnem, hojevem in smrekovem medu namreč ne obstaja ( $R = 0,18$ ), determinacijski koeficient regresijskega modela pa nam pove, da bi na osnovi prolina uspeli napovedati le 3 % variabilnosti skupnih beljakovin.

Statistično značilne in hkrati močne linearne zveze med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina smo potrdili za nektarne in nektarno-manine medove. Najmočnejša je zveza, ki zajema kostanjev in lipov med nektarno-maninega izvora ( $R = 0,96$ ), nekoliko manj močna, a še vedno primerna, pa je zveza akacijevega in cvetličnega nektarnega medu ( $R = 0,76$ ).

Linearne zveze med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina za posamezno vrsto medu niso dale pričakovanih rezultatov. Najslabše sta se izkazali vrsti gozdnega ( $R = 0,11$ ) in smrekovega medu ( $R = 0,12$ ), kjer vsebnost prolina pojasnjuje le 1 do 2 % variabilnosti skupnih beljakovin, iz česar sledi, da ostaja kar 99 oziroma 98 % variabilnosti neodvisne spremenljivke nepojasnjene. Zveza med vsebnostjo prolina in skupnih beljakovin v cvetličnem medu obstaja, a je šibka ( $R = 0,37$ ), v akacijevem ( $R = 0,50$ ) in hojevem ( $R = 0,51$ ) je zmerna, v lipovem medu pa se nahaja ravno na meji med zmerno in močno ( $R = 0,70$ ). Zveza lipovega medu je za razliko od predhodnih statistično značilna pri  $\alpha < 0,05$ . Med

sedmimi vrstno značilnimi zvezami se je le zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina v kostanjevem medu izkazala kot močna ( $R = 0,78$ ) in statistično značilna hkrati.

V dosegljivi literaturi nismo zasledili prispevka, ki bi preučeval zvezo med beljakovinami in prolinom v medu. Regresijski modeli, determinacijski in korelacijski koeficienti ter ocene statističnih značilnosti ostajajo predmet tega diplomskega dela.

V vseh primerih je nezanesljivost regresijskih modelov oz. zvez znatna, saj so bili določeni na relativno majhnem številu statističnih enot, zato njihovo uporabo odsvetujemo. Ne le, da bi bilo potrebno v raziskavo vključiti več vzorcev, pomembno je, da bi modele osnovali na velikem številu vzorcev različnih letnikov. Zavedamo se, da imajo vremenski pogoji (predvsem padavine, temperatura in veter) posredno velik vpliv na obe analizirani spremenljivki in posledično na njuno zvezo.

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi eksperimentalnih določitev prolina in skupnih beljakovin v sedmih vrstah medu ter rezultatov regresijske, korelacijske in statistične analize le-teh, povzemamo naslednje sklepe:

- Metoda za določanje vsebnosti aminokislina prolina v medu, ki jo navaja Mednarodna komisija za med (1999), je primerna, saj je ponovljivost njenih rezultatov več kot 98 %. Enako velja tudi za Kjledahlovo delno avtomatizirano metodo za določanje vsebnosti skupnih beljakovin.
- Vsi analizirani vzorci vsebujejo več kot 180 mg/kg prolina, zato ustrezajo priporočilu Mednarodne komisije za med. Sklepamo, da so nepotvorjeni in zreli, torej primerne kakovosti.
- Posamezne vrste medu se glede na povprečno vsebnost prolina med seboj statistično značilno razlikujejo ( $\alpha < 0,05$ ) in jih uvrščamo v štiri razrede. Povprečna vsebnost prolina v kostanjevem medu (617 mg/kg) je največja in se razlikuje od ostalih šestih vrst medu, uvrščamo jo v razred d. Povprečne vsebnosti prolina v gozdnem (401 mg/kg), hojevem (404 mg/kg) in cvetličnem medu (432 mg/kg) se med seboj statistično ne razlikujejo, zato si delijo isti razred (c), se pa razlikujejo od ostalih treh razredov. Povprečni vsebnosti prolina v lipovem (300 mg/kg) in smrekovem medu (351 mg/kg) se med seboj statistično značilno razlikujeta, zato ju uvrščamo v ločena razreda a oziroma b. Akacijev med se glede na povprečno vsebnost prolina (307 mg/kg) razlikuje le od vrst medu, ki pripadajo razredu c in d.
- Povprečne vsebnosti prolina so primerljive s slovenskimi podatki drugih letnikov, močno pa se razlikujejo od tujih.

- Vsebnost skupnih beljakovin v medu je izredno variabilen parameter, ki se znotraj pripadajoče vrste ne porazdeljuje v skladu z normalno Gaussovo krivuljo.
- Povprečne vsebnosti skupnih beljakovin sedmih vrst medu se med seboj ne razlikujejo statistično značilno.
- Večina analiziranih vrst medu nakazuje sorazmerje med vsebnostjo prolina in skupnih beljakovin v medu, kar pomeni, da je pri večji količini prolina opazno tudi povečanje deleža skupnih beljakovin.
- Splošni regresijski model, ki opisuje zvezo med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina ne glede na vrsto oziroma poreklo medu, je statistično značilen, vendar je zveza le zmerno močna in zato njegove uporabe ne priporočamo. Močna in statistično značilna sta regresijska modela, ki opisujeta zvezo med prolinom in skupnimi beljakovinami medov nektarnega izvora, to sta akacijev ter cvetlični ( $R = 0,76$ ) in nektarno-maninega izvora, kamor uvrščamo kostanjev ter lipov med ( $R = 0,96$ ).
- Slabo ohranjanje razmerja med deležem prolina in skupnih beljakovin v maninih medovih ( $R = 0,18$ ) onemogoča nastanek enotnega regresijskega modela, ki bi zajemal vse vrste medov. Slednje potrjuje močen ( $R = 0,83$ ) in statistično značilen model, ki vključuje vsebnosti prolina in skupnih beljakovin v vseh vrstah medu, z izjemo medov maninega izvora, to so gozdni, hojev in smrekov.
- Med sedmimi preučevanimi vrstami medu je močna ( $R = 0,78$ ) in hkrati statistično značilna le zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina v kostanjevem medu.
- Zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina lipovega medu je statistično značilna, a je vrednost korelacijskega koeficienta ( $R = 0,70$ ) na meji med zmerno in močno povezanostjo.
- Vsi modeli, zlasti pa modeli za sortne medove, so pridobljeni na premajhnem številu vzorcev, zato njihove uporabe ne priporočamo.

## 6 POVZETEK

Osnovni namen diplomskega dela je bil ovrednotiti delež prevladujoče aminokislina prolina in skupnih beljakovin v najpogosteje zastopanih vrstah medu slovenskega porekla, ter preučiti, ali sta omenjeni spremenljivki vrstno značilna parametra. Ker predstavlja prolina del skupnih beljakovin, smo preverili tudi ohranjanje razmerja med opazovanima spremenljivkama, njuno zvezo pa opisali z linearnimi regresijskimi modeli za posamezno vrsto oziroma glede na izvor.

Analize smo opravili na 101 vzorcih medu letnika 2004, sedmih različnih vrst: akacijevem, cvetličnem, gozdnem, hojevem, kostanjevem, lipovem in smrekovem. Vrste medu so bile predhodno določene s senzorično analizo in merjenjem SEP. Pelodna preiskava ni bila opravljena.

Vsebnost aminokislina prolina smo določali spektrofotometrično, z Oughovo metodo prilagojeno po Bogdanovu, po navodilih Mednarodne komisije za med (1999). Njena ponovljivost je 98 %, kar smo preverili z večkratnim določanjem prolina v testnem vzorcu medu.

Vsebnost skupnih beljakovin v medu smo ovrednotili z uporabo delno avtomatizirane Kjeldahlove metode, katere ponovljivost je bila prav tako več kot 98 %.

Intervalno območje vseh določitev prolina se nahaja med 197 mg/kg in 776 mg/kg. Ker vsebnost prolina v vseh vzorcih presega spodnjo priporočeno vrednost 180 mg/kg, lahko zaključimo, da so analizirani medovi zreli in pristni oz. nepotvorjeni.

Povprečne vsebnosti prolina nekaterih vrst medu se med seboj statistično značilno razlikujejo pri stopnji tveganja  $\alpha < 0,05$ . Povprečna vsebnost prolina v kostanjevem medu (617 mg/kg) se razlikuje od ostalih šestih povprečnih vrednosti. Povprečja vsebnosti prolina v gozdnem (401 mg/kg), hojevem (404 mg/kg) in cvetličnem medu (432 mg/kg) se prav tako razlikujejo od ostalih, ne pa tudi med seboj. Akacijev med (307 mg/kg) se glede na povprečno vsebnost prolina ne razlikuje od lipovega (300 mg/kg) in smrekovega medu (351 mg/kg), med tem ko je razlika med slednjima statistično značilna.

Primerjava vsebnosti prolina v naših vzorcih s podatki tujih avtorjev je slaba in potrjuje predvsem botanično ter geografsko specifičnost te aminokislina. Nasprotno pa se naši rezultati, zlasti za akacijev, lipov in kostanjev med, zelo dobro ujemajo z rezultati v domači literaturi, ki jih navajajo Kobal (1990), Veljanovski (1993), Pučko (1995) ter Jamnik in sodelavci (2004).



Eksperimentalni podatki vseh določitev vsebnosti skupnih beljakovin se nahajajo med vrednostma 0,13 in 0,49 g/100 g.

Porazdelitev posameznih določitev skupnih beljakovin znotraj pripadajočih vrst ni v skladu z normalno Gaussovo krivuljo. Koeficienti variabilnosti, ki znašajo od 9 % v kostanjevem medu do 31 % v gozdnem, nakazujejo velike razlike v relativni variabilnosti beljakovin med različnimi vrstami medu. Izrazito nehomogenost vzorcev je potrdil tudi statistični test, iz česar sledi, da na osnovi določene vsebnosti skupnih beljakovin v vzorcu ni moč sklepati na vrsto medu.

Vsebnost prolina, kot ene izmed aminokislin, ki smo jo določali enkrat neodvisno, drugič pa v sklopu skupnih beljakovin, smo pri linearni regresijski analizi izbrali za neodvisno spremenljivko, vsebnost skupnih beljakovin pa od nje odvisno spremenljivko.

Na podlagi regresijske, korelacijske in statistične analize smo ugotovili, da je splošna zveza med vsebnostma skupnih beljakovin in prolina vseh 101 vzorcev medu sicer statistično značilna pri 0,01 stopnji tveganja, vendar zmerno močna ( $R = 0,68$ ) in zato neuporabna.

Med regresijskimi modeli za posamezno vrsto je le model kostanjevega medu:  $y = 0,0003x + 0,188$  primeren, kar pomeni, da je zveza močna ( $R = 0,78$ ) in statistično značilna hkrati. Regresijski model lipovega medu:  $y = 0,0004x + 0,061$  je prav tako statistično značilen, a je stopnja povezanosti mejna in sicer med zmerno in močno ( $R = 0,70$ ). Ker sta bila oba modela določena na relativno majhnem številu vzorcev, priporočamo za potrditev teh rezultatov nadaljnje analize.

Linearna zveza med opazovanima spremenljivkama v smrekovem ( $R = 0,11$ ) in gozdnem medu ( $R = 0,12$ ) ni potrjena, saj naj bi vsebnost prolina pojasnjevala le 1-2 % variabilnosti skupnih beljakovin. Stopnja povezanosti regresijskega modela za cvetlični med ( $R = 0,37$ ) je šibka in za akacijev ( $R = 0,50$ ) ter hojev ( $R = 0,51$ ) med zmerna. Rezultati, ki smo jih dobili za gozdni in cvetlični med ne presenečajo, saj je za vse predstavnike mešanih medov značilna pestra in variabilna sestava.

Pri preučevanju zveze med vsebnostma skupnih beljakovin in prolina glede na nektarni, manin ali nektarno-manin izvor medu smo ugotovili, da so manini medovi (gozdni, hojev in smrekov) tisti, ki manjšajo moč in statistično značilnost splošne zveze. Vsebnost prolina in beljakovin v maninih medovih ne kaže medsebojne povezanosti ( $R = 0,18$ ). Kot močni in statistično značilni sta se izkazali zvezi medov nektarnega izvora ( $R = 0,76$ ), med katere uvrščamo akacijev in cvetlični med ter nektarno-maninega izvora ( $R = 0,96$ ), kamor spadata kostanjev in lipov med. Tudi zveza, ki vključuje vse nektarne in nektarno-manine

medove je močna in statistično značilna ( $R = 0,83$ ). Na podlagi slednje je moč razlikovati le povsem manine medove od vseh ostalih. Ker je bila določena na relativno veliki statistični masi ( $n = 57$ ), ima omenjena zveza med vsemi največji praktični pomen.

Iz povprečne vsebnosti prolina in skupnih beljakovin v posamezni vrsti medu ne moremo sklepati o nektarnem ali maninem izvoru medicine, pač pa lahko v določenih primerih napovemo vrstno pripadnost v ožjem pomenu besede. Kot smo že omenili, se je vsebnost prolina v nekaterih vrstah izkazala kot statistično značilna, ne pa tudi vsebnost skupnih beljakovin.

Prispevek naše raziskave vidimo v boljšem poznavanju dušikovih spojin v slovenskih sortnih in mešanih medovih.

Rezultati o vsebnosti prolina pripomorejo k lažji karakterizaciji medov. Podobno velja za izdelane regresijske modele, ki opisujejo zvezo med vsebnostma prolina in skupnih beljakovin. Vsebnost skupnih beljakovin se je izkazala kot izredno variabilen parameter, ki ga ni moč povezati z vrsto ali poreklom medu.

Menimo, da je uporabnost naše študije sicer omejena, vendar podaja realno sliko. Z izločanjem posameznih določitev bi sicer lahko ustvarili zanimivejše in statistično značilnejše rezultate, a to ni bil naš namen.

## 7 VIRI

Abdel-Aal E. S. M., Ziena H. M., Youssef M M. 1993. Adulteration of honey with high-fructose corn syrup: detection by different methods. *Food Chemistry*, 48: 209-212

Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinsko informatiko: 27-39, 44-48, 113-122, 157

Anklam E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63, 3: 549-562

Azeredo L. C., Azeredo M. A. A., Souza S. R., Dutra V. M. L. 2002. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis Mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, 80: 249-254

Bauer L., Kohlich A., Hirschwehr R., Siemann U., Ebner H., Scheiner O., Kraft D., Ebner C. 1996. Food allergy to honey: pollen or bee products? Characterisation of allergenic proteins in honey by means of immunoblotting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97, 1, 1: 65-73

Berger B., Crailsheim K., Leonhard B. 1997. Proline, leucine and phenylalanine metabolism in adult honeybee drones (*Apis mellifica carnica* Polm). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27, 6: 587-593

Bogdanov S., Lüllman C., Martin P., von der Ohe W., Russmann H., Vorwohl G., Presano Oddo L., Sabatini A. G., Marcazzan G. L., Piro R., Flamini C., Morlot M., Lheretier J., Borneck R., Marioleas P., Tsigouri A., Kerkvliet J., Ortiz A., Ivanov T., D'Arcy B., Mossel B., Vit P. 1999. Honey quality and international regulatory standards: Review of the International Honey Commission. Bern, Swiss Bee Research Centre (1999) [http://www.apis.admin.ch/host/doc/pdfhoney/HonigkontrIntern\\_e.pdf](http://www.apis.admin.ch/host/doc/pdfhoney/HonigkontrIntern_e.pdf) (februar 2006): 7 str.

Božič J. 1998. Nektarne paše. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 146-161

Božič J. 1998. Življenje čebel. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 49-60

Božnar A., Senegačnik J. 1998. Med. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 376-413

Conte L. S., Miorini M., Giomo A., Bertacco G., Zironi R. 1998. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1844-1849

Council directive 2001/110/EC. 2002. *Official Journal of the European Communities*, L 10: 47-52

Diez M. J., Andres C., Terrab A. 2004. Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 39: 167-176

Földhazi G., Amtmann M., Fodor P., Ittzes A. 1996. The physico-chemical properties and composition of honeys of different botanical origin. *Acta Alimentaria*, 25, 3: 237-256

Friedman M. 2004. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Food Chemistry*, 52: 385-406

Golob T., Bertoncej J., Škrabanja V. 2002. Sensory characteristics of Slovenian honey. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani: Kmetijstvo*, 79, 2: 381-389

Golob T., Plestenjak A. 2000. *Analiza kakovosti živil*. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Oddelek za živilstvo: 96-98

Gonzalez Paramas A. M., Gomez Barez J. A., Cordon Marcos C., Garcia-Villanova R.J., Sanchez Sanchez J. 2006. HPLC-fluorimetric method for amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry*, 95: 148-156

Gregorc A. 1998. Zgradba in delovanje čebeljega telesa. V: *Od čebele do medu*. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 24-48

Gregorc A. 2002. Medonosna čebela in osnove čebelarjenja. Ljubljana, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani: 19-36, 90-95, 114-120

Hermosin I., Chicon R. M., Cabezudo M. D. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83: 263-268

Iglesias M. T., Lorenzo C., Carmen Polo M., Martin-Alvarez P. J., Pueyo E. 2004. Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 84-89

Jamnik M., Bertonec J., Golob T. 2004. Content of proline in Slovenian honeys. V: CEFood Congress; congress proceedings. 2<sup>nd</sup> Central European Congress on Food, Budapest, 26-28 apr. 2004. Budapest, Central Food Research Institute, Complex Committee on Food Science of the Hungarian Academy of Sciences: 4 str.

Joshi S. R., Pechhacker H., Willam A., von der Ohe W. 2000. Physico-chemical characteristics of *Apis dorsata*, *A. Cerana* and *A. Mellifera* honey from Chitwan district, central Nepal. *Apidologie*, 31: 367-375

Kobal S. 1990. Ugotavljanje pristnosti medu. Diplomski naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 36-36

Košmelj B., Arh F., Urbanc D., Ferligoj A., Omladič M. 2002. Statistični terminološki slovar. Razširjena izdaja z dodanim slovarjem ustreznikov v angleščini. 1. izdaja. Ljubljana, Študentska založba: 15, 53, 54

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 48-52

Küçük M., Kolaylı S., Karaoğlu Ş., Baltacı C., Ulusoy E., Candan F. 2006. Biological activities and chemical composition of three honey of different types from Anatolia. *Food Chemistry*: sprejeto v tisk, online december 2005: 9 str.

Lehninger A. L. 1988. Principles of biochemistry. 6<sup>th</sup> printing. New York, Worth Publishers, Inc.: 95-115, 121-141

Marshall T., Williams K. M. 1987. Electrophoresis of honey: characterization of trace proteins from a complex biological matrix by silver staining. *Analytical Biochemistry*, 167: 301-303

Meda A., Euloge Lamien C., Romito M., Millogo J., Germaine Nacoulma O. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91: 571-577

Meda A., Lamien C. E., Millogo J., Romito M., Nacoulma O. G. 2005. Physicochemical analyses of Burkina Fasan honey. *Acta Veterinaria Brno*, 74: 147-152

Nelson D. L., Cox M. M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed. New York, W. H. Freeman and Company: 75-94

Ouchemoukh S., Louaileche H., Schweitzer P. 2006. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Chemistry*, sprejeto v tisk, online oktober 2005: 7 str.

Pihlar B. 2001. Osnove analize kemije, *Zapiski predavanj*, II. del. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani: 213-222

Plestenjak A. 1999. Fizikalno kemijske lastnosti medu, zakonodaja, vzorčenje. V: *Pridelava in kontrola medu v okviru kolektivne blagovne znamke za slovenski med*. Golob T. (ur.). Ljubljana, Čebelarstva zveza Slovenije in Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 14-17

Pravilnik o medu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 31: 3611-3612

Pravilnik o ocenjevanju medu. 2002. Lukovica, Čebelarstva zveza Slovenije (oktober 2002) [http://www.slovenski-cebelarji.com/html/ocenjevanje\\_medu.htm](http://www.slovenski-cebelarji.com/html/ocenjevanje_medu.htm) (februar 2006): 21 str.

Proline. 1998. Berlin, Institute of Chemistry (februar 1998) [http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/bio/aminoacid/prolin\\_en.html](http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/bio/aminoacid/prolin_en.html) (marec 2006): 1 str.

Pučko A. 1995. Kakovostni parametri slovenskega sortnega medu. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 27-27

Sanchez M. P., Huidobro J. F., Mato I., Muniategui S., Sancho T. 2001. Correlation between proline content of honeys and botanical origin. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 97, 5: 171-175

Seljak J. 1996. *Statistične metode*. Ljubljana, Visoka upravna šola Univerze v Ljubljani: 197-199

Serrano S., Villarejo M., Espejo R., Jodral M. 2004. Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of citrus and eucalyptus honeys by discriminant analysis. *Food Chemistry*, 87: 619-625

Slovar slovenskega knjižnega jezika. 1995. Bajec A. (ur.). 2. izd. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 533-533

Sporns P. 1992. Honey analysis. V: *Encyclopedia of food science and technology*. Vol. 2. Hui Y. H. (ed.). New York, J. Wiley & Sons: 1417-1422

SPSS software for Windows. Version 11.0.0. 2001. Chicago, SPSS: software

Šivic F. 1998. Manine paše. V: *Od čebele do medu*. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 162-177

Terrab A., Diez M. J., Heredia F. J. 2002. Characterisation of monofloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*, 79: 373-379

Terrab A., Diez M. J., Heredia F. J. 2003. Palynological, physico-chemical and colourcharacterisation of Moroccan honeys: III. Other unifloral honey types. *International Journal of Food Science and Technology*, 38: 395-402

Veljanovski V. 1993. Sladkorji, aminokisliline in drugi kakovostni parametri lipovega, žajbljevega in kostanjevega medu. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 43-43

von der Ohe W., Dustmann J. H., von der Ohe K. 1991. Prolin als kriterium der reife des honigs. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 87, 12: 383-385

White J. W. 1978. Honey. *Advances in Food Research*, 24: 287-374

## ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorici prof. dr. Tereziji Golob za strokovno pomoč ter vzpodbudne in prijazne besede, ki sem jih bila deležna med nastajanjem te diplomske naloge.

Za vodstvo med praktičnim delom in številne koristne nasvete pri pisanju se iskreno zahvaljujem delovni mentorici Mojci Jamnik.

V laboratoriju mi je pomagala tehnična sodelavka ga. Elena Kenda Majerič, ki me je sprejela za prijateljico in z menoj delila življenjske modrosti.

Hvala mladi raziskovalki Urški Doberšek, asistentki Jasni Bertonec ter Katedri za vrednotenje živil v celoti za vaš prispevek, prijaznost in resnično gostoljubje.

Knjižnično-informacijskemu osebju, ge. Ivici Hočevar in ge. Lidiji Slemenik, se zahvaljujem za pomoč pri zbiranju in urejanju literature. Njuno delo v neidealnih pogojih je dokaz, da je Oddelek za živilstvo v službi Ljudi za Ljudi – študente.

Ob koncu se spominjam mojih domačih. Hvala staršem za življenje, posebej mami Biserki, ki je temu življenju vdihnila tudi dušo in bila vedno moja zaupnica ter najboljša prijateljica.

Stari mami Ani, ker me je podpirala, skrbela zame in bila v vseh pogledih moja druga mama, prav tako hvala.

Nenazadnje gre zahvala mojemu fantu Mitji, ki z menoj vztraja že 7 let. Njegova pomoč med študijem in predvsem ob zaključku je neprecenljiva. Mitja, najlepša hvala!

... nevidni Roki, ki usmerja ...



## PRILOGE

Priloga A 1. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih akacijevega medu

vzorec	PROLIN (mg/kg)			BELJAKOVINE (g/100 g)		
	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$
A1	343	346	345	0,163	0,163	0,163
A2	340	327	334	0,880	0,200	0,194
A3	352	355	354	0,175	0,175	0,175
A4	230	227	229	0,150	0,150	0,150
A5	197	197	197	0,144	0,150	0,147
A6	355	355	355	0,175	0,169	0,172
A7	311	320	316	0,131	0,131	0,131
A8	269	275	272	0,163	0,169	0,166
A9	324	333	329	0,163	0,163	0,163
A10	293	293	293	0,138	0,144	0,141
A11	208	207	208	0,125	0,131	0,128
A12	228	234	231	0,131	0,131	0,131
A13	262	265	264	0,188	0,188	0,188

Priloga A 2. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih cvetličnega medu

vzorec	PROLIN (mg/kg)			BELJAKOVINE (g/100 g)		
	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$
C1	434	440	437	0,425	0,419	0,422
C2	374	370	372	0,175	0,175	0,175
C3	412	413	413	0,306	0,319	0,313
C4	344	336	340	0,344	0,344	0,344
C5	452	448	450	0,425	0,412	0,419
C6	519	523	521	0,362	0,369	0,366
C7	446	450	448	0,275	0,275	0,275
C8	492	487	489	0,331	0,331	0,331
C9	481	474	477	0,356	0,356	0,356
C10	357	363	360	0,225	0,225	0,225
C11	392	397	394	0,312	0,319	0,316
C12	310	307	308	0,200	0,200	0,200
C13	503	508	505	0,300	0,294	0,297
C14	534	534	534	0,235	0,235	0,235
C15	439	435	437	0,325	0,319	0,322

Priloga A 3. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih gozdnega medu

vzorec	PROLIN (mg/kg)			BELJAKOVINE (g/100 g)		
	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$
G1	383	399	391	0,387	0,387	0,387
G2	386	388	387	0,494	0,488	0,491
G3	403	403	403	0,394	0,394	0,394
G4	448	452	450	0,431	0,438	0,435
G5	371	379	375	0,250	0,250	0,250
G6	439	430	435	0,231	0,231	0,231
G7	417	423	420	0,200	0,194	0,197
G8	322	322	322	0,244	0,244	0,244
G9	345	345	345	0,206	0,206	0,206
G10	459	456	458	0,275	0,262	0,269
G11	347	345	346	0,281	0,281	0,281
G12	404	402	403	0,250	0,244	0,247
G13	458	464	461	0,262	0,262	0,262
G14	407	419	413	0,262	0,256	0,259

Priloga A 4. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih hojjevega medu

vzorec	PROLIN (mg/kg)			BELJAKOVINE (g/100 g)		
	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$
H1	428	422	425	0,244	0,244	0,244
H2	464	473	469	0,243	0,231	0,237
H3	391	402	397	0,219	0,219	0,219
H4	506	506	506	0,262	0,269	0,266
H5	397	396	397	0,181	0,181	0,181
H6	449	449	449	0,344	0,338	0,341
H7	444	431	438	0,356	0,356	0,356
H8	394	400	397	0,244	0,244	0,244
H9	393	405	399	0,256	0,256	0,256
H10	337	333	335	0,213	0,206	0,210
H11	425	431	428	0,252	0,269	0,261
H12	401	407	404	0,194	0,200	0,197
H13	334	331	333	0,219	0,219	0,219
H14	357	355	356	0,219	0,219	0,219
H15	401	407	404	0,256	0,244	0,250

Priloga A 5. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih kostanjevega medu

vzorec	PROLIN (mg/kg)			BELJAKOVINE (g/100 g)		
	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$
K1	593	597	595	0,344	0,338	0,341
K2	773	779	776	0,381	0,375	0,378
K3	605	600	603	0,375	0,375	0,375
K4	470	476	473	0,306	0,312	0,309
K5	616	624	620	0,312	0,325	0,319
K6	548	538	543	0,306	0,306	0,306
K7	712	694	703	0,387	0,375	0,381
K8	454	459	457	0,312	0,325	0,319
K9	669	650	660	0,338	0,356	0,347
K10	755	731	743	0,400	0,400	0,400
K11	619	617	618	0,381	0,387	0,384
K12	614	612	613	0,369	0,250	0,310

Priloga A 6. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih lipovega medu

vzorec	PROLIN (mg/kg)			BELJAKOVINE (g/100 g)		
	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$
L1	303	299	301	0,169	0,169	0,169
L2	238	236	237	0,175	0,169	0,172
L3	263	262	263	0,188	0,194	0,191
L4	251	248	250	0,188	0,194	0,191
L5	336	324	330	0,181	0,181	0,181
L6	399	396	398	0,225	0,231	0,228
L7	392	386	389	0,244	0,237	0,241
L8	226	223	225	0,131	0,138	0,135
L9	284	300	292	0,169	0,175	0,172
L10	306	305	306	0,156	0,156	0,156
L11	372	372	372	0,175	0,175	0,175
L12	250	251	251	0,125	0,125	0,125
L13	227	228	228	0,144	0,144	0,144
L14	322	313	318	0,163	0,163	0,163
L15	339	337	338	0,175	0,175	0,175

Priloga A 7. Vsebnost prolina in skupnih beljakovin v vzorcih smrekovega medu

vzorec	PROLIN (mg/kg)			BELJAKOVINE (g/100 g)		
	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$	1. paralelka	2. paralelka	$\bar{x}$
S1	301	308	305	0,250	0,250	0,250
S2	334	329	332	0,381	0,369	0,375
S3	354	353	354	0,294	0,300	0,297
S4	230	231	231	0,181	0,181	0,181
S5	292	293	293	0,262	0,256	0,259
S6	362	366	364	0,306	0,306	0,306
S7	359	366	363	0,312	0,306	0,309
S8	331	323	327	0,231	0,225	0,228
S9	316	320	318	0,381	0,381	0,381
S10	429	424	427	0,275	0,269	0,272
S11	497	492	495	0,262	0,269	0,266
S12	351	355	353	0,262	0,256	0,259
S13	337	345	341	0,244	0,244	0,244
S14	379	380	380	0,194	0,200	0,197
S15	386	391	389	0,237	0,237	0,237

LEGENDA:

Vrste medu:

- A akacijev med
- C cvetlični med
- G gozdni med
- H hojev med
- K kostanjev med
- L lipov med
- S smrekov med

Številka vzorca:

Številka za oznako vrste medu je zaporedna številka na Katedri za vrednotenje živil.

Priloga A 8. Vsebnost prolina v vzorcu medu 115

vzorec 115				
zaporedni dan	št. analize	1.	2.	$\bar{x}$
		paralelka	paralelka	
Pro (mg/kg)				
1. dan	1	326	329	328
	2	330	332	331
	3	323	335	329
	4	326	326	326
	5	330	329	330
	6	333	338	336
2. dan	1	329	339	334
	2	333	335	334
	3	333	336	335
	4	333	339	336
	5	325	330	328
	6	322	342	332
3. dan	1	339	334	337
	2	329	336	333
	3	328	322	325
	4	322	329	326
	5	328	337	333
	6	319	341	330
4. dan	1	344	342	343
	2	341	342	342
	3	339	334	337
	4	333	334	334
	5	347	336	342
	6	333	347	340
5. dan	1	333	342	338
	2	345	348	347
	3	333	339	336
	4	340	340	340
	5	339	344	342
	6	350	340	345
6. dan	1	342	340	341
	2	324	334	329
	3	333	337	335
	4	327	328	328
	5	331	345	338
	6	336	340	338

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška GOLOB

**VSEBNOST PROLINA IN BELJAKOVIN V  
RAZLIČNIH VRSTAH SLOVENSKEGA MEDU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana 2006