

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Špela SUSMAN

**PRIMERJAVA PARAMETROV KAKOVOSTI
PRISTNEGA IN POTVORJENEGA MEDU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Špela SUSMAN

**PRIMERJAVA PARAMETROV KAKOVOSTI PRISTNEGA IN
POTVORJENEGA MEDU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF QUALITY PARAMETERS TO DISCRIMINATE
PURE AND ADULTERATED HONEYS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Terezijo Golob, za somentorja dr. Tomaža Polaka in za recenzentko doc. dr. Natašo Šegatin.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Somentor: dr. Tomaž Polak

Reczentka: doc. dr. Nataša Šegatin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Špela Susman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 638.162+664.162.7:543.2/.9 (043) = 163.6
KG med/potvorjen med/glukozni sirup/glukozno-fruktozni sirup/invertni sirup/
vsebnost vode/električna prevodnost/vrednost pH/proste kisline/skupne kisline/
laktoni/specifični kot zasuka/aktivnost diastaze/vsebnost hidroksimetilfurfurala/
HMF
AV SUSMAN, Špela
SA GOLOB, Terezija (mentorica)/POLAK, Tomaž (somentor)/ŠEGATIN, Nataša
(recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2011
IN PRIMERJAVA PARAMETROV KAKOVOSTI PRISTNEGA IN
POTVORJENEGA MEDU
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XI, 65 str., 10 pregl., 17 sl., 7 pril., 78 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V diplomskem delu smo ugotavljali razlike med parametri kakovosti pristnega in namerno potvorjenega medu. Izhodiščna vzorca sta bila cvetlični in gozdni med, ki smo jima dodali različne deleže glukozonega, glukozone-fruktozonega in invertnege sirupa. Vzorcem smo določili vsebnost vode z refraktometrom, vsebnost hidroksimetilfurfurala (HMF) s HPLC, električno prevodnost s konduktometrom, diastazno število (DŠ) z metodo po Schadeju, specifični kot zasuka s polarimetrom, vsebnost prostih in skupnih kislin ter laktonov s titracijsko metodo in vrednost pH. Dobljene rezultate smo statistično obdelali ter primerjali med seboj in z vrednostmi v Pravilniku o medu (2004). Vsi vzorci so ustrezali predpisom pravilnika. Z večanjem deleža glukozone-fruktozonega in invertnege sirupa se je večala vsebnost vode v vzorcih. Pri glukozone in glukozone-fruktozone sirupu se je vrednost pH med osnovnim medom in vzorcem z 20 % dodanega sirupa znižala, pri invertnege sirupu pa povišala. Na specifični kot zasuka vzorcev je najbolj vplival dodatek glukozonega sirupa. Z večanjem deleža sirupa v vzorcih se je diastazno število nižalo. Dodajanje sirupa je vplivalo na vsebnost HMF, vendar je bil ta vpliv zelo majhen. Vsebnosti skupnih in prostih kislin, HMF in DŠ so bile v močni povezavi (α 0,01) z deležem dodanega sirupa. Medtem ko je bila vrsta medu v močni povezavi z električno prevodnostjo, vsebnostjo skupnih in prostih kislin, z diastaznim številom in vsebnostjo HMF, pa vrsta dodanega sirupa ni bila v nobeni povezavi z izmerjenimi fizikalnokemijskimi parametri.

KEY WORDS INFORMATION

- DN Dn
- DC UDC 638.162+664.162.7:543.2/.9 (043) = 163.6
- CX honeys/adulterated honeys/glucose syrups/glucose-fructose syrups/invert syrups/water content/electrical conductivity/pH value/free acids/total acids/lactones/specific rotation/diastase number/ hydroxymethylfurfural content/HMF
- AU SUSMAN, Špela
- AA GOLOB, Terezija (supervisor)/POLAK, Tomaž (co-advisor)/ŠEGATIN, Nataša (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2011
- TI COMPARISON OF QUALITY PARAMETERS TO DISCRIMINATE PURE AND ADULTERATED HONEYS
- DT Graduation thesis (university studies)
- NO XI, 65 p., 10 tab., 17 fig., 7 ann., 78 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The graduation thesis deals with the comparison of quality parameters between pure and adulterated honey. Parameters were determined in floral and forest honeys which were adulterated using different shares of glucose, glucose-fructose and invert syrups. In samples were determined: water content with refractometer, pH value with pH metre, hydroxymethylfurfural (HMF) with HPLC, electrical conductivity with conductometer, diastase number by the Schade method, and specific rotation with polarimetric method. The titration method was used to measure the amount of total and free acids as well as the amount of lactones. The results were then statistically evaluated and compared with the regulatory values stated in Slovenian legislation, i. e. *Pravilnik o medu* from 2004, and with each other respectively. The comparison of results with the regulatory values showed that all samples met the standards and regulations. The water content increased together with increasing the shares of glucose-fructose and invert syrup. pH value between basic samples and samples containing 20% syrup were reduced in glucose and glucose-fructose syrup, whereas they increased by adding invert syrup. The specific angle of the rotation was influenced by glucose syrup mostly. When increasing the shares of the syrup, the diastase numbers decreased. The addition of the syrup had an influence on HMF, but it should be pointed out that the influence was very small. The positive correlation between the shares of the added syrup and the amounts of total and free acids, as well as the diastase number and HMF were determined. There is no significant correlation between various kinds of syrup added to honey and the measured physicochemical parameters. Type of honey is in strong correlation with the amount of total and free acids, with diastase number, HMF content and electrical conductivity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS INFORMATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NASTANEK MEDU	3
2.2 SESTAVA MEDU	4
2.2.1 Voda	4
2.2.2 Ogljikovi hidrati	5
2.2.3 Encimi	6
2.2.4 Kisline	7
2.2.5 Proteini in aminokisline	8
2.2.6 Minerali, elementi v sledih in vitamini.....	8
2.2.7 Hidroksimetilfurfural.....	9
2.3 FIZIKALNE LASTNOSTI MEDU	10
2.3.1 Gostota.....	10
2.3.2 Viskoznost	10
2.3.3 Higroskopičnost	10
2.3.4 Električna prevodnost	10
2.3.5 Barva.....	10
2.3.6 Kristalizacija	11
2.3.7 Optične lastnosti	11
2.4 PRAVILNIK O MEDU.....	12
2.5 SLADKORNI SIRUPI.....	12
2.5.1 Glukozno-fruktozni sirup	12
2.5.2 Glukozni sirup	13
2.5.3 Invertni sirup	14
2.6 POTVORBE MEDU.....	15
2.7 OPIS FIZIKALNOKEMIJSKIH METOD	16
2.7.1 Merjenje pH	16
2.7.2 Refraktometrija	17
2.7.3 Električna prevodnost	18
2.7.4 Merjenje optične rotacije.....	19
2.7.5 Spektrometrija	20

2.7.6 HPLC	22
3 MATERIALI IN METODE	24
3.1 VZOREC	24
3.2 FIZIKALNOKEMIJSKE METODE	25
3.2.1 Določanje vsebnosti vode v medu z ročnim refraktometrom (AOAC 969.38, 1999)	26
3.2.2 Določanje električne prevodnosti z laboratorijskim konduktometrom (Kropf in sod., 2008)	26
3.2.3 Določanje vrednosti pH, vsebnosti prostih in skupnih kislin ter laktonov (AOAC 962.19, 1999)	27
3.2.4 Merjenje specifičnega kota zasuka medu s polarimetrom (Junk in Pancoast, 1973)	29
3.2.5 Določanje aktivnosti encima diastaza z metodo po Schadeju (Bogdanov, 2009)	30
3.2.6 Določanje vsebnosti hidroksimetilfurfurala (HMF) z metodo HPLC (Bogdanov, 2009)	31
3.3 STATISTIČNA ANALIZA	33
3.3.1 Enovzorčna analiza	33
3.3.1.1 Aritmetična sredina ali povprečje	33
3.3.1.2 Varianca in standardni odklon	34
3.3.1.3 Koeficient variabilnosti	34
3.3.1.4 Mediana	34
3.3.2 Dvovzorčna analiza	35
3.3.2.1 Koeficient korelacije po Pearsonu	35
3.3.2.2 Koeficient determinacije	36
3.3.3 Večvzorčna analiza ene spremenljivke	36
3.3.3.1 Parametrični in neparametrični testi	36
3.3.3.2 Levenov test homogenosti variance	36
3.3.3.3. ANOVA – Analiza variance	37
3.3.3.4 Duncanov test	37
3.3.3.5 Studentov t-test	38
3.3.3.6 Kruskal-Wallisov test	38
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	39
4.1 REZULTATI VSEBNOSTI VODE V ANALIZIRANIH VZORCIH	39
4.2 REZULTATI MERJENJA ELEKTRIČNE PREVODNOSTI.....	41
4.3 REZULTATI MERJENJA VREDNOSTI pH.....	42
4.5 MERJENJE SPECIFIČNEGA KOTA ZASUKA	46
4.6 DOLOČANJE DIASTAZNEGA ŠTEVILA	47
4.7 DOLOČANJE VSEBNOSTI HIDROKSIMETILFURFURALA	48
4.8 REZULTATI STATISTIČNE OBDELAVE	50
4.8.1 Primerjava vpliva deleža sirupa v vzorcih	50
4.8.2 Primerjava glede na vrsto dodanih sirupov	54
4.8.3 Primerjava glede na vrsto medu	54
5.2 SKLEPI	56
6 POVZETEK	58

7 VIRI	60
ZAHVALE	
PRILOGE.....	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kriteriji sestave medu (Pravilnik o medu, 2004).....	12
Preglednica 2: Vrste in deleži dodanih sirupov ter oznake vzorcev medu.....	24
Preglednica 3: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti spremenljivk (Seljak, 1996).....	35
Preglednica 4: Rezultati fizikalnokemijskih analiz v osnovnih vzorcih medu in sladkornih sirupih.....	39
Preglednica 5: Osnovni statistični parametri za diastazno število osnovnega vzorca cvetličnega medu.....	47
Preglednica 6: Rezultati Duncanovega testa za vsebnost skupnih kislin v vzorcih medu z različnimi deleži sirupa.....	51
Preglednica 7: Rezultati Duncanovega testa za diastazno število v vzorcih medu z različnimi deleži sirupa.....	51
Preglednica 8: Rezultati bivariatne analize primerjave vpliva deleža sirupa v vzorcih potvorjenega medu.....	53
Preglednica 9: Rezultati bivariatne analize glede na vrsto dodanih sirupov vzorcema medu.....	54
Preglednica 10: Rezultati bivariatne analize glede na vrsto medu.....	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Cvetlični in gozdni med	3
Slika 2: Refraktometer	5
Slika 3: Spektrofotometer	7
Slika 4: Aparatura za merjenje vsebnosti skupnih in prostih kislin	8
Slika 5: Glukozno-fruktozni sirup	12
Slika 6: Glukozni sirup	13
Slika 7: Invertni sirup	14
Slika 8: Aparatura za merjenje električne prevodnosti	19
Slika 9: Polarimeter	20
Slika 10: Vsebnost vode v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa	40
Slika 11: Električna prevodnost v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa	41
Slika 12: Vrednost pH v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa	43
Slika 13: Skupne kisline v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa	44
Slika 14: Proste kisline v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa	45
Slika 15: Specifični kot zasuka v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa	46
Slika 16: Diastazno število v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa	48
Slika 17: HMFv vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa.....	49

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Vsebnost vode, električna prevodnost in vrednost pH v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu potvorjenih z glukozno-fruktoznim, invertnim in glukoznim sirupom.

PRILOGA B: Vsebnost skupnih in prostih kislin ter laktonov v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu potvorjenih z glukozno-fruktoznim, invertnim in glukoznim sirupom.

PRILOGA C: Vsebnosti laktonov cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa.

PRILOGA D: Specifični kot zasuka, diastazno število in vsebnost hidroksimetilfurfurala v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa.

PRILOGA E: Neparometrični test (Kruskal-Wallisov test) za različne deleže sirupov v vzorcih medu.

PRILOGA F: Neparometrični test (Kruskal-Wallisov test) za različne vrste sirupov v vzorcih medu.

PRILOGA G: Neparometrični test (Kruskal-Wallisov test) za različne vrste medu.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANOVA	analiza variance (ang. Analysis of variance)
C	cvetlični med
c	koncentracija raztopine, izražena v mol/l
c_{xy}	kovarianca
DŠ	diastazno število
G	gozdni med
GF	glukozno-fruktozni sirup
GL	glukozni sirup
HMF	hidroksimetilfurfural
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. High Pressure Liquid Chromatography)
IN	invertni sirup
IR	infrardeča svetloba
KV	koeficient variance
Me	mediana
meq/kg	miliekvivalent na kilogram
mS/cm	mili Siemens na centimeter
r	Pearsonov koeficient korelacije
r^2	koeficient determinacije
s^2	varianca
SD	standardna deviacija
Sig.	signifikanca, statistična značilnost
UV	ultravijolična svetloba
α	stopnja tveganja
\bar{x}	povprečna vrednost
x_{\max}	maksimalna vrednost
x_{\min}	minimalna vrednost
(+)	desnosučna spojina
(-)	levosučna spojina
°	kotna stopinja
$[\alpha]_D^{20}$	specifični kot zasuka linearno polarizirane svetlobe pri valovni dolžini natrijeve D linije in pri 20 °C vodne raztopine (°cm ³ /gdm)

1 UVOD

Med je naravna sladka snov, ki ga izdelajo čebele *Apis mellifera*, iz nektarja cvetov, izločkov iz živih delov rastlin ali izločkov na živih delih rastlin, ki jih čebele zberejo, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, ga shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju (Pravilnik o medu, 2004).

Med sestavlja najmanj 181 različnih komponent (Sato in Miyata, 2000). Največji del predstavljajo sladkorji (70-80 %) in voda (10-20 %). V medu najdemo še organske kisline, minerale (soli), proteine, proste aminokisline, med katerimi prevladuje prolin, vitamine in fenolne spojine (Nagai in sod., 2002; Terrab in sod., 2001). Med sladkorji je največ fruktoze in glukoze, poleg teh pa tudi saharoza, maltoza, melecitoza (izvira iz mane) in nekateri drugi. Količina vode v medu ne sme presegati 20 % (Pravilnik o medu, 2004). Zrel med v naših klimatskih pogojih navadno ne dosega te vrednosti. Med vsebuje različne organske kisline, kot so glukonska, jabolčna, jantarna, očetna, mravljična, maslena, mlečna in oksalna. Od anorganskih kislin vsebuje fosforno kislino. Mineralne snovi v medu so soli kalija, natrija, magnezija, kalcija, železa in druge. Hidroksimetilfurfurala v svežem medu praktično ni, njegova vsebnost se povečuje tekom skladiščenja, močno pa se poveča ob segrevanju medu (Plestenjak, 1999).

Med mora biti, kolikor je mogoče, brez organskih ali anorganskih tujih primesi. Med ne sme imeti tujega okusa ali vonja, ne sme fermentirati, njegova stopnja kislosti ne sme biti umetno spremenjena in ne sme biti pregret tako, da so naravni encimi, bodisi uničeni, bodisi je znatno zmanjšana njihova aktivnost. Med, ki se daje v promet kot med ali je namenjen za uporabo v kateremkoli živilu, kot prehrano za ljudi, ne sme vsebovati nobenih dodanih sestavin, vključno z aditivi za živila, niti nobenih drugih dodatkov (Pravilnik o medu, 2004). Kljub pravilniku pa se na našem tržišču pojavlja vedno več potvorjenega medu. Med je največkrat potvorjen tako, da so mu dodani razni sladkorni sirupi. Sladkorni sirupi so naravnega izvora in zato jih je v medu težko odkriti.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti ali se naravni in namerno potvorjen med razlikujeta v parametrih kakovosti. Izhodiščna vzorca sta bila nektarni in manin med, ki smo jima dodali različne deleže sladkornih sirupov. Ti sirupi so bili glukozni, glukozno-fruktozni in invertni sirup. Vzorcem smo določili vsebnost vode, vsebnost hidroksimetilfurfurala (HMF), električno prevodnost, aktivnost diastaze, specifični kot zasuka, vsebnost prostih in skupnih kislin ter laktonov in vrednost pH. Dobljene rezultate smo statistično obdelali in med seboj primerjali. Primerjali smo jih tudi z vrednostmi v Pravilniku o medu (2004).

Pričakovali smo, da bodo med analiziranimi vzorci pristnega in potvorjenega medu obstajale statistično značilne razlike v vsaj nekaterih analiziranih parametrih. Želeli smo določiti zvezo med vrednostmi analiziranih parametrov in deležem dodanega sladkornega sirupa v medu. Glede na ugotovljene razlike smo poskušali izbrati najbolj občutljive metode za ugotavljanje pristnosti medu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NASTANEK MEDU

Surovini za med sta nektar in mana (Slika 1). Nektar izvira iz cvetov ali drugih izločkov živih rastlinskih delov, mana pa je izloček žuželk, ki živijo na različnih delih rastlin (Meglič, 2004).

Izločanje nektarja je odvisno od vrste rastline, tal in vremenskih razmer. Izvor nektarja je mogoče določiti z analizo cvetnega prahu. Vsaka vrsta nektarja ima tudi značilno vsebnost sladkorjev, ki predstavljajo poleg vode najpomembnejši del nektarja. Najpomembnejši sladkorji v nektarju so fruktoza, glukoza in saharoza, v različnih medsebojnih razmerjih (Meglič, 2004). Od sladkorjev so v majhnih količinah prisotni še galaktoza, riboza, maltoza, manoza, melecitoza in rafinoza (Božnar, 2003). V nektarju najdemo tudi aminokisliline, mineralne snovi, organske kisline, vitamine, eterična olja, barvila in zrnca cvetnega prahu (Božnar, 2003; Meglič, 2004). Gostota nektarja je od 1,02 do 1,35 g/L, vrednost pH je največkrat med 2,7 in 6,4, zelo redko pa je pH v alkalnem območju med 7,2 in 9 (Božnar, 2003).

Mano izločajo listne uši, kaparji in škržati, ki srkajo rastlinske sokove. Iz njih porabijo del sladkorjev, ostalo pa bolj ali manj predelano izločijo v obliki kapljic – mane. Sveža mana je bistra in ima povprečno vsebnost suhe snovi od 5 do 18 %, njena gostota je med 1 in 1,3 g/L, vrednost pH pa je med 5,1 in 7,9 (Božnar, 2003). Najpomembnejša sestavina mane so različni sladkorji, med katerimi je največ disaharidov (Meglič, 2004). V mani so tudi aminokisliline, organske kisline, encimi in vitamini. V primerjavi z nektarjem vsebuje mana veliko več mineralnih snovi, zlasti kalija, magnezija in fosforja (Božnar, 2003). Čebele nabirajo mano ob toplem, vlažnem vremenu. Navadno najraje dopoldne in proti večeru, ker se mana zaradi višjih dnevnihih temperatur čez dan preveč izsuši (Meglič, 2004).



Slika 1: Cvetlični in gozdni med

Za pridelavo medu je pomembna predvsem vrsta medonosnih čebel *Apis mellifera*. Le-te živijo v visoko razvitih socialnih skupnostih z 20.000 do 80.000 člani. Med njimi je ena matica, nekaj sto trotov, ostalo pa predstavljajo nereproduktivne čebele delavke (Stark, 1998). Slednje, ko se vrnejo s paše, v svojem mednem mešičku prinesejo približno 50 mg nektarja ali mane. Svojo bero razdelijo panjskim čebelam. Ker je prinešena medicina zelo vodena, jo čebele s posebnimi gibi iztisnejo iz medne golše na konec svojega rilčka. Tako

se sladki sok nekaj sekund suši na suhem in toplém zraku, nato pa ga vrnejo v medno golšo. Ta postopek večkrat ponovijo (Božnar in Senegačnik, 1998; Doner, 2003). Medtem pa čebele medičini dodajajo tudi encime, ki povzročijo pretvorbo sladkorjev, predvsem saharoze in drugih ogljikovih hidratov v glukozo, fruktozo in druge enostavne sladkorje (Meglič, 2004). Ko je medičina že precej zgoščena, čebele napolnijo satne celice in jih zaprejo z voščnimi pokrovčki in s tem preprečijo vezavo vode na med. Temu sledi zorenje, katerega osnova je izhlapevanje vode. Istočasno pa poteka tudi biokemično zorenje, ki je posledica delovanja encimov na strukturo sladkorjev (Božnar in Senegačnik, 1998). Praviloma točimo med šele takrat, ko doseže vsebnost vode 18,6 % ali manj (Meglič, 2004).

2.2 SESTAVA MEDU

Naravni čebelji med vsebuje različne sladkorje, vodo, organske kisline, proteine, hidrosimetilfurfural, aminokisline, mineralne snovi, encime, lipide, barvila, voske, pelod, v vodi topne vitamine, flavonoide, fenolne komponente, terpene in aromatične snovi (Plestenjak, 1999; Božnar, 2003; Cordella in sod., 2003; Doner, 2003; Anklam, 1998; White, 1978). Kakovost in sestava medu sta odvisni od izvora nektarja ali mane, od zrelosti, klimatskih pogojev in pogojev predelave ter shranjevanja (White, 1978).

2.2.1 Voda

Vsebnost vode sicer ni odvisna od botaničnega in geografskega porekla, je pa merilo, ki značilno vpliva na senzorično kakovost in fizikalnokemijske parametre medu (Golob in sod., 2008). Vsebnost vode je odvisna od naravnih pogojev paše, vsebnosti vode v nektarju in zorenja medu. Normalno zoren med ima vsebnost vode pod 18,6 %, saj večja vsebnost omogoča fermentacijo medu (Doner, 2003). V vsakem medu so namreč prisotne ozmofilne kvasovke, ki lahko živijo v močno koncentriranih sladkornih raztopinah in pretvarjajo sladkorje v alkohol, kasneje pa lahko nastane očetna kislina in ogljikov dioksid (Plestenjak, 1999). Majhna vsebnost vode lahko privede do kristalizacije glukoze v medu, kar povzroči granulacijo medu (Doner, 2003).

Vsebnost vode v medu se lahko spreminja tudi zaradi pogojev shranjevanja. Prostor za skladiščenje mora biti suh, temperatura prostora pa naj bi bila pod 11 °C (Plestenjak, 1999).

Poznavanje vsebnosti vode je pomembno pri določanju električne prevodnosti in izračunu specifične rotacije medu (Bogdanov in sod., 1997). Poznamo več načinov določanja količine vode v medu. Med njimi so najpogostejši: direktno sušenje vzorca, merjenje viskoznosti, Karl-Fischer titracijska metoda in merjenje z refraktometrom (Slika 2). Najpogosteje se uporablja slednja metoda (Doner, 2003).



Slika 2: Refraktometer

2.2.2 Ogljikovi hidrati

Kar se tiče ogljikohidratne sestave, je med eno najbolj kompleksno sestavljenih naravnih živil. Več kot 85 % suhe snovi v medu sestoji iz monosaharidov fruktoze in glukoze. Naslednjih 10 % pa predstavlja najmanj 25 drugih, bolj kompleksnih sladkorjev. Te delimo na disaharide, trisaharide in višje saharide. Med disaharide spadajo saharoza, maltoza, maltuloza, izomaltoza, nigerozna, turanoza, kojibioza, laminaribioza, α - in β -trehaloza, gentibioza, palaminioza in celibioza. Med trisaharide pa uvrščamo: melecitozo, maltotriozo, izomaltotriozo, 3- α -izomaltosil glukoza, 1-kestozo, panozo, izopanozo, erlozo, teanderozo, centozo, laminaritriozo. Višja saharida sta izomaltotrehaloza in izomaltopentanoza. Nekateri med njimi so v medu v zelo majhnih količinah in so posledica raznih povezav med glukoza in fruktozo (Doner, 1977; Doner, 2003).

Med vsebuje od 33 do 42 % fruktoze, od 27 do 36 % glukoze in od 1 do 4 % saharoze. Vse tri vrste sladkorjev so v naravi zelo razširjene. Njihovo razmerje v medu je delno odvisno od vrste medu, delno pa tudi od učinkovitosti encima invertaze, ki saharozo cepi v količinsko izenačeno mešanico fruktoze in glukoze (Božnar in Senegačnik, 1998).

Ogljikovi hidrati so v medu odgovorni za fizikalnokemijske lastnosti, kot so viskoznost, kristalizacija in higroskopsnost (Cavia in sod., 2002). Vsebnost in razmerje med različnimi sladkorji v medu sta odvisna od botaničnega izvora, encimov, sestave in intenzivnosti izločanja nektarja, podnebnih razmer, vrste, fiziološkega stanja čebel in od moči čebelje družine (Cotte in sod., 2004; Esti in sod., 1997; Nanda in sod., 2003).

Mešanica glukoze in fruktoze se imenuje invertni ali reducirajoči sladkor. Fruktoza ali D (-) fruktoza je zelo higroskopična, dobro topna v vodi, zelo počasi kristalizira in suče ravnino polarizirane svetlobe v levo. Glukoza ali D (+) glukoza je v vodi slabše topna, njena stabilna kristalna oblika α -D glukoza monohidrat pa kristalizira pri temperaturah, nižjih od 50 °C. Glukoza suče ravnino polarizirane svetlobe v desno (Aurand in sod., 1987; Božnar in Senegačnik, 1998; Johnson, 1993; Scott, 1993).

Za karakterizacijo sladkorjev v medu se uporablja več metod. Kalorimetrične metode se uporabljajo za določanje stopnje reducirajočih in nereducirajočih sladkorjev, vendar jih ne

moremo uporabljati za dokazovanje vseh sladkorjev. Prav tako so tudi encimske metode uporabne le za dokazovanje določenih sladkorjev, kot je npr. glukoza, ki jo določamo glukoza-oksidadze. Za enkrat so za določanje večjega števila različnih sladkorjev uporabljajo predvsem različne kromatografije, kot sta plinska in ionsko izmenjevalna ter infrardeča spektroskopija ali nuklearna magnetna resonanca (Doner, 2003).

2.2.3 Encimi

V medu so določili naslednje encime: α -glukozidazo, β -glukozidazo, glukoza-oksidadzo, katalazo, kislno fosfatazo, α -amilazo in β -amilazo. Encimi pridejo v med predvsem med procesom dozorevanja, ko jih v med dodajajo čebele s svojimi žlezami ali slino. Nekaj encimov izhaja tudi iz rastlin (Doner, 2003).

Verjetno najbolj značilen encim v medu je α -glukozidaza, saj je odgovorna za veliko sprememb, ki potekajo med predelavo nektarja. V literaturi se velikokrat pojavlja tudi pod imenom invertaza ali saharaza. Encim je odgovoren za inverzijo disaharida saharoze v nektarju v monosaharida glukoza in fruktoza. Ta proces je zelo pomemben, saj saharoza lažje kristalizira, prav tako pa dobimo razmerje med glukoza in fruktoza, ki je značilno za med. α -glukozidaza sodeluje tudi pri nastanku drugih sladkorjev, prisotnih v medu, kot so maltoza, izomaltoza, α - in β -trehaloza (Doner, 2003).

Če β -glukozidazo inkubiramo skupaj z glukoza, fruktoza in saharoza, dobimo druge sladkorje kot z α -glukozidazo. Ti sladkorji so disaharidi glukoza-glukoza, laminaribioza in entiobioza (Doner, 2003).

Glukoza-oksidadza je pomembna predvsem zaradi antibakterijskega delovanja, saj glukoza pretvarja v vodikov peroksid. Poleg slednjega pa, s pomočjo encima, nastaja tudi glukonska kislina, ki je v večini odgovorna za kisel pH medu. Kar skupaj z nizko vodno aktivnostjo in visokim deležem suhe snovi pripomore k stabilnosti medu in ga varuje pred fermentacijo (Doner, 2003).

Encima katalaza in kislna fosfataza v medu nista veliko raziskana. Katalaza je odgovorna za pretvorbo vodikovega peroksida v vodo in kisik. S tem naj bi uravnavala količino vodikovega peroksida v medu. Kislinska fosfataza je odgovorna za nastanek fosforne kisline, glicerola in β -glicerolfosfata. Izvor tega encima še ni povsem pojasnjen. Po nekaterih raziskavah naj bi bil prisoten le v tistih vrstah medu, ki fermentira, torej naj bi izhajal iz kvasovk. Po drugih raziskavah pa so njegov vir rastline, saj so ga našli tudi v pelodu in nektarju (Doner, 2003).

Diastaza je dodana nektarju v procesu njegovega spreminjanja in je sestavljena iz α - in β -amilaze, vendar njuna vloga v medu še ni povsem poznana. Njuna naloga je razcep glikozidnih vezi v škrobu, ta pa v medu ni prisoten. Aktivnost diastaze v medu se v procesu gretja zmanjšuje. Ker lahko aktivnost diastaze merimo na dokaj preprost način, se ta analiza uporablja v procesu ugotavljanja pregrelosti medu. Vendar delo otežuje dejstvo, da se količina diastaze lahko močno zmanjšuje tudi med skladiščenjem (Doner, 2003).

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 od starosti čebel. Aktivnost diastaze je povezana tudi s pH-jem medu. 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 (Aldocorn in sod., 1985; Babacan in sod., 2002; Vit in Pulcini, 1996).

Aktivnost diastaze določamo spektrofotometrično (Slika 3) in jo 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 (Gfeller in Bogdanov, 2006; Persano Oddo in sod., 1999).



Slika 3: Spektrofotometer

2.2.4 Kisline

Med ima vrednost pH med 3,5 in 4,5 (Božnar, 2003). Kljub kislemu pH-ju pa se kislosti ne občuti zaradi velike vsebnosti sladkorjev. V medu je približno do 0,5 % organskih kislin, med katerimi prevladuje glukonska kislina. Izvor kislin so čebele, sokovi v naravi ali pa nastanejo kot vmesni členi bioloških procesov. Glukonska kislina nastane v medu iz glukoze s pomočjo encima glukoza-oksிடaze. V medu se nahajajo še naslednje kisline: mravljična, očetna, maslena, mlečna, jabolčna, jantarna, citronska, vinska, oksalna, fumarna in nekatere anorganske kisline, med katerimi prevladuje fosforna kislina (Doner, 2003; Golob in sod. 2008).

Celokupna koncentracija kislin v medu ni odvisna od vrste medu, ampak predvsem od pogojev njegovega nastanka. Šele z identifikacijo glukonske kisline so bile pojasnjene mnoge težave pri določanju celokupne koncentracije kislin v medu. D-glukonska kislina namreč obstaja v ravnotežju z D-glukono- α -laktonom. Laktoni nastajajo v procesu zorenja medu, kar kaže na prisotnost aktivnega encima glukoza-oksிடaze. Proste kisline se sprostijo ob titraciji z NaOH, vsebnost laktonov pa je presežek kislosti, ko med postane alkalen in se sprostijo ob titraciji s HCl (Slika 4) (Božnar in Senegačnik, 1998).



Slika 4: Aparatura za merjenje vsebnosti skupnih in prostih kislin ter laktonov

Kislone prispevajo k značilni aromi in okusu, pomembne pa so tudi zaradi antibakterijskega in antioksidativnega delovanja. Iz kislosti medu lahko z določeno zanesljivostjo sklepamo o njegovi pristnosti. Če je bil ponarejen z neinvertirano saharozo, bo manj kisel kot ponavadi, če pa mu je bil dodan industrijsko invertiran sladkor, bo precej bolj kisel, saj lahko pri razpadu saharoze nastajata tudi mravljična kislina in nekatere druge kisline (Božnar, 2003; Golob in sod., 2008).

2.2.5 Proteini in aminokislina

Vsebnost proteinov in aminokislin v medu podajamo z vsebnostjo dušika, ki pa je majhna in v povprečju znaša 0,04 %. Vendar ta vrednost variira in se lahko povzpne tudi do 0,1 %. Med 40 in 80 % vsega dušika predstavljajo proteini, večino preostalega deleža pa proste aminokislina. V medu so določili okoli 20 različnih neencimskih proteinov, večina med njimi je bila prisotna v vseh vrstah medu. Njihov vir je rastlinski nektar ali pa čebele same (Doner, 2003).

V medu lahko najdemo med 11 in 21 različnih prostih aminokislin. Med njimi je najpomembnejši prolin, saj njegov delež predstavlja polovico vseh prostih aminokislin in izvira predvsem iz čebel, nekaj pa tudi iz peloda in nektarja ali mane. Prolinu sledijo glutaminska kislina, alanin, fenilalanin, tirozin, levcin in izolevcin (Doner, 2003). Običajno vsebujejo več aminokislin temnejše, gozdne vrste medu (Božnar, 2003). Zaradi reakcije med aminokislinami in sladkorji v medu lahko pride do rumenorjavega obarvanja medu, ki se pojavi sčasoma (Doner, 2003).

2.2.6 Minerali, elementi v sledih in vitamini

Vsebnost mineralov in elementov v sledih v medu je odvisna od tipa tal, na katerih je medeča rastlina rasla, in od intenzivnosti paše. Vsebnost težkih kovin lahko kaže na

onesnaževanje okolja in s tem tudi na geografski izvor medu (Božnar, 2003; Anklam 1998). Čim več teh snovi je raztopljenih v medu, višja je električna prevodnost medu. Temnejše, gozdne vrste medu imajo višjo električno prevodnost (Božnar, 2003). V teh vrstah medu je zato večja tudi vsebnost pepela, celo nad 1 %, v nektarnih vrstah pa med 0,04 in 0,6 % (Sporns, 1992).

Tako kot skupna količina mineralov variira v medu tudi količina posameznih mineralov. Med njimi je največ kalija, sledijo mu natrij, kalcij in magnezij. V medu pa najdemo tudi železo, mangan, baker, klor, fosfor, žveplo in silicij (Doner, 2003).

Za določanje elementov v medu se uporabljajo različne metode. Najpogosteje uporabljene so naslednje štiri metode: rentgenska fluorescenčna spektroskopija s totalnim odbojem (TXRF), atomska absorpcijska spektroskopija (AAS), atomska emisijska spektroskopija z induktivno spojeno plazmo (ICP-AES) in nevtronska aktivacijska analiza (NAA) (Golob in sod., 2005).

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).

2.2.7 Hidroksimetilfurfural

Vsebnost HMF (5-hidroksimetil 2-furfuraldehid) v medu je kriterij kakovosti, saj v svežem medu praktično ni prisoten. V medu nastane pri skladiščenju ali drugih postopkih, ki jih opravljamo na medu. Med slednje spada predvsem segrevanje, ki ga opravimo zaradi znižanja viskoznosti in preprečevanja kristalizacije ali fermentacije (Sing in sod., 1988). V ocenjevanju kakovosti medu se HMF uporablja kot kriterij svežosti oz. kot pokazatelj pregretosti medu (Plestenjak, 1999).

HMF nastaja med kislinsko-katalizirano dehidracijo heksoz in je povezan s kemijskimi parametri medu, kot so pH, skupne kisline in vsebnost mineralov (Anam in Dart, 1995; Bath in Singh, 1999). V splošnem imajo nektarne vrste medu nižje, med iz mane 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).

Za določanje HMF v medu se uporabljajo predvsem naslednje tri metode: spektrofotometrična metoda po Whiteju (1979), spektrometrična metoda po Winklerju (1955) in HPLC (Zappala in sod., 2005).

2.3 FIZIKALNE LASTNOSTI MEDU

2.3.1 Gostota

Gostota je razmerje med maso in volumnom in v povprečju znaša za med $1,422 \text{ g/cm}^3$ pri $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Božnar, 2003). Večja ko je vsebnost vode v medu, manjša je njegova gostota (Ouchemoukh in sod., 2007).

2.3.2 Viskoznost

Viskoznost je odvisna od vsebnosti sladkorjev, vsebnosti vode (večja je vsebnost vode, večja je viskoznost medu) in od temperature. Z naraščanjem temperature narašča tudi viskoznost (Božnar, 2003).

2.3.3 Higroskopičnost

Med je zelo higroskopen. To pomeni, da veže nase vlago iz okolja, če jo je tam več kot v medu (Božnar, 2003). S tehničnega vidika je ta lastnost zelo pomembna, saj omogoči, da se med razredči do take stopnje, da v njem lahko poteka alkoholno vrenje kvasovk (Božnar in Senegačnik, 1998).

2.3.4 Električna prevodnost

Električna prevodnost medu je odvisna od koncentracije mineralov, organskih kislin, beljakovin, sladkorjev in poliolov, ki v vodni raztopini medu razpadejo na ione in tako prevajajo električni tok. Specifična električna prevodnost naravnega medu je zaradi visoke koncentracije sladkorjev, ki zmanjša gibljivost ionov, sorazmerno nizka in narašča z naraščajočo razredčitvijo medu v destilirani vodi. Maksimalno električno prevodnost imajo raztopine medu z 20 do 30 % suhe snovi, saj je gibljivost ionov v taki raztopini optimalna. Vrednosti električne prevodnosti medu so lahko zelo različne in značilne za določeno vrsto medu. Torej nam merjenje električne prevodnosti medu omogoča kontrolo kakovosti oz. ugotavljanje potvorb naravnih vrst medu (Golob, 1999). Na splošno se električna prevodnost medu giblje med 0,1 in 2 mS/cm (Božnar, 2003). Manin med in mešanica nektarnega in maninega medu imata višjo električno prevodnost od nektarnega zaradi večje vsebnosti elementov (Popek, 2002).

2.3.5 Barva

Med ima zelo širok barvni spekter, od vodeno bele do temno rjave, skoraj črne. Barva svežega medu je odvisna od mineralne sestave in botaničnega izvora in je posledica barvil, ki jih vsebuje. To so predvsem karotenoidi in ksantofili. K barvi prispevajo tudi polifenoli in flavonoidi. Po kristalizaciji se med posvetli (Božnar, 1999).

2.3.6 Kristalizacija

Nastanek in rast kristalov imenujemo kristalizacija. To je naravni pojav, ki je odvisen od vsebnosti sladkorjev v medu, količine vode, temperature, časa shranjevanja, prisotnosti kristalizacijskih jeder in postopkov pridobivanja medu. Hitreje kristalizirajo tiste vrste medu, ki vsebujejo več glukoze kot fruktoze. Če je razmerje med glukozo in fruktozo večje kot 1 : 1,5, med ostane zelo dolgo tekoč (Božnar, 2003).

Na kristalizacijo medu vpliva tudi razmerje med glukozo in vodo v medu. Če to razmerje znaša 1,6 : 1, med še ne kristalizira, pri razmerju 2,16 : 1 že nastane mehka kristalizacija, kristali pa se oblikujejo pri razmerju 2,24 : 1, ter najpogosteje začne kristalizirati pri 14 °C, tiste vrste z več kot 18 % vode pa pri nekoliko nižjih temperaturah (Božnar in Senegačnik, 1998).

Če želimo kristaliziran med utekočiniti, ga segrejemo na 40 °C. Reakcija je reverzibilna, kar pomeni, da se lahko kristalizacija ponovno pojavi. Segrevanje medu negativno vpliva na kakovost medu, saj med potemni in v njem se uničijo nekatere biološko aktivne snovi (Božnar, 2003).

2.3.7 Optične lastnosti

Med suče ravnino polarizirane svetlobe. Ta lastnost je odvisna od sladkorjev v medu, vrste sladkorjev in relativnih razmerij. Na splošno velja, da je med iz nektarja levosučen, med iz mane pa desnосуčen. Večina vrst medu iz nektarja vsebuje večjo količino fruktoze kot glukoze. Tako je tak med levosučen, saj je fruktoza levosučna, glukoza pa desnосуčna. S tem je izražena negativna vrednost specifične rotacije $[\alpha]_D^{20}$. Vrste medu iz mane imajo bolj kompleksen spekter sladkorjev. Vsebujejo malo fruktoze in več glukoze. Vsebujejo tudi melecitozo ali erlozo, kar skupaj z glukozo povzroča pozitivno vrednost $[\alpha]_D^{20}$ (Božnar in Senegačnik, 1998).

Merjenje optične rotacije lahko da koristne informacije o kakovosti in morebitni potvorjenosti medu, lahko pa služi za določanje vrste medu (Golob, 1999).

2.4 PRAVILNIK O MEDU

Po Pravilniku o medu (2004) so kriteriji sestave medu naslednji:

Preglednica 1: Kriteriji sestave medu (Pravilnik o medu, 2004)

Parameter	Cvetlični med	Gozdni med
vsebnost fruktoze in glukoze (g/100g)	najmanj 60	najmanj 45
vsebnost saharoze (g/100g)	največ 5	največ 5
vsebnost vlage (g/100g)	največ 20	največ 20
vsebnost v vodi netopnih snovi (g/100g)	največ 0,1	največ 0,1
elektrolitska prevodnost (mS/cm)	največ 0,8	najmanj 0,8
proste kisline (miliekvivalenti/1000g)	največ 50	največ 50
HMF (mg/kg)	največ 40	največ 40

2.5 SLADKORNI SIRUPI

Sladkorni sirupi so sladila v tekoči, močno viskozni obliki. Sirupe, med katere lahko uvrščamo tudi med, človek uporablja že zelo dolgo, saj so med uporabljali že stari Egipčani (Clarke, 2003).

2.5.1 Glukozno-fruktozni sirup

Glukozno-fruktozni sirup (Slika 5) vsebuje največ glukoze, tej sledijo fruktoza, maltoza in višji sladkorji. Delež fruktoze je lahko zelo različen in se giblje med 5 in 45 %, a v večini sirupov je fruktoze manj kot maltoze in višjih sladkorjev. Vrednost pH tega sladkorja se giblje med 4 in 6. Sirup je brezbarven, z nevtralno sladko aromo. Sladek je skoraj toliko kot saharoza (Sipal partners, 2010).



Slika 5: Glukozno-fruktozni sirup

Priprava sirupa se začne s hidrolizo škroba. Ta se kot rezervna snov v rastlinah nahaja v obliki zrn v različnih delih rastline (semenih, koreninah). Sestavljen je iz amilopektina (približno 80 %), ki je v vodi netopen, in topne amiloze (približno 20 %). Oba sta zgrajena iz glukočnih enot, povezanih z glikozidnimi vezmi. Med hidrolizo se te vezi razgradijo tako, da kot končni produkt dobimo glukozo. Najpogostejša je kombinacija kislinske in encimske hidrolize, kjer najprej s pomočjo kisline dobimo različne oligosaharide. α -amilaza nato cepi α -(1,4)-glikozidne vezi v sredini, amiloglukozidaza α -(1,4)-glikozidne vezi od konca oligosaharidov in tudi α -(1,6)-glikozidne vezi, čeprav bolj počasi. Hidrolizi sledi izomerizacija, kjer se del glukoze pretvori v fruktozo s pomočjo encima izomeraze (Abram in Zelenik-Blatnik, 2002).

Sirup se uporablja predvsem kot sladilo. V živilski industriji ga najdemo v pekarstvu (piškoti), mlekarnstvu (jogurti) in slaščičarstvu. Uporablja se tudi pri izdelavi kosmičev, sladoleda, otroške hrane in različnih omak. Najdemo ga tudi v nekaterih farmacevtskih in kozmetičnih izdelkih (Sipal partners, 2010).

2.5.2 Glukočni sirup

Glukočni sirup (Slika 6) je najbolj razširjen nadomestek sladkorja v industriji. Je vodna raztopina (več kot 80 %) glukoze (dekstroze), maltoze in maltodekstrinov. Največji delež zavzema glukozna. Ta očiščena in koncentrirana raztopina monosaharida in višjih saharidov je narejena s pomočjo encimske ali kislinske hidrolize škroba pod kontroliranimi pogoji. Škrob je lahko iz različnih rastlin, največkrat pa je iz koruze ali pšenice. Glukočni sirup je manj sladek od sladkorja. Ima veliko pomembnih funkcionalnih lastnosti, kot so visoka fermentabilnost, viskoznost in higroskopičnost. vrednost pH ima med 3,5 in 5,5. Vsebnost pepela (predvsem natrijevaga klorida) je majhna (Clarke, 2003; Hull, 2010).



Slika 6: Glukočni sirup

Škrob lahko obdelamo na tri načine:

- Pri obdelavi s kislino škrobno brozgo primerne suhosti okisamo do vrednost pH približno 2. Nizek pH poskrbi za depolimerizacijo škroba. Z nevtralizacijo dobljeno tekočino nato z evaporacijo zbistrimo in koncentriramo do srednje gostote. Nato ta sirup še dodatno zbistrimo, razbarvamo in koncentriramo do končne gostote.
- Pri kislinsko-encimski obdelavi je postopek podoben kislinski obdelavi, le da tu škrobno brozgo le delno obdelamo s kislino, tako da dobimo dekstrozo. Slednjo nato obdelamo s primernimi encimi, ki dokončajo proces.
- Pri encimski obdelavi so škrobna zrna želirana. Primarno depolimerizacijo škroba opravimo z α -amilazami. Nato lahko dobljeni sirup dokončno obdelamo z različnimi encimi, ki jih izberemo glede na končni želeni izdelek (Clarke, 2003).

Glukočni sirup uporabljajo v različnih panogah. Njegova uporaba je najbolj razširjena v slaščičarstvu, pekarstvu, proizvodnji marmelad, džemov, kandiranega sadja in sladoleda. Uporablja se tudi v farmaciji, predvsem za proizvodnjo sirupov (proti kašlju), usnjarski industriji in proizvodnji parfumov ali osvežilcev zraka. V živilskih panogah se uporablja predvsem zato, ker ne povzroča kristalizacije, daje homogene izdelke, daje primerno teksturo in ima dobre lastnosti konzerviranja (Hull, 2010).

2.5.3 Invertni sirup

Invertni sirup (Slika 7) je sirup zlate barve, ki je sestavljen iz glukoze (dekstroze) in fruktoze v približno enakih deležih. Njegova uporaba je v industriji zelo razširjena. Na to vpliva dejstvo, da je invertni sirup slajši od same glukoze, saj je fruktoza najslajše naravno sladilo (Ensymm Company, 2007).



Slika 7: Invertni sirup

Invertni sirup je narejen s pomočjo hidrolize saharoze v glukozo in fruktozo. Pojem invertirati prihaja iz opisa pojava, ki ga opazimo na polarimetru, inštrumentu, ki ga uporabljamo za analizo vsebnosti saharoze. V primerjavi s čisto saharozo daje mešanica glukoze in fruktoze zrcalno sliko polarizirane svetlobe (Ensymm Company, 2007).

Invertni sladkor je lahko popolnoma invertiran ali pa le deloma. Sirupi so večinoma le polovično ali pretežno invertirani. Saharozo lahko hidroliziramo s pomočjo kisline in vročine ali s pomočjo encimov. Produkti encimske hidrolize naj bi bili zdravju bolj prijazni. Za hidrolizo uporabljajo invertazni encim β -fruktofumarozidazo, ki ga pridobivajo iz kvasovk, največkrat iz *Saccharomyces cerevisiae* (Ensymm Company, 2007; Hull, 2010).

Sirup se uporablja v pekarstvu, slaščičarstvu, mlekarnstvu (kondenzirano mleko), proizvodnji pijač, marmelad, džemov in čokolad. Primeren je tudi za določene dietne proizvode, v farmaciji pa se predvsem uporablja pri izdelavi sirupov (Ensymm Company, 2007).

2.6 POTVORBE MEDU

Zadnje čase postaja kakovost hrane vedno bolj pomembna, tako za kupce in proizvajalce, kot za oblasti. Za zagotavljanje kakovosti pa je potrebna široka kontrola, ki obsega senzorično kontrolo, kontrolo prehranske vrednosti, avtentičnosti in varnosti (Montilla in sod., 2006). Zaradi visoke prehranske vrednosti in edinstvenih aromatičnih lastnosti, je med najdražje sladilo (Sivakesava in Irudayaraj, 2002). Ljudje ga že od antičnih časov cenijo tudi zaradi drugih lastnosti, kot so probiotičnost (Sanz in sod. 2005), antioksidativnost (Frankel in sod., 1998), antibakteričnost (Weston in Brocklebank, 1999) in antimitogenost (Wang in sod., 2002). Vse te lastnosti, omejena količina in dvigovanje cene medu, so vzrok za povečanje potvorb medu (Anklam, 1998).

Potvarjenje medu temelji predvsem na dveh principih, in sicer na redčenju medu z vodo in dodajanju sladkorjev ali sladkornih sirupov (Anklam, 1998). Med potvorbe spadajo tudi dodajanje karamela v cvetlični med, z namenom potemnitve barve medu (Montilla in sod., 2006), in hranjenje čebel s sladkorji ali sirupi (Anklam, 1998).

Včasih je bila najbolj razširjena potvorba z glukozo. Danes se uporablja zelo redko zaradi relativno slabe topnosti glukoze, ki lahko povzroči povečano granulacijo v tekočem medu ali težak, kremni med. Bolj kot glukoza je primerna saharoza (kuhinjski sladkor), saj ob primerno dodani količini, ne vpliva na kristalizacijo. Danes se za potvorbo uporabljajo predvsem sirupi, ki ne vplivajo veliko na fizikalne lastnosti medu (Kelly in sod., 2006). Sirupi so lahko preprosti ali kompleksni, ki so spremenjeni tako, da ustrezajo naravnemu ogljikohidratnemu profilu medu. Med sirupi so najbolj razširjeni glukozni, invertni in vedno bolj koruzni sirup z visoko vsebnostjo fruktoze (Swallow in Low, 1994). Najlažje zaznamo potvorbo z glukoznim sirupom, saj njegov dodatek povzroči dvig vsebnosti glukoze v medu (Doner, 2003).

Zadnje čase se potvorbam medu namenja vse več pozornosti, saj so zelo razširjene. Tega problema se med drugim dobro zavedajo tudi organi Evropske unije (Council directive 2001/110/EC, 2002), zato spodbujajo uporabo analitskih metod za dokazovanje avtentičnosti medu. Pri vseh analizah se moramo zavedati, da je med naravni proizvod, čigar komponente oz. njihove količine se lahko spreminjajo, saj so odvisne od mnogih dejavnikov.

V literaturi se največkrat navajajo naslednji načini za dokazovanje potvorbe medu:

- analiza razmerja izotopov $\delta^{13}\text{C}$ v medu in proteinih izoliranih iz medu ter $\delta^{15}\text{N}$ v proteinih izoliranih iz medu, s katero lahko dokažemo potvorbo s sladkorji, ki vsebujejo štiri ogljikove atome, razen z visoko fruktoznim sirupom (Anklam, 1998);
- določanje vsebnosti prolina kot aminokislina, ki je je največ v medu (Kelly in sod., 2006);
- določanje dušika v medu, saj naj bi, če bi se njegova vsebnost zmanjšala pod 10 mg/100 g, to lahko smatrali za potvorbo medu s sladkorji (Vit Olivier, 1987);
- določitev vsebnosti HMF, s katero si lahko pomagamo pri ugotavljanju potvorbe z invertnim sirupom (Anklam, 1998);
- analiza oligosaharidov (ionsko izmenjevalna tekočinska kromatografija), za ugotavljanje potvorbe z invertnim sirupom ali visoko fruktoznim sirupom (Swallow in Low, 1994).

Potvarjanje medu oziroma njegova pristnost je pomembna tako za potrošnike kot tudi za proizvajalce in predelovalce. Potrošniki so vedno bolj ozaveščeni, zato zahtevajo zdravo in kakovostno hrano. Od medu, kot luksuzne dobrine, pričakujejo, da je popolnoma naraven izdelek, za katerega so pripravljeni plačati določeno vsoto (Fairchild in sod., 2000).

Proizvajalci se poslužujejo potvorb zaradi znižanja stroškov in s tem povečanja profita ali pa zaradi znižanja končne cene izdelka, s katero povzročijo povečanje prodaje in s tem deleža na trgu. Vendar s tem močno škodujejo »poštenim« proizvajalcem, saj morajo ti nato izdelke prodajati pod ceno. Hkrati pa lahko močno škodujejo tudi sebi, saj se jim lahko prodaja precej zmanjša, če njihovo goljufanje, ki je protizakonito, pride v javnost. Dobro ime pa si potem zelo težko ponovno ustvarijo (Fairchild in sod., 2000).

Poleg oblasti se problema potvarjanja zavedajo tudi polnilci, ki v velikem številu že sami kontrolirajo pristnost medu, ki ga pakirajo. Vendar se pritožujejo nad zahtevnostjo in predvsem ceno kontrolnih analiz. Zato si želijo boljših in preprostejših metod dokazovanja potvorjenosti ter standardizacije protokolov (Fairchild in sod., 2000).

2.7 OPIS FIZIKALNOKEMIJSKIH METOD

2.7.1 Merjenje pH

Vrednost pH je definirana kot negativni logaritem aktivnosti vodikovih ionov a_{H^+} :

$$pH = -\log a_{\text{H}^+} \quad \dots(1)$$

Aktivnost vodikovih ionov je podana z aktivnostnim koeficientom γ_{H^+} in koncentracijo vodikovih ionov $[H^+]$:

$$A_{\text{H}^+} = \gamma_{\text{H}^+} \cdot [H^+] \quad \dots(2)$$

Aktivnostni koeficient je odvisen od temperature in ionske moči raztopine in ima vrednost 1 za neskončno razredčene raztopine. Zato pri zelo razredčenih raztopinah lahko sklepamo, da je pH odvisen od koncentracije vodikovih ionov v raztopini (Holobar, 1996; Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Vrednost pH lahko določamo elektrokemično s pH metrom ali pa s pomočjo indikatorjev. Ti se lahko dodajajo raztopinam (metil vijolično, metil rumeno, alizerin rumeno). Iz barve, ki nastane, lahko s pomočjo barvnih tabel odčitamo vrednost pH (Klofutar in sod., 1998). Merjenje s pH metrom temelji na merjenju potenciala semipermeabilne membrane iz tanke steklene stene (opne). Potencial je odvisen od koncentracije H^+ ionov v raztopini. Da lahko ta potencial izmerimo, potrebujemo konstanten potencial znotraj membrane, kar dosežemo z uporabo referenčne elektrode s konstantnim potencialom. Med referenčnimi elektrodami so najpogostejše Ag/AgCl in KCl elektrode. Potencial, ki se ustvari na stekleni membrani, je podan z Nernstovo enačbo in je odvisen od koncentracije vodikovih ionov znotraj in zunaj elektrode (Holobar, 1996):

$$E = 2,3 \cdot \frac{R \cdot T}{F} \log \frac{(a_{H^+})_{\text{zunanje raztopine}}}{(a_{H^+})_{\text{notranje raztopine}}} \quad \dots(3)$$

Ker je koncentracija vodikovih ionov v notranji raztopini konstantna, lahko zapišemo potencial med pH-elektrodo in referenčno elektrodo z enačbo (Holobar, 1996):

$$E = E_0 + 2,3 \frac{R \cdot T}{F} \log a_{H^+} \quad \dots (4)$$

Kisle raztopine so vse tiste raztopine, katerih pH je manjši od 7. V teh raztopinah je koncentracija oksonijevih ionov (vodikovih ionov) večja od $1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Bazične raztopine pa so tiste, katerih pH je večji od 7, oziramo tiste, v katerih je koncentracija oksonijevih ionov manjša od $1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. V nevtralni raztopini je koncentracija oksonijevih ionov enaka koncentraciji hidroksilnih ionov (Klofutar in sod., 1998; Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

2.7.2 Refraktometrija

Refraktometrija je široko uporabna v kontroli kakovosti živil. Primerna je za hitro določanje vsebnosti vode v različnih tekočinah in inertnih trdnih snoveh. Posebej prirejene instrumente uporabljamo za določanje vsebnosti drugih snovi, kot je sladkor (Golob, 1999).

Analit ali merjenja komponentna morata biti v raztopini, saj metoda temelji na merjenju lomnega količnika (indeksa refrakcije) raztopine. Za čisto raztopino določene substance je značilno, da ima pri konstantni temperaturi in pritisku konstanten lomni količnik (Golob, 1999).

Refraktometrija je optična metoda, pri kateri se pri prehodu svetlobe iz enega medija (zrak) v drug medij (vodna raztopina vzorca) svetloba deloma odbija, deloma lomi. Kako se žarek lomi, je odvisno od snovi. Običajno izražamo to z lomnim količnikom. Definiran je kot razmerje med sinusom kota vpadnega žarka in sinusom kota prepuščenega žarka. Je karakterističen za vsako snov in odvisen od koncentracije snovi v raztopini in temperature (Golob, 1999).

Poznamo več vrst refraktometrov, kot so: laboratorijski hidrometer, Abbejev refraktometer, ročni refraktometer ali avtomatski žarkovni analizator, potopljiv refraktometer, ki je primeren za raztopine. Med njimi je najbolj znan Abbejev refraktometer, ki pokrije indeks refrakcije od 1,3 do 1,7, s ponovljivostjo $\pm 0,0003$ in omogoča direktno odčitavanje. Pri vseh refraktometrih je bistvenega pomena konstantna temperatura, ker so gostota, specifična teža in lomni količnik odvisni od nje. Pri diferencialnem refraktometru pa temperature ni potrebno kontrolirati, ker z aparatom merimo razliko med vzorcem in referenco (Golob, 1999).

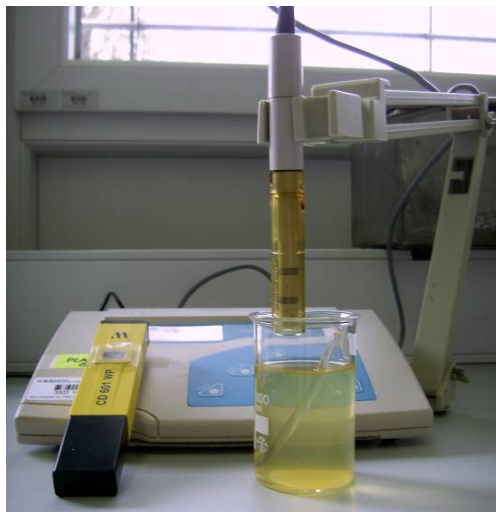
Merjenje lomnega količnika uporabljamo za določanje vsebnosti suhe snovi oz. vode v: sadnih sokovih, želejih, marmeladah, paradižnikovem koncentratu, medu in ostalih živilih, ki vsebujejo veliko ogljikovih hidratov, pa tudi v mleku, mlečnih izdelkih, raztopinah beljakovin in živilih, ki vsebujejo veliko maščob (Golob, 1999).

2.7.3 Električna prevodnost

Vodne raztopine nekaterih kemijskih spojin prevajajo električni tok. Na osnovi električne prevodnosti razdelimo vodne raztopine na dobre prevodnike električnega toka (vodna raztopina klorovodikove kisline), šibke prevodnike električnega toka (vodna raztopina očetne kisline) in na raztopine, ki ne prevajajo električnega toka (Klofutar in sod., 1998). Prevodnost nekega elektrolita – prevodnika določamo iz upornosti raztopine, ki jo merimo med dvema elektrodama, potopljenima v elektrolit. Izmerjena upornost je premosorazmerna vrednosti, s katero se snov upira premiku naboja. Prevodnost je inverzna vrednosti upornosti (Golob, 1999).

Specifična upornost je upornost raztopine, ki je med dvema elektrodama z medsebojno oddaljenostjo 1 cm in površino 1 cm² in je recipročna specifični prevodnosti. Specifična prevodnost vodne raztopine čistega elektrolita je pri konstantni temperaturi odvisna od koncentracije. Če je v razredčeni raztopini en sam elektrolit, lahko določimo njegovo koncentracijo neposredno z merjenjem električne prevodnosti. Pri raztopinah, ki jih sestavljajo različne raztopljene sestavine, je električna prevodnost odvisna od oblike, v kateri se nahajajo. Med je raztopina pri katerem je električna prevodnost odvisna od koncentracije mineralnih soli, organskih kislin, proteinov, pa tudi kompleksnejših spojin, kot so sladkorji. Specifična električna prevodnost naravnega medu je zaradi visoke koncentracije sladkorjev, ki zmanjša gibljivost ionov sorazmerno nizka in narašča z naraščajočo razredčitvijo medu v destilirani vodi. Maksimalno električno prevodnost imajo raztopine medu z 20-30 % suhe snovi, saj je gibljivost ionov v taki raztopini optimalna (Golob, 1999).

Za merjenje specifične električne prevodnosti medu so v uporabi različni konduktometri (Slika 8): laboratorijski ali namizni, prenosni in mikroprocesorski prenosni konduktometri, ki imajo možnost pomnjenja izmerjenih vrednosti. Prenosni konduktometri z moderno elektroniko zagotavljajo enostavno uporabo (Golob, 1999).



Slika 8: Aparatura za merjenje električne prevodnosti

Inštrument se lahko uporablja za meritve na terenu in v laboratoriju na različnih področjih, kot so kemična, papirna, usnjarska, tekstilna in živilska industrija. Pri slednji so zelo razširjeni in se uporabljajo npr. pri kontroli proizvodnje sladkorjev, mesnih in mlečnih izdelkov. Konduktometri so pomembni tudi v ekologiji pri kontroli odpadkov, vodotokov, vodnih zajetij in rečnih vod (Golob, 1999).

2.7.4 Merjenje optične rotacije

Ena najbolj značilnih lastnosti geometrijskih likov je njihova simetričnost oziroma asimetričnost. Za asimetrične molekule je značilna t.i. optična izomerija. Stereoizomeri te vrste (t.i. enantiomeri) imajo enake molekulske formule in enake skupine atomov, ki so lahko vezane na t.i. asimetrični ogljikov atom (tj. ogljikov atom, na katerega so vezane štiri različne atomske skupine ali atomi). Med seboj se razlikujejo samo po različni prostorski razporeditvi atomskih skupin, pri čemer je en enantiomer zrcalna slika drugega. Tudi njihove kemijske in fizikalne lastnosti so, z izjemo sukanja ravnine linearno polarizirane svetlobe, enake. Pri tem eden od enatiomerov suče ravnino linearno polarizirano svetlobo v smeri urinega kazalca, drugi pa za enak kot v nasprotno smer. Za prvi izomer pravimo, da je desnosučen in ga označimo s (+), drugi pa je levosučen in ga označimo z (-) (Klofutar in sod., 1998).

Običajna in monokromatska svetloba sta transverzalno elektromagnetno valovanje, pri katerem vektor električne poljske jakosti niha v vseh ravninah, ki so pravokotne na smer razširjenja žarkov. Za določanje optične aktivnosti spojin ta svetloba ni primerna in jo je potrebno predhodno polarizirati. Linearno polarizirano svetlobo dobimo s prehodom

običajne svetlobe skozi npr. Nikolovo prizmo ali drug primeren polarizator v polarimetru (Slika 9). Pri linearno polarizirani svetlobi vektor električne poljske jakosti niha samo v eni ravnini (ravnina polarizacije), ki je pravokotna na smer razširjenja žarka (Breznik in sod., 2001).

Polarimetrična analiza služi za določanje čistosti in koncentracije raztopin optično aktivnih snovi. Kot sukanja ravnine polarizirane svetlobe je odvisen od valovne dolžine svetlobe, dolžine poti žarka, temperature raztopine in koncentracije raztopljenega sladkorja (Plestenjak, 1993).

Specifični kot zasuka je karakteristična konstanta optično aktivnih spojin, ki jo izrazimo z enačbo:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c} \quad \dots(5)$$

v kateri pomenijo:

- $[\alpha]_D^{20}$... specifični kot zasuka raztopine, izražen v stopinjah (°) pri valovni dolžini 589,3 nm (natrijeva D – linija) in temperaturi 20 °C (° cm³/g dm)
- α ... izmerjeni kot zasuka linearno polarizirane svetlobe v kotnih stopinjah (°)
- l ... dolžina kivete, izražena v dm
- c ... koncentracija raztopine v g/100 cm³

Ob poznavanju specifičnega kota zasuka in izmerjenim kotom zasuka lahko izračunamo koncentracijo optično aktivnih spojin v raztopini (Breznik in sod., 2001; Klofutar, 1993).



Slika 9: Polarimeter

2.7.5 Spektrometrija

Bistvo spektrometričnih metod je v interakciji analita z elektromagnetnim valovanjem. To je sestavljeno iz valovanja električnega in magnetnega polja, ki delujeta pravokotno eno na

drugo in v vakuumu potujeta s hitrostjo svetlobe in pri tem skozi prostor nosita energijo (Pihlar, 2001).

Spektrometrijo delimo:

- glede na vrsto delcev, ki jih vzbujamo: molekulska, atomska;
- glede na vrsto interakcij: absorpcijska, emisijska;
- glede na uporabljeno valovno dolžino: UV, IR... (Pihlar, 2001).

V normalnih okoliščinah se večina atomov in molekul nahaja v osnovnem stanju, se pravi, da elektroni zasedajo mesta nižjih energijskih nivojev. Z dovajanjem svetlobne energije lahko povzročimo, da elektroni zunanjih orbital preidejo v nestabilno vzbujeno stanje, kjer se zadržijo le od 10^{-9} do 10^{-6} sekunde in nato energijo oddajo (emitirajo). Absorpcija nastopi, kadar nihanje svetlobe in elektronov preide v območje resonance, kar se zgodi v primeru tistih snovi, ki svetlobe določene valovne dolžine ne prepuščajo. Tako moramo za določitev analita vnaprej poznati njegov absorpcijski maksimum in izbrano valovno dolžino tudi zagotoviti. Govorimo o monokromatski svetlobi, ki je sestavljena iz ene same valovne dolžine (Pihlar, 2001).

Osnovna zakona praktične fotometrije sta Lambertov in Beerov zakon. Prvi pravi, da je intenziteta prepuščenega žarka, ki vstopa pravokotno na absorbirajočo snov, odvisna od dolžine poti. Beerov zakon pravi, da intenziteta prepuščenega žarka monokromatske svetlobe pri potovanju skozi raztopino eksponentno pojema z razdaljo. Če oba zakona združimo dobimo Beer-Lambertovo enačbo (6), ki velja le za razredčene raztopine. Enačba podaja, da je zveza med absorbanco in koncentracijo spojine, ki absorbira elektromagnetno valovanje, linearna. Sicer je absorbanca odvisna od koncentracije raztopine, dolžine poti žarka skozi njo in molskega absorpcijskega koeficienta spojine.

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot C \cdot l = A \quad \dots(6)$$

Pri čemer je:

A... absorbanca raztopine

I_0 ... intenziteta vpadne svetlobe

I ...intenziteta prepuščene svetlobe

c ...koncentracija v mol/dm³

l... dolžina poti žarka v cm

ε ...molski absorpcijski koeficient spojine v dm³/mol cm (Abram, 2003; Pihlar, 2001).

Spektrometrija je ena najpogosteje uporabljenih inštrumentalnih metod v analitiki, saj omogoča kvalitativno in kvantitativno ovrednotenje preiskovane snovi, je zanesljiva in enostavna. V analitiki se predvsem uporablja vidno področje elektromagnetnega spektra (med 400 in 800 nm), saj to energijo absorbirajo številne naravne in sintetične organske spojine ter biološko pomembne snovi (Pihlar, 2001)

2.7.6 HPLC

Kromatografija je separacijski postopek. Pri kromatografski analizi najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustrezno detekcijo s ciljem kvalitativne ali kvantitativne določitve. To v praksi pomeni, da poskušamo doseči čim boljšo separacijo v čim krajšem času, z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema. Meja optimalnosti je ponavadi določena z zmogljivostjo opreme in pritiska na koloni. Posamezne komponente preiskovanega vzorca se med seboj ločijo na podlagi njihovih različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo (Žorž, 1991).

Glede na naravo interakcij med stacionarno fazo in snovjo razlikujemo naslednje vrste kromatografij: adsorpcijska, porazdelitvena, ionsko izmenjevalna, izločitvena in afinitetna. S HPLC tehniko ločujemo snovi na osnovi vseh naštetih načinov, zato se je ta metoda v zadnjem času razvila v najbolj pogosto in najbolj široko uporabljeno kromatografsko tehniko. Je zelo učinkovita, hitra in ima visoko stopnjo ločljivosti, zato se uporablja tako v analitiki kot tudi v industriji (Kregar, 1996).

Kromatografski sistem, na katerem poteka ločevanje zmesi snovi, je sestavljen iz dveh faz, in sicer iz stacionarne in mobilne faze. Molekule stalno prehajajo med obema fazama, pri čemer se premikajo le v mobilni fazi s hitrostjo u_x ; v stacionarni fazi pa mirujejo. Njihova povprečna migracijska hitrost se lahko izrazi z enačbo:

$$U_x = \frac{1}{t_r} \quad \dots(7)$$

Retencijski čas (t_r) lahko razdelimo na čas, ki ga molekule prebijejo v mobilni fazi, in na čas, ko se nahajajo na stacionarni fazi. Razmerje med njima nam pri ravnotežnih pogojih pove relativno število molekul topljenca v mobilni oz. stacionarni fazi. To razmerje imenujemo kapacitivni faktor (k') (Žorž, 1991).

Retencijski čas je za določeno komponento karakteristična vrednost in jo lahko uporabimo pri konstantnem pretoku za njeno identifikacijo. Kapacitivni faktor je povezan s porazdelitvenim koeficientom (K) preko razmerja faz. Porazdelitveni koeficient pa je definiran kot razmerje koncentracij topljenca v stacionarni fazi in mobilni fazi. Kapacitivni faktor tudi definira razmerje med linearno hitrostjo mobilne faze in povprečno migracijsko hitrostjo. Variira lahko med nič in neskončno, pri čemer nič pomeni, da topljenec preide skozi kolono neretardiran, medtem ko neskončno pomeni, da se je topljenec popolnoma vezal in ga pri danih pogojih ne bo mogoče eluirati. Razmerje kapacitivnih faktorjev dveh topljencev se imenuje tudi separacijski faktor (Žorž, 1991).

Razlika posameznih retencijskih časov, ki je potrebna za separacijo, narašča z naraščajočo razliko med kapacitivnima faktorjema obeh komponent pri dani hitrosti in z naraščajočo dolžino kolone. Opisan proces separacije je podvržen tudi antagonističnemu učinku širjenja posameznih con med migracijo topljenca skozi kromatografsko kolono. Ta učinek je karakteriziran s širino vrha (peak) pri njegovem podnožju oz. bazi (W_b). To širino dobimo, če potegnemo tangente skozi prevojne točke, na presečišču le-teh z bazno linijo ali pa širino vrha v višini prevojev. Za Gaussov vrh velja:

$$W_b = 2W_i = 4\sigma \quad \dots(8)$$

kjer je standardna deviacija (σ) ustreznega vrha merjena v enotah dolžine, časa ali volumna. Vendar lahko grafično določamo standardno deviacijo le pri resnični Gaussovi obliki vrha. Teorija in praksa kažeta, da narašča širina vrha s kvadratnim korenom razdalje migracije znotraj kolone; za kompletno eluirano komponento je ta razdalja enaka dolžini kolone (l).

$$\sigma^2 = h \cdot l \quad \dots(9)$$

Osnovna kromatografska fenomena sta separacija in disperzija. Oba se povečujeta z dolžino kolone. Faktor (h) obsega vse tiste učinke, ki povzročajo, da posamezne molekule iste komponente potujejo skozi kolono z različnimi hitrostmi. Posledica tega je disperzija in redčitev, kjer se komponenta eluira iz kolone v večjem volumnu, kot je bila dozirana, in v manjši koncentraciji. Na disperzijo kromatografskega vrha vplivajo:

- učinek množice poti; zaradi vijugaste narave poti v samem polnilu kolone bodo posamezne molekule topljenca opravile različno dolge poti, kar povzroči širitev vrha. Za zmanjšanje tega efekta je potrebno kolono skrbno napolniti s čim manjšimi delci, kar se odraža na enakomernosti polnitve,
- naključna molekularna difuzija v aksialni smeri kolone; ta efekt je relativno majhen, pomemben postane šele pri dolgih retencijskih časih in pri zelo majhnih pretokih,
- upor proti difuziji in masnemu prehodu molekul, ki se gibljejo iz ene v drugo fazo in odstopanje od ravnotežja zaradi tega prehoda; ta efekt lahko zmanjšamo z zmanjšanim pretokom ali s povišano temperaturo (Žorž, 1991).

Če določamo retencijski čas iz kromatograma, je potrebno vedeti, da čas med injektorjem in detektorjem vključuje tudi čas, ki ga je komponenta prebila v samih dovodnih in odvodnih ceveh. Torej določimo nekoliko daljši čas, kot je definiran s standardno deviacijo vrha (Žorž, 1991).

Glavne komponente HPLC-sistema so kolona, mobilna faza in črpalka. Kolone so najpomembnejši del HPLC-sistema. Čim manjši so delci njihovega polnila, tem večja je ločljivost kolone. Za mobilno fazo se uporabljajo le čista topila in bidestilirana voda. Črpalka je zelo pomembna, saj mora zagotavljati čim bolj konstanten pretok (Kregar, 1996).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZOREC

V raziskavo sta bila vključena vzorca cvetličnega in goznega medu slovenskega porekla, letnika 2008. Sirupi, ki smo jih uporabili, so bili glukočni, glukočno-fruktozni in invertni sirup. Obema vrstama medu smo dodajali enake deleže posameznih sirupov. Ti deleži so znašali 1 %, 2 %, 4 %, 8 %, 12 %, 16 % in 20 %. Vse analize smo opravili na potvorjenih vzorcih, na osnovnih vrstah medu in sirupih. Skupno število vzorcev je bilo 47. Pred analizami je bil med shranjen v plastičnih posodah na sobni temperaturi. Sirupi so bili v plastenkah, v temnem prostoru in na sobni temperaturi. Analize so obsegale določanje vsebnosti vode, prostih in skupnih kislin ter laktonov, električne prevodnosti, vrednost pH. Merili smo še specifični kot zasuka, aktivnost diastaze in vsebnost HMF. Rezultate smo statistično obdelali. Temu je sledila primerjava rezultatov med posameznimi vzorci potvorjenega medu in pravega medu.

Potvorjene vzorce smo pripravili tako, da smo med najprej utekočinili pri 40 °C. Nato smo pripravili vzorce mase 200 g. Najprej smo stehali ustrezno količino sirupa, ki smo jo dodali polovici potrebnega medu v steklenem kozarčku. Ko smo dodali še preostali med, smo vzorce dobro premešali. Vzorce smo nato ponovno premešali naslednji dan in pred vsako analizo. Ker pa se glukočni sirup ni hotel mešati z medom, smo kozarčke s tem sirupom še enkrat temperirali na 40 °C in jih potem ponovno premešali. Ker to ni zadostovalo in se je glukoza usedla na dno ali pa se je prijela sten kozarca, smo vzorce z njo prelili v druge kozarce. Glukoza smo raztopili z malo destilirane vode in jo potem ponovno vmešali v vzorce.

Preglednica 2: Vrste in deleži dodanih sirupov ter oznake vzorcev medu

Osnovni med	Dodani sirup	Delež sirupa (%)	Oznaka
cvetlični	/	0	C
gozdni	/	0	G
/	glukočno-fruktozni	100	GF
/	glukočni	100	GL
/	invertni	100	IN
cvetlični	glukočno-fruktozni	1	C-1-GF
cvetlični	glukočno-fruktozni	2	C-2-GF
cvetlični	glukočno-fruktozni	4	C-4-GF
cvetlični	glukočno-fruktozni	8	C-8-GF
cvetlični	glukočno-fruktozni	12	C-12-GF
cvetlični	glukočno-fruktozni	16	C-16-GF
cvetlični	glukočno-fruktozni	20	C-20-GF
gozdni	glukočno-fruktozni	1	G-1-GF
gozdni	glukočno-fruktozni	2	G-2-GF
gozdni	glukočno-fruktozni	4	G-4-GF
gozdni	glukočno-fruktozni	8	G-8-GF
gozdni	glukočno-fruktozni	12	G-12-GF
gozdni	glukočno-fruktozni	16	G-16-GF

"se nadaljuje"

nadaljevanje Preglednice 2: Vrste in deleži dodanih sirupov ter oznake vzorcev medu

Osnovni med	Dodani sirup	Delež sirupa (%)	Oznaka
gozdni	glukozno-fruktozni	20	G-20-GF
cvetlični	glukozni	1	C-1-GL
cvetlični	glukozni	2	C-2-GL
cvetlični	glukozni	4	C-4-GL
cvetlični	glukozni	8	C-8-GL
cvetlični	glukozni	12	C-12-GL
cvetlični	glukozni	16	C-16-GL
cvetlični	glukozni	20	C-20-GL
gozdni	glukozni	1	G-1-GL
gozdni	glukozni	2	G-2-GL
gozdni	glukozni	4	G-4-GL
gozdni	glukozni	8	G-8-GL
gozdni	glukozni	12	G-12-GL
gozdni	glukozni	16	G-16-GL
gozdni	glukozni	20	G-20-GL
cvetlični	invertni	1	C-1-IN
cvetlični	invertni	2	C-2-IN
cvetlični	invertni	4	C-4-IN
cvetlični	invertni	8	C-8-IN
cvetlični	invertni	12	C-12-IN
cvetlični	invertni	16	C-16-IN
cvetlični	invertni	20	C-20-IN
gozdni	invertni	1	G-1-IN
gozdni	invertni	2	G-2-IN
gozdni	invertni	4	G-4-IN
gozdni	invertni	8	G-8-IN
gozdni	invertni	12	G-12-IN
gozdni	invertni	16	G-16-IN
gozdni	invertni	20	G-20-IN

3.2 FIZIKALNOKEMIJSKE METODE

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

- določitev vsebnosti vode v medu z ročnim refraktometrom,
- določitev električne prevodnosti z laboratorijskim konduktometrom,
- določitev vrednosti pH, vsebnosti prostih in skupnih kislin ter laktonov,
- določitev specifičnega kota zasuka medu s polarimetrom,
- določitev aktivnosti encima diastaze z metodo po Schadeju,
- določitev vsebnosti hidrosimetilfurfurala (HMF) z metodo HPLC.

3.2.1 Določanje vsebnosti vode v medu z ročnim refraktometrom (AOAC 969.38, 1999)

Princip:

Določanje vsebnosti vode s pomočjo ročnega refraktometra na osnovi merjenja lomnega količnika medu.

Aparatura in oprema:

- Abbejev ročni refraktometer s skalo, prilagojeno za med, in termometrom za temperaturno korekcijo: (Attago hand refractometer HHR-2N),
- 50 ml čaše in steklene palčke.

Priprava vzorca :

Če je med tekoč, ga pred začetkom analize premešamo s palčko ali pretresemo. Če je med kristaliziran, damo zaprto posodo z vzorcem v sušilnik in segrevamo pri temperaturi 40 °C. Ko se utekočini, ga hitro ohladimo in premešamo.

Izvedba analize (Golob, 1999):

Na merilno prizmo ročnega refraktometra s plastično žličko nanese tanko plast medu tako, da v medu ni nobenih zračnih mehurčkov. Merilno prizmo moramo popolnoma prekriti. Nato nežno zapremo poklopec refraktometra in pritisnemo, da se med razporedi po celotni površini prizme. Refraktometer je umerjen na 20 °C. Refraktometer usmerimo proti viru svetlobe in pogledamo skozi okular. Merjeno vrednost odčitamo v točki, kjer mejna črta seka skalo. Če temperatura merjenja odstopa od 20 °C, odčitamo še korekcijsko vrednost na korelacijski skali, ki je na spodnji strani refraktometra. Odčitano korekcijsko vrednost prištejemo ali odštejemo od izmerjene vrednosti, odvisno od temperature merjenja. Takoj po opravljeni meritvi med obrišemo, prizmo pa očistimo z destilirano vodo ter jo obrišemo do suhega.

Rezultat:

Iz skale direktno odčitamo masni delež vode, pri tem pa upoštevamo temperaturno korekcijsko vrednost.

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

Princip:

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

Aparature in oprema:

- laboratorijski konduktometer Cyberbscan 510 PC,
- ročni konduktometer CD 601 WP,
- plastične čaše 100 ml in paličice.

Priprava vzorca:

Medu najprej izmerimo vsebnost vode. Glede na to izračunamo, koliko medu moramo stehtati, da bo končna raztopina medu vsebovala 20 % masni delež suhe snovi. Medu nato dodamo destilirano vodo in ga mešamo s stekleno palčko, dokler se popolnoma ne raztopi.

Izvedba analize:

Konduktometer pred začetkom merjenja umerimo z 0,1 M raztopino kalijevega klorida, katerega električna prevodnost je 12,88 mS/cm pri temperaturi 25 °C. Pred merjenjem elektrodo speremo z destilirano vodo in jo nato do suhega obrišemo. Elektrodo potopimo v raztopino medu in izmerimo električno prevodnost. Izmerimo tudi temperaturo.

Rezultati:

Rezultate direktno odčitamo s konduktometra v obliki mS/cm. Če temperatura ni bila enaka 20 °C, potem vrednost električne prevodnosti izračunamo s pomočjo korekcijske tabele s temperaturami.

3.2.3 Določanje vrednosti pH, vsebnosti prostih in skupnih kislin ter laktonov (AOAC 962.19, 1999)**Princip:**

Direktno merjenje vrednosti pH v raztopini medu s pomočjo pH metra s kombinirano ion selektivno stekleno elektrodo.

Določanje vsebnosti prostih in skupnih kislin ter laktonov s pomočjo titracijske metode z NaOH in HCl.

Reagenti:

- 0,05 M NaOH
- 0,05 M HCl
- Indikator metilranž
- boraks (NBB_4O_7)

Priprava in standardizacija:

Standardno raztopino baze pripravimo tako, da iz podatkov o gostoti in koncentraciji izračunamo ustrežno maso kristalov NaOH, ki jih nato raztopimo in razredčimo z vodo do prave koncentracije.

Pripravljeni NaOH titriramo s HCl točno določene molarnosti (0,05 M) do preskoka v čebulno barvo. Točno molarnost NaOH izračunamo iz sledeče enačbe:

$$c(\text{NaOH}) \cdot V(\text{NaOH}) = c(\text{HCl}) \cdot V(\text{HCl}) \quad \dots (10)$$

- 0,05 M HCl

Standardno raztopino kisline pripravimo tako, da iz podatkov o gostoti in koncentraciji izračunamo ustrezen volumen izhodne, t.j. koncentrirane kisline, nato razredčimo z vodo do prave koncentracije.

Odtehtamo med 0,1 in 0,15 g boraksa ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) v erlenmajerico in ga raztopimo v 100 ml destilirane vode. Dodamo nekaj kapljic indikatorja metiloranža in titriramo s pripravljeno HCl. Ekvivalentna točka nastopi pri preskoku barve iz rumene v čebulno barvo. Točno molarnost HCl izračunamo iz naslednje enačbe:

$$c(\text{HCl}) = 2 \cdot \frac{m(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7)}{M(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) \cdot V(\text{HCl})} \quad \dots(11)$$

c = koncentracija raztopine v mol/ml

V = volumen v ml

M = molarnost v g/mol

m = masa v g

Aparatura in oprema:

- pH meter MA 5736 Methron s kombinirano ion selektivno stekleno elektrodo (serijska številka: 4581)
- magnetno mešalo Rotamix 550 MNA,
- 100 ml čaše in steklene palčke.

Priprava vzorca:

V 100 ml čašo odtehtamo 10 g vzorca in ga raztopimo v 75 ml destilirane vode.

Izvedba analize:

Umeritev pH metra:

pH meter umerimo s pomočjo dvotočkovnega umerjanja s pufroma znanih vrednosti pH, in sicer pH 4 in pH 9.

Vzorec:

K raztopljenemu medu dodamo magnet in vse skupaj postavimo na električno mešalo. Po kalibraciji pH metra potopimo elektrodo slednjega v raztopino in zabeležimo vrednost pH. Titriramo z 0,05 M NaOH do pH 8,5. Dodamo 10 ml 0,05 M NaOH in z 0,05 M HCl titriramo do vrednosti pH 8,3.

Slepi vzorec:

Titracija 85 ml destilirane vode z 0,05 M NaOH do pH 8,5.

Rezultati:

vrednost pH direktno odčitamo z zaslona aparature.

Kislost izrazimo kot število miliekvivalentov v kilogramu vzorca (meq/kg).

Proste kisline (FA):

$$FA = (a - b) \cdot c(\text{NaOH}) \cdot 100 \quad \dots(12)$$

Laktoni (LA):

$$LA = (10\text{ml} - \text{ml } 0,05\text{M HCl pri 2. titraciji vzorca}) \cdot c(\text{HCl}) \cdot 100 \quad \dots(13)$$

Skupne kisline (TA):

$$TA = FA + LA \quad \dots(14)$$

a = V (ml) 0,05 M NaOH pri 1. titraciji vzorca

b = V (ml) 0,05 M NaOH pri titraciji slepega vzorca

3.2.4 Merjenje specifičnega kota zasuka medu s polarimetrom (Junk in Pancoast, 1973)

Princip:

Specifični kot zasuka je kot zasuka ravnine linearno polarizirane svetlobe, pri valovni dolžini natrijeve D linije pri 20 °C vodne raztopine medu, v 20 cm cevi polarimetra.

Reagenti:

Carrezova raztopina I:

10,6 g kalijevega fero cianida ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) raztopimo v destilirani vodi in dopolnimo do 100 ml.

Carrezova raztopina II:

24 g cinkovega acetata ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) raztopimo v destilirani vodi, dodamo 3 g ledene oetne kisline in dopolnimo z destilirano vodo do oznake. Tako pripravljeno raztopino pustimo stati 24 h.

Aparati in oprema:

- polarimeter KRUSS optronic,
- čaše (50 ml), merilne bučke (50 ml), liji, filtrirni papir (modri trak), erlenmajerice (100 ml) in pipeta (10 ml).

Priprava vzorca:

Odehtamo $6,0 \pm 0,5$ g vzorca medu (to ustreza približno 5 g suhe snovi) v 50 ml stekleno čašo in ga raztopimo v destilirani vodi. Ko se med raztopi, ga kvantitativno prenesemo v 50 ml merilno bučko. Dodamo 5 ml Carrezove raztopine I in temeljito mešamo 30 s. Nato dodamo 5 ml Carrezove raztopine II in temeljito mešamo 30 s. Z destilirano vodo dopolnimo do oznake. Tako pripravljeno pustimo stati 24 h.

Izvedba analize:

Po 24 h raztopino prefiltriramo skozi modri trak filtrirnega papirja. Prve ml filtrata zavržemo. Preostali bistri filtrat natočimo v cev polarimetra, ki jo vstavimo v polarimeter. Izmerimo kot zasuka.

Rezultati:

Specifični kot zasuka, ki ovrednoti vsebnost sladkorjev v raztopini, izračunamo po enačbi:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c} \quad \dots(15)$$

- $[\alpha]_D^{20}$... specifični kot zasuka raztopine izražen v stopinjah (°) pri valovni dolžini 589,3 nm (natrijeva D- linija) in temperaturi 20 °C (° cm³/g dm)
- α ... izmerjeni kot zasuka linearno polarizirane svetlobe v kotnih stopinjah (°)
- l...dolžina kivete izražena v dm
- c.. koncentracija raztopine v g/100 ml

3.2.5 Določanje aktivnosti encima diastaza z metodo po Schadeju (Bogdanov, 2009)

Princip:

Standardna raztopina škroba ob prisotnosti raztopine joda razvije različno intenzivno barvo, ki je odvisna od aktivnosti encima v vzorcu medu pod standardnimi pogoji. Intenzivnost modre barve s časom pada. Za določitev časa, potrebnega za zmanjšanje absorbance na 0,235, narišemo graf absorbance v odvisnosti od časa ter skozi najmanj tri točke potegnemo premico. Število 300 delimo s časom, izraženim v minutah, in tako dobimo diastazno število. To število izraža aktivnost diastaze kot volumen (v ml) 1 % raztopine škroba, ki jo encim iz 1 g medu hidrolizira v 1 uri pri 40 °C.

Reagenti:

- 0,5 M raztopina natrijevega klorida (NaCl):

2,9 g natrijevega klorida raztopimo v destilirani vodi in nato dopolnimo do 100 ml.

- acetatni pufer (pH = 5,3):

43,5 g natrijevega acetata ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) raztopimo v destilirani vodi. Dodamo približno 10,5 ml ledene očetne kisline in z destilirano vodo dopolnimo do 250 ml.

- škrobna raztopina

Raztopina mora biti dnevno sveža.

- osnovna raztopina joda
- dnevna raztopina joda

Določitev suhe snovi v škrobu:

Odtehtamo približno 2 g škroba v tehtič in sušimo 90 min pri 130 °C. Tehtiče pustimo približno 1 uro v eksikatorju, nato stehtamo. Iz izgube mase lahko določimo vsebnost vode v škrobu oziroma vsebnost suhe snovi.

Priprava škrobne raztopine:

V 100 ml čašo odtehtamo količino škroba, ki ustreza masi 2 g suhega škroba. Dodamo nekaj kapljic destilirane vode, tako da se škrob rehidrira. Vse skupaj kvantitativno prenesemo v 100 ml bučko. Čašo spiramo z vročo destilirano vodo. S slednjo tudi dopolnimo bučko, tako da ta vsebuje približno 60 ml. Bučko pokrijemo z alufolijo, ki ima luknjico. Bučko postavimo na kuhalnik in pustimo, da 10 min počasi vre. Vmes mešamo. Nato bučko čim hitreje ohladimo pod tekočo vodo. Z destilirano vodo dopolnimo do 100 ml.

- Osnovna raztopina joda

11 g joda pomešamo z 22 g kalijevega joda in raztopimo v 30 do 40 ml destilirane vode. Nato razrečimo do 500 ml.

- Dnevna raztopina joda

Raztopina mora biti dnevno sveža.

V 30-40 ml destilirane vode raztopimo 20 g kalijevega jodita, prelijemo v 500 ml merilno bučko, dodamo 2 ml osnovne raztopine joda in dopolnimo z destilirano vodo do oznake.

Aparatura in oprema:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 2000 series,
- vodna kopel,
- steklene čaše, steklene merilne bučke, steklene erlenmajerice in steklene palčke.

Priprava raztopine medu:

V 50 ml čašo odtehtamo 10 g vzorca. Dodamo 15 ml destilirane vode in 5 ml acetatnega pufra. Vzorec raztopimo. Nato v 50 ml merilno bučko vlijemo 3 ml raztopine natrijevega klorida, dodamo raztopino medu in dopolnimo z destilirano vodo do oznake.

Določitev modre vrednosti škroba:

V čaši zmešamo 5 ml škroba in 10 ml vode. V čašo damo 5 ml dnevne raztopine joda in 0,5 ml škrobne raztopine. To razredčimo s toliko ml vode, da je vrednost absorbance pri 660 nm med 0,770 in 0,745.

Izvedba analize:

Slepi vzorec:

Zmešamo 10 ml pripravljene raztopine vzorca in 5 ml vode. Od te raztopine vzamemo 0,5 ml in dodamo 5 ml raztopine dnevnega joda in količino destilirane vode, ki smo jo določili za modro vrednost škroba. Absorbanco zmerimo takoj pri valovni dolžini 660 nm.

Merjenje absorbance:

V 100 ml erlenmajerico s pipeto odmerimo 10 ml pripravljene raztopine medu. V čašo odmerimo vsaj 6 ml škrobne raztopine. Erlenmajerjevo bučko in čašo damo v vodno kopel pri 40 °C za 15 min. Po tem času v erlenmajerico dodamo 5 ml škrobove raztopine. Po točno 5 minutah damo v čašo 0,5 ml vzorca in 5 ml joda. To dobro premešamo. Nato dodamo količino vode, ki ustreza modri vrednosti škroba, in ponovno premešamo. Absorbanco izmerimo takoj pri valovni dolžini 660 nm. Meritev ponavljamo, dokler absorbanca ne pade pod vrednost 0,155; naredimo minimalno tri meritve.

Rezultati:

V grafikon vpišemo vrednosti absorbance v odvisnosti od časa v minutah. Skozi najmanj tri točke, kjer je absorbanca med 0,456 in 0,155, potegnemo premico. Tako določimo čas (t), kjer reakcijska zmes doseže vrednost absorbance 0,235. Število 300 delimo s časom, izraženim v minutah, in tako dobimo diastazno število (DN). To število izraža aktivnost diastaze kot volumen (ml) 1 % raztopine škroba, ki jo encim iz 1 g medu hidrolizira v 1 uri pri 40 °C.

3.2.6 Določanje vsebnosti hidroksimetilfurfurala (HMF) z metodo HPLC (Bogdanov, 2009)

Princip:

Hidroksimetilfurfural določamo v čisti, filtrirani vodni raztopini medu, s pomočjo HPLC-ja z UV detektorjem. Signal nato primerjamo s signalom standarda, čigar koncentracijo poznamo.

Reagenti:

Mobilna faza: mešanica milli-Q vode in metanola v razmerju 9:1.

Standardne raztopine:

- 5-(hidroksimetil-)furan-2-karbaldehid (HMF)

Pripravljamo ga dnevno svežega.

Pripravimo 0,2, 0,5, 1, 2, 5 in 10 mg/l vodne raztopine.

Standardne raztopine hranimo v hladilniku pri 4 °C, saj je HMF zelo občutljiv na temperaturo in svetlobo.

Aparatura in oprema:

- HPLC, Agilent 1100 z DAD
- ultrazvočna kopel,
- steklene čaše, steklene merilne bučke, steklene palčke,
- najlonska filtra z porami velikosti 0,22 µm in 0,45µm,
- brizgalke.

Priprava vzorca:

Priprava raztopine metanola:

Pripravimo raztopino metanola in vode v razmerju 1:9. Raztopino ohladimo na 4 °C.

V 50 ml čašo odtehtamo približno 10 g medu. Med s pomočjo ultrazvočne kopeli raztopimo v približno 25 ml raztopine metanola. Ko je vzorec raztopljen, ga kvantitativno prenesemo v 50 ml merilno bučko in z raztopino metanola dopolnimo do oznake. Bučke ohladimo na 4 °C. Vzorec filtriramo skozi najlonska filtra velikosti 0,45 µm in 0,22 µm.

Pogoji kromatografije:

- hitrost pretoka 1,0 ml/min,
- količina injiciranja 20 µl vzorca ali standarda,
- detekcija: UV 285 nm
- kolona Gemini C18 (Phenomenex, 150 mm · 2,0 mm · 3 µm)
- temperatura 25 °C

Rezultati:

Vsebino HMF v vzorcu izračunamo s pomočjo primerjave površine pika vzorca s površino pikov standardnih vzorcev. Med območjem pika in koncentracijo HMF obstaja linearna povezava. Rezultate zapišemo kot mg/kg na eno decimalko natančno.

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Pri statistični analizi so bile uporabljene naslednje metode:

- a) Osnovni statistični parametri:
 - aritmetična sredina,
 - standardni odklon,
 - koeficient variabilnosti in
 - mediana.

Zadnja dva osnovna statistična parametra sta bila narejena le pri aktivnosti diastaze v cvetličnem medu.

- b) Analiza statističnih podatkov za posamezno statistično spremenljivko z:
 - Levenovim testom homogenosti varianc,
 - analizo varianc (ANOVA) in
 - Duncanovim testom.
- c) Analiza povezanosti dveh spremenljivk s:
 - Pearsonovim koeficientom korelacije (r).
- d) Neparametrični testi.

3.3.1 Enovzorčna analiza

3.3.1.1 Aritmetična sredina ali povprečje

Povprečje je vrednost, za katero velja, da če bi bili vsi podatki enaki, bi bili enaki povprečju. Za izračun povprečja lahko uporabljamo tri načine: aritmetično sredino, geometrijsko sredino in harmonično sredino. Način izračunavanja je odvisen od vrste podatkov (Košmelj, 2001).

Aritmetična sredina je najpogosteje uporabljena srednja vrednost. Na vrednost aritmetične sredine vplivajo vse vrednosti. Standardna oznaka za aritmetično sredino podatkov x_1, x_2, \dots, x_n je \bar{x} . Aritmetična sredina leži med vrednostnimi x_1, x_2, \dots, x_n . vsaka posamezna vrednost x_i se od \bar{x} odklanja navzgor ali navzdol. Aritmetična sredina je postavljena tako, da je vsota odklonov enaka 0 (Košmelj, 2001).

Aritmetično sredino izračunamo tako, da seštejemo vse vrednosti spremenljivke x_i in vsoto delimo s številom podatkov n . Izjemno velike oz. izjemno majhne vrednosti, torej osamelci, močno vplivajo na vrednost aritmetične sredine, zato je bolje, da računamo brez teh osamelcev (Košmelj, 2001).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{(i=1)}^n x_i \quad \dots(16)$$

3.3.1.2 Varianca in standardni odklon

Varianca vzorca (s^2) je merilo razpršenosti podatkov oziroma variiranja okoli aritmetične sredine. Izračunamo jo iz enačbe (17), kot povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Kadar je število statističnih enot vzorca manjše od 30, je imenovalac v enačbi zmanjšan za eno (Adamič, 1989).

Varianca je za statistično analizo podatkov zelo pomembna, kot opisni parameter pa manj, saj kvadrat merske enote ene spremenljivke pogosto nima pravega smisla. Zato se pogosto uporablja standardni odklon ali standardna deviacija, ki je kvadratni koren variance. Standardni odklon izračunamo po enačbi (18) (Adamič, 1989).

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)} \quad \dots(17)$$

$$SD = s = \sqrt{s^2} \quad \dots(18)$$

3.3.1.3 Koeficient variabilnosti

Za primerjavo variiranja več statističnih spremenljivk z različnimi povprečnimi vrednostmi absolutne mere varianc (kot sta npr. varianca in standardni odklon) običajno niso primerne. Objektivno primerjavo takšnih statističnih spremenljivk nam omogoča koeficient variabilnosti (19), ki ga izračunamo tako, da standardno deviacijo delimo z aritmetično sredino opazovanega vzorca in dobljeno vrednost izrazimo v odstotkih (Adamič, 1989).

$$KV (\%) = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad \dots(19)$$

3.3.1.4 Mediana

Mediana (Me) ali centralna vrednost je tista vrednost spremenljivke, od katere ima polovica enot manjše, polovica pa večje vrednosti spremenljivke. Mediana ima manjši pomen kot aritmetična sredina pri statističnem sklepanju, saj ni povezana z nobeno teoretično porazdelitvijo. Prav slednje pa se izkaže kot prednost v primeru asimetrične porazdelitve statistične mase (Adamič, 1989).

Kljub temu da mediano lahko izračunamo, jo je preprosteje določiti, kadar so podatki rangirani, t.j. urejeni po velikosti od najmanjše do največje vrednosti. Če je število enot liho, je mediana enaka srednji vrednosti enote v ranžirni vrsti, če pa je število sodo, je mediana povprečje srednjega para podatkov (Adamič, 1989).

3.3.2 Dvovzorčna analiza

Medsebojno zvezo dveh spremenljivk (x,y) preučujemo s statistično metodo korelacije in regresije. Tako ugotavljamo, ali obstaja povezanost med spremenljivkama in kakšne vrste je, ali pa poizkušamo na osnovi ene spremenljivke napovedati vrednost druge (Adamič, 1989).

Korelacija obe spremenljivki obravnava kot neodvisni, naključni in odvisni od napak pri merjenju. Na obe delujejo biološki in drugi dejavniki variabilnosti. Korelacija se razlikuje glede na smer povezanosti in zato lahko govorimo o pozitivni ali negativni. Korelacija je lahko velika, majhna ali pa je sploh ni (Adamič, 1989).

3.3.2.1 Koeficient korelacije po Pearsonu

Pearsonov koeficient korelacije (r) je merilo linearne povezanosti dveh številskih spremenljivk, ki sta naključni, med seboj povezani, vendar ne nujno odvisni ena od druge. Koeficient je enak razmerju med kovarianco (C_{xy}) (21) in zmnožkom standardnih deviacij za obe spremenljivki x in y (s_x in s_y) (20).

$$r = \frac{C_{xy}}{s_x \cdot s_y} \quad \dots(20)$$

$$C_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n [(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})] \quad \dots(21)$$

Koeficient korelacije po Pearsonu ima lahko vse vrednosti med -1 (maksimalno negativna korelacija) in +1 (maksimalno pozitivna korelacija). Pozitivne vrednosti pomenijo, da vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, negativne pa, da vrednost ene spremenljivke raste, druge pa pada. Vrednost 0 pomeni, da med obema spremenljivkama ni nobene povezanosti. Na osnovi velikosti koeficienta korelacije lahko sklepamo, kako močna je povezava med statističnimi enotami. Kadar je vrednost koeficienta korelacije nad 0,7, govorimo o močni povezanosti. Velikost koeficienta korelacije pa nam ne pove ničesar o tem, če je povezava značilna (Adamič, 1989). Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti so navedene v preglednici 3.

Preglednica 3: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti spremenljivk (Seljak, 1996)

Korelacijski koeficient (r)	Povezanost
od 0,00 do $\pm 0,20$	povezanosti ni
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

3.3.2.2 Koeficient determinacije

Koeficient determinacije (r^2) vrednoti kakovost regresijskega modela in je kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (r). Izraža delež variance odvisne številske spremenljivke (y), ki je pojasnjen z regresijskim modelom ene ali več neodvisnih spremenljivk (x) (Košmelj, 2001).

Povezava med dvema obravnavanima spremenljivkama je močna, ko je koeficient determinacije večji od 0,5.

3.3.3 Večvzorčna analiza ene spremenljivke

Statistične metode temeljijo na postavljanju, preverjanju in nato sprejemanju ali zavračanju domnev. Tako moramo najprej jasno postaviti osnovno (alternativno) domnevo (H_1), ki v splošnem pravi, da se preiskovane vrednosti med seboj statistično značilno razlikujejo. Tej domnevi priredimo nasprotno, ničelno domnevo (H_0), ki trdi, da razlik ni ali pa so zgolj naključne. Pred preverjanjem domnev določimo kritično oziroma zgornjo mejo tveganja (α), pri kateri bomo zavrnili H_0 , kar je naš cilj, saj s tem potrdimo H_1 . V biostatistiki so najpogosteje izbrane vrednosti α 0,05, 0,01 ali 0,001. Glede na te meje govorimo tudi o 5 %, 1 %, in 0,1 % stopnji značilnosti rezultatov. Nato za podatke, ki jih želimo analizirati, izberemo ustrezen statistični test. Če je izračunana vrednost izraza manjša od kritične vrednosti, ki jo pri izbrani stopnji tveganja in številu prostostnih stopinj odčitamo iz ustrezne statistične preglednice, zavrnemo H_0 in sprejmemo H_1 . V nasprotnem primeru, H_0 ne moremo zavrniti in H_1 ne moremo sprejeti (Adamič, 1989).

3.3.3.1 Parametrični in neparametrični testi

Večina statističnih metod temelji na predpostavkah v zvezi s porazdelitvijo populacije. Ker preverjamo domneve o parametrih populacije, jih imenujemo parametrične metode. Pomanjkljivost parametričnih testov je predvsem v tem, da je ponavadi predpostavka o normalni porazdelitvi populacije le slabo utemeljena, kar lahko privede do negotovosti in možnih napak. Po drugi strani pa imajo parametrične metode večjo moč odkrivanja statističnih značilnosti in so primernejše za analizo podatkov, ki zahtevajo več vzorcev ali skupin (Adamič, 1989).

Neparametrični testi nam omogočajo hitrejše in preprostejše računanje, saj ne temeljijo na predpostavki o normalni ali drugačni porazdelitvi populacije. Ti testi so tudi manj občutljivi, kar pomeni večjo verjetnost, da bo statistična značilnost nekega rezultata ostala neodkrita (Adamič, 1989).

3.3.3.2 Levenov test homogenosti variance

Pri tem testu iz vsakega vzorca zgradimo nov vzorec, v katerem so združene absolutne vrednosti odmikov od povprečne vrednosti opazovanega vzorca. Na novih vzorcih, ki

opisujejo disperzije statističnih enot znotraj posameznih vzorcev, izvedemo analizo variance, s katero preverimo homogenost varianc neodvisnih vzorcev. Osnovna domneva (22) pri Levenovem testu pravi, da med vsaj enim parom varianc obstaja statistično značilna razlika, ničelna (23) pa, da razlik med variancama ni:

$$H_0 : s_1 = s_2 = \dots = s_n \quad \dots(22)$$

$$H_1 : s_1 \neq s_2 \quad \dots(23)$$

Stopnja značilnosti oz. signifikance (*Sig*) pove, katera izmed domnev je prava. Stopnja značilnosti, ki je manjša od stopnje tveganja 0,05, vodi k sprejetju osnovne domneve, vrednost večja od 0,05 pa k potrditvi ničelne domneve. Slednja je tista, ki si jo želimo, saj pomeni, da smemo vzorce medsebojno primerjati z dejansko analizo variance, ki sledi (Golob, 2006).

Levenov test je uporaben tudi, kadar za obravnavano spremenljivko ne moremo privzeti normalne porazdelitve, saj je ta test manj občutljiv na morebitno odstopanje podatkov od normalne porazdelitve (Košmelj in Kastelec, 2003).

3.3.3.3. ANOVA – Analiza variance

Analiza variance je parametrična metoda, ki temelji na dejstvu, da so porazdelitve vzorcev ene statistične spremenljivke normalne in da se variance statističnih vzorcev med seboj statistično ne razlikujejo. Enakost varianc ali homogenost varianc predhodno preverimo z Levenovim testom. Bistvo analize varianc je v tem, da celotno varianco vseh enot iz vseh vzorcev razstavimo na komponente, iz katerih je sestavljena, t.j. na varianco enot v vsaki posamezni skupini ali vzorcu in na varianco med temi skupinami (Adamič, 1989).

Ničelna domneva trdi, da vsi vzorci izhajajo iz populacije z enakimi povprečji, in da varianca med skupinami ni večja od variance znotraj teh skupin. Osnovna domneva pa trdi, da med opazovanimi statističnimi vzorci obstajata vsaj dva, katerih povprečji se statistično značilno razlikujeta. Kadar je stopnja značilnosti manjša od 0,05, sklepamo, da vzorci pripadajo različnim populacijam oz., da med statističnimi vzorci obstaja vsaj en par, ki ima različni povprečji. S tem je zavržena ničelna hipoteza, ki pravi, da razlike ne obstajajo (Adamič, 1989).

3.3.3.4 Duncanov test

Duncanov test je zaključni test namenjen analizi večjega števila vzorcev. Ti vzorci so homogeni, kar predhodno preverimo z Levenovim testom, a ne pripadajo isti populaciji, kar preverimo s testom ANOVA. Razlikovanje vzorcev je osnovano na večkratnem preizkušanju variacijskih razmikov. Stopnja značilnosti temelji na številu neodvisnih primerjav med aritmetičnimi sredinami. S pomočjo tega testa lahko razdelimo posamezne vzorce v več podskupin, v katerih se vzorci, glede na opazovano statistično spremenljivko, statistično značilno ne razlikujejo (Adamič, 1989).

3.3.3.5 Studentov t-test

Če primerjamo dva majhna vzorca, nam standardni odklon vzorcev postane nezanesljiv cenilec za standardni odklon populacije. Tako preizkus domneve o razlikah med njunima povprečjema ne more temeljiti na normalni porazdelitvi, temveč na t-porazdelitvi. V tem primeru *t*-test sloni še na dodatni predpostavki. Računati moramo skupen standardni odklon za oba vzorca, to pa smemo storiti le, če se varianci obeh vzorcev med seboj ne razlikujeta (Adamič, 1989).

Pri preizkušanju ničelne domneve o razliki med povprečjema dveh majhnih, neodvisnih vzorcev uporabljamo enačbo (24), kjer je s_s skupen standardni odklon za oba vzorca. n_1 je število enot v prvem vzorcu, n_2 je število enot v drugem vzorcu, \bar{x}_1 je povprečna vrednost prvega vzorca, \bar{x}_2 pa povprečna vrednost drugega vzorca (Adamič, 1989).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \dots(24)$$

3.3.3.6 Kruskal-Wallisov test

Ta test je neparametričen in se lahko uporablja za večvzorčno analizo enega samega faktorja. Pri tem testu izhajamo iz predpostavke, da imamo n neodvisnih vzorcev, za katere želimo ugotoviti, ali obstajajo med njimi značilne razlike. Uporabljamo ga lahko tudi, kadar podatki ne izvirajo iz normalno distributivne populacije ali kadar variance vzorcev niso homogene (Kazmier, 1988).

Pri izvedbi Kruskal-Wallisovega testa vse podatke rangiramo ne glede na to, iz katere skupine je posamezna enota. Range vsake skupine seštejemo in vnesemo v enačbo (25). Če so vzorci dovolj veliki, t.j. večji kot pet enot, postane porazdelitev H zelo podobna porazdelitvi hi-kvadrat. Pri tem testu ne moremo trditi, katere skupine se med seboj razlikujejo in katere ne. Test kaže le na značilnost razlike med vsemi skupinami (Adamič, 1989).

$$H = \frac{12}{n \cdot (n+1)} \cdot \sum \frac{T_v^2}{n_v} - 3 \cdot (n+1) \quad \dots(25)$$

n ... število vseh enot

n_v ... število enot v posameznem vzorcu

T_v ... vsota rangov v posameznem vzorcu

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Praktični del diplomske naloge je obsegal določanje vsebnosti vode, merjenje električne prevodnosti, določanje vrednosti pH, določanje vsebnosti prostih in skupnih kislin ter laktonov, določanje specifičnega kota zasuka, določanje aktivnosti encima diastaze in določanje vsebnosti hidroksimetilfurfurala v 47 vzorcih. Analize so bile opravljene na dveh vzorcih medu (cvetlični in gozdni med), ki sta služila kot osnova, na treh sladkornih sirupih in na 42 vzorcih potvorjenega medu. Sladkorni sirupi so bili glukozni (Cargill Sweet M 01277), glukozno-fruktozni (Cargill Tru Sweet 01750) in invertni sirup (Mercator Emba). Osnovni cvetlični in gozdni med sta bila letnik 2008. Potvorili pa smo ju junija 2009, in sicer z dodatkom 1, 2, 4, 8, 12, 16 in 20 % sladkornega sirupa.

Posamezne fizikalnokemijske parametre smo opisali z osnovnimi statističnimi parametri in jih obdelali z različnimi statističnimi metodami. S pomočjo slednjih smo iskali razlike in povezave med analiziranimi parametri oziroma dodano količino sladkornega sirupa.

Preglednica 4: Rezultati fizikalnokemijskih analiz v osnovnih vzorcih medu in sladkornih sirupih

Parameter	Med		Sirup		
	cvetlični	gozdni	glukozni	glukozno-fruktozni	invertni
vsebnost vode (g/100g)	15,3	14,7	12,7	29,3	21,1
elek. prevodnost (mS/cm)	0,790	1,756	0,026	0,051	0,840
vrednost pH	5,06	5,54	6,96	4,80	7,52
proste kisline (meq/kg)	12,66	20,47	1,06	2,40	2,69
skupne kisline (meq/kg)	12,87	21,20	1,31	2,13	2,95
laktoni (meq/kg)	0,23	0,75	0,00	0,00	0,00
specifični kot zasuka (°)	-7,405	-0,185	105,016	-9,207	-16,010
diastazno število	14,97	19,16	/	/	/
HMF (mg/kg)	2,81	0,21	18,61	21,13	0,70

4.1 REZULTATI VSEBNOSTI VODE V ANALIZIRANIH VZORCIH

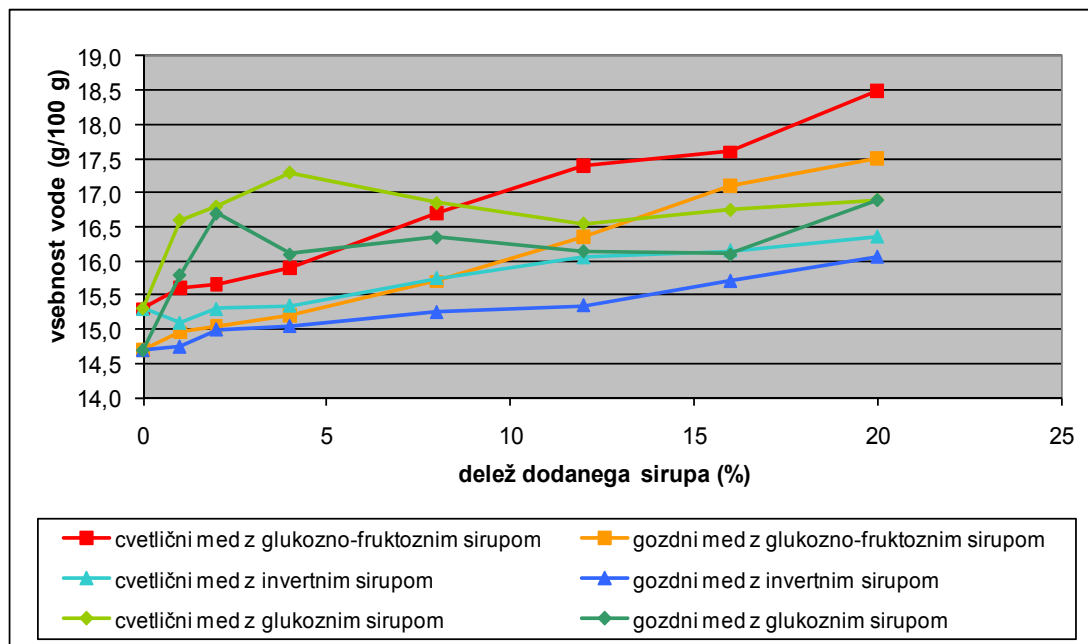
Rezultati merjenja vsebnosti vode so podani v preglednici 4, sliki 10 in v prilogi A. V preglednicah so podane povprečne vrednosti dveh ali več paralelk. Pri pripravi vzorcev z dodatkom glukoznega sirupa smo zaradi netopnosti slednjega sirup topili v vodi. Količine slednje pa nismo volumsko določili, zato vsebnost vode v teh vzorcih ni odvisna le od prvotne količine v medu in količine dodanega sirupa. Rezultati merjenja vsebnosti vode vzorcev z dodatkom glukoznega sirupa so predstavljeni v sliki 10, a niso obrazloženi, saj niso smiselni, ker količina dodane vode ni znana.

Iz preglednice 4 je razvidno, da sta obe vrsti osnovnega medu ustrezali Pravilniku o medu (2004), saj sta vsebovala manj kot 20 % vode. Gozdni med je vseboval manj vode kot cvetlični, in to za 0,6 %. Med sladkornimi sirupi je največ vode vseboval glukozno-fruktozni sirup, kar 29,3 %, najmanj pa glukozni sirup, ki je vseboval le 12,7 % vode.

Iz priloge A in slike 10 je razvidno, da vsi vzorci ustrezajo Pravilniku (2004), čeprav je bila nekaterim dodana poleg sirupa tudi voda.

Ker je glukozno-fruktozni sirup vseboval 29,3 % vode (preglednica 4) se je vsebnost vode tako cvetličnega kot gozdnega medu večala z večanjem dodatka sirupov. V cvetličnem medu se je vsebnost vode pri 20 % dodatku sirupa povečala za 3,2 %, v gozdnem pa za 2,8 %. Za obe vrsti potvorjenega medu lahko rečemo, da se je bolj občutno povečanje vsebnosti vode pokazalo šele pri dodatkih 8 % glukozno-fruktoznega sirupa in več.

Invertni sirup je vseboval 21,1 % vode (preglednica 1). Kar pomeni, da je vseboval več vode kot osnovni vrsti medu. Zato se je vsebnost vode z večanjem dodatka sirupa v vzorcih povečevala. Pri cvetličnem medu se je vsebnost vode, če primerjamo osnovni med in vzorec z 20 % dodanega sirupa, povečala za 1,1 %, pri gozdnem pa za 1,4 %. Pri obeh vrstah medu se je vsebnost vode povečevala v majhnih deležih, saj je bil največji preskok med vzorcema C-4-IN in C-8-IN, ki je znašal 0,4 %.



Slika 10: Vsebnost vode v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa

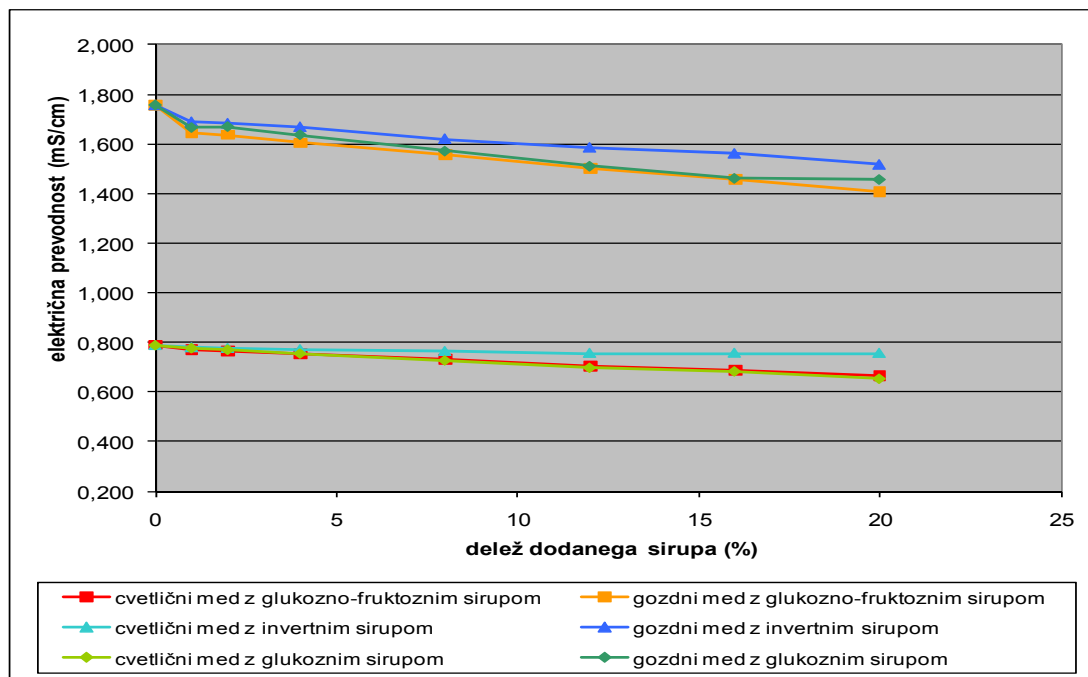
Če primerjamo vpliv glukozno-fruktoznega sirupa in invertnega sirupa, lahko sklepamo, da ima glukozno-fruktozni sirup večji vpliv na povečanja vsebnosti vode v medu. To si razlagamo s tem, da je imel glukozno-fruktozni sirup večjo vsebnost vode kot invertni sirup. Pri obeh sirupih pa lahko rečemo, da samo z določanjem vsebnosti vode v medu ne moremo sklepati, da je med potvorjen, saj je tudi z 20 % dodanega sirupa potvorjen med še vedno ustrezajo pravilniku.

4.2 REZULTATI MERJENJA ELEKTRIČNE PREVODNOSTI

Rezultati merjenja električne prevodnosti so podani v preglednici 4, sliki 11 ter prilogi A. Poleg povprečne vrednosti paralelek so v prilogi A podane še meritve, opravljene z ročnim konduktometrom. Rezultatov merjenj z ročnim konduktometrom nismo upoštevali pri izračunu povprečne vrednosti, uporabili smo jih samo za kontrolo merjenj z laboratorijskim konduktometrom.

Na osnovi rezultatov merjenja el. prevodnosti ugotavljamo, da sta oba vzorca medu ustrezala zahtevam Pravilnika o medu (2004). Vendar je bil cvetlični med blizu zgornje dovoljene meje, ki jo določa pravilnik (0,8 mS/cm). Med sirupi sta imela glukozni in glukozno-fruktozni sirup zelo nizki električni prevodnosti, saj sta bila oba pod mejo 0,1 mS/cm. Invertni sirup pa je imal veliko višjo električno prevodnost, in sicer 0,840 mS/cm.

Če dobljene rezultate v prilogi A in sliki 11, primerjamo s Pravilnikom (2004), lahko ugotovimo, da so kljub potvorbi vsi vzorci ustrezali pravilniku: v potvorjenih vzorcih cvetličnega medu vrednosti električne prevodnosti niso presegle 0,8 mS/cm, vrednosti vzorcev gozdnega medu pa niso bile nižje od te vrednosti.



Slika 11: Električna prevodnost v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa

Tako pri cvetličnem, kot gozdnem medu so se z večanjem dodatka glukoznega sirupa vrednosti električne prevodnosti zmanjševale, saj je bila električna prevodnost sirupa zelo nizka. Pri cvetličnem medu je bila razlika v vrednosti električne prevodnosti med nepotvorjenim medom in medom, ki smo mu dodali 20 % sirupa, 0,137 mS/cm, pri gozdnem pa je bila razlika večja (0,298 mS/cm).

Ker je imel glukozno-fruktozni sirup nizko električno prevodnost, so se vrednosti prevodnosti zmanjševale ob dodajanju sirupa medu. Pri cvetličnem medu se je vrednost električne prevodnosti zmanjšala (med z 20 % sirupa) za 0,126 mS/cm, pri gozdnem pa občutno več, in sicer za 0,35 mS/cm.

Ker je imel invertni sirup višjo električno prevodnost kot cvetlični med, smo pričakovali, da se bodo njene vrednosti z večanjem deleža sladkornega sirupa rahlo večale. Vendar so se vrednosti do vključno z vzorcem C-12-IN nekoliko znižale, nato pa so se začele rahlo višati. Če primerjamo prvo in zadnjo meritev, se je električna prevodnost znižala za 0,013 mS/cm. V vzorcih gozdnega medu pa so se vrednosti električne prevodnosti nižale, in sicer od prvega do zadnjega vzorca za 0,239 mS/cm.

Tako kot pri določanju vsebnosti vode lahko tudi za merjenje električne prevodnosti ugotovimo, da samo s to analizo ne moremo dokazovati potvorbe, saj dodatki sirupov premalo vplivajo na vrednosti električne prevodnosti. Pri gozdnem medu so vsi trije sirupi povzročili nižanje električne prevodnosti, najbolj jo je znižal dodatek glukozno-fruktoznega sirupa. Pri cvetličnem medu pa je invertni sirup na koncu rahlo dvignil vrednosti električne prevodnosti, medtem ko se je pri ostalih dveh sirupih vrednost nižala. Tako kot pri gozdnem medu se je tudi tukaj najbolj znižala pri glukozno-fruktoznem sirupu.

4.3 REZULTATI MERJENJA VREDNOSTI pH

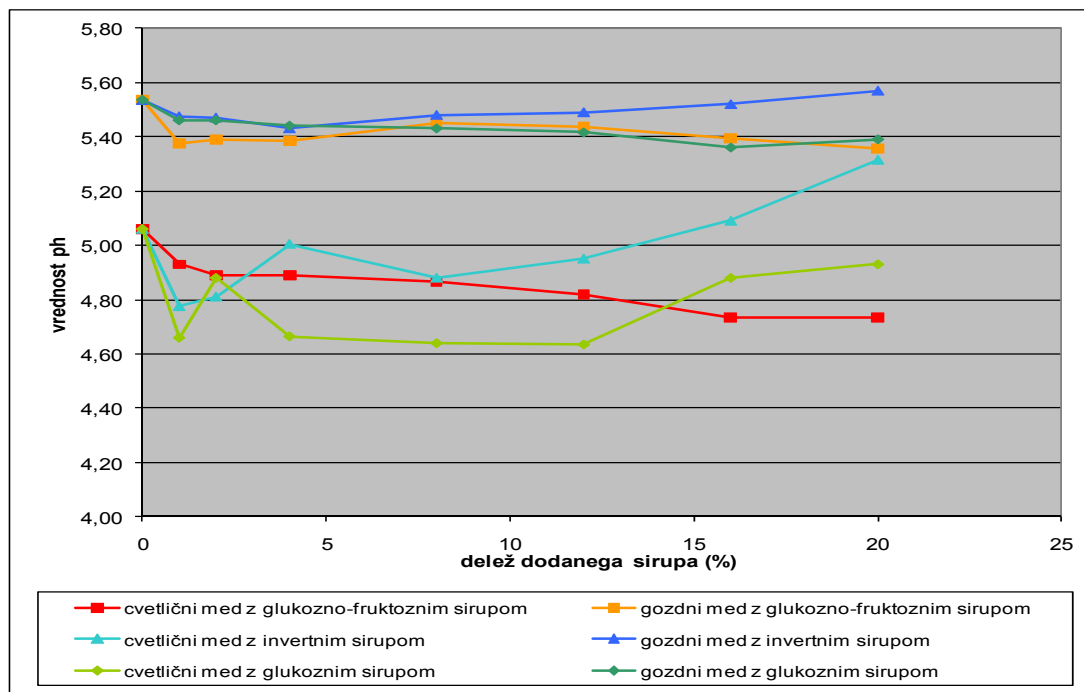
Rezultati merjenja vrednosti pH so podani v preglednici 4, sliki 12 ter v prilogi A. Meritve smo opravljali v dveh paralelkah. V preglednicah so podane povprečne vrednosti, ki so izrisane tudi v grafu.

Vrednost pH je pomemben parameter kakovosti medu in je odvisna od prisotnosti organskih kislin. Te so v ravnotežju z njihovimi pripadajočimi laktoni, estri in nekaterimi anorganskimi ioni, kot so fosfat, sulfat in klorid (Terrab in sod., 2001). Gozdni med je imel višjo vrednost pH kot cvetlični med. Med sirupi je imel glukozno-fruktozni sirup nižjo vrednost pH od medu, medtem ko sta imela preostala dva sirupa višjo vrednost pH. Invertni sirup je imel vrednost pH že v bazičnem območju.

Kljub temu, da je imel glukozni sirup višjo vrednost pH od osnovnih vrst medu to ni povzročilo višanja vrednosti pH z večanjem dodatka glukoznega sirupa. Na sliki 12 tako vidimo, da se je pri gozdnem medu vrednost pH ves čas nižala, razen pri zadnji meritvi. Pri cvetličnem medu se je vrednost pH najprej nižala, nato višala, pa spet nižala in višala (priloga A in slika 12). Vrednost pH se je najbolj spremenila pri gozdnem medu, za 0,18, pri cvetličnem pa za 0,42. Pri razlagi teh rezultatov pa moramo upoštevati tudi to, da smo pri pripravi vzorcev glukozni sirup redčili z vodo, katere količina ni bila enaka pri vseh vzorcih.

Glukozno-fruktozni sirup je imel nižji pH od obeh osnovnih vrst medu (preglednica 4). Če pogledamo prilogo A in sliko 12, vidimo, da se je vrednost pH cvetličnega medu ob dodatku tega sirupa nižala ali pa ostala nespremenjena. Pri gozdnem medu se je ob 1 %

deležu sirupa znižala, nato pa naraščala do 8 % deleža sirupa. Po tem se je vrednost ponovno znižala. Pri obeh vrstah medu je bila vrednost pH osnovnega medu najvišja. Vzorec z 20 % dodatkom sirupa je imel najnižjo vrednost pH. Pri cvetličnem medu se vrednost pH od prvega do zadnjega vzorca znižala za 0,32, pri gozdnem pa za 0,18.



Slika 12: Vrednost pH v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa

Kot navajata Božnar in Senegačnik (1998) naj bi bil med, kateremu je dodan industrijsko invertiran sladkor, precej bolj kisel, saj pri razpadu saharoze lahko nastajajo mravljična in nekatere druge kisline. Vendar je imel sam invertni sirup v naši raziskavi vrednost pH višjo od osnovnih vrst medu. Pri cvetličnem medu se je tako vrednost pH znižala do tretje meritve, nato je pri četrti zvišala, potem znižala in nato ponovno zvišala. Pri gozdnem medu je vrednost pH ravno tako nihala, saj se je najprej znižala, nato zvišala do četrte meritve, po tej se je ponovno znižala in nato spet naraščala. Pri obeh vrstah medu je bila najvišja vrednost pH pri dodatku 20 % sirupa.

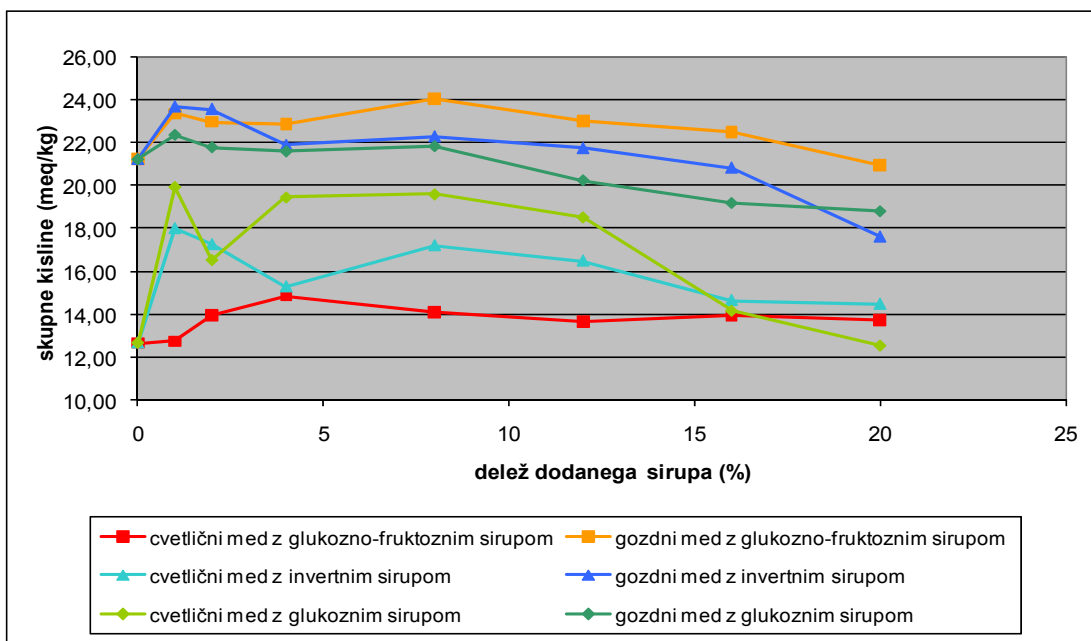
Pri glukoznem in glukozno-fruktoznem sirupu se je vrednost pH med osnovnim medom in vzorcem z 20 % dodanega sirupa znižala, pri invertnem sirupa pa povišala. Pri vseh treh vrstah sirupa vrednost pH ni le naraščala ali se zniževala, zato lahko sklepamo, da je na nihanje rezultatov vplivala puferska kapaciteta medu, ki je zelo kompleksno sestavljen, saj se je upirala spremembi pH.

4.4 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SKUPNIH IN PROSTIH KISLIN TER LAKTONOV

Rezultati določanja vsebnosti prostih in skupnih kislin ter laktonov so podani v preglednici 4 in slikah 13 in 14 ter prilogi B. Za vse tri vrednosti so podane povprečne vrednosti dveh paralelek.

Ugotavljamo, da je največ skupnih in prostih kislin vseboval gozdni med, in sicer 21,20 meq/kg oziroma 20,47 meq/kg. Vsi trije sirupi so v primerjavi z osnovnima vrstama medu vsebovali zelo malo skupnih in prostih kislin. Med njimi jih je imel največ invertni sirup. Če primerjamo rezultate vsebnosti prostih kislin z zahtevami Pravilnika o medu (2004), ugotovimo, da cvetlični in gozdni med ustrezata temu pravilniku, saj ta dovoljuje do 50 meq/kg prostih kislin v medu.

Vsi trije sirupi niso vsebovali laktonov, medtem ko jih je gozdni med imel 0,75 meq/kg in cvetlični 0,23 meq/kg.



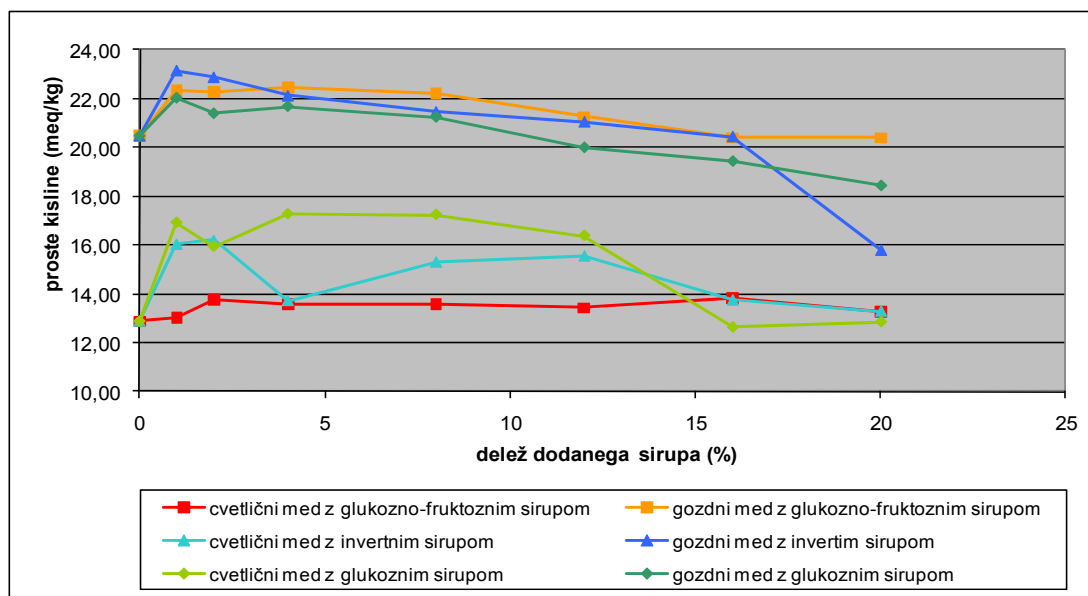
Slika 13: Skupne kisline v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa

Za vzorce cvetličnega medu z dodatki glukoznega sirupa težko govorimo o trendu zmanjševanja vrednosti skupnih kislin, saj so vrednosti nihale. Tako se je vsebnost močno povečala pri 1 % dodanega sirupa (19,93 meq/kg) v primerjavi z osnovnim medom, nato se je vsebnost pri 2 % dodanega sirupa zmanjšala na 16,52 meq/kg in pri 4 % ponovno povečala nad 19 meq/kg. Pri 8 % dodanega sirupa je bila vrednost še malo višja, nato se je močno zmanjšala do vrednosti 12,53 meq/kg. Tako lahko govorimo o zmanjšanju vsebnosti skupnih kislin šele po 8 % dodanega sirupa. V vzorcih gozdnega medu z dodatkom glukoznega sirupa so se vsebnosti skupnih kislin zmanjševale, razen pri 1 % in 8 % dodanega sirupa, vendar sta bili obe vrednosti zelo malo nad 0% in 4%, tako da tu lahko govorimo o trendu zmanjševanja.

Pri dodajanju glukožno-fruktoznega sirupa cvetličnemu medu vidimo, kako so se vsebnosti skupnih kislin najprej večale do vzorca z 4 % dodanega sirupa (14,86 meq/kg), nato so se vsebnosti zmanjšale (14,11 meq/kg), nato pa ponovno naraščale do 16 % dodanega sirupa (13,92 meq/kg), temu je nato pa je sledilo rahlo zmanjšanje. Pri gozdnem medu z glukožno-fruktoznim sirupom zasledimo podobno dogajanje, saj so se vsebnosti tako večale, kot zmanjšale. A vseeno lahko govorimo o trendu zmanjševanja vsebnosti skupnih kislin v vzorcih z več kot 8 % dodanega sirupa.

Kljub temu da je imel invertni sirup manjšo vsebnost skupnih kislin kot osnovni vrsti medu, tudi tu ne moremo govoriti o zmanjševanju vsebnosti z povečanjem deleža sirupa. Pri cvetličnem medu se je najprej vsebnost pri 1 % dodanega sirupa močno povečala (17,98 meq/kg), nato zmanjšala, a pri 8 % ponovno narasla (17,18 meq/kg), a se nato zmanjšala. Pri gozdnem medu lahko opazimo trend zmanjševanja, čeprav se je vsebnost skupnih kislin ravno tako pri 1 % (23,64 meq/kg) in 8 % (22,25 meq/kg) dodanega sirupa povečala.

Obe osnovni vrsti medu sta vsebovali veliko več skupnih kislin kot sirupi (priloga B), zato smo pričakovali, da se bo vsebnost skupnih kislin z naraščanjem dodatka sirupa zmanjšala. Če primerjamo osnovni med in med z 20 % dodanega sirupa, lahko ugotovimo, da je bila v vzorcih gozdnega medu vsebnost skupnih kislin pri vseh treh sirupih manjša. Pri vseh treh vrstah gozdnega medu je tudi viden trend zmanjševanja vsebnosti skupnih kislin, medtem ko za cvetlične vrste medu tega ne bi mogli reči. Pri slednjih je bila le pri dodatku glukoznega sirupa vsebnost skupnih kislin, pri 20 % dodatku sirupa, manjša kot pri osnovnem medu.



Slika 14: Proste kisline v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukožno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa

Vsebnost skupnih kislin je seštevek vsebnosti laktonov in prostih kislin. Ker laktoni predstavljajo manjši delež pri tej vsoti, lahko rečemo, da se s prostimi kislinami dogaja podobno kot skupnimi. Pri gozdnih vrstah medu z dodatki sirupov lahko govorimo o

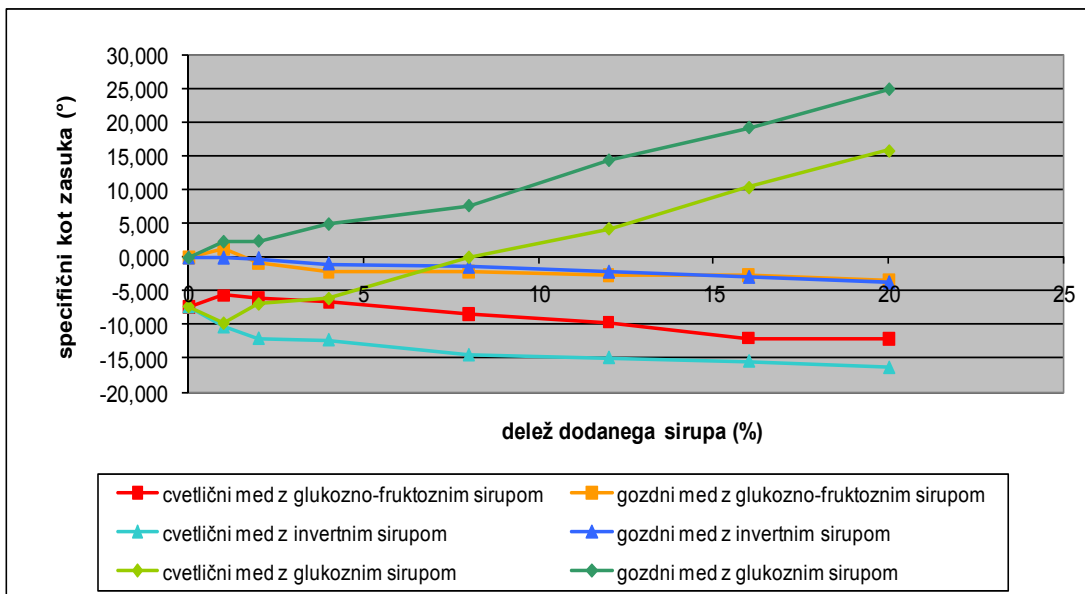
trendu zmanjševanja vsebnosti prostih kislin, čeprav pri nobenem primeru ne gre samo za zmanjševanje vsebnosti, saj so posamezne vsebnosti tudi tu višje od predhodnih. Vendar ni tolikšnih skokov, kot pri cvetličnih vrstah medu, kjer ne moremo govoriti o trendu zmanjševanja.

Vsebnost laktonov je nihala med 0 meq/kg in 2,93 meq/kg, kolikor smo jih določili v cvetličnem medu z glukoznim sirupom pri 1 % dodatka. Pri laktonih ne moremo govoriti o nobeni povezanosti med dodanim deležem sirupa in vsebnostjo laktonov, saj vrednosti zelo nihajo.

4.5 MERJENJE SPECIFIČNEGA KOTA ZASUKA

Analize smo opravili v dveh paralelkah. Povprečja le teh so podana v preglednici 4 in prilogi D ter tudi v sliki 15.

Praviloma je med iz nektarja levosučen in med iz mane desnosučen. Če je levo sučen, potem ima negativni predznak (Božnar in Senegačnik, 1998). Pri naši analizi pa sta se obe vrsti medu pokazala za levosučna, saj imata negativni predznak. Cvetlični med je bil bolj levo sučen, saj je bila vrednosti $[\alpha]_D^{20}$ gozdnega medu blizu vrednosti 0 °. Glukozno-fruktozni sirup je imel podoben $[\alpha]_D^{20}$ kot cvetlični med, medtem ko sta imela ostala dva sirupa višji negativni oz. pozitivni $[\alpha]_D^{20}$.



Slika 15: Specifični kot zasuka v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa

V vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom glukoznega sirupa opazimo trend večanja vrednosti $[\alpha]_D^{20}$, saj so razen pri 1 % dodanega sirupa pri cvetličnem medu vrednosti povsod rastle. Tako je specifični kot zasuka narasel pri cvetličnem iz -7,405 ° na

15,748 ° in pri gozdnem medu iz -0,185 ° na 24,793 °. To smo tudi pričakovali, saj je bil glukozni sirup desnosučen.

Pri dodatku glukozno-fruktoznega sirupa tako v cvetličnem kot gozdnem medu lahko govorimo o trendu zniževanja vrednosti $[\alpha]_D^{20}$, se pravi da so vzorci postajali vedno bolj levosučni. Pri cvetličnem medu se je $[\alpha]_D^{20}$ med osnovnim medom in medom z 20 % dodanega sirupa spremenil za -4,793 ° pri gozdnem pa za -3,380 °. Te rezultate smo pričakovali, saj je imel sirup nižji $[\alpha]_D^{20}$ kot osnovni vrsti medu.

Invertni sirup je bil bolj levosučen od obeh osnovnih vrstah medu, zato so rezultati pričakovani. Pri cvetličnem in gozdnem medu se je z višanjem deleža dodanega sirupa vrednost $[\alpha]_D^{20}$ znižala. Pri cvetličnem medu se je vrednost znižala za -8,983 ° in pri gozdnem za -3,522 °.

4.6 DOLOČANJE DIASTAZNEGA ŠTEVILA

Analizo smo opravili v dveh paralelkah, razen pri cvetličnem medu, kjer smo opravili šest meritev. Za te meritve smo opravili tudi analizo z osnovnimi statističnimi parametri (preglednica 5).

Preglednica 5: Osnovni statistični parametri za diastazno število osnovnega vzorca cvetličnega medu

vzorec	Osnovni statistični parametri						
	n	\bar{x}	x_{\min}	x_{\max}	s	KV (%)	Me
C	6	14,97	13,25	16,98	1,30	8,68	14,89

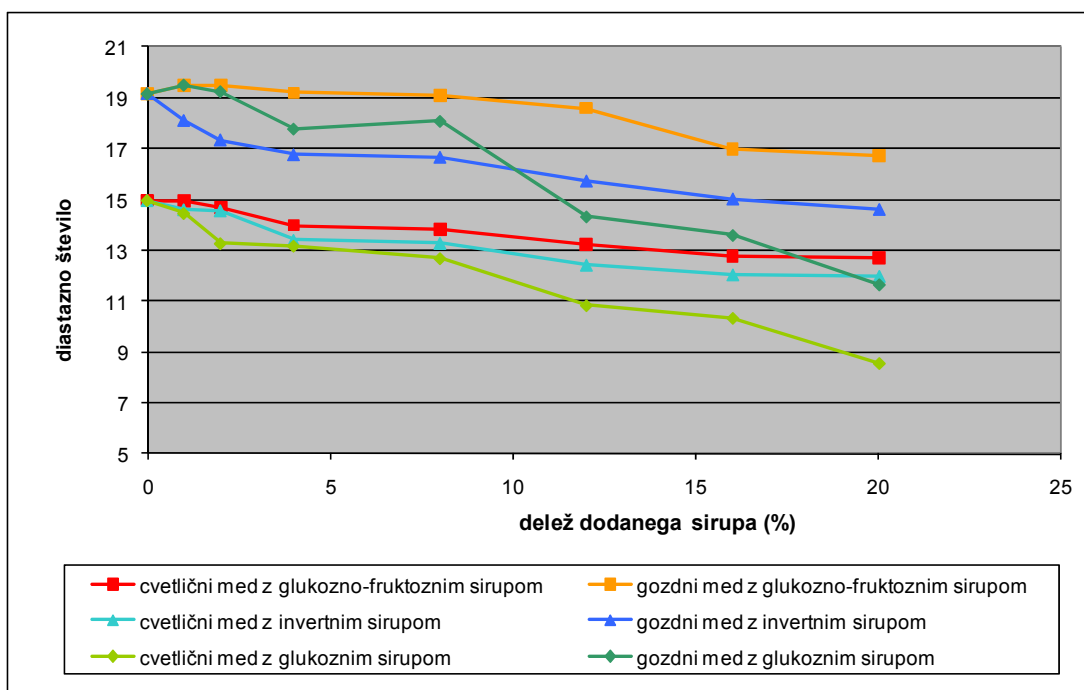
Iz preglednice 5 je razvidno, da je bila najmanjša vrednost diastaznega števila (x_{\min}) 13,25 in največja (x_{\max}) 16,98. Med njima je razlika 3,73. Standardni odklon (s) je znašal 1,30, koeficient variabilnosti 8,68 % in mediana 14,89.

Povprečni rezultati so predstavljeni v preglednici 4, sliki 16 in prilogi D. Gozdni med je imel višje diastazno število (DŠ) kot cvetlični med, in sicer za 4,2. Pri vseh treh sirupih diastazne aktivnosti nismo dokazali. Ti rezultati so pričakovani, saj v sirupih naj ne bi bilo encima diastaze.

Ker glukozni sirup ni vseboval encima diastaze, smo pričakovali, da se bo vrednost DŠ z večanjem dodatka sirupa zniževala. To se pri cvetličnem medu lepo vidi, medtem ko pri gozdnem še vedno lahko govorimo sicer o trendu zniževanja, vendar je pri 1 % in 8 % dodanega sirupa vrednost DŠ višja kot pri predhodnem vzorcu. Nihanja pri sicer opaznem zniževanju vrednosti, bi lahko pripisali napaki pri merjenju diastaznega števila ali pa tudi slabši homogenosti vzorcev. Pri cvetličnem medu je razlika v DŠ med osnovnim medom in medom z 20 % dodanega sirupa 6,4, pri gozdnem pa 7,5.

Tudi pri dodajanju glukozno-fruktoznega sirupa opazimo trend zniževanja vrednosti diastaznega števila. Tako pri cvetličnem kot gozdnem medu lahko opazimo rahlo rast vrednosti DŠ med osnovnim vzorcem in vzorcem z 1 % dodanega sirupa. Vendar sta oba porasta zelo majhna. Pri cvetličnem medu je bila razlika v DŠ med osnovnim medom in medom z 20 % dodanega sirupa 2,3, pri gozdnem pa 2,5.

Pri potvorjenih vzorcih z invertnim sirupom je tudi prisoten trend znižanja DŠ z večanjem dodatka sirupa. Pri cvetličnem medu je bila razlika v DŠ med osnovnim medom in medom z 20 % dodanega sirupa 3,0, pri gozdnem pa 4,5. Za med potvorjen z vsemi tremi sirupi lahko ugotovimo, da so razlike med DŠ osnovnih vrst medu in vrst medu z 20 % dodanega sladkorja večje pri gozdnih vrstah medu.

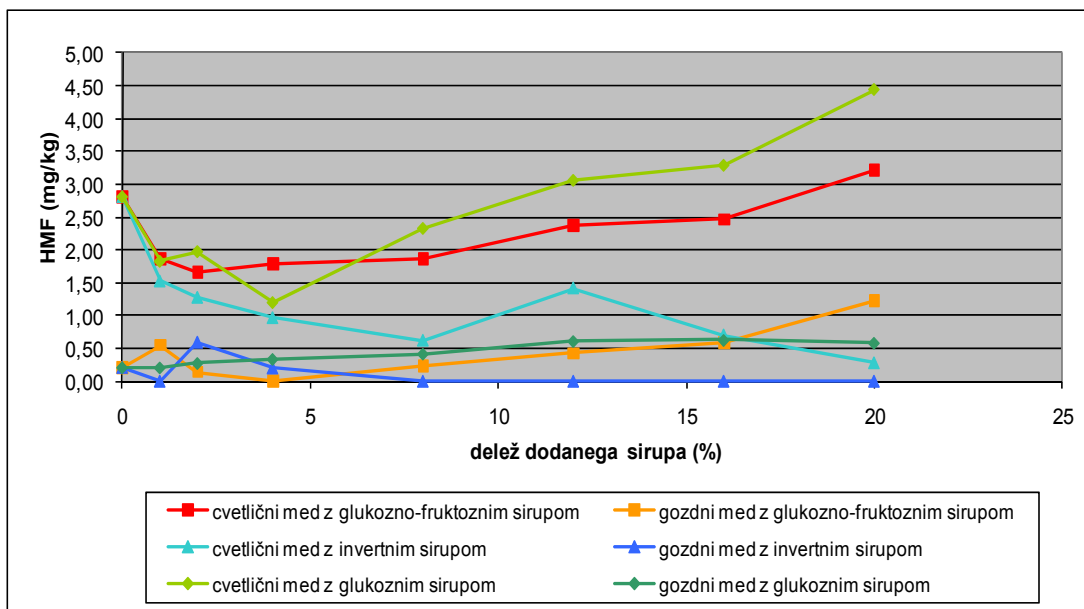


Slika 16: Diastazno število v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa

4.7 DOLOČANJE VSEBNOSTI HIDROKSIMETILFURFURALA

Rezultati merjenja hidroksimetilfurfurala (HMF) so podani v preglednici 4, sliki 17 ter v prilogi D.

Kot je razvidno iz preglednice 4, sta tako cvetlični kot gozdni med vsebovala majhen delež HMF in s tem ustrezala Pravilniku o medu (2004), ki dovoljuje največ 40 HMF mg/kg. Med sirupi ga je največ, in sicer 21,13 mg/kg, vseboval glukozno-fruktozni sirup in najmanj invertni sirup, 0,70 mg/kg.



Slika 17: HMF v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukozno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa

Glukozni sirup je vseboval več HMF kot osnovni vrsti medu, zato smo pričakovali, da se bo vsebnost HMF večala z večanjem deleža dodanega sirupa. Če pogledamo krivulji na sliki 17 in prilogo D, lahko govorimo o trendu rahlega večanja vsebnosti. Pri gozdnem medu je bila razlika v vsebnosti HMF med osnovnim vzorcem in vzorcem z 20 % dodanega sirupa 0,37 mg/kg. Medtem ko pri gozdnem medu le med zadnjima vzorcema zaznamo zelo rahlo zmanjšanje, pa je pri cvetličnem zmanjšanje med meritvami prisotno pri 1 % in pri 4 % dodanega sirupa. Razlika med prvim in zadnjim vzorcem je bila pri cvetličnem medu 1,63 mg/kg. Do odstopanj od pričakovanj je lahko prišlo zaradi tega, ker smo glukozni sirup redčili z vodo.

Pri vzorcih z glukozno-fruktoznim sirupom imamo prav tako splošen trend naraščanja vrednosti HMF z naraščanjem dodajanja sirupa. Pri cvetličnem medu od tega trenda odstopajo vrednosti pri 1 % in pri 2 % dodanega sirupa. Pri gozdnem pa odstopajo meritve pri 1 %, 2 % in pri 4 % dodanega sladkorja. Med prvo in zadnjo meritvijo pri cvetličnem medu je bila razlika 0,41 mg/kg, pri gozdnem pa 1,01 mg/kg.

Invertni sirup je vseboval zelo malo HMF, zato nismo pričakovali, da bi kakorkoli vplival na delež HMF v vzorcih, kjer smo ga dodali. Vsebnosti HMF v vzorcih cvetličnega medu so se gibale med 2,81 mg/kg (osnovni med) in 0,21 mg/kg (20 % dodanega sirupa). Tu lahko govorimo o trendu zmanjšanja, saj se je vrednost povečala, glede na predhodno meritev le pri 8 % dodanega sladkorja. Pri gozdnem medu smo prisotnost HMF določili le pri 2 % in 4 % dodanega sirupa.

4.8 REZULTATI STATISTIČNE OBDELAVE

Rezultate analiz (razen vrednost pH) smo obdelali z različnimi statističnimi metodami, katerih rezultate smo primerjali in ugotavljali ali obstajajo zveze med njimi.

4.8.1 Primerjava vpliva deleža sirupa v vzorcih

- Levenov test homogenosti varianc

S programa za statistično obdelavo rezultatov SPSS 17.0 (SPSS Base, 2009) smo naredili Levenov test homogenosti varianc. Statistična značilnost je bila večja od 0,05 pri skupnih kislinah (0,342), laktonih (0,88) in diastaznem številu (0,289). Pri ostalih parametrih, to so vsebnost vode, električna prevodnost, proste kisline, specifični kot zasuka in vsebnost HMF, smo zavrnilo ničelno hipotezo. S tem smo ugotovili, da vzorcev z različnimi deleži dodanih sirupov glede na te parametre med seboj ne moremo primerjati. Pri vsebnosti skupnih kislin, laktonov in DŠ smo nadaljevali s testom ANOVA in Duncanovim testom.

- ANOVA

Analize varianc smo lahko opravili le za rezultate vsebnosti skupnih kislin, laktonov in diastaznega števila. Pri vsebnosti skupnih kislin in DŠ smo na osnovi stopnje značilnosti 0,001, ki jo je po izračunu podal test, zavrnilo ničelno hipotezo pri 5 % stopnji tveganja. Posledično smo sprejeli hipotezo, ki pravi, da sta med devetimi dodanimi deleži sirupov vsaj dva (lahko pa jih je tudi več), ki se statistično značilno razlikujeta glede na povprečno vrednost tako skupnih kislin kot DŠ. Pri laktonih nismo mogli zavrniti ničelne hipoteze, zato smo za nadaljnje razvrščanje vzorcev v skupine s podobnimi statističnimi značilnostmi uporabili zaključni Duncanov test pri skupnih kislinah in DŠ.

- Duncanov test

Duncanov test je zaključni test, namenjen analizi večjega števila vzorcev, za katere je znano, da so homogeni (Levenov test), a ne pripadajo isti populaciji (ANOVA). Duncanov test smo opravili za vsebnost skupnih kislin in diastazno število. Rezultati so podani v preglednicah 6 in 7. Devet deležev sirupov se po Duncanovi analizi razvrsti v dva razreda: *a* in *b*.

Deleži sirupov, ki so uvrščeni v različne razrede, se med seboj statistično značilno razlikujejo glede na povprečno vrednost skupnih kislin. Deleži v istem razredu pa se med seboj statistično ne razlikujejo. Kot je razvidno iz preglednice 6, lahko rečemo, da se vzorci potvorjenih vrst medu z različnimi deleži sirupa med seboj statistično značilno ne razlikujejo, saj vsi pripadajo istemu razredu. Od njih pa se glede na delež skupnih kislin statistično značilno razlikujejo sami sirupi.

Preglednica 6: Rezultati Duncanovega testa za vsebnost skupnih kislin v vzorcih medu z različnimi deleži sirupa

Delež sirupa (%)	n	Razred ($\alpha \geq 0,05$)	
		a	b
100	3	2,13	
20	6		16,3367
0	2		16,9300
16	6		17,5283
12	6		18,9283
4	6		19,3050
2	6		19,3283
8	6		19,8317
1	6		19,9967
Sig.		1	0,2090

Za oba statistično značilna razreda je podana tudi vrednost statističnega ujemanja – stopnja značilnosti (signifikacija), ki nam pove, kolikšna je razlika med povprečnimi vrednostmi vzorcev znotraj enega razreda. Če je stopnja značilnosti 1, pomeni, da je ujemanje vzorca s samim seboj popolno. Zato ima vrednost signifikacije praktičen pomen le tedaj, kadar sta v razredu vsaj 2 vzorca, kot je v našem primeru v razredu b. Signifikacija tega razreda je 0,209, kar je več kot znaša mejna vrednost statističnega zaupanja, ki je 0,05. S tem je potrjena ničelna hipoteza, ki pravi, da se povprečne vrednosti za vsebnost skupnih kislin potvorjenih vrst medu z različnimi deleži sirupa statistično ne razlikujejo.

Preglednica 7: Rezultati Duncanovega testa za diastazno število v vzorcih medu z različnimi deleži sirupa

Delež sirupa (%)	n	Razred ($\alpha \geq 0,05$)		
		a	b	c
100	3	0,0000		
20	6		12,7067	
16	6		13,4667	13,4667
12	6		14,195	14,195
8	6		15,605	15,605
4	6		15,7217	15,7217
0	3		15,9867	15,9867
2	6			16,4767
1	6			16,81
Sig.		1,0000	0,083	0,081

Pri Duncanovem testu za DŠ smo dobili tri statistične razrede, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo. Razredu a pripadajo čisti sirupi, kar pomeni, da se ti statistično značilno razlikujejo od ostalih vzorcev. Statistično značilno se od vzorcev z 1 % in 2 % dodanega sirupa razlikujejo vzorci z 20 % dodanega sirupa. Vendar se ti vzorci statistično značilno ne razlikujejo od osnovnih vrst medu.

Signifikacija razredov b (0,083) in c (0,081) je višja od mejne vrednosti statističnega zaupanja (0,05), tako da lahko potrdimo ničelni hipotezi. Prva med njima pravi, da se

povprečne vrednosti diastaznega števila osnovnega medu in potvorjenih vrst medu z 1 %, 2 %, 4 %, 8 %, 12 %, 16 % dodanega sirupa statistično ne razlikujejo. Druga pa pravi, da se vzorci z 0 %, 4 %, 8 %, 12 %, 16 % dodanega sirup statistično ne razlikujejo.

- Neparometrični test (Kruskal-Wallisov test)

Ker smo pri analizi ANOVA analizirali le dva parametra, lahko rečemo, da varianca ni homogena razporejena, smo naredili tudi neparometrični test (Kruskal-Wallisov test). Ta je v primerjavi s parametričnimi testi hitrejši in preprostejši, saj ne temelji na predpostavki o normalni ali drugačni porazdelitvi populacije. Vendar je ta test tudi manj občutljiv.

Rezultati neparometričnega testa so podani v preglednici v prilogi E. Iz rezultatov je razvidno, da delež dodanega sirupa statistično značilno vpliva na vsebnost vode in diastazno število. Pri teh dveh analizah je bila signifikacija manjša od 0,05, zato smo lahko zavrgli ničelni hipotezi. Prva pravi, da je delež vode nespremenjen ne glede na delež dodanega sirupa, druga pa, da je diastazno število enako ne glede na delež dodanega sirupa. Pri analizi deleža vode nismo upoštevali rezultatov vzorcev, ki so vsebovali glukozni sirup, ker smo pri teh vzorcih poleg sirupa dodali tudi majhen delež vode, ki pa ni bil enak pri vseh vzorcih.

- Korelacija med posameznimi parametri (Pearsonov koeficient povezanosti)

Pearsonov koeficient korelacije (r) je merilo linearne povezanosti dveh številskih spremenljivk, ki sta naključni, med seboj povezani, vendar ne nujno odvisni ena od druge. V preglednici 8 so prikazani rezultati bivariatne analize, povezanosti dveh neodvisnih spremenljivk. Z dvema zvezdicama (**) so prikazane povezave značilne pri 0,01 stopnji zaupanja, z eno zvezdico (*) pa povezave pri 0,05 stopnji zaupanja. Mejne vrednosti presojanja moči povezanosti so podane v preglednici 3, v poglavju 3.3.2.1.

Iz preglednice 8 je razvidno, da je delež dodanega sirupa pri 0,01 stopnji tveganja v močni povezavi z vsebnostjo skupnih ($r = -0,771$) in prostih kislin ($r = -0,760$), z diastaznim številom ($r = -0,857$) in vsebnostjo HMF ($r = 0,749$). S slednjim je v pozitivni povezavi in s prvimi tremi v negativni povezavi. V močni povezavi so še električna prevodnost z vsebnostjo skupnih in prostih kislin ter z diastaznim številom; vsebnost skupnih kislin z vsebnostjo prostih kislin, z diastaznim številom in z vsebnostjo HMF (negativna). Vsebnost prostih kislin z vsebnostjo laktonov, z diastaznim številom in z vsebnostjo HMF (negativna). Vsebnost HMF je v močni povezavi z diastaznim številom. Vse zgoraj našete močne povezave so pri stopnji zaupanja 0,01. Najmočnejša povezava pa je med vsebnostjo skupnih in prostih kislin. To smo tudi pričakovali, saj so skupne kisline vsota prostih kislin in laktonov. Laktonov pa smo pri vseh vzorcih dokazali malo ali celo nič.

Delež dodanega sirupa je v zmerni korelaciji z vsebnostjo vode, z električno prevodnostjo (negativna) in s specifičnim kotom zasuka (negativna). V zmerni povezanosti so še:

- Vsebnost vode z vsebnostjo skupnih kislin (negativna), z vsebnostjo prostih kislin (negativna), z vsebnostjo HMF in diastaznim številom;
- električna prevodnost z vsebnostjo HMF (negativna) in specifičnim kotom zasuka;
- vsebnost skupnih kislin s specifičnim kotom zasuka;
- vsebnost prostih kislin s specifičnim kotom zasuka;
- vsebnost HMF s specifičnim kotom zasuka;
- specifični kot zasuka z diastaznim številom.

Preglednica 8: Rezultati bivariatne analize primerjave vpliva deleža sirupa v vzorcih potvorjenega medu

	Delež sirupa	Voda	Elek. prevodnost	Skupne kisline	Proste kisline	Laktioni	HMF	Specifični kot zasuka	Diestazno število
delež sirupa sig. (Pearson)	1,000	0,577**	-0,457**	-0,771**	-0,760**	-0,289*	0,749**	-0,556**	-0,857**
voda sig. (Pearson)		1,000	-0,373**	-0,483**	-0,476**	-0,128	0,509**	0,204	-0,541**
elek. prevodnost sig. (Pearson)			1,000	0,831**	0,872**	-0,197	-0,639**	0,426**	0,766**
skupne kisline sig. (Pearson)				1,000	0,989**	0,230	-0,719**	0,511**	0,906**
proste kisline sig. (Pearson)					1,000	0,096	-0,710**	0,520**	0,915**
laktioni sig. (Pearson)						1,000	-0,175	0,091	0,088
HMF sig. (Pearson)							1,000	-0,628**	-0,728**
specifični kot zasuka sig. (Pearson)								1,000	0,482**
diestazno število sig. (Pearson)									1,000

** korelacija je značilna pri 0,01 stopnji zaupanja

* korelacija je značilna pri 0,05 stopnji zaupanja

Delež dodanega sirupa je v šibki negativni povezanosti z vsebnostjo laktonov. Iz preglednice je razvidno, da je to najmanjša povezava med deležem sirupa in izmerjenimi fizikalnokemijskimi parametri. Tako lahko zaključimo, da je delež sirupa v povezavi z vsemi izmerjenimi parametri.

4.8.2 Primerjava glede na vrsto dodanih sirupov

- Neparometrični test (Kruskal-Wallisov test)

Kruskal-Wallisov test se lahko uporablja za večvzorčno analizo enega samega faktorja ali kadar podatki ne izvirajo iz normalno distributivne populacije, ali če variance vzorcev niso homogene.

Rezultati neparometričnega testa so podani v preglednici v prilogi F. Iz rezultatov je razvidno, da vrsta sirupa statistično značilno vpliva na vsebnost vode, HMF in specifični kot rotacije. Pri teh analizah je bila signifikacija manjša od 0,05, zato smo lahko zavrgli ničelne hipoteze. Te so: vsebnost vode se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa, vsebnost HMF se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa in specifični kot zasuka se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa. Signifikacija je bila večja od 0,05 pri električni prevodnosti, vsebnosti skupnih kislin, prostih kislin in laktonov ter diastaznem številu.

- Korelacija med posameznimi parametri (Pearsonov koeficient povezanosti)

V preglednici 9 so prikazani rezultati bivariatne analize, povezanosti dveh neodvisnih spremenljivk. Mejne vrednosti presojanja moči povezanosti so podane v preglednici 3, v poglavju 3.3.2.1.

Preglednica 9: Rezultati bivariatne analize primerjave glede na vrsto dodanih sirupov vzorcema medu

	Vrsta sirupa	Voda	Elek. Prevodn.	Skupne kisline	Proste klisline	Laktone	HMF	Specifični kot zasuka	Diastazno število
Sig. (Pearson)	1,000	-0,166	0,008	0,045	0,033	0,103	0,002	-0,076	-0,167

Iz preglednice je razvidno, da vrsta sirupa ni z nobenim fizikalnokemijskim parametrom v močni, zmerni ali šibki povezavi. Tako lahko ugotovimo, da vrsta sirupa ni v nobeni povezavi z izmerjenimi fizikalnokemijskimi parametri.

4.8.3 Primerjava glede na vrsto medu

- Levenov test homogenosti varianc

Levenov test homogenosti varianc smo naredili s programa za statistično obdelavo rezultatov. Statistična značilnost je bila večja od 0,05 pri vsebnosti vode (0,090), prostih kislin (0,344), pri specifičnem kotu zasuka (0,854) in diastaznem številu (0,289). Pri električni prevodnosti, vsebnosti skupnih kislin, laktonov in HMF, smo zavrnili ničelno hipotezo. S tem smo ugotovili, da vzorcev različnih vrst medu glede na te parametre med seboj ne moremo primerjati. Pri vsebnosti vode, prostih kislin, specifičnem kotu zasuka in DŠ smo nadaljevali s *t*-testom.

- Studentov *t*-test

T-test opravimo takrat, ko imamo le dva majhna vzorca in preizkus domneve o razlikah med njunima povprečjema temelji na *t* porazdelitvi. *T*-test smo opravili za vsebnost vode, prostih kislin, specifičnega kota zasuka in DŠ. Pri vseh teh parametrih smo na osnovi stopnje značilnosti 0,001, ki jo je po izračunu podal test, zavrnilo ničelno hipotezo pri 5 % stopnji tveganja (signifikanca < 0,05). Posledično smo sprejeli hipotezo, ki pravi, da se cvetlični in gozdni med statistično značilno razlikujeta glede na povprečno vsebnost vode in prostih kislin, specifični kot zasuka in DŠ.

- Neparometrični test (Kruskal-Wallisov test)

Rezultati neparometričnega testa so podani v preglednici v prilogi G. Iz rezultatov je razvidno, da vrsta medu statistično značilno vpliva na vsebnost vode, električno prevodnost, vsebnost skupnih kislin, prostih kislin, laktonov in HMF, specifičnega kota rotacije in diastaznega števila. Iz tega sledi, da je bila signifikanca manjša od 0,05 pri vseh analizah. Zato smo lahko zavržli vse ničelne hipoteze, s katerimi smo predvidevali, da se fizikalnokemijski parametri ne spreminjajo glede na vrsto medu. Glede na test lahko ugotovimo, da ima poleg deleža sirupa močan vpliv tudi vrsta medu.

- Korelacija med posameznimi parametri (Pearsonov koeficient povezanosti)

V preglednici 10 so prikazani rezultati bivariatne analize, povezanosti dveh neodvisnih spremenljivk. Z dvema zvezdicama (**) so prikazane povezave značilne pri 0,01 stopnji zaupanja, z eno zvezdico (*) pa povezave pri 0,05 stopnji zaupanja. Mejne vrednosti presojanja moči povezanosti so podane v preglednici 3, v poglavju 3.3.2.1.

Preglednica 10: Rezultati bivariatne analize primerjave glede na vrsto medu

	Vrsta medu	Voda	Elek. Prevodn.	Skupne kisline	Proste klisline	Laktoni	HMF	Specif. kot zasuka	Diestazno število
Sig. (Pearson)	1,000	-0,333*	0,987**	0,838**	0,899**	-0,392**	-0,747**	0,519**	0,736**

** korelacija je značilna pri 0,01 stopnji zaupanja

* korelacija je značilna pri 0,05 stopnji zaupanja

Iz preglednice 10 je razvidno, da je vrsta medu pri 0,01 stopnji tveganja v močni povezavi z električno prevodnostjo ($r = 0,987$), vsebnostjo skupnih ($r = 0,838$) in prostih kislin ($r = 0,899$), z diastaznim številom ($r = 0,636$) in vsebnostjo HMF ($r = -0,747$). Z vsebnostjo HMF je vrsta medu v močni negativni korelaciji. Vrsta medu je v zmerni povezanosti s specifičnim kotom zasuka. V šibki negativni povezanosti pa je z vsebnostjo vode in laktonov. Vrsta medu je tako v povezavi z vsemi fizikalnokemijskimi rezultati naših raziskav.

5.2 SKLEPI

Na podlagi opravljenih fizikalnokemijskih analiz in statistične obdelave rezultatov lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Z večanjem deleža dodanega sirupa (glukozno-fruktozni in invertni sirup) se je večala vsebnost vode v vzorcih. Vendar samo z analizo vsebnosti vode v vzorcu ne moremo dokazati, da je med potvorjen, če nimamo rezultatov nepotvorjenega medu.
- Dodajanje sirupa medu je sicer vplivalo na vrednosti električne prevodnosti, vendar je bil ta vpliv premajhen, da bi lahko s to metodo dokazali potvorbe.
- Pri glukoznem in glukozno-fruktoznem sirupu se je vrednost pH med osnovnim medom in vzorcem z 20 % dodanega sirupa znižala, pri invertnem sirupu pa povišala. Pri potvorjenih vrstah medu z vsemi tremi sirupi so vrednosti pH nihale, torej tudi s to meritvijo ne moremo določiti, kateri med je potvorjen in predvsem kakšen delež sirupa je bil dodan.
- Dodajanje vedno večjih deležev sirupov v med ni imelo velikega vpliva na spremembo vsebnosti skupnih kislin. Pri vzorcih z gozdnim medom smo z večanjem deleža dodanega sirupa opazili trend zmanjševanja vsebnosti skupnih in prostih kislin. Vendar tudi tu, tako kot pri cvetličnem medu, se vsebnost ni zmanjševala ves čas pri vseh vzorcih. Za vsebnost laktonov nismo našli nobeni povezanosti z različnimi deleži dodanega sirupa, saj so izmerjene vrednosti nihale.
- Na specifični kot zasuka vzorcev je najbolj vplival dodatek glukoznega sirupa, saj so se tu vrednosti z večanjem količine dodanega sirupa najbolj povečevale. Pri ostalih dveh sirupih pa so se vrednosti nižale v negativne vrednosti.
- Z večanjem deleža sirupa v vzorcih potvorjenega medu se je diastazno število znižalo. Vseeno pa samo na podlagi te analize, ne moremo ugotoviti, če gre za potvorjen med, saj so bile vrednosti diastaznega števila v potvorjenih vzorcih še vedno večje od najnižje vsebnosti predpisane s Pravilnikom o medu (2004).
- Dodajanje sirupa je vplivalo na vsebnost HMF v vzorcu, vendar je bil ta vpliv zelo majhen. Z večanjem vsebnosti glukoznega in glukozno-fruktoznega sirupa se je vsebnost HMF rahlo povečala, pri dodatku invertnega sirupa pa rahlo zmanjšala. Ker pa sta že osnovni vrsti medu vsebovala zelo malo HMF, nam samo določanje vsebnosti HMF ne more služiti kot dokaz potvorjenosti medu.
- Vsi potvorjeni vzorci so kljub potvorbi ustrezali kakovostnim parametrom, ki jih predpisuje Pravilnik o medu (2004).
- Sirupi so se statistično značilno razlikovali od ostalih vzorcev glede na vsebnost skupnih kislin in diastazno število. Statistično značilno so se glede na diastazno število od vzorcev z 1 % in 2 % dodanega sirupa razlikovali vzorci z 20 % dodanega sirupa. Vendar se ti vzorci niso statistično značilno razlikovali od

osnovnih vrst medu. Cvetlični in gozdni med sta se statistično značilno razlikovala glede na povprečno vsebnost vode, prostih kislin, vrednost specifičnega kota zasuka in DŠ.

- Glede na neparametrični test delež dodanega sirupa statistično značilno vpliva na vsebnost vode in diastazno število, vrsta sirupa statistično značilno vpliva na vsebnost vode, HMF in specifični kot rotacije ter vrsta medu statistično značilno vpliva na vsebnost vode, električno prevodnost, vsebnost skupnih kislin, prostih kislin, laktonov in HMF, specifični kot zasuka in diastazno število.
- Delež dodanega sirupa je pri 0,01 stopnji tveganja v močni povezavi z vsebnostjo skupnih in prostih kislin, z diastaznim številom in vsebnostjo HMF. Vrsta sirupa ni v nobeni povezavi z izmerjenimi fizikalnokemijskimi parametri. Vrsta medu je pri 0,01 stopnji tveganja v močni povezavi z električno prevodnostjo, vsebnostjo skupnih in prostih kislin, HMF ter z vrednostjo diastaznega števila.

6 POVZETEK

Med je naravna sladka snov, ki ga čebele *Apis mellifera* pridobivajo iz nektarja ali mane. Nektar izvira iz cvetov ali drugih izločkov živih rastlin, mana pa je izloček žuželk, ki živijo na rastlinah. V panju panjske čebele obdelajo medičino, tako da se ta močno zgosti. Zaradi delovanja čebeljih encimov se spremeni tudi kemijska sestava medičine. Naravni čebelji med vsebuje različne ogljikove hidrate, vodo, organske kisline, proteine, hidroksimetilfurfural, aminokisline, mineralne snovi, encime, lipide, barvila, voske, v vodi topne vitamine in aromatične snovi.

Zaradi omejenosti pridobivanja medu in njegove cene se že zelo dolgo pojavljajo najrazličnejše potvorbe. Poleg dodajanja vode in hranjenja čebel s sladkorji, se pojavlja tudi dodajanje različnih sladkornih sirupov medu. Ker pa je potvorba nedovoljena in je potrošnik vedno bolj ozaveščen, si oblasti prizadevajo za čim večji nadzor nad kakovostjo medu. Ker je slednji naravno in kompleksno živilo, za enkrat še ne obstaja hitra in poceni metoda, ki bi zagotovila popoln nadzor nad potvorbami.

Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti razlike med kakovostnimi parametri naravnega – pristnega in namerno potvorjenega medu. Izhodiščna vzorca sta bila nektarni in manin med. Potvorili smo ju z dodatkom različnih deležev glukoznega, glukozno-fruktoznega in invertnega sirupa.

Fizikalnokemijske analize, ki smo jih opravili na vzorcih, so bile določanje vode z refraktometrom, določanje električne prevodnosti s konduktometrom, določanje vrednosti pH s pH metrom, vsebnosti skupnih in prostih kislin ter laktonov z nevtralizacijsko titracijo, določanje specifičnega kota zasuka medu s polarimetrom, določanje aktivnosti encima diastaze z metodo po Schadeju in določanje vsebnosti hidroksimetilfurfurala z metodo HPLC.

Vsi potvorjeni vzorci so še vedno ustrezali Pravilniku o medu (2004). Čeprav smo pri večini analiz zaznali vpliv dodajanja sirupa osnovnima vzorcema, vseeno za nobeno analizo ne moremo reči, da je sama dovolj, da lahko trdimo, da je nek med potvorjen. Z naraščanjem deleža glukozno-fruktoznega ali invertnega sirupa smo povzročili, da je vsebnosti vode naraščala. Prav tako se je z večanjem deleža sirupa spreminjala električna prevodnost medu, ki je rahlo padala pri dodajanju glukozno-fruktoznega in glukoznega sirupa.

Izmerjene vrednosti pH so pri dodajanju sirupov nihale. Zato lahko sklepamo, da s to analizo ne moremo ugotoviti kateri med je potvorjen. Pri skupnih kislinah smo predvidevali, da bodo vrednosti padale z naraščanjem dodatka sirupa, saj so sirupi vsebovali manj skupnih kislin kot osnovna vzorca. Vendar pa smo trend padanja zasledili le pri gozdnem medu.

Praviloma je med iz nektarja levosučen in med iz mane desnосуčen. Mi pa smo obema osnovnima vzorcema določili levosučenost. Pri potvorjenih vrstah medu smo zasledili trend večanja vrednosti specifičnega kota zasuka pri večanju dodatka glukoznega sirupa. Pri

večanju dodatka ostalih dveh sirupov pa smo zaznali trend nižanja specifičnega kota zasuka.

Sirupi niso vsebovali encima diastaze, zato so naši rezultati pričakovani. Pri večanju dodatka vseh treh sirupov smo tako opazili trend nižanja vrednosti diastaznega števila. Obe osnovni vrsti medu sta vsebovala zelo malo HMF. Pri večanju dodatka glukoznega in glukozno-fruktoznega sirupa smo zaznali trend naraščanja vrednosti HMF, kar je bilo pričakovano, saj sta imela sirupa višjo izmerjeno vrednost HMF kot osnovna vzorca.

S statističnima testoma ANOVA in Duncanovega testa smo ugotovili, da se sirupi v vsebnosti skupnih kislin in diastaznega števila statistično značilno razlikujejo od ostalih vzorcev. Ugotovili smo tudi, da se statistično značilno razlikujejo vzorci z 20 % dodanega sirupa od vzorcev z 1 in 2 % dodanega sirupa. S pomočjo Levenovega in Studentovega *t*-testa pa smo ugotovili, da se cvetlični in gozdni med statistično značilno razlikujeta glede na povprečno vrednost vsebnosti vode, prostih kislin, specifičnega kota zasuka in DŠ.

Z neparametričnim testom smo dokazali, da delež dodanega sirupa statistično značilno vpliva na vsebnost vode in diastazno število. Vrsta sirupa statistično značilno vpliva na vsebnost vode, HMF in specifični kot zasuka. Vrsta medu pa statistično značilno vpliva na vsebnost vode, električno prevodnost, vsebnost skupnih kislin, prostih kislin, laktonov in HMF, specifičnega kota rotacije in diastaznega števila.

S pomočjo Pearsonovega koeficienta povezanosti smo ugotovili, da je delež dodanega sirupa pri 0,01 stopnji tveganja v močni povezavi z vsebnostjo skupnih ($r = -0,771$) in prostih kislin ($r = -0,760$), z diastaznim številom ($r = -0,857$) in vsebnostjo HMF ($r = 0,749$). Vrsta medu je pri 0,01 stopnji tveganja v močni povezavi z električno prevodnostjo ($r = 0,987$), vsebnostjo skupnih ($r = 0,838$), prostih kislin ($r = 0,899$), z diastaznim številom ($r = 0,636$) in vsebnostjo HMF ($r = -0,747$).

Z našo raziskavo smo ugotovili, da je dokazovanje potvorjenosti medu zahtevno in da zato ni dovolj le ena osnovna fizikalnokemijska analiza. Kljub temu da smo pri skoraj pri vseh analizah zaznali vpliv sirupa, pa so bili ti vplivi premajhni, da bi lahko zagotovo trdili, da gre pri katerem vzorcu za potvorjen med. Vendar smo z analizami pokazali, da bi ob obstoju baze z veliko statistično obdelanimi podatki za pristni med nekega geografskega območja lahko z osnovnima analizama lažje posumili o potvorjenosti določenega vzorca.

7 VIRI

- Abram V., Zelenik – Blatnik M. 2002. Vaje iz živilske kemije za študente živilske tehnologije. 2. popravljena izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 15-15
- Abram V. 2003. Vaje iz biokemije za študente agronomije, zootehnike in živilstva. 4. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 12-12
- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani: 195 str.
- Aldcorn D.L., Wandler E., Sporns P. 1985. Diastase (alpha-amylase and beta-amylase) and alpha-glucosidase (sucrase) activity in western Canadian honeys. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18, 3: 268-270
- Anam O.O., Dart R.K. 1995. Influence of metal ions on hidroxymethylfurfural formation in honey. *Analytical Proceedings*, 32, 12: 515-517
- Anklam E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63, 4: 549-562
- AOAC Official Method 969.38. Moisture in honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 21-21
- AOAC Official Method 962.19. Acidity (free, lactone and total) of honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 31-31
- Aurand L.W., Woods A.E., Wells M.R. 1987. Food composition and analysis. New York, AVI Publishing Company: 690 str.
- Babacan S., Pivarnik L.F., Rand A.G. 2002. Honey amylase activity and food starch degradation. *Journal of Food Science*, 67, 5: 1625-1630
- Bath P.K., Singh N. 1999. A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Food Chemistry*, 67, 4: 389-397
- Bogdanov S. 2009. Harmonised methods of the International Honey Commission. Bern, Swiss Bee Research Centre, International Honey Commission, World Network of Honey Science: 63 str.
http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/IHCPapers/IHC-methods_2009.pdf (maj, 2010)
- Bogdanov S., Martin P., Lulleman C. 1997. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, 28:1-59

- 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, Založba Kmečki glas: 376-413
- Breznik M., Kmetec V., Kreft S., Kristl A., Osredkar J., Planinšek O., Pukl M., Urleb U., Zega A., Kikelj D. 2001. Vaje iz inštrumentalne farmacevtske analize. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 51 -55
- Cavia M.M., Fernández – Muiño M.A., Gómez – Alonso E., Montes – Pérez M.J., Huidobro J.F., Sancho M.T. 2002. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: Influence of induced granulation. *Food Chemistry*, 78, 2: 157-161
- Clarke M.A. 2003. Syrups. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 5. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Finglas P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 5711-5717
- Council directive 2001/110/ EC of 20 december 2001 relating to honey. 2002. Official Journal of European Communities, 45, L10: 47-52
- Cordella C.B.Y., Militão J.S.L.T., Clément M.C., Cabrol-Bass D. 2003. Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. Honey floral species characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3234-3242
- Cotte J.F., Casabianca H., Chardon S., Lheritier J., Grenier – Loustalot M.F. 2004. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 4: 698-705
- Doner L.W. 1977. The sugars of honey: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 5: 443-456
- Doner L.W. 2003. Honey. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 5. 2nd ed. Caballero B., Trugo L., Finglas P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3125-3130
- Ensymm Company. 2007. Enzymatic production of invert sugar. Düsseldorf, Ensymm Company: 10 str.
<http://www.ensymm.com/pdf/ensymmProjectstudyreportInversugarproduction.pdf>
(maj, 2010)
- Esti M., Panfili G., Marconi E., Trivisonno M.C. 1997. Valorization of the honey from the Molise region through physico-chemical, organoleptic and nutritional assessment. *Food Chemistry*, 58, 1-2: 125-128
- Fairchild G.F., Capps O., Nichols J.P. 2000. Impact of economic adulteration on the U.S. honey industry. Vancouver, Western Agricultural Economics Association: 20 str.
<http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/36358/1/sp00fa01.pdf> (januar, 2010)

- Fallico B., Zappalá M., Arena E., Verzera A. 2004. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85, 2: 305-313
- Frankel S., Robinson G.E., Berenbaum M.R. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37, 1: 27-31
- Gfeller M., Bogdanov S. 2006. HMF-Gehalt, Invertase- und Diastaseaktivität von in- und ausländischen Honigen – Analyse mit logistischer Regression. *ALP Science*, 499: 16 str. http://www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_Gfeller_M_2006_1613.pdf (Februar, 2010)
- Golob T. 1999. Osnove refraktometrije in elektrolitske prevodnosti. V: Pridelava in kontrola medu v okviru kolektivne blagovne znamke za slovenski med. Golob. T. (ur.). Ljubljana, Čebelarstva zveza Slovenije in Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 49-52
- Golob U. 2006. Vsebnost prolina in beljakovin v različnih vrstah slovenskega medu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 94 str.
- Golob T., Doberšek U., Kump P., Nečemer M. 2005. Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, 91,4: 593–600
- Golob T., Korošec M., Jamnik M., Kropf U., Bertonec J., Kandolf A., Božič J., Zdešar D., Meglič M., Goljat A. 2008. Lastnosti medu. V: Med: značilnosti slovenskega medu. Kandolf A. (ur.). Lukovica, Čebelarstva zveza Slovenije: 25-42
- Hull P. 2010. Glucose syrups: Technology and applications. Chichester, Wiley-Blackwell: 386 str.
- Holobar A. 1996. Merjenje kemijskih parametrov v bioreaktorjih. V: Biotehnologija osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA d.o.o: 669-689
- Johnson J.M. 1993. Fructose. V: Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition. Vol. 3. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 2080-2081
- Junk W. R., Pancoast H. M. 1973. Handbook of sugars for processors, chemists and technologists. Westport, AVI Publishing Company: 295-296
- Kazmier L.J. 1988. Theory and problems of bussines statistics. 2nd ed. New York, McGraw-Hill: 207 str.
- Kelly J.D., Petisco C., Downey G. 2006. Potential of near infrared transfectance spectroscopy to detect adulteration of Irish honey by beet invert syrup and high fructose corn syrup. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14: 139-146

- Klofutar C. 1993. Fizikalno kemijske lastnosti ogljikovih hidratov. V: Ogljikovi hidrati. 15. Bitenčevi živilski dnevi '93. Ljubljana 10.-11. junij 1993. Plestenjak A., Žlender B., Hribar J., Zelenik-Blatnik M. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21-31
- Klofutar C., Šmalc A., Rudan-Tasič D. 1998. Laboratorijske vaje iz kemije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 293 str.
- Košmelj K., Kastelec D. 2003. Uporabna biostatistika. Načrtovanje in analiza poskusov, delovno gradivo za podiplomski študij. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 108 str.
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 239 str.
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija: osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA d.o.o: 609-632
- Kropf U., Jamnik M., Bertonec J., Golob T. 2008. Linear regression model of the ash mass fraction and electrical conductivity for Slovenian honey. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 3: 335-340
- Meglič M. 2004. Čebelji pridelki: pridobivanje in trženje. Brdo pri Lukovici, Čebelarstva zveza Slovenije: 96 str.
- Montilla A., Ruiz-Matute A.I., sanz M.L., Martinez-Castro I., del Castillo M.D. 2006. Diffructose anhydrides as quality markers of honey and coffee. *Food Research International*, 39: 801-806
- Nanda V., Sarkar B.C., Sharma H.K., Bawa A.S. 2003. Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 5:613-619
- Nagai T., Inoue R., Inoue H., Suzuki N. 2002. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals and DPPH radicals. *Nutrition Research*, 22, 4: 519-526
- Ouchemoukh S., Hayette L., Schweitzer P. 2007. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control*, 18, 1: 52-58
- Persano Oddo L., Piazza M.G., Pulcini P. 1999. Invertase activity in honey. *Apidologie*, 30: 57-65
- Pihlar B. 2001. Osnove analize kemije: zapiski predavanj: II del. Ljubljana, Katedra za analizo kemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani: 213-222

- Plestenjak A. 1993. Analitika ogljikovih hidratov. V: Ogljikovi hidrati. 15. Bitenčevi živilski dnevi '93. Ljubljana 10.-11. junij 1993. Plestenjak A., Žlender B., Hribar J., Zelenik-Blatnik M. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21-31
- Plestenjak A. 1999. Fizikalno-kemijske lastnosti medu, zakonodaja, vzorčenje. V: Pridelava in kontrola medu v okviru kolektivne blagovne znamke za slovenski med. Golob. T. (ur.). Ljubljana, Čebelarstva zveza Slovenije in Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 14-17
- Popek S. 2002. A procedure to identify a honey type. *Food Chemistry*, 79, 3: 401-406
- Pravilnik o medu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 31: 3611-3614
- Pravilnik o spremembi pravilnika o medu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 89: 10890-10890
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 376 str.
- Sanz M.L., Polemis N., Morales V., Corzo N., Drakoularakou A., Gibson G.R. 2005. *In vitro* investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8: 2914-2921
- Sato T., Miyata G. 2000. The nutraceutical benefit, part III: Honey. *Nutrition*, 16: 6468-6469
- Scott F.W. 1993. Glucose. V: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Vol. 4. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 2201-2206
- Seljak J. 1996. Statistične metode. Ljubljana, Visoka upravna šola: 197-199
- Sing N., Sing S., Bawa A.S., Sekhon K.S. 1988. Honey- its food uses. *Indian Food Packer*, 42: 15-25
- Sipal partners. 2010. Glucose-fructose syrups. Herve, Sipal partners: 1 str.
<http://www.sipalpartners.com/eng/products/our-products/3-Sipa-Wheat-F9-5> (maj. 2010)
- Sivakesava S., Irudayaraj J. 2002. Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by mid-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 4: 351-360
- Sporns P. 1992. Honey analysis. V: *Encyclopedia of food science and technology*. Hui Y.H. (ed.). Vol. 2. New York, John Wiley and Sons: 1417-1421
- Stark J. 1998. Klasifikacija čebel. V: *Od čebele do medu*. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Založba Kmečki glas: 18-23

- Swallow K.W., Low N.H. 1994. Determination of honey authenticity by anion-exchange liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 77, 3: 695-702
- Terrab A., Vega-Pérez J.M., Diez M.J., Heredia F.J. 2001. Characterisation of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of their sugar components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 2: 179-185
- Vit Olivier P. 1987. Utilidad de la determinación del contenido de nitrógeno en el control de calidad de mieles Venezolanas. *Acta Científica Venezolana*, 38: 511-512
- Vit P., Pulcini P. 1996. Diastase and invertase activities in Meliponini and Trigonini honeys from Venezuela. *Journal of Apicultural Research*, 35, 2: 57-62
- Wang X.H., Andrae L., Engeseth N.J. 2002. Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 23: 6923-6928
- Weston R.J., Brocklebank L.K. 1999. The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*, 64, 1: 33-37
- White J.W.Jr. 1978. Honey. *Advances in Food Research*, 24: 287-374
- White J.W.Jr. 1979. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62, 3: 509-514
- Winkler O. 1955. Beitrag zum Nachweis und zur Bestimmung von Oxymethylfurfural in Honig und Kunsthonig. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 102, 3: 161-167
- Zappala M., Fallico B., Arena E., Verzera A. 2005. Methods for the determination of HMF in honey: A comparison. *Food Control*, 16: 273-277
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 154 str.

ZAHVALE

Najprej se zahvaljujem mentorici prof. dr. Tereziji Golob za njeno strokovno pomoč in vzpodbudo med nastajanjem te diplomske naloge.

Zahvala gre tudi somentorju, dr. Tomažu Polaku, za pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala delovni mentorici Mojci Korošec za vso pomoč in trud tako med opravljanjem praktičnega dela, kot med pisanjem diplomske naloge. Hvala tudi Jasni in Urški za njuno pomoč. Hvala tudi Marinki za vso pomoč pri laboratorijskem delu in njeno potrpežljivost.

Zahvaljujem se tudi recenzentki doc. dr. Nataši Šegatin za strokoven pregled diplomskega dela.

Hvala ga. Lini Burkan in ga. Barbari Slemenik za pomoč pri iskanju in urejanju literature.

Prav posebna zahvala pa gre moji družini, da mi je stala ob strani ves čas mojega šolanja. Hvala za vse spodbude, razumevanje in vzpodbudo.

Nenazadnje hvala vsem sošolcem za nepozabna študijska leta.

PRILOGE

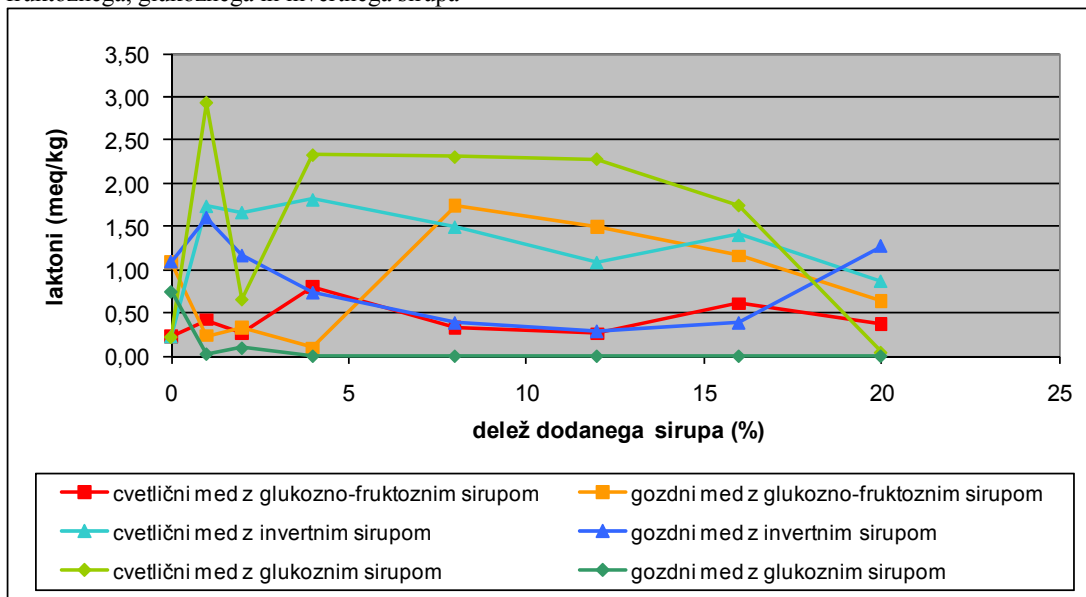
Priloga A: Vsebnost vode, električna prevodnost in vrednost pH v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu potvorjenih z glukozno-fruktoznim, invertnim in glukoznim sirupov

Vzorec	Vsebnost vode (g/100 g)	Električna prevodnost (mS/cm)		Vrednost pH
	povprečje	povprečje	ročni kon.	povprečje
C-1-GF	15,6	0,771	0,710	4,93
C-2-GF	15,7	0,764	0,703	4,89
C-4-GF	15,9	0,755	0,696	4,89
C-8-GF	16,7	0,731	0,675	4,87
C-12-GF	17,4	0,704	0,651	4,82
C-16-GF	17,6	0,686	0,633	4,74
C-20-GF	18,5	0,664	0,617	4,74
G-1-GF	15,0	1,645	1,496	5,38
G-2-GF	15,1	1,637	1,485	5,39
G-4-GF	15,2	1,605	1,456	5,39
G-8-GF	15,7	1,558	1,420	5,45
G-12-GF	16,4	1,503	1,366	5,44
G-16-GF	17,1	1,456	1,324	5,40
G-20-GF	17,5	1,406	1,406	5,36
C-1-IN	15,1	0,780	0,724	4,78
C-2-IN	15,3	0,777	0,777	4,81
C-4-IN	15,4	0,772	0,772	5,01
C-8-IN	15,8	0,769	0,764	4,88
C-12-IN	16,1	0,761	0,756	4,95
C-16-IN	16,2	0,767	0,762	5,09
C-20-IN	16,4	0,769	0,761	5,32
G-1-IN	14,8	1,688	1,688	5,48
G-2-IN	15,0	1,682	1,683	5,47
G-4-IN	15,1	1,668	1,668	5,43
G-8-IN	15,3	1,620	1,620	5,48
G-12-IN	15,4	1,585	1,585	5,49
G-16-IN	15,7	1,561	1,561	5,52
G-20-IN	16,1	1,517	1,517	5,57
C-1-GL	16,6	0,778	0,778	4,66
C-2-GL	16,8	0,771	0,771	4,88
C-4-GL	17,3	0,756	0,756	4,67
C-8-GL	16,9	0,728	0,728	4,64
C-12-GL	16,6	0,698	0,698	4,64
C-16-GL	16,8	0,683	0,683	4,88
C-20-GL	16,9	0,653	0,651	4,93
G-1-GL	15,8	1,666	1,666	5,46
G-2-GL	16,7	1,670	1,669	5,46
G-4-GL	16,1	1,637	1,637	5,44
G-8-GL	16,4	1,572	1,572	5,43
G-12-GL	16,2	1,511	1,511	5,42
G-16-GL	16,1	1,463	1,463	5,36
G-20-GL	16,9	1,458	1,458	5,39

Priloga B: Vsebnost skupnih in prostih kislin ter laktonov v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu potvorjenih z glukozno-fruktoznim, invertnim in glukoznim sirupom

Vzorec	Skupne kisline (meq/kg)	Proste kisline (meq/kg)	Laktoni (meq/kg)
	povprečje	povprečje	povprečje
C-1-GF	13,02	12,75	0,42
C-2-GF	13,96	13,77	0,26
C-4-GF	14,86	13,60	0,79
C-8-GF	14,11	13,60	0,33
C-12-GF	13,67	13,43	0,26
C-16-GF	13,92	13,81	0,61
C-20-GF	13,72	13,26	0,37
G-1-GF	23,33	22,33	0,68
G-2-GF	22,95	22,28	0,61
G-4-GF	22,83	22,45	0,12
G-8-GF	24,04	22,20	1,26
G-12-GF	22,98	21,26	1,55
G-16-GF	22,50	20,39	1,59
G-20-GF	20,94	20,39	0,68
C-1-IN	17,98	16,05	1,74
C-2-IN	17,24	16,20	1,67
C-4-IN	15,27	13,72	1,81
C-8-IN	17,18	15,31	1,50
C-12-IN	16,47	15,57	1,09
C-16-IN	14,64	13,74	1,40
C-20-IN	14,46	13,28	0,87
G-1-IN	23,64	23,16	1,06
G-2-IN	23,53	22,88	0,94
G-4-IN	22,12	21,85	0,46
G-8-IN	22,25	21,46	0,65
G-12-IN	21,71	21,05	0,48
G-16-IN	20,80	20,45	0,43
G-20-IN	17,60	15,77	1,17
C-1-GL	19,93	16,92	2,93
C-2-GL	16,52	15,94	0,66
C-4-GL	19,44	17,27	2,33
C-8-GL	19,59	17,25	2,31
C-12-GL	18,51	16,38	2,28
C-16-GL	14,15	12,63	1,75
C-20-GL	12,53	12,85	0,05
G-1-GL	22,35	22,02	0,02
G-2-GL	21,77	21,39	0,09
G-4-GL	21,68	21,58	0,00
G-8-GL	21,82	21,24	0,00
G-12-GL	20,23	20,01	0,00
G-16-GL	19,45	19,16	0,00
G-20-GL	18,77	18,46	0,00

Priloga C: Vsebnosti laktonov cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukožno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa



Priloga D: Specifični kot zasuka, diastazno število in vsebnost hidroksimetilfurfurala v vzorcih cvetličnega in gozdnega medu z dodatkom različnih deležev glukožno-fruktoznega, glukoznega in invertnega sirupa

Vzorec	Specifični kot zasuka (°)	Diastazno število	HMF (mg/kg)
	povprečje	povprečje	povprečje
C-1-GF	-5,732	15,0	1,86
C-2-GF	-6,115	14,7	1,65
C-4-GF	-6,753	14,0	1,79
C-8-GF	-8,459	13,8	1,86
C-12-GF	-9,698	13,2	2,36
C-16-GF	-12,050	12,8	2,46
C-20-GF	-12,198	12,7	3,22
G-1-GF	1,142	19,5	0,55
G-2-GF	-1,001	19,5	0,14
G-4-GF	-2,187	19,2	0,00
G-8-GF	-2,219	19,1	0,24
G-12-GF	-2,647	18,6	0,42
G-16-GF	-2,745	17,0	0,59
G-20-GF	-3,565	16,7	1,22
C-1-IN	-10,375	14,6	1,52
C-2-IN	-12,064	14,6	1,27
C-4-IN	-12,292	13,4	0,96
C-8-IN	-14,507	13,3	0,62
C-12-IN	-14,908	12,4	1,42
C-16-IN	-15,426	12,1	0,70
C-20-IN	-16,388	12,0	0,27
G-1-IN	-0,217	18,1	0,00
G-2-IN	-0,288	17,3	0,59
G-4-IN	-1,032	16,8	0,20
G-8-IN	-1,502	16,7	0,00
G-12-IN	-2,216	15,7	0,00
G-16-IN	-2,941	15,0	0,00
G-20-IN	-3,707	14,6	0,00
C-1-GL	-9,903	14,5	1,83
C-2-GL	-7,038	13,3	1,97
C-4-GL	-6,218	13,2	1,20
C-8-GL	-0,071	12,7	2,33
C-12-GL	4,173	10,8	3,06
C-16-GL	10,295	10,3	3,29
C-20-GL	15,748	8,6	4,44
G-1-GL	2,200	19,5	0,21
G-2-GL	2,305	19,3	0,27
G-4-GL	4,805	17,8	0,34
G-8-GL	7,548	18,1	0,42
G-12-GL	14,269	14,3	0,61
G-16-GL	19,128	13,6	0,63
G-20-GL	24,793	11,7	0,58

Priloga E: Neparametrični test (Kruskal-Wallisov test) za različne deleže sirupov v vzorcih medu

Ničelna hipoteza	Signifikacija	Odločitev
Vsebnost vode se ne spreminja glede na delež dodanega sirupa.	0,042	Ničelno hipotezo zavrnemo
Električna prevodnost se ne spreminja glede na delež dodanega sirupa.	0,200	Ničelno hipotezo ohranimo
Vsebnost prostih kislin se ne spreminja glede na delež dodanega sirupa.	0,094	Ničelno hipotezo ohranimo
Vsebnost skupnih kislin se ne spreminja glede na delež dodanega sirupa.	0,075	Ničelno hipotezo ohranimo
Vsebnost laktonov se ne spreminja glede na delež dodanega sirupa.	0,400	Ničelno hipotezo ohranimo
Vsebnost HMF se ne spreminja glede na delež dodanega sirupa.	0,723	Ničelno hipotezo ohranimo
Specifični kot zasuka se ne spreminja glede na delež dodanega sirupa.	0,690	Ničelno hipotezo ohranimo
Diastazno število se ne spreminja glede na delež dodanega sirupa.	0,015	Ničelno hipotezo zavrnemo

Priloga F: Neparametrični test (Kruskal-Wallisov test) za različne vrste sirupov v vzorcih medu

Ničelna hipoteza	Signifikacija	Odločitev
Vsebnost vode se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa.	0,019	Ničelno hipotezo zavrnemo
Električna prevodnost se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa.	0,259	Ničelno hipotezo ohranimo
Vsebnost prostih kislin se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa.	0,961	Ničelno hipotezo ohranimo
Vsebnost skupnih kislin se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa.	0,953	Ničelno hipotezo ohranimo
Vsebnost laktonov se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa.	0,172	Ničelno hipotezo ohranimo
Vsebnost HMF se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa.	0,030	Ničelno hipotezo zavrnemo
Specifični kot zasuka se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa.	0,002	Ničelno hipotezo zavrnemo
Diastazno število se ne spreminja glede na vrsto dodanega sirupa.	0,231	Ničelno hipotezo ohranimo

Priloga G: Neparametrični test (Kruskal-Wallisov test) za različne vrste medu

Ničelna hipoteza	Signifikacija	Odločitev
Vsebnost vode se ne spreminja glede na vrsto medu.	0,032	Ničelno hipotezo zavrnemo
Električna prevodnost se ne spreminja glede na vrsto medu.	0,000	Ničelno hipotezo zavrnemo
Vsebnost prostih kislin se ne spreminja glede na vrsto medu.	0,000	Ničelno hipotezo zavrnemo
Vsebnost skupnih kislin se ne spreminja glede na vrsto medu.	0,000	Ničelno hipotezo zavrnemo
Vsebnost laktonov se ne spreminja glede na vrsto medu.	0,018	Ničelno hipotezo zavrnemo
Vsebnost HMF se ne spreminja glede na vrsto medu.	0,000	Ničelno hipotezo zavrnemo
Specifični kot zasuka se ne spreminja glede na vrsto medu.	0,000	Ničelno hipotezo zavrnemo
DŠ se ne spreminja glede na vrsto medu.	0,000	Ničelno hipotezo zavrnemo