

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Alja KNEGO

VPLIV POGOJEV SKLADIŠČENJA NA VSEBNOST HMF V MEDU

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF STORAGE CONDITIONS ON HMF CONTENT IN
HONEY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Terezija Golob, za somentorico dr. Jasna Bertoncelj in za recenzentko prof. dr. Tatjana Košmerl.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Somentorica: doc. dr. Jasna Bertoncelj

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Alja Knego

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 638.162:664.8.03:543.2/9 (043)=163.6
KG	med/HMF/skladiščenje medu/senzorične lastnosti/absorpcijski spektri/ fizikalno-kemijske lastnosti/skladiščenje na svetlobi/svetloba/skladiščenje v temi
AV	KNEGO, Alja
SA	GOLOB, Terezija (mentorica)/BERTONCELJ, Jasna (somentorica)/ KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2012
IN	VPLIV POGOJEV SKLADIŠČENJA NA VSEBNOST HMF V MEDU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 61 str., 12 pregl., 12 sl., 10 pril., 57 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Namen naloge je bil ugotoviti vpliv osemnajstmesečnega skladiščenja v medu na svetlobi oz. v temi na vsebnost hidroksimetilfurfurala (HMF). Analizirali smo osem vrst slovenskega medu, skupno 24 vzorcev. V svežih vzorcih medu smo analizirali vsebnosti vode, pepela, prostih kislin, HMF in prolina, izmerili vrednost pH, električno prevodnost in aktivnost diastaze. Vzorce smo senzorično ocenili in posneli absorpcijske spektre v območju med 200 in 500 nm. V vzorcih, skladiščenih na svetlobi oz. v temi, smo vsakih šest mesecev določili vsebnost HMF v medu. Vsebnost HMF v medu se je ves čas večala in dosegla maksimalno vrednost na koncu skladiščenja. Po osemnajstih mesecih skladiščenja je vsebnost HMF v medu ustrezala zahtevam Pravilnika o medu (2011), ki dovoljuje vsebnost HMF do 40 mg/kg. S pomočjo statistične analize smo ocenili, da način skladiščenja (svetloba ali tema) ne vpliva na vsebnost HMF v medu. Vsebnost HMF je bila večja pri vzorcih medu, shranjenih na svetlobi, vendar razlika ni bila statistično značilna. Ugotovili smo, da lahko med uživamo leto in pol po točenju, ne glede na način skladiščenja na svetlobi ali v temi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 638.162:664.8.03:543.2/S (043)=163.6
CX	honeys/HMF/storage/sensory properties /absorption spectrum /physicochemical properties/storage in light/storage in dark
AU	KNEGO, Alja
AA	GOLOB, Terezija (supervisor)/BERTONCELJ, Jasna (co-advisor)/KOŠMERL, Tatjana (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2012
TI	INFLUENCE OF STORAGE CONDITIONS ON HMF CONTENT IN HONEY
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 61 p., 12 tab., 12 fig., 10 ann., 57 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The purpose of the thesis was to determine the influence of storage (in light or in the dark) on the hydroxymethylfurfural (HMF) content in honey during eighteen months of storage. Eight main types of Slovenian honeys, a total of 24 samples were analysed. The research of fresh honey samples included the analyses of the content of water, ash, free acids, proline and HMF, the determination of pH value, electrical conductivity, diastase activity, the sensory properties, and absorption spectrum in the range from 200 to 500 nm. During the time of storage the content of HMF in honey samples was evaluated every six months. The content of HMF increased consistently throughout this period and reached the maximum level at the end of storage. After eighteen months of storage the content of HMF remained within the limits prescribed by the Slovenian legislation, which allows for up to 40 mg of HMF per kg of honey. With statistical analysis it was determined that the type of storage (in light or in the dark) does not influence the formation of HMF in honey. The content of HMF was higher in samples stored in the light, but the difference was not statistically significant. It was concluded that honey can be consumed until a year and a half after extraction, regardless of the storage (in light or in the dark).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PRAVILNIK O MEDU	3
2.2 VRSTE MEDU	4
2.3 SESTAVA MEDU	4
2.3.1 Vsebnost vode v medu	5
2.3.2 Električna prevodnost	5
2.3.3 Vsebnost pepela	5
2.3.4 Vsebnost prostih kislin in vrednost pH	6
2.3.5 Vsebnost ogljikovih hidratov	6
2.3.6 Vsebnost beljakovin in aminokislin v medu	7
2.3.7 Encimi v medu	7
2.3.8 Vsebnost HMF v medu	8
2.3.8.1 Metode določanja vsebnosti HMF v medu	10
2.4 MERJENJE ABSORPCIJSKIH SPEKTROV MEDU	10
2.5 STARANJE IN SKLADIŠČENJE MEDU	12
2.6 SENZORIČNA ANALIZA MEDU	14
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 OPREDELITEV NALOGE	16
3.2 VZORCI	16
3.3 SENZORIČNO OCENJEVANJE MEDU	17
3.4 MERJENJE ABSORPCIJSKIH SPEKTROV MEDU V UV OBMOČJU	18
3.5 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE	18
3.5.1 Določanje vsebnosti vode z ročnim refraktometrom (AOAC 969.38, 1999)	18
3.5.2 Določanje električne prevodnosti z laboratorijskim konduktometrom (Kropf in sod., 2008)	19
3.5.3 Določanje vsebnosti celokupnega pepela (AOAC 920.181, 1999)	19

3.5.4 Določanje vrednosti pH v medu (Bogdanov in sod., 1997)	20
3.5.5 Določanje vsebnosti prostih titrabilnih kislin (AOAC 962.19, 1999)	20
3.5.6 Določanje vsebnosti prolina z Oughovo spektrofotometrično metodo, prilagojeno po Bogdanovu (1997)	21
3.5.7 Določanje vsebnosti HMF z metodo po Winklerju (Bogdanov in sod., 1997)	22
3.5.8 Spektrofotometrično določanje aktivnosti encima diastaze z metodo po Schadeju (Bogdanov in sod., 1997)	24
3.6 STATISTIČNA ANALIZA	25
3.6.1 Enovzorčna analiza	25
3.6.1.1 Aritmetična sredina ali povprečje	25
3.6.1.2 Varianca in standardni odklon	26
3.6.1.3 Koeficient variabilnosti	27
3.6.2 Dvovzorčna analiza	27
3.6.2.2 Studentov <i>t</i> -test	28
3.6.3 Primerjava dveh populacij	29
3.6.3.1 Preizkus domneve o razliki povprečij	29
4 REZULTATI	30
4.1 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE MEDU	30
4.2 REZULTATI MERJENJA ABSORPCIJSKIH SPEKTROV MEDU	32
4.3 REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE	40
4.4 REZULTATI SPREMLJANJA VSEBNOSTI HMF MED SKLADIŠČENJEM	43
4.4.1 Rezultati vsebnosti HMF v svežih vzorcih medu	44
4.4.2 Rezultati vsebnosti HMF med skladiščenjem	46
4.4.3 Primerjava vsebnosti HMF med skladiščenjem na svetlobi in v temi	48
5. RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1 RAZPRAVA	52
5.2 SKLEPI	55
6 POVZETEK	56
7 VIRI	57
PRILOGE	
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Absorpcijski spektri akacijevnega medu	32
Slika 2: Absorpcijski spektri cvetličnega medu	33
Slika 3: Absorpcijski spektri gozdnega medu	34
Slika 4: Absorpcijski spekter hojčevnega medu	35
Slika 5: Absorpcijski spektri mešanega medu	36
Slika 6: Absorpcijski spektri kostanjevega medu	37
Slika 7: Absorpcijska spektra lipovega medu	38
Slika 8: Absorpcijski spektri škržatovega medu	39
Slika 9: Vsebnost HMF (mg/kg) v svežih vzorcih medu	44
Slika 10: Povprečna vsebnost HMF (mg/kg) v vzorcih medu v času skladiščenja na svetlobi (S) in v temi (T)	46
Slika 11: Povečanje vsebnosti HMF (mg/kg) med skladiščenjem na svetlobi (S)	49
Slika 12: Povečanje vsebnosti HMF (mg/kg) med skladiščenjem v temi (T)	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Priporočila slovenskega pravilnika za posamezne parametre kakovosti medu (Pravilnika o medu, 2011)	3
Preglednica 2: Povprečne vsebnosti HMF v medu	10
Preglednica 3: Pregled števila in oznake vzorcev posamezne vrste medu	16
Preglednica 4: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti spremenljivk	28
Preglednica 5: Rezultati senzorične analize medu	30
Preglednica 6: FIZIKALNO-Kemijski parametri v svežih vzorcih različnih vrst medu	40
Preglednica 7: Povprečne vrednosti kakovostnih parametrov v svežih vzorcih medu	43
Preglednica 8: Osnovni statistični parametri za vsebnost HMF (mg/kg) v svežih vzorcih medu	45
Preglednica 9: Delež povečanje vsebnosti HMF v medu po 18-ih mesecih skladiščenja	47
Preglednica 10: Delež povečanja vsebnosti HMF v medu po 6-ih, 12-ih, 18-ih mesecih skladiščenja	48
Preglednica 11: Pregled koeficientov korelacije (r) za skladiščenje na svetlobi in temi	50
Preglednica 12: Vrednosti t za skladiščenje na svetlobi in v temi	51

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Spremljanje vsebnosti HMF v medu med skladiščenjem na svetlobi
- Priloga B: Spremljanje vsebnosti HMF v medu med skladiščenjem v temi
- Priloga C: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem na svetlobi v nektarnem medu
- Priloga D: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem v temi v nektarnem medu
- Priloga E: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem na svetlobi v maninem medu
- Priloga G: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem na svetlobi v kostanjevem in lipovem medu
- Priloga I: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem na svetlobi v škržatovem medu
- Priloga J: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem v temi v škržatovem medu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

χ	električna prevodnost
$\bar{x}$	povprečna vrednost
A	akacijev med
C	cvetlični med
C0	začetni čas
c_{xy}	kovarianca
DN	diastazno število
G	gozdni med
H	hojev med
HMF	hidroksimetilfurfural
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. High Pressure Liquid Chromatography)
K	kostanjev med
KV	koeficient variacije
L	lipov med
M	mešani med
meq/kg	miliekvivalent na kilogram
r	Pearsonov koeficient korelacije
S12	čas po 12-ih mesecih skladiščenja na svetlobi
S18	čas po 18-ih mesecih skladiščenja na svetlobi
S6	čas po 6-ih mesecih skladiščenja na svetlobi
Š	škržatov med
t	koeficient Studentove porazdelitve
T12	čas po 12-ih mesecih skladiščenja v temi
T18	čas po 18-ih mesecih skladiščenja v temi
T6	čas po 6-ih mesecih skladiščenja v temi
UV	ultravijolična svetloba
$x_{\max}$	minimalna vrednost
$x_{\min}$	maksimalna vrednost
α	stopnja tveganja
λ	valovna dolžina

1 UVOD

Najstarejši dokumenti iz zgodovine človeštva pričajo, da je bil med že v pradavnini cenjeno živilo. Prazgodovinski človek je po duplih iskal čebelje satje in ga užival, podobno kot to delajo medvedi. Iz dobe faraonov, pred približno 5000 leti, kažejo reliefi, kako so v tistem času izrezovali satje iz panjev. Kasneje so pridobivali med ali strd s stiskanjem satja. Zapiski iz starega in srednjega veka pričajo, da je postalo pridobivanje medu, tako pri naših prednikih, kot tudi pri drugih narodih, družbeno cenjeno delo.

Zgodaj spomladi začnejo čebele nabirati cvetni prah in medicino. Čebele prvo spomladansko pašo potrebujejo za svoj razvoj, čebelarji tega medu ne točijo. Nato začnejo cveteti zgodnje vrste sadja. Prvi medovi, ki so nektarnega izvora, so pogosto nabrani na sadnem drevju (marelica, breskev), v gozdu pa na divji češnji in za njo na različnih vrstah javorja. Na njem se lahko razvijejo kolonije listnih ušic, ki izločajo mano in s tem prispevajo k večji beri medu ob cvetenju te drevesne vrste. Tako dobimo mešani med ali celo prvi pravi med iz mane. V tem obdobju pričnejo na travniku cveteti medovite rastline (trobentice, spominčice, regrat, travniška kadulja). V nižinah najdemo polja oljne ogrščice. Prva obilnejša paša v Sloveniji je pozneje v maju, ko se začnejo odpirati robinije (akacije). Po cvetenju robinije se nadaljuje paša na travnikih, poleg tega pa se v gozdovih lahko pojavi večje izločanje mane, in to tako na listavcih, kot tudi na smreki (Božič, 2008).

V začetku julija zacvetita lipa in lipovec, oba sta bogata z medicino. V drugi polovici junija začne cveteti kostanj, na katerem čebele nabirajo medicino za kostanjev med. Že ob cvetenju kostanja se lahko na smreki in jelki (hoji) razvijejo kolonije listnih uši in kaparjev, ki poleti izločajo mano za nastanek smrekovega in hojevega medu. V nižinah se pozno poleti razcveti zlasti močvirsko rastlinje, vendar to le popestri prehrano čebel, čebelarju pa le izjemoma omogoči dodatno točenje medu. Jeseni čebele najdejo medicino še na bršljanu, to pa je zadnja večja paša v naših krajih (Božič, 2008).

Med mora biti brez organskih ali anorganskih tujih primesi. Med ne sme imeti tujega okusa ali vonja, ne sme fermentirati, njegova stopnja kislosti ne sme biti umetno spremenjena in med ne sme biti pregret tako, da so naravni encimi, bodisi uničeni, bodisi je znatno zmanjšana njihova aktivnost. Med, ki se daje v promet kot med ali je namenjen za uporabo v kateremkoli živilu za prehrano ljudi, ne sme vsebovati nobenih dodanih sestavin, vključno z aditivi za živila, niti nobenih drugih dodatkov (Pravilnik o medu, 2011). Kljub pravilniku pa se na našem tržišču pojavljajo potvorjeni medovi, ki so jim v večini dodani različni sladkorni sirupi. Med je odlična hrana, ki jo uživamo skozi vse leto. Obstojnost lahko traja tudi več let po pridelavi, zato je pomembno spremljati kakovost medu po krajšem in daljšem skladiščenju.

Namen dela in hipoteza

Namen diplomske naloge je bil spremljati vsebnost HMF v medu v daljšem časovnem obdobju (18 mesecev) in ugotoviti vpliv skladiščenja (na svetlobi in v temi) na tvorbo HMF v različnih časovnih obdobjih. Na svežih vzorcih različnih vrst slovenskega medu smo izvedli senzorično analizo, posneli absorpcijske spektre, opravili analize vsebnosti vode, pepela, prostih kislin, HMF in prolina ter določili električno prevodnost, vrednost pH in aktivnost encima diastaze. Dobljene rezultate smo primerjali tudi z vrednostmi v Pravilniku o medu (2011). V vzorcih medu smo spektrofotometrično določili vsebnost HMF v različnih časovnih obdobjih in rezultate statistično obdelali.

Pričakovali smo razlike v vsebnosti HMF že v svežih vzorcih medu. Prav tako smo pričakovali povečanje vsebnosti HMF v vzorcih medu med skladiščenjem. Predvidevali smo, da razlike v vsebnosti HMF v medu med vzorci, ki smo jih skladiščili v temi ali na svetlobi ne bodo statistično značilne. Pričakovali smo, da med 18-mesečnim skladiščenjem vsebnost HMF v vzorcih medu ne bo presegla dovoljenih vrednosti, predpisanih v Pravilniku o medu (2011).

2 PREGLED OBJAV

2.1 PRAVILNIK O MEDU

Med je naravna sladka snov, ki jo izdelajo čebele *Apis mellifera* iz nektarja cvetov ali izločkov iz živih delov rastlin ali izločkov žuželk, ki sesajo rastlinski sok na živih delih rastlin, ki jih čebele zberejo, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju (Pravilnik o medu, 2011).

Med mora glede sestave in lastnosti ustrezati merilom, določenim v 6. členu tega pravilnika in Prilogi, ki je sestavni del pravilnika (Pravilnik o medu, 2011). Zakonsko določene meje za posamezne parametre so zbrane v preglednici 1.

Preglednica 1. Priporočila slovenskega pravilnika za posamezne parametre kakovosti medu (Pravilnik o medu, 2011)

Parameter	Vrsta medu	Količina	
		najmanj	največ
vsebnost fruktoze in glukoze (vsota) (g/100 g)	cvetlični	60	
	gozdni, mešanica gozdnega in cvetličnega	45	
vsebnost saharoze (g/100 g)	splošno		5
	akacija, lucerna, medenice, rdeči gumi, med citrusov		10
	sivka		15
vsebnost vode (%)	splošno		20
	resa in pekovski med splošno		23
	pekovski med iz rese		25
vsebnost v vodi netopnih snovi (g/100 g)	splošno		0,1
	prešani med		0,5
χ (mS/cm)	vse vrste razen izjem		0,8
	gozdni, kostanjev, smrekov in hojev ter njihove mešanice	0,8	
proste kisline (miliekvivalenti/100 g)	splošno		50
	pekovski med		80
diastazno število	splošno	8	
	med z majhno naravno vsebnostjo encimov	3	
HMF (mg/kg)	splošno		40
	med z deklariranim poreklom iz območij s tropsko klimo in mešanice teh vrst medu		80

2.2 VRSTE MEDU

Poznamo različne vrste medu in jih poimenujemo glede na izvor kot nektarni ali cvetlični med in manin ali gozdni med (Pravilnik o medu, 2011). Nektar izločajo cvetovi večine cvetlic, ki jih oprašujejo žuželke. Mano izločajo živi deli rastlin ter listne uši, kaparji in škržati, ki srkajo rastlinske sokove.

V nekaterih primerih lahko neka rastlina daje bodisi med iz nektarja bodisi med iz mane. Pri nas sta kot mešana nektarno-manina medova znana lipov in kostanjev med. Če upoštevamo število rastlinskih vrst, katerim pripada medicina, razlikujemo sortne (ena prevladujoča rastlinska vrsta) in nesortne medove (dva ali več rastlinskih vrst). Med sortne medove uvrščamo akacijev, ajdov, lipov, kostanjev, hojev, smrekov, regratov med, med oljne ogrščice ter rešeljikin med. Cvetlični in gozdni med pa uvrščamo med nesortne medove. Po Pravilniku o medu (2011) mora imeti sortni med ustrezne senzorične, fizikalno-kemijske in mikroskopske lastnosti, značilne za rastlino, ki ji pripada medicina.

V zadnjem desetletju prejšnjega stoletja se je v našem okolju pojavil škržatov med. Medeči škržat (*Metcalfa pruinos a say*) je povzročitelj medenja, ki se je v zadnjih desetletjih pojavil na Goriškem. Njegova domovina sta Severna in Srednja Amerika. V okolici Trevisa v Italiji blizu vojaškega oporišča so ga opazili že leta 1979 in je najverjetneje pripotoval kot slepi potnik v vojaškem letalu. Leta 1990 se je pojavil ob Soči pri Novi Gorici. Tisto leto so čebele v Vrtojbi prinesle okrog 30 kg temnega medu nenavadnega okusa (Žežlina in sod., 1999).

V nasprotju z ostalimi povzročitelji medenja je škržat polifag, kar pomeni, da so ga našli na več kot petdesetih vrstah rastlin. Najraje se je zadrževal na koprivi, robidi, rdečem drenu, amfori itn. Uvrščamo ga med rastlinske škodljivce, ker se je pojavil tudi na gojenih rastlinah. V svoji izvorni domovini ima škržat številne sovražnike, ki preprečujejo, da bi se čezmerno razmnožil (Poklukar s sod., 1998).

V notranjosti Slovenije do leta 2000 ni bil najden (Božič, 2000).

V kasnejšem obdobju do danes v literaturi ne zasledimo veliko podatkov o prisotnosti medečega škržata. Tudi čebelarji v zadnjih letih škržatnega medu ne točijo več.

2.3 SESTAVA MEDU

Med je visokovredno naravno živilo. Je kompleksna mešanica več kot 300 različnih kemijskih spojin. Med njimi je največ različnih sladkorjev (75 - 80 %) in vode (14 - 20 %), poleg tega pa so v medu še številne druge snovi: organske kisline (0,1 - 1 %), različni elementi (0,1 - 1,5 %), proste aminokisline, encimi (invertaza, katalaza, glukozidaza, fosfataza), vitamini (B1, B2, B6, C, pantotenska, nikotinska in folna kislina ter biotin), hormon acetilholin, barvila in fenolne spojine ter v sledovih tudi številne organske snovi. Prav snovi, ki so v medu v manjših količinah, so odgovorne za senzorične lastnosti, to je za barvo, vonj, okus in aromo posameznih vrst medu (Golob in sod., 2008).

2.3.1 Vsebnost vode v medu

Vsebnost vode je eno izmed najpomembnejših meril kakovosti medu. Vsebnost vode sicer ni odvisna od botaničnega in geografskega porekla, je pa merilo, ki značilno vpliva na senzorično kakovost in fizikalno-kemijske parametre. Med z večjo vsebnostjo vode je redkejši in lažje tekoč, tisti z manjšo vsebnostjo vode pa je bolj viskozen. Slednji je bolj obstojen, saj je v takih razmerah onemogočeno delovanje ozmofilnih kvasovk in s tem je preprečena tudi fermentacija. Vsebnost vode je odvisna od naravnih pogojev paše, vsebnosti vode v nektarju ter zorenja medu (Golob in sod., 2008). V naših klimatskih pogojih vsebuje zrel med od 15 do 18 g/100 g vode. Vsebnost vode v medu se lahko tudi spreminja zaradi pogojev shranjevanja. Prostor za skladiščenje mora biti suh, temperatura prostora pa do 25 °C. Po Pravilniku o medu (2011) je v medu dovoljeno največ 20 g vode na 100 g.

2.3.2 Električna prevodnost

Električna prevodnost je parameter, ki daje koristno informacijo o kakovosti in morebitni potvorjenosti medu. Uporabna pa je tudi pri prepoznavanju različnih vrst medu, zlasti pri razlikovanju med medom iz nektarja in medom iz mane (Golob in sod., 2008).

Po Pravilniku o medu (2011) mora biti električna prevodnost medu iz nektarja (izjema je kostanjev med) enaka ali manjša 0,8 mS/cm, električna prevodnost medu iz mane in kostanjevega medu pa večja od 0,8 mS/cm. Električna prevodnost medu je odvisna od vsebnosti mineralnih snovi, organskih kislin, proteinov in drugih kompleksnejših snovi, kot so sladkorji in poliolli. Višja električna prevodnost maninega medu in mešanega nektarnega in maninega medu je posledica večje vsebnosti elementov. Nasprotno je nižja vrednost električne prevodnosti, kar je značilno za akacijev med, posledica majhne vsebnosti pepela v medu (Popek, 2002). V splošnem je električna prevodnost medu zaradi visoke vsebnosti sladkorjev, ki zmanjšujejo gibljivost ionov, sorazmerno nizka in jo zato merimo v raztopinah medu z 20 do 30 % suhe snovi (Marinko, 1994).

Poznavanje vsebnosti vode v medu je pomembno pri določanju električne prevodnosti in izračunu specifične rotacije medu (Bogdanov in sod., 1997). Najpogosteje se uporablja metoda merjenja z refraktometrom (Doner, 2003).

2.3.3 Vsebnost pepela

Poleg številnih organskih snovi vsebuje med tudi manjše količine različnih anorganskih snovi (Golob in sod., 2008). Pepel je anorganski ostanek, ki ga dobimo pri popolnem sežigu medu. Njegova vsebnost variira od 0,04 do 0,60 g/100 g v svetlih vrstah medu in celo nad 1 g/100 g v nekaterih temnih vrstah medu. V splošnem je torej vsebnost pepela zelo nizka, odvisna od tipa tal, na katerem je medeča rastlina rasla (Spons, 1992). Vsebnost

posameznih elementov - težkih kovin pa lahko kaže na onesnaženost okolja in s tem na geografski izvor medu (Anklam, 1998).

Pravilnik o medu (2011) vsebnosti pepela ne predpisuje, potrjeno pa je, da temni medovi lahko vsebujejo tudi več kot 1 g/100 g pepela (Golob in sod., 2008).

2.3.4 Vsebnost prostih kislin in vrednost pH

V medu je približno do 0,5 % organskih kislin, med katerimi prevladuje glukonska kislina. Izvor kislin so čebele, sokovi v naravi ali pa kisline nastanejo kot vmesni členi bioloških procesov. Glukonska kislina nastane v medu iz glukoze s pomočjo encima glukoza-oksidge. V medu se nahajajo še naslednje kisline: mravljična, očetna, maslena, mlečna, jabolčna, jantarna, citronska, vinska, oksalna, fumarna in nekatere anorganske kisline, med katerimi prevladuje fosforna kislina. Vsebnost kislin vpliva na obstojnost medu (Doner, 2003; Golob in sod., 2008). Kisline prispevajo k značilni aromi in okusu, pomembne pa so tudi zaradi antibakterijskega in antioksidativnega delovanja (Golob in sod., 2008).

Pravilnik o medu (2011) dovoljuje do 50 mg prostih kislin v kilogramu medu. Bertoneelj in sod. (2011) so določili vsebnost prostih kislin v sedmih vrstah slovenskega medu. Povprečne vsebnosti prostih kislin v analiziranih vrstah medu so se gibale med 13,3 meq/kg v kostanjevem medu in 30,9 meq/kg v smrekovem medu.

Med ima vrednost pH med 3,0 in 6,2. Vrednost pH v medu ima pomembno vlogo med skladiščenjem, saj vpliva na viskoznost, stabilnost in svežost medu (Bertoneelj in sod., 2011). Kljub nizki vrednosti pH, ki bi lahko bila vzrok za kisel okus, pa se kislosti v medu ne občuti zaradi velike vsebnosti sladkorjev. Medovi, ki vsebujejo veliko mineralnih snovi (soli K, Ca, Na) imajo običajno višje vrednosti pH. Razmerje med celokupno koncentracijo kislin v medu in vrednostjo pH medu ni odvisno od vrste medu, ampak predvsem od pogojev nastanka medu (Poklukar in sod., 1998).

2.3.5 Vsebnost ogljikovih hidratov

Ogljikovi hidrati so najbolj zastopane organske spojine v medu (Krell, 1996; Plestenjak, 1999; Golob in sod., 2008).

Predstavljajo kar od 95 do 99 % celotne suhe snovi v medu. Sladkorji, ki jih vsebuje med, spadajo med enostavne ogljikove hidrate. Med vsebuje od 33 do 42 % fruktoze, 27 do 36 % glukoze in 1 do 4 % saharoze (Molan, 1996; Ipavec, 1997). Prisotnost in delež posameznih sladkorjev v medu sta odvisna od izvora medu, sestave nektarja, botaničnega porekla, klimatskih razmer, vrste in fizičnega stanja čebel (Božnar in Senegačnik, 1998).

Ogljikovi hidrati so v medu odgovorni za fizikalno-kemijske lastnosti, kot so viskoznost, kristalizacija in higroskopnost. Odgovorni pa so tudi za energijsko vrednost medu (Božnar, 2003; Golob in sod., 2008).

Saharoza se pri rahlo povečani temperaturi zaradi povišane aktivnosti encima diastaze razgradi na fruktozo in glukozo, vendar ne v enakih deležih (Božnar in Senegačnik, 1998).

2.3.6 Vsebnost beljakovin in aminokislin v medu

Ponavadi med vsebuje majhno količino beljakovin, manj kot 0,5 g/100 g, zato beljakovinom v medu ne pripisujemo posebne prehranske vrednosti. Med aminokislinami ima največji delež prolin, in to od 50 do 85 % skupne količine aminokislin v medu. Prolin je indikator potvorjenosti medu.

Prolin vstopi v med v večini z izločanjem sline čebel med pretvorbo medicine v med (Manzanares in sod., 2011). Bogdanov in sod. (1997) navajajo, da je lahko vsebnost prolina pod 180 mg/kg dober pokazatelj potvorjenosti medu.

Tudi cvetni prah je lahko izvor aminokislin in beljakovin v medu. Več aminokislin vsebuje med iz mane (Božnar, 2003). Analiza vsebnosti prolina je dokaj enostavna, saj skupaj z ninhidrinom tvorita spojino rumene barve, katere koncentracijo določimo spektrofotometrično (Bogdanov in sod., 1997). Posamezne vrste medu vsebujejo različne količine prolina: najmanj ga vsebuje akacijev med (317 mg/kg), največ pa kostanjev med (588 mg/kg) (Bertoncelj in sod., 2011). Podobno vsebnost prolina v posameznih vrstah slovenskega medu navajajo Golob in sod. (2008), ki najmanjšo vsebnost prolina omenjajo v akacijevem medu (približno 300 mg/kg), največjo vsebnost prolina pa v kostanjevem medu (več kot 600 mg/kg).

Aminokisline z nekaterimi sladkorji tvorijo rumene in rjave spojine (Maillardova reakcija), rezultat tega je verjetno s staranjem pogojeno temnenje medu (Doner, 2003).

2.3.7 Encimi v medu

Encimi so med najpomembnejšimi spojinami v medu. Med vsebuje različne encime, ki izvirajo iz čebel, nektarja ali mane in cvetnega prahu in ki pomembno sodelujejo pri nastanku medu (Božnar in Senegačnik, 1998).

Najpomembnejši encimi v medu so diastaza (amilaza), invertaza (glukozidaza), glukoza-oksidadaza, prisotni pa so tudi kislja fosfataza, katalaza, β -glukozidaza. Kemijsko so encimi proteini, ki katalizirajo biokemijske reakcije v živih organizmih. Njihova aktivnost je odvisna od parametrov, kot so vrednost pH, temperatura in vsebnost vode.

Diastaza je sestavljena iz α - in β -amilaze. Njuna naloga je razcep glikozidnih vezi v škrobu. Njuna vloga v medu še ni povsem poznana. Aktivnost diastaze v medu se v procesu segrevanja zmanjšuje. Merimo jo na dokaj enostaven način, zato se metoda uporablja v procesu ugotavljanja pregretosti medu. Vendar delo otežuje dejstvo, da se

vsebnost diastaze lahko močno zmanjšuje tudi med skladiščenjem (Doner 2003). Aktivnost diastaze je povezana tudi z vrednostjo pH medu. Optimalna vrednost pH za delovanje diastaze je med 5,3 in 5,6. Čim bolj se vrednost pH znižuje, tem bolj se aktivnost diastaze zmanjšuje (Babacan in sod., 2002).

Aktivnost diastaze izražamo z diastaznim številom, ki pomeni volumen (mL) 1 % raztopine škroba, ki ga hidrolizira encim iz 1 g medu v eni uri pri temperaturi 40 °C. V svežem medu se vrednost diastaznega števila gibljejo med 13 in 30. Akacijev med je znan po nizkem diastaznem številu, ki je ponavadi nižji od 15. V kostanjevem in lipovem medu ter maninem medu pa se vrednosti gibljejo od 15 do 35. Diastazno število pregretega medu je nižje od 8 oziroma nižje od 3 za med z naravno nizko encimsko aktivnostjo (Pravilnik o medu, 2011; Persano Oddo in sod., 1999). Avtorji, ki so spremljali vrednosti diastaznega števila v slovenskih vrstah medu, so določili nižje vrednosti, kot jih omenjajo tuji avtorji. Vrednosti diastaznega števila se gibljejo od najnižje vrednosti v akacijevem medu okoli 10 do najvišje vrednosti diastaznega števila pri kostanjevem in gozdnem medu med 17,5 in 22 (Golob in Plestenjak, 1999; Ovčec, 2007).

2.3.8 Vsebnost HMF v medu

HMF (5-hidroksimetil-2-furfural) je ciklični aldehyd ($C_6H_6O_3$), ki nastane z odcepitevijo vode iz dikarbonilnih spojin, le te pa nastanejo pri 1,2-enolaciji. Začetni sladkor je heksoza.

HMF nastane v treh glavnih stopnjah:

- I. Tvorba N-substituiranega glikozilamina (adicija amina se vrši na karbonilno skupino odprte verige sladkorja, odcepi se voda in obroč se zapre).
- II. Amadori oz. Heynsova premestitev N-glikozilaminov.
- III. Pretvorba produktov premestitve v dikarbonilne spojine.

Fruktozamin se najprej izomerizira v enolno obliko. Sledi eliminacija -OH skupine na mestu 3, pri čemer se tvori Schiffova baza. Pri hidrolizi slednje nastane 3-deoksiosuloza v enolni obliki. Po odcepitevji vode se tvori nenasičena osuloza (1,2 dikarbonilna spojina), ki preide v HMF z odcepitevjo druge molekule vode (Zelenik-Blatnik, 1986).

Med procesi pridobivanja medu je med izpostavljen tudi toplotni obdelavi. To je potrebno, da upočasnimo kristalizacijo. Toplotna obdelava med temperaturo 45 in 50 °C še ne vpliva na povečanje vsebnosti HMF. V primeru, da postopek toplotne obdelave ni ustrezen, lahko nastopijo negativne posledice (kristalizacija, fermentacija, slabša kakovost, okužba) (Tosi in sod., 2002). Med neželene posledice uvrščamo tudi povečano vsebnost HMF. White (1992) v svoji raziskavi navaja, da je za človeka toksičen vnos 2,4 mg HMF na kilogram telesne teže na dan.

Vsebnost HMF v medu je kriterij za kakovost medu. V svežem medu HMF praktično ni prisoten. V medu nastane pri skladiščenju ali drugih postopkih, ki jih opravljamo na medu.

Med slednje spada predvsem segrevanje, ki ga opravimo zaradi znižanja viskoznosti in preprečevanja kristalizacije ali fermentacije (Sing in sod., 1988). Pri ocenjevanju kakovosti medu se HMF uporablja kot kriterij svežosti oz. kot pokazatelj pregretosti medu (Golob in sod. 2008).

HMF nastaja med kislinsko katalizirano dehidracijo heksoz in je povezan s kemijskimi parametri medu, kot so: vrednost pH, vsebnost skupnih kislin in vsebnost mineralov (Zappala, 2005). Gfeller in Bogdanov (2006) navajata, da obstaja povezava med vrednostjo pH in vsebnostjo HMF v medu. Pri medu z nizko vrednostjo pH se tvori HMF hitreje kot pri tistih vrstah medu z visoko vrednostjo pH. Ker ima manin med višje vrednosti pH v primerjavi z nektarnim medom, je lahko tudi vsebnost HMF v vzorcih maninega medu manjša in vsebnost HMF v vzorcih nektarnega medu večja.

V svežem medu je vsebnost HMF minimalna, in sicer od 0,06 do 0,2 mg/kg. Povečana vsebnost kaže na prekomerno segrevanje medu oz. na neustrezno skladiščenje (White, 1992). Kandolf (2007) navaja, da analize cvetličnega medu, skladiščenega eno leto pri temperaturi $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$, kažejo povečanje vsebnosti HMF za 16 mg/kg medu na leto oziroma 1 - 2 mg/kg na mesec.

Zgornja meja vsebnosti HMF v medu, ki jo določa Pravilnik o medu (2011), je 40 mg/kg. Pravilnik Evropske unije (Council directive..., 2002) pa v državah, ki imajo tropsko podnebje, dovoljuje do 80 mg/kg medu.

V preglednici 2 so navedene vsebnosti HMF v posameznih vrstah medu različnih avtorjev. Golob in Plestenjak (1999) sta največjo vsebnost HMF določili v cvetličnem medu (7,09), najmanjše vsebnosti HMF pa v kostanjevem in hojevem medu (1,25 in 1,46 mg/kg). Tudi Šifrerjeva (2005) je največjo vsebnost HMF določila v cvetličnem medu (5,0 mg/kg), najmanjšo vsebnost HMF pa v hojevem medu (1,1 mg/kg). Persano Oddo in sod. (1995) so določili najmanjšo vsebnost HMF v kostanjevem in hojevem medu (2,0 mg/kg), največjo pa v lipovem medu (4,2 mg/kg). Od navedenih avtorjev so samo Persano Oddo in sod. (1995) določili vsebnost HMF v škržatovem medu (2,2 mg/kg), ki je podobna vsebnosti HMF v kostanjevem in hojevem medu (2,0 mg/kg).

Preglednica 2: Povprečne vsebnosti HMF v medu

Vrsta medu	Vsebnost HMF (mg/kg)		
	Šifrer (2005)	Golob in Plestenjak (1999)	Persano Oddo in sod. (1995)
akacijev	3,8	5,22	3,8
cvetlični	5,0	7,09	-
gozdni	3,8	2,08	-
hojev	1,1	1,46	2,0
kostanjev	3,5	1,25	2,0
lipov	3,1	3,63	4,2
mešani	5,0	5,55	-
škržatov	-	-	2,2

2.3.8.1 Metode določanja vsebnosti HMF v medu

Za analizo vsebnosti HMF v medu se uporabljajo različne metode, najbolj pogosto naslednje tri: spektrofotometrična metoda po Whitju (1979), spektrofotometrična metoda po Winklerju (1955) in sodobna HPLC metoda (Zapalla in sod., 2005). Mednarodna komisija za med je za določanje vsebnosti HMF v medu predlagala dve spektrofotometrični metodi ter HPLC metodo. Zappala in sod. (2005) navajajo HPLC metodo kot bolj uporabno. Slabost metode po Winklerju je po njihovem mnenju manjša natančnost in uporaba kancerogenega reagenta p-toluidina. V svojem članku primerjajo vsebnost HMF, določeno z vsemi tremi metodami. Analizirane vrednosti kažejo, da so vsebnosti HMF v različnih vrstah medu, dobljene z metodo po Winklerju, višje v primerjavi z vsebnostmi HMF, določenimi z ostalima dvema metodama.

Nasprotno pa Tekavec (1997) v svoji diplomski nalogi navaja, da sta za določanje vsebnosti HMF enako primerni tako spektrofotometrična metoda po Winklerju, kot tudi HPLC metoda in da je vseeno, katero metodo določanja vsebnosti HMF uporabimo.

2.4 MERJENJE ABSORPCIJSKIH SPEKTROV MEDU

Spektroskopija je instrumentalna metoda, ki obravnava spektre, to je porazdelitve izsevanega ali prepuščenega elektromagnetnega valovanja. Spektroskopske analize temeljijo na kvantitativnem merjenju radiacije, ki jo producirajo ali absorbirajo določene molekularne ali atomske vrste. Spektroskopske metode lahko klasificiramo z ozirom na področje elektromagnetnega valovanja, ki ga uporabljamo pri merjenju. Spekter elektromagnetnega valovanja vključuje: γ -žarke, X-žarke, UV-žarke, vidno polje, IR-žarke, mikrovalove in radiovalove (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Sprejem svetlobne energije v molekuli označujemo kot absorpcija svetlobe. Absorpcijo svetlobe določimo z merjenjem padca intenzitete svetlobe pri prehodu skozi vzorec, v

našem primeru je to med. Naprava za merjenje sprememb absorpcije v odvisnosti od valovne dolžine je spektrofotometer.

Padec intenzivnosti svetlobe pri prehodu skozi vzorec je premo sorazmeren koncentraciji spojine, dolžini poti in molarnemu ekstinkcijskemu koeficientu. Beer-Lambertov zakon (enačba 1) omogoča direkten izračun koncentracije iz izmerjene vrednosti absorbance. Beer-Lambertov zakon velja samo pri majhnih koncentracijah, kajti pri velikih koncentracijah zveza ni več linearna.

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \dots (1)$$

ε - molarni ekstinkcijski koeficient (1/mol.cm)

I_0 - intenziteta vstopnega žarka

I - intenziteta izstopnega žarka

l - dolžina kivete (navadno 1 cm)

Produkt $\varepsilon \cdot c \cdot l$ imenujemo optična gostota ali absorbanca (A).

Spektralne lastnosti medu so povezane s sposobnostjo medu da absorbira, transmitira, reflektira in reemitira optično radiacijo. Merjenje spektralnih lastnosti medu je pomembno za ugotavljanje kakovosti medu ali za spremljanje onesnaženja v okolju, kajti iz sestave medu je razvidna prisotnost določenih okužb znotraj pašnega območja čebel. Absorpcijski spekter, značilen za med, je enakomerno padajoč od 200 do 700 nm valovne dolžine. Vrh doseže med 250 in 275 nm valovne dolžine (Posudin in sod., 1995).

Sirnikova (2002) je poiskala karakteristične absorpcijske spektre posameznih vrst medu in jih razdelila v naslednje skupine:

- absorpcijski spekter akacijevega medu,
- absorpcijski spekter cvetličnega medu,
- absorpcijski spekter gozdnega medu,
- absorpcijski spekter hojevega medu,
- absorpcijski spekter kostanjevega medu,
- absorpcijski spekter lipovega medu,
- absorpcijski spekter smrekovega medu,
- absorpcijski spekter škržatovega medu.

Na osnovi rezultatov svojih analiz je Sirnikova (2002) ugotovila, da na podlagi spektralnih diagramov lahko ugotovljamo vrsto medu in tudi morebitno primes druge vrste medu.

2.5 STARANJE IN SKLADIŠČENJE MEDU

Z vidika potrošnikov je pomembno, da med ohrani svoje lastnosti tudi med skladiščenjem. Pogosto se zgodi, da med ostane skladiščen tudi do enega leta preden pride do potrošnika. Tekom skladiščenja se spremenijo senzorične lastnosti in hranilna vrednost medu.

V ta namen so bile narejene nekatere raziskave, ki so spremljale kemijske spremembe vzorcev medu tekom skladiščenja. V raziskavah so vzorce medu izpostavili višji temperaturi, kot jo pričakujemo v normalnih pogojih v naravi ($> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Ricardo in sod., 2007; Tosi in sod., 2002; Zappala in sod., 2005; Khalil in sod., 2010; Cervantes in sod., 2000). Nekateri avtorji pa so spremljali povečanje vsebnosti HMF med skladiščenjem v različnih časovnih obdobjih. Povečanje vsebnosti HMF med skladiščenjem vpliva na kakovost medu. Avtorji navajajo različna časovna obdobja, v katerih je med na podlagi vsebnosti HMF še svež (Yilmaz in Küfrevioğlu, 2001; Khalil in sod., 2010; Cervantes in sod., 2000; Papić, 1988; Sancho in sod., 1992).

HMF v svežem medu ponavadi ni prisoten. Njegova vsebnost se večja kot rezultat procesa toplotne obdelave in daljšega časa skladiščenja. Številni faktorji vplivajo na tvorbo HMF v medu v času skladiščenja (embalaža, fizikalno-kemijski parametri medu, vlažnost, sprememba temperature in intenzitete svetlobe). Pomembno je, da izberemo optimalno embalažo za skladiščenje (npr. steklen kozarec). V raziskavah so omenjeni kovinski zabojniki, ki vplivajo na kakovost medu med skladiščenjem (Khalil in sod., 2010). fizikalno-kemijski parametri medu (vrednost pH, vsebnost prostih kislin, vsebnost laktonov in vsebnost skupnih kislin) se med skladiščenjem spreminjajo in posredno vplivajo na tvorbo HMF in s tem na kakovost medu (Yilmaz in Küfrevioğlu, 2001; Khalil in sod., 2010; Cervantes in sod., 2000; Manzanares in sod., 2011).

Khalil in sod. (2010) so analizirali vsebnost HMF v vzorcih malezijskega medu, ki so bili skladiščeni več kot eno leto. Naraščanje vsebnosti HMF so spremljali v časovnem intervalu od 3 do 6 mesecev in od 12 do 24 mesecev. V prvem intervalu je bila vsebnost HMF med 2,80 in 24,87 mg/kg medu, kar je znotraj mednarodnih priporočil (80 mg/kg za tropski med). V drugem intervalu pa je bila vsebnost HMF znatno večja (med 182,19 in 1131,79 mg/kg). Avtorji na osnovi rezultatov raziskave povzamejo priporočilo, da med uživamo v roku enega leta od pridobivanja in pri tem upoštevamo vrsto medu.

Yilmaz in Küfrevioğlu (2001) sta z analizo 45 vzorcev cvetličnega medu, hranjenega 12 mesecev pri temperaturi $20 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ugotovila, da se vsebnost HMF v času skladiščenja povečuje. Začetna povprečna vsebnost HMF je bila 3,3 mg/kg medu, določena končna povprečna vsebnost pa je znašala 19,1 mg/kg medu.

Med skladiščenjem se vsebnost HMF v medu počasi večja. Spremembe so očitne šele po nekaj mesecih. Vsebnost HMF v medu narašča med 0,1 in 3 mg/kg na mesec. Skladiščenje medu pri povišani temperaturi (30 do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) povzroči močno povečanje vsebnosti HMF (Železnikar, 1987). Tudi Nombre in sod. (2010) navajajo, da se vsebnosti HMF prvih šest mesecev skladiščenja skoraj ni povečala, po enem letu pa se je vsebnost HMF dvakrat

povečala pri temperaturi skladiščenja med 15 in 20 °C. Temperatura skladiščenja nad 35 °C pa vpliva tudi na ostale fizikalno-kemijske parametre in s tem na obstojnost medu.

Cervantes in sod. (2000) so prav tako proučevali vpliv toplotne obdelave na spremembo vsebnosti HMF v medu med samim shranjevanjem. Avtorji si razlagajo, da na spremembo vsebnosti HMF ne vpliva toliko obdelava, temveč kemijska sestava medu. Razlike izvirajo predvsem iz vsebnosti reducirajočih sladkorjev, kajti povečanje vsebnosti HMF naj bi bilo povezano z vsebnostjo fruktoze. Analizirali so vzorce dveh različnih vrst medu skladiščenih pri sobni temperaturi. Uporabili so dve vrsti nektarnega medu (med Tahonal in med Dzidzilché). Vzorce so nato segrevali različno dolgo, od 3 do 15 minut, pri temperaturi 55 °C. Začetna vsebnost HMF je bila v obeh vrstah medu majhna in je znašala okrog 3 mg/kg. Dolžina segrevanja ni vplivala na povečanje vsebnosti HMF v obravnavanih vzorcih. S segrevanjem se je vsebnost HMF sicer povečala, vendar med temperaturo in časom ni bilo ugotovljenih linearnih povezav. Po 23-ih tednih se je vsebnost HMF povečala na 30 mg/kg (900 %) pri prvi vrsti medu, medtem ko je bilo v drugi vrsti povečanje vsebnosti HMF okrog 16 mg/kg (433 %).

Papić in sod. (1988) so raziskovali vpliv skladiščenja na vsebnost HMF v medu. Analizirali so 20 vzorcev medu različne kakovosti in porekla ter spremljali spremembe vsebnosti HMF v medu po osmih mesecih skladiščenja. Sprememba vsebnosti HMF med shranjevanjem ni pričakovana, kajti v nekaterih vzorcih se vsebnost HMF povečuje, v nekaterih pa zmanjšuje. Od 20 vzorcev se je po osmih mesecih skladiščenja vsebnost HMF povečala v enajstih vzorcih, v preostalih pa zmanjšala. Po mnenju avtorja ta parameter nima pomembne vloge v oceni staranja medu.

Sancho in sod. (1992) so proučevali 115 vzorcev španskega medu različnega botaničnega porekla, hranjenega pri sobni temperaturi. Vzorcem medu so določili diastazno število in vsebnost HMF 4, 16 in 28 mesecev po točenju. Povprečna začetna vsebnost HMF je bila 4,7 mg/kg, po 16-ih mesecih je bila vsebnost 13,1 mg/kg medu, po 28-ih mesecih pa že 33,2 mg/kg. Večina vzorcev (96,5 %) kaže linearno odvisnost med logaritmom vsebnosti HMF in časom skladiščenja. Avtorji so ugotovili, da je bila maksimalna vsebnost HMF (40 mg/kg medu) dosežena v 97 vzorcih medu (84 %) po preteku dveh do treh let. Iz tega so sklepali, da med po dveh letih skladiščenja ni več svež.

2.6 SENZORIČNA ANALIZA MEDU

Senzorične lastnosti medu imajo pomembno vlogo pri ugotavljanju vrste in kakovosti medu. S senzorično analizo merimo in vrednotimo lastnosti živil z enim ali več človeškimi čutili. Barva, vonj, okus in aroma so pomembni kriteriji, ki imajo velik pomen pri ugotavljanju sortnosti in kakovosti medu. Te senzorične lastnosti so odvisne od botaničnega in geografskega izvora medu, od količine in razmerja posameznih sestavin v medu (pigmentov, sladkorjev, organskih kislin, mineralnih snovi, beljakovin, aminokislin), od vremenskih razmer, časa medenja, individualne čebelarske prakse ter od ravnanja z medom med skladiščenjem. Za potrošnika so senzorične lastnosti prvo merilo kakovosti medu, zato odločilno vplivajo na njegovo sprejemljivost (Golob in sod., 2008).

Barva medu je zelo različna in je za posamezno vrsto medu značilna, od zelo svetlo rumene (včasih je med skoraj brezbarven), prek jantarne do temno rjave. Na barvo medu vplivajo različni rastlinski pigmenti, kot so karoteni, ksantofili, klorofili, antociani in drugi. Barva je odvisna tudi od vsebnosti beljakovin, aminokislin in drugih dušikovih snovi. Potemnitev medu med toplotno obdelavo in skladiščenjem je posledica Maillardove reakcije in karamelizacije sladkorjev. Pri vrednotenju barve medu je treba upoštevati, da je barva kristaliziranega medu svetlejša od barve tekočega medu (Božnar in Senegačnik, 1998; Golob in sod., 2008).

Vonj medu izhaja iz aromatičnih sestavin nektarja oz. mane posameznih rastlin. Odvisno od vrste medu so te snovi navzoče v različnih količinah in razmerjih ter bolj ali manj izrazite. Vonj medu oblikujejo karbonilne spojine, alkoholi, estri alifatskih in aromatskih kislin ter eterična olja. Identifikacijo številnih hlapnih vonjalnih sestavin v medu omogoča plinska kromatografija (Golob in sod., 2008).

Okus medu je sladek predvsem zaradi vsebnosti fruktoze. Ta je dvainpolkrat slajša kot glukoza in enainpolkrat slajša kot saharoza. Okus medu je odvisen od razmerja med različnimi sladkorji, kislinami in mineralnimi snovmi, zato se pri različnih vrstah medu lahko precej razlikuje. Drugi okus, ki ga ocenjujemo v medu, zlasti v različnih cvetličnih medovih, je kisel. Povzročajo ga različne organske in anorganske kisline. Precej manj, če izvzamemo kostanjev med, v medu zaznamo grenkost. Okusa po slanem pa v medu tako rekoč ne zaznamo, zato je zaznavanje slanosti znak tujega, neznačilnega okusa (Golob in sod., 2008).

Skupna zaznava vonjalnih, okušalnih in tipnih zaznav v ustih oblikuje t.i. značilno aromo. Za posamezne vrste medu je značilna specifična aroma, ki je ne odlikuje samo značilna nota, ampak tudi različna intenzivnost in obstojnost. Pri ocenjevanju arome je poleg značilnosti pomembna tudi obstojnost. Aromatične snovi so precej hlapne, hitro hlapijo zlasti pri višjih temperaturah. K aromi medu prispevajo različne organske spojine, kot so alkoholi (alifatski ali aromatski), aldehidi, ketoni ter kisline in njihovi estri (Golob in sod., 2008).

Med, ki ga senzorično ocenjujemo, mora ustrezati zahtevam Pravilnika o senzoričnem ocenjevanju (2010). Pravilnik vsebuje člene, kriterije in pogoje, na osnovi katerih preskuševalci ocenijo vzorce medu.

Preskuševalec medu samostojno oceni videz, vonj, okus in aromo vsakega vzorca medu. Pri ocenjevanju preskuševalci lahko uporabijo tudi 0,5 točke.

Ocenjevanje videza je razdeljeno na:

ocenjevanje čistosti: od 1 do 3 točke

ocenjevanje barve: od 1 do 4 točke

ocenjevanje bistrosti: od 1 do 3 točke

Najmanjši seštevek točk pri skupni oceni videza je 3 točke in največji 10 točk.

Ocenjevanje vonja: od 1 do 5 točk

Ocenjevanje okusa: od 1 do 5 točk

Ocenjevanje arome je razdeljeno na:

ocenjevanje vrstne značilnosti: od 1 do 6 točk

ocenjevanje obstojnosti arome: od 1 do 4 točke

Najmanjši seštevek točk pri skupni oceni arome je 2 točki in največji 10 točk.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPREDELITEV NALOGE

Cilj naloge je bil spremljati vsebnost HMF v medu v daljšem časovnem obdobju (v 18-ih mesecih) in ugotoviti vpliv skladiščenja (tema, svetloba) na povečanje vsebnosti HMF po 6-ih, 12-ih in 18-ih mesecih. Sveže vzorce medu smo najprej senzorično ocenili, jim izmerili absorpcijske spektre in opravili meritve različnih parametrov kakovosti.

3.2 VZORCI

Začetna senzorična analiza je bila izvedena na 151 vzorcih medu. Vzorci so bili dostavljeni neposredno od čebelarjev v steklenih kozarcih.

Na osnovi rezultatov senzorične analize smo izbrali tipične vzorce posamezne vrste medu. Razdelitev vzorcev v štiri skupine je podana v preglednici 3.

Preglednica 3: Pregled števila in oznake vzorcev posamezne vrste medu

Vrsta medu	Število vzorcev	Oznaka vzorca
nektarni med	7	A01, A02, A04, A06, C23, C25, C31
manin med	7	G03, G05, G06, H04, M16, M17, M21
kostanjev in lipov	6	K17, K33, K36, K37, L01, L02
škržatov	4	Š01, Š04, Š10, Š12

nektarni med: 4 vzorci akacijevega medu in 3 vzorci cvetličnega medu

manin med: 3 vzorci gozdnega medu, 1 vzorec hojevega medu in 3 vzorci mešanega medu

kostanjev in lipov med: 4 vzorci kostanjevega medu in 2 vzorca lipovega medu

škržatov med: 4 vzorci

Izbranim 24 vzorcem smo:

- določili vsebnost vode,
- določili vsebnost pepela,
- določili vsebnost HMF,
- določili diastazno število (DN),
- določili vsebnost prostih titrabilnih kislin,
- določili vsebnost prolina,
- izmerili električno prevodnost,
- izmerili pH,
- posneli absorpcijske spektre v ultravijoličnem (UV) območju med 200 in 500 nm.

Po opravljenih analizah smo vsak vzorec razdelili na dva dela, glede na nadaljnje razmere skladiščenja:

- hranjenje v steklenih kozarcih na svetlobi pri sobni temperaturi in
- hranjenje v steklenih kozarcih v temi pri sobni temperaturi.

V tako hranjenih vzorcih smo nato spremljali vsebnost HMF po 6-ih, 12-ih in 18-ih mesecih.

3.3 SENZORIČNO OCENJEVANJE MEDU

Senzorično analizo medu smo izvedli na neseGREtem medu, ki je bil v originalnih steklenih kozarcih. Senzorično ocenjevanje medu je izvedla laboratorijska ocenjevalna komisija, sestavljena iz šestih preskuševalcev. Ocenjevali smo naslednje lastnosti: barvo, vonj, okus in aromo. Stopnjo izraženosti posamezne lastnosti smo ocenili s točkovanjem z ocenami od 0 - 5.

Ocena barve medu (1 - 5 točk), pri čemer pomeni:

Ocena 1 točk: barva sploh ni izražena za določeno vrsto medu

Ocena 3 točk: temnejši oziroma svetlejši odtenek sicer značilne barve

Ocena 5 točk: barva je značilna, optimalna za med določene vrste

Ocena vonja medu (1 - 5 točk), pri čemer pomeni:

Ocena 1 točk: netipičen, neznačilen, tuj vonj

Ocena 3 točk: manj izrazit, vendar tipičen vonj, značilen za določeno vrsto medu

Ocena 5 točk: izrazit, optimalno izražen vonj, značilen za določeno vrsto medu

Ocena arome medu (1 - 5 točk), pri čemer pomeni:

Ocena 1 točk: netipičen na aromo, prisotnost tujih priokusov

Ocena 3 točk: aroma manj izrazita, značilna za določeno vrsto medu

Ocena 5 točk: tipična in intenzivno izražena aroma, značilna za določeno vrsto medu

Barve nismo ocenjevali pri cvetličnih in mešanih medovih, ker imajo širok spekter barve.

Naštete senzorične lastnosti, tipične za posamezno vrsto medu, so odvisne od posameznih komponent v medu (barvil, vsebnost beljakovin, aminokislin, sladkorjev, organskih kislin, mineralnih snovi, encimov), ravnanja med skladiščenjem, embalaže.

3.4 MERJENJE ABSORPCIJSKIH SPEKTROV MEDU V UV-OBMOČJU

2 % vodni raztopini suhe snovi medu smo izmerili absorpcijski spekter v območju 200 do 500 nm z UV-spektrofotometrom (UV visible recording spectrophotometer, UV-16A2, SHIMADZU).

3.5 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE

3.5.1 Določanje vsebnosti vode z ročnim refraktometrom (AOAC 969.38, 1999)

Princip:

Metoda temelji na refraktometrijskem določanju vsebnosti vode.

Pribor:

- steklena čaša
- steklena palčka
- refraktometer, ATAGO, HHR-2N

Izvedba:

V primeru, da je med tekoč, ga pred začetkom analize premešamo s palčko. Če je med kristaliziran, damo zaprto posodo z vzorcem v sušilnik in segrevamo pri temperaturi 40 °C, dokler se ne utekočini. Nato ga hitro ohladimo. Tako pripravljenemu vzorcu določimo vsebnost vode pri konstantni temperaturi 20 °C. S stekleno palčko naneseemo tanko plast medu na prizmo refraktometra in na skali odčitamo vsebnost v %. Upoštevamo tudi temperaturni popravek.

3.5.2 Določanje električne prevodnosti z laboratorijskim konduktometrom (Kropf in sod., 2008)

Princip:

Merjenje električne prevodnosti 20 % vodne raztopine medu (glede na suho snov v medu) s konduktometrom pri temperaturi 20 °C.

Pribor:

- konduktometer, ISKRA, MA 5950
- steklena palčka
- steklena čaša

Izvedba:

Odtehta medu je odvisna od količine vode, ki jo med vsebuje. Po določanju vsebnosti vode v medu preračunamo, kakšna mora biti odtehta medu, da bo končna raztopina (100 g) vsebovala 20 utežnih % suhe snovi (w/w). S stekleno palčko mešamo, da se med popolnoma raztopi. Konduktometer pred začetkom merjenja umerimo z 0,1 M raztopino kalijevega klorida. Pred merjenjem elektrodo speremo z destilirano vodo in obrišemo do suhega. Elektrodo potopimo v merjeno raztopino in izmerimo električno prevodnost.

Rezultat:

Vrednost, ki se prikaže na zaslonu, je električna prevodnost v mS/cm ali v μ S/cm, rezultat podamo kot mS/cm.

3.5.3 Določanje vsebnosti celokupnega pepela (AOAC 920.181, 1999)

Princip:

Suhi sežig vzorca pri temperaturi 600 °C do konstantne mase.

Pribor:

- žarilni lonček
- električna kuhalna plošča
- žarilna peč

Izvedba:

V prežarjen in stehtan žarilni lonček odtehtamo 3 - 5 g vzorca ($\pm 0,0001$ g) in ga segrevamo na električni kuhalni plošči, dokler večji del vode ne izpari. Ostanek žarimo v žarilni peči pri 600 °C do konstantne mase. Ohladimo in tehtamo.

Račun:

$$\text{vsebnost pepela [g/100 g]} = \frac{b}{a} \cdot 100 \quad \dots(2)$$

a - odtehta vzorca (g)

b - masa pepela (g)

3.5.4 Določanje vrednosti pH v medu (Bogdanov in sod., 1997)Princip:

S pH metrom izmerimo vrednost pH vodne raztopine medu.

Izvedba:

Odtehtamo 10 g $\pm 0,01$ g medu, dodamo 25 mL destilirane vode in s stekleno palčko premešamo, da se ves med raztopi. S predhodno umerjenim pH metrom takoj izmerimo vrednost pH.

3.5.5 Določanje vsebnosti prostih titrabilnih kislin (AOAC 962.19, 1999)Princip:

Titracija vzorca z 0,05 M NaOH do pH 8,5. Dodatek 10 mL 0,05 M NaOH in titracija z 0,05 M HCl do pH 8,3.

Reagenti:

- 0,05 M NaOH
- 0,05 M HCl

Pribor:

- čaša

- magnetno mešalo
- pH meter

Izvedba:

- Vzorec: v čašo odtehtamo $10 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ vzorca in ga raztopimo v 75 mL destilirane vode, dodamo magnet in na magnetnem mešalu mešamo ves čas titracije. Po umerjanju pH metra potopimo elektrode pH metra v raztopino in zabeležimo vrednost pH. Temu sledi titracija z 0,05 M NaOH do pH 8,5. Nato dodamo 10 mL 0,05 M NaOH in titriramo z 0,05 M HCl do pH 8,3.
- Slep vzorec: 85 mL destilirane vode titriramo z 0,05 M NaOH do pH 8,5.

Račun:

Kislota izrazimo kot miliekvivalent na kg vzorca:

$$\text{vsebnost prostih kislin (PK) [meq/kg]} = (a - b) \cdot C_{(\text{NaOH})} \cdot 100 \quad \dots(3)$$

a - poraba 0,05 M NaOH pri titraciji vzorca (mL)

b - poraba 0,05 M NaOH pri titraciji slepega vzorca (mL)

$C_{(\text{NaOH})}$ - točna koncentracija NaOH

3.5.6 Določanje vsebnosti prolina z Oughovo spektrofotometrično metodo,

prilagojeno po Bogdanovu (1997)

Princip:

Prolin in ninhidrin tvorita rumeno barvni kompleks. Po dodatku 2-propanola merimo absorbanco v raztopini vzorca in referenčni (standardni) raztopini pri valovni dolžini 510 nm. Delež prolina v vzorcu medu 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(-)-prolin: vakuumsko osušen prolin hranimo do uporabe v eksikatorju.
- 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.
- Delovna raztopina prolina (0,032 mg/mL): 1 mL standardne raztopine prolina z destilirano vodo razredčimo do 25 mL. Vsak dan pripravimo svežo delovno raztopino.

- Izopropanol (2-propanol): izopropanol razredčimo z destilirano vodo v enakem razmerju (1:1).
- Mravljična kislina (HCOOH): 98 - 100 % mravljična kislina

Aparatura:

ISKRA-ZEISS digitalni spektrofotometer SPEKOL 20; meritve so izvedene pri valovni dolžini 510 nm.

Izvedba:

- Priprava raztopine vzorca medu: 2,5 g medu odtehtamo v čašo, dodamo približno 10 mL destilirane vode in vzorec kvantitativno prenesemo v 50 mL bučko. Bučko dopolnimo z destilirano vodo do oznake in vsebino dobro pretresemo.
- Določanje: V dve epruveti odpipetiramo 0,5 mL raztopine medu, v drugi dve epruveti 0,5 mL destilirane vode (slepi vzorec) in v tri epruvete 0,5 mL standardne raztopine prolina. V vsako epruveto dodamo 1 mL mravljične kisline ter 1 mL raztopine ninhidrina. Dobro zapremo in 15 minut mešamo na stresalniku. Temu sledi 15 minutno termostatiranje v vreli vodni kopeli, nato še 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 kiveti poti 1 cm.

Račun:

Rezultat je podan kot masni delež - mg prolina/kg medu, kar izračunamo po enačbi (4):

$$\text{vsebnost prolina [mg/kg]} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot \frac{E_1}{E_2} \cdot R \quad \dots(4)$$

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

3.5.7 Določanje vsebnosti HMF z metodo po Winklerju (Bogdanov in sod., 1997)Princip:

Princip metode temelji na reakciji HMF z barbiturno kislino in p-toluidinom, pri čemer nastane spojina rožnate barve, ki ji izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 550 nm.

Aparatura:

ISKRA-ZEISS digitalni spektrofotometer SPEKOL 20; meritve so izvedene pri valovni dolžini 550 nm.

Reagenti:

- Raztopina barbiturne kisline: odtehtamo 500 mg barbiturne kisline in jo s 70 mL vode prenesemo v 100 mL merilno bučko. Raztopino damo v vodno kopel, da se popolnoma raztopi in ohladimo ter dopolnimo z destilirano vodo do oznake.
- Raztopina p-toluidina: odtehtamo 10 g p-toluidina in ga s počasnim segrevanjem na vodni kopeli raztopimo v približno 50 mL izopropanola. Skupaj z izopropanolom ga prenesemo v 100 mL merilno bučko in dodamo 10 mL ledocetne kisline, ohladimo in dopolnimo z izopropanolom do oznake. Raztopino hranimo v temnem prostoru in je ne uporabimo najmanj 24 ur.
- Destilirana voda brez kisika: destilirano vodo prepriamo z dušikom.

Izvedba:

Odtehtamo 10 g vzorca medu in ga brez segrevanja raztopimo v 20 mL destilirane vode. Nato raztopino prenesemo v 50 mL merilno bučko in dopolnimo do oznake. S pipeto odmerimo 2 mL tako pripravljene raztopine medu in jo prenesemo v vsako od dveh epruvet ter dodamo 5 mL p-toluidina. V eno od epruvet odmerimo s pipeto 1 mL vode, v drugo pa 1 mL barbiturne kisline in nato vsebino dobro premešamo. Epruveto, v katero smo dali destilirano vodo, uporabimo kot slepi vzorec. Reagente moramo dodajati brez prekinitve v eni do dveh minutah. Ko intenziteta barve doseže maksimum (3 do 4 minut), odčitamo absorbanco pri 550 nm v 1 cm kivetu. Vsebnost HMF izrazimo v mg/kg medu.

Račun :

$$\text{vsebnost HMF medu [mg/kg]} = (A_{\text{vz}} - A_{\text{sl}}) \cdot 192 \quad \dots(5)$$

A_{vz} - izmerjena absorbanca raztopine vzorca

A_{sl} - izmerjena absorbanca slepega vzorca

Ocena:

Vsebnost HMF v medu ne sme presegati 40 mg/kg (Pravilnik o medu 2011).

3.5.8 Spektrofotometrično določanje aktivnosti encima diastaze z metodo po Schadeju (Bogdanov in sod., 1997)

Princip:

Enourna hidroliza 1 % raztopine škroba z encimom iz 1 g medu pri temperaturi 40 °C, ki se po dodatku joda in nastanku modro obarvanega produkta spremlja z merjenjem absorbance pri 660 nm v določenih časovnih intervalih.

Aparatura:

ISKRA-ZEISS digitalni spektrofotometer SPEKOL 20

Reagenti:

- Osnovna raztopina joda (0,07 M): odtehtamo 8,8 g joda p.a., pomešamo z 22 g kalijevega jodida in raztopimo v 30 - 40 mL vode, nato razredčimo do enega litra.
- Razredčena raztopina joda (0,0007 M): v 30 - 40 mL vode raztopimo 20 g kalijevega jodida p.a, prelijemo v 500 mL bučko, dodamo 5 mL osnovne raztopine in dopolnimo z vodo do oznake.
- Acetatni pufer (pH = 5,3): V 400 mL vode raztopimo 87 g natrijevega acetata ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), dodamo približno 10,5 mL ledocetne kisline in dopolnimo z vodo do 500 mL. Če je potrebno, uravnamo pH vrednost z natrijevim acetatom do 5,3.
- 0,5 M raztopina natrijevega klorida: Raztopimo 14,5 g natrijevega klorida v prekuhani destilirani vodi in dopolnimo do 500 mL.
- Raztopina škroba: V 250 mL erlenmajerjevi buči odtehtamo določeno količino škroba, ki ustreza masi 2 g brezvodnega škroba in pomešamo z 90 mL vode. Raztopino takoj segrejemo nad gorilnikom in pustimo zmerno vreti tri minute. Raztopino odstranimo z gorilnika, pokrijemo in pustimo, da se postopoma ohladi do sobne temperature. Raztopino prenesemo v 100 mL merilno bučko in postavimo na vodno kopel, segreto na 40 °C. Ko raztopina doseže omenjeno temperaturo, jo dopolnimo z vodo do oznake.

Izvedba:

Priprava vzorca za določanje: v 50 mL čašo odtehtamo 10 g vzorca, dodamo 5 mL acetatnega pufra (pH = 5,3) in 20 mL vode ter premešamo, da se raztopi. Raztopino kvantitativno prenesemo v 50 mL merilno bučko, dodamo 3 mL raztopine natrijevega klorida in dopolnimo z vodo do oznake.

Priprava standardne raztopine škroba: s pipeto odmerimo 5 mL raztopine škroba, segretega na 40 °C in 10 mL vode ter dobro premešamo. V drugo čašo odmerimo s pipeto 1 mL pripravljene mešanice in 10 mL razredčene raztopine joda. Razredčimo s toliko mL vode, da je vrednost ekstinkcije pri 660 nm $0,76 \pm 0,020$ (proti slepemu vzorcu).

Merjenje absorbance: S pipeto odmerimo 10 mL raztopine medu in jo prenesemo v 50 mL valj ter damo v vodno kopel pri temperaturi 40 °C skupaj s posodo, v kateri je raztopina škroba. Po 15 minutah odmerimo s pipeto 5 mL raztopine škroba in jo dodamo v raztopino medu, premešamo in vključimo uro. V petminutnih presledkih odmerimo 1 mL raztopine vzorca in jo dodamo v 10 mL razredčene raztopine joda v merilnem valju. Premešamo,

razredčimo z ustreznim volumnom vode (določili smo ga pri pripravi standardne raztopine) in takoj izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 660 nm. Postopek ponavljamo dokler absorbanca ne pade pod vrednost 0,235. Če absorbanca pade pod vrednost 0,235 že prej kot v 15-ih minutah, odvezemamo alikvote v krajših časovnih intervalih.

Izračun:

V grafikon vrišemo vrednost absorbance kot časovne funkcije (min). Skozi najmanj tri zadnje točke potegnemo premico, da določimo čas (t), ko reakcijska zmes doseže vrednost absorbance 0,235. Število 300 delimo s tem časom, izraženim v minutah in dobimo število diastaze (DN).

To število izraža aktivnost diastaze kot volumen (mL) 1 % raztopine škroba, ki je z encimom iz 1 g medu eno uro hidrolizirana pri temperaturi 40 °C.

$$\text{diastazno število} = \frac{60}{t} \cdot \frac{0,10}{0,01} \cdot \frac{1,0}{2,0} = \frac{300}{t} \quad \dots(6)$$

t - čas (min)

3.6 STATISTIČNA ANALIZA

Pri statistični analizi so bile uporabljene naslednje metode:

- a. Enovzorčna analiza:
 - aritmetična sredina,
 - standardni odklon,
 - koeficient variabilnosti
- b. Dvovzorčna analiza:
 - koeficient korelacije po Pearsonu,
 - Studenova porazdelitev
- c. Primerjava dveh populacij:
 - Preizkus domneve o razliki povprečij

3.6.1 Enovzorčna analiza

3.6.1.1 Aritmetična sredina ali povprečje

Povprečna vrednost, za katero velja, da če bi bili vsi podatki enaki, bi bili enaki povprečju. Za izračun povprečja lahko uporabimo tri načine: aritmetično sredino, geometrijsko

sredino in harmonično sredino. Način izračunavanja je odvisen od vrste podatkov (Košmelj, 2007).

Aritmetična sredina je najpogostejše uporabljena srednja vrednost. Na vrednost aritmetične sredine vplivajo vse vrednosti. Standardna oznaka za aritmetično sredino podatkov $x_1, x_2, \dots, x_n$ je $\bar{x}$ (povp). Aritmetična sredina je postavljena tako, da je vsota odklonov enaka 0 (Košmelj, 2007).

Aritmetično sredino izračunamo po enačbi 7:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} \quad \dots(7)$$

$\sum x_i$ - vsota posameznih vrednosti

N - število enot

Izjemno velike oziroma izjemno majhne vrednosti, ti. osamelci močno vplivajo na vrednost aritmetične sredine, zato je bolje, da računamo brez teh osamelcev (Košmelj, 2007).

3.6.1.2 Varianca in standardni odklon

Varianca (s^2) je merilo razpršenosti podatkov oz. variiranja okoli aritmetične sredine. Izračunamo jo po enačbi 8, kot povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Kadar je število statističnih enot vzorca manjše od 30, je imenovalec v enačbi zmanjšan za eno (Adamič, 1989).

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N-1} \quad \dots(8)$$

Standardni odmik izračunamo po enačbi 9:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N-1}} \quad \dots(9)$$

3.6.1.3 Koeficient variabilnosti

Za primerjavo variiranja več statističnih spremenljivk z različnimi povprečnimi vrednostmi absolutne mere varianc (kot sta npr. varianca in standardni odklon) običajno niso primerne. Objektivno primerjavo takšnih statističnih spremenljivk nam omogoča koeficient variabilnosti (enačba 10), ki ga izračunamo tako, da standardno deviacijo delimo z aritmetično sredino opazovanega vzorca in dobljeno vrednost izrazimo v odstotkih (Adamič, 1989).

$$KV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \dots(10)$$

3.6.2 Dvovzorčna analiza

Medsebojno analizo dveh spremenljivk (x in y) preučujemo z metodo korelacije in regresije. Na ta način ugotavljamo odnos med dvema spremenljivkama, ali obstaja povezanost med spremenljivkama in kakšne vrste je, ali pa poskušamo na osnovi ene spremenljivke napovedati vrednost druge. Za statistično analizo povezanosti dveh spremenljivk uporabljamo metodo regresije in metodo korelacije (Adamič, 1998).

3.6.2.1 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. Koeficient je enak razmerju med kovarianco (c_{xy}) (enačba 12) in zmnožkom standardnih deviacij za obe spremenljivki x in y (s_x in s_y) (enačba 11).

$$r = \frac{c_{xy}}{s_x \cdot s_y} \quad \dots(11)$$

$$c_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n [(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})] \quad \dots(12)$$

r - koeficient korelacije

c_{xy} - kovarianca

s – standardni odmik

Koeficient korelacije po Pearsonu ima lahko vse vrednosti med - 1 (maksimalno negativna korelacija) in + 1 (maksimalno pozitivna korelacija). Pozitivne vrednosti pomenijo, da vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, negativne pa, da vrednost ene spremenljivke raste, druge pa pada. Vrednost 0 pomeni, da med obema spremenljivkama ni nobene povezave. Na osnovi velikosti koeficienta korelacije lahko sklepamo, kako močna je povezava med statističnimi enotami. Kadar je vrednost koeficienta korelacije nad 0,7, govorimo o močni povezanosti. Velikost koeficienta korelacije pa nam ne pove ničesar o tem, če je povezava značilna (Adamič, 1989). Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti so navedene v preglednici 4.

Preglednica 4: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti spremenljivk

Korelacijski koeficient (<i>r</i>)	Povezanost
od ± 0,00 do ± 0,20	povezanosti ni
nad ± 0,20 do ± 0,40	šibka
nad ± 0,40 do ± 0,70	zmerna
nad ± 0,70 do ± 1,00	močna

3.6.2.2 Studentov *t*-test

Kadar primerjamo dva majhna vzorca, nam standardni odklon vzorcev postane nezanesljiv cenilec za standardni odklon populacije. Preizkus domneve o razlikah med njunima povprečjema zato ne more temeljiti na normalni porazdelitvi, ampak na porazdelitvi *t*. V tem primeru *t*-test sloni še na dodatni predpostavki. Računati je namreč treba skupni standardni odklon za oba vzorca, to pa smemo storiti le, če se varianci obeh vzorcev med seboj ne razlikujeta (Adamič, 1989).

Pri preskušanju ničelne domneve o razliki med povprečjem dveh majhnih neodvisnih vzorcev in v primeru, da sta varianci obeh populacij enaki, uporabljamo enačbo 13 (Košmelj, 2007).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s_{sk}^2 \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad \dots (13)$$

n_1 - število enot v prvem vzorcu

n_2 - število enot v drugem vzorcu

$\bar{x}_1$ - povprečna vrednost prvega vzorca

$\bar{x}_2$ - povprečna vrednost drugega vzorca

V primeru različnih varianc velja enačba (14)

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \dots(14)$$

n_1 - število enot v prvem vzorcu

n_2 - število enot v drugem vzorcu

$\bar{x}_1$ - povprečna vrednost prvega vzorca

$\bar{x}_2$ - povprečna vrednost drugega vzorca

3.6.3 Primerjava dveh populacij

Primerjali bomo parametre verjetnosti porazdelitve za dve populaciji in sicer povprečje dveh normalnih porazdelitev. Vzorca, ki zastopata prvo in drugo populacijo, sta lahko neodvisna ali odvisna (Košmelj, 2007). Vzorca imenujemo neodvisna, če informacija, ki jo dobimo iz prvega vzorca, ni povezana z informacijo, ki jo dobimo iz drugega vzorca (Košmelj, 2007).

3.6.3.1 Preizkus domneve o razliki povprečij

Preizkušali bomo domnevo o razliki dveh povprečnih vrednosti. Ničelna domneva predvideva, da je njuna razlika δ , torej $\delta = \mu_1 - \mu_2$, enaka neki vnaprej določeni vrednosti δ_0 , $\delta_0 \in \mathbb{R}$. Najpogosteje nas zanima, ali je ta razlika enaka nič, torej ali je $\delta_0 = 0$.

Zapišemo ničelno ali alternativno domnevo:

$$H_0: \delta = \mu_1 - \mu_2 = \delta_0 \quad \text{Razlika povprečij je } \delta_0. \quad \dots(15)$$

$$H_1: \delta = \mu_1 - \mu_2 \neq \delta_0 \quad \text{Razlika povprečij ni } \delta_0. \quad \dots(16)$$

Če lahko privzamemo, da sta varianci obeh populacij različni, je testna statistika enaka t (Studentov t -test) iz enačbe 13 (Košmelj, 2007).

Pri statistični analizi naših vzorcev medu smo zapisali ničelno domnevo H_0 : tvorba HMF v medu ni odvisna od načina skladiščenja (svetloba ali tema). Temu sledi alternativna domneva H_1 : tvorba HMF v medu je odvisna od pogojev skladiščenja.

4 REZULTATI

Rezultate podajamo v štirih sklopih. V prvem sklopu so opisane senzorične lastnosti obravnavanih vzorcev medu. Nato smo vzorcem izmerili absorpcijske spektre pri valovni dolžini med 200 in 500 nm, ki so predstavljeni v drugem sklopu. Izmerjene absorpcijske spektre naših vzorcev medu smo primerjali z značilnimi absorpcijskimi spektri posamezne vrste medu. V tretjem sklopu so navedeni rezultati fizikalno-kemijskih parametrov, ki smo jih določili v vseh svežih vzorcih medu. V zadnjem delu so podani rezultati določanja vsebnosti HMF med osemnajstmesečnim skladiščenjem.

4.1 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE MEDU

V preglednici 5 so predstavljeni rezultati senzorične analize vzorcev medu vključenih v diplomsko delo.

Preglednica 5: Rezultati senzorične analize medu

Vrsta medu	Oznaka vzorca	Ocena (0-5 točk) Povprečne vrednosti			Komentar
		barva	vonj	aroma	
nektarni	A01	4,5	3,7	3,8	Barva svetlo rumena. Vonj preveč intenziven. Okus zelo sladek, rahlo kisel. Aroma po cvetlicah.
	A02	4,1	4,0	4,6	Nekoliko preveč rumena barva. Vonj nežen. Aroma šibka, nežna, značilna.
	A04	4,5	3,0	4,0	Barva svetlo rumena. Netipičen vonj. Aroma po cvetlicah.
	A06	5,0	4,0	4,1	Barva značilna - skoraj brezbarven med. Vonj nežen. Okus zelo sladek. Aroma nežna, po cvetlicah.
	C23	/	4,1	5,0	Vonj prijeten, cvetličast. Okus dokaj sladek, in primerno kisel. Odlična in harmonična cvetlična aroma.
	C25	/	4,4	5,0	Vonj dokaj izrazit. Okus sladek, kisel. Odlična in harmonična cvetlična aroma.
	C31	/	4,1	4,5	Vonj nekoliko po kostanjevem medu. Okus sladek, kisel. Intenzivna aroma po sadju.
manin	G03	5,0	4,6	4,7	Barva svetlo rjava. Vonj po satju, po mleku v prahu. Intenzivna aroma, značilna za manin med.
	G05	5,0	4,0	4,2	Barva svetlo rjava. Vonj po karamelu, rahlo po pregretem medu. Aroma premalo značilna, zaznana prisotnost arome kostanjevega medu.
	G06	5,0	4,6	4,9	Barva svetlo rjava. Vonj po smreki. Intenzivna in značilna aroma.
	H04	4,5	4,0	4,0	Barva rjava z zelenim odtenkom. Vonj šibek. Zmerno aromatičen; v aromi zaznana prisotnost arome kostanjevega medu.
	M16	/	4,6	5,0	Vonj značilen. Okus dokaj sladek, le malo kisel. Aroma intenzivna, značilna za mešan med (po cvetlicah in po mani).
	M17	/	4,6	4,5	Vonj značilen. Okus dokaj sladek, malenkost grenek. Aroma intenzivna, zaznana aroma kostanjevega medu.
	M21	/	4,4	3,6	Vonj prijeten, po mentolu. Okus sladek. Aroma po mentolu, značilna za lipov med.

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 5.

Rezultati senzorične analize medu

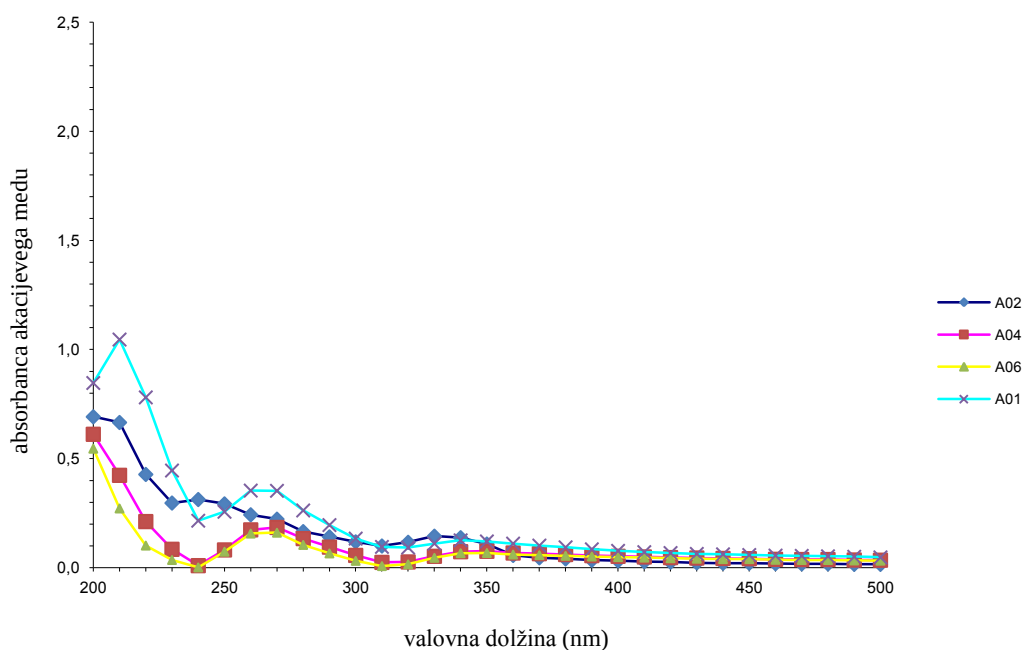
Vrsta medu	Oznaka vzorca	Ocena (0-5 točk) Povprečne vrednosti			Komentar
		barva	vonj	aroma	
kostanjev in lipov	K17	5,0	5,0	4,5	Barva rdečkasto rjava. Vonj harmoničen, značilen za kostanjev med. Okus presladek, grenkoba srednje intenzivna. Aroma premalo intenzivna.
	K33	5,0	3,9	3,9	Barva rdečkasto rjava. Vonj premalo intenziven. Okus dokaj grenek. Aroma srednje intenzivna.
	K36	5,0	5,0	4,8	Barva optimalna, rdečkasto rjava. Vonj zelo intenziven, značilen. Aroma značilna in intenzivna.
	K37	5,0	4,5	4,5	Barva rdečkasto rjava. Izrazit vonj. Značilna, a prešibka aroma.
	L01	4,0	3,9	4,0	Barva nekoliko pretemna. Vonj premalo intenziven. Dokaj izrazita aroma po mentolu.
	L02	4,5	4,3	4,1	Barva svetlo rumena, skoraj optimalna. Vonj premalo intenziven. Aroma značilna, intenzivna aroma po mentolu.
škržatov	Š02	5,0	3,5	3,6	Barva značilna, temno rjava. Vonj po paradižnikovi juhi. Grenek pookus. Aroma po zažganem in kovini.
	Š04	4,9	3,3	3,1	Barva skoraj črna. Vonj intenziven, neprijeten. V okusu zaznano grenko, kislo in sladko. Aroma zmerno izrazita, po zažganem sladkorju, zaznana aroma kostanjevega medu.
	Š10	4,9	3,9	4,1	Barva zelo temno rjava. Vonj po zažgani marmeladi. Okus grenek. Aroma po karamelu.
	Š12	4,9	3,1	3,1	Barva temno rjava. Vonj po zažganem. Aroma neprijetna, po paradižnikovi juhi.

4.2 REZULTATI MERJENJA ABSORPCIJSKIH SPEKTROV MEDU

Na slikah 1 do 8 so predstavljeni absorpcijski spektri analiziranih vzorcev medu, ki smo jih izbrali na podlagi senzorične analize.

Za razumevanje spektrov in komentar smo se oprli na rezultate predhodnih raziskav, opravljenih na Katedri za vrednotenje živil (Buzuk, 1995; Šmit, 1997; Sirnik, 2002; Veselič, 2006), kjer so objavljeni spektri, značilni za posamezno vrsto medu.

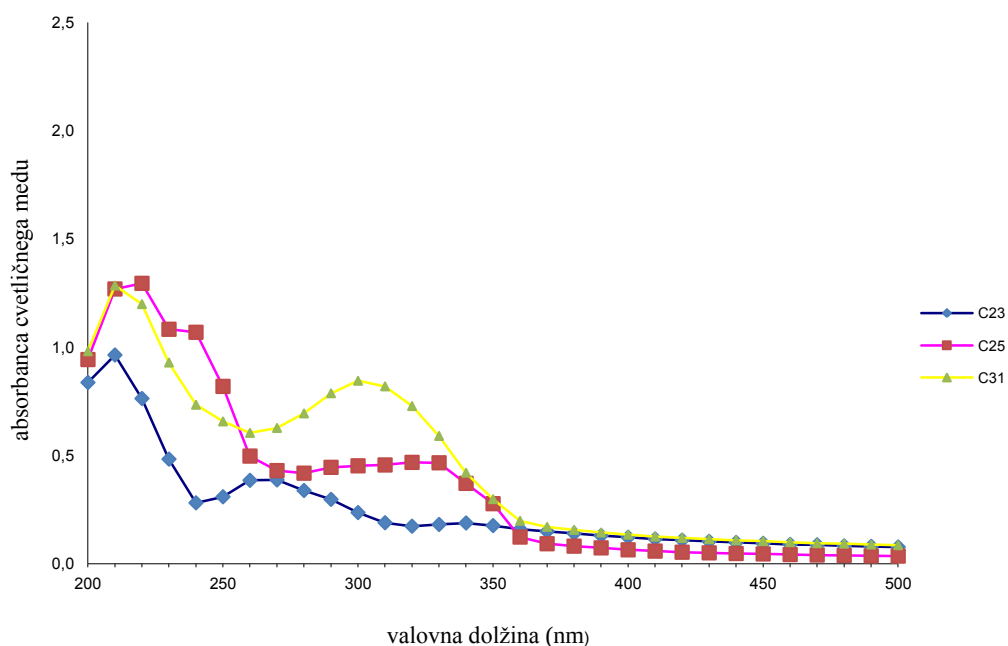
S slike 1 je razvidno, da so si trije vzorci akacijevega medu (A02, A04, A06) zelo enotni in značilni za spekter akacijevega medu ter imajo najvišjo vrednost absorbance pri valovni dolžini 200 nm. Spektri naših vzorcev akacijevega medu imajo lokalni maksimum okoli valovne dolžine 260 nm, kjer imajo vrednost absorbance nižjo od 0,5. Podoben potek funkcije spektra akacijevega medu navaja tudi Veselič (2006). Spekter vzorca A01 nekoliko izstopa in je podoben spektru cvetličnega medu. Če upoštevamo še senzorično oceno za vzorec A01 lahko zaključimo, da omenjeni vzorec spominja na cvetlični med.



Slika 1: Absorpcijski spektri akacijevega medu

Spekter akacijevega medu je padajoča funkcija, ki ima neizrazit lokalni maksimum v območju valovne dolžine med 260 in 270 nm. Vrednost absorbance A pri lokalnem maksimumu je pod 0,4 (Veselič, 2006). Sirnik (2002) navaja, da ima spekter akacijevega medu najvišjo vrednost absorbance A pri valovni dolžini 200 nm. Pogosto je ta vrednost absorbance A pod 2,5. Že pri valovni dolžini 230 pa absorbance A pade pod 0,5 in te vrednosti do valovne dolžine 400 nm ne doseže več (Sirnik, 2002).

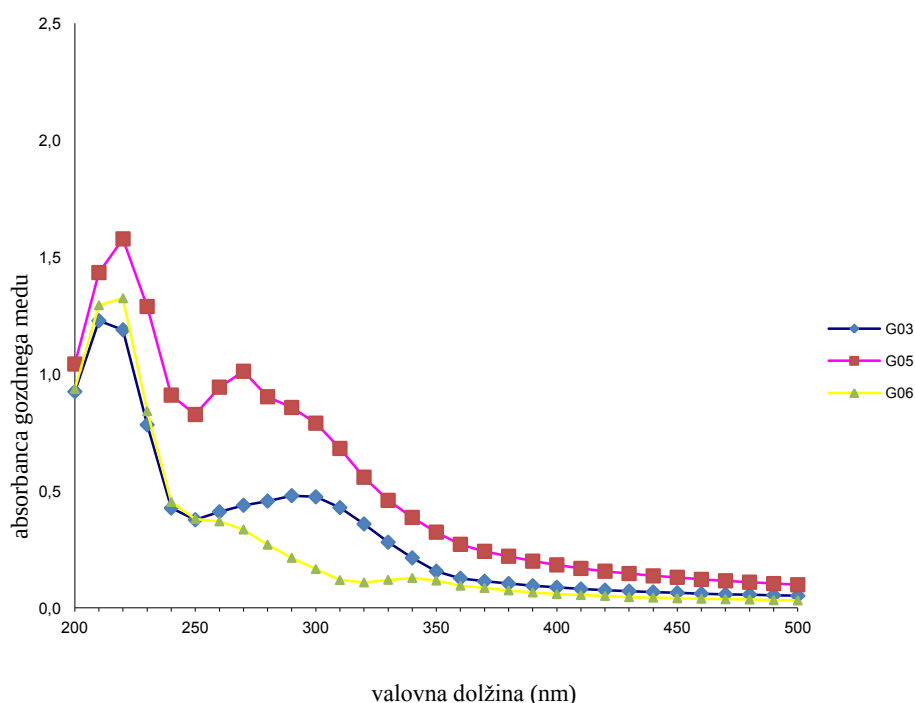
Cvetlični med spada med nektarni med in lahko vsebuje različne vire nektarja. Zato nima značilnega spektra. Spektri so različni in se lahko med sabo prekrivajo z drugimi spektri posameznih vrst medu, npr. s spektri gozdnega in smrekovega medu (Veselič 2006). Iz primerjave spektrov, ki jih navajata Sirnik (2002) in Veselič (2006) lahko sklepamo, da naši vzorci nimajo značilnega spektra cvetličnega medu (slika 2). Vsi trije spektri vzorcev (C23, C25 in C31) se prekrivajo s spektri maninega medu. Pri senzorični oceni vzorca C31 smo navedli, da ima vonj po kostanju in tudi spekter je bolj podoben spektru kostanjevega medu. Na osnovi teh dveh podatkov bi lahko ocenili, da vzorec C31 ni značilen predstavnik cvetličnega medu.



Slika 2: Absorpcijski spektri cvetličnega medu

Spekter značilnega cvetličnega medu ima obliko monotonno padajoče funkcije. Padec absorbance ni tako strm. Vrednost absorbance A pade na vrednost okoli 0,8 pri valovni dolžini 240 nm. V območju valovne dolžine med 240 in 270 nm je krivulja skoraj vodoravna, nato pa začne ponovno padati (Sirnik 2002).

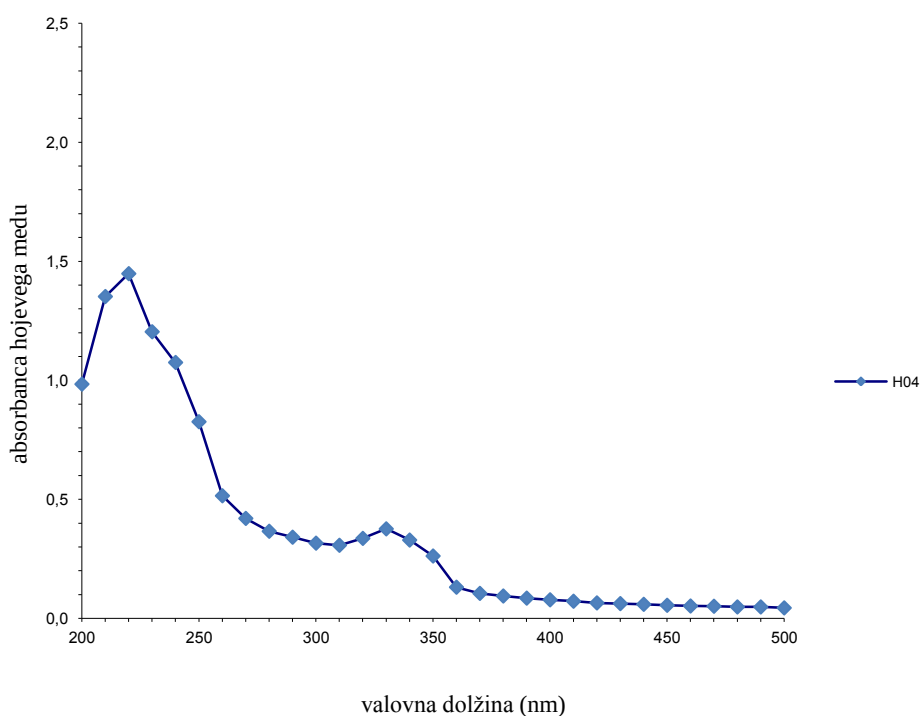
Gozdni med ne spada med sortni med. Iz spektrov predstavljenih na sliki 3 je razvidno, da vzorci gozdnega medu (G03, G05 in G06) nimajo značilnega spektra, ki sta ga opisali Sirnikova (2002) in Veseličeva (2006). Buzuk (1995) in Šmit (1997) pa navajata, da je spekter gozdnega medu lahko različen. Še najbolj se značilnemu spektru gozdnega medu približa vzorec G06, v katerem smo s senzorično analizo zaznali aromo po smrekovem medu. Spekter smrekovega medu je zelo podoben spektru gozdnega medu (Sirnik, 2002; Veselič, 2006). Po opisu značilnega spektra hojjevega medu lahko sklepamo, da vzorec G03 spominja na hojev med. Tudi pri senzorični oceni arome smo ocenili, da je v vzorcu G03 izražena aroma hojjevega medu. Spekter vzorca gozdnega medu G05 pa je podoben spektru kostanjevega medu.



Slika 3: Absorpcijski spektri gozdnega medu

Spekter gozdnega medu ima obliko monotone padajoče funkcije, brez lokalnega maksimuma in minimuma. Za spekter je značilen hiter padec absorbanca A na vrednost 0,9 že pri valovni dolžini 240 nm (Sirnik, 2002).

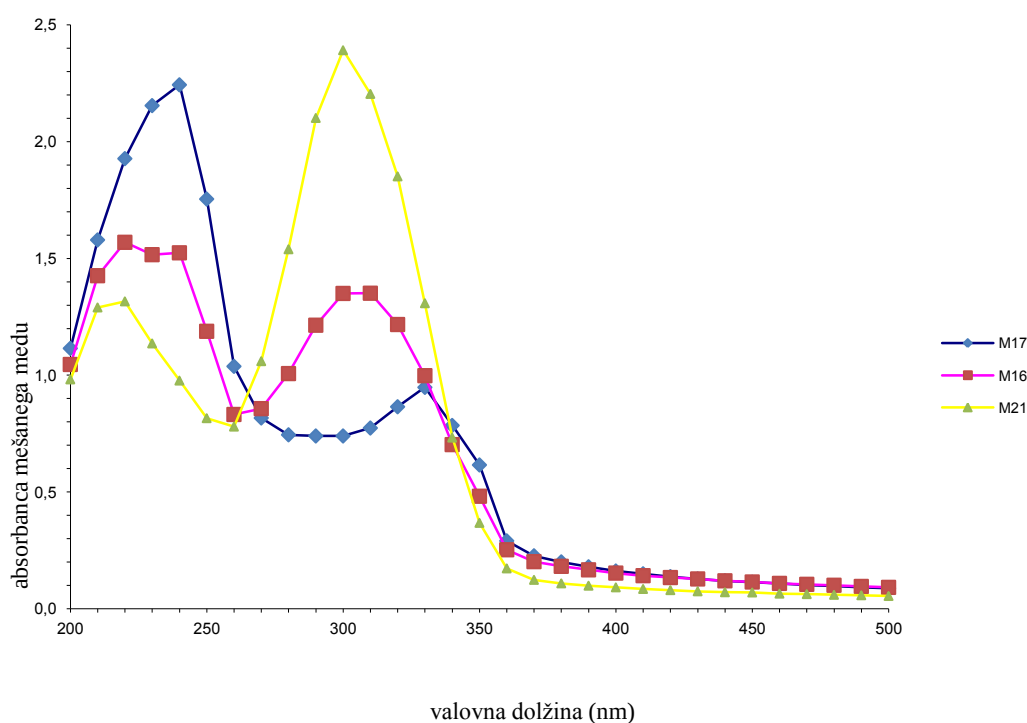
V absorpcijskem spektru hojevega medu (slika 4) vidimo pri valovni dolžini 220 nm absorpcijski maximum, ki je zelo blizu maksimumu, značilnemu za kostanjev med (Šmit, 1997). Tudi senzorična ocena vzorca hojevega medu H04 je pokazala, da ima omenjeni vzorec prisotno aromo kostanjevega medu. Na podlagi tega lahko povzamemo, da vzorec hojevega medu H04 ni značilen hojev med.



Slika 4: Absorpcijski spekter hojevega medu

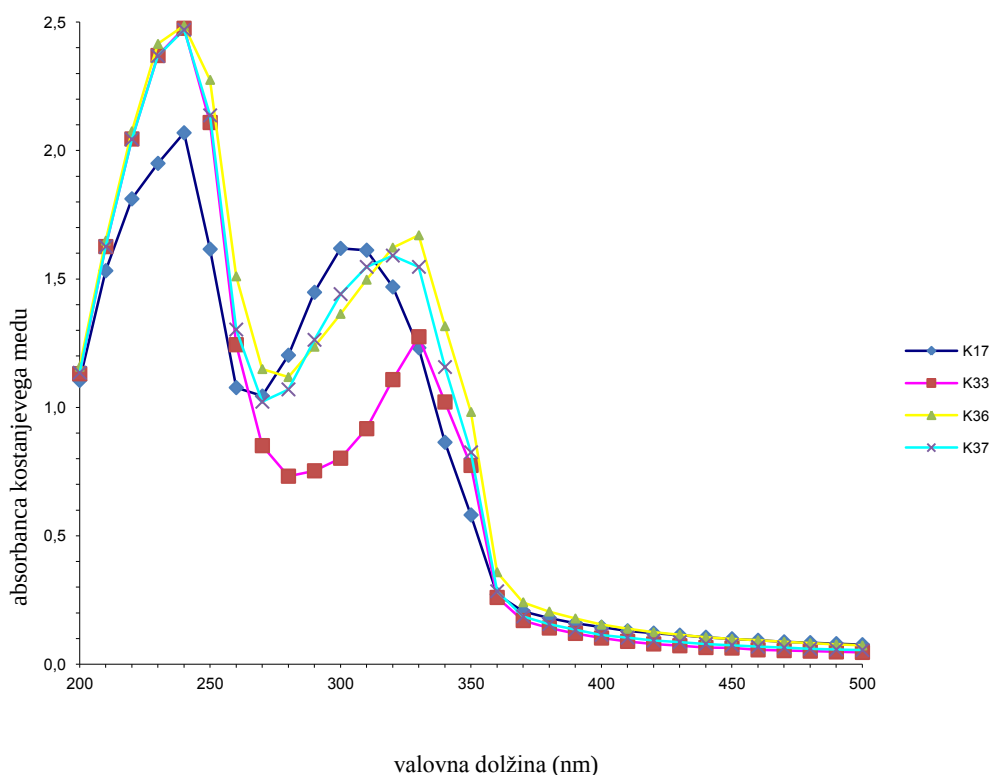
Tudi spekter značilnega hojevega medu je značilna monotona padajoča funkcija. Lahko jo razdelimo na dva dela: do valovne dolžine 240 nm funkcija strmo pada, od tu naprej pa se strmina zmanjša in funkcija dobi obliko linearne funkcije z negativnim odklonom (Sirnik, 2002).

Mešani med vsebuje cvetlični nektar kakor tudi gozdno mano. Spektri so zato različni. Slika 5 prikazuje absorpcijske spektre vzorcev mešanega medu. Spekter vzorca M21 ustreza značilnemu spektru lipovega medu. To potrjuje tudi senzorična analiza tega vzorca medu, kjer smo ugotovili, da ima vzorec intenziven vonj in aromo po mentolu, kar je značilno za lipov med. Spekter vzorca M17 ima maksimum pri valovni dolžini 240 nm, kar je značilno za spekter kostanjevega medu, čeprav s senzorično analizo nismo opazili senzoričnih lastnosti, značilnih za kostanjev med.



Slika 5: Absorpcijski spektri mešanega medu

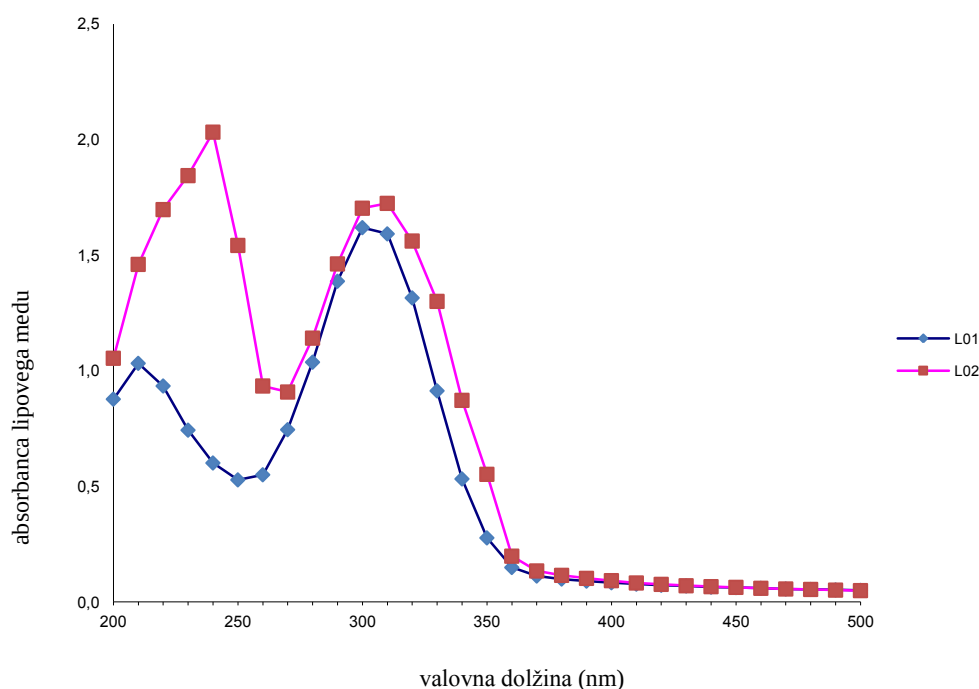
Primerjava absorpcijskih spektrov vzorcev kostanjevega medu (slika 6) s karakterističnim spektrom kostanjevega medu, ki ga podajata Sirnikova (2002) in Veseličeva (2006) je pokazala, da imajo trije vzorci (K33, K36, K37) značilno obliko spektra kostanjevega medu, medtem ko spekter vzorca K17 spominja na lipov med. Senzorična analiza vzorcev kostanjevega medu je potrdila, da gre v vseh treh primerih (K33, K36, K37) za značilne predstavnike kostanjevega medu.



Slika 6: Absorpcijski spektri kostanjevega medu

Za kostanjev med je značilno, da absorbanca A pade pod 2,5 šele pri valovni dolžini 240 nm in doseže minimum pri valovni dolžini med 260 in 270 nm, kjer je vrednost absorbance A okoli 1. Za funkcijo kostanjevega spektra je značilen prevoj pri valovni dolžini okoli 350 nm, kjer je vrednost absorbance A okoli 1,2 (Sirnik, 2002).

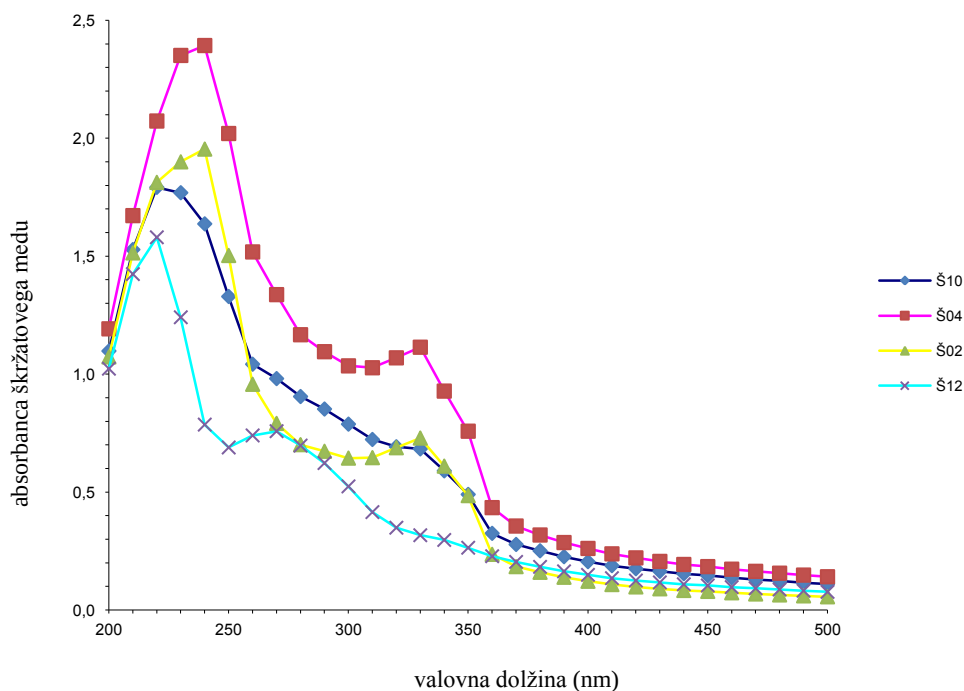
Primerjava absorpcijskih spektrov vzorcev lipovega medu pokaže, da sta spektra obeh vzorcev L01 in L02 med seboj podobna v drugem delu funkcije (slika 7). Podobna sta spektrom, ki jih navaja Šmit (1997), vendar nista značilna predstavnika spektra lipovega medu. Manjše odstopanje spektra za vzorec L02 pripisujemo prisotnosti kostanjevega medu, kar je potrdila tudi senzorična analiza. Sirnik (2002) omenja, da spekter kostanjevega medu doseže minimum pri valovni dolžini med 250 in 260 nm, in maksimum okoli 300 nm, kar velja za naš vzorec L01. Tudi senzorična analiza pokaže, da dani vzorec ni značilen predstavnik lipovega medu. Vzorec L02 pa ima maksimalno vrednost pri valovni dolžini 240 nm, kar je značilno za kostanjev med, vendar pa je absorbanca A maksimuma pri valovni dolžini 240 nm nižja od 2,5, kar pa ni značilno za spekter kostanjevega medu. Vrednost absorbance pri določeni valovni dolžini za značilen spekter določene vrste medu je odvisna od vsebnosti cvetnega prahu sortnega medu in ostalega cvetnega prahu. Iz tega lahko sklepamo, da sta vzorca L01 in L02 mešanici kostanjevega in lipovega medu.



Slika 7: Absorpcijska spektra lipovega medu

Spekter lipovega medu ima izrazit lokalni maksimum pri valovni dolžini 300 nm, kjer je absorbanca A okoli 2,0. Funkcija ima minimum pri valovni dolžini med 250 in 260 nm, kjer je absorbanca A 0,7 (Sirnik 2002). Tudi Veseličeva (2006) navaja, da ima spekter lipovega medu maksimum pri valovni dolžini med 290 in 300 nm, vendar pa navaja vrednost absorbance A med 1,8 in 2,5.

Naši vzorci škrdatovega medu nimajo značilnega spektra za škrdatov med, kot ga navaja Sirnik (2002). Vsi štiri vzorci imajo skladen potek funkcije (slika 8). Vzorec Š12, ki ima nižje vrednosti vrhov absorbanc, in vzorec Š10 imata potek funkcije podoben značilnemu spektru cvetličnega medu. Sklepali bi lahko, da gre za cvetlični med. Vendar s senzorično analizo tega nismo potrdili. Ko smo spektre primerjali še s preostalimi spektri drugih vrst medu, smo ugotovili, da sta vzorca Š04 in Š02 precej podobna spektrom kostanjevega medu. Senzorična analiza pa tega ni potrdila.



Slika 8. Absorpcijski spekter škrdatovega medu

Za spekter škrdatovega medu je značilen hiter padec absorbance A na vrednost 1,2 pri valovni dolžini 250 nm. Funkcija ima lokalni maksimum pri vrednosti absorbance A okoli 1,3 in valovni dolžini okoli 270 nm. Od tu naprej funkcija pada z manjšim naklonom. (Sirnik 2002).

4.3 REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE

Fizikalno-kemijski del diplome je obsegal določanje vsebnosti vode, pepela, HMF, prostih titrabilnih kislin in prolina. Vzorcem smo izmerili tudi električno prevodnost in vrednost pH ter aktivnost encima diastaze. Analize so bile opravljene na 24-ih svežih vzorcih medu. Vzorce smo razdelili v štiri skupine (nektarni med, manin med, kostanjev in lipov med ter škržatov med). Rezultate za posamezne fizikalno-kemijske parametre smo opisali z osnovnimi statističnimi parametri in jih obdelali z različnimi statističnimi metodami. S pomočjo slednjih smo iskali razlike in povezave med analiziranimi parametri.

Fizikalno-kemijski parametri svežih vzorcev medu so podani v preglednici 6.

Preglednica 6: Fizikalno-kemijski parametri v svežih vzorcih različnih vrst medu

Vrsta medu	Vzorec	Vsebnost vode (g/100 g)	Vrednost pH	Vsebnost prostih kislin (meq/kg)	Električna prevodnost (mS/cm)	Vsebnost HMF (mg/kg)	Vsebnost pepela (g/100 g)	Vsebnost prolina (mg/kg)	DN
nektarni	A01	18,83	4,0	37,0	0,447	4,01	0,070	254,9	69,7
	A02	14,68	4,3	33,0	0,297	3,05	0,025	253,8	23,4
	A04	16,66	4,2	23,0	0,291	0,54	0,086	256,0	46,8
	A06	15,27	4,2	35,0	0,241	2,39	0,102	257,1	41,6
	C23	15,24	4,6	31,0	0,678	1,70	0,219	265,3	69,7
	C25	15,87	4,5	31,0	0,780	0,93	0,248	237,4	76,9
	C31	15,47	4,2	43,0	0,635	4,66	0,141	259,9	36,6
manin	G03	16,26	4,4	39,0	0,898	0,81	0,208	264,6	31,2
	G05	15,27	5,6	31,0	2,010	1,70	0,734	301,4	67,1
	G06	18,64	4,5	33,0	1,204	1,44	0,391	277,4	41,5
	H04	15,49	4,6	34,0	1,170	1,56	0,512	285,8	41,5
	M16	15,67	4,7	26,0	1,124	2,29	0,505	285,4	28,9
	M17	15,47	5,0	30,0	1,387	1,65	0,391	277,4	35,8
	M21	15,67	4,7	36,0	0,895	2,97	0,139	259,7	33,6
kostanjev	K17	19,43	4,8	28,0	1,296	2,63	0,613	292,9	34,8
	K33	15,47	5,1	28,0	1,360	0,68	0,800	306,0	50,6
	K36	14,88	6,3	17,5	1,970	3,56	0,807	306,5	47,0
	K37	15,07	5,3	20,0	1,912	0,34	0,340	273,8	37,4
lipov	L01	14,88	4,4	29,0	0,720	2,63	0,451	281,6	25,8
	L02	18,83	5,8	18,0	1,168	0,93	0,472	283,0	54,1
škržatov	Š02	15,07	5,3	46,0	2,010	0,51	0,589	291,2	61,2
	Š04	16,85	5,2	44,0	2,390	1,69	0,820	307,4	72,3
	Š10	20,61	5,5	32,0	2,090	1,02	0,752	302,6	59,4
	Š12	14,48	5,3	44,0	2,190	2,20	0,684	297,8	42,2

Rezultate FIZIKALNO-Kemijskih parametrov smo primerjali z zahtevami Pravilnika o medu (2011) in z rezultati predhodnih objav.

Vsi analizirani vzorci, razen vzorca škržatovega medu Š10, ustrezajo Pravilniku o medu (2011) glede vsebnosti vode, ki določa, da je lahko v medu, ki se daje v promet kot med ali

je uporabljen v proizvodnji za prehrano ljudi, vsebnost vode največ 20 g/100 g. Med, ki ima večjo vsebnost vode od 20 g/100 g, je občutno bolj tekoč. Trije vzorci (A02, Š01 in Š12) imajo vsebnost vode pod 15 g/100 g medu. V tem primeru je med bolj viskozen, slabo tekoč in hitreje kristalizira.

Pravilnik o medu (2011) navaja vrednost električne prevodnosti do 0,8 mS/cm za nektarne medove in električno prevodnost večjo od 0,8 mS/cm za medove iz mane. Vsi analizirani vzorci nektarnega medu imajo vrednost električne prevodnosti pod 0,8 mS/cm in ustrezajo zahtevam Pravilnika o medu (2011). Vzorci maninega in kostanjevega medu prav tako ustrezajo zahtevam Pravilnika o medu (2011), saj imajo vrednost električne prevodnosti nad 0,8 mS/cm. V preglednici 7 so navedene povprečne vrednosti parametrov kakovosti v svežih vzorcih medu. Naše vrednosti električne prevodnosti smo primerjali z rezultati drugih avtorjev in ugotovili, da so primerljivi (Sirnik, 2002; Šifrer, 2005). Vzorci škržatovega medu imajo visoke vrednosti električne prevodnosti (povprečna vrednost je 2,170 mS/cm). Tudi Sirnikova (2002) navaja najvišjo vrednost električne prevodnosti za škržatov med (povprečna vrednost 1,899 mS/cm). Glede na rezultat električne prevodnosti smo pričakovali, da je vsebnost pepela pri vzorcih škržatovega medu tudi večja, vendar vsebnost ne presega 1 g/100 g. Pri senzorični oceni barve vzorca Š04 smo navedli, da gre za zelo temen med in ga ovrednotili z oceno 4,9. Pri določanju električne prevodnosti so imeli vzorci nektarnega medu najnižje vrednosti električne prevodnosti (povprečna vrednost 0,481 mS/cm). Nižja vrednost električne prevodnosti je posledica majhne vsebnosti pepela v medu (Popek, 2002). Tudi pri oceni vrednosti električne prevodnosti in vsebnosti pepela naših vzorcev nektarnega medu lahko trdimo, da je nizka vrednost električne prevodnosti posledica manjše vsebnosti pepela (povprečna vsebnost pepela 0,131 g/100 g medu in povprečna vrednost električne prevodnosti 0,481 mS/cm).

V splošnem je vsebnost pepela v medu zelo majhna, odvisna od tipa tal, na katerem je medeča rastlina rasla (Spons, 1992; Anklam, 1998). Predhodne objave navajajo, da vsebnost pepela variira od 0,04 do 0,60 g/100 g v svetlih vrstah medu in celo nad 1 g/100 g v nekaterih temnih vrstah medu (Golob in sod., 2008). Pričakovano je vsebnost pepela največja v naših vzorcih škržatovega medu (povprečna vrednost 0,711 g/100g medu). Največjo vsebnost pepela je imel vzorec Š04 (0,820 g/100 g medu). Prisotnost težkih kovin v medu pa kaže na onesnaženje in geografski izvor medu. Manjšo vsebnost pepela smo opazili v vzorcih akacijevga medu: med 0,028 in 0,08 g/100 g.

Vrednosti pH analiziranih vzorcev so nekoliko višje od vrednosti pH, ki jih navajajo drugi viri (Grešak, 2008; Golob in Plestenjak, 1999). Najvišjo vrednost pH ima vzorec K36 (6,3). Omenjeni avtorji so najvišjo vrednost pH izmerili v kostanjevem medu (vrednost pH okoli 5,3). Vzorci škržatovega medu so imeli v povprečju vrednost pH 5,3, sledijo vzorci kostanjevega in lipovega medu 5,2. Najnižjo vrednost pH smo določili v vzorcu A01 (4,0). Vzorci nektarnega medu imajo najnižjo povprečno vrednost pH 4,3. Vzorci medu iz mane imajo lahko višje vrednosti pH (v naših vzorcih je povprečna vrednost 4,8) zaradi večje vsebnosti mineralov (soli kalcija, natrija, kalija). V povprečju imajo naši vzorci škržatovega medu najvišje vrednosti pH (5,3). Manjša kislost (vrednost pH višja od 6) lahko kaže na ponarejanje medu z neinvertnim sladkorjem (Golob in sod., 2008).

Bertoncelj in sod. (2011) so v obravnavanih vrstah slovenskega medu določili najnižjo povprečno vrednost pH v akacijevem medu (4,01) in najvišjo povprečno vrednost pH v kostanjevem medu (5,51). Nižja vrednost pH zavira razvoj mikroorganizmov in njihovo rast. V svoji raziskavi so Bertoncelj in sod. (2011) določili vrednost pH v vrstah slovenskega medu med 3,0 in 6,2. Naši rezultati vrednosti pH v analiziranih vzorcih so primerljivi z rezultati vrednosti pH, ki jih navajajo Bertoncelj in sod. (2011).

Glede vsebnosti prostih kislin vsi vzorci ustrezajo Pravilniku o medu (2011), ki dovoljuje do 50 mg prostih kislin v kilogramu medu. Iz preglednice 6 lahko ocenimo, da je vsebnost prostih kislin v naših vzorcih večja v primerjavi s predhodnimi objavami (Golob in Plestenjak, 1999; Grešak, 2008). Najmanjšo vsebnost prostih kislin imajo vzorci kostanjevega in lipovega medu (povprečna vsebnost 23,4 meq/kg), sledijo vzorci maninega medu (povprečna vsebnost 30,7 meq/kg) in vzorci nektarnega medu (povprečna vsebnost 33,3 meq/kg). Največjo povprečno vsebnost prostih kislin pa smo določili pri vzorcih škrzatovega medu (41,5 meq/kg). Bertoncelj in sod. (2011) so določili vsebnost prostih kislin v sedmih vrstah slovenskega medu. Povprečne vsebnosti prostih kislin v analiziranih vrstah medu so se gibale med 13,3 meq/kg (kostanjev med) in 30,9 meq/kg (smrekov med). V vzorcih cvetličnega medu so določili povprečno vsebnost prostih kislin 23,6 meq/kg.

Pravilnik o medu (2011) prolina ne vključuje. V obravnavanih vzorcih smo določili vsebnost prolina med 237,4 mg/kg (vzorec C25) in 307,4 mg/kg (vzorec Š04). Iz preglednice 7 je razvidno, da imajo najmanjšo vsebnost prolina vzorci nektarnega medu (254,9 mg/kg). Tudi Golob in sod. (2008) in Golob (2006) navajajo, da ima akacijev med najmanjšo vsebnost prolina (približno 300 mg/kg) in kostanjev med več kot 600 mg/kg. Golob (2006) je v svoji diplomski nalogi spremljala vsebnost prolina v sedmih vrstah slovenskega medu. Vsebnost prolina v vseh vzorcih je bila v razponu od 197 do 776 mg/kg medu, kar je več kot spodnja meja 180 mg/kg, ki so jo določili Bogdanov in sod. (1997) za pristne medove. Glede na to, da posamezne vrste medu vsebujejo različne količine prolina, imajo naši vzorci razmeroma enotno vsebnost prolina ($278,3 \pm 20,1$), ki je pri vseh obravnavanih vzorcih večja od 180 mg/kg medu.

Vsi vzorci, ki smo jim analizirali vsebnost hidroksimetilfurfurala (HMF), ustrezajo Pravilniku o medu (2011). V nobenem vzorcu svežega medu nismo določili več kot 40 mg HMF/kg. Podrobnejši komentar rezultatov vsebnosti HMF v svežih vzorcih sledi v poglavju 4.4.1.

Vse izmerjene vrednosti diastaznega števila v analiziranih vzorcih medu so nad vrednostjo 8, kar ustreza zahtevam Pravilniku o medu (2011). Primerjava naših rezultatov diastaznega števila s predhodnimi objavami nam pove, da so naše vrednosti višje. Iz preglednice 7 je razvidno, da imajo naši vzorci škrzatovega medu najvišjo povprečno vrednost diastaznega števila 58,8. Ovčec (2007) je v svoji diplomski nalogi določila najnižjo vrednost diastaznega števila v akacijevem medu (9,5), sledil je lipov med (15,2) in cvetlični med (17,1). Najvišjo vrednost diastaznega števila je določila v kostanjevem medu (22,0). Tudi

Golob in Plestenjak (1999) navajata najnižjo vrednost diastaznega števila v akacijevem medu (9,3) in najvišjo vrednost v gozdnem (18,6) in kostanjevem medu (17,5). V teh podatkih ni vključen škržatov med. Vrednost diastaznega števila v škržatovem medu so določili Persano Oddo in sod. (2004) in ugotovili, da ima škržatov med najvišje vrednosti diastaznega števila (DN) med obravnavanimi vrstami medu (povprečna vrednost DN 39,3).

Preglednica 7: Povprečne vrednosti kakovostnih parametrov v svežih vzorcih medu

Vrsta medu	Vsebnost vode (g/100 g)	Vrednost pH	Vsebnost prostih kislin (meq/kg)	Električna prevodnost (mS/cm)	Vsebnost HMF (mg/kg)	Vsebnost pepela (g/100 g)	Vsebnost prolina (mg/kg)	DN
nektarni	16,0	4,3	33,3	0,481	2,47	0,131	254,9	52,1
manin	15,6	4,8	30,7	1,135	2,30	0,345	274,2	32,8
kostanjev in lipov	16,4	5,2	23,4	1,404	1,79	0,580	290,6	41,6
škržatov	16,8	5,3	41,5	2,170	1,36	0,711	299,8	58,8

Preglednica 7 prikazuje povprečne vrednosti FIZIKALNO-Kemijskih parametrov, ki so nam v pomoč pri oceni kakovosti medu. Vseh 24 analiziranih vzorcev medu ustreza zahtevam Pravilniku o medu (2011), razen vzorca škržatovega medu Š10, ki presega dovoljeno vsebnost vode. Za ostale obravnavane vzorce lahko povzamemo, da ustrezajo določilom Pravilnika o medu (2011) in so kakovostni.

4.4 REZULTATI SPREMLJANJA VSEBNOSTI HMF MED SKLADIŠČENJEM

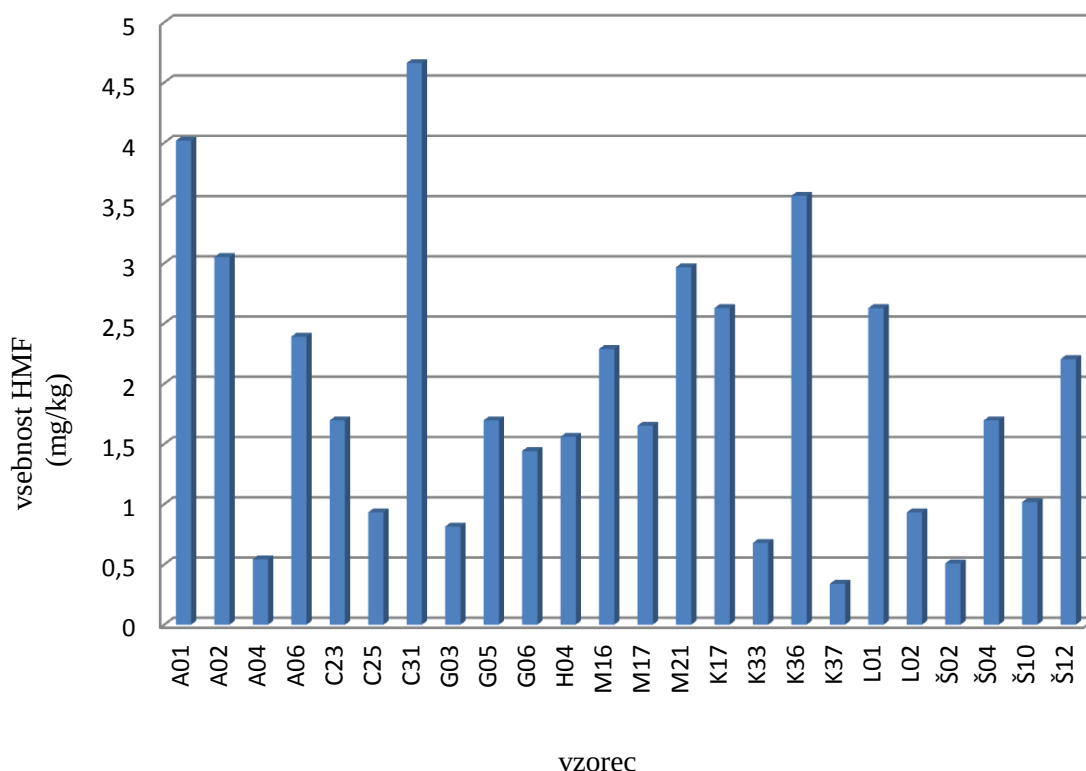
Po opravljenih analizah na svežih vzorcih smo vzorce razdelili na dva dela, glede na nadaljnje razmere skladiščenja:

- hranjenje v steklenih kozarcih na svetlobi pri sobni temperaturi,
- hranjenje v steklenih kozarcih v temi (zaprta omara) pri sobni temperaturi.

V tako hranjenih vzorcih smo nato spremljali vsebnost HMF po 6-ih, 12-ih in 18-ih mesecih. Skupen čas skladiščenja je bil 18 mesecev.

4.4.1 Rezultati vsebnosti HMF v svežih vzorcih medu

Pravilnik o senzoričnem ocenjevanju medu (2010) dovoljuje največ 10 mg HMF na kilogram medu. Iz tega lahko sklepamo, da vseh 24 svežih vzorcev ustreza zahtevam za pridobitev naziva znamke višje kakovosti.



Slika 9: Vsebnost HMF (mg/kg) v svežih vzorcih medu

S slike 9 je razvidno, da ima največjo vsebnost HMF vzorec cvetličnega medu C31 (4,66 mg/kg). Razpon vsebnosti HMF v medu iz nektarja je med 0,54 mg/kg in 4,66 mg/kg. Najmanjše vsebnost HMF smo določili v vzorcih kostanjevega medu: K33 (0,68 mg/kg) in K37 (0,34 mg/kg). Najbolj podobne vsebnosti HMF imajo vzorci maninega medu (povprečna vsebnost $1,77 \pm 0,68$ mg/kg). Podobne ugotovitve zasledimo pri Golob in Plestenjak (1999), ki sta določili najmanjšo vsebnost HMF v kostanjevem medu (povprečna vsebnost 1,25 mg/kg), največjo vsebnost HMF pa v cvetličnem medu (7,09 mg/kg) in akacijevem medu 5,22 mg/kg). Vsebnost HMF v škržatovem medu (povprečna vsebnost 2,2 mg/kg), ki so jo določili Persano Oddo in sod. (1995) je podobna vsebnosti HMF, ki smo jo določili v naših vzorcih škržatovega medu (povprečna vsebnost 2,20 mg/kg).

Tuji viri navajajo, da imajo na splošno vrste medu iz nektarja z nižjo vrednostjo pH večjo vsebnost HMF. Pri medu z nizko vrednostjo pH se HMF hitreje tvori (Gfeller in Bogdanov, 2006). Podobno lahko sklepamo za naše vzorce nektarnega medu. Vzorec C31

z največjo vsebnostjo HMF 4,66 mg/kg ima vrednost pH 4,2, kar je nižje od povprečne vrednosti pH v vzorcih nektarnega medu. Vzorci kostanjevega medu imajo manjšo vsebnost HMF (K33 in K37) in vrednost pH nad 5.

V preglednici 8 so podani osnovni statistični parametri vsebnosti HMF, povprečna vrednost in standardni odklon za vse obravnavane vrste medu. Standardni odmik (KV) je največji pri medu iz nektarja (26 %), najmanjši pa pri medu iz mane (11 %). Podatki nam povedo, da je najmanjša razpršenost vsebnosti HMF v vzorcih maninega medu. Največja nihanja vsebnosti HMF imajo vzorci nektarnega medu. Tudi vzorci škržatovega medu imajo majhna odstopanja vsebnost HMF (KV je 12 %).

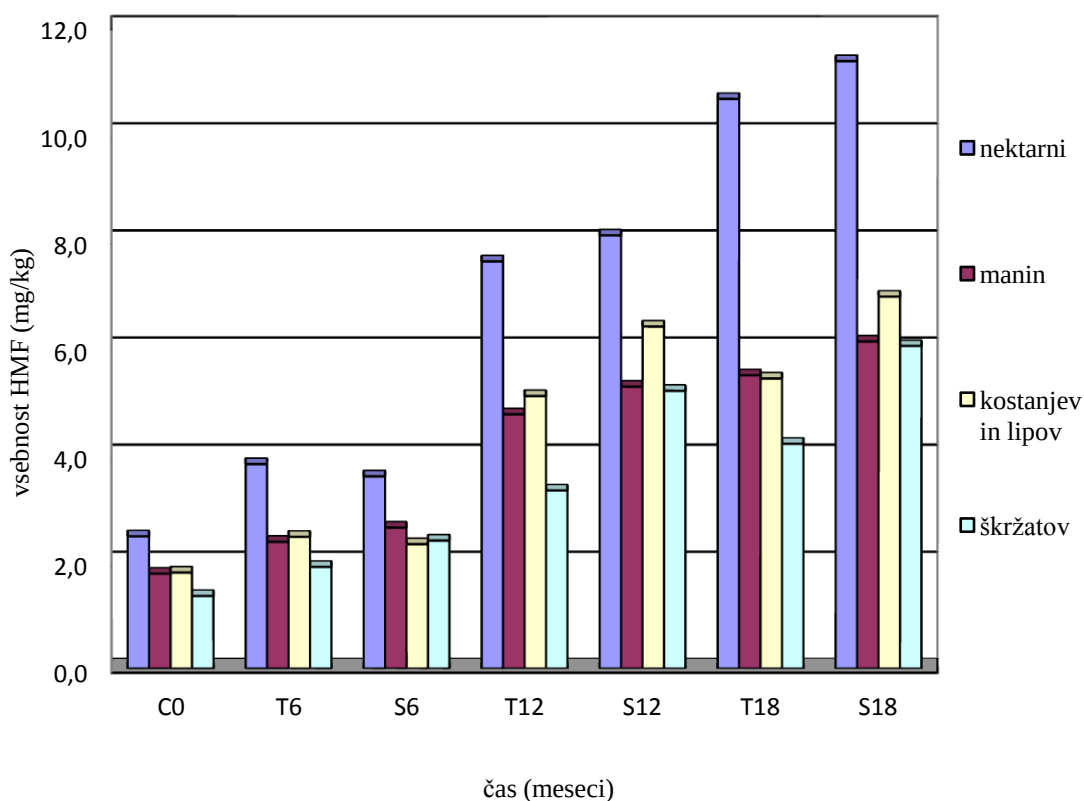
Preglednica 8: Osnovni statistični parametri za vsebnost HMF (mg/kg) v svežih vzorcih medu

Vrsta medu	Vzorec	Število vzorcev	$\bar{x}$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	s	KV(%)
nektarni	A01, A02, A04, A06, C23, C25, C31	7	2,47	0,54	4,66	1,54	26
manin	G03, G05, G06, H04, M16, M17, M21	7	1,77	0,81	2,97	0,68	11
kostanjev in lipov	K17, K33, K36, K37, L01, L02	6	1,79	0,34	3,56	1,31	22
škržatov	Š02, Š04, Š10, Š12	4	1,36	0,51	2,20	0,75	12

$\bar{x}$: povprečna vrednost, $x_{\min}$: najmanjša vsebnost HMF, $x_{\max}$: največja vsebnost HMF, s: standardni odmik, KV: koeficient variabilnosti

4.4.2 Rezultati vsebnosti HMF med skladiščenjem

HMF je parameter kakovosti medu. Vsebnost HMF nam pove, ali sta način predelave medu in način skladiščenja ustrezna. Kakovost medu se lahko med skladiščenjem slabša, vsebnost HMF se poveča do te mere, da med ne ustreza več zahtevam Pravilnika o medu (2011). Zaradi fizikalno-kemijske spremembe medu v daljšem časovnem obdobju je potrebno med kontrolirati tudi med skladiščenjem. V vseh 24-ih vzorcih smo spremljali vsebnost HMF v časovnem obdobju 18-ih mesecev.



C0: začetni čas, T6: skladiščenje v temi po 6-ih mesecih, T12: skladiščenje v temi po 12-ih mesecih, T-18: skladiščenje v temi po 18-ih mesecih, S6: skladiščenje na svetlobi po 6-ih mesecih, S12: skladiščenje na svetlobi po 12-ih mesecih, S-18: skladiščenje na svetlobi po 18-ih mesecih

Slika 10: Povprečna vsebnost HMF (mg/kg) v vzorcih medu med skladiščenjem na svetlobi (S) in v temi (S)

S slike 10 lahko razberemo povečanje vsebnosti HMF v analiziranih vrstah medu med skladiščenjem na svetlobi in v temi po 18-ih mesecih. Vsem vzorcem, ki smo jim določili vsebnost HMF med skladiščenjem, se je le-ta s časom povečala. V nobenem vzorcu medu med skladiščenjem nismo določili vsebnosti HMF nad 40 mg/kg, ki jo zahteva Pravilnik o medu (2011). Na podlagi spremljanja vsebnosti HMF med 18-mesečnim skladiščenjem lahko sklepamo, da naši vzorci medu po skladiščenju še vedno ustrezajo zahtevam

Pravilnika o medu (2011). Med skladiščenjem smo določili najmanjšo vsebnost HMF v svežih vzorcih škržatovega medu (povprečna vrednost 1,36 mg/kg), največjo pa v vzorcih nektarnega medu po 18-ih mesecih (povprečna vrednost 11,34 mg/kg).

V preglednici 9 je prikazano povečanje vsebnosti HMF za posamezne vrste medu po 18-ih mesecih skladiščenja. Iz podatkov lahko ugotovimo, da se je vsebnost HMF med skladiščenjem najbolj povečala vzorcem nektarnega medu (za 359 % na svetlobi in za 331 % v temi). V vseh vzorcih je povečanje vsebnosti HMF med skladiščenjem večje.

Preglednica 9. Delež povečanje vsebnosti HMF v medu po 18-ih mesecih skladiščenja

Vrsta medu	Povečanje vsebnosti HMF (%)	
	skladiščenje na svetlobi	skladiščenje v temi
nektarni	359	331
manin	244	209
kostanjev in lipov	287	202
škržatov	344	210

Cervantes in sod. (2000) so spremljali povečanje vsebnosti HMF med 23-tedenskim skladiščenjem v dveh različnih vrstah medu (med Tahonal in med Dzidzilché). V tem času se je vsebnost HMF povečala za 900 % v prvi vrsti medu in za 433 % v drugi vrsti medu. Podobne rezultate navajajo tudi drugi avtorji. Yilmaz in Küfrevioğlu (2001) sta spremljala tvorbo HMF v 45-ih vzorcih medu v času enega leta. Vsebnost HMF se je povečala za 479 % (iz povprečne vsebnosti HMF 3,3 mg/kg na začetku do povprečne vsebnosti HMF 19,1 mg/kg po enem letu). Pri določanju vsebnosti HMF med skladiščenjem medu v času dveh let so Khalil in sod. (2010) povzeli priporočilo, da med uživamo v roku enega leta od pridobivanja. Skladiščenje dveh let je razdelil na dve časovni obdobji in spremljal povečanje vsebnosti HMF v vrstah malezijskega medu. Prvo časovno obdobje je trajalo od 3 do 6 mesecev, drugo časovno obdobje pa od 12 do 24 mesecev skladiščenja. Ugotovili so, da vsebnost HMF v prvem časovnem obdobju ne presega zahteve 80 mg/kg za tropski iz Pravilnika Evropske unije (Council directive..., 2002), kljub povečanju vsebnosti HMF za 788 %. V drugem časovnem obdobju pa je bila vsebnost HMF v medu med 183,19 in 1131,79 mg/kg, kar ne ustreza zahtevam Pravilnika Evropske unije (Council directive..., 2002).

4.4.3 Primerjava vsebnosti HMF med skladiščenjem na svetlobi in v temi

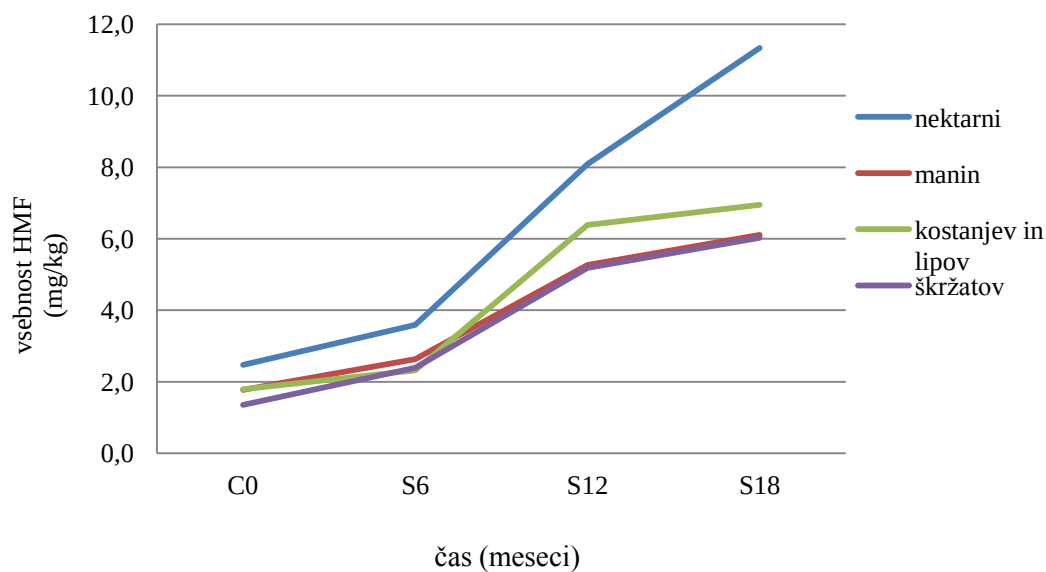
V nadaljevanju smo statistično analizirali vpliv skladiščenja na svetlobi in v temi na povečanje vsebnosti HMF v medu.

Iz preglednice 10 lahko ocenimo, da se vsebnost HMF hitreje povečuje pri skladiščenju medu na svetlobi. Izjeme so vzorci kostanjevega in lipovega medu med skladiščenjem prvih 6 mesecev (na svetlobi povečanje vsebnosti HMF za 29,5 % in v temi za 37,2 %) in vzorci škržatovega medu med skladiščenjem od 12-ih do 18-ih mesecev (na svetlobi 16,1 % in v temi 26,2 %). Vsem vrstam medu se je povprečna vsebnost HMF največ povečala v času skladiščenja med 6-im in 12-im mesecem (v povprečju se je vsebnost HMF podvojila). Za manj kot 100 % se je vsebnost HMF v času med 6-im in 12-im mesecem povečala le v vzorcih škržatovega medu (75,2 %).

Preglednica 10: Delež povečanja vsebnosti HMF v medu po 6-ih, 12-ih, 18-ih mesecih skladiščenja

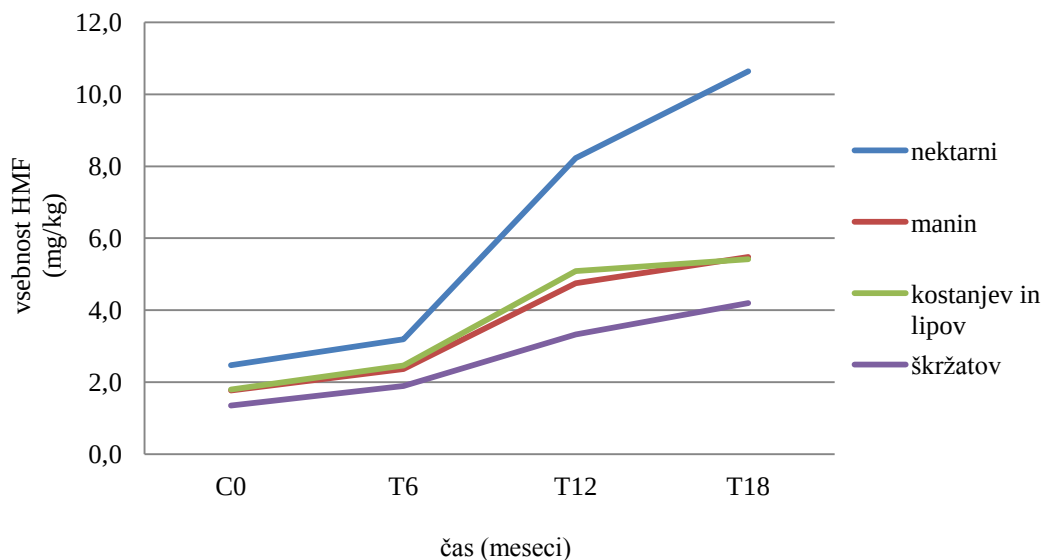
Vrsta medu	Povečanje vsebnosti HMF (%)					
	skladiščenje na svetlobi			skladiščenje v temi		
	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
nektarni	45,3	125,4	40,2	29,3	157,8	29,2
manin	48,4	100,1	16,0	33,5	100,6	15,4
kostanjev in lipov	29,5	174,9	8,7	37,2	106,9	6,4
škržatov	76,3	117,0	16,1	40,0	75,2	26,2

Sliki 11 in 12 prikazujeta povečanje vsebnosti HMF v obravnavanih vzorcih med 18-mesečnim skladiščenjem na svetlobi in v temi. Prvih 6 mesecev skladiščenja se je največ povečala povprečna vsebnosti HMF v vzorcih škržatovega medu, na svetlobi za 76,3 % (iz 1,35 mg/kg na 2,39 mg/kg) in v temi za 40,0 % (iz 1,35 mg/kg na 1,90 mg/kg).



C0: začetni čas, T6: skladiščenje v temi po 6-ih mesecih, T12: skladiščenje v temi po 12-ih mesecih, T-18: skladiščenje v temi po 18-ih mesecih, S6: skladiščenje na svetlobi po 6-ih mesecih, S12: skladiščenje na svetlobi po 12-ih mesecih, S-18: skladiščenje na svetlobi po 18-ih mesecih

Slika 11. Povečanje vsebnosti HMF (mg/kg) med skladiščenjem na svetlobi (S)



C0: začetni čas, T6: skladiščenje v temi po 6-ih mesecih, T12: skladiščenje v temi po 12-ih mesecih, T-18: skladiščenje v temi po 18-ih mesecih, S6: skladiščenje na svetlobi po 6-ih mesecih, S12: skladiščenje na svetlobi po 12-ih mesecih, S-18: skladiščenje na svetlobi po 18-ih mesecih

Slika 12. Povečanje vsebnosti HMF (mg/kg) med skladiščenjem v temi (T)

V zadnjem časovnem obdobju, med 12-im in 18-im mesecem, so imeli vzorci nektarnega medu največje povečanje vsebnosti HMF pri obeh načinih skladiščenja (svetloba ali tema). Povprečna vsebnost HMF v vzorcih nektarnega medu se je povečala za 40,2 % med skladiščenjem na svetlobi (iz 8,09 mg/kg na 11,34 mg/kg) in za 29,2 % (iz 8,23 mg/kg medu na 10,64 mg/kg) med skladiščenjem v temi.

Obravnavani vzorci so imeli največje povečanje vsebnosti HMF med skladiščenjem v času med 6-im in 12-im mesecem, neodvisno od načina skladiščenja (sliki 11 in 12). Vrsta kostanjevega in lipovega medu je dosegla v tem obdobju skladiščenja največje povprečno povečanje vsebnosti HMF na svetlobi, 175,4 % (iz 2,32 mg/kg na 6,39 mg/kg). Pri skladiščenju v temi, v istem časovnem obdobju, pa je največje povprečno povečanje vsebnosti HMF imel nektarni med, in sicer 157,8 % (iz 3,19 mg/kg na 8,23 mg/kg).

Izračunali smo koeficient korelacije (r), da bi ocenili kako močna je povezava med vsebnostjo HMF v medu, skladiščenem na svetlobi in v temi. Ko je vrednost koeficienta korelacije nad 0,7 pomeni, da je povezava močna. Pri močni povezavi lahko sklepamo, da pri obravnavanih vzorcih medu način skladiščenja na svetlobi ali v temi ne vpliva na tvorbo HMF. Primerjava korelacijskih koeficientov r iz preglednice 11 nam pove, da način skladiščenja (svetloba ali tema) ne vpliva na tvorbo HMF pri vzorcih nektarnega, maninega, ter kostanjevega in lipovega medu. Izjema so vzorci škržatovega medu, pri katerih je korelacija šibka (preglednica 11).

Preglednica 11: Koeficient korelacije (r) za skladiščenje medu na svetlobi in temi

Vrsta medu	Čas skladiščenja		
	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
nektarni	0,88	0,73	0,93
manin	0,70	0,98	0,99
kostanjev in lipov	0,94	0,96	0,97
škržatov	0,30	0,29	-0,19

Nadaljnja statistična obravnava vzorcev medu (Studentov t -test) pa je pokazala, da način skladiščenja na svetlobi ali temi ne vpliva na tvorbo HMF v škržatovem medu (preglednica 12).

S pomočjo preizkusov domneve o razliki povprečij smo preizkusili domnevo o razliki dveh povprečnih vrednosti. Ničelna domneva H_0 predvideva, da med povečanjem vsebnosti HMF med skladiščenjem medu (na svetlobi ali v temi) ni statistične razlike. Alternativna domneva H_1 pa predvideva, da je med povečanjem vsebnosti HMF med skladiščenjem medu na svetlobi in v temi statistična razlika.

Studentov t -test opravimo takrat, ko imamo le dva majhna vzorca in preizkus domneve o razlikah med njunima povprečjema temelji na t porazdelitvi.

V preglednico 12 smo vnesli izračunane in tabelirane vrednosti t . Na osnovi primerjave izračunanih in tabeliranih vrednosti t , ničelno hipotezo ovržemo ali potrdimo. Vse obravnavane vrste medu imajo izračunano vrednost t nižjo od tabelirane pri stopnji tveganja 0,05, zato lahko ničelno domnevo H_0 obdržimo in zaključimo, da na povečanje vsebnosti HMF način skladiščenja medu na svetlobi ali v temi, v času osemnajst mesecev, ne vpliva.

Preglednica 12: Vrednosti t za skladiščenje na svetlobi in v temi

Vrsta medu	Vrednost $t_{0,025}$	Izračunana vrednost t
nektarni	2,1790	0,3036
manin	2,1790	0,4324
kostanjev in lipov	2,2280	0,8519
škržatov	2,4470	2,0570

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo proučevali osem vrst slovenskega medu (akacijev, cvetlični, gozdni, hojev, lipov, kostanjev, škržatov in mešani med) med skladiščenjem (osemnajst mesecev) na svetlobi in v temi z namenom ugotoviti vpliv načina skladiščenja (svetloba ali tema) na vsebnost HMF v medu. V svežih vzorcih smo določili fizikalno-kemijske parametre z namenom ugotoviti kakovost slovenskega medu glede na določila in zahteve Pravilnika o medu (2011). Pri določanju vrste slovenskega medu smo si pomagali s senzorično analizo in merjenjem absorpcijskih spektrov obravnavanih vrst medu v območju valovnih dolžin 200 in 500 nm.

Fizikalno-kemijska analiza je obsegala določanje vsebnosti vode, pepela, prostih titrabilnih kislin, hidroksimetilfurfurala in prolina ter merjenje električne prevodnosti, vrednosti pH in aktivnosti encima diastaze. Vsi vzorci medu, razen vzorca škržatovega medu Š10, so ustrezali zahtevam Pravilnika o medu (2011).

S Pravilnikom o medu (2011) je določena največja vsebnost vode 20 g na 100 g medu. Vsebnost vode v vzorcu Š10 je bila 20,61 g/100 g medu, kar ne ustreza zahtevi Pravilnika o medu (2011).

Vsebnost pepela je v medu zelo majhna in variira med 0,04 in 0,60 g/100 g v svetlih vrstah medu, v nekaterih temnih vrstah pa je lahko nad 1 g/100 g. Tudi med našimi svetlimi vzorci medu vsebnost pepela ni bila večja od 0,60 g/100 g. V temnejših vrstah medu smo določili večjo vsebnost pepela, in sicer nad 0,60 g/100 g pri kostanjevem, gozdnem in škržatovem medu.

Električna prevodnost je bila v vzorcih maninega medu nad 0,8 mS/cm in v vzorcih nektarnega medu pod 0,8 mS/cm, kar ustreza zahtevam Pravilnika o medu (2011). Škržatov med je imel najvišjo povprečno vrednost električne prevodnosti, 2,170 mS/cm, najnižjo vrednost pa akacijev med (0,319 mS/cm).

Čeprav je vsebnost prolina v posameznih vrstah medu zelo različna (Golob, 2006) smo v naših vzorcih določili dokaj podobne vsebnosti prolina ($278,3 \pm 20,1$ mg/kg). Vsi vzorci so vsebovali več kot 180 mg prolina v kilogramu medu, in sicer med 237,4 mg/kg (vzorec C25) in 307,4 mg/kg (vzorec Š04), zato lahko zaključimo, da so analizirani vzorci medu pristni. Pravilnik o medu (2011) vsebnosti prolina ne vključuje.

Vsebnost prostih kislin v analiziranih vzorcih smo primerjali s predhodnimi objavami (Golob in Plestenjak, 1998; Grešak, 2008; Bertoncelj in sod., 2011), ki navajajo podobne rezultate vsebnosti prostih kislin v analiziranih vzorcih, kot smo jih določili v naših vzorcih. Ugotovili smo, da je vsebnost prostih kislin v naših vzorcih medu med 23,4 meq/kg (kostanjev in lipov med) in 41,5 meq/kg (škržatov med) in da vzorci medu ustrezajo določilom Pravilnika o medu (2011), ki dovoljuje do 50 meq prostih kislin v kilogramu medu. Kislost je lahko merilo za ugotavljanje pristnosti medu.

Vrednost pH v analiziranih vzorcih medu je bila od 4,0 do 6,3. Najnižjo vrednost pH smo določili v vzorcu akacijevega medu A01 (4,0), najvišjo vrednost pH pa v vzorcu škržatovega medu Š12 (6,3). V povprečju imajo najvišjo vrednost pH vzorci škržatovega medu (povprečna vrednost pH 5,3). Rezultati vrednosti pH naših vzorcev so višji od

prehodnih objav (Grešak, 2008; Golob in Plestenjak, 1999), primerljivi pa so z vrednostjo pH v vrstah medu, ki so jih določili Bertonecelj in sod. (2011).

Tudi izmerjena aktivnost diastaze je bila v obravnavanih vzorcih višja, kot jo navajajo drugi viri (Šifrer, 2005; Golob in Plestenjak, 1999). Pravilnik o medu (2011) določa najnižjo vrednost diastaznega števila 8, zato lahko trdimo, da vzorci ustrezajo določilu.

Del diplomske naloge je obsegal tudi senzorično analizo in merjenje absorpcijskih spektrov obravnavanih vrst medu. Pri nekaterih vzorcih smo s pomočjo obeh metod ugotovili, da vzorci niso značilni primeri sortnega medu, ampak gre za dobre mešane medove iz nektarja ali mane. Senzorično ocenjevanje je izvedla šestčlanska senzorična komisija. Ocenjevali smo barvo, vonj in aromo z metodo točkovanja od 1 do 5, pri čemer je ocena 1 pomenila neustrezno izraženo senzorično lastnost, ocena 5 pa najbolj izraženo lastnost. Iz razlage, podane v poglavju 4, lahko povzamemo, da je med vzorci znotraj vrste veliko odstopanje v senzoričnih ocenah in da so le posamezni medovi dobili najvišje ocene. Najbolje so bili ocenjeni kostanjevi in gozdni medovi, najslabše pa škržatovi. Pri ocenjevanju vrste medu smo si pomagali tudi z absorpcijskim spektrom medu, ki je značilen za posamezno vrsto. Oprli smo se na rezultate predhodnih raziskav (Buzuk 1995; Šmit, 1997; Sirnik, 2002; Veselič, 2006). Absorpcijski spekter smo posneli v 2 % vodni raztopini suhe snovi medu s spektrofotometrom v UV-območju elektromagnetnega valovanja pri valovni dolžini od 200 nm do 500 nm. Ugotovili smo, da so spektri posameznih vrst medu različni. Prepoznavna spektra imata lipov in kostanjev med. Spektri cvetličnega, mešanega in gozdnega medu so si podobni in se prekrivajo. Znotraj posamezne vrste lahko s poznavanjem značilnega spektra ugotovimo prisotnost druge vrste medu. Tako smo pri oceni spektra lipovega medu opazili prisotnost kostanjevega medu in to potrdili tudi s senzorično analizo. Spektri vzorcev cvetličnega, gozdnega, kostanjevega in akacijevega medu so bili med sabo podobni in primerljivi s predhodno objavljenimi raziskavami. Spektri škržatovega medu niso bili skladni s značilnim spektrom škržatovega medu, ki ga navaja Sirnikova (2002).

Po opravljenih analizah na svežih vzorcih smo vzorce skladiščili osemnajst mesecev na svetlobi in v temi ter spremljali vsebnost HMF po 6-ih, 12-ih in 18-ih mesecih. Znano je, da se vsebnost HMF s časom skladiščenja in z neustrezno toplotno obdelavo povečuje. Zato je HMF primeren fizikalno-kemijski parameter za ugotavljanje svežosti medu in ravnanja z medom med skladiščenjem. V svežih vzorcih medu je vsebnost HMF zelo majhna. Tudi v obravnavanih svežih vzorcih medu je bila vsebnost majhna in v skladu z določili Pravilnika o medu (2011). Največjo vsebnost HMF smo zasledili v vzorcih nektarnega medu, in sicer v vzorcu cvetličnega medu C31 (4,66 mg/kg) in najmanjšo vsebnost v vzorcu kostanjevega medu K33 (0,68 mg/kg). Do podobnih zaključkov sta prišli Golob in Plestenjak (1999).

Za ugotavljanje vpliva skladiščenja na vsebnost HMF v medu smo analizo vsebnost HMF opravili vsakih šest mesecev. Ugotovili smo, da je vsebnost HMF ves čas naraščala in bila največja na koncu skladiščenja. Največja vsebnost HMF je bila v nektarnem medu (11,34 mg/kg v vzorcu cvetličnega medu C31) po osemnajstih mesecih. Vzorci so, ne glede na čas trajanja skladiščenja, ustrezali zahtevam Pravilnika o medu (2011). Vsebnost

HMF se je najbolj povečala v medu iz nektarja, za 359 %, najmanj pa v kostanjevem in v lipovem medu, za 202 %. Cervantes in sod. (2000) so v 23-ih tednih skladiščenja medu določili 900 % povečanje vsebnosti HMF v eni vrsti (med Tahonal) in povečanje vsebnosti HMF v drugi vrsti (med Dzidzilché) nektarnega medu, za 433 %. Ugotovili so, da se s segrevanjem vsebnost HMF sicer poveča, vendar med temperaturo in časom toplotne obdelave ni ugotovljenih linearnih povezav. Razlagajo si, da na povečanje vsebnosti HMF ne vpliva toliko toplotna obdelava, temveč kemijska sestava medu. Domnevajo, da je tvorba HMF v medu v času skladiščenja značilna za vsako vrsto posebej, torej odvisna tudi od kemijske sestave medu. Tudi drugi avtorji navajajo povečanje vsebnosti HMF med skladiščenjem medu. Iz pregleda teh raziskav izhaja priporočilo, da med uživamo v roku enega leta po točenju (Khalil in sod., 2010) in da po dveh letih skladiščenja med ni več svež (Sancho in sod., 1992).

Med 18-mesečnim skladiščenjem smo spremljali tudi vpliv načina skladiščenja medu na vsebnost HMF. Vzorce medu smo skladiščili na svetlobi in v temi in vsakih šest mesecev določili vsebnost HMF. S pomočjo statistične analize smo ocenili, da način skladiščenja (svetloba ali tema) ne vpliva na povečanje vsebnosti HMF v medu. Vsebnost HMF je bila sicer večja pri vzorcih medu shranjenih na svetlobi, vendar razlika ni bila statistično značilna.

Glede na rezultate opravljenih raziskav lahko zaključimo, da sta lahko senzorična analiza medu in merjenje absorpcijskih spektrov dopolnilni orodji k meritvam fizikalno-kemijskih parametrov za določanje kakovosti posameznih vrst medu. Vsebnost HMF ima velik pomen pri oceni svežosti in kakovosti medu. Spremljanje vsebnosti HMF med skladiščenjem medu nas je pripeljalo do zaključka, da lahko med uživamo leto in pol po točenju, ne glede na način skladiščenja na svetlobi ali v temi.

5.2 SKLEPI

Na podlagi opravljenih fizikalno-kemijskih analiz in statistične obdelave rezultatov lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Analiza kakovostnih parametrov v svežih vzorcih medu je pokazala, da vsi obravnavani vzorci razen enega (vzorec škržatovega medu Š10) ustrezajo zahtevam Pravilnika o medu (2011).
- Senzorična analiza je pokazala, da nekateri obravnavani vzorci medu niso značilni primeri deklarirane vrste medu (akacijev, hojev in lipov med). Za ostale vzorce lahko sklepamo, da so dobri mešani medovi nektarja in mane.
- Vzorcem smo izmerili absorpcijske spektre in ugotovili, da se spektri znotraj ene vrste medu med seboj razlikujejo. Primerjava naših absorpcijskih spektrov s predhodno objavljenimi absorpcijskimi spektri je pokazala, da naši vzorci sortnega medu vsebujejo več vrst nektarnega ali maninega medu, kar je podprla tudi senzorična ocena vzorcev medu.
- Vsebnost HMF v svežih vzorcih medu je manj kot 10 mg/kg, kar ustreza zahtevi Pravilnika o senzoričnem ocenjevanju medu (2010) in Pravilnika o medu (2011).
- Med 18-mesečnim skladiščenjem se je vsebnost HMF pri vseh vzorcih večala. Na koncu skladiščenja vsebnost HMF v vzorcih medu ni presegla zahteve Pravilnika o medu (2011), ki dovoljuje vsebnost HMF do 40 mg na kilogram medu. Iz tega lahko sklepamo, da je v tem času skladiščenja med primeren za uživanje.
- Vsebnost HMF se je največ povečala med skladiščenjem od šestih do dvanajstih mesecev (med poletjem). Sklepamo lahko, da je bila takrat temperatura skladiščenja višja in je vplivala na povečanje vsebnosti HMF v medu.
- Pogoj skladiščenja na svetlobi ali v temi ni vplival na vsebnost HMF v medu.

6 POVZETEK

Med je sladka snov, ki ga čebele *Apis mellifera* pridobivajo iz nektarja ali mane. Nektar izvira iz cvetov, mana pa je izloček živih rastlin in žuželk, ki živijo na rastlinah. Zaradi delovanja čebeljih encimov se spremeni tudi kemijska sestava medu. Naravni čebelji med vsebuje različne ogljikove hidrate, vodo, organske kisline, proteine, aminokisline, mineralne snovi, encime, pigmente, voske, v vodi topne vitamine in aromatične snovi. Fizikalno-kemijski parametri in senzorične lastnosti medu so odvisni od vrste medu, klimatskih razmer in individualne čebelarke tehnike.

Pri segrevanju in predolgem skladiščenju medu prihaja do različnih fizikalno-kemijskih in biokemijskih procesov, ki vodijo k inaktivaciji encimov, razgradnji sladkorjev, poslabšanju senzoričnih lastnosti, povečanju vsebnosti HMF in drugim spremembam. Omenjene spremembe močno vplivajo na kakovost medu. Med je odlična hrana, ki jo uživamo skozi celo leto. Obstoječnost lahko traja tudi več let po pridelavi, zato je pomembno spremljati kakovost medu po krajšem in daljšem skladiščenju. Vsebnost HMF je eden od kriterijev kakovosti medu. Povečana vsebnost HMF v medu kaže na postopke ravnanja z medom, predvsem na morebitno neustrezno toplotno obdelavo ali na neustrezne razmere skladiščenja. HMF v svežem medu ponavadi ni prisoten. Med neustrezno toplotno obdelavo in skladiščenjem pa se vsebnost HMF v medu povečuje.

Cilj naloge je bil spremljati vsebnost HMF v medu v daljšem časovnem obdobju (18 mesecev) in ugotoviti, če način skladiščenja (svetloba ali tema) vpliva na povečano vsebnost HMF v medu. V svežih vzorcih različnih vrst slovenskega medu smo izvedli senzorično analizo, posneli absorpcijske spektre, opravili analize vsebnosti vode, pepela, prostih kislin, HMF in prolina, izmerili vrednost pH, električno prevodnost in aktivnost encima diastaze. Dobljene rezultate smo primerjali tudi z zahtevami Pravilnika o medu (2011). Med skladiščenjem smo spektrofotometrično določili vsebnost HMF in rezultate statistično obdelali. Ocenili smo ali način skladiščenja (svetloba ali tema) vpliva na povečanje vsebnosti HMF v medu v času 18-ih mesecev.

Vsebnost HMF se je v naših vzorcih med skladiščenjem ves čas večala, vendar ob koncu 18-mesečnega skladiščenja ni presegla 40 mg/kg. Torej so vsi obravnavani vzorci ustrezali zahtevi Pravilnika o medu (2011) in bili primerni za uživanje. Statistična analiza vsebnosti HMF v vzorcih med skladiščenjem je pokazala, da način skladiščenja (svetloba ali tema) ne vpliva na povečanje vsebnosti HMF v medu.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 27-36
- AOAC Official Method 920.181. Ash of honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2 Cunniff P (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 21-21
- AOAC Official Method 969.38. Moisture in honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2 Cunniff P (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 21-21
- AOAC Official Method 962.19. Acidity (free, lactone and total) of honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2 Cunniff P (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 31-31
- Anklam E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. Food Chemistry, 63, 4: 549-562
- Babacan S., Pivarnik L.F., Rand A.G. 2002. Honey amylase activity and food starch degradation. Journal of Food Science, 67, 5: 1625-1630
- Bertoncelj J., Golob T., Kropf U., Korošec M. 2011. Characterisation of Slovenian honey on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. International Journal of Food Science and Technology, 46: 1661-1671
- Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C. 1997. Harmonised methods of the European honey commission. Apidologie, 28, Suppl. 1: S3-S59
- Božič J. 2008. Čebelje paše. V: Med: Značilnosti slovenskega medu. Kandolf A. (ur.). Lukovica, Čebelarstva zveza Slovenije: 19-22
- Božnar A. 2003. Mikrobiologija medu. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 582-592
- Božnar A., Senegačnik J. 1998. Med. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Založba Kmečki glas: 376-413

Buzuk S. 1995. Novi kakovostni parametri slovenskega sortnega medu. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-50

Cervantes R.M.A., Gonzáles-Novelo S.A., Sauri-Duch E. 2000. Effect of the temporary thermic treatment of honey on variation of the quality of the same during storage. *Apiacta*, 35, 4: 162-170

Doner L. W. 2003. Honey. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 5. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Finglas P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3125-3130

Grešak M. 2008. Določanje vrstne značilnosti medu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 41-50

Gfeller M., Bogdanov S. 2006. HMF-Gehalt, Invertase-und Diastaseaktivität von in-und ausländischen Honigen-Analyse mit logistischer Regression. *ALP Science*, 499: 16 str.
http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/Honey/GfellerAlpScience_2006_sb.pdf
(november, 2011)

Golob T., Plestenjak A. 1999. The physico-chemical characteristics of Slovenian honey. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani*, 73: 209-221

Golob U. 2006. Vsebnost prolina in beljakovin v različnih vrstah slovenskega medu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 94 str.

Golob T., Korošec M., Jamnik M., Kropf U., Bertonecelj J., Kandolf A., Božič J., Zdešar D., Meglič M., Goljat A. 2008. Lastnosti medu. V: *Med: Značilnosti slovenskega medu*. Kandolf A. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 25-42

Ipavec H. 1997. Vsebnost sladkorjev in skupnih kislin v slovenskih sortnih medovih. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-9

Khalil M.I., Sulaiman S.A., Gan S.H. 2010. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2388-2395

Kandolf A. 2007. Rok uporabe medu. *Čebelarski svetovalec*, 10,7: 1-2

Košmelj K. 2007. Uporabna biostatistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 239 str.

- Krell R. 1996. Value-added products from beekeeping. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 1-19
- Kropf U. 2009. Elementna in izotopska sestava medu iz različnih geografskih regij Slovenije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 31-89
- Manzanares A.B., García Y.H., Galdón B.R., Rodríguez E.R. Romeo C.D. 2011. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. Food Chemistry, 126: 664-672
- Marinko R. 1994. Električna prevodnost medu. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 41 str.
- Meglič M. 2004. Čebelji pridelki, pridobivanje, trženje. 1. izdaja. Brdo pri Lukovici, Čebelarstva zveza Slovenije: 96 str.
- Molan P.C. 1996. Authenticity of honey V: Food authentication. Ashurst P.R., Dennis M.J. (eds.). London, Chapman&Hall: 259-296
- Nombre I., Schweitzer P., Issaka B.J., Millogo R.J. 2010. Impacts of storage conditions on physicochemical characteristics of honey samples from Burkina Faso. African Journal of Food Science, 4, 7: 458-463
- Papić J., Perkovic M., Belanović J. 1988. Utjecaj vremena skladištenja na količinu hidroksimetilfurfurala i na katalitičku aktivnost amilaza u medu. Prehrambeno-tehnološka i biotehnološka revija, 26, 4: 147-150
- Persano Oddo L., Piazza M.G., Sabatini A.G., Accorti M. 1995 Characterization of unifloral honeys. Apidologie: 7 str 26: 453-465
- Persano Oddo L., Piro R. 2004. Unifloral honeys: Quality standards. Roma, Sezione di Apicoltura di Roma dell' Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria.
http://www.apicoltura.org/file_pdf/unifloral_honey.pdf (november, 2011): 7 str.
- 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.). Lukovica, Čebelarstva zveza Slovenije; Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 14-17

Poklukar J. 1998. Od čebele do medu. Ljubljana, Kmečki glas: 471 str.

Popek S. 2002. A procedure to identify a honey type. Food Chemistry, 79, 3: 401-406

Posudin Y.I., Polishuk V.P., Istomina V.A. 1995. Spectroscopic evaluation of honey quality. Spectroscopic Methods of Honey Investigation, 6: 78-82

Pravilnik o kolektivni blagovni in storitveni znamki za slovenski med vrhunske kakovosti. 1999. Ljubljana, Čebelarska zveza Slovenije: 7 str.

Pravilnik o medu. 2011. Uradni list Republike Slovenije, 21,4: 345-347

Moreira R.F.A., De Maria C.A.B. Pietroluongo M., Trugo L.C. 2007. Chemical changes in the non-volatile Brazilian honeys during storage under tropical condition. Food Chemistry, 104, 3: 1236-1241

Rudan-Tasič. D., Klofutar C. 2007. Fizikalno-kemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 376 str.

Sancho M.T., Muniategui S., Huidobro J.F. 1992. Aging of honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 134-138

Schade J.E., Marsh G.L., Eckert J.E. 1958. Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting alteration. Journal of Food Research, 23: 446-463

Sing N., Sing S., Bawa A.S., Sekhon K.S. 1988. Honey - its food uses. Indian Food Packer, 42: 15-25

Sirnik V. 2002. Ugotavljanje sortnosti medu z mikroskopsko, senzorično in fizikalno analizo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 20-44

Spons P. 1992. Honey analysis. V: Encyclopedia of food science and technology. Hui Y. H. (ed.). Vol. 2. New York, John Wiley and Sons, Inc.: 1417-1421

Šmit R. 1997. Nekatere fizikalno kemijske lastnosti slovenskih medov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 7-11

- Thrasyvoulou A.T. 1986. The use of HMF and diastase as criteria of quality of Greek honey. *Journal of Apicultural Research*, 25, 3: 186-195
- Tkavc A. 1997. Vsebnost HMF v medu - primerjava dveh metod. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 44-46
- Tosi E., Ciappini M., Ré E., Lucero H. 2001. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*, 77: 71-74
- Vrečar N. 2003. Vpliv segrevanja na diastazno aktivnost in vsebnost HMF v različnih vrstah medu. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 10-40
- Zappala M., Fallico B., Arena E., Verzera A. 2005. Methods for the determination of HMF in honey: A comparison. *Food Control*, 16: 273-277
- Zelenik-Blatnik M. 1986. Neencimsko porjavenje živil pri toplotni obdelavi. V: Toplotna obdelava živil. 9. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana 13. in 14. november 1986. Šikovec S., Bučar F., Klofutar C. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 80-88
- Žežlina I., Girolami V. 1999. Širjenje medečega škržata (*Metcalfa pruinosa* Say) v Sloveniji in Italiji ter sezonska dinamika pojavljanja razvojnih stadijev. Zbornik predavanj in referatov s 4. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 3. in 4. marec 1999. Maček J (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: str. 453-458
- White W.J. 1992. The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. *Bee World*, 75, 3:104-117
- White J.W.Jr. 1979. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62, 3: 509-514
- Yilmaz H., Küfrevioğlu I. 2001. Composition of honey collected from eastern and southeastern Anatolia and effect of storage on hydroxymethylfurfural content and diastase activity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25: 374-394

PRILOGE

Priloga A: Spremljanje vsebnosti HMF v medu med skladiščenjem na svetlobi

Vzorci medu	Vsebnost HMF (mg/kg)			
	svež vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
A01	4,017	6,230	8,390	19,008
A02	3,051	4,810	9,034	11,827
A04	0,542	1,872	5,347	7,872
A06	2,390	2,592	4,310	8,006
C23	1,695	2,218	7,123	7,834
C25	0,932	2,189	8,198	8,794
C31	4,661	5,213	14,218	16,051
G03	0,814	1,978	6,461	7,498
G05	1,695	1,968	2,909	5,078
G06	1,441	2,083	2,333	2,554
H04	1,559	3,350	4,646	5,616
K17	2,627	3,072	7,920	8,419
K33	0,678	0,912	3,466	4,157
K36	3,559	3,610	9,053	9,322
K37	0,339	1,229	2,736	2,976
L01	2,627	3,795	11,558	11,712
L02	0,932	1,325	3,590	5,088
M16	2,288	3,715	9,350	10,013
M17	1,651	2,208	2,851	3,072
M21	2,966	3,120	8,304	8,928
Š02	0,508	2,227	7,018	7,488
Š04	1,695	3,206	6,672	7,104
Š10	1,017	1,066	2,659	4,128
Š12	2,203	3,062	4,397	5,376

Priloga B: Spremljanje vsebnosti HMF v medu med skladiščenjem v temi

Vzorci medu	Vsebnost HMF (mg/kg)			
	svež vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
A01	4,017	6,125	10,512	18,624
A02	3,051	3,504	9,554	12,672
A04	0,542	1,709	6,509	8,640
A06	2,390	2,214	7,190	7,718
C23	1,695	1,901	7,027	7,296
C25	0,932	1,891	6,605	7,402
C31	4,661	5,002	10,214	12,096
G03	0,814	1,728	5,232	6,374
G05	1,695	2,141	3,312	3,744
G06	1,441	1,507	1,901	2,342
H04	1,559	2,016	4,435	5,194
K17	2,627	3,014	5,414	5,952
K33	0,678	1,718	3,859	3,917
K36	3,559	4,109	6,240	6,528
K37	0,339	0,950	1,891	2,112
L01	2,627	3,514	9,859	10,118
L02	0,932	1,459	3,264	3,869
M16	2,288	3,312	7,699	9,312
M17	1,651	2,006	2,938	3,178
M21	2,966	3,859	7,718	8,198
Š02	0,508	1,526	4,301	4,992
Š04	1,695	1,776	2,294	3,014
Š10	1,017	1,882	2,438	4,512
Š12	2,203	2,410	4,272	4,272

Priloga C: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem na svetlobi v nektarnem medu

	Parameter	Skladiščenje na svetlobi			
		svež vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
Vsebnost HMF (mg/kg)	X_{povp}	2,470	3,589	8,089	11,342
	X_{min}	0,542	1,872	4,310	7,834
	X_{max}	4,661	6,230	14,218	19,008
	SD	1,539	1,774	3,196	4,530
	KV (%)	25,7	29,6	53,3	75,5
	povprečno povečanje (%)		45,3*	125,4**	40,2***
	povprečno povečanje v 18 mesecih (%)	359,2			

*- povprečno povečanje vsebnosti HMF po 6-tih mesecih skladiščenja

** - povprečno povečanje vsebnosti HMF med 6-tim in 12-tim mesecem skladiščenja

***-povprečno povečanje vsebnosti HMF med 12-tim in 18-tim mesecem skladiščenja

Priloga D: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem v temi v nektarnem medu

	Parameter	Skladiščenje v temi			
		sveži vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
Vsebnost HMF (mg/kg)	X_{povp}	2,470	3,192	8,230	10,635
	X_{min}	0,542	1,709	6,509	7,296
	X_{max}	4,661	6,125	10,512	18,624
	SD	1,539	1,755	1,781	4,167
	KV (%)	25,7	29,3	29,7	69,5
	povprečno povečanje (%)		29,3*	157,8**	29,2***
	povprečno povečanje v 18 mesecih (%)	330,6			

*- povprečno povečanje vsebnosti HMF po 6-tih mesecih skladiščenja

** - povprečno povečanje vsebnosti HMF med 6-tim in 12-tim mesecem skladiščenja

***-povprečno povečanje vsebnosti HMF med 12-tim in 18-tim mesecem skladiščenja

Priloga E: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem na svetlobi v maninem medu

	Parameter	Skladiščenje na svetlobi			
		sveži vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
Vsebnost HMF (mg/kg)	X_{povp}	1,773	2,632	5,265	6,108
	X_{min}	0,814	1,968	2,333	2,554
	X_{max}	2,966	3,715	9,350	10,013
	SD	0,681	0,739	2,820	2,837
	KV (%)	11,4	12,3	47,0	47,3
	povprečno povečanje (%)		48,4*	100,1**	16,0***
	povprečno povečanje v 18 mesecih (%)	244,4			

*- povprečno povečanje vsebnosti HMF po 6-tih mesecih skladiščenja

** - povprečno povečanje vsebnosti HMF med 6-tim in 12-tim mesecem skladiščenja

***-povprečno povečanje vsebnosti HMF med 12-tim in 18-tim mesecem skladiščenja

Priloga F: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem v temi v maninem medu

	Parameter	Skladiščenje v temi			
		sveži vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
Vsebnost HMF (mg/kg)	X_{povp}	1,773	2,367	4,748	5,477
	X_{min}	0,814	1,507	1,901	2,342
	X_{max}	2,966	3,859	7,718	9,312
	SD	0,681	0,873	2,284	2,618
	KV (%)	11,4	14,5	38,1	43,6
	povprečno povečanje (%)		33,5*	100,6**	15,4***
	povprečno povečanje v 18 mesecih (%)	208,9			

*- povprečno povečanje vsebnosti HMF po 6-tih mesecih skladiščenja

** - povprečno povečanje vsebnosti HMF med 6-tim in 12-tim mesecem skladiščenja

***-povprečno povečanje vsebnosti HMF med 12-tim in 18-tim mesecem skladiščenja

Priloga G: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem na svetlobi v kostanjevem in lipovem medu

	Parameter	Skladiščenje na svetlobi			
		sveži vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
Vsebnost HMF (mg/kg)	X_{povp}	1,794	2,324	6,387	6,946
	X_{min}	0,339	0,912	2,736	2,976
	X_{max}	3,559	3,795	11,558	11,712
	SD	1,312	1,309	3,630	3,392
	KV (%)	21,9	21,8	60,5	56,5
	povprečno povečanje (%)		29,5*	174,9**	8,7***
	povprečno povečanje v 18 mesecih (%)	287,2			

*- povprečno povečanje vsebnosti HMF po 6-tih mesecih skladiščenja

**- povprečno povečanje vsebnosti HMF med 6-tim in 12-tim mesecem skladiščenja

***-povprečno povečanje vsebnosti HMF med 12-tim in 18-tim mesecem skladiščenja

Priloga H: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem v temi v kostanjevem in lipovem medu

	Parameter	Skladiščenje v temi			
		sveži vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
Vsebnost HMF (mg/kg)	X_{povp}	1,794	2,461	5,088	5,416
	X_{min}	0,339	0,950	1,891	2,112
	X_{max}	3,559	4,109	9,859	10,118
	SD	1,312	1,262	2,802	2,800
	KV (%)	21,9	21,0	46,7	46,7
	povprečno povečanje (%)		37,2*	106,8**	6,4***
	povprečno povečanje v 18 mesecih (%)	201,9			

*- povprečno povečanje vsebnosti HMF po 6-tih mesecih skladiščenja

**- povprečno povečanje vsebnosti HMF med 6-tim in 12-tim mesecem skladiščenja

***-povprečno povečanje vsebnosti HMF med 12-tim in 18-tim mesecem skladiščenja

Priloga I: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem na svetlobi v škržatovem medu

	Parameter	Skladiščenje na svetlobi			
		sveži vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
Vsebnost HMF (mg/kg)	X_{povp}	1,356	2,390	5,186	6,024
	X_{min}	0,508	1,066	2,659	4,128
	X_{max}	2,203	3,206	7,018	7,488
	SD	0,745	0,983	2,047	1,563
	KV (%)	12,4	16,4	34,1	26,0
	povprečno povečanje (%)		76,3*	117,0**	16,1***
	povprečno povečanje v 18 mesecih (%)	344,3			

*- povprečno povečanje vsebnosti HMF po 6-tih mesecih skladiščenja

**_ povprečno povečanje vsebnosti HMF med 6-tim in 12-tim mesecem skladiščenja

***-povprečno povečanje vsebnosti HMF med 12-tim in 18-tim mesecem skladiščenja

Priloga J: Statistični parametri za vsebnost HMF med skladiščenjem v temi v škržatovem medu

	Parameter	Skladiščenje v temi			
		Sveži vzorec	6 mesecev	12 mesecev	18 mesecev
Vsebnost HMF (mg/kg)	X_{povp}	1,356	1,898	3,326	4,198
	X_{min}	0,508	1,526	2,294	3,014
	X_{max}	2,203	2,410	4,301	4,992
	SD	0,745	0,372	1,110	0,944
	KV (%)		6,2	18,5	14,1
	povprečno povečanje (%)		40,0*	75,2**	26,2***
	povprečno povečanje v 18 mesecih (%)	209,6			

*- povprečno povečanje vsebnosti HMF po 6-tih mesecih skladiščenja

**_ povprečno povečanje vsebnosti HMF med 6-tim in 12-tim mesecem skladiščenja

***-povprečno povečanje vsebnosti HMF med 12-tim in 18-tim mesecem skladiščenja

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem:

- mentorici prof. dr. Tereziji Golob za njeno vsestransko pomoč, vzpodbudne besede in razumevanje, ki sem jih bila deležna v času študija. S svojimi širokim znanjem in dolgoletnimi izkušnjami je veliko prispevala h končni obliki naloge,
- somentorici doc. dr. Jasni Bertoncelj za strpnost, strokovno pomoč in podporo pri pisanju in oblikovanju diplomske naloge,
- prof. dr. Anamariji Plestenjak za idejno zasnovu diplomske naloge,
- prof.dr. Tatjani Košmerl za strokoven in hiter pregled diplomske naloge,
- knjižničarkama Barbari Slemenik, univ. dipl. bibl. in Lini Burkan Makivić, univ. dipl. inž. živ. tehnol. za pomoč pri zbiranju in urejanju literature ter vodji knjižnice Ivici Hočevnar, univ. dipl. inž. živ. tehnol. za strokoven pregled diplomske naloge
- moji družini za potrpljenje v času študija in nastajanju diplomske naloge. Smeh, razigranost in posluh so me držali pokonci in mi vlivali pozitivno energijo.

Jelena I., Saša H., Tadeja K. in Tatjana K. hvala, brez vas mi nebi uspelo!