

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Simona OVČEK

ENCIMSKA AKTIVNOST MEDU

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Simona OVČEK

ENCIMSKA AKTIVNOST MEDU

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ENZYME ACTIVITY OF HONEY

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so bile v laboratoriju opravljene fizikalno-kemijske analize.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Terezijo Golob in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simona OVČEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 638.16:577.15:543.635(043)=863
- KG med / slovenski med / encimi / diastaza / invertaza / diastazna aktivnost / invertazna aktivnost / vodikov peroksid
- AV OVČEK, Simona
- SA GOLOB, Terezija (mentorica) / ABRAM, Veronika (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2007
- IN ENCIMSKA AKTIVNOST MEDU
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 62 str., 27 pregl., 15 sl., 1 pril., 46 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen dela je bil določiti diastazno in invertazno aktivnost ter količino nastalega vodikovega peroksida v medu in preveriti ali so vrednosti vrstno značilne ter če ustrezajo predpisanim oziroma priporočenim vrednostim. Analizirali smo 84 vzorcev značilnih vrst slovenskega medu: akacijevega, lipovega, cvetličnega, kostanjevega, gozdnega, hojevega in smrekovega. Vrednosti diastaznega števila so se gibale od 5,9 do 27,4. Vsi vzorci so ustrezali slovenski zakonodaji (Pravilnik o medu, 2004), ki predpisuje najnižjo vrednost diastaznega števila 8 oziroma 3 za med z naravno nizko encimsko aktivnostjo in dosegali priporočene vrednosti, ki jih za svež med navaja literatura. Statistična obdelava rezultatov je pokazala, da so bile vrednosti diastaznega števila vrstno značilne. Vrednosti invertaznega števila so se gibale od 3,3 do 26,0. Vsi vzorci, razen dveh vzorcev lipovega medu, so dosegali priporočene vrednosti za svež med. Med diastazno in invertazno aktivnostjo v vseh analiziranih vzorcih smo določili močno pozitivno korelacijo. Količina nastalega vodikovega peroksida se je gibala od 0,0 do 115,2 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g medu/h}$ in je med vrstami, kot tudi znotraj posameznih vrst medu, zelo variirala.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 638.16:577.15:543.635(043)=863
- CX honeys / Slovenian honey / enzymes / diastase / invertase / diastase activity / invertase activity / hydrogen peroxide
- AU OVČEK, Simona
- AA GOLOB, Terezija (supervisor) / ABRAM, Veronika (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2007
- TI ENZYME ACTIVITY OF HONEY
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 62 p., 27 tab., 15 fig., 1 ann., 46 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of the thesis was to determine diastase and invertase activity and the amount of produced hydrogen peroxide in honey. We wanted to find out whether the values are significant for the type of the honey and whether they correspond to the prescribed and the recommended values. 84 samples of the characteristic types of Slovenian honey: acacia, lime, floral, chestnut, forest, fir and spruce were analyzed. Values of the diastase number ranged from 5.9 to 27.4. All samples corresponded to the Slovenian regulation for honey (Pravilnik o medu, 2004), which prescribes as the minimum value of diastase number the value 8 and the value 3 for honey with low natural enzyme activity. All samples also reached the recommended values, indicated for the fresh honey by the literature. Statistical analysis of the results showed that the diastase number is a significant parameter for the type of the honey. Values of the invertase number ranged from 3.3 to 26.0. Except for two samples of lime honey, all analyzed samples reached the recommended values for the fresh honey. Between diastase and invertase activity a strong positive correlation was determined. The amount of produced hydrogen peroxide ranged from 0.0 to 115.2 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g honey/h}$ and varied considerably among and within analyzed types of honey.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 NASTANEK IN BIOLOŠKO POREKLO MEDU	2
2.2 PRAVILNIK O MEDU	2
2.3 SESTAVA MEDU	4
2.3.1 Ogljikovi hidrati.....	4
2.3.2 Voda	5
2.3.3 Beljakovine in aminokisline	5
2.3.4 Organske kisline.....	5
2.3.5 Mineralne snovi.....	5
2.3.6 Vitamini	5
2.3.7 Hidroksimetilfurfural.....	6
2.4 ENCIMI V MEDU	6
2.4.1 Diastaza.....	7
2.4.2 Invertaza	8
2.4.3 Glukoza-oksidaza.....	9
2.4.4 Katalaza	10
2.4.5 Kisl fosfataza	10
2.5 ENCIMSKA AKTIVNOST KOT KRITERIJ KAKOVOSTI MEDU.....	11
2.5.1 Korelacija med diastazno in invertazno aktivnostjo	12
2.6 ANTIMIKROBNE SNOVI V MEDU	13
2.6.1 Peroksidni sistem inhibinov	13
2.6.1.1 Korelacija količine nastalega H ₂ O ₂ z diastazno in invertazno aktivnostjo.....	15
2.6.2 Neperoksidni sistem inhibinov.....	15
3 MATERIALI IN METODE.....	16
3.1 VZORCI MEDU	16
3.2 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE	17
3.2.1 Spektrofotometrično določanje diastazne aktivnosti	17
3.2.2 Spektrofotometrično določanje invertazne aktivnosti	19
3.2.3 Spektrofotometrično določanje količine nastalega H₂O₂.....	21
3.3 STATISTIČNA ANALIZA.....	24

4	REZULTATI	28
4.1	REZULTATI DOLOČANJA DIASTAZNE AKTIVNOSTI	28
4.1.1	Ponovljivost metode za določanje diastazne aktivnosti.....	28
4.1.2	Diastazno število v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu	28
4.1.3	Statistična obdelava rezultatov določanja diastazne aktivnosti	30
4.2	REZULTATI DOLOČANJA INVERTAZNE AKTIVNOSTI.....	33
4.2.1	Ponovljivost metode za določanje invertazne aktivnosti.....	33
4.2.2	Invertazno število v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu	34
4.2.3	Statistična obdelava rezultatov določanja invertazne aktivnosti	35
4.3	KORELACIJA MED DIASTAZNO IN INVERTAZNO AKTIVNOSTJO	38
4.4	RAZMERJE IN/DN V ANALIZIRANIH VZORCIH MEDU	40
4.4.1	Statistična obdelava rezultatov IN/DN	41
4.4.2	Korelacija razmerja IN/DN z diastazno in invertazno aktivnostjo.....	42
4.5	REZULTATI DOLOČANJA KOLIČINE NASTALEGA H ₂ O ₂	43
4.5.1	Ponovljivost metode za določanje količine nastalega H₂O₂	43
4.5.2	Količina nastalega H₂O₂ v vzorcih glede na posamezno vrsto medu	43
4.5.3	Statistična obdelava rezultatov določanja količine nastalega H₂O₂.....	45
4.6	KORELACIJA H ₂ O ₂ Z DIASTAZNO IN INVERTAZNO AKTIVNOSTJO	48
4.6.1	Korelacija med količino nastalega H₂O₂ in diastazno aktivnostjo.....	48
4.6.2	Korelacija med količino nastalega H₂O₂ in invertazno aktivnostjo.....	49
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1	RAZPRAVA.....	51
5.2	SKLEPI.....	56
6	POVZETEK	57
7	VIRI	59
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Kriteriji sestave medu (Pravilnik o medu, 2004; Council directive ..., 2002)	3
Preglednica 2. Vpliv pH-vrednosti na diastazno aktivnost (Babacan in sod., 2002)	7
Preglednica 3. Vpliv temperature na diastazno aktivnost (White, 1994)	8
Preglednica 4. Povprečne vrednosti diastaznega števila v različnih vrstah slovenskega medu	8
Preglednica 5. Vpliv temperature na invertazno aktivnost (White, 1994)	9
Preglednica 6. Diastazno (DN) in invertazno število (IN) ter razmerje IN/DN v posameznih vrstah italijanskega medu (Persano Oddo, 1999)	11
Preglednica 7. Smernice za vrednotenje kakovosti medu glede na vpliv segrevanja (Gfeller in Bogdanov, 2006)	12
Preglednica 8. Koeficienti korelacije med diastazno in invertazno aktivnostjo	12
Preglednica 9. Količina v medu nastalega H ₂ O ₂ , ki ustreza posameznemu inhibinskemu številu (White in Subers, 1963)	14
Preglednica 10. Izguba H ₂ O ₂ v posameznih vrstah medu (5 mm debela plast medu) po 10 minutni izpostavljenosti sončni svetlobi (Dustmann, 1972)	14
Preglednica 11. Analizirani vzorci glede na posamezno vrsto medu	16
Preglednica 12. Volumen 0,1 % (v/v) raztopine H ₂ O ₂ , količina H ₂ O ₂ v 8 mL in ustrezna količina nastalega H ₂ O ₂ v µg/g medu/h	22
Preglednica 13. Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti (Seljak, 1996)	26
Preglednica 14. Diastazno število (DN) v vzorcu K35 z izračunanimi statističnimi parametri	28
Preglednica 15. Diastazno število (DN) v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu	29
Preglednica 16. Diastazno število za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri	31
Preglednica 17. Invertazno število (IN) v vzorcu L20 z izračunanimi statističnimi parametri	33
Preglednica 18. Invertazno število (IN) v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu	34
Preglednica 19. Invertazno število za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri	36
Preglednica 20. Koeficienti korelacije in determinacije med diastazno in invertazno aktivnostjo pri posameznih vrstah medu	38
Preglednica 21. Razmerje IN/DN v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu	40
Preglednica 22. Razmerje IN/DN za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri	41
Preglednica 23. Količina nastalega H ₂ O ₂ v vzorcu L29 z izračunanimi statističnimi parametri	43
Preglednica 24. Količina nastalega H ₂ O ₂ v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu	44
Preglednica 25. Količina nastalega H ₂ O ₂ za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri	46

Preglednica 26. Koeficienti korelacije in determinacije med količino nastalega H_2O_2 in diastazno aktivnostjo pri posameznih vrstah medu	48
Preglednica 27. Koeficienti korelacije in determinacije med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo pri posameznih vrstah medu	50

KAZALO SLIK

Slika 1. Umeritvena krivulja za določanje količine nastalega H_2O_2	23
Slika 2. Diastazno število (DN) analiziranih vzorcev glede na posamezno vrsto medu z označeno predpisano mejno vrednostjo in priporočeno mejno vrednostjo za svež med	30
Slika 3. Najnižje, povprečne in najvišje vrednosti diastaznega števila (DN) v posameznih vrstah medu	31
Slika 4. Koeficienti variabilnosti (KV) diastaznega števila glede na posamezno vrsto medu	32
Slika 5. Invertazno število (IN) analiziranih vzorcev glede na posamezno vrsto medu z označeno priporočeno mejno vrednostjo za svež med	35
Slika 6. Najnižje, povprečne in najvišje vrednosti invertaznega števila (IN) v posameznih vrstah medu	36
Slika 7. Koeficienti variabilnosti (KV) invertaznega števila glede na posamezno vrsto medu	37
Slika 8. Korelacija med diastazno in invertazno aktivnostjo za vse vrste medu	38
Slika 9. Razmerje IN/DN v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu z označeno priporočeno mejno vrednostjo za svež med	41
Slika 10. Najnižje, povprečne in najvišje vrednosti razmerja IN/DN v posameznih vrstah medu	42
Slika 11. Količina nastalega H_2O_2 v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu	45
Slika 12. Najnižje, povprečne in najvišje vrednosti količine nastalega H_2O_2 v posameznih vrstah medu	46
Slika 13. Koeficienti variabilnosti (KV) količine nastalega H_2O_2 glede na posamezno vrsto medu	47
Slika 14. Korelacija med količino nastalega H_2O_2 in diastazno aktivnostjo za vse vrste medu	48
Slika 15. Korelacija med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo za vse vrste medu	49

KAZALO PRILOG

Priloga A. Invertazna aktivnost v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu, podana kot število μmol razgrajenega substrata/kg medu/min

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DN	diastazno število
F	fruktoza
G	glukoza
HMF	hidroksimetilfurfural
IA	invertazna aktivnost
IN	invertazno število
KV	koeficient variabilnosti
R	koeficient korelacije
R ²	koeficient determinacije
SD	standardni odklon
U/kg	enota invertazne aktivnosti
\bar{x}	povprečna vrednost
x _{max}	maksimalna vrednost
x _{min}	minimalna vrednost
α	stopnja tveganja

1 UVOD

Med je naravni čebelji pridelek, ki poleg ogljikovih hidratov vsebuje še druge pomembne hranilne sestavine: dekstrine, organske kisline, beljakovine, encime, vitamine, mineralne in aromatične snovi ter barvila. Cenjen je kot živilo, ki veča umsko in telesno moč, pomirja pri živčnih napetostih, krepi organizem med boleznijo, ugodno vpliva na prebavo in celi rane. Med je tako hrana za zdrave in bolne, v vseh življenjskih obdobjih in v vseh letnih časih. Lahko ga uporabimo tudi kot sladilo in dodatek jedem.

Zaradi vedno večje potrošnje in zahtev kupcev pa je med čedalje bolj podvržen številnim tehnološkim postopkom, ki mu sicer zagotovijo želen okus in konsistenco, vendar vodijo do poslabšanja nekaterih fizikalno-kemijskih in senzoričnih lastnosti.

Pomembnejši encimi v medu so diastaza, invertaza in glukoza-oksidaža. Encimska aktivnost medu je odvisna od biološkega izvora ter od postopka pridobivanja in shranjevanja medu. Encimi v medu so poleg vsebnosti hidroksimetilfurfurala pokazatelj pregretosti oziroma staranja medu. Če med segrevamo pri višji temperaturi, se encimi uničijo, pri daljšem shranjevanju pa se zmanjša njihova aktivnost. Diastaza je najbolj toplotno odporen encim v medu, zato diastazno število najbolj pogosto uporabljamo kot kriterij kakovosti medu. V medu nastaja pod vplivom encima glukoza-oksidaže v majhnih količinah tudi vodikov peroksid, ki naj bi bil pomemben pri antibakterijskem učinku medu.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil določiti diastazno in invertazno število ter količino nastalega vodikovega peroksida v različnih vrstah slovenskega medu, letnika 2006. Podatkov o invertazni aktivnosti in količini nastalega vodikovega peroksida v slovenskem medu še nismo imeli in smo z dobljenimi rezultati dopolnili bazo podatkov o slovenskem medu. Rezultate smo primerjali s podatki iz literature in vrednostmi, ki jih za diastazno število predpisuje Pravilnik o medu (2004). S statistično obdelavo smo določili tudi korelacije med obravnavanimi parametri.

Na podlagi podatkov iz literature smo pričakovali, da bodo vrednosti diastaznega in invertaznega števila vrstno značilne ter da obstaja zveza med aktivnostjo omenjenih encimov. Predvidevali smo, da bo encimska aktivnost največja v kostanjevem medu in medovih iz mane, najmanjša pa v akacijevem in lipovem medu. Pričakovali smo tudi, da bodo vsi vzorci ustrezali zahtevam slovenske zakonodaje (Pravilnik o medu, 2004), ki predpisuje najnižjo vrednost diastaznega števila 8 oziroma 3 za med z naravno nizko encimsko aktivnostjo. Glede količine nastalega vodikovega peroksida v medu smo predvidevali, da bo variirala tako med vrstami kot tudi znotraj posamezne vrste medu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NASTANEK IN BIOLOŠKO POREKLO MEDU

Med je gosto tekoče ali kristalizirano živilo, ki so ga proizvedle čebele. Osnovni material prinašajo čebele v panj, ga obdelajo, mu dodajo izločke svojih žlez, ga zgostijo in nato shranjujejo v pokritih celicah satja (Božnar in Senegačnik, 1998).

Med se razvršča in poimenuje glede na izvor kot (Pravilnik o medu, 2004):

- »cvetlični med ali nektar«, ki je pridobljen iz nektarja cvetov;
- »med iz mane ali gozdni med«, ki je pridobljen povsem iz izločkov insektov (*Hemiptera*) na živih delih rastlin ali izločkov živih delov rastlin.

Nektar izločajo cvetovi večine cvetnic, ki jih oprašujejo žuželke. Sestavljajo ga ogljikovi hidrati, v majhnih količinah pa najdemo tudi aminokislino, mineralne snovi, eterična olja, organske kisline, barvila in zrnca cvetnega prahu. Najpomembnejši ogljikovi hidrati so glukoza, fruktoza in saharoza, ki so, odvisno od izvora nektarja, v različnih medsebojnih razmerjih. Vitaminov je zelo malo, več jih vsebujejo nektarji z veliko cvetnega prahu.

Mano izločajo živi deli rastlin ter listne uši, kaparji in škržati, ki srkajo rastlinske sokove. Poleg omenjenih ogljikovih hidratov najdemo v mani tudi povsem nove, kot je na primer melecitoza. Le-ta povzroča, da med, ki je nastal iz ustrezne mane, v satju zelo hitro kristalizira. Mana vsebuje tudi aminokislino, vitamine, organske kisline in encime. V primerjavi z nektarjem je precej bogata z mineralnimi snovmi, med katerimi prevladujejo spojine kalija, magnezija in fosforja (Božnar in Senegačnik, 1998).

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 še upoštevamo število rastlinskih vrst, katerim pripada medičina, razlikujemo sortne (ena prevladujoča rastlinska vrsta) in nesortne medove (dve ali več rastlinskih vrst). Po Pravilniku (2004) mora imeti sortni med ustrezne senzorične, fizikalno-kemijske in mikroskopske lastnosti, značilne za rastlino, ki ji pripada medičina.

Glede na biološko poreklo je Slovenija znana tako po nektarnem kot maninem medu. Znanе nektarne vrste so: akacijev, lipov, cvetlični in kostanjev med, med maninimi vrstami pa prevladujejo gozdni, hojev in smrekov med. Medove lipe in kostanja lahko opredelimo tudi kot mešane nektarno-manine medove.

2.2 PRAVILNIK O MEDU

Pravilnik o medu, ki je bil objavljen v Uradnem listu RS št. 31 z dne 31.3.2004, določa pogoje za minimalno kakovost, ki jih mora v prometu izpolnjevati med kot predpakirano živilo. Pravilnik je usklajen z direktivo Evropske unije (Council directive ..., 2002) in določa enake pogoje. Osnovni kakovostni parametri so podani v preglednici 1.

Preglednica 1. Kriteriji sestave medu (Pravilnik o medu, 2004; Council directive ..., 2002)

FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETER	VRSTA MEDU	KOLIČINA	
		min	max
vsebnost fruktoze in glukoze (g/100 g)	cvetlični	60	-
	gozdni, mešanica gozdnega in cvetličnega	45	-
vsebnost saharoze (g/100 g)	cvetlični	-	5
	gozdni	-	10
vsebnost vode (g/100 g)	splošno	-	20
vsebnost v vodi netopnih snovi (g/100 g)	splošno	-	0,1
električna prevodnost (mS/cm)	cvetlični	-	0,8
	gozdni, kostanjev	0,8	-
proste kisline (miliekvivalenti/kg)	splošno	-	50
diastazno število	splošno, razen pekovskega medu	8	-
	med z majhno naravno vsebnostjo encimov	3	-
HMF (mg/kg)	splošno, razen pekovskega medu	-	40
	med iz območij s tropsko klimo	-	80

Po tem Pravilniku je med naravna sladka snov, ki jo izdelajo čebele *Apis mellifera* iz nektarja cvetov ali izločkov živih delov rastlin ali izločkov na živih delih rastlin, ki jih čebele zberejo, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju.

Med, ki se daje v promet kot med ali je namenjen za uporabo v kateremkoli živilu, namenjenemu za prehrano ljudi, ne sme vsebovati nobenih dodanih sestavin, vključno z aditivi za živila, niti nobenih drugih dodatkov. Kolikor je mogoče mora biti brez organskih ali anorganskih tujih primesi. Ne sme imeti tujega okusa ali vonja, ne sme začeti fermentirati, njegova stopnja kislosti ne sme biti umetno spremenjena in ne sme biti pregret tako, da so naravni encimi, bodisi uničeni, bodisi je znatno zmanjšana njihova aktivnost (Pravilnik o medu, 2004).

Za naše delo je najbolj pomemben parameter diastazno število, ki v medu po obdelavi in mešanju ne sme biti nižje od 8 oziroma nižje od 3 za med z naravno nizko encimsko aktivnostjo.

2.3 SESTAVA MEDU

Med je razmeroma koncentrirana vodna raztopina predvsem treh vrst ogljikovih hidratov: glukoze, fruktoze in saharoze, ki jih lahko spremljajo še drugi ogljikovi hidrati ter poleg njih v manjših količinah beljakovine, aminokisliline, encimi, organske kisline, vitamini, mineralne in aromatične snovi ter barvila. Ogljikovi hidrati, ki so od vseh sestavin najmočnejše zastopani, dajejo medu njegove najznačilnejše lastnosti, medtem ko ostale povzročajo individualne razlike v senzoričnih lastnostih med posameznimi vrstami medu (Božnar in Senegačnik, 1998).

2.3.1 Ogljikovi hidrati

Med vsebuje v povprečju okrog 40 % fruktoze (F), 34 % glukoze (G) in od 1 do 4 % saharoze. Razmerje med njimi je odvisno od same vrste medu in encima invertaze, ki pride v med delno že z medicino, večinoma pa iz izločkov čebeljih žlez. Invertaza cepi saharozo v invertni sladkor, to je mešanico glukoze in fruktoze (Božnar in Senegačnik, 1998).

Sladkorji so pokazatelji (Kmecl, 2006):

- izvora;
- kristalizacije in
- potvorjenosti medu.

Nektarni med vsebuje več monosaharidov (fruktoze in glukoze), manj disaharidov (saharoze in maltoze) in minimalno količino oligosaharidov. Med iz mane pa ima več oligosaharidov, predvsem melecitoze in rafinoze ter manj monosaharidov (Kmecl, 2006).

Kristalizacija je naraven pojav, ki je odvisen od razmerja med fruktozo in glukozo, razmerja med glukozo in vodo ter temperature in časa shranjevanja. Hitreje kristalizirajo tiste vrste medu, ki vsebujejo več glukoze kot fruktoze. Če je razmerje F/G med 1,0 in 1,2, med hitreje kristalizira, razmerje, višje od 1,3, pa pomeni počasnejšo kristalizacijo. Akacijev med z razmerjem F/G od 1,4-1,7 tako zelo redko kristalizira. Nadalje velja, če je razmerje glukoza/voda nižje od 1,7, med ne kristalizira oziroma če je višje od 2,1, med kristalizira. Na stopnjo kristalizacije vpliva tudi vsebnost melecitoze, ki se v medu slabo topi in hitro kristalizira (Božnar, 2003; Plestenjak, 1999; Kmecl, 2006).

Potvorjenost medu lahko ugotovimo na podlagi povečane vsebnosti saharoze (nad 5 %), ki naraste zaradi hranjenja čebel s sladkorno raztopino ali neposrednega dodatka sladkorja v med (Kmecl, 2006).

2.3.2 Voda

Za vsebnost vode v medu obstajata spodnja in zgornja meja. Spodnja je pomembna zaradi topnosti posameznih sestavin medu v vodi, zgornjo pa predpisuje Pravilnik o medu (2004). Le-ta dovoljuje največ 20 % vode v medu. V naših klimatskih pogojih zrel med navadno te vrednosti ne presega in vsebuje v povprečju od 15 do 18 % vode. Med z manjšo vsebnostjo vode je bolj viskozen, z večjo pa redkejši in bolj tekoč. Tak med je slabše obstojen in lahko prične vreti, če je kontaminiran z ozmofilnimi kvasovkami, ki pretvarjajo ogljikove hidrate v medu v alkohol, kasneje pa v očetno kislino in ogljikov dioksid. Med vrhunske kakovosti sme vsebovati največ 18,6 % vode (Božnar in Senegačnik, 1998; Plestenjak, 1999).

2.3.3 Beljakovine in aminokislino

Med vsebuje običajno le malo beljakovin (0,2-0,3 %). Glavni izvor beljakovin v medu je cvetni prah, nekaj pa jih pride tudi iz nektarja in mane. Več aminokislin imajo običajno medovi iz mane. Glavni aminokislino v medu sta prolina in fenilalanin. Obe sodelujeta pri nastajanju aromatičnih snovi v medu, koncentracija prolina pa je pomembna tudi pri ugotavljanju potvorjenosti medu (Božnar, 2003).

2.3.4 Organske kisline

Med je kislo živilo, z vrednostjo pH med 3,2 in 5,5. Vsebuje številne organske kisline, med katerimi je najpomembnejša glukonska kislina, ki nastane pri encimski pretvorbi glukoze z encimom glukoza-oksidadza. Najdemo še jabolčno, jantarno, očetno, mravljinčno, masleno, mlečno in oksalno kislino. Izvor teh kislin je medičina in čebela sama.

Kislost medu je povezana s stabilnostjo medu pred delovanjem mikroorganizmov in z aromo. Medovi iz mane vsebujejo veliko mineralnih snovi in imajo navadno višjo vrednost pH. Posledično so manj kislega okusa, čeprav vsebujejo več kislin kot nektarni medovi (Božnar, 2003; Plestenjak, 1999).

2.3.5 Mineralne snovi

V medu najdemo soli kalija, natrija, magnezija, kalcija, železa in druge. Njihova količina je odvisna od izvora in intenzivnosti čebelje paše ter se giblje med 0,02 in 1 %. Najmanj jih je v nektarnih medovih, zlasti v akacijevem, več pa v medovih iz mane.

V tesni zvezi s količino mineralnih snovi je električna prevodnost medu. Za manine medove je zaradi večje vsebnosti mineralnih snovi višja, za medove iz nektarja pa nižja (Božnar, 2003; Plestenjak, 1999).

2.3.6 Vitamini

V medu so prisotni predvsem v vodi topni vitamini, to so vitamini B-kompleksa in vitamin C. V med pridejo v glavnem s cvetnim prahom (Božnar in Senegačnik, 1998).

2.3.7 Hidroksimetilfurfural

Hidroksimetilfurfural (HMF) je ciklični aldehid (5-hidroksimetil-2-furaldehid), ki nastaja pri razgradnji ogljikovih hidratov, predvsem fruktoze in glukoze, v kislem okolju medu (Bertoncelj in sod., 2004).

V svežem medu ga praktično ni, njegova vsebnost ne presega 1 mg/kg. Večje količine se tvorijo med dolgotrajnim skladiščenjem, mnogo hitreje pa pri izpostavljenosti visokim temperaturam. HMF se zato uporablja kot kriterij svežosti oziroma pokazatelj pregretosti medu. Pravilnik (2004) dovoljuje največ 40 mg HMF v 1 kg medu, med vrhunske kakovosti pa ne sme presegati 10 mg/kg (Plestenjak, 1999).

Tvorba HMF je odvisna od vrednosti pH v medu. V splošnem imajo nektarni medovi nižje, manini medovi pa višje vrednosti pH. Pri medu z nižjo vrednostjo pH se tvori HMF hitreje kot pri tistih, z višjo vrednostjo pH (Gfeller in Bogdanov, 2006).

2.4 ENCIMI V MEDU

Encimi so med najpomembnejšimi in najbolj zanimivimi spojinami v medu, predvsem zaradi vloge, ki jo imajo pri nastajanju medu iz medicine (Božnar in Senegačnik, 1998).

Kemijsko so encimi proteini, ki katalizirajo biokemijske reakcije v živih organizmih. Njihova aktivnost je odvisna od parametrov, kot so: vrednost pH, temperatura in količina vode. Optimalne vrednosti teh parametrov so za delovanje posameznega encima specifične, vendar pri večini nastopi pri temperaturi 50-60 °C ireverzibilna inaktivacija. To dejstvo je treba upoštevati pri obdelavi in shranjevanju živil, pri katerih je encimska aktivnost zaželeno (Matissek in sod., 1992).

Med vsebuje majhne količine različnih encimov, od katerih so najbolj pomembni: diastaza, invertaza, glukoza-oksidaža, katalaza in kislina fosfataza. Izvirajo iz nektarja in mane, čebelje slinice ter izločkov krmilnih ali goltnih žlez čebel. Kljub temu, da so prisotni le v sledovih, imajo velik vpliv na naravo in značilnosti medu, saj prav vsebnost encimov loči med od ostalih sladil (Huidobro in sod., 1995; Serrano in sod., 2007).

Zaradi občutljivosti na toploto se uporabljajo kot pokazatelj pregretosti oziroma kriterij kakovosti medu. Najbolj uveljavljeno je določanje diastazne aktivnosti, vendar se čedalje bolj upošteva tudi invertazna aktivnost, predvsem zaradi večje občutljivosti invertaze na visoke temperature (Molan, 1996).

2.4.1 Diastaza

Diastazo uvrščamo med hidrolaze in naprej med glikozilaze, ki katalizirajo razcep glikozidnih vezi. Diastaza je v bistvu skupno ime za encima α - in β -amilazo, ki katalizirata razcep α -D-(1,4)-glikozidne vezi v škrobu. α -amilaza deluje kot endoglukozidaza in povzroči naključno hidrolizo znotraj škrobne molekule, pri čemer nastajajo dekstrini. β -amilaza pa kot eksoglukozidaza odceplja maltozo s konca škrobne verige (Webb, 1992; Yilmaz in Küfrevioğlu, 2001).

Diastaza izvira izključno od čebel, saj nektar ne vsebuje škroba ali dekstrinov. Dokazali so, da je diastaza v medu bolj podobna amilazi v izločkih čebeljih žlez kot tisti, ki je prisotna v nektarju. Našli so jo tudi v medovih čebel, ki so bile hranjene s saharozo. Med zorenjem medu se diastaza primeša medicini iz izločkov čebeljih slinskih žlez, vendar v medu nima posebne vloge.

Diastazna aktivnost med posameznimi vrstami medu variira in je odvisna od biološkega porekla medu kot tudi od količine saharoze v hrani čebel, količine nektarja, ki ga je potrebno obdelati, ter celo starosti čebel. Znano je, da čebele ob obilni paši ne morejo tako intenzivno obdelati nektarja, zato imajo nekateri medovi nižjo encimsko aktivnost. Nektarji z visokim odstotkom ogljikovih hidratov prav tako ne zahtevajo toliko dela s strani čebel in se jim med samim procesom zorenja primeša manj encimov (Aldcorn in sod., 1985; Babacan in sod., 2002; Vit in Pulcini, 1996; White, 1994).

Optimalna vrednost pH za delovanje diastaze je med 5,3 in 5,6. Čim bolj se vrednost pH odmika od optimalne, tem bolj se diastazna aktivnost zmanjšuje, kar podrobneje prikazuje preglednica 2 (Babacan in sod. 2002).

Preglednica 2. Vpliv pH-vrednosti na diastazno aktivnost (Babacan in sod., 2002)

VREDNOST PH	zmanjšanje diastazne aktivnosti (%)
7,1	76
6,5	30
4,6	27
3,8	85
3,6	100

Diastazna aktivnost se znižuje tudi ob segrevanju in dolgotrajnem skladiščenju. V preglednici 3 je predstavljen čas, v katerem pride do znižanja diastazne aktivnosti na polovico začetne ob izpostavljenosti temperaturam med 20 in 80 °C.

Preglednica 3. Vpliv temperature na diastazno aktivnost (White, 1994)

temperatura (°C)	razpolovni čas diastazne aktivnosti
20	1480 dni
30	200 dni
40	31 dni
50	5,4 dni
60	25 h
70	5,3 h
80	1,2 h

Bertoncelj in sod. (2004) navajajo, da sedemmesečno shranjevanje medu pri sobni temperaturi v temnem prostoru ne vpliva značilno na diastazno aktivnost, medtem ko izpostavljenost medu svetlobi zniža aktivnost encima za povprečno 6 %. Krauze in Krauze (1991) pa sta po 26 do 30 mesečnem shranjevanju medu pri enakih pogojih ugotovila znižanja diastazne aktivnosti za povprečno 16,5 %, torej približno 0,6 % na mesec.

Aktivnost diastaze izražamo z diastaznim številom – DN, ki pomeni volumen 1 % raztopine škroba v mL, ki jo encim iz 1 g medu hidrolizira v 1 uri pri temperaturi 40 °C.

V svežem medu se vrednosti diastaznega števila gibljejo med 13 in 30. Akacijev med je znan po nizkem diastaznem številu, ki je ponavadi zmeraj nižje od 15. V lipovem in kostanjevem medu ter medovih iz mane 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 (Gfeller in Bogdanov, 2006; Persano Oddo in sod., 1999; Pravilnik o medu, 2004).

Preglednica 4. Povprečne vrednosti diastaznega števila v različnih vrstah slovenskega medu

vrsta medu	diastazno število		
	Golob in Plestenjak (1999)	Vrečar (2003)	Karo (2004)
akacijev	9,3	11,1	12,3
lipov	13,2	14,3	14,0
cvetlični	13,4	14,2	18,7
kostanjev	17,5	21,4	22,6
gozdni	18,6	16,6	19,8
hojev	16,6	18,6	16,3
smrekov	-	22,5	14,8

2.4.2 Invertaza

Invertazo uvrščamo podobno kot diastazo med hidrolaze in naprej med glikozilaze, ki katalizirajo razcep glikozidnih vezi. Drugo ime za invertazo je α -glukozidaza, ki katalizira pretvorbo saharoze v invertni sladkor, to je mešanico glukoze in fruktoze. Ima tudi transglukozilazno aktivnost, rezultat katere je nastanek oligosaharidov v medu, kot so maltoza, izomaltoza, erloza in izomaltotrioza (Molan, 1996; Webb, 1992).

Invertaza lahko delno izvira iz nektarja, v glavnem pa iz izločkov čebeljih krmilnih žlez. Količina izločene invertaze je odvisna od starosti čebel, njihovega fiziološkega stanja, prehrane, stanja kolonije, temperature ter količine nektarja, ki ga je potrebno obdelati. Več encima izločajo mlade čebele, stare okrog 4 tedne, katerih goltne žleze so popolnoma razvite. Največ invertaze vsebujejo medovi iz mane, saj mana zelo pogosto vsebuje tudi različne invertaze iz črevesja in slin insektov (Horn in Böhm, 2004; Persano Oddo in sod., 1999; Vorlová in Přidal, 2002). Optimalna vrednost pH za delovanje encima se giblje med 5,8 in 6,5 (Belitz in sod., 2004).

Na segrevanje in dolgotrajno skladiščenje je invertaza bolj občutljiva kot diastaza, vendar je hitrost inaktivacije encima pod 15 °C zelo majhna. Pri skladiščenju medu pri 20 °C v temnem prostoru se invertazna aktivnost znižuje od povprečno 1,1 % (Krauze in Krauze, 1991) do 1,6 % na mesec (Vorlová in Přidal, 2002). V preglednici 5 je predstavljen čas, v katerem pride do znižanja invertazne aktivnosti na polovico začetne ob izpostavljenosti temperaturam med 20 in 80 °C.

Preglednica 5. Vpliv temperature na invertazno aktivnost (White, 1994)

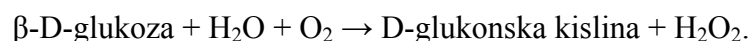
temperatura (°C)	razpolovni čas invertazne aktivnosti
20	820 dni
30	83 dni
40	9,6 dni
50	31 h
60	4,7 h
70	47 min
80	8,6 min

Aktivnost invertaze lahko izražamo kot število μmol substrata p-nitrofenol- α -D-glukopiranozida, razgrajenega v minuti na kg medu ($\mu\text{mol/kg medu/min}$) ali kot invertazno število – IN, ki pomeni maso saharoze v g, hidrolizirane v 1 h z encimi iz 100 g medu.

V svežem medu se vrednosti invertaznega števila gibljejo med 10 in 25. Akacijev med z naravno nizko encimsko aktivnostjo ima ponavadi vrednosti nižje od 10, pri lipovem medu se gibljejo med 5 in 20, pri cvetličnem med 7 in 28 ter pri kostanjevem med 14 in 30. Najvišje vrednosti invertaznega števila imajo medovi iz mane, pri katerih so ponavadi višje od 18. Invertazno število pregretega medu je nižje od 8 oziroma nižje od 4 za med z naravno nizko encimsko aktivnostjo (Gfeller in Bogdanov, 2006; Persano Oddo in sod., 1999).

2.4.3 Glukoza-oksidadza

Glukoza-oksidadza se primeša medicini med zorenjem medu iz izločkov krmilnih žlez čebel. Uvrščamo jo med oksidoreduktaze, ki katalizirajo oksidacijsko-redukcijske reakcije. Glukoza-oksidadza katalizira oksidacijo glukoze v medu preko D-glukonolaktone v D-glukonsko kislino in vodikov peroksid:



Glukonska kislina je prevladujoča kislina v medu in je v veliki meri odgovorna za nizko vrednost pH v medu. Skupaj z nastalim vodikovim peroksidom prispevata k antibakterijskemu učinku medu med zorenjem. Optimalna vrednost pH za delovanje encima je 6,1 (Belitz in sod., 2004; Webb, 1992; White in sod., 1963).

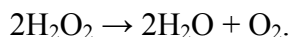
Za oksidacijo glukoze je potrebna voda, zato se aktivnost encima med zorenjem medu postopoma znižuje zaradi naraščajočih količin ogljikovih hidratov v medičini in se v dozorelem medu ustavi. Encim postane spet aktiven, ko med razredčimo z vodo. Dodatek vode tudi najverjetneje pripomore k dvigu vrednosti pH na optimalno za delovanje encima (Božnar in Senegačnik, 1998; Molan, 1996).

Aktivnosti glukoza-oksidade ne moremo meriti z merjenjem količine nastalega vodikovega peroksida, saj se le-ta ob prisotnosti encima katalaze razgrajuje (Dustmann, 1972).

Ob izpostavljenosti medu visokim temperaturam in svetlobi se glukoza-oksida inaktivira. Občutljivost medu na svetlobo je odvisna predvsem od izvora medičine in vrednosti pH v medu. Tako se v kislih nektarnih medovih glukoza-oksida pod vplivom vidne svetlobe hitreje inaktivira kot v medovih iz mane (Dustmann, 1972).

2.4.4 Katalaza

Katalazo uvrščamo med oksidoreduktaze in naprej med peroksidaze, ki potrebujejo peroksid kot substrat. Katalaza razgrajuje v medu nastali vodikov peroksid v vodo in kisik:



Za razliko od glukoza-oksidade, ki izvira pretežno od čebel, so glavni izvor katalaze rastline. Prisotna je tako v medičini kot v cvetnem prahu.

Aktivnost katalaze je odvisna od količine cvetnega prahu v medu, njegovega biološkega porekla kot tudi katalazne aktivnosti v cvetnem prahu. Medovi z nizko katalazno aktivnostjo imajo zaradi večjih količin nerazgrajenega vodikovega peroksida večji antibakterijski učinek (Božnar in Senegačnik, 1998; Webb, 1992; Weston, 2000).

2.4.5 Kisla fosfataza

Kislo fosfatazo uvrščamo med hidrolaze, ki delujejo na vezeh estrov oziroma med esteraze. Odceplja anorganski fosfat iz fosfatnih monoestrov. Izvira iz nektarja in cvetnega prahu, vendar ni znano kakšno funkcijo naj bi imela v medu. Povezujejo jo s fermentacijo medu, saj naj bi v fermentiranih medovih zasledili večjo aktivnost tega encima kot v nefermentiranih. Optimalna vrednost pH za delovanje encima se giblje med 4,5 in 6,5 (Alonso-Torre in sod., 2006; Webb, 1992).

2.5 ENCIMSKA AKTIVNOST KOT KRITERIJ KAKOVOSTI MEDU

V zadnjem času je med podvržen številnim procesnim postopkom, ki omogočajo pridobiti varen izdelek, ki je prijetnega okusa in v tekoči oziroma pol tekoči obliki. Ti postopki ponavadi zahtevajo izpostavljenost medu visokim temperaturam in različnim pogojem skladiščenja, kar lahko vodi do izgube kakovosti. Sestava medu se namreč s časom in temperaturo spreminja, s tem pa se spreminjajo tudi njegove senzorične in fizikalno-kemijske lastnosti (White, 1994).

Svežost medu se vrednoti z določanjem vrednosti parametrov, ki se s prekomernim segrevanjem in/ali staranjem povečujejo oziroma zmanjšujejo. Pomembna parametra, uporabljena za vrednotenje svežosti medu ter za spremljanje pogojev obdelave in shranjevanja medu, sta diastazna aktivnost in vsebnost HMF. Njune minimalne in maksimalne vrednosti so predpisane v številnih državah, tudi v Sloveniji, in so usklajene z direktivo Evropske unije (Bertoncelj in sod., 2004; Persano Oddo, 1999).

Bogdanov in sod., (1997) predlagajo določanje invertazne aktivnosti kot perspektivni kriterij kakovosti medu, predvsem za izredno pazljivo toplotno obdelane ali sveže medove. Invertaza je namreč bolj občutljiva na segrevanje kot diastaza in ji zato nekateri dajejo prednost pri vrednotenju svežosti medu, poleg tega je metoda za določanje invertazne aktivnosti enostavnejša in hitrejša (Aldcorn in sod., 1985; Persano Oddo in sod., 1999; Sanchez in sod., 2001).

White (1994) močno kritizira uporabo diastazne aktivnosti kot kriterij kakovosti medu zaradi problema določitve začetne točke, od katere bi se računala izguba aktivnosti oziroma škoda, povzročena s prekomernim segrevanjem. Podoben argument se lahko uporabi tudi pri ugotavljanju primernosti invertazne aktivnosti.

Nekateri avtorji (Aldcorn in sod., 1985; Huidobro in sod., 1995; Persano Oddo in sod., 1999) omenjajo kot kriterij kakovosti medu uporabo razmerja IN/DN. Za svež med naj bi bila vrednost razmerja višja od 0,5, za med, ki se prodaja v trgovini, pa med 0,2 in 0,5. Najbolj zanesljiv pokazatelj pregretosti medu ostaja vsebnost HMF, ki ga v svežem medu praktično ni, torej lahko škodo, povzročeno s prekomernim segrevanjem, v vseh medovih računamo od nič naprej (White, 1994).

Preglednica 6. Diastazno (DN) in invertazno število (IN) ter razmerje IN/DN v posameznih vrstah italijanskega medu (Persano Oddo, 1999)

vrsta medu	dn	in	in/dn
akacijev	8,3	3,6	0,42
lipov	17,7	12,8	0,73
cvetlični	22,0	15,4	0,72
kostanjev	24,9	21,6	0,88
hojev	21,7	23,9	1,13

Gfeller in Bogdanov (2006), pa nasprotno, kritizirata uporabo razmerja IN/DN kot kriterij kakovosti medu, saj je to razmerje v veliki meri odvisno od nihanja obeh merjenih parametrov. Menita, da je za optimalno vrednotenje sprememb, povzročenih s segrevanjem in dolgotrajnim skladiščenjem, treba upoštevati kombinacijo vseh treh kriterijev: vsebnost HMF ter diastazno in invertazno aktivnost. Na podlagi statistične analize sta ugotovila, da sta za nektarne medove najboljša kriterija kakovosti vsebnost HMF in invertazna aktivnost, za medove iz mane pa invertazna in diastazna aktivnost. Prilagata tudi smernice za vrednotenje kakovosti medu glede na vpliv segrevanja, ki so prikazane v preglednici 7.

Preglednica 7. Smernice za vrednotenje kakovosti medu glede na vpliv segrevanja (Gfeller in Bogdanov, 2006)

med	DN	in	hmf (MG/KG)
svež med – splošno	13-30	10-25	0-15
svež med – z nizko encimsko aktivnostjo	4-8	8-12	0-15
komercialen med – splošno	8-14	4-10	10-40
komercialen med – z nizko encimsko aktivnostjo	5-12	2-6	3-15
pregret med – po kratkotrajnemu segrevanju	0-8	0-8	40-80
pregret med – po dolgotrajnemu segrevanju	0-4	0-4	40-150

2.5.1 Korelacija med diastazno in invertazno aktivnostjo

Številni avtorji so iskali povezanost med diastazno in invertazno aktivnostjo. V večini primerov obstajajo močne korelacije med omenjenima encimoma, kar je najverjetneje posledica enakega izvora v medu. Rezultati so natančneje prikazani v preglednici 8.

Preglednica 8. Koeficienti korelacije med diastazno in invertazno aktivnostjo

vir	koeficient korelacije (r)
Serrano in sod. (2007)	0,853
Horn in Böhm (2004)	0,700
Vorlová in Přidal (2002)	0,749
Persano in sod. (1999)	0,835
Vit in Pulcini (1996)	neznačilna
Huidobro in sod. (1995)	0,878
Krauze in Krauze (1991)	0,738
Aldcorn in sod. (1985)	0,924

Krauze in Krauze (1991) nadalje poročata, da se omenjena korelacija po več kot dvoletnem skladiščenju medu zniža iz $R = 0,738$ na $R = 0,632$. Vorlová in Přidal (2002) podobno ugotavljata nižjo korelacijo v vzorcih medu iz trgovine ($R = 0,573$) v primerjavi s svežimi vzorci ($R = 0,749$). Nižje korelacije so najverjetneje posledica večje občutljivosti invertaze na visoke temperature in skladiščenje v primerjavi z diastazo. Diastazna aktivnost je v medu, ki se prodaja v trgovini, dvakrat nižja kot v svežem medu, invertazna pa celo šestkrat. Vorlová in Přidal (2002) sta primerjala tudi razmerje IN/DN z diastazno in invertazno aktivnost. Korelacija je močnejša z invertazno aktivnostjo ($R = 0,456$), medtem ko obstaja med razmerjem IN/DN in diastazno aktivnostjo šibka negativna korelacija s koeficientom $R = -0,209$.

2.6 ANTIMIKROBNE SNOVI V MEDU

Posebna lastnost medu je, da zavira rast in razvoj velikega števila mikroorganizmov. Vzroki za to so (Božnar, 2003):

- velika vsebnost sladkorjev (več kot 95 % suhe snovi), ki določa visok osmotski pritisk in viskoznost;
- majhna vsebnost vode (14-21 %);
- nizka pH vrednost;
- prisotnost substanc z antimikrobnim delovanjem;
- majhna vsebnost dušika.

Substance z antimikrobnim delovanjem, tako imenovane inhibine, lahko razdelimo v dve skupini oziroma na dva inhibinska sistema (Bogdanov, 1997):

- toplotno in svetlobno labilni peroksidni sistem ter
- toplotno in svetlobno stabilni neperoksidni sistem inhibinov.

2.6.1 Peroksidni sistem inhibinov

Peroksidni sistem inhibinov predstavlja v medu nastali H_2O_2 skupaj z encimoma glukoza-oksidadza in katalaza. Količina nastalega H_2O_2 je določena s sintezo pod vplivom delovanja glukoza-oksidadze in razgradnjo s strani katalaze. Je torej sorazmerna koncentraciji glukoza-oksidadze in obratno sorazmerna koncentraciji katalaze (Dustmann, 1972; Weston, 2000).

Glukoza-oksidadza se primeša medičini med zorenjem medu iz izločkov krmilnih žlez čebel in njena količina v medovih posameznih vrst ne variira toliko kot količina katalaze, ki je v veliki meri odvisna od količine cvetnega prahu v medu in njegovega biološkega porekla. Zaradi različnega izvora glukoza-oksidadze in katalaze, količina nastalega H_2O_2 med vrstami, kot tudi znotraj posameznih vrst medu, zelo variira.

Zreli medovi ne vsebujejo značilnih količin H_2O_2 (< 0,3 ppm), saj je aktivnost glukoza-oksidadze v veliki meri odvisna od vsebnosti vode v medu. White in sod. (1963) navajajo, da se tekom dolgotrajnega skladiščenja tvori le 0,002-0,012 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h, medtem ko naj bi se količina v razredčenem medu, inkubiranem pri 37 °C, gibala od manj kot 5 do približno 100 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h.

Prve raziskave teh antimikrobnih snovi v medu so bile mikrobiološke. Kot osnovni mikroorganizem so uporabljali *Staphylococcus aureus*, ki so ga inokulirali na 5 petrijevke z različnimi koncentracijami medu. Antimikrobno aktivnost medu so izrazili z inhibinskim številom, ki pomeni število petrijevke z najnižjo koncentracijo medu, na kateri še ni vidne rasti mikroorganizmov. Inhibinsko število se giblje od 0 do 5, kjer 0 pomeni, da je rast mikroorganizma prisotna na vseh petrijevkah, 5 pa, da ni vidne rasti na nobeni petrijevki (White in sod., 1962). Šele raziskave White-a in sod. (1963) so pokazale tvorbo glukonske kisline in H_2O_2 kot posledico encimske aktivnosti glukoza-oksidadze in s tem pojasnile izvor omenjenih inhibinov. White in Subers (1963) sta določila tudi količino nastalega H_2O_2 , ki glede na antimikrobno aktivnost ustreza posameznemu inhibinskemu številu. To nam podrobneje prikazuje preglednica 9.

Preglednica 9. Količina v medu nastalega H_2O_2 , ki ustreza posameznemu inhibinskemu številu (White in Subers, 1963)

inhibinsko število	količina H_2O_2 ($\mu G/G$ MEDU/H)
0	< 3,4
1	3,4-8,7
2	8,8-20,5
3	20,6-54,5
4	54,6-174,0
5	> 174,0

Glukoza-oksidadza je toplotno manj stabilna od diastaze in invertaze, vendar količina nastalega H_2O_2 ni primerna za primerjavo z diastazo in invertazo, saj se nastali H_2O_2 pod vplivom katalaze razgrajuje. Tako sta White in Subers (1964a) ugotavljala vpliv toplote na peroksidni sistem. Razpolovni čas aktivnosti sistema pri 65 °C se je gibal med 36 sekund in 4,5 minut, pri 55 °C pa od 2,8 do 6,1 ur, kar je manj kot velja za diastazo (11,5 h pri 65 °C) in invertazo (1,9 h pri 65 °C) (White, 1994). Peroksidni sistem je torej toplotno manj stabilen od diastaze in invertaze. White in Subers (1964a) še navajata povprečno 82 %-no izgubo količine nastalega H_2O_2 v različnih vzorcih medu pri 10 minutnem segrevanju pri 70 °C.

Nadalje so White in Subers (1964b) ter pozneje Dustmann (1972) raziskovali vpliv svetlobe na peroksidni sistem in dokazali, da svetloba inaktivira glukoza-oksidadzo, kar posledično vpliva na nastanek manjše količine H_2O_2 . White in Subers sta ugotovila, da je sistem najbolj občutljiv na vidno svetlobo pri valovni dolžini 425-525 nm in manj na ultravijolično svetlobo. Pomemben faktor predstavlja tudi vrednost pH v medu. Inaktivacija glukoza-oksidadze pod vplivom svetlobe je največja pri pH = 3, medtem ko pri vrednosti pH med 6 in 7 svetloba več nima vpliva na encim. Dustmann (1972) poroča, da je občutljivost medu na svetlobo odvisna tudi od izvora medičine. Tako se v nekaterih nektarnih medovih, ki imajo tudi nižjo vrednost pH, glukoza-oksidadza pod vplivom vidne svetlobe hitreje inaktivira kot v medovih iz mane, z višjo vrednostjo pH, kar je razvidno tudi iz preglednice 10.

Preglednica 10. Izguba H_2O_2 v posameznih vrstah medu (5 mm debela plast medu) po 10 minutni izpostavljenosti sončni svetlobi (Dustmann, 1972)

vrsta medu	vrednost PH	izguba H_2O_2 (%)
akacijev	4,5	68,5
lipov	4,4	23,5
lipov ^a	5,2	1,0
kostanjev	4,5	24,6
kostanjev ^a	5,1	15,3
hojev ^a	5,1	4,1
smrekov ^a	5,0	12,7

^a pretežno iz mane

Kerkvliet (1996) je pri analizi 580 vzorcev medu s pomočjo testnih lističev za določanje količine H_2O_2 določil vrednosti, ki so se gibale od 0 do 150 $\mu\text{g/g}$ medu/h. Ugotovil je, da so vzorci z več kot 10 $\mu\text{g } H_2O_2/\text{g}$ medu/h v 95 %-ih primerov imeli vsebnost HMF ≤ 40 mg/kg oziroma diastazno število ≥ 8 . Dodaja, da je naravno nizka encimska aktivnost medu lahko razlog za nastanek manjše količine H_2O_2 , saj le-tega ni bilo zaslediti v kar 27 %-ih vzorcev akacijevega medu. Majhne količine nastalega H_2O_2 so lahko tudi posledica kemijskih interakcij, kot sta na primer reakciji H_2O_2 z askorbinsko kislino in železom, ki sta lahko prisotna v medu.

2.6.1.1 Korelacija količine nastalega H_2O_2 z diastazno in invertazno aktivnostjo

Nekateri avtorji so iskali stopnjo povezanosti količine nastalega H_2O_2 z diastazno in invertazno aktivnostjo. White in Subers (1963) poročata, da korelacija med količino nastalega H_2O_2 in diastazno aktivnostjo ni značilna, medtem ko so Bogdanov in sod. (1987) pri analizi 37 vzorcev medu našli zmerno močno korelacijo s koeficientom $R = 0,650$. Podobno korelacijo so določili tudi med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo ($R = 0,582$). Serra Bonvehí in sod. (2000) so pri analizi 147 vzorcev medu določili med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo prav tako zmerno korelacijo s koeficientom $R = 0,458$.

2.6.2 Neperoksidni sistem inhibinov

Prve raziskave neperoksidnih antimikrobnih snovi so pokazale, da so to hlapne, toplotno stabilne substance neznanega porekla in lizocim, česar nadaljnje raziskave niso potrdile. Bogdanov (1984) je s tankoplastno kromatografijo dokazal prisotnost pinocembrina in drugih antimikrobnih snovi, ki spadajo v skupino flavonoidov. Ti so prisotni tudi v propolisu, to je smolnatih substancah, ki jih čebele prinašajo v panj z različnih rastlinskih virov, da z njimi prevlečejo satje zaradi zaščite pred mikroorganizmi. Prisotnost flavonoidov v medu je lahko posledica direktnega mešanja smolnatih substanc v med s strani čebel ali sekundarne difuzije iz celic satja, v katerih je méd med zorenjem skladiščen (Bogdanov, 1984).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI MEDU

Analizirali smo 84 vzorcev slovenskega medu, letnika 2006. Med smo dobili v času točenja neposredno od čebelarjev iz različnih predelov Slovenije. Vzorci medu so bili hranjeni v zaprtih plastičnih posodah ali steklenih kozarcih, v temnem prostoru in pri sobni temperaturi.

V času analize so bili vzorci medu stari približno 10 mesecev. Predhodno so bili senzorično ocenjeni ter analizirani na določene fizikalno-kemijske parametre. Določili smo jim še diastazno in invertazno aktivnost ter količino nastalega vodikovega peroksida.

Preglednica 11. Analizirani vzorci glede na posamezno vrsto medu

VRSTA MEDU	ŠTEVILO VZORCEV	OZNAKA VZORCEV
akacijev	14	A33, A35, A36, A38, A45-A54
lipov	14	L16-L29
cvetlični	13	C32-C44
kostanjev	14	K27-K40
gozdni	10	G31-G36, G38-G41
hojev	14	H17-H30
smrekov	5	S27-S31

3.2 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE

3.2.1 Spektrofotometrično določanje diastazne aktivnosti (Bogdanov in sod., 1997)

Princip

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

Aparatura

Poleg običajne laboratorijske opreme uporabljamo še:

- vodno kopel pri 40 °C ± 0,2 °C;
- spektrofotometer (Cecil, CE 2021, Velika Britanija)

Reagenti

- osnovna raztopina joda (0,07 M): raztopimo 8,8 g joda (Merck, Nemčija), pomešamo z 22 g kalijevega jodida (Merck, Nemčija) in raztopimo v 30-40 mL destilirane vode, nato pa razredčimo do 1 L.
- razredčena raztopina joda (0,0007 M): v 500 mL merilni bučki raztopimo 20 g kalijevega jodida v 30-40 mL destilirane vode. Nato dodamo 5 mL osnovne raztopine joda in dopolnimo z destilirano vodo do oznake. Raztopino moramo pripraviti svežo vsak drugi dan.
- acetatni pufer (1,3 M; pH = 5,3): v 400 ml destilirane vode raztopimo 87 g natrijevega acetata ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Merck, Nemčija), dodamo približno 10,5 mL ledocetne kisline (Merck, Nemčija) in dopolnimo z destilirano vodo do 500 mL. Izmerimo vrednost pH in jo, če je potrebno, uravnamo na 5,3 z natrijevim acetatom ali očetno kislino.
- raztopina natrijevega klorida (0,5 M): raztopimo 2,9 g natrijevega klorida (Merck, Nemčija) v prekuhani destilirani vodi in dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL. Raztopina je uporabna, dokler se ne razvije plesen.
- raztopina škroba (20 g/L): v 250 mL erlenmajerico odtehtamo 2,0 g brezvodnega škroba (Merck, Nemčija), pomešamo z 90 mL destilirane vode, takoj segrejemo in pustimo zmerno vreti 3 minute. Raztopino pokrijemo, ohladimo do sobne temperature in prenesemo v 100 mL merilno bučko. Nato jo v vodni kopeli segrejemo na 40 °C in dopolnimo z destilirano vodo do oznake.

Izvedba

➤ Priprava vzorca medu za določanje:

Vzorca medu za analizo ne smemo segreti. V 50 mL čašo zatehtamo 10 g vzorca, dodamo 5 mL 1,3 M acetatnega pufra (pH = 5,3) in 20 mL destilirane vode ter premešamo, da se raztopi. Raztopino kvantitativno prenesemo v 50 mL merilno bučko, dodamo 3 mL 0,5 M raztopine natrijevega klorida in dopolnimo z vodo do oznake (raztopina medu).

➤ Standardizacija raztopine škroba:

S pipeto odmerimo 5 mL raztopine škroba, segrete na 40 °C in 10 mL vode. Nato s pipeto odmerimo 1 mL tako pripravljene mešanice in ga dodamo v 10 mL razredčene raztopine joda. Razredčimo s toliko mL destilirane vode, da vrednost absorbance, merjene proti slepemu vzorcu pri 660 nm, znaša $0,760 \pm 0,020$.

➤ Merjenje absorbance (modificirano):

S pipeto odmerimo 10 mL raztopine medu v erlenmajerjevo bučko in jo skupaj s posodo, v kateri je raztopina škroba, postavimo v vodno kopel pri temperaturi 40 °C. Po 15 minutah odmerimo s pipeto 5 mL raztopine škroba v erlenmajerjevo bučko z raztopino medu, premešamo in vključimo uro. V 5 minutnih presledkih odvezemamo 1 mL alikvote in jih dodajamo v 10 mL 0,0007 M razredčene raztopine joda. Premešamo in razredčimo z ustreznim volumnom destilirane vode, določenim pri pripravi standardne raztopine ter takoj izmerimo absorbanco pri 660 nm. Postopek ponavljamo, dokler absorbanca ne pade pod vrednost 0,235. Naredimo najmanj tri meritve. Če pade absorbanca pod vrednost 0,235 že prej, odvezemamo alikvote v krajših časovnih intervalih.

Izračun

V grafikon vpišemo vrednost absorbance kot funkcijo časa (min). Skozi najmanj tri zadnje točke potegnemo premico in določimo čas (t), ko reakcijska zmes doseže vrednost absorbance 0,235. Diastazno število (DN) dobimo, če delimo število 300 s tem časom, izraženim v minutah. To število izraža aktivnost diastaze kot volumen 1 % raztopine škroba v mL, ki jo encim iz 1 g medu hidrolizira v 1 uri pri temperaturi 40 °C.

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

kjer je:

t = čas v minutah.

3.2.2 Spektrofotometrično določanje invertazne aktivnosti (Bogdanov in sod., 1997)

Princip

Kot substrat za določanje invertazne aktivnosti se uporablja p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (pNPG), ki se s pomočjo encima α -glukozidaze razcepi na glukozo in p-nitrofenol. Z regulacijo pH na vrednost 9,5 se encimska reakcija ustavi in nitrofenol se pretvori v nitrofenolatni anion, ki ustreza količini razgrajenega substrata ter se spremlja z merjenjem absorbance pri 400 nm.

Aparatura

Poleg običajne laboratorijske opreme uporabljamo še:

- vodno kopel pri $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- spektrofotometer (Cecil, CE 2021, Velika Britanija)

Reagenti

- fosfatni pufer (0,1 M; pH = 6,0): raztopimo 11,66 g kalijevega hidrogenfosfata (KH_2PO_4 ; Merck, Nemčija) in 2,56 g dinatrijevega hidrogenfosfata ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck, Nemčija) v destilirani vodi in dopolnimo do 1 L
- raztopina p-nitrofenil- α -D-glukopiranozida (0,02 M): raztopimo 6,0252 g pNPG (Sigma, ZDA) v fosfatnem pufru in dopolnimo do 1 L. pNPG je zmerno topen v vodi, vendar raztopina ni zelo stabilna. Raztapljamo ob segrevanju fosfatnega pufra, vendar ne nad $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in takoj ohladimo. Raztopina se lahko hrani v temni steklenici v hladilniku 1 mesec.
- raztopina za zaustavitev reakcije – Tris-HCl pufer (3 M; pH = 9,5): raztopimo 363,42 g tris-(hidroksimetil)-aminometana (Merck, Nemčija) v destilirani vodi in dopolnimo do 1 L. S 3 M klorovodikovo kislino (Merck, Nemčija) uravnamo vrednost pH na 9,5.

Izvedba

- Priprava vzorca medu za določanje:

Odtehtamo 5 g vzorca medu, ga raztopimo v 0,1 M fosfatnem pufru (pH = 6,0) in kvantitativno prenesemo v 25 mL bučko ter dopolnimo do oznake. Raztopina se lahko hrani v hladilniku 1 dan.

- Merjenje absorbance:

Pet min pred dodatkom raztopine medu odmerimo s pipeto 5 mL raztopine substrata v epruveto v vodni kopeli pri $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dodamo 0,5 mL raztopine medu (začetni čas), dobro premešamo na stresalniku in inkubiramo pri $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po točno 20 min dodamo 0,5 mL raztopine za zaustavitev reakcije in še enkrat premešamo (raztopina vzorca).

Za slepi vzorec istočasno inkubiramo 5 mL raztopine substrata pri 40 °C. Po 5 min dodamo 0,5 mL raztopine za zaustavitev reakcije, epruveto zamašimo, dobro premešamo in šele nato dodamo 0,5 mL raztopine medu. Slepí vzorec pripravimo za vsak vzorec medu, ki ga analiziramo.

Raztopine čim prej ohladimo na sobno temperaturo in izmerimo absorbance raztopin vzorcev in slepih vzorcev v 1 cm kivetah pri 400 nm. Meritve naj bi se izvedle po 15 min, v vsakem primeru pa znotraj 1 h. Absorbanco slepega vzorca odštejemo od absorbance vzorca (ΔA_{400}).

Izračun

Količina p-nitrofenola v μmol , nastala med analizo, natanko ustreza količini izkoriščenega substrata v μmol . Tako se aktivnost invertaze v medu izračuna iz absorbance, merjene pri 400 nm in se izrazi v enotah (units) na kg medu:

$U/\text{kg} = 1 \mu\text{mol pNPG}/\text{kg medu}/\text{min}$

$$\text{Invertaza v } U/\text{kg} = 6 \cdot 0,05 \cdot 0,05298 \cdot 10^4 \cdot \Delta A_{400} = 158,94 \cdot \Delta A_{400} \quad \dots (2);$$

kjer je:

$U = 1$ internacionalna enota z definiranim izkoristkom 1 μmol pretvorjenega substrata na minuto;

6 = faktor za volumen v mL uporabljene raztopine vzorca (skupni volumen);

0,05 = faktor za pretvorbo reakcijskega časa z 20 min na 1 min;

0,05298 = 7,37/139,11 = faktor za pretvorbo μg v $\mu\text{mol}/\text{mL}$;

7,37 = faktor za p-nitrofenol iz ustreznega grafa;

139,11 = molska masa p-nitrofenola (g/mol).

Invertazna aktivnost je lahko izražena tudi kot invertazno število (IN):

IN pomeni pomeni maso saharoze v g, hidrolizirane v 1 h z encimi iz 100 g medu, ki dobro korelira s količino p-nitrofenola, nastalega po zgoraj opisani metodi. Relacija med IN in A_{400} je naslednja:

$$\text{IN} = 21,64 \cdot \Delta A_{400} \quad \dots (3);$$

kjer je:

21,64 = naklon linearne premice odvisnosti IN (y os) od A_{400} (x os). Rezultat podamo na eno decimalno mesto natančno.

3.2.3 Spektrofotometrično določanje količine nastalega H_2O_2 (White in Subers, 1963)

Princip

Aktivacija encima glukoza-oksidade pri optimalnih pogojih (vodna raztopina medu; pH = 6,5; T = 37 °C, ...) za nastanek večje količine H_2O_2 , ki se po dodatku o-dianizidina in encima peroksidaze spektrofotometrično določi. Peroksidaza katalizira reakcijo med nastalim H_2O_2 in o-dianizidinom. Oksidacijski produkt je obarvan in se spremlja z merjenjem absorbance pri 450 nm.

Aparatura

Poleg običajne laboratorijske opreme uporabljamo še:

- vodno kopel pri 37 °C ± 0,5 °C;
- spektrofotometer (Cecil, CE 2021, Velika Britanija)

Reagenti

- 0,4 M fosfatni pufer (pH = 6,5): pripravimo 0,4 M raztopino kalijevega hidrogenfosfata (KH_2PO_4 ; Merck, Nemčija) in 0,4 M raztopino dinatrijevega hidrogenfosfata ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; Merck, Nemčija). Med sabo ju mešamo v takem razmerju, da vrednost pH doseže 6,5.
- 0,01 M fosfatni pufer (pH = 6,5): pripravimo na podoben način kot 0,4 M fosfatni pufer
- raztopina o-dianizidina (0,2 mM): v 200 mL bučko odpipetiramo 5 mL 0,4 M fosfatnega pufra, dodamo 10 mg o-dianizidina (3,3'-dimetoksibenzidin; Sigma, ZDA), raztopljenega v 2 mL 95 % etanola (Merck, Nemčija). Dopolnimo do oznake in premešamo. Raztopina mora biti sveže pripravljena.
- raztopina peroksidaze: 2 mg peroksidaze (tip 1; Horseradish; 113 U/mg; Sigma, ZDA) razredčimo v 50 mL 0,01 M fosfatnega pufra (pH = 6,5)
- standardna raztopina H_2O_2 (Fluka, Nemčija): 0,1 % (v/v) raztopina

Izvedba

➤ Priprava osnovne raztopine vzorca medu:

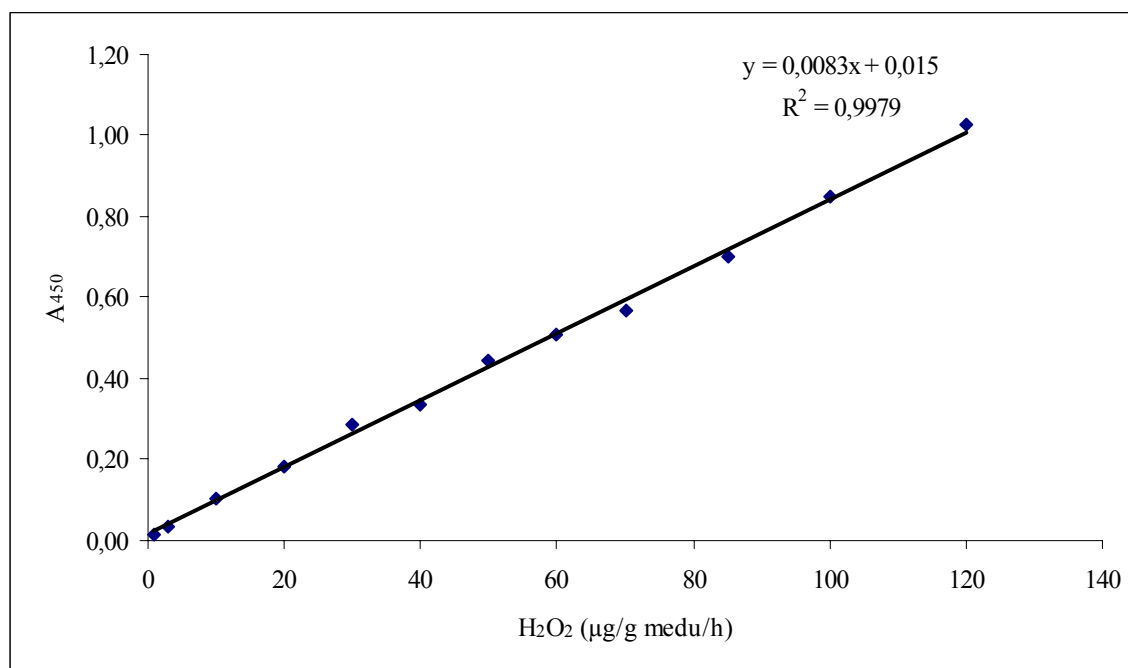
10 g vzorca medu raztopimo v 5 mL 0,4 M fosfatnega pufru s pH = 6,5 in dopolnimo z destilirano vodo do 25 mL. 10 mL pripravljene raztopine prenesemo v erlenmajerjevo bučko in razredčimo z destilirano vodo v razmerju 1:1. Zaprto bučko segrevamo 1 h v vodni kopeli pri 37 °C in jo vsakih 15 min ročno stresamo 0,5 min. Po 1 h bučko ohladimo in v roku 5 min odpipetiramo 1 mL vzorca v 3 epruvete. V dve epruveti (paralelki) dodamo 6 mL raztopine o-dianizidina in 1 mL destilirane vode, tako da je skupni volumen 8 mL. Tretja epruveta predstavlja slepi vzorec in jo dopolnimo do 8 mL z destilirano vodo. V vse 3 epruvete dodamo še 100 µL raztopine peroksidaze in vsebino dobro premešamo. Po 5 min izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

➤ Priprava standardne raztopine za umeritveno krivuljo:

V 25 mL bučko odpipetiramo namesto vzorca medu ustrezne volumne 0,1 % (v/v) raztopine H₂O₂ (preglednica 12), dodamo 5 mL fosfatnega pufru in dopolnimo do oznake. 10 mL pripravljene raztopine prenesemo v erlenmajerjevo bučko in razredčimo z destilirano vodo v razmerju 1:1. Vzorcev za umeritveno krivuljo ne smemo termostatirati, da se ne bi del peroksida razgradil. V 3 epruvete odpipetiramo po 1 mL vzorca za umeritveno krivuljo. V dve epruveti (paralelki) dodamo 6 mL raztopine o-dianizidina in 1 mL destilirane vode, tako da je skupni volumen 8 mL. V slepi vzorec dodamo namesto reagenta destilirano vodo. Za umeritveno krivuljo je potreben en slepi vzorec, ker koncentracija H₂O₂ v slepem vzorcu ne vpliva na končni rezultat. V vse tri epruvete dodamo 100 µL raztopine peroksidaze, premešamo in po 5 min izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

Preglednica 12. Volumen 0,1 % (v/v) raztopine H₂O₂, količina H₂O₂ v 8 mL in ustrezna količina nastalega H₂O₂ v µg/g medu/h

VOLUMEN 0,1 % (V/V) RAZT. H ₂ O ₂ (µL)	KOLIČINA H ₂ O ₂ V 8 ML (µG)	KOLIČINA NASTALEGA H ₂ O ₂ (µG/G/H)
10	0,2	1,0
30	0,6	3,0
100	2,0	10,0
200	4,0	20,0
300	6,0	30,0
400	8,0	40,0
500	10,0	50,0
600	12,0	60,0
700	14,0	70,0
850	17,0	85,0
1000	20,0	100,0
1200	24,0	120,0

Slika 1. Umeritvena krivulja za določanje količine nastalega H₂O₂

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Podatke smo statistično obdelali s pomočjo računalniškega paketa za statistično obdelavo SPSS/PC⁺ (Statistical Package for the Social Sciences). Za ugotavljanje razlik med posameznimi vrstami medu smo uporabili test homogenosti variance, analizo variance (ANOVA) in Duncanov test.

Dobljene rezultate smo ovrednotili z naslednjimi statističnimi parametri:

- povprečna vrednost (\bar{x});
- standardni odklon (SD);
- koeficient variabilnosti (KV);
- Levenov test homogenosti variance;
- analiza variance – ANOVA;
- Duncanov test;
- Pearsonov koeficient korelacije (R);
- koeficient determinacije (R^2).

Povprečna vrednost ali aritmetična sredina

Aritmetična sredina je najpogosteje uporabljena srednja vrednost. Izračunamo jo tako, da seštejemo vrednosti spremenljivke vseh enot (x_i) in vsoto delimo s številom enot (n). Vsota vseh odklonov od aritmetične sredine je vedno enaka nič (Adamič, 1989).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \dots (4)$$

Varianca in standardni odklon

Varianca je osnovna mera variacije in pomeni povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad \dots (5)$$

Za statistično analizo podatkov je varianca zelo pomembna, kot opisni parameter pa manj, saj kvadrat merske enote spremenljivke pogosto nima pravega smisla. Kot opisni parameter variacije se pogosteje uporablja kvadratni koren variance, ki ga imenujemo tudi standardni odklon ali standardna deviacija (Adamič, 1989).

$$SD = \sqrt{s^2} \quad \dots (6)$$

Koeficient variabilnosti

Absolutne mere variacije, kot sta varianca in standardni odklon, za primerjavo variiranja več statističnih spremenljivk z različnimi povprečnimi vrednostmi običajno niso primerne. Objektivno primerjavo takšnih statističnih spremenljivk nam omogoča koeficient variabilnosti. Izračunamo ga tako, da standardni odklon delimo s povprečno vrednostjo in to izrazimo v odstotkih (Adamič, 1989).

$$KV(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \dots (7)$$

Levenov test homogenosti variance

S pomočjo tega testa ugotavljamo ali so variance v vseh obravnavanih statističnih vzorcih enake, torej če so vzorci homogeni. Prednost Levenovega testa je manjša občutljivost za morebitna odstopanja podatkov od normalne porazdelitve. Ničelna hipoteza testa pravi, da ni razlik v variancah med vrstami, osnovna pa, da vsaj med enim parom varianc obstaja statistično značilna razlika. Vrednost statistične značilnosti, ki nam jo da test, pove katera izmed domnev je pravilna. Vrednost statistične značilnosti, ki je manjša od stopnje tveganja $\alpha = 0,05$ vodi k sprejetju osnovne hipoteze, vrednost, večja od $\alpha = 0,05$, pa k potrditvi ničelne. Kadar je sprejeta ničelna hipoteza, se potrди homogenost vzorcev. V primeru, da vzorci niso homogeni, ne moremo nadaljevati z analizo variance (Adamič, 1989).

Analiza variance – ANOVA

Pri uporabi te analize domnevamo, da se variance vzorcev med seboj statistično ne razlikujejo. Enakost varianc med vzorci imenujemo homogenost varianc in smo jo predhodno preverili z Levenovim testom. Ničelna hipoteza analize variance pravi, da vsi statistični vzorci izhajajo iz populacije z enakim povprečjem, osnovna pa, da med opazovanimi statističnimi vzorci obstajata vsaj dva, katerih povprečji sta statistično različni. Kadar je vrednost signifikance manjša od $\alpha = 0,05$, sklepamo, da vzorci pripadajo različnim populacijam oziroma, da med njimi obstaja vsaj en par z različnimi povprečji. S tem je zavržena ničelna hipoteza, ki pravi, da razlike ne obstajajo (Adamič, 1989).

Duncanov test

Duncanov test je zaključni test, namenjen analizi vzorcev, za katere je znano, da so homogeni (Levenov test) in ne pripadajo isti populaciji (ANOVA). S pomočjo tega testa razdelimo posamezne vzorce v več podskupin, v katerih se vzorci glede na opazovano statistično spremenljivko statistično značilno ne razlikujejo.

Pearsonov koeficient korelacije in test t

Pearsonov koeficient korelacije (R) je merilo stopnje povezanosti med opazovanima spremenljivkama. Zavzema lahko vrednosti med -1 in +1. Vrednost -1 dobimo, če gre za maksimalno negativno korelacijo (vrednost spremenljivke pada z vrednostjo druge), vrednost +1 pa pri maksimalni pozitivni korelaciji (vrednost spremenljivke narašča z vrednostjo druge). Vrednost 0 nam pove, da med spremenljivkama ni povezanosti. Pearsonov koeficient korelacije izračunamo tako, da kovarianco (c_{xy}), ki jo izračunamo po enačbi (8), delimo z zmnožkom standardnih odklonov za obe spremenljivki x in y (SD_x in SD_y), kot je prikazano v enačbi (9) (Adamič, 1989).

$$c_{xy} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{n - 1} \quad \dots (8)$$

$$R = \frac{c_{xy}}{SD_x \cdot SD_y} \quad \dots (9)$$

Izračunani koeficient se praviloma le približuje eni izmed omenjenih skrajnih vrednosti. Mejne vrednosti za presojanje stopnje oziroma moči povezanosti so prikazane v preglednici 13.

Preglednica 13. Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti (Seljak, 1996)

koeficient korelacije (r)	stopnja povezanosti
od 0,00 do $\pm 0,20$	ni povezanosti
nad $\pm 0,20$ do $\pm 0,40$	šibka
nad $\pm 0,40$ do $\pm 0,70$	zmerna
nad $\pm 0,70$ do $\pm 1,00$	močna

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

Značilnost korelacije ocenjujemo s testom t. Ničelna hipoteza testa pravi, da med spremenljivkama ni značilne povezanosti, alternativna pa, da obstaja značilna povezava med spremenljivkama. Ničelno hipotezo preverimo tako, da izračunamo vrednost t po enačbi (10), ki jo nato primerjamo s kritično vrednostjo t pri $m = n - 2$ stopinjah prostosti.

$$t = \sqrt{\frac{R^2 \cdot (n - 2)}{1 - R^2}} \quad \dots (10)$$

Če je izračunana vrednost večja od kritične, ničelno hipotezo zavrnemo in sprejmemo alternativno, ki pravi, da je povezanost med spremenljivkama značilna (Adamič, 1989).

Koeficient determinacije

Koeficient determinacije (R^2) je merilo povezanosti in izraža odstotek variabilnosti odvisne številske spremenljivke (y), ki je pojasnjen z regresijskim modelom ene ali več neodvisnih številskih spremenljivk (x). V primeru linearnega regresijskega modela je koeficient determinacije enak kvadratu Pearsonovega korelacijskega koeficienta. Povezava med spremenljivkama je močna, ko je koeficient determinacije večji od 0,5 (Košmelj in sod. 2002; Košmelj, 2001).

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI DOLOČANJA DIASTAZNE AKTIVNOSTI

4.1.1 Ponovljivost metode za določanje diastazne aktivnosti

Izbrana spektrofotometrična metoda (Bogdanov in sod., 1997), je že uveljavljena in posebej prilagojena za med. Metoda je dolgotrajna in zahteva veliko ročnega dela ter je izredno časovno in temperaturno odvisna.

Ponovljivost metode smo ovrednotili tako, da smo naključno izbranemu vzorcu, to je vzorcu kistanjevega medu z oznako K35, določili vrednost diastaznega števila v 6 paralelnih določitvah ter rezultate ovrednotili s statističnimi parametri.

Preglednica 14. Diastazno število (DN) v vzorcu K35 z izračunanimi statističnimi parametri

PARALELKA	DN
1.	21,1
2.	21,2
3.	22,1
4.	21,1
5.	22,2
6.	22,8
	$\bar{x} = 21,8$
	SD = 0,7
	KV (%) = 3,2

Koeficient variabilnosti – KV, ki ocenjuje variabilnost 6 določitev vrednosti diastaznega števila v vzorcu glede na povprečno vrednost, znaša 3,2 %, kar pomeni, da je bila ponovljivost boljša od 96 %.

4.1.2 Diastazno število v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu

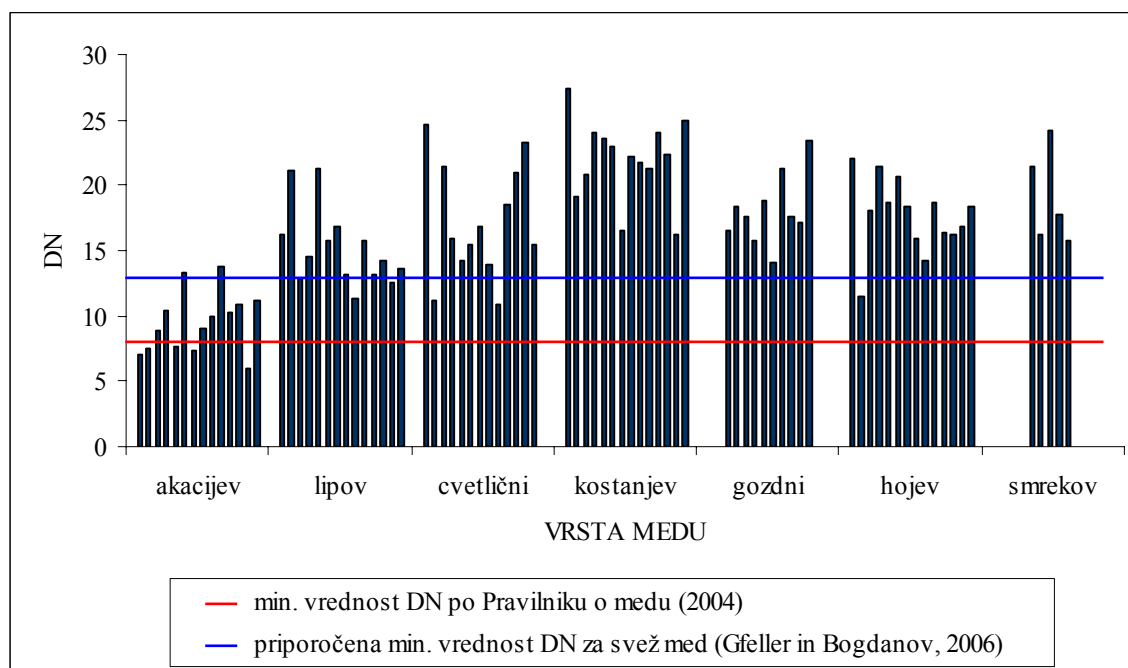
Rezultati določanja diastazne aktivnosti so podani kot diastazno število – DN in prikazani v preglednici 15 kot povprečna vrednost dveh določitev.

Preglednica 15. Diastazno število (DN) v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu

AKACIJEV MED		LIPOV MED		CVETLIČNI MED		KOSTANJEV MED	
vzorec	DN	vzorec	DN	vzorec	DN	vzorec	DN
A33	7,1	L16	16,3	C32	24,7	K27	27,4
A35	7,5	L17	21,1	C33	11,1	K28	19,2
A36	8,9	L18	12,8	C34	21,4	K29	20,8
A38	10,4	L19	14,5	C35	15,9	K30	24,0
A45	7,7	L20	21,2	C36	14,3	K31	23,5
A46	13,3	L21	15,8	C37	15,5	K32	23,0
A47	7,4	L22	16,9	C38	16,8	K33	16,5
A48	9,1	L23	13,1	C39	13,9	K34	22,2
A49	10,0	L24	11,3	C40	10,8	K35	21,8
A50	13,7	L25	15,8	C41	18,5	K36	21,2
A51	10,2	L26	13,2	C42	20,9	K37	24,1
A52	10,8	L27	14,2	C43	23,3	K38	22,4
A53	5,9	L28	12,5	C44	15,5	K39	16,3
A54	11,1	L29	13,6			K40	24,9

GOZDNI MED		HOJEV MED		SMREKOV MED	
vzorec	DN	vzorec	DN	vzorec	DN
G31	16,6	H17	22,0	S27	21,5
G32	18,3	H18	11,5	S28	16,3
G33	17,6	H19	18,1	S29	24,2
G34	15,8	H20	21,4	S30	17,7
G35	18,9	H21	18,6	S31	15,8
G36	14,1	H22	20,7		
G38	21,2	H23	18,3		
G39	17,6	H24	15,9		
G40	17,2	H25	14,2		
G41	23,4	H26	18,6		
		H27	16,4		
		H28	16,3		
		H29	16,9		
		H30	18,4		

Pravilnik o medu (2004) predpisuje, da mora biti vrednost diastaznega števila najmanj 8 oziroma 3 za med z naravno nizko encimsko aktivnostjo. Če je vrednost nižja od mejne vrednosti, se pojavlja sum, da je bil med izpostavljen previsoki temperaturi. Iz preglednice 15 in slike 2 je razvidno, da vrednosti 8 ni dosegalo 5 vzorcev akacijevega medu, za katerega je znano, da ima naravno nizko encimsko aktivnost (Golob in Plestenjak, 1999). Med njimi najbolj izstopa vzorec z oznako A53 (DN = 5,9), ostali štirje vzorci (A33, A35, A45, A47) imajo diastazno število v območju od 7,1 do 7,7.



Slika 2. Diastazno število (DN) analiziranih vzorcev glede na posamezno vrsto medu z označeno predpisano mejno vrednostjo in priporočeno mejno vrednostjo za svež med

Gfeller in Bogdanov (2006) priporočata vrednosti diastaznega števila v svežem medu od 13 do 30, za med z nizko encimsko aktivnostjo pa od 4 do 8. Priporočenim vrednostim, ob predpostavki, da ima akacijev med naravno nizko encimsko aktivnost, ne ustrezajo 3 vzorci lipovega medu (L18, L24, L28), 2 vzorca cvetličnega (C33, C40) in 1 vzorec hojevega medu (H18). Diastazno število teh vzorcev je v območju med 10,8 in 12,8, kar je le malo nižje od priporočene vrednosti 13. Ob upoštevanju dejstva, da so bili vzorci v času analize stari približno 10 mesecev, sklepamo, da so sveži vzorci ustrezali priporočenim vrednostim.

Vzorci kostanjevega medu in vzorci medov iz mane, z izjemo prej omenjenega vzorca hojevega medu H18, imajo vrednosti diastaznega števila v območju od 14,1 do 27,4, torej vsi ustrezajo priporočenim vrednostim za svež med.

4.1.3 Statistična obdelava rezultatov določanja diastazne aktivnosti

S statistično obdelavo dobljenih rezultatov smo ugotovili, da se posamezne vrste medu glede na diastazno aktivnost med seboj statistično značilno razlikujejo ($\alpha = 0,000$).

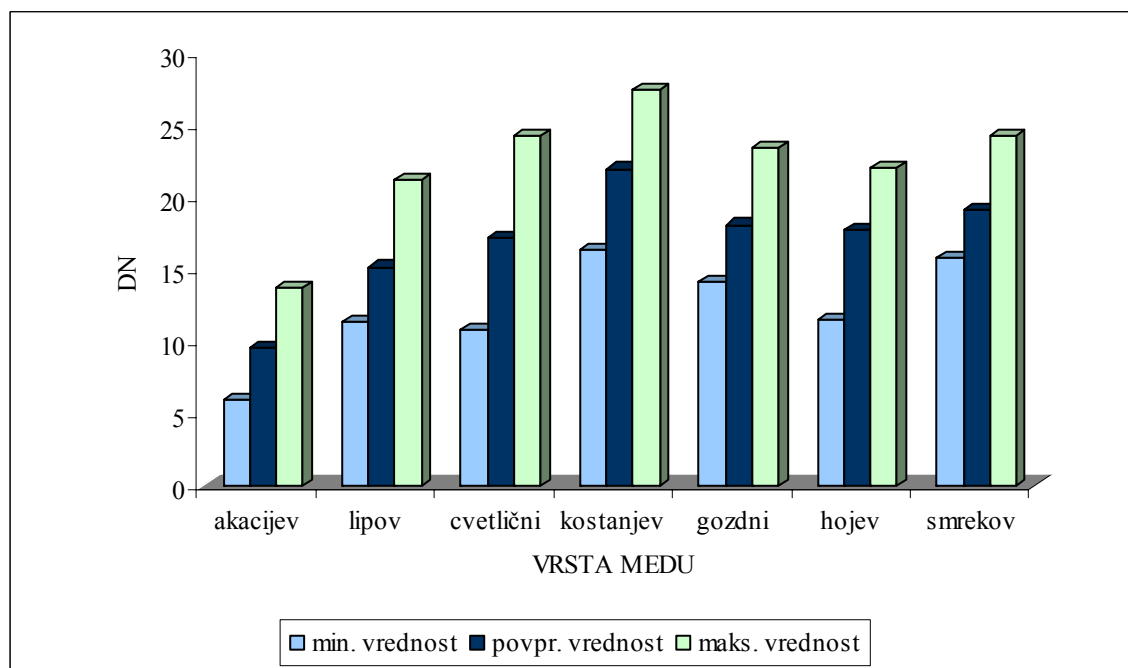
Preglednica 16. Diastazno število za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

Vrsta medu	Diastazno število					
	n	\bar{x}	x_{\min}	x_{\max}	SD	KV (%)
akacijev	14	9,5 ^a	5,9	13,7	2,3	24,2
lipov	14	15,2 ^b	11,3	21,2	3,0	19,7
cvetlični	13	17,1 ^{b,c}	10,8	24,7	4,4	25,7
kostanjev	14	22,0 ^d	16,3	27,4	3,1	14,0
gozdni	10	18,1 ^{b,c}	14,1	23,4	2,7	14,7
hojev	14	17,7 ^{b,c}	11,5	22,0	2,8	15,9
smrekov	5	19,1 ^c	15,8	24,2	3,6	19,0

a, b, c, d vrednosti z različnimi indeksi se statistično značilno razlikujejo ($\alpha \leq 0,05$)

Duncanov test je pokazal, da se akacijev med statistično značilno razlikuje od ostalih šestih vrst medu ($\alpha \leq 0,05$), podobno velja za kostanjev med. Lipov med se statistično značilno razlikuje od smrekovega medu in se ne razlikuje od cvetličnega, gozdnega in hojevega medu. Statistično značilno se med seboj ne razlikujejo cvetlični, gozdni, hojev in smrekov med.

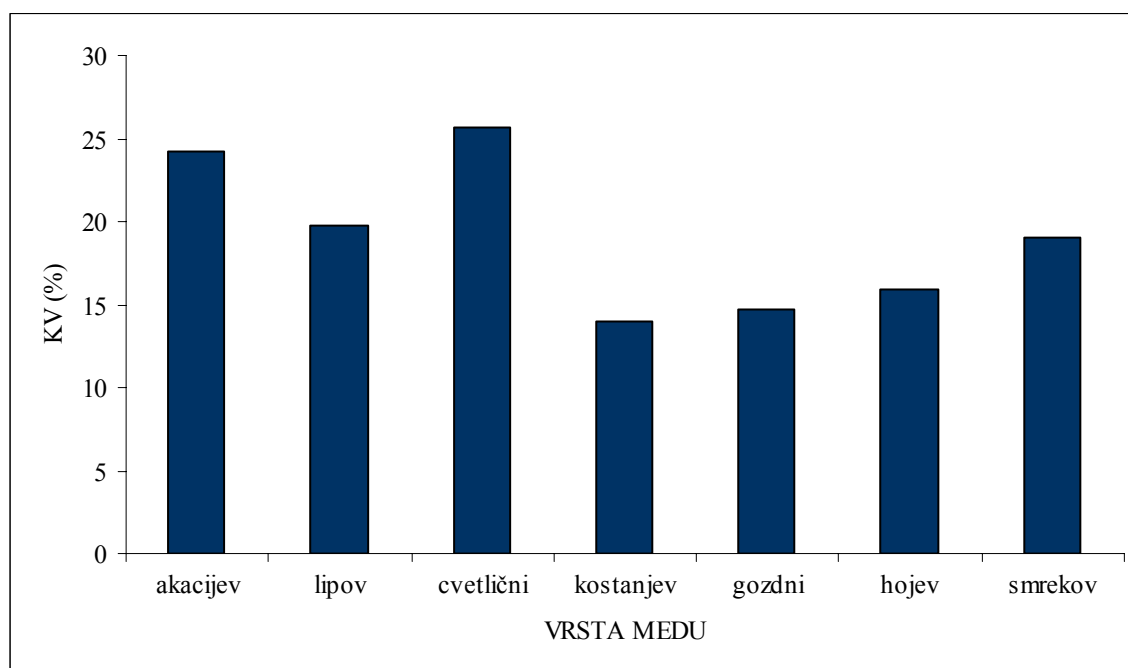
V preglednici 16 in na sliki 3 vidimo, da ima najnižjo povprečno vrednost diastaznega števila akacijev med (DN = 9,5), kateremu pripada tudi vzorec A53, ki je imel minimalno vrednost diastaznega števila med vsemi analiziranimi vzorci ($DN_{\min} = 5,9$). Najvišjo povprečno vrednost diastaznega števila je imel kostanjev med (DN = 22,0), kateremu pripada tudi vzorec K27, ki je imel maksimalno vrednost diastaznega števila med vsemi analiziranimi vzorci medu ($DN_{\max} = 27,4$).



Slika 3. Najnižje, povprečne in najvišje vrednosti diastaznega števila (DN) v posameznih vrstah medu

Primerjava naših rezultatov s podatki o vrednosti diastaznega števila za posamezne vrste slovenskega medu, letnikov 1999, 2003 in 2004 (preglednica 4), ne pokaže bistvenih razlik. Golob in Plestenjak (1999), Vrečar (2003) in Karo (2004) navajajo najnižjo povprečno vrednost diastaznega števila za akacijev med, najvišjo pa za gozdni (Golob in Plestenjak, 1999), smrekov (Vrečar, 2003) in kostanjev med (Karo, 2004), torej za medove iz mane.

Če primerjamo rezultate s tujo literaturo, prav tako ne najdemo velikih razlik. Persano Oddo in sod. (1999) so v medu italijanskega porekla določili najnižje povprečno diastazno število v akacijevem medu (DN = 8,3) ter najvišje v kostanjevem (DN = 24,9).



Slika 4. Koeficienti variabilnosti (KV) diastaznega števila glede na posamezno vrsto medu

Slika 4 prikazuje variabilnost vzorcev medu znotraj posamezne vrste. Največji koeficient variabilnosti je pri nesortnem cvetličnem medu, kar je najverjetneje posledica različnega izvora nektarja. Pri nektarnih medovih so večji koeficienti variabilnosti kot pri medovih iz mane. Izjema je kostanjev med, ki je lahko iz nektarja ali mane.

4.2 REZULTATI DOLOČANJA INVERTAZNE AKTIVNOSTI

4.2.1 Ponovljivost metode za določanje invertazne aktivnosti

Uporabljena spektrofotometrična metoda (Bogdanov in sod., 1997) je posebej prilagojena za med in že uveljavljena v tujini, pri nas pa smo jo uporabili prvič. V primerjavi z metodo za določanje diastazne aktivnosti je dokaj enostavna in hitra, saj se lahko istočasno analizira več vzorcev, vendar je cenovno manj ugodna. Metoda je izredno časovno in temperaturno odvisna ter zahteva veliko natančnost pri delu.

Invertazno aktivnost lahko podamo kot število μmol substrata, razgrajenega v minuti na kg medu ($\mu\text{mol/kg}$ medu/min) ali kot invertazno število – IN (enačba (3)). Zaradi lažje primerljivosti z diastaznim številom smo se odločili, da bomo v nadaljevanju podajali invertazno aktivnost z invertaznim številom (preglednica 18). Rezultati, ki so podani kot invertazna aktivnost ($\mu\text{mol/kg}$ medu/min), so prikazani v prilogi A.

Ponovljivost metode smo ovrednotili tako, da smo naključno izbranemu vzorcu, to je vzorcu lipovega medu z oznako L20, določili vrednost invertaznega števila v 6 paralelnih določitvah ter rezultate ovrednotili s statističnimi parametri.

Preglednica 17. Invertazno število (IN) v vzorcu L20 z izračunanimi statističnimi parametri

PARALELKA	IN
1.	16,9
2.	16,9
3.	17,0
4.	17,2
5.	17,1
6.	17,0
	$\bar{x} = 17,0$
	SD = 0,1
	KV (%) = 0,8

Koeficient variabilnosti – KV vseh 6 določitev vrednosti invertaznega števila v vzorcu glede na povprečno vrednost znaša le 0,8 %, kar kaže na zelo dobro ponovljivost metode, ki je bila boljša od 99 %.

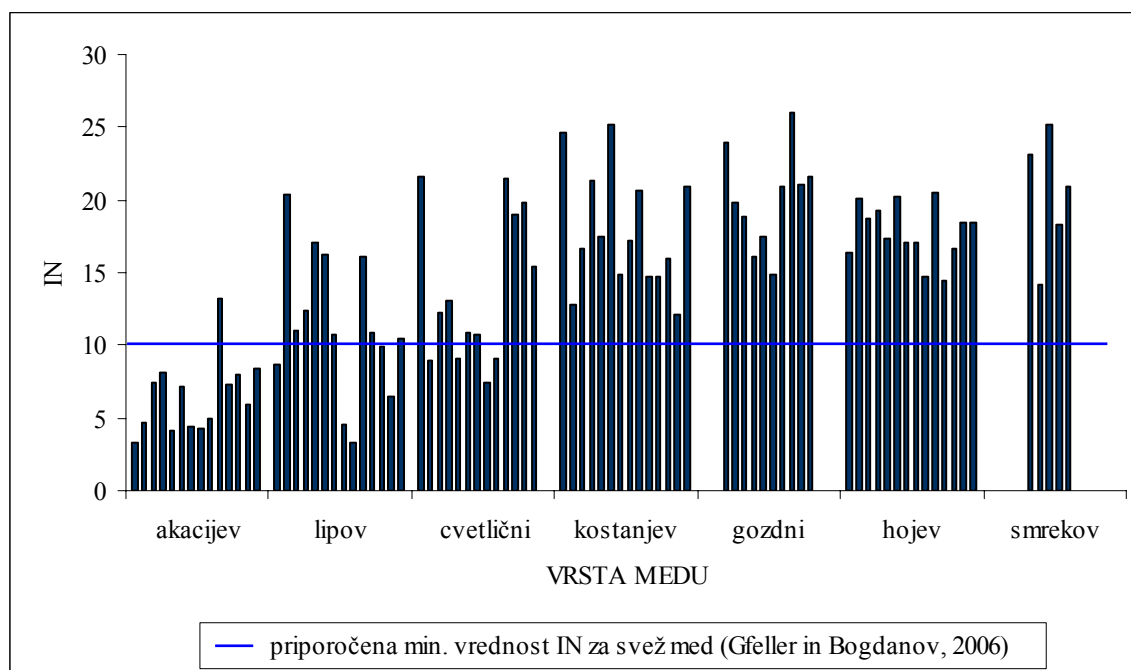
4.2.2 Invertazno število v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu

Preglednica 18. Invertazno število (IN) v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu

AKACIJEV MED		LIPOV MED		CVETLIČNI MED		KOSTANJEV MED	
vzorec	IN	vzorec	IN	vzorec	IN	vzorec	IN
A33	3,3	L16	8,7	C32	21,6	K27	24,7
A35	4,7	L17	20,3	C33	9,0	K28	12,8
A36	7,4	L18	11,0	C34	12,2	K29	16,6
A38	8,1	L19	12,4	C35	13,0	K30	21,3
A45	4,2	L20	17,0	C36	9,1	K31	17,5
A46	7,1	L21	16,3	C37	10,9	K32	25,2
A47	4,4	L22	10,7	C38	10,8	K33	14,8
A48	4,3	L23	4,6	C39	7,4	K34	17,2
A49	5,0	L24	3,3	C40	9,1	K35	20,7
A50	13,2	L25	16,2	C41	21,5	K36	14,7
A51	7,3	L26	10,9	C42	18,9	K37	14,7
A52	8,0	L27	9,9	C43	19,9	K38	15,9
A53	6,0	L28	6,5	C44	15,5	K39	12,1
A54	8,4	L29	10,5			K40	20,9

GOZDNI MED		HOJEV MED		SMREKOV MED	
vzorec	IN	vzorec	IN	vzorec	IN
G31	23,9	H17	16,4	S27	23,2
G32	19,8	H18	20,1	S28	14,2
G33	18,8	H19	18,6	S29	25,2
G34	16,2	H20	19,3	S30	18,3
G35	17,4	H21	17,3	S31	20,9
G36	14,8	H22	20,3		
G38	21,0	H23	17,1		
G39	26,0	H24	17,0		
G40	21,1	H25	14,7		
G41	21,6	H26	20,5		
		H27	14,4		
		H28	16,7		
		H29	18,4		
		H30	18,5		

Pravilnik o medu (2004) ne predpisuje minimalne vrednosti invertaznega števila. Če se pri vrednotenju rezultatov opiramo na smernice za vrednotenje kakovosti medu, ki jih podajata Gfeller in Bogdanov (2006), je iz preglednice 18 in slike 5 razvidno, da priporočenih vrednosti invertaznega števila, ki naj bi se v svežem medu gibale od 10 do 25, ne dosegajo vsi vzorci akacijevega medu, z izjemo vzorca A50, 5 vzorcev lipovega medu (L16, L23, L24, L27, L28) in 4 vzorci cvetličnega medu (C33, C36, C39, C40).



Slika 5. Invertazno število (IN) analiziranih vzorcev glede na posamezno vrsto medu z označeno priporočeno mejno vrednostjo za svež med

Ob predpostavki, da ima akacijev med naravno nizko encimsko aktivnost, najbolj izstopata vzorca lipovega medu L23 in L24, ki pa glede vrednosti diastaznega števila ustrezata Pravilniku (2004). Ker so bili vzorci v času analize stari približno 10 mesecev, so nižje vrednosti invertaznega števila najverjetneje posledica večje občutljivosti invertaze na skladiščenje v primerjavi z diastazo.

Gfeller in Bogdanov (2006) za sveže medove z naravno nizko encimsko aktivnostjo navajata priporočene vrednosti med 8 in 12, medtem ko Bogdanov in sod. (2000) predlagajo minimalno vrednost 4. Slednje vrednosti ne dosega samo vzorec A33 z invertaznim številom 3,3, vrednosti 8 pa ne dosega kar 10 od 14 vzorcev akacijevga medu.

Vzorci kostanjevega medu in vzorci medov iz mane imajo vrednosti invertaznega števila v območju od 12,1 do 26,0, torej vsi ustrezajo priporočenim vrednostim za svež med.

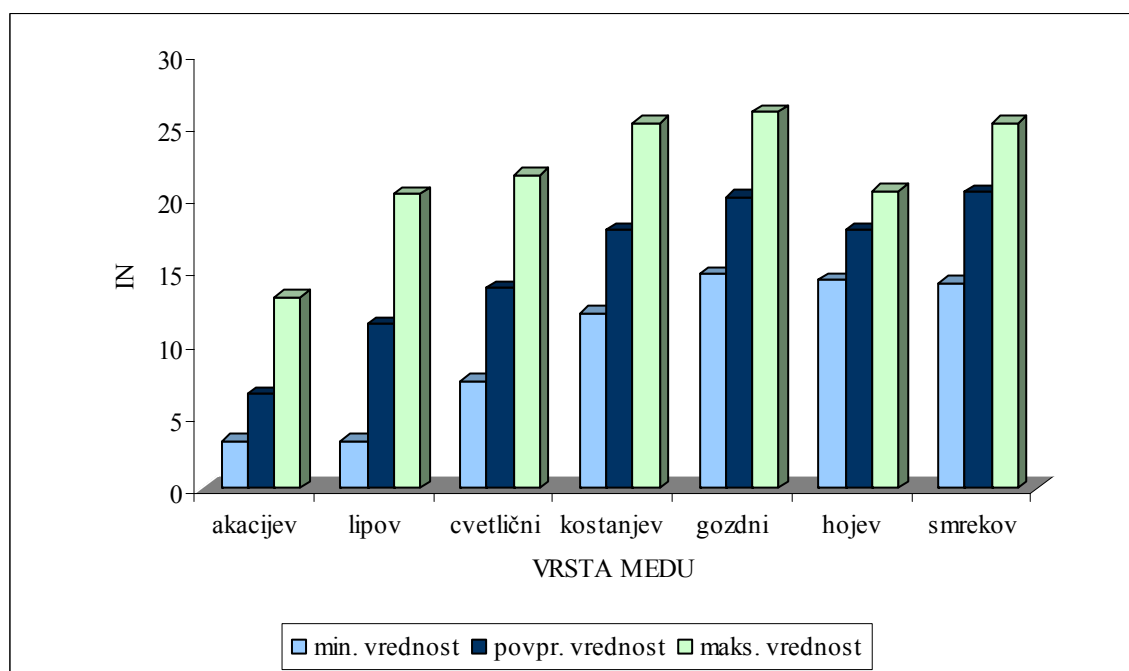
4.2.3 Statistična obdelava rezultatov določanja invertazne aktivnosti

Pri statistični obdelavi rezultatov določanja invertazne aktivnosti nismo opravili analize variance in zaključnega testa za analizo homogenih vzorcev (Duncanov test). Levenov test homogenosti variance nam je dal vrednost statistične značilnosti (signifikance) 0,014, ki je manjša od izbrane meje tveganja $\alpha = 0,05$. S tem zavrnemo ničelno hipotezo, ki pravi, da ni razlik med variancami med vrstami. Vzorci so torej nehomogeni in zato neprimerni za nadaljnjo statistično analizo.

Preglednica 19. Invertazno število za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

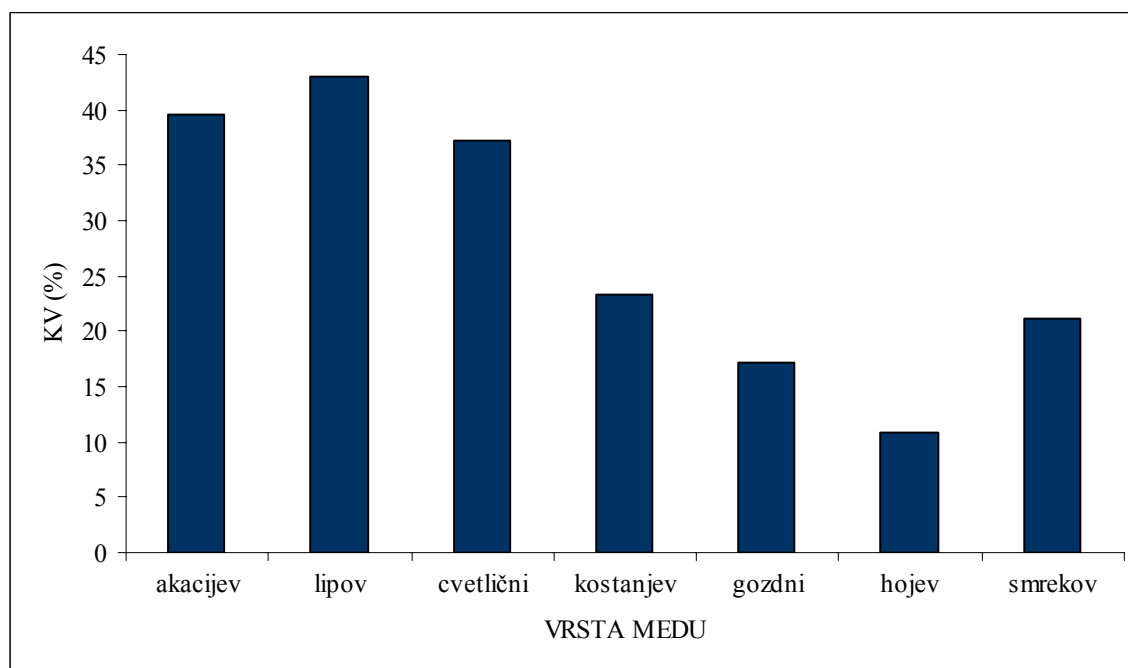
VRSTA MEDU	INVERTAZNO ŠTEVILO					
	n	\bar{x}	x_{\min}	x_{\max}	SD	KV (%)
akacijev	14	6,5	3,3	13,2	2,6	39,6
lipov	14	11,3	3,3	20,3	4,9	43,0
cvetlični	13	13,8	7,4	21,6	5,1	37,3
kostanjev	14	17,8	12,1	25,2	4,1	23,3
gozdni	10	20,1	14,8	26,0	3,4	17,1
hojev	14	17,8	14,4	20,5	1,9	10,8
smrekov	5	20,4	14,2	25,2	4,3	21,2

Iz preglednice 19 in slike 6 je razvidno, da ima najnižjo povprečno vrednost invertaznega števila akacijev med (IN = 6,5), najvišjo pa smrekov (IN = 20,4) in gozdni med (IN = 20,1). Minimalno vrednost invertaznega števila med vsemi analiziranimi vzorci smo določili v vzorcu akacijevga medu A33 in vzorcu lipovega medu L24 ($IN_{\min} = 3,3$), maksimalno vrednost pa v vzorcu gozdnega medu G39 ($IN_{\max} = 26,0$). Akacijev med se glede invertazne aktivnosti značilno razlikuje od ostalih vrst medu. Povprečna vrednost invertaznega števila akacijevga medu je dvakrat nižja od naslednje najnižje povprečne vrednosti invertaznega števila.



Slika 6. Najnižje, povprečne in najvišje vrednosti invertaznega števila (IN) v posameznih vrstah medu

Persano Oddo in sod. (1999) so v posameznih vrstah italijanskega medu določili podobne vrednosti invertaznega števila. Najnižjo povprečno vrednost invertaznega števila je imel prav tako akacijev med (IN = 3,6), najvišjo pa hojev (IN = 23,9). Gozdnega in smrekovega medu niso analizirali, zato rezultati niso najbolj primerljivi.

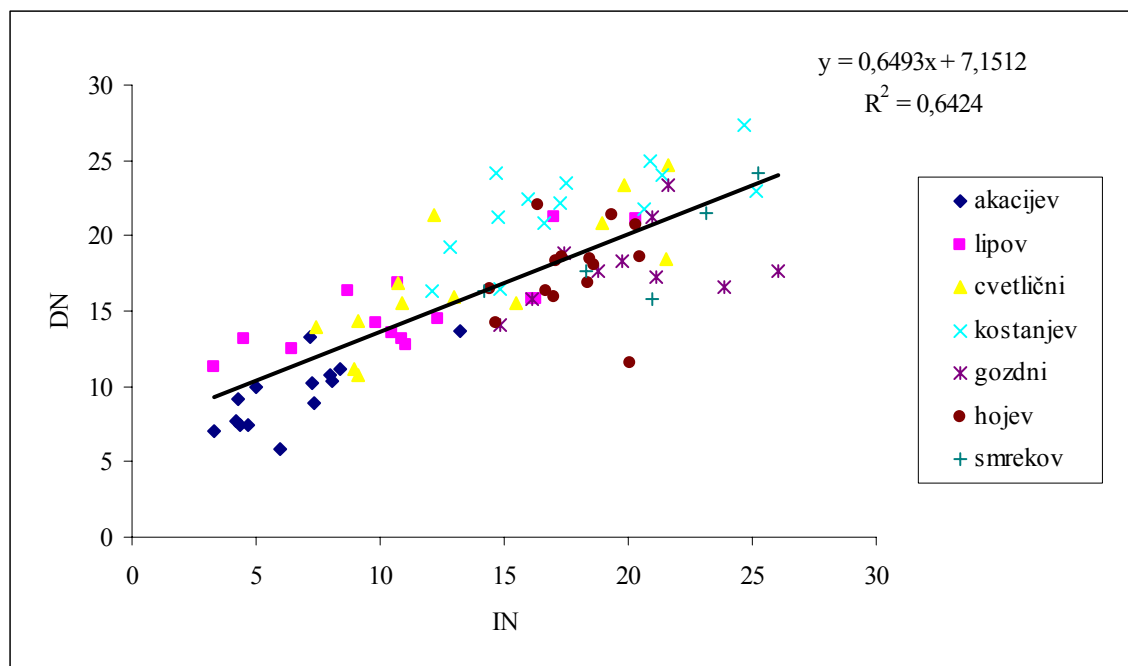


Slika 7. Koeficienti variabilnosti (KV) invertaznega števila glede na posamezno vrsto medu

Invertazna aktivnost, podobno kot diastazna, najbolj variira znotraj nektarnih vrst medu. Največji koeficient variabilnosti je pri lipovem medu, najmanjši pa pri hojevem. Med nektarnimi medovi glede variabilnosti, podobno kot pri diastazni aktivnosti, izstopa kostanjev med. Na podlagi tega lahko sklepamo, da so bili naši vzorci kostanjevega medu mešanica nektarja in mane.

4.3 KORELACIJA MED DIASTAZNO IN INVERTAZNO AKTIVNOSTJO

Med diastazno in invertazno aktivnostjo v vseh analiziranih vzorcih medu smo določili značilno ($\alpha < 0,01$) pozitivno korelacijo s koeficientom korelacije $R = 0,801$ in koeficientom determinacije $R^2 = 0,642$. Korelacijo lahko opredelimo kot močno, saj je $R > 0,70$ in $R^2 > 0,5$. Pozitivna korelacija pomeni, da diastazna aktivnost narašča z naraščajočo invertazno aktivnostjo in obratno.



Slika 8. Korelacija med diastazno in invertazno aktivnostjo za vse vrste medu

Koeficient korelacije je manjši v primerjavi s tistimi (preglednica 8), ki so jih določili Serrano in sod. (2007), Persano Oddo in sod. (1999) ter Huidobro in sod. (1995). Razlog je najbrž starost vzorcev, ki so bili v času analize stari nekaj mesecev, saj se korelacija s skladiščenjem manjša (Krauze in Krauze, 1991).

Preglednica 20. Koeficienti korelacije in determinacije med diastazno in invertazno aktivnostjo pri posameznih vrstah medu

vrsta medu	koeficient korelacije (r)	koeficient determinacije (R^2)
akacijev	0,768	0,590
lipov	0,802	0,644
cvetlični	0,800	0,641
kostanjev	0,719	0,516
gozdni	0,363	0,132
hojev	0,188	0,035
smrekov	0,798	0,636

Primerjava koeficientov korelacije in determinacije med posameznimi vrstami medu (preglednica 20) kaže, da je korelacija med omenjenima encimoma močna pri vseh vrstah, z izjemo gozdnega in hojevega medu. Pri gozdnem medu je korelacija šibka, pri hojevem pa povezanosti med aktivnostjo diastaze in invertaze nismo našli ($R < 0,20$).

Močna korelacija, predvsem pri nektarnih medovih, je najverjetneje posledica enakega izvora diastaze in invertaze v medu. Nekatere mane vsebujejo še invertaze iz črevesja in sline insektov, kar je lahko razlog za manjšo korelacijo med omenjenima encimoma pri maninih medovih.

4.4 RAZMERJE IN/DN V ANALIZIRANIH VZORCIH MEDU

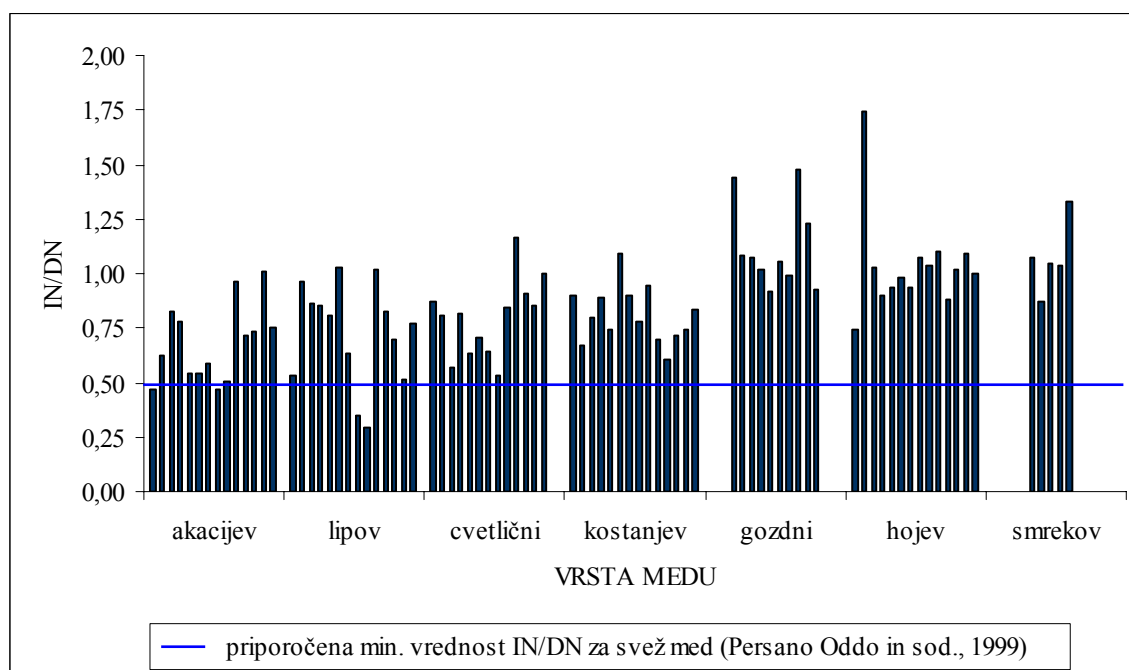
Razmerje IN/DN v posameznih analiziranih vzorcih je glede na vrsto medu prikazano v preglednici 21.

Preglednica 21. Razmerje IN/DN v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu

AKACIJEV MED		LIPOV MED		CVETLIČNI MED		KOSTANJEV MED	
vzorec	IN/DN	vzorec	IN/DN	vzorec	IN/DN	vzorec	IN/DN
A33	0,47	L16	0,53	C32	0,87	K27	0,90
A35	0,63	L17	0,96	C33	0,81	K28	0,67
A36	0,83	L18	0,86	C34	0,57	K29	0,80
A38	0,78	L19	0,85	C35	0,82	K30	0,89
A45	0,54	L20	0,80	C36	0,64	K31	0,74
A46	0,54	L21	1,03	C37	0,70	K32	1,10
A47	0,59	L22	0,63	C38	0,64	K33	0,90
A48	0,47	L23	0,35	C39	0,53	K34	0,78
A49	0,50	L24	0,29	C40	0,84	K35	0,95
A50	0,97	L25	1,02	C41	1,16	K36	0,70
A51	0,71	L26	0,82	C42	0,91	K37	0,61
A52	0,74	L27	0,70	C43	0,85	K38	0,71
A53	1,01	L28	0,52	C44	1,00	K39	0,74
A54	0,76	L29	0,77			K40	0,84

GOZDNI MED		HOJEV MED		SMREKOV MED	
vzorec	IN/DN	vzorec	IN/DN	vzorec	IN/DN
G31	1,44	H17	0,75	S27	1,08
G32	1,08	H18	1,75	S28	0,87
G33	1,07	H19	1,03	S29	1,04
G34	1,02	H20	0,90	S30	1,04
G35	0,92	H21	0,93	S31	1,33
G36	1,05	H22	0,98		
G38	0,99	H23	0,94		
G39	1,48	H24	1,07		
G40	1,23	H25	1,03		
G41	0,92	H26	1,10		
		H27	0,88		
		H28	1,02		
		H29	1,09		
		H30	1,00		

Nekateri avtorji (Aldcorn in sod., 1985; Huidobro in sod., 1995; Persano Oddo in sod., 1999) poročajo, da je razmerje IN/DN boljši parameter za vrednotenje svežosti medu ter za spremljanje pogojev obdelave in shranjevanja medu kot samo diastazna oziroma invertazna aktivnost. Dodajajo, da naj bi bila minimalna vrednost razmerja IN/DN v svežem medu višja od 0,5. V preglednici 21 in na sliki 9 vidimo, da samo 4 vzorci ne dosegajo te vrednosti, pri čemer lahko vzorca akacijevega medu (A33, A48) z razmerjem 0,47 zanemarimo zaradi majhne razlike glede na priporočeno vrednost. Ostala dva vzorca pripadata lipovemu medu (L23, L24) in imata zelo nizki vrednosti invertaznega števila, vrednosti diastaznega števila pa v skladu z zahtevami Pravilnika (2004). Glede na razmerje IN/DN lahko sklepamo, da sta bila vzorca pregreta oziroma nepravilno skladiščena.



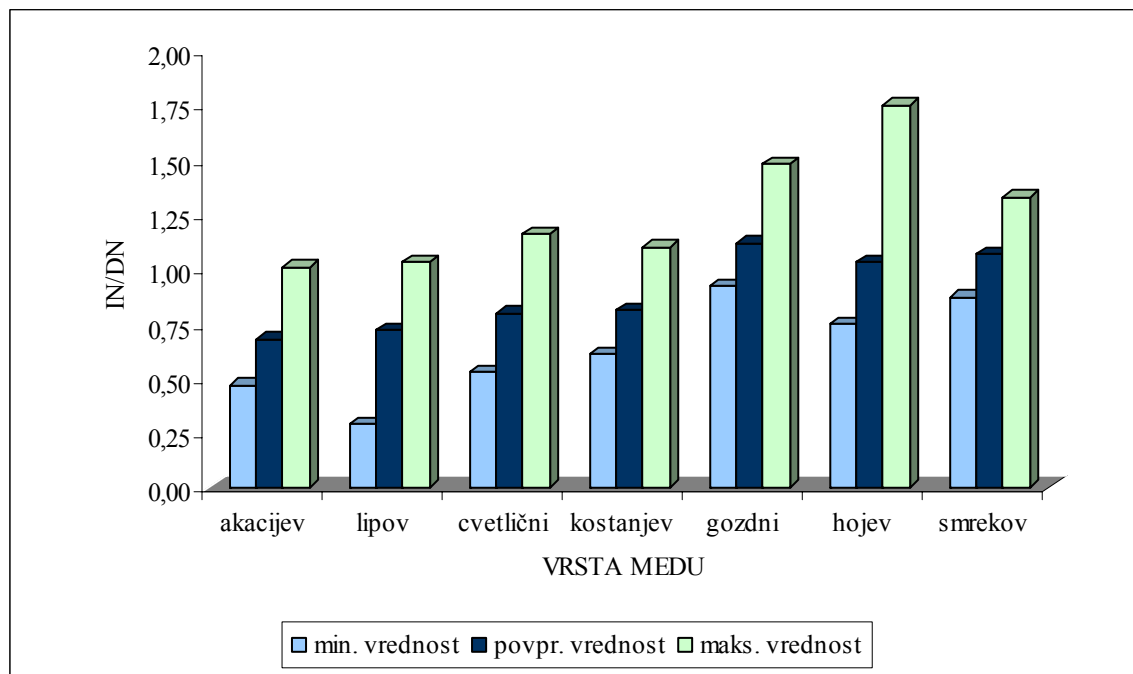
Slika 9. Razmerje IN/DN v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu z označeno priporočeno mejno vrednostjo za svež med

4.4.1 Statistična obdelava rezultatov IN/DN

Preglednica 22. Razmerje IN/DN za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

VRSTA MEDU	IN/DN					
	n	\bar{x}	x_{\min}	x_{\max}	SD	KV (%)
akacijev	14	0,68	0,47	1,01	0,18	25,97
lipov	14	0,72	0,29	1,03	0,23	32,31
cvetlični	13	0,80	0,53	1,16	0,18	22,32
kostanjev	14	0,81	0,61	1,10	0,13	16,04
gozdni	10	1,12	0,92	1,48	0,20	17,73
hojev	14	1,03	0,75	1,75	0,23	21,88
smrekov	5	1,07	0,87	1,33	0,16	15,35

Če primerjamo povprečne vrednosti razmerja IN/DN med posameznimi vrstami medu, vidimo, da imajo manine vrste medu povprečne vrednosti razmerja višje 1, nektarne vrste pa nižje od 1. Najnižjo povprečno vrednost razmerja je imel akacijev med (IN/DN = 0,68), najvišjo pa gozdni (IN/DN = 1,12).



Slika 10. Najnižje, povprečne in najvišje vrednosti razmerja IN/DN v posameznih vrstah medu

Primerjava rezultatov z vrednostmi razmerja IN/DN, ki so jih določili Persano Oddo in sod. (1999) v posameznih vrstah italijanskega medu, ne pokaže velikih razlik. Najnižjo povprečno vrednost omenjenega razmerja je imel akacijev med (IN/DN = 0,42), najvišjo pa hojev (IN/DN = 1,13).

4.4.2 Korelacija razmerja IN/DN z diastazno in invertazno aktivnostjo

Med razmerjem IN/DN in diastazno aktivnostjo v vseh analiziranih vzorcih medu smo določili značilno ($\alpha < 0,05$) pozitivno korelacijo s koeficientom korelacije $R = 0,246$ in koeficientom determinacije $R^2 = 0,061$. Korelacija je šibka, saj je $0,20 < R < 0,40$. Korelacija, ki sta jo določila Vorlová in Přidal (2002) pri analizi 54 vzorcev medu, je bila šibka negativna ($R = -0,209$).

Med razmerjem IN/DN in invertazno aktivnostjo v vseh analiziranih vzorcih medu smo določili značilno ($\alpha < 0,01$) pozitivno korelacijo s koeficientom korelacije $R = 0,758$ in koeficientom determinacije $R^2 = 0,574$. Korelacija je močna, saj je $R > 0,70$ in $R^2 > 0,5$. Vorlová in Přidal (2002) sta med omenjenima parametroma določila zmerno pozitivno korelacijo ($R = 0,456$).

4.5 REZULTATI DOLOČANJA KOLIČINE NASTALEGA H₂O₂

4.5.1 Ponovljivost metode za določanje količine nastalega H₂O₂

Spektrofotometrična metoda za določanje količine nastalega H₂O₂ (White in Subers, 1963) je posebej prilagojena za med, vendar jo v zadnjem času izpodriva določanje količine H₂O₂ s pomočjo testnih lističev. Prva metoda je dolgotrajna in izredno časovno in temperaturno odvisna, zato zahteva veliko natančnost.

Ponovljivost metode smo ovrednotili tako, da smo naključno izbranemu vzorcu, to je vzorcu lipovega medu z oznako L29, določili količino nastalega H₂O₂ v 6 paralelnih določitvah ter rezultate ovrednotili s statističnimi parametri.

Preglednica 23. Količina nastalega H₂O₂ v vzorcu L29 z izračunanimi statističnimi parametri

PARALELKA	H ₂ O ₂ (μG/G MEDU/H)
1.	69,2
2.	69,2
3.	70,7
4.	69,4
5.	70,6
6.	70,1
	$\bar{x} = 69,9$
	SD = 0,7
	KV (%) = 1,0

Koeficient variabilnosti – KV vseh 6 določitev količine nastalega H₂O₂ v vzorcu glede na povprečno vrednost znaša le 1,0 %, kar kaže na zelo dobro ponovljivost metode, ki je bila 99 %-na.

4.5.2 Količina nastalega H₂O₂ v vzorcih glede na posamezno vrsto medu

Rezultati določanja količine nastalega H₂O₂ so podani kot μg H₂O₂/g medu/h in so prikazani v preglednici 24.

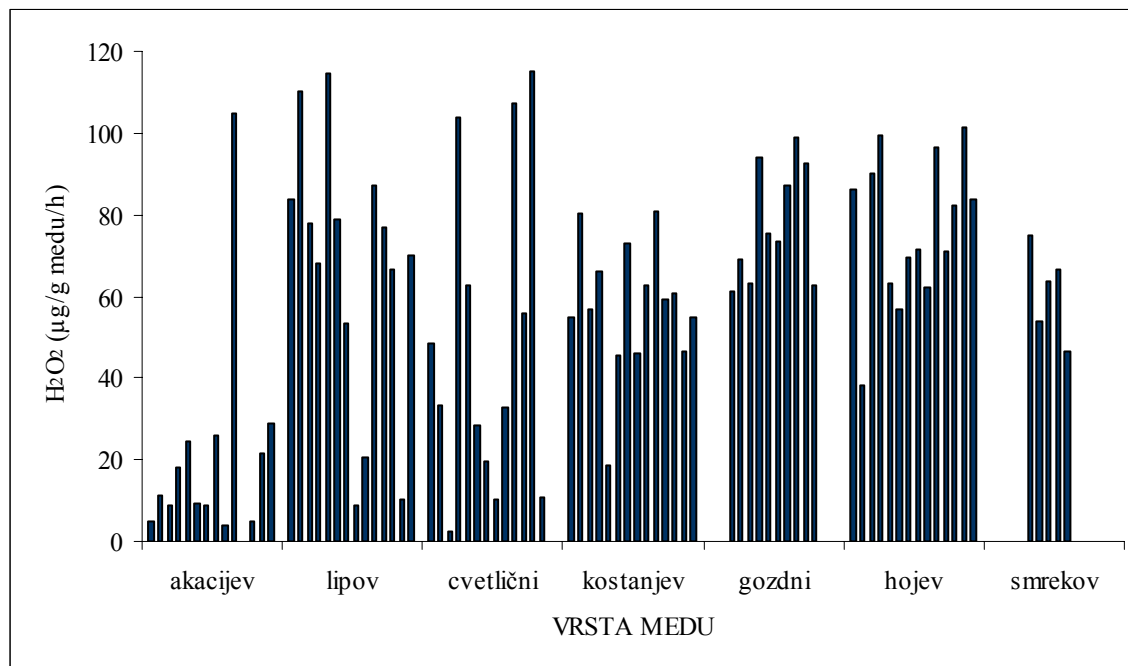
Preglednica 24. Količina nastalega H_2O_2 v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu

AKACIJEV MED		LIPOV MED		CVETLIČNI MED		KOSTANJEV MED	
vzorec	H_2O_2 ($\mu\text{g/g/h}$)	vzorec	H_2O_2 ($\mu\text{g/g/h}$)	vzorec	H_2O_2 ($\mu\text{g/g/h}$)	vzorec	H_2O_2 ($\mu\text{g/g/h}$)
A33	5,1	L16	83,6	C32	48,3	K27	54,8
A35	11,4	L17	110,3	C33	33,4	K28	80,2
A36	9,0	L18	78,0	C34	2,4	K29	56,9
A38	17,9	L19	67,9	C35	104,1	K30	66,3
A45	24,5	L20	114,5	C36	62,6	K31	18,7
A46	9,3	L21	78,7	C37	28,6	K32	45,3
A47	8,7	L22	53,6	C38	19,5	K33	72,9
A48	26,2	L23	8,9	C39	10,3	K34	46,0
A49	3,7	L24	20,6	C40	32,6	K35	62,9
A50	104,8	L25	87,0	C41	107,2	K36	80,7
A51	0,0	L26	77,1	C42	55,9	K37	59,1
A52	4,8	L27	66,8	C43	115,2	K38	60,6
A53	21,4	L28	10,5	C44	10,6	K39	46,3
A54	28,9	L29	69,9			K40	54,8

GOZDNI MED		HOJEV MED		SMREKOV MED	
vzorec	H_2O_2 ($\mu\text{g/g/h}$)	vzorec	H_2O_2 ($\mu\text{g/g/h}$)	vzorec	H_2O_2 ($\mu\text{g/g/h}$)
G31	61,2	H17	86,3	S27	74,7
G32	68,8	H18	38,0	S28	54,0
G33	63,3	H19	90,1	S29	63,5
G34	94,1	H20	99,6	S30	66,4
G35	75,4	H21	63,3	S31	46,6
G36	73,6	H22	56,6		
G38	87,2	H23	69,5		
G39	98,7	H24	71,5		
G40	92,4	H25	62,3		
G41	62,9	H26	96,7		
		H27	70,9		
		H28	82,1		
		H29	101,2		
		H30	83,8		

Iz preglednice 24 in slike 11 je razvidno, da količina nastalega H_2O_2 med vrstami, kot tudi znotraj posameznih vrst medu, zelo variira. Vrednosti se gibljejo od 0,0 do 115,2 $\mu\text{g/g}$ medu/h, kar se sklada s vrednostmi, ki so jih določili White in sod. (1963) – od manj kot 5 do približno 100 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ medu/h ter Kerkvliet (1996) – od 0 do 150 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ medu/h.

Nastanka H_2O_2 ni bilo zaslediti v vzorcu akacijevnega medu z oznako A51, kar je najverjetneje posledica naravno nizke encimske aktivnosti glukoza-oksidadaze, saj smo skoraj v vseh vzorcih akacijevnega medu, z izjemo vzorca A50, določili zelo majhne količine nastalega H_2O_2 .



Slika 11. Količina nastalega H₂O₂ v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu

Zelo majhne količine nastalega H₂O₂ smo določili še v dveh vzorcih lipovega (8,9 in 10,5 µg H₂O₂/g medu/h) in v treh vzorcih cvetličnega medu (2,4-10,6 µg H₂O₂/g medu/h). Vzorca lipovega medu (L23, L28) ne dosegata priporočenih vrednosti invertaznega števila, zato so majhne količine nastalega H₂O₂ najverjetneje posledica starosti vzorcev, saj je glukoza-oksிடaza podobno kot invertaza izjemno občutljiva na skladiščenje. Vzorci cvetličnega medu (C34, C39, C44) pa glede vrednosti diastaznega in invertaznega števila ustrezajo zahtevam Pravilnika (2004) in priporočenim vrednostim, zato je nastanek majhnih količin H₂O₂ najverjetneje posledica višje aktivnosti katalaze ali drugih kemijskih interakcij v cvetličnem medu.

V enem vzorcu akacijevega (A50) in hojevega medu (H20) ter v dveh vzorcih lipovega (L17, L20) in cvetličnega medu (C35, C43) smo določili vrednosti količine nastalega H₂O₂ nad 100 µg/g medu/h. Omenjeni vzorci imajo relativno visoke vrednosti diastaznega in invertaznega števila ter vrednosti razmerja IN/DN v območju od 0,80 do 0,97.

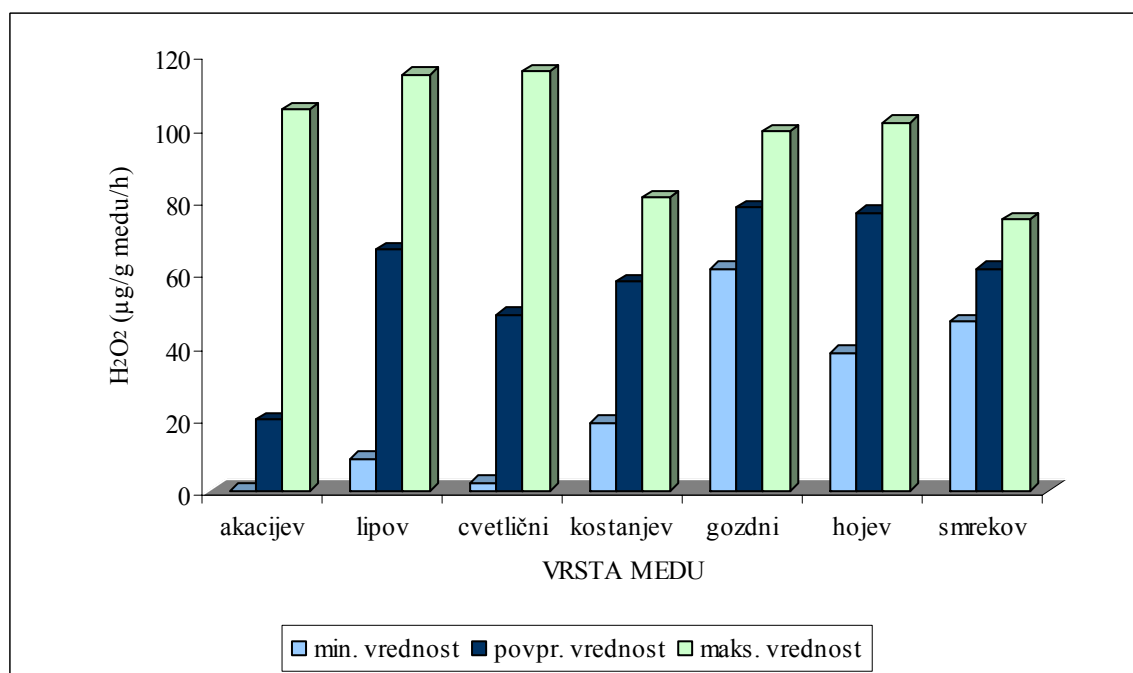
4.5.3 Statistična obdelava rezultatov določanja količine nastalega H₂O₂

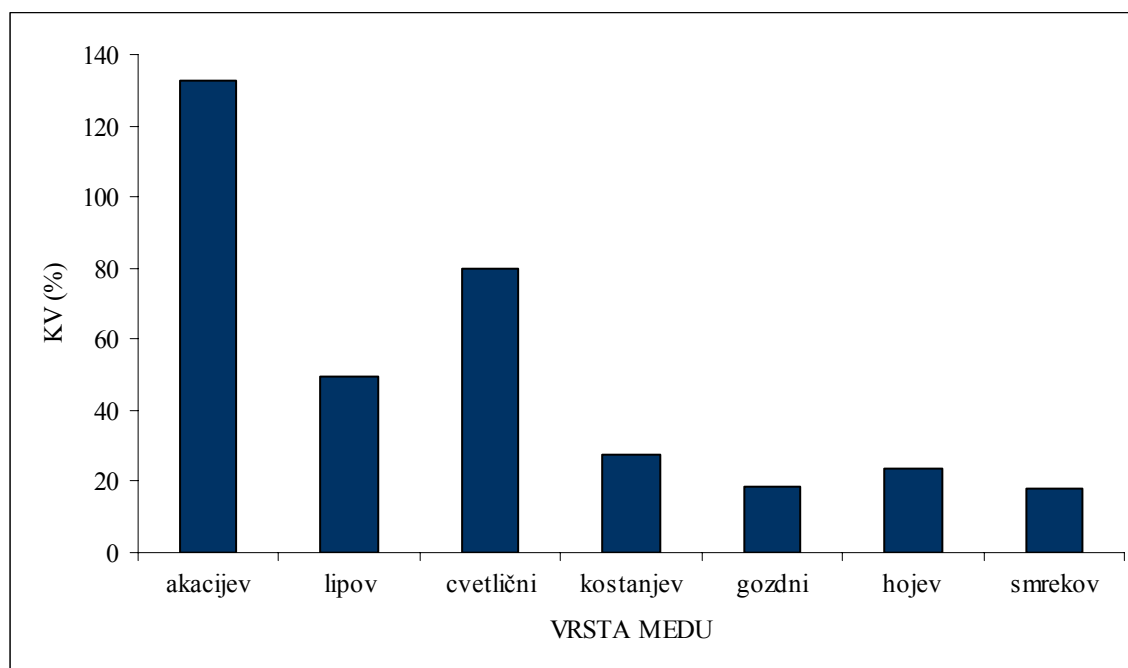
Pri statistični obdelavi rezultatov določanja količine nastalega H₂O₂ nismo opravili analize variance in Duncanovega testa. Levenov test homogenosti variance nam je dal vrednost statistične značilnosti (signifikance) 0,013, ki je manjša od izbrane meje tveganja $\alpha = 0,05$. S tem zavrnilo ničelno hipotezo, ki pravi, da ni razlik med variancami med vrstami. Vzorci so torej nehomogeni in zato neprimerni za nadaljnjo statistično analizo.

Preglednica 25. Količina nastalega H_2O_2 za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

VRSTA MEDU	KOLIČINA H_2O_2 ($\mu\text{g/g}$ medu/h)					
	n	\bar{x}	x_{\min}	x_{\max}	SD	KV (%)
akacijev	14	19,7	0,0	104,8	26,1	132,8
lipov	14	66,3	8,9	114,5	32,9	49,7
cvetlični	13	48,5	2,4	115,2	38,7	79,8
kostanjev	14	57,5	18,7	80,7	16,0	27,8
gozdni	10	77,8	61,2	98,7	14,2	18,3
hojev	14	76,6	38,0	101,2	18,2	23,7
smrekov	5	61,0	46,6	74,7	11,0	18,0

Iz preglednice 25 in slike 12 je razvidno, da ima najnižjo povprečno vrednost količine nastalega H_2O_2 akacijev med (19,7 $\mu\text{g/g}$ medu/h), najvišjo pa gozdni (77,8 $\mu\text{g/g}$ medu/h) in hojev med (76,6 $\mu\text{g/g}$ medu/h). Kot smo že omenili, nastanka H_2O_2 nismo zasledili v vzorcu akacijevnega medu z oznako A51, maksimalno vrednost količine nastalega H_2O_2 med vsemi analiziranimi vzorci medu pa smo določili v vzorcu cvetličnega medu C43 (115,2 $\mu\text{g/g}$ medu/h). Akacijev med se glede na količino nastalega H_2O_2 , podobno kot pri diastaznem in invertaznem številu, značilno razlikuje od ostalih vrst medu. Povprečna vrednost količine nastalega H_2O_2 v akacijevem medu je vsaj dvakrat nižja od naslednje najnižje povprečne vrednosti količine nastalega H_2O_2 .

Slika 12. Najnižje, povprečne in najvišje vrednosti količine nastalega H_2O_2 v posameznih vrstah medu



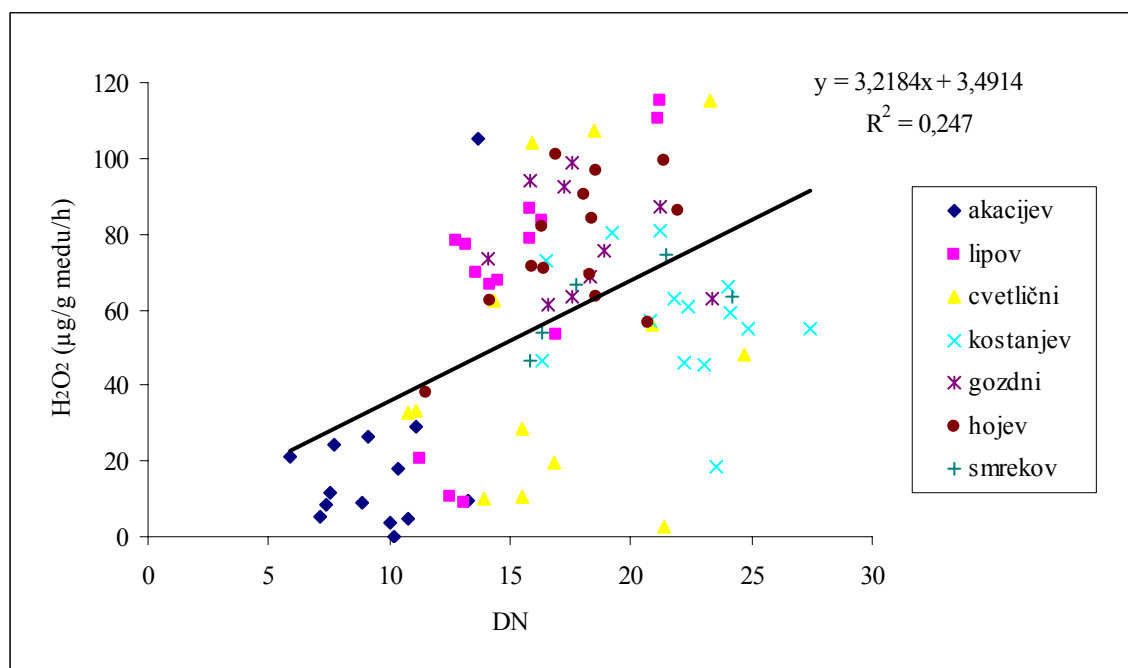
Slika 13. Koeficienti variabilnosti (KV) količine nastalega H_2O_2 glede na posamezno vrsto medu

Količina nastalega H_2O_2 najbolj variira znotraj nektarnih vrst, predvsem znotraj akacijevega medu, kar je najverjetneje posledica različnega izvora nektarja, od katerega je v veliki meri odvisna aktivnost katalaze. Koeficient variabilnosti kostanjevega medu je, podobno kot pri diastaznem in invertaznem številu, bližje koeficientom variabilnosti manjih vrst medu.

4.6 KORELACIJA H_2O_2 Z DIASTAZNO IN INVERTAZNO AKTIVNOSTJO

4.6.1 Korelacija med količino nastalega H_2O_2 in diastazno aktivnostjo

Med količino nastalega H_2O_2 in diastazno aktivnostjo v vseh analiziranih vzorcih medu smo določili značilno ($\alpha < 0,01$) pozitivno korelacijo s koeficientom korelacije $R = 0,497$ in koeficientom determinacije $R^2 = 0,247$. Korelacijo lahko opredelimo kot zmerno, saj je $0,40 < R < 0,70$. Pozitivna korelacija pomeni, da količina nastalega H_2O_2 narašča z naraščanjem diastazne aktivnosti in obratno.



Slika 14. Korelacija med količino nastalega H_2O_2 in diastazno aktivnostjo za vse vrste medu

Koeficient korelacije je manjši od koeficienta $R = 0,650$, ki so ga določili Bogdanov in sod. (1987) pri analizi 37 vzorcev medu.

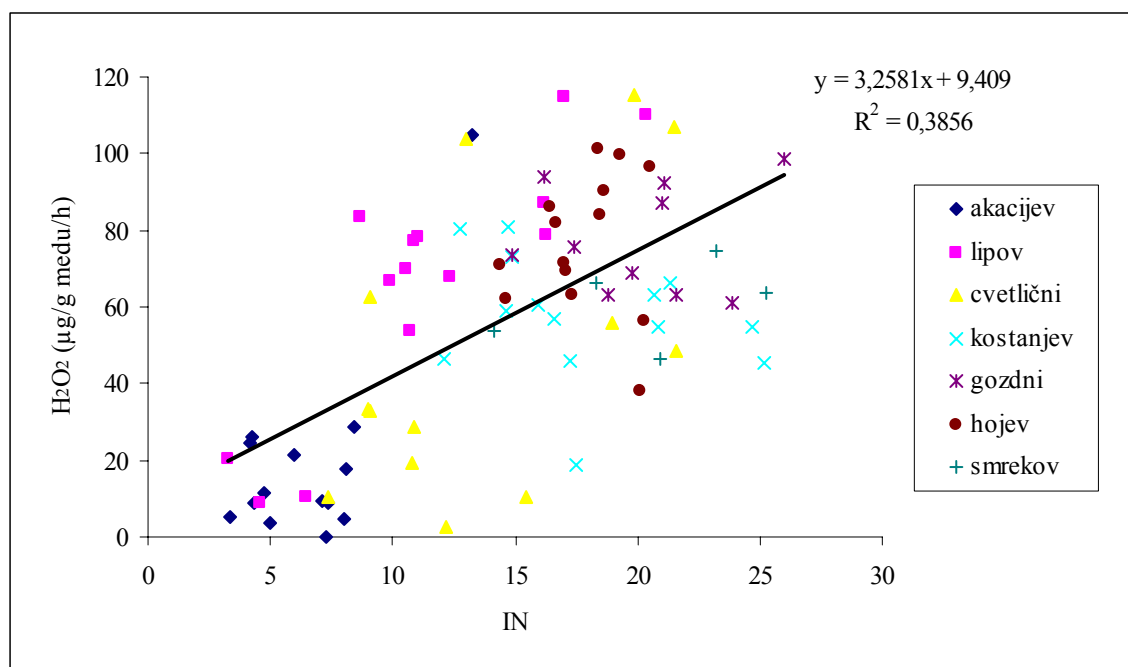
Preglednica 26. Koeficienti korelacije in determinacije med količino nastalega H_2O_2 in diastazno aktivnostjo pri posameznih vrstah medu

vrsta medu	koeficient korelacije (r)	koeficient determinacije (R^2)
akacijev	0,453	0,205
lipov	0,750	0,563
cvetlični	0,310	0,096
kostanjev	-0,276	0,076
gozdni	0,194	0,038
hojev	0,541	0,293
smrekov	0,662	0,438

Močna pozitivna korelacija med količino nastalega H_2O_2 in diastazno aktivnostjo je samo pri lipovem medu, zmerna pozitivna korelacija pa pri smrekovem, hojevem in akacijevem medu. Pri cvetličnem medu je šibka pozitivna korelacija, pri kostanjevem pa šibka negativna korelacija. Pri gozdnem medu nismo našli povezanosti med nastankom H_2O_2 in diastazno aktivnostjo.

4.6.2 Korelacija med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo

Med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo v vseh analiziranih vzorcih medu smo določili značilno ($\alpha < 0,01$) pozitivno korelacijo s koeficientom korelacije $R = 0,621$ in koeficientom determinacije $R^2 = 0,386$. Tudi to korelacijo lahko opredelimo samo kot zmerno, saj je $0,40 < R < 0,70$ in $R^2 < 0,5$. Pozitivna korelacija pomeni, da količina nastalega H_2O_2 narašča z naraščanjem invertazne aktivnosti in obratno.



Slika 15. Korelacija med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo za vse vrste medu

Koeficient korelacije je večji od koeficienta $R = 0,582$, ki so ga določili Bogdanov in sod. (1987) pri analizi 37 vzorcev medu, in koeficienta $R = 0,458$, ki so ga določili Serra Bonvehí in sod. (2000) pri analizi 147 vzorcev medu.

Preglednica 27. Koeficienti korelacije in determinacije med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo pri posameznih vrstah medu

vrsta medu	koeficient korelacije (r)	koeficient determinacije (R^2)
akacijev	0,704	0,496
lipov	0,871	0,759
cvetlični	0,560	0,314
kostanjev	-0,265	0,070
gozdni	0,108	0,012
hojev	0,093	0,009
smrekov	0,394	0,155

Močna pozitivna korelacija med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo je značilna pri lipovem in akacijevem medu. Pri cvetličnem medu je zmerno pozitivna korelacija, pri smrekovem medu pa šibka pozitivna. Šibko negativno korelacijo smo našli pri kostanjevem medu, pri gozdnem in hojevem medu pa ni bilo povezanosti med omenjenima parametroma. Manjša korelacija pri maninih medovih je najverjetneje posledica prisotnosti invertaz iz črevesja in slin insektov, ki jih vsebujejo nekatere mane.

Korelacija med količino nastalega H_2O_2 in invertazno aktivnostjo pri kostanjevem medu je, podobno kot pri diastazni aktivnosti, negativna, kar pomeni, da količina nastalega H_2O_2 z naraščajočo aktivnostjo invertaze oziroma diastaze pada. Razlog za to je najverjetneje višja aktivnost katalaze v kostanjevem medu ali morebitne kemijske interakcije med H_2O_2 in spojinami, ki so lahko prisotne v tej vrsti medu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Analizirali smo 84 vzorcev slovenskega medu, letnika 2006, in sicer 14 vzorcev akacijevega, 14 vzorcev lipovega, 13 vzorcev cvetličnega, 14 vzorcev kostanjevega, 10 vzorcev gozdnega, 14 vzorcev hojevega in 5 vzorcev smrekovega medu. Vzorce smo dobili v času točenja neposredno od čebelarjev iz različnih predelov Slovenije in so bili v času analize stari približno 10 mesecev. Namen dela je bil določiti diastazno in invertazno aktivnost ter količino nastalega vodikovega peroksida v medu in preveriti ali so vrednosti vrstno značilne ter če ustrezajo predpisanim oziroma priporočenim vrednostim.

Pomembna parametra, ki se uporabljata za vrednotenje svežosti medu ter za spremljanje pogojev obdelave in shranjevanja medu, sta diastazna aktivnost in vsebnost HMF. Njune minimalne in maksimalne vrednosti so predpisane s Pravilnikom o medu (2004). Omenjena parametra sta učinkovita za ugotavljanje pristnosti medu, ki se prodaja v trgovini, za spremljanje manjših sprememb v svežem medu pa nista najbolj primerna. Kot kriterij za vrednotenje kakovosti svežega medu se priporoča določanje invertazne aktivnosti (Bogdanov in sod., 1997) in razmerja IN/DN (Aldcorn in sod., 1985; Huidobro in sod., 1995; Persano Oddo in sod., 1999), saj je invertaza bolj občutljiva na zunanje dejavnike kot diastaza.

Pravilnik o medu (2004) predpisuje najnižjo vrednost diastaznega števila 8 oziroma 3 za med z naravno nizko encimsko aktivnostjo. Vrednosti 8 ni dosegalo 5 vzorcev akacijevega medu, ki so imeli vrednost diastaznega števila v območju od 5,9 do 7,7. Za akacijev med je znano, da ima naravno nizko encimsko aktivnost in Pravilnik (2004) za tak med predpisuje nižjo vrednost diastaznega števila ($DN > 3$). Ti vzorci so imeli tudi nižje vrednosti invertaznega števila v primerjavi z ostalimi vzorci medu. Rezultate smo primerjali še s priporočenimi vrednostmi za svež med, ki jih navaja literatura. V medu z normalno encimsko aktivnostjo naj bi se gibale od 13 do 30, v medu z nizko encimsko aktivnostjo pa od 4 do 8. Teh vrednosti ni dosegalo 6 vzorcev, in sicer 3 vzorci lipovega, 2 vzorca cvetličnega in 1 vzorec hojevega medu. Diastazno število teh vzorcev je bilo v območju med 10,8 in 12,8, kar je le malo nižje od priporočene vrednosti 13. Ob upoštevanju dejstva, da so bili vzorci v času analize stari približno 10 mesecev, sklepamo, da so sveži vzorci dosegali priporočene vrednosti. Vzorci kostanjevega medu in vzorci medov iz mane, z izjemo vzorca hojevega medu H18, so imeli vrednosti diastaznega števila v območju od 14,1 do 27,4, torej so vsi ustrezali priporočenim vrednostim za svež med. Prav tako so vsi vzorci akacijevega medu ustrezali priporočenim vrednostim za svež med z nizko encimsko aktivnostjo.

Statistična obdelava rezultatov je pokazala, da se posamezne vrste medu glede na diastazno aktivnost med seboj statistično značilno razlikujejo ($\alpha = 0,000$). Akacijev med se statistično značilno razlikuje od ostalih šestih vrst medu ($\alpha \leq 0,05$), podobno velja za kostanjev med. Akacijev med je imel najnižjo povprečno vrednost diastaznega števila (DN = 9,5), kostanjev med pa najvišjo (DN = 22,0). Višje povprečne vrednosti so poleg kostanjevega medu imeli medovi iz mane, kar je v skladu z našimi pričakovanji. Podobne rezultate navajajo tudi drugi avtorji (Golob in Plestenjak, 1999; Karo, 2004; Persano Oddo, 1999; Vrečar, 2003). Vsi ugotavljajo najmanjšo aktivnost v akacijevem medu, največjo pa v kostanjevem medu oziroma v medovih iz mane. Vzorci nektarnih medov so v primerjavi z maninimi bolj variirali znotraj posamezne vrste, kar je najverjetneje posledica različnega izvora nektarja.

Pravilnik o medu (2004) ne predpisuje minimalne vrednosti invertaznega števila, zato smo se pri vrednotenju rezultatov opirali na literaturo, ki podaja priporočene vrednosti za svež med. Te naj bi se v medu z normalno encimsko aktivnostjo gibale med 10 in 25, v medu z nizko encimsko aktivnostjo pa od 4 oziroma 8 do 12. Vrednosti invertaznega števila 10 ne dosegajo 4 vzorci lipovega in 4 vzorci cvetličnega medu. Med njimi najbolj izstopata vzorca lipovega medu z oznakama L23 in L24, ki imata relativno visoke vrednosti diastaznega števila in bi na podlagi tega lahko sklepali, da nista bila podvržena segrevanju oziroma nepravilnemu skladiščenju, vendar rezultati razmerja IN/DN kažejo drugače. Ravno ta vzorca sta imela najnižje omenjeno razmerje izmed vseh analiziranih vzorcev in obstaja možnost, da sta bila pregreta. Nepravilno skladiščenje lahko izvezemo, saj smo vzorce medu dobili neposredno od čebelarjev in so bili vsi do časa analize hranjeni pri enakih pogojih. Vzorci kostanjevega medu in vzorci medov iz mane imajo vrednosti invertaznega števila v območju od 12,1 do 26,0, torej vsi ustrezajo priporočenim vrednostim za svež med. Vsi vzorci akacijevga medu, ki ima naravno nizko encimsko aktivnost, z izjemo vzorca A33, so dosegali priporočeno vrednost 4, vrednosti 8 pa ni dosegalo kar 10 od vseh 14 vzorcev. To je lahko posledica starosti vzorcev ali pa je mejna vrednost 8 previsoka za vrednotenje medu z nizko encimsko aktivnostjo. Vzorec A33 je imel invertazno število 3,3 in razmerje IN/DN 0,47, kar je ravno na meji s priporočenimi vrednostmi in predvidevamo, da je takoj po točenju te vrednosti dosegal.

Pri statistični obdelavi rezultatov določanja invertazne aktivnosti nismo opravili analize variance in Duncanovega testa, saj nam je Levenov test homogenosti variance dal vrednost statistične značilnosti (signifikance) 0,014, ki je manjša od izbrane meje tveganja 0,05. Najmanjšo povprečno vrednost invertaznega števila smo določili v akacijevem medu (IN = 6,5), največjo pa v smrekovem (IN = 20,4) in gozdnem medu (IN = 20,1). Akacijev med se je glede invertazne aktivnosti značilno razlikoval od ostalih vrst medu. Povprečna vrednost invertaznega števila akacijevga medu je bila dvakrat nižja od naslednje najnižje povprečne vrednosti invertaznega števila.

Rezultate smo lahko primerjali samo s tujimi, saj podatkov za slovenski med še nismo imeli. Persano Oddo in sod. (1999) so v posameznih vrstah italijanskega medu določili najmanjšo invertazno aktivnost v akacijevem medu (IN = 3,6), največjo pa v hojevem (IN = 23,9). Rezultati o največji aktivnosti niso najbolj primerljivi, saj italijanski raziskovalci gozdnega in smrekovega medu niso analizirali.

Podobno kot diastazna, je tudi invertazna aktivnost, najbolj variirala znotraj nektarnih vrst medu, med katerimi je izstopal kostanjev med. Koeficient variabilnosti kostanjevega medu je bil bližje koeficientom variabilnosti maninih vrst medu. Na podlagi tega lahko sklepamo, da so bili naši vzorci kostanjevega medu mešanica nektarja in mane.

Med diastazno in invertazno aktivnostjo v vseh analiziranih vzorcih medu smo določili značilno ($\alpha < 0,01$) pozitivno korelacijo, s koeficientom korelacije 0,801. Pozitivna korelacija pomeni, da diastazna aktivnost narašča z naraščajočo invertazno aktivnostjo in obratno, visok koeficient korelacije pa, da sta aktivnosti omenjenih encimov močno povezani. To je v skladu z našimi pričakovanji, saj se oba encima primešata medičini med zorenjem medu iz izločkov čebeljih žlez. Koeficient korelacije je primerljiv s tistimi, ki jih navaja tuja literatura. Znotraj posamezne vrste medu smo določili močne pozitivne korelacije pri lipovem, cvetličnem, smrekovem, akacijevem in kostanjevem medu. Pri gozdnem medu je bila korelacija šibka, pri hojevem pa nismo našli povezanosti med aktivnostjo obeh encimov. Močna korelacija pri medovih nektarnih vrst je posledica enakega izvora diastaze in invertaze. Razlog za manjšo korelacijo pri medovih iz mane lahko predstavljajo invertaze iz črevesja in sline insektov, ki jih nekatere mane vsebujejo.

Analiziranim vzorcem smo določili tudi razmerje IN/DN, saj literatura (Aldcorn in sod., 1985; Huidobro in sod., 1995; Persano Oddo in sod., 1999) navaja, da je boljši pokazatelj svežosti medu kot diastazna in invertazna aktivnost. Svež med naj bi imel vrednosti omenjenega razmerja nad 0,5. Te vrednosti so dosegali vsi vzorci, razen prej omenjenih L23 in L24 ter dveh vzorcev akacijevga medu, ki pa sta ravno na meji. Kot smo že prej navedli, omenjena vzorca lipovega medu glede vrednosti diastaznega števila ustrezata Pravilniku (2004), a imata vrednosti razmerja IN/DN 0,35 in 0,29, kar je pod priporočeno vrednostjo 0,5. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je razmerje IN/DN boljši pokazatelj svežosti medu od diastazne aktivnosti.

Statistična obdelava rezultatov je pokazala, da imajo manine vrste medu povprečne vrednosti razmerja IN/DN višje od 1, nektarne vrste pa nižje od 1. To je najverjetneje posledica večje stabilnosti encimov v medovih iz mane ali dejstva, da nekatere mane vsebujejo še invertaze iz črevesja in sline insektov, ki prispevajo k večji invertazni aktivnosti medu. Najnižjo povprečno vrednost razmerja IN/DN sta imela akacijev (IN/DN = 0,68) in lipov med (IN/DN = 0,72), najvišjo pa gozdni med (IN/DN = 1,12). Kot vidimo se povprečni vrednosti razmerja IN/DN med akacijevim in lipovim medom bistveno ne razlikujeta, medtem ko ima lipov med (IN = 11,3) v primerjavi z akacijevim (IN = 6,5) skoraj dvakrat višjo povprečno vrednost invertaznega števila. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je razmerje IN/DN boljši pokazatelj svežosti medu tudi od invertazne aktivnosti.

Količina nastalega H_2O_2 je med vrstami, kot tudi znotraj posameznih vrst medu, zelo variirala, kar smo tudi pričakovali. Vrednosti so se gibale od 0,0 do 115,2 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h in so bile v skladu s količinami, ki jih navaja tuja literatura. Nastanka H_2O_2 nismo zasledili v vzorcu akacijevega medu A51, kar je najverjetneje posledica naravno nizke encimske aktivnosti glukoza-oksidge, saj smo skoraj v vseh vzorcih akacijevega medu, z izjemo vzorca A50, določili zelo majhne količine nastalega H_2O_2 . Zelo majhne količine nastalega H_2O_2 smo določili še v dveh vzorcih lipovega (8,9 in 10,5 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h) in v treh vzorcih cvetličnega medu (2,4-10,6 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h). Vzorca lipovega medu (L23, L28) ne dosejata priporočenih vrednosti invertaznega števila, zato so majhne količine nastalega H_2O_2 najverjetneje posledica starosti vzorcev, saj je glukoza-oksidge podobno kot invertaza izjemno občutljiva na skladiščenje. Vzorca cvetličnega medu (C34, C39, C44) pa glede vrednosti diastaznega in invertaznega števila ustrezajo zahtevam Pravilnika (2004) in priporočenim vrednostim, zato je nastanek majhnih količin H_2O_2 najverjetneje posledica višje aktivnosti katalaze ali drugih kemijskih interakcij v cvetličnem medu.

Presenetljivo je, da smo maksimalne vrednosti med vsemi analiziranimi vzorci dokazali ravno v posameznih vzorcih akacijevega (A50), lipovega (L17, L20) in cvetličnega medu (C35, C43), torej v medovih iz nektarja. Razlog za to je najverjetneje različen izvor medicine, od katere je v veliki meri odvisna aktivnost katalaze. Vsi vzorci medu s količino nastalega H_2O_2 nad 100 $\mu g/g$ medu/h so imeli relativno visoke vrednosti diastaznega in invertaznega števila ter vrednosti razmerja IN/DN v območju od 0,80 do 0,97.

Pri statistični obdelavi rezultatov določanja količine nastalega H_2O_2 nismo opravili analize variance in Duncanovega testa, saj nam je Levenov test homogenosti variance dal vrednost statistične značilnosti (signifikance) 0,013, ki je manjša od izbrane meje tveganja 0,05. Najnižjo povprečno vrednost količine nastalega H_2O_2 smo določili v akacijevem medu (19,7 $\mu g/g$ medu/h), najvišjo pa v gozdnem (77,8 $\mu g/g$ medu/h) in hojevem medu (76,6 $\mu g/g$ medu/h). Akacijev med se glede na količino nastalega H_2O_2 , podobno kot pri diastaznem in invertaznem številu, značilno razlikuje od ostalih vrst medu. Povprečna vrednost količine nastalega H_2O_2 v akacijevem medu je vsaj dvakrat nižja od naslednje najnižje povprečne vrednosti količine nastalega H_2O_2 . Količina nastalega H_2O_2 je najbolj variirala znotraj nektarnih vrst medu, kar je najverjetneje posledica različnega izvora nektarja, od katerega je v veliki meri odvisna aktivnost katalaze. Koeficient variabilnosti kostanjevega medu je, podobno kot pri diastaznem in invertaznem številu, bližje koeficientom variabilnosti maninih vrst medu. Na podlagi tega lahko sklepamo, da so bili naši vzorci kostanjevega medu mešanica nektarja in mane.

Določili smo tudi korelacije količine nastalega H_2O_2 z diastazno in invertazno aktivnostjo. Korelacija je bila močnejša z invertazno aktivnostjo, kar je najverjetneje posledica podobne občutljivosti invertaze in glukoza-oksidge na zunanje dejavnike. Zanimivo je, da je korelacija pri kostanjevem medu v obeh primerih negativna, kar pomeni, da količina nastalega H_2O_2 z naraščajočo aktivnostjo diastaze oziroma invertaze pada. Razlog za to je najverjetneje višja aktivnost katalaze v kostanjevem medu ali morebitne kemijske interakcije med H_2O_2 in spojinami, ki so lahko prisotne v tej vrsti medu.

Zaradi prisotnosti drugih antimikrobnih snovi, velike variabilnosti količine nastalega H_2O_2 med vrstami, kot tudi znotraj posameznih vrst medu, ter njegove občutljivosti na zunanje dejavnike, količina nastalega H_2O_2 ne more biti absolutno merilo za vrednotenje antibakterijske aktivnosti medu.

Aktivnost encimov v medu predstavlja pomemben kriterij kakovosti medu, zato je White (1994) poskušal ugotoviti ali ima diastaza v medu kakšen pomen oziroma koristni vpliv tudi na zdravje ljudi. Diastazo je primerjal z amilazo, ki jo najdemo v človeški slini. Vrednosti diastazne aktivnosti, določene v človeški slini in izražene v enakih enotah, ki jih uporabljamo za določanje diastazne aktivnosti v medu, se gibljejo med 3000 in 4000. Ljudje dnevno izločimo povprečno 1200-1500 ml sline, kar znese 3,600.000 do 7,000.000 diastaznih enot. Če te vrednosti primerjamo z vrednostmi, ki smo jih določili v medu, vidimo, da je količina encima v medu za zdravje človeka zanemarljiva.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov določanja diastazne in invertazne aktivnosti ter količine nastalega H_2O_2 v slovenskem medu smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Vsi analizirani vzorci so ustrezali zahtevam Pravilnika o medu (2004), ki predpisuje najnižjo vrednost diastaznega števila 8 oziroma 3 za med z naravno nizko encimsko aktivnostjo in priporočenim vrednostim, ki jih za svež med navaja literatura.
- Vrednosti diastaznega števila so bile vrstno značilne. Najnižjo povprečno vrednost je imel akacijev med (DN = 9,5), najvišjo pa kostanjev (DN = 22,0).
- Vsi analizirani vzorci, razen dveh vzorcev lipovega medu, so dosegali priporočene vrednosti invertaznega števila, ki jih za svež med navaja literatura.
- Najnižjo povprečno vrednost invertaznega števila je imel akacijev med (IN = 6,5), najvišjo pa smrekov (DN = 20,4) in gozdni med (DN = 20,1).
- Med diastazno in invertazno aktivnostjo v vseh analiziranih vzorcih je bila močna pozitivna korelacija.
- Razmerje IN/DN je boljši pokazatelj svežosti medu od diastazne in invertazne aktivnosti tudi v primeru slovenskega medu.
- Priporočeni vrednosti razmerja IN/DN nista ustrezala dva vzorca lipovega medu, ki tudi nista dosegala priporočenih vrednosti invertaznega števila.
- Nektarne vrste medu so imele povprečne vrednosti razmerja IN/DN nižje od 1, manine pa višje od 1.
- Količina nastalega H_2O_2 je med vrstami, kot tudi znotraj posameznih vrst medu, zelo variirala in se gibala od 0,0 do 115,2 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h.
- Najnižjo povprečno vrednost količine nastalega H_2O_2 smo določili v akacijevem medu (19,7 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h), najvišjo pa v gozdnem (77,8 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h) in hojevem medu (76,6 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h).
- Korelacija med količino nastalega H_2O_2 in aktivnostjo diastaze oziroma invertaze je bila močnejša v primeru invertaze.
- Akacijev med je med z naravno nizko encimsko aktivnostjo in se je glede na diastazno in invertazno število ter količino nastalega H_2O_2 značilno razlikoval od vseh ostalih vrst medu.

6 POVZETEK

Med je naravni čebelji pridelek, ki poleg sladkorjev vsebuje še druge pomembne hranilne sestavine: dekstrine, organske kisline, beljakovine, encime, vitamine, mineralne in aromatične snovi ter barvila. Pripisujejo mu tudi zdravilni učinek zaradi antibakterijskega delovanja.

Pomembnejši encimi v medu so: diastaza, invertaza, glukoza-oksidaža, katalaza in kislina fosfataza. Izvirajo iz nektarja in mane, čebelje slinice ter izločkov krmilnih ali goltnih žlez čebel. Kljub temu, da so prisotni le v sledovih, imajo velik vpliv na naravo in značilnosti medu. V medu nastaja pod vplivom encima glukoza-oksidaže v majhnih količinah tudi vodikov peroksid, ki naj bi imel vlogo pri antibakterijskem učinku medu.

Encimi v medu so poleg hidroksimetilfurfurala pokazatelj pregretosti oziroma staranja medu. Če med segrevamo pri višji temperaturi, se encimi uničijo, pri daljšem shranjevanju pa se zmanjša njihova aktivnost. Diastaza je najbolj toplotno odporen encim v medu, zato je vrednost diastaznega števila predpisana v številnih državah.

Namen dela je bil določiti diastazno in invertazno aktivnost ter količino nastalega vodikovega peroksida v medu in preveriti ali so vrednosti vrstno značilne ter če ustrezajo predpisanim oziroma priporočenim vrednostim. Analizirali smo 84 vzorcev značilnih vrst slovenskega medu: akacijevga, lipovega, cvetličnega, kostanjevega, gozdnega, hojevega in smrekovega.

Diastazno aktivnost smo določali s spektrofotometrično metodo (Bogdanov in sod., 1997), in jo izrazili z diastaznim številom – DN, ki pomeni volumen 1 % raztopine škroba v ml, ki jo encim iz 1 g medu hidrolizira v 1 uri pri temperaturi 40 °C. Vrednosti diastaznega števila so se gibale od 5,9 do 27,4 in so bile vrstno značilne. Najnižjo povprečno vrednost smo določili v akacijevem medu (DN = 9,5), najvišjo pa v kostanjevem (DN = 22,0). Vsi analizirani vzorci so ustrezali zahtevam slovenske zakonodaje (Pravilnik o medu, 2004), ki predpisuje najnižjo vrednost diastaznega števila 8 oziroma 3 za med z naravno nizko encimsko aktivnostjo in priporočenim vrednostim, ki jih za svež med navaja literatura.

Invertazno aktivnost smo določali s spektrofotometrično metodo (Bogdanov in sod., 1997) ter jo izrazili z invertaznim številom – IN, ki pomeni maso saharoze v g, hidrolizirane v 1 h z encimi iz 100 g medu. Vrednosti invertaznega števila so se gibale od 3,3 do 26,0 in so bile vrstno značilne. Najnižjo povprečno vrednost smo določili v akacijevem medu (DN = 6,5), najvišjo pa smrekovem (DN = 20,4) in gozdnem medu (DN = 20,1). Priporočene vrednosti za svež med so dosegali vsi vzorci, razen dveh vzorcev lipovega medu, ki sta prav tako imela vrednosti razmerja IN/DN nižji od priporočene za svež med. Razmerje IN/DN naj bi bilo boljši pokazatelj svežosti medu od diastazne in invertazne aktivnosti (Aldcorn in sod., 1985; Huidobro in sod., 1995; Persano Oddo in sod., 1999).

Med diastazno in invertazno aktivnostjo v vseh analiziranih vzorcih medu smo določili značilno ($\alpha < 0,01$) pozitivno korelacijo, s koeficientom korelacije 0,801. Pozitivna korelacija pomeni, da diastazna aktivnost narašča z naraščajočo invertazno aktivnostjo in obratno, visok koeficient korelacije pa, da sta aktivnosti omenjenih encimov močno povezani. To je v skladu z našimi pričakovanji, saj se oba encima primešata medičini med zorenjem medu iz izločkov čebeljih žlez.

Količino nastalega H_2O_2 smo določali s spektrofotometrično metodo (White in Subers, 1963) ter jo izrazili kot $\mu g H_2O_2/g$ medu/h. Vrednosti so se gibale od 0,0 do 115,2 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h in so med vrstami, kot tudi znotraj posameznih vrst medu, zelo variirale. Najnižjo povprečno vrednost količine nastalega H_2O_2 je imel akacijev med (19,7 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h), najvišjo pa gozdni (77,8 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h) in hojev med (76,6 $\mu g H_2O_2/g$ medu/h). Količina nastalega H_2O_2 je bolj korelirala z invertazno aktivnostjo, kar je najverjetneje posledica podobne občutljivosti invertaze in glukoza-oksidade na zunanje dejavnike.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 195 str.
- Aldcorn D.L., Wandler E., Sporns P. 1985. Diastase (α - and β -amylase) and α -glucosidase (sucrase) activity in western Canadian honeys. *Journal of Food Science and Technology*, 18, 3: 268-270
- Alonso-Torre S.R., Cavia M.M., Fernández-Muiño M.A., Moreno G., Huidobro J.F., Sancho J.F. 2006. Evolution of acid phosphatase activity of honeys from different climates. *Food Chemistry*, 97: 750-755
- Babacan S., Pivarnik L.F., Rand A.G. 2002. Honey amylase activity and food starch degradation. *Journal of Food Science*, 67, 5: 1625-1630
- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. 2004. Food chemistry. 3rd rev. ed. Berlin, Springer – Verlag: 883-891
- Bertoncelj J., Golob T., Jamnik M., Doberšek U. 2005. Influence of heating and storage on diastase activity and HMF formation in honey. V: Proceedings of the 2nd Central European Meeting and 5th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, 17th-20th October 2004, Opatija, Croatia. Karlović D. (ed.). Zagreb, Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists Society: 287-291
- Bogdanov S. 1984. Characterisation of antibacterial substances in honey. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 17: 74-76
- Bogdanov S. 1997. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 30: 748-753
- Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C. 1997. Harmonized methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, Extra Issue, 28: 1-59
- Bogdanov S., Martin P., Lullman C., Von der Ohe W., Russmann H., Vorwohl G., Persano Oddo L., Sabatini A.-G., Marcazzan G.L., Piro R., Flamini C., Morolot M., Lheretier J., Borneck R., Marioleas P., Tsigouri A., Kerkvliet J., Ortiz A., Ivanov T., D'Arcy B., Mossel B., Vit P. 2000. Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. Posieux, Swiss Bee Research Centre: 15 str. (Marec, 2006)
<http://www.alp.admin.ch/themen/00502/00555/00564/index.html?lang=de> (Junij, 2007): 15 str.
- Bogdanov S., Rieder K., Rüegg M. 1987. Neue Qualitätskriterien bei Honiguntersuchungen. *Apidologie*, 18, 3: 267-278

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: 582-586

Božnar A., Senegačnik J. 1998. Med. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 376-414

Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. Composition criteria for honey. 2002. Official Journal of the European Communities, L 10: 47-52

Dustmann J.H. 1972. Über den Einfluß des Lichtes auf den Peroxid-Wert (Inhibin) des Honigs. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 148, 5: 263-268

Gfeller M., Bogdanov S. 2006. HMF-Gehalt, Invertase- und Diastaseaktivität von in- und ausländischen Honigen – Analyse mit logistischer Regression. ALP (Agroscope Liebefeld-Posieux) Science, 499: 16 str. (December, 2006)

http://www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_GfellerM_2006_16313.pdf

(April, 2007): 16 str.

Golob T., Plestenjak A. 1999. Quality of Slovene honey. Food Technology and Biotechnology, 37, 3: 195-201

Horn H., Böhm D. 2004. The relationship between the yield, moisture, proline and the enzyme activities invertase and diastase in honey. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 100, 3: 88-92

Huidobro J.F., Sanatana F.J., Sanchez M.P., Sancho M.T., Muniategui S., Simal-Lozano J. 1995. Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. Journal of Apicultural Research, 31, 1: 39-44

Karo P. 2004. Kakovost medu kontrolirane blagovne znamke »Slovenski med«. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 49 str.

Kerkvliet J.D. 1996. Screening method for the determination of peroxide accumulation in honey and relation with HMF content. Journal of Apicultural Research, 35, 3/4: 110-117

Kmecl V. 2006. Kakovost slovenskega medu. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 23 str.

Košmelj B., Arh F., Urbanc D., Ferligoj A., Omladič M. 2002. Statistični terminološki slovar. Razširjena izdaja z dodanim slovarjem ustreznikov v angleščini. Ljubljana, Študentska založba: 13, 53-54

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

Krauze A., Krauze J. 1991. Changes in chemical composition of stored honeydew honeys. Acta Alimentaria Polonica, 17, 2: 119-125

Matissek R., Schnepel F.M., Steiner G. 1992. *Lebensmittelanalytik*. 2., korr. Aufl. Berlin, Springer – Verlag: 228-232

Molan P.C. 1996. Authenticity of honey. V: *Food authentication*. Ashurst P.R., Dennis M.J. (eds.). London, Chapman & Hall: 259-296

Persano Oddo L., Piazza M.G., Pulcini P. 1999. Invertase activity in honey. *Apidologie* 30: 57-65

Plestenjak A. 1999. Fizikalno-kemijske lastnosti medu, zakonodaja, vzorčenje. V: *Pridelava in kontrola medu v okviru kolektivne blagovne znamke za slovenski med*. Golob T. (ur.). Ljubljana, Čebelarska zveza Slovenije in Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21-31

Pravilnik o medu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 31: 3611-3614

Sanchez M.P., Huidobro J.F., Mato I., Muniategui S., Sancho M.T. 2001. Evolution of invertase activity in honey over two years. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 416-422

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

Serra Bonvehí J., Soliva Torrentó M., Muntané Raich J. 2000. Invertase activity in fresh and processed honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 507-512

Serrano S., Espejo R., Villarejo M., Jordal M.L. 2007. Diastase and invertase activities in Andalusian honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 76-79

Vit P., Pulcini P. 1996. Diastase and invertase activities in Meliponini and Trigonini honeys from Venezuela. *Journal of Apicultural Research*, 35, 2: 57-62

Vorlová L., Přidal A. 2002. Invertase and diastase activity in honeys of Czech Provenience. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, L, 5: 57-66

Vrečar N. 2003. Vpliv segrevanja na diastazno aktivnost in vsebnost HMF v različnih vrstah medu. *Diplomsko delo*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 56 str.

Webb E. C. 1992. *Enzyme nomenclature: 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. San Diego, Academic Press: 862 str.

Weston R.J. 2000. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey. *Food Chemistry*, 71: 235-239

White J.W. 1994. The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. *Bee World*, 75, 3: 104-117

White J.W.Jr., Subers M.H., Schepartz A.I. 1962. The identification of inhibine. *American Bee Journal*, 102: 430-431

White J.W.Jr., Subers M.H., Schepartz A.I. 1963. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 73: 57-70

White J.W.Jr., Subers M.H. 1963. Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay. *Journal of Apicultural Research*, 2, 2: 93-100

White J.W.Jr., Subers M.H. 1964a. Studies on honey inhibine. 3. Effect of heat. *Journal of Apicultural Research*, 3, 1: 45-50

White J.W.Jr., Subers M.H. 1964b. Studies on honey inhibine. 4. Destruction of the peroxide accumulation system by light. *Journal of Food Science*, 29: 819-828

Yilmaz H., Küfrevioğlu I. 2001. Composition of honeys collected from eastern and south-eastern Anatolia and effect of storage on hydroxymethylfurfural content and diastase activity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25: 347-349

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Tereziji Golob se zahvaljujem za strokovno pomoč in vodenje ter za vse vzpodbudne besede, ki sem jih bila deležna med nastajanjem diplomske naloge. Hvala tudi recenzentki prof. dr. Veroniki Abram za prijaznost in ves trud, ki ga je vložila pri strokovnem pregledu naloge.

Posebna zahvala gre delovni mentorici Jasni Bertoncelj za potrpežljivo vodenje med praktičnim delom in za vse koristne nasvete pri pisanju diplomske naloge. Hvala tudi tehnični sodelavki Eleni Kenda-Majerič za dobro voljo, veliko smeha in podporo pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se tudi knjižničarkama Ivici Hočevnar in Barbari Slemenik za pomoč pri iskanju in urejanju literature.

Prav posebna zahvala pa gre moji družini in prijateljem, ki mi vedno stojijo ob strani. Hvala za vse vzpodbude, razumevanje in potrpežljivost.

PRILOGE

Priloga A. Invertazna aktivnost v analiziranih vzorcih glede na posamezno vrsto medu, podana kot število μmol razgrajenega substrata/kg medu/min

AKACIJEV MED		LIPOV MED		CVETLIČNI MED		KOSTANJEV MED	
vzorec	IA ($\mu\text{mol/kg}$ /min)	vzorec	IA ($\mu\text{mol/kg}$ /min)	vzorec	IA ($\mu\text{mol/kg}$ /min)	vzorec	IA ($\mu\text{mol/kg}$ /min)
A33	24,4	L16	63,9	C32	158,7	K27	181,2
A35	34,6	L17	149,3	C33	66,0	K28	94,0
A36	54,2	L18	80,9	C34	89,6	K29	122,1
A38	59,4	L19	90,9	C35	95,6	K30	156,8
A45	30,5	L20	125,0	C36	66,8	K31	128,3
A46	52,5	L21	119,5	C37	80,1	K32	185,1
A47	32,0	L22	78,7	C38	79,0	K33	109,1
A48	31,3	L23	33,4	C39	54,3	K34	126,6
A49	36,7	L24	24,0	C40	66,9	K35	151,8
A50	97,3	L25	118,7	C41	158,0	K36	108,3
A51	53,5	L26	79,7	C42	139,0	K37	107,7
A52	58,6	L27	72,5	C43	146,0	K38	117,1
A53	43,7	L28	47,4	C44	113,5	K39	88,9
A54	61,7	L29	77,2			K40	153,2

GOZDNI MED		HOJEV MED		SMREKOV MED	
vzorec	IA ($\mu\text{mol/kg}$ /min)	vzorec	IA ($\mu\text{mol/kg}$ /min)	vzorec	IA ($\mu\text{mol/kg}$ /min)
G31	175,4	H17	120,5	S27	170,2
G32	145,3	H18	147,5	S28	104,0
G33	138,2	H19	137,0	S29	185,4
G34	118,7	H20	141,9	S30	134,7
G35	128,0	H21	127,3	S31	153,9
G36	109,1	H22	149,0		
G38	154,1	H23	125,7		
G39	191,2	H24	125,0		
G40	155,1	H25	107,7		
G41	158,7	H26	150,6		
		H27	105,9		
		H28	122,4		
		H29	135,3		
		H30	135,6		