

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška KOČEVAR

**VPLIV TEMPERATURE IN ČASA SEGREVANJA NA NEKATERE  
FIZIKALNOKEMIJSKE LASTNOSTI MEDU**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EFFECT OF TEMPERATURE AND TIME OF HEATING ON SELECTED  
PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF HONEY**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2016

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

Za mentorico diplomskega dela je bila imenovana doc. dr. Jasna Bertoncelj in za recenzenta prof. dr. Rajko Vidrih.

Mentorica: doc. dr. Jasna Bertoncelj

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Urška Kočevar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dn                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| DK | UDK 638.165:543.5(043)=163.6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| KG | med/akacijev med/cvetlični med/kostanjev med/gozdni med/fizikalnokemijske lastnosti/temperatura/čas segrevanja/aktivnost encima diastaze/vsebnost HMF/vsebnost skupnih fenolnih spojin/antioksidativna učinkovitost/barva medu/korelacije                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| AV | KOČEVAR, Urška                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SA | BERTONCELJ, Jasna (mentorica) /VIDRIH, Rajko (recenzent)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| LI | 2016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| IN | VPLIV TEMPERATURE IN ČASA SEGREVANJA NA NEKATERE FIZIKALNOKEMIJSKE LASTNOSTI MEDU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| OP | X, 64 str., 4 pregl., 29 sl., 6 pril., 81 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| AI | <p>Namen dela je bil ugotoviti vpliv temperature in časa segrevanja na nekatere fizikalnokemijske lastnosti medu. Naravni med kristalizira in za ponovno utekočinjenje je potrebno med segreti, kar lahko vpliva na kakovost medu. V analizo smo vključili osem vzorcev medu letnika 2010 (po 2 vzorca akacijevega, cvetličnega, kostanjevega in gozdnega medu). Vzorce smo segrevali pri dveh temperaturah (40 in 65 °C) določen čas (24 in 48 ur). Nesegetim vzorcem medu smo določili vsebnost vode, električno prevodnost in vrednost pH, vsem vzorcem pa aktivnost encima diastaze, vsebnost HMF, vsebnost skupnih fenolnih spojin, antioksidativno učinkovitost in barvo. Rezultati so pokazali, da je segrevanje povzročilo zmanjšanje diastaznega števila, povečanje vsebnosti HMF in skupnih fenolnih spojin ter večjo antioksidativno učinkovitost. Barva segretil vzorcev medu je bila temnejša, kar se kaže z manjšo vrednostjo parametra L* in večjim indeksom porjavenja. Rezultati korelacijske analize so pokazali močne zveze med obravnavanimi parametri. Spremembe v analiziranih parametrih so bile večje pri vzorcih medu, ki smo jih segrevali pri višji temperaturi daljši čas. Pri vzorcih, ki smo jih segrevali pri temperaturi 40 °C, so bile spremembe majhne oz. v nekaterih primerih zanemarljive. Spremembe v analiziranih parametrih so bile na splošno bolj opazne v vrstnih medovih, akacijevem in kostanjevem medu, kot v vzorcih mešanega cvetličnega in gozdnega medu. Zaključimo lahko, da segrevanje medu pri temperaturi, ki ne preseže 40 °C, ne poslabša kakovosti medu.</p> |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 638.165:543.5(043)=163.6  
CX honey/acacia honey/multifloral honey/chestnut honey/forest honey/physicochemical properties temperature/time of heating/diastase activity/ HMF content/total phenolic content/ antioxidant activity/honey colour/correlations  
AU KOČEVAR, Urška  
AA BERTONCELJ, Jasna (supervisor) / VIDRIH, Rajko (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2016  
TI EFFECT OF TEMPERATURE AND TIME OF HEATING ON SELECTED PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF HONEY  
DT Graduation Thesis (University Studies)  
NO X, 64 p., 4 tab., 29 fig., 6 ann., 81 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of this study was to determine the effect of the temperature and heating time on some physicochemical properties of honey. Natural honey crystallizes and re-liquefaction requires heat what can affect its quality. The analysis included eight samples of honey from the year 2010 (2 samples of acacia, multifloral, chestnut and forest honey). The samples were heated at two temperatures (40 and 65 °C) for 24 and 48 hours. Unheated samples of honey were analysed for water content, electrical conductivity and pH value. In all of the honey samples the diastase activity, HMF and total phenolic contents, antioxidant activity and colour were determined. The results showed, that the heating decreased the diastase number of honey and increased HMF and total phenolic content as well as antioxidant activity. Colour of heated honey samples was darker, reflecting the lower value of the parameter L\* and higher index of browning. The results of correlation analysis showed a strong relationships among the studied parameters. Changes in the analyzed parameters were higher in samples of honey samples, which were heated at a higher temperature for a longer time. For samples heated at a temperature of 40 °C, the changes were small and in some cases, negligible. Changes in the analyzed parameters were generally more pronounced in unifloral honey types such as acacia and chestnut honey, than in mixed honey types - multifloral and forest honey. It can be concluded that appropriate heating conditions of honey (tempering at 40 °C) does not deteriorate the quality of the honey.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                                                                                                                      | str.        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>                                                                                                                                           | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>                                                                                                                                                       | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE</b>                                                                                                                                                                | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC</b>                                                                                                                                                             | <b>VII</b>  |
| <b>KAZALO SLIK</b>                                                                                                                                                                   | <b>VIII</b> |
| <b>KAZALO PRILOG</b>                                                                                                                                                                 | <b>IX</b>   |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>                                                                                                                                                          | <b>X</b>    |
| <br>                                                                                                                                                                                 |             |
| <b>1 UVOD</b>                                                                                                                                                                        | <b>1</b>    |
| 1.1 NAMEN DELA                                                                                                                                                                       | 2           |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE                                                                                                                                                                 | 2           |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                                                                                                                                                               | <b>3</b>    |
| 2.1 ČEBELE                                                                                                                                                                           | 3           |
| 2.2 NASTANEK MEDU                                                                                                                                                                    | 3           |
| 2.3 VRSTE MEDU                                                                                                                                                                       | 4           |
| 2.3.1 Akacijev med                                                                                                                                                                   | 4           |
| 2.3.2 Cvetlični med                                                                                                                                                                  | 4           |
| 2.3.3 Kostanjev med                                                                                                                                                                  | 5           |
| 2.3.4 Gozdni med                                                                                                                                                                     | 5           |
| 2.4 SENZORIČNE LASTNOSTI MEDU                                                                                                                                                        | 6           |
| 2.4.1 Barva                                                                                                                                                                          | 6           |
| 2.4.1.1 Določanje barve                                                                                                                                                              | 7           |
| 2.4.2 Okus                                                                                                                                                                           | 7           |
| 2.4.3 Vonj                                                                                                                                                                           | 7           |
| 2.4.4 Aroma                                                                                                                                                                          | 7           |
| 2.5 FIZIKALNOKEMIJSKI PARAMETRI MEDU                                                                                                                                                 | 8           |
| 2.5.1 Voda                                                                                                                                                                           | 8           |
| 2.5.2 Električna prevodnost                                                                                                                                                          | 8           |
| 2.5.3 Vrednost pH                                                                                                                                                                    | 8           |
| 2.6 ENCIMI V MEDU                                                                                                                                                                    | 9           |
| 2.6.1 Diastaza                                                                                                                                                                       | 9           |
| 2.6.2 Invertaza                                                                                                                                                                      | 10          |
| 2.7 HIDROKSIMETILFURFURAL                                                                                                                                                            | 11          |
| 2.8 FENOLNE SPOJINE                                                                                                                                                                  | 13          |
| 2.8.1 Flavonoidi                                                                                                                                                                     | 14          |
| 2.8.2 Fenolne kisline                                                                                                                                                                | 14          |
| 2.9 ANTIOKSIDANTI                                                                                                                                                                    | 15          |
| 2.9.1 Delitev antioksidantov                                                                                                                                                         | 15          |
| 2.9.2 Oksidativni stres                                                                                                                                                              | 15          |
| 2.9.3 Antioksidativna učinkovitost medu                                                                                                                                              | 15          |
| 2.9.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti medu z FRAP metodo                                                                                                                     | 16          |
| 2.10 VPLIV TEMPERATURE IN ČASA SEGREVANJA NA AKTIVNOST ENCIMA<br>DIASTAZE, VSEBNOST HMF, VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN,<br>ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST, BARVO IN PORJAVENJE MEDU | 16          |

|          |                                                                                                                                  |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3</b> | <b>MATERIALI IN METODE</b>                                                                                                       | <b>19</b> |
| 3.1      | VZORCI MEDU                                                                                                                      | 19        |
| 3.2      | FIZIKALNOKEMIJSKE LASTNOSTI                                                                                                      | 21        |
| 3.2.1    | Določanje vsebnosti vode v medu (Bogdanov, 2009)                                                                                 | 21        |
| 3.2.2    | Merjenje električne prevodnosti medu (Kropf in sod., 2008)                                                                       | 21        |
| 3.2.3    | Določanje vrednosti pH v medu (Bogdanov, 2009)                                                                                   | 22        |
| 3.2.4    | Določanje aktivnosti encima diastaze z metodo po Schadeju (Bogdanov, 2009)                                                       | 22        |
| 3.2.5    | Določanje vsebnosti HMF z metodo po Winklerju (Bogdanov, 2009)                                                                   | 24        |
| 3.2.6    | Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo (Beretta in sod., 2005)                                 | 25        |
| 3.2.7    | Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo FRAP (Benzie in Strain, 1996)                                                   | 26        |
| 3.2.8    | Merjenje barve z Minolta kromometrom                                                                                             | 27        |
| 3.2.9    | Spektrofotometrično določanje barve in indeksa porjavenja medu (Brudzynski in Miotto, 2011)                                      | 27        |
| 3.3      | STATISTIČNA ANALIZA                                                                                                              | 28        |
| <b>4</b> | <b>REZULTATI</b>                                                                                                                 | <b>29</b> |
| 4.1      | REZULTATI DOLOČANJA FIZIKALNOKEMIJSKIH PARAMETROV                                                                                | 29        |
| 4.1.1    | Rezultati vsebnosti vode, električne prevodnosti in vrednosti pH.                                                                | 29        |
| 4.1.2    | Rezultati določanja diastaznega števila                                                                                          | 30        |
| 4.1.3    | Rezultati določanja vsebnosti hidroksimetilfurfurala (HMF)                                                                       | 34        |
| 4.1.3.1  | Vsebnost HMF v vzorcih akacijevega medu                                                                                          | 34        |
| 4.1.3.2  | Vsebnost HMF v vzorcih cvetličnega medu                                                                                          | 35        |
| 4.1.3.3  | Vsebnost HMF v vzorcih kostanjevega medu                                                                                         | 35        |
| 4.1.3.4  | Vsebnost HMF v vzorcih gozdnega medu                                                                                             | 36        |
| 4.1.4    | Rezultati določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin                                                                            | 37        |
| 4.1.5    | Rezultati določanja antioksidativne učinkovitosti                                                                                | 39        |
| 4.1.6    | Rezultati merjenja barve medu                                                                                                    | 42        |
| 4.1.6.1  | L*, a* in b* vrednosti barve medu                                                                                                | 42        |
| 4.1.6.2  | Spektrofotometrično določanje barve medu                                                                                         | 46        |
| 4.1.6.3  | Rezultati določanja indeksa porjavenja medu                                                                                      | 46        |
| 4.2      | PRIMERJAVA REZULTATOV DIASTAZNEGA ŠTEVILA, VSEBNOSTI HMF IN SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN, ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI IN BARVE MEDU | 47        |
| 4.3      | KORELACIJE MED ANALIZIRANIMI PARAMETRI MEDU                                                                                      | 49        |
| 4.3.1    | Zveza med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin                                                   | 49        |
| 4.3.2    | Zveza med indeksom porjavenja in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin                                                              | 50        |
| 4.3.3    | Zveza med vsebnostjo HMF in diastaznim številom (DN)                                                                             | 50        |
| <b>5</b> | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>                                                                                                        | <b>52</b> |
| 5.1      | RAZPRAVA                                                                                                                         | 52        |
| 5.2      | SKLEPI                                                                                                                           | 56        |
| <b>6</b> | <b>POVZETEK</b>                                                                                                                  | <b>57</b> |
| <b>7</b> | <b>VIRI</b>                                                                                                                      | <b>58</b> |
|          | <b>ZAHVALA</b>                                                                                                                   |           |
|          | <b>PRILOGE</b>                                                                                                                   |           |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                     | str. |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Preglednica 1: Značilnosti barve različnih vrst slovenskega medu (Bertoncelj, 2008) | 6    |
| Preglednica 2: Vrste medu, število vzorcev in oznake vzorcev                        | 19   |
| Preglednica 3: Oznake vzorcev, temperatura in čas segrevanja                        | 20   |
| Preglednica 4: Korelacije med obravnavanimi parametri                               | 51   |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                      | str. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1: Nastanek 5-hidroksimetilfurfurala (Capuano in Fogliano, 2011)                                               | 12   |
| Slika 2: Fenolne spojine glede na število fenolnih podenot (Robbins in Bean, 2004)                                   | 12   |
| Slika 3: Splošna kemijska struktura favonoidov (Tsao, 2010)                                                          | 14   |
| Slika 4: Vsebnost vode, električna prevodnost, in vrednost pH v nesegetih vzorcih medu                               | 30   |
| Slika 5: Diastazno število analiziranih vzorcev akacijevega medu                                                     | 31   |
| Slika 6: Diastazno število analiziranih vzorcev cvetličnega medu                                                     | 32   |
| Slika 7: Diastazno število v analiziranih vzorcih kostanjevega medu                                                  | 33   |
| Slika 8: Diastazno število analiziranih vzorcev gozdnega medu                                                        | 33   |
| Slika 9: Vsebnost HMF v analiziranih vzorcih akacijevega medu                                                        | 34   |
| Slika 10: Vsebnost HMF v analiziranih vzorcih cvetličnega medu                                                       | 35   |
| Slika 11: Vsebnost HMF v analiziranih vzorcih kostanjevega medu                                                      | 36   |
| Slika 12: Vsebnost HMF v analiziranih vzorcih gozdnega medu                                                          | 36   |
| Slika 13: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih akacijevega medu                                   | 37   |
| Slika 14: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih cvetličnega medu                                   | 38   |
| Slika 15: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih kostanjevega medu                                  | 38   |
| Slika 16: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih gozdnega medu                                      | 39   |
| Slika 17: Antioksidativna učinkovitost vzorcev akacijevega medu                                                      | 40   |
| Slika 18: Antioksidativna učinkovitost vzorcev cvetličnega medu                                                      | 40   |
| Slika 19: Antioksidativna učinkovitost vzorcev kostanjevega medu                                                     | 41   |
| Slika 20: Antioksidativna učinkovitost vzorcev gozdnega medu                                                         | 41   |
| Slika 21: Vrednost parametra L* za posamezne vzorce akacijevega medu                                                 | 42   |
| Slika 22: Vrednost parametra L* za posamezne vzorce cvetličnega medu                                                 | 43   |
| Slika 23: Vrednost parametra L* za posamezne vzorce kostanjevega medu                                                | 44   |
| Slika 24: Vrednost parametra L* za posamezne vzorce gozdnega medu                                                    | 44   |
| Slika 25: Indeks porjavenja za analizirane vzorce medu                                                               | 46   |
| Slika 26: Primerjava analiziranih parametrov za različne vrste medu                                                  | 48   |
| Slika 27: Zveza med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih medu | 49   |
| Slika 28: Zveza med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in indeksom porjavenja v analiziranih vzorcih medu            | 50   |
| Slika 29: Zveza med vsebnostjo HMF in diastaznim številom (DN) v analiziranih vzorcih medu                           | 51   |



## KAZALO PRILOG

Priloga A: Povprečne vrednosti analiziranih parametrov (voda, EP, DN, HMF, vsebnost skupnih fenolnih spojin in AU) pri različnih temperaturah in času segrevanja

Priloga B: Povprečne vrednosti analiziranih parametrov ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , barva, indeks porjavenja) pri različnih temperaturah in času segrevanja

Priloga C: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Priloga D: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin (odvisnost absorbance od koncentracije, izražene kot mg galne kisline na kg medu)

Priloga E: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje AU s FRAP metodo

Priloga F: Umeritvena krivulja za določanje AU s FRAP metodo (odvisnost absorbance od koncentracije Fe(II))

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|                |                                                                               |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| A              | akacijev med                                                                  |
| AU             | atioksidativna učinkovitost                                                   |
| C              | cvetlični med                                                                 |
| DN             | diastazno število                                                             |
| FC             | Folin-Ciocalteu                                                               |
| FRAP           | antioksidativna moč redukcije železa (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power) |
| G              | gozdni med                                                                    |
| HMF            | 5-hidroksimetil-2-furfural                                                    |
| K              | kostanjev med                                                                 |
| L*a*b*         | parametri barvnega prostora                                                   |
| r              | koeficient korelacije                                                         |
| r <sup>2</sup> | koeficient determinacije                                                      |
| $\bar{x}$      | povprečna vrednost                                                            |

## 1 UVOD

Človek se je začel ukvarjati s čebelarstvom zaradi čebeljih pridelkov. Njihova zelo široka uporabnost je pripomogla k temu, da se je čebelarstvo v zadnjem stoletju močno razvilo in tako postalo močna panoga kmetijstva. Čebelar se lahko usmeri v pridobivanje medu, cvetnega prahu, propolisa, čebeljega strupa, čebeljih matic ali novih družin. Med je naravno živilo, čebele ga proizvedejo iz nektarja, ki ga izločajo cvetoče rastline, ali iz mane. Različne vrste medu so dobile ime po rastlinah, na katerih čebele nabirajo nektar in mano. V Sloveniji poznamo več vrst medu, (akacijev, lipov, hojev, kostanjev, smrekov, cvetlični in gozdni med, med oljne ogrščice, rešeljike) (Kozmus in sod., 2011).

Med je gosto tekoče živilo, (vsebuje približno 15-18 % vode). Gre za kompleksno mešanico ogljikovih hidratov, predvsem glukoze in fruktoze. Ostali sladkorji so prisotni v sledovih, odvisno od izvora medu. Poleg tega vsebuje med še organske kisline, aminokisline, minerale, vitamine, encime, fenolne spojine, cvetni prah, vosek in pigmente (Fallico in sod., 2004).

Med uporabljajo in uživajo ljudje po celem svetu, zato so zanj zahtevani določeni standardi in norme. Najpogostejši nedovoljeni posegi v med so dodajanje poceni sladil (trsni sladkor, rafinirana sladkorna pesa, koruzni sirup, maltozni sirup in sirup z visoko vsebnostjo fruktoze) in krmljenje čebel s saharozo (Puscas in sod., 2013).

Trenutno je letna proizvodnja medu približno 1,2 milijone ton, kar je manj kot 1 % celotne proizvodnje sladkorja. Danes je med eno izmed zadnjih neobdelanih naravnih živil. Poraba medu se od države do države razlikuje. Veliki proizvajalki in izvoznici medu sta Kitajska in Argentina, vendar je njihova letna poraba majhna: 0,1 do 0,2 kg na prebivalca. Večja poraba medu je v razvitih državah, kjer domača pridelava ne pokrije vedno potreb trga. V Evropski uniji, ki je velika uvoznica in proizvajalka medu, se letna poraba na prebivalca giblje od srednje (0,3-0,4 kg) v Italiji, Franciji, Veliki Britaniji, na Danskem in Portugalskem do visoke porabe (1-1,8 kg) v Nemčiji, Avstriji, Švici, Grčiji in na Madžarskem (Bogdanov, 2014).

Med vsebuje nekatere pomembne bioaktivne spojine, vključno z  $\alpha$ -tokoferoli, askorbinsko kislino, encimi, flavonoidi in ostalimi fenolnimi spojinami. Sestava in lastnosti medu so odvisne od rastlinskega izvora, podnebnih razmer, geografskega porekla ter načina predelave in shranjevanja (Mendes in sod., 1998).

Čeprav je temperaturno neobdelan (neseget) med najboljši, je segrevanje medu edini praktični način za preprečitev ali odložitev kristalizacije, za utekočinjanje že kristaliziranega medu in da olajšamo polnjenje z zmanjševanjem viskoznosti (Bath in Singh, 1999; Tosi in sod., 2002). Z neprimerno toplotno obdelavo medu, to je z neustrezno temperaturo in časom segrevanja povzročimo poslabšanje kakovosti medu, saj negativno vplivamo na bioaktivne spojine, ki jih med vsebuje (Nagai in sod., 2001).

## 1.1 NAMEN DELA

Naravni med kristalizira in za ponovno utekočinjenje je potrebno med segreti. Zato je bil namen diplomskega dela ugotavljanje vpliva temperature in časa segrevanja na nekatere fizikalnokemijske lastnosti medu: aktivnost encima diastaze, vsebnost hidroksimetilfurfurala (HMF), vsebnost skupnih fenolnih spojin, antioksidativno učinkovitost in barvo. Želeli smo ugotoviti ali segrevanje vpliva na kakovost medu oziroma kako se spremenijo nekateri fizikalnokemijski parametri segretega medu.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bodo imeli segreti vzorci medu manjšo aktivnost encima diastaze ter večjo vsebnost HMF. Glede na rezultate zadnjih tujih raziskav pričakujemo, da se bo antioksidativna učinkovitost povečala zaradi nastanka produktov Maillardove reakcije. Barva segretyh vzorcev medu bo temnejša. Spremembe v vrednostih analiziranih parametrov bodo večje pri vzorcih medu, ki bodo segrevani pri višji temperaturi daljši čas.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ČEBELE

Čebele ne samo, da pridobivajo med za človeka, pač pa ga tudi presnavljajo v dolgotrajno obstojno živilo. V preteklosti so čebelje družine živele in se razmnoževale v naravnih bivališčih, v drevesnih duplih, votlinah, brez pomoči človeka. Z razvojem čebelarstva je človek čebele naselil v pripravljenih panjih. Čebele živijo v skupnosti, (v čebeljih družinah) z več tisoč osebki. Skupno živi veliko število čebel delavk, matic in trotoev. Čebele v panju, tako poleti kakor tudi pozimi, uravnavajo temperaturo, vlažnost in zračenje. Čebele uporabljajo samo osnovne sestavine hrane, nektar, cvetni prah žužkocvetnih rastlin in mano (Taranov, 2013).

Čebele vedno pridelajo med najboljše kakovosti ne glede na to, na katerih rastlinah so nabirale nektar ali mano. Čebelar te kakovosti ne more izboljšati, lahko jo le poslabša v primeru neustreznega ravnanja z medom (Kozmus in sod., 2011).

### 2.2 NASTANEK MEDU

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

Med kot čebelji pridelek spada med živila živalskega izvora. Zmanjševanje vsebnosti vode v medicini in koncentracija sladkorjev poteka po načelu trofalaksije, izmenjava hrane iz ust v usta, ki je značilno za vse socialne žuželke (Pedrotti, 2003).

Mana je naraven, sladek, lepljiv sok, ki ga izločajo drevesne ušice, škržati in kaparji. Iz drevesnega soka porabijo vire dušika in le majhno količino sladkorjev, preostanek pa izločijo v obliki sladkih kapljic-mane. V panju čebele mano obdelajo, zgostijo, ji primešajo izločke svojih žlez in jo nato shranijo v celice satja. Tako nastane med. Med pokrijejo z voščenimi pokrovčki, ki jih moramo pred točenjem medu odstraniti. Iz satja med iztočimo s centrifugiranjem, gre za proces točenja medu. Sledi pakiranje v primerno embalažo in skladiščenje v ustreznih razmerah (Golob in sod., 2008).

Med, ki se daje v promet kot med ali je namenjen za uporabo v kateremkoli živilu, namenjenem za prehrano ljudi ne sme vsebovati nobenih dodanih sestavin (Pravilnik o medu, 2011).

## 2.3 VRSTE MEDU

Vrstni med je izraz, s katerim označujemo med, ki je bil pridobljen po večini iz nektarja ali mane ene same rastlinske vrste. Če ima tudi barvo, okus in vonj, značilen za med iz te rastlinske vrste je dovoljeno označbe, ki se nanašajo na izvor medu, dopolniti z navedbo določenih cvetov, rastlin ali vrste mane. Takrat govorimo o vrsti medu (Golob in sod., 2008).

Med se razvršča v glavne tipe in se poimenuje glede na izvor kot:

- »Nektarni med« ali »cvetlični med«, ki je pridobljen iz nektarja cvetov;
- »Manin med« ali »gozdni med«, ki je pridobljen predvsem iz izločkov žuželk (*Hemiptera*) na živih delih rastlin ali izločkov živih delov rastlin (Pravilnik o medu, 2011).

V raziskovalne namene diplomskega dela smo uprabili akacijev, cvetlični, kostanjev in gozdni med, zato so v nadaljevanju te vrste medu opisane.

### 2.3.1 Akacijev med

Pridobivajo ga iz nektarja navadne robinije (*Robinia pseudoacacia*), ki je doma v Združenih državah Amerike. Znana je kot black locust tree, na veliko jo gojijo tudi na Madžarskem, v Bolgariji, Romuniji, Franciji in Italiji. Akacijev med pogosto mešajo z drugimi vrstami medu (Fleetwood, 2009).

Tudi na območju celotne Slovenije, čebelja paša na robiniji ali akaciji, predstavlja enega najbolj obilnih in zanesljivih virov nektarja med vsemi medonosnimi drevesnimi vrstami. Predvsem na območju jugozahodne in severovzhodne Slovenije, kjer je največ vinogradov (Božič, 1998).

Akacijev med vsebuje več fruktoze kot glukoze, v Sloveniji ga točimo maja in junija (Božnar, 2002).

Senzorične lastnosti akacijevga medu: je blede rumene barve, bister in ne kristalizira. Intenzivnost vonja je zelo slaba. V vonju lahko zaznamo čebelji vosek, akacijev cvetje, cvetlice (vrtnice in vijolice), sadje (jabolko, hruško), vanilijo, smetanove bonbone, sveže maslo in slamo. Trajanje okusa je srednje do močno intenzivno, prav tako je sladkost srednje do močno intenzivna. Kislost je šibka, grenkosti pa ne zaznamo. Intenzivnost arome je zelo slaba. Zaznamo čebelji vosek, akacijev cvetje, cvetlice, sadje (jabolko, hruška), vanilijo, smetanove bonbone, sveže maslo in slamo (Bertoncelj in sod., 2011).

Za akacijev med je značilno, da ima najnižjo vrednost električne prevodnosti med vsemi vrstami slovenskega medu, od 0,11 do 0,27 mS/cm (Korošec in sod., 2016).

### 2.3.2 Cvetlični med

Cvetoče rastline v optimalnem času za oprašitev izločajo nektar in tako privabijo opraševalce. Večina rastlin ga najintenzivneje izloča med 10. in 15. uro. Med, ki ga čebele

nabirajo na raznovrstnih travniških cvetlicah in drugih cvetočih rastlinah, je cvetlični med in je najpogostejši med vsemi vrstami medu (Kozmus in sod., 2011).

Senzorične lastnosti cvetličnega medu: je zelo barvit, od rumene do rjave barve, odvisno od rastlinske vrste. Je redko bister. Kristalizira lahko hitro, z majhnimi ali velikimi grobimi kristali. Intenzivnost vonja je lahko srednja do močna. Vonjamo sadje, cvetlice (vijolice, regrat, gorsko rastlinje), travnik, čebelji vosek, sladkor, včasih zaznamo vonj po lesu. Obstočnost okusa v ustih je srednje močna. Tudi sladkost okusa je srednje močna. Kislost je šibka do srednje močna. Grenkobe ne zaznamo. Včasih daje v ustih osvežilen občutek. Intenzivnost arome je srednje močna. V aromi zaznamo cvetlice (vijolice, gorsko rastlinje, zelišča, deteljo), sveže sadje (jabolko, hruško, breskev, muškat, grozdje), kuhano sadje, karamelne ali mlečne bonbone, rjavi sladkor, melaso, travo in zmečkano drevesno listje (Bertoncelj in sod., 2011).

Po pravilniku mora imeti cvetlični med prevodnost manjšo od 0,8 mS/cm. Električna prevodnost slovenskega cvetličnega medu je od 0,24 do 0,84 mS/cm (Korošec in sod., 2016).

### **2.3.3 Kostanjev med**

Senzorične lastnosti kostanjevega medu: je jantarne barve različnih odtenkov z rdečkastimi niansami. Gre za vedno bister med, ki navadno ne kristalizira. Intenzivnost vonja je močna. Vonjamo grenkobo, pikantnost in kostanjevo cvetje. Okus je izrazito grenek, sladkost je srednje močna, kislost šibka. Včasih daje trpek okus v ustih. Intenzivnost arome je močna do zelo močna, traja dolgo in pušča grenak pookus. Aromo opišemo kot ostro, grenko, po zažganem sladkorju, lahko tudi po dimu, zeliščih in pelinu (Bertoncelj in sod., 2011).

Za kostanjev med je značilno, da vsebuje veliko cvetnega prahu, običajno vsebuje več kot 86 % peloda pravega kostanja in malo elementov mane (Golob in sod., 2008).

Električna prevodnost za slovenski kostanjev med je v območju od 0,96 do 2,25 mS/cm (Korošec in sod., 2016).

### **2.3.4 Gozdni med**

Gozdni med je mešanica različnih vrst mane, zato se lahko vzorci zelo razlikujejo po barvi, vonju okusu in aromi. Za to vrsto medu je značilno, da v njem ne prevladuje nobena vrsta mane. Pogosto je mešan s cvetličnim medom, saj čebele v gozdu nabirajo tudi mano na podrahti (Golob in sod., 2008).

Električna prevodnost gozdnega medu mora biti večja od 0,8 mS/cm, območje vrednosti za tega parametra za slovenski gozdni med je od 0,81 do 1,68 mS/cm (Korošec in sod., 2016).

Senzorične lastnosti gozdnega medu: je svetlo do temno jantarne barve, z rdečkastim ali zelenim odtenkom. Je bister ali moten in lahko kristalizira. Intenzivnost vonja je šibka do srednje močna. Vonjamo čebelji vosek, karamelo, mleko v prahu, smolo, dim, melaso, humus, lahko ima vonj po zatohlem. Obstočnost okusa je srednje močna. Sladkost okusa je

prav tako srednje močna. Gozdni med je šibko do srednje kisel. Grenkobe ni ali pa jo le šibko zaznamo. Včasih imamo občutek, da je gozdni med rahlo trpek. Intenzivnost arome je srednje močna. V aromi lahko zaznamo orehe, lešnike, mleko v prahu, zelišča, rjavi sladkor, karamelo, melaso, pelin in suho sadje (Bertoncelj in sod., 2011).

## 2.4 SENZORIČNE LASTNOSTI MEDU

### 2.4.1 Barva

Barva medu je zelo raznolika in predstavlja pomemben parameter kakovosti, sprejemanja in izbire pri potrošniku (Da Silva, 2015).

Barva lahko variira od zelo svetle, rumene, jantarjeve do temno rjave oz. skoraj črne barve. Odvisna je od botaničnega porekla, vsebnosti elementov, in prisotnih barvil. V mnogih državah je cena medu povezana z njegovo barvo (Tuberoso in sod., 2014).

Barva medu je odvisna tudi od temperature skladiščenja in morebitne toplotne obdelave (Gambaro in sod., 2007).

Pojav neencimskega porjavenja, tako imenovana Maillardova reakcija, je posledica segrevanja, pri katerem iz sladkorjev in aminokislin nastanejo rjavo obarvani produkti. Med skladiščenjem postaja med temnejši, največ zaradi produktov Maillardove reakcije in reakcije fenolnih spojin. Sama sestava medu, predvsem vsebnost glukoze, fruktoze, prostih aminokislin in vode ter njegova začetna barva vplivajo na stopnjo potemnitve, ki je odvisna od temperature in časa skladiščenja. Na barvo medu vplivajo tudi naravno prisotna pelodna zrnca (Kapš, 2012).

Barva je odvisna tudi od nečistoč, ki so prisotne v nektarju, ter od agregatnega stanja medu. Nastanek in rast kristalov je naraven pojav, zgodi se pri večini medov. Med je nasičena raztopina glukoze, ki se pri temperaturah, nižjih kot so bile v panju, v določenih okoliščinah začne izločati. Pri kristalizaciji medu ne pride do nobenih kemijskih sprememb medu. Spremeni pa se barva, kristaliziran med je nekoliko svetlejši. Med je podvržen toplotni obdelavi iz dveh razlogov, da se prepreči oziroma zmanjša pojav kristalizacije in da se uniči morebitno prisotne patogene mikroorganizme v medu (Šenk, 2006).

Preglednica 1: Značilnosti barve različnih vrst slovenskega medu (Bertoncelj, 2008)

| VRSTA MEDU | BARVA                                                                               |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| akacijev   | skoraj brezbarvna do slamnato rumena                                                |
| lipov      | svetlo rumena do svetlo jantarna, slamnata z zelenim odtenkom                       |
| cvetlični  | zelo raznolika; od rumene do rjave, odvisna od vrste rastlin in deleža medu iz mane |
| kostanjev  | rjava, jantarna, bolj ali manj temna z rdečkastim odtenkom                          |
| hojev      | sivo-rjava z zelenim odtenkom                                                       |
| smrekov    | srednje do temno jantarna z rdečim odtenkom, sijoča površina                        |
| gozdni     | svetlo do temno rjava, lahko z rdečkastim ali zelenim odtenkom                      |



#### 2.4.1.1 Določanje barve

Metode za merjenje barve lahko razdelimo na subjektivne oziroma senzorične, kjer barvo medu ocenjujemo s šolanim senzoričnim panelom, in objektivne oziroma inštrumentalne. Nekatere od inštrumentalnih metod so; merjenje barve medu s kromometrom Minolta, spektrofotometrično določanje barve medu raztopine medu pri določenih valovnih dolžinah in, merjenje barve medu po Pfund-u (Tuberoso in sod., 2014).

#### 2.4.2 Okus

Okus medu je odvisen od razmerja med različnimi sladkorji, kislinami in mineralnimi snovmi. Med osnovnimi okusi je v medu najbolj izrazit okus po sladkem. Najslajši sladkor je fruktoza, sledita saharoza in glukoza, k sladkosti pa prispevajo tudi mineralne in aromatične snovi, proste kisline in beljakovine (Golob in sod., 2008).

Vse vrste medu niso enako sladke, ker so razmerja med glukozo, fruktozo in saharozo različna. Kot sladke zaznavamo predvsem snovi, ki v svoji molekuli vsebujejo več alkoholnih –OH skupin. Sladek okus medu pa pogosto prekrivajo nekatere druge sestavine, npr. mineralne snovi in kisline. Kisel okus povzročajo kemijsko kisle snovi. V medu jih ne občutimo kot prave kisline in tudi ni pravega razmerja med občuteno kislostjo in vrednostjo pH. Grenek okus je okus kininovih soli ali kofeina. Ta okus je večkrat zelo poudarjen v nekaterih medovih (kostanjevem in medu jagodičnice). Slan okus povzroča natrijev klorid, pa tudi nekatere druge mineralne spojine. V medu, ki vsebuje le zelo malo ustreznih mineralnih snovi, običajno ne zaznamo tega okusa (Božnar in Senegačnik, 1998).

#### 2.4.3 Vonj

Vonj medu izhaja iz aromatičnih sestavin nektarja oz. mane posameznih rastlin. Vonj medu oblikujejo karbonilne spojine, alkoholi, estri alifatskih in aromatskih kislin ter eterična olja. Identifikacijo številnih hlapnih vonjalnih sestavin v medu omogoča plinska kromatografija (Golob in sod., 2008).

Odsotnost določenih aromatičnih snovi v medu lahko pomeni, da je med star ali da je bil prekomerno segret. Pogosto so nekatere blago dišeče hlapne snovi bistveni sestavni del medu, čeprav so prisotne le v sledovih. Ker pa so zelo hlapne, izhlapijo ob neprimernem ravnanju z medom (Božnar in Senegačnik, 1998).

#### 2.4.4 Aroma

Aromatične snovi so precej hlapne. K aromi medu prispevajo različne organske spojine, kot so alkoholi, ketoni ter kisline in njihovi estri (Golob in sod., 2008).

Pri aromi medu nastajajo kompleksne zmesi hlapnih spojin, ki se lahko razlikujejo glede na izvor, nektar, pogoje predelave, in skladiščenje medu. Med iz samo ene vrste cvetov ima značilno aromo te rastline, zaradi prisotnosti nekaterih hlapnih organskih spojin iz nektarja (Castro-Vazquez in sod., 2007).

## 2.5 FIZIKALNOKEMIJSKI PARAMETRI MEDU

### 2.5.1 Voda

Pravilnik o medu (2011) določa da med lahko vsebuje največ 20 % vode. Med iz rese (*Calluna*) in pekovski med do največ 23 % in pekovski med iz rese (*Calluna*) največ 25 %. Med višje kakovosti pa lahko vsebuje, največ 18 % vode.

Vsebnost vode je odvisna od vrste paše in njene intenzivnosti, podnebnih razmer, od vrste panja in tehnologije čebelarjenja (Golob in sod., 2008)

Voda je druga največja sestavina medu. Njena vsebnost variira od 15 do 21 g na 100 g medu (Yücel in Sultanoglu, 2013).

Vsebnost vode je ena od najpomembnejših značilnosti, katera vpliva na fizikalne lastnosti medu (viskoznost in kristalizacijo). Vpliva pa tudi na druge parametre, kot so barva, okus, aroma, topnost, viskoznost in obstojnost medu (Escuredo in sod., 2013).

Kristalizacija glukoze v medu vodi do zmanjšanja topnosti trdnih snovi. Rezultat je redčenje amorfne raztopine, ki zato povečuje  $a_w$  vrednost. Med ima običajno  $a_w$  vrednost med 0,50 in 0,65,  $a_w$  nad 0,60 predstavlja kritično mejo za mikrobiološko stabilnost. Burkan (2006) je v slovenskem medu določila povprečne  $a_w$  vrednosti med 0,479 do 0,591. Čeprav ni standardnih omejitev katere bi določale vrednost  $a_w$ , je znano, da je njena vrednost zelo pomembna. Med vsebuje osmofilne kvasovke, ki lahko povzročajo fermentacijo, med katero nastaja etanol in ogljikov dioksid. Posledica nastajanja teh produktov pa je spreminjanje kakovosti medu (Escuredo in sod., 2013; Tornuk in sod., 2013; Yücel in Sultanoglu, 2013).

Določanje vode v medu je zelo pomembno in metodi, ki se največkrat uporabljata sta:

- določanje vsebnosti vode na osnovi lomnega količnika s pomočjo refraktometra,
- instrumentalno določanje aktivnosti vode na osnovi določanja točke rosišča.

### 2.5.2 Električna prevodnost

Električna prevodnost, nam da koristne informacije o kakovosti in morebitni potvorjenosti medu, uporabimo pa ga lahko tudi pri prepoznavanju različnih vrst medu, zlasti za razlikovanje med medom iz nektarja in medom iz mane. Električna prevodnost medu je odvisna od vsebnosti mineralnih soli, organskih kislin, proteinov pa tudi od sladkorjev in poliolov (Golob in sod., 2008).

Pravilnik o medu (2011) navaja, da mora biti električna prevodnost medu iz nektarja enaka ali manjša od 0,8 mS/cm, električna prevodnost medu iz mane pa večja od 0,8 mS/cm.

### 2.5.3 Vrednost pH

Kislost medu je pomembno merilo za ugotavljanje pristnosti medu. Vrednost pH medu je navadno od 3,2 do 5,5. Pri ponarejanju medu z neinvertnim sladkorjem, pride do manjše

kislosti (vrednost pH je večja od 6,0). Večja kislost pa kaže na to, da je prišlo do ponarejanja medu z invertnim sladkorjem, pridobljenega s hidrolizo v kislem (vrednost pH je približno 3,0 ali manj) (Golob in sod, 2008).

Nizka vrednost pH zavira prisotne mikororganizme in nadaljnjo rast le-teh. Dejansko je vrednost pH medu zelo pomembna lastnost medu, saj vpliva na njegovo teksturo, obstojnost in rok uporabe. Kislost medu izvira iz prisotnosti organskih kislin, zlasti glukonske kisline, ki so v ravnotežju s svojimi pripadajočimi laktoni in estri, ter nekaterih anorganskih ionov, kot so fosfati in sulfati (Bertoncelj in sod., 2011)

Območja vrednosti pH-ja za nekatere vrste slovenskega medu:

- akacijev: 3,6-4,4
- cvetlični med; 3,9-5,2
- gozdni med; 4,4-5,2
- kostanjev med; 4,8-6,2 (Korošec in sod., 2016).

## 2.6 ENCIMI V MEDU

Encimi v medu so zelo različni in izvirajo bodisi iz čebel, mane ali nektarja in cvetnega prahu. Njihova vloga je tudi, da sodelujejo pri nastanku medu iz medičine. Med najpomembnejše encime v medu prištevamo invertazo ali glukozidazo, diastazo ali amilazo in glukozo oksidazo. V medu pa sta še encima katalaza in kislja fosfataza (Golob in sod., 2008).

Encimi so katalizatorji biokemijskih reakcij v živih organizmih. Njihova vloga je, da usmerjajo in uravnavajo tisoče reakcij, ki omogočajo pretvorbe energije, sinteze in metabolne razgradnje (Boyer, 2005).

Če čebele hranimo z raztopino saharoze, jo ne morejo invertirati v celoti. Zato v takih primerih med vsebuje še vedno veliko saharoze, kar nam pomaga pri ugotavljanju pristnosti medu. Sčasoma se encimska učinkovitost medu začne zmanjševati. To se zgodi tudi, če smo med nepravilno shranjevali ali preveč segreli (Božnar in Senegačnik, 1998).

Encimi so zelo občutljivi na toploto, (pri večini encimov nastopi ireverzibilna inaktivacija pri temperaturi 50-60 °C). Zaradi te njihove lastnosti se uporabljajo kot pokazatelji pregretosti medu. Največkrat se uporablja določanje diastazne aktivnosti. Zaradi večje občutljivosti, pa se lahko upošteva tudi invertazna aktivnost, invertaza je bolj občutljiva na visoke temperature kot diastaza (Molan, 1996).

### 2.6.1 Diastaza

Diastaza izvira izključno od čebel, saj nektar ne vsebuje škroba ali dekstrinov. Dokazali so, da je diastaza v medu bolj podobna amilazi v izločkih čebeljih žlez kot tisti, ki je prisotna v nektarju. Našli so jo tudi v medovih čebel, ki so bile hranjene s saharozo. Med zorenjem medu se diastaza primeša medičini iz izločkov čebeljih slinskih žlez, vendar v medu nima posebne vloge (Ovček, 2007).

Diastaze ( $\alpha$ - in  $\beta$ -amilaze) so encimi, ki so naravno prisotni v medu. Količina diastaze je odvisna od botaničnega in geografskega porekla medu. Njena naloga je razgraditi molekule škroba v zmes maltoze (disaharid) in maltotrioze (trisaharid) (Ahmed in sod., 2013).

Vsebnost diastaze v medu se lahko razlikuje. Količina je odvisna od starosti čebel, časovnega obdobja zbiranja nektarja, fiziološkega obdobja kolonije, vsebnosti sladkorja in nektarja (Persano Oddo in sod., 1999).

Tako, kot vsi encimi, je tudi encim diastaza izjemno občutljiv na povišano temperaturo. Zato je določanje diastazne aktivnosti, pomembno merilo pri določanju same kakovosti medu (Golob in sod., 2008).

Vrednost pH, katera je optimalna za delovanje diastaze, je med 5,3 in 5,6. Diastazna aktivnost se zmanjšuje, ko se vrednost pH odmika od optimalne (Babacan in sod., 2002).

Medovi z manjšo količino encimov so proizvedeni iz mladega nektarja v začetku pomladi. Ti medovi imajo manj encimov, malo koncentriranega nektarja in visoko vsebnostjo sladkorja. Zmanjšana pa je tudi aktivnost čebel v času rasti (Vorlová in Přidal, 2002).

Če čebele krmimo umetno, lahko dobimo med v katerem je aktivnost encimov zmanjšana. Guler in sod. (2014) so izvedli raziskavo, v kateri so čebele krmili s koncentrirano glukozo. Avtorji so ugotovili, da čebele ne smejo zaužiti prevelike količine glukoze, ker lahko to vodi do manjše encimske aktivnosti (zlasti diastaze).

Diastazno aktivnost 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 (Ovčjek, 2007).

Pravilnik o medu (2011) določa naslednje vrednosti diastaznega števila:

- med splošno, razen pekovskega medu: najmanj 8
- vrste medu z majhno naravno vsebnostjo encimov (npr. medovi iz citrusov) in vsebnostjo HMF največ 15 mg/kg: najmanj 3

### 2.6.2 Invertaza

Invertaza ali saharaza, lahko delno izvira iz nektarja samega, večinoma pa iz čebelje slin, ki nastaja v posebnih slinskih žlezah (Božnar in Senegačnik, 1998). Drugo ime za invertazo je  $\alpha$ -glukozidaza, ki katalizira pretvorbo saharoze v invertni sladkor. Uvrščamo jo med hidrolaze in naprej med glikozilaze, katere katalizirajo razcep glikozidnih vezi. Ima tudi transglukozilazno aktivnost, rezultat katere je nastanek oligosaharidov (maltoza, izomaltoza, erloza in izomaltotrioza) (Webb, 1992; Molan, 1996).

Invertaza je na segrevanje in dolgotrajno skladiščenje bolj občutljiva kot diastaza, vendar je hitrost inaktivacije encima pod 15 °C zelo majhna. Če med skladiščimo pri 20 °C in v temnem prostoru, se invertazna aktivnost zniža povprečno za 1,1 % (Krauze A. in Krauze J., 1991) oz. 1,6 % na mesec (Vorlová in Přidal, 2002).

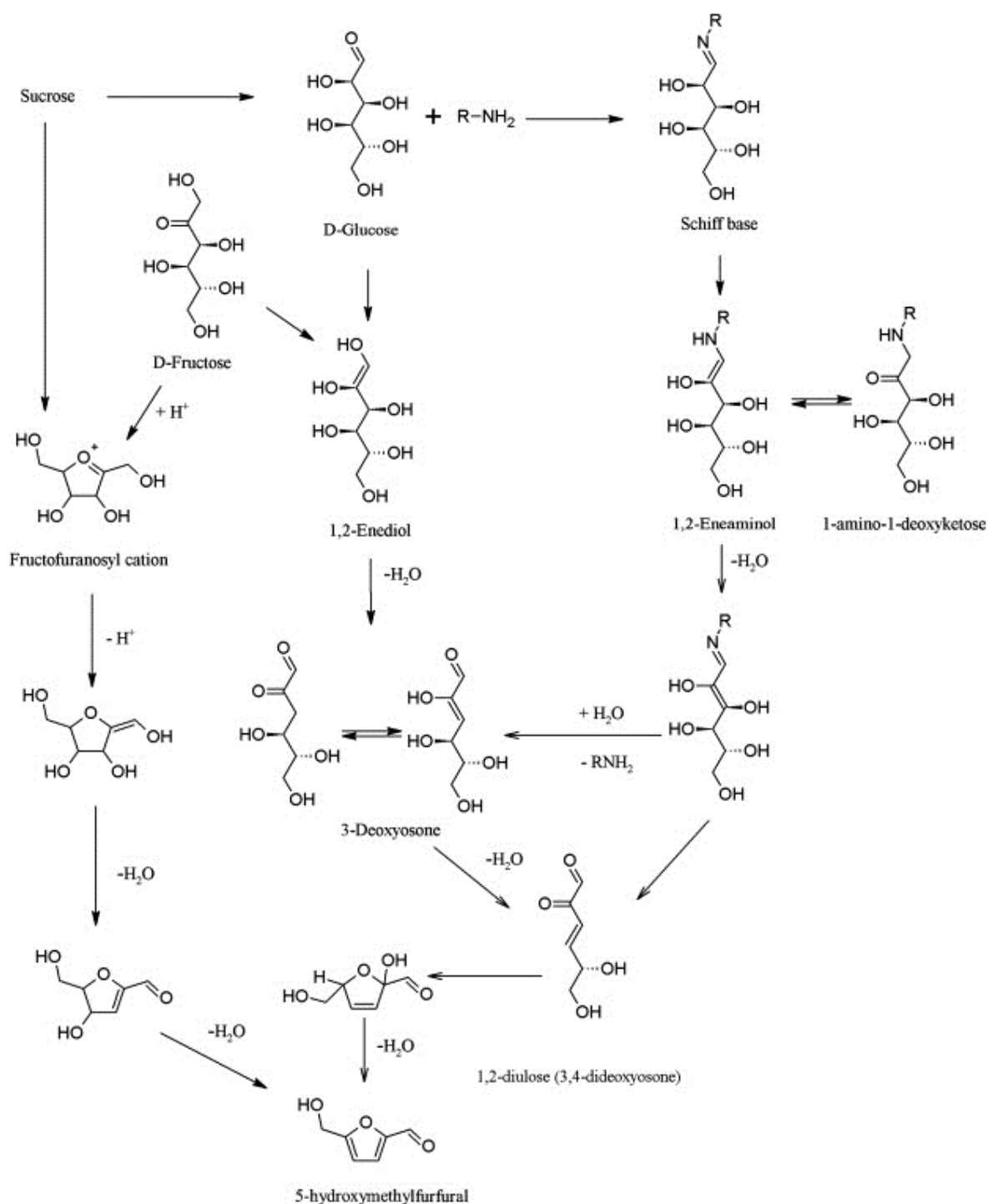
## 2.7 HIDROKSIMETILFURFURAL

Hidroksimetilfurfural (HMF) je ciklični aldehyd (5-hidroksimetil-2-furalaldehid), ki nastaja pri razgradnji ogljikovih hidratov v kislem okolju medu. V svežem medu ga praktično ni (ne presega vsebnosti 1 mg na kilogram medu). HMF se uporablja kot kriterij svežosti, oziroma pokazatelj pregretosti medu, saj se večje količine le-tega tvorijo med dolgotrajnim skladiščenjem, še mnogo hitreje pa pri izpostavljenosti visokim temperaturam. Tvorba HMF je odvisna od kislosti medu. Nektarni medovi imajo v splošnem nižje, manini medovi pa višje vrednosti pH. HMF se tvori hitreje pri medu z nižjo vrednostjo pH, kot pri tistih z višjo vrednostjo (Kapš, 2012).

Pravilnik o medu (2011) določa, da med, razen pekovskega medu, lahko vsebuje največ 40 mg HMF/kg. Med z deklariranim poreklom z območij s tropsko klimo in mešanice teh vrst medu pa največ 80 mg HMF/kg medu.

Visoka vsebnost HMF v medu je lahko tudi znak potvorbe, zaradi dodajanja invertnega sirupa v prisotnosti kislin za inverzijo saharoze (Capuano in Fogliano, 2011; Yücel in Sultanoglu, 2013).

3-deoksiozon je znan kot ključni element v tvorbi HMF in nastane pri 1,2 enolizaciji in dehidraciji glukoze ali fruktoze. Nadaljnje dehidracije in ciklizacije 3-deoksiozona povečajo vsebnost HMF. Slika 1 prikazuje nastanek HMF v živilih, prikazuje glavno pot, ki poteka na podlagi toplote in nizke vlažnosti, ter presnovo, ki vključuje tvorbo zelo reaktivnega fruktofuranozila, ki se lahko pretvori v HMF pri nizki vrednosti pH ( $\text{pH} < 5$ ), kot v primeru medu (Capuano in Fogliano, 2011).



Slika 1: Nastanek 5-hidroksimetilfurfurala (Capuano in Fogliano, 2011)

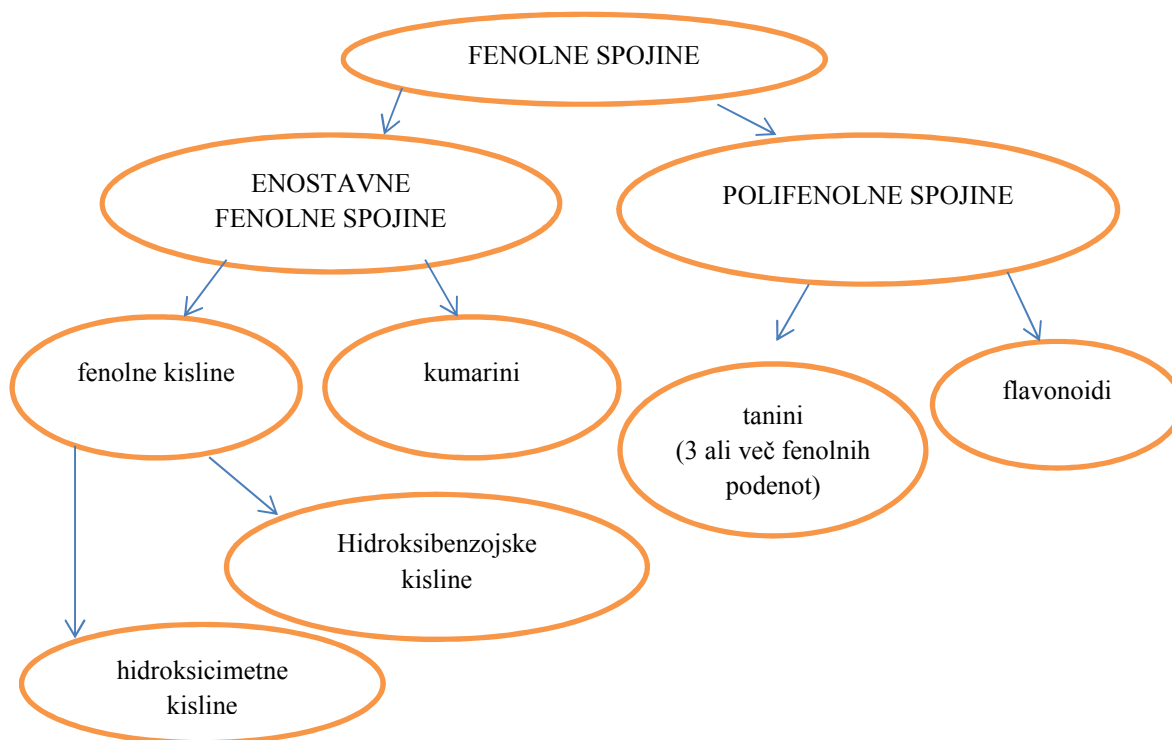
## 2.8 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so gledano s kemijskega stališča zelo različne spojine, s približno 10.000 spojinami. Združene so v različne razrede, glede na njihovo osnovno kemijsko strukturo (Marston in Hostettmann, 2005). Razdelitev fenolnih spojin glede na število fenolnih podenot je prikazana na sliki 2.

Fenolne spojine so prisotne v vseh rastlinah. Gre za sekundarne metabolite. Imajo najmanj en aromatski obroč z eno ali več hidroksilnimi (-OH) skupinami, neposredno vezanimi na obroč. Njihova strukturna oblika se spreminja od enostavnih fenolnih molekul do kompleksnih polimerov z visoko molsko maso. Običajno so v glikozidni obliki, kar poveča njihovo topnost v vodi (Bravo, 1998).

Fenolne spojine so naravni antioksidanti z različno strukturo in kemijskimi lastnostmi. Vse to je zelo pomembno za določanje fenolnih spojin v medu. Vplivajo na kakovost medu, njihovo antioksidativno delovanje koristi našemu zdravju in preprečuje nekatere bolezni (arterosklerozo, tumorje, srčne kapi) (Nardini in Ghisel, 2004; Marini in sod., 2011).

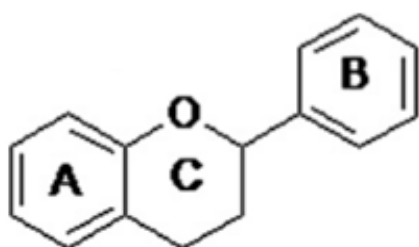
Fenolne spojine so tudi markerji geografskega in botaničnega porekla medu (Anklam, 1998).



Slika 2: Fenolne spojine glede na število fenolnih podenot (Robbins in Bean, 2004)

### 2.8.1 Flavonoidi

Flavonoidi imajo osnovno strukturo  $C_6-C_3-C_6$ , ki vključuje dva benzenska obroča povezana s piran obročem (slika 3). Zamenjave na obročih povzročijo nastanek več kategorij flavonoidov. Predstavljajo največjo skupino rastlinskih fenolnih spojin, kar pomeni več kot 50 % vseh naravnih fenolnih spojin. Te so zelo razširjene v semenih, lubju, listih, cvetovih rastlin in drevesih. V rastlinah te spojine zagotavljajo zaščito pred ultravijoličnim sevanjem, patogenimi mikroorganizmi in rastlinojedimi živalmi. Rastline imajo več polifenolnih derivatov z veliko strukturno raznolikostjo in kompleksnostjo. Čebele zbirajo nektar in s tem lahko te biaoaktivne komponente prenesejo iz rastline v med (Silici in sod., 2010).



Slika 3: Splošna kemijska struktura flavonoidov (Tsao, 2010)

### 2.8.2 Fenolne kisline

Fenolne kisline predstavljajo pomemben razred fenolnih spojin z bioaktivnim delovanjem, vsebujejo jih rastline in živila rastlinskega izvora. So sekundarni rastlinski metaboliti, potrebni za normalno delovanje rastlin. Delujejo kot antioksidanti, ki odpravljajo proste radikale in inhibirajo oksidacijo lipidov. Lahko jih razvrstimo v dve podskupini glede na njihovo strukturo: hidroksibenzojske in hidroksicimetne kisline (Challacombe in sod., 2012).

Hidroksicimetne kisline imajo splošno strukturo  $C_3-C_6$ , predstavniki so p-kumarna, kavna, ferulna in sinapinska kislina. Te spojine se pojavljajo običajno v konjugirani obliki kot estri hidroksi kislin, vinske in šikimske kisline (Fleuriet in Macheix, 2003).

Hidroksibenzojske kisline imajo splošno strukturo  $C_1-C_6$  in vključujejo p-hidroksibenzojsko, vanilinsko, siringinsko, galno in elaginsko kislino. Te spojine so lahko prisotne v njihovi topni obliki v celicah (Fleuriet in Macheix, 2003).



## 2.9 ANTIOKSIDANTI

Mnoge rastline sintetizirajo spojine z antioksidativnim delovanjem, ki veljajo za naravni vir obrambe človeškega organizma pred delovanjem radikalov. Bioaktivne komponente se prenesejo v med, kadar čebele na teh rastlinah nabirajo nektar oziroma mano. Antioksidanti imajo sposobnost, da že v majhnih koncentracijah zavirajo ali preprečujejo neželene oksidativne spremembe v bioloških sistemih (v živilih in živih organizmih) (Antolovich in sod., 2002; Baltrušaityte in sod., 2007).

### 2.9.1 Delitev antioksidantov

Antioksidante delimo na prave antioksidante, (ki vežejo proste radikale), reducente in antioksidativne sinergiste, (ki povečujejo učinkovanje antioksidantov prve skupine). Kemijsko ločimo vodotopne antioksidante (askorbinska kislina, glutation in flavonoidi) in v maščobi topne antioksidante (vitamin E, kurkumin, karotenoidi, retinoidi, ubikinon in koencim Q10) (Korošec, 2000). V medu je vsebnost vseh teh sestavin majhna in variira glede na botanično in geografsko poreklo medu. Tudi postopki pridobivanja medu in pogoji skladiščenja lahko v manjši meri vplivajo na vsebnost teh sestavin (Frankel in sod., 1998; Gheldof in Engeseth, 2002; Wang in sod., 2004; Turkmen in sod., 2006).

### 2.9.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres je posledica neravnovesja med nastankom prostih radikalov in antioksidativnim obrambnim sistemom. Vodi v nastanek nekaterih kroničnih nenalezljivih bolezni. Oksidativne reakcije, pa so tudi reakcije, ki so najbolj nezaželene v živilskih izdelkih. V sadju, zelenjavi, ostalih rastlinskih živilih (stročnice, oreški in žita) in v pijači (vino, pivo, kakav in čaj) imamo naravne antioksidante (vitamine oz. provitamine in polifenolne spojine). Prehranski antioksidanti pomembno vplivajo na izboljšanje antioksidativnega obrambnega sistema (Gheldof in sod., 2002; Aljadi in Kamaruddin, 2004).

### 2.9.3 Antioksidativna učinkovitost medu

Za antioksidativni učinek medu so odgovorne spojine fenolnega ali nefenolnega izvora. Od fenolnih spojin so v medu prisotne fenolne kisline (benzojska, cimetna, kavna, *p*-kumarna, ferulna, galna, elaginska, vanilinska in klorogenska kislina) in flavonoidi (pinobaksin, pinocembrin, krizin, galangin, apigenin, kvercetin, kamferol, luteolin, tektokrizin, hesperetin, pinostrobin in miricetin). Predstavniki nefenolnih spojin pa so abscizinska kislina, proteini, prolin, glukonska kislina, askorbinska kislina, katalaza, peroksidaza, vodikov peroksid, hidroksimetilfurfural (HMF), produkti Maillardove reakcije (Tomas-Barberan in sod., 2001; Gheldof in sod., 2002; Al-Mamary in sod., 2002).

Antioksidativni potencial medu, je rezultat medsebojnega delovanje širokega spektra komponent, vključno s fenolnimi spojinami, organskimi kislinami, peptidi, encimi, prdukti Maillardove reakcije (Gheldof in sod., 2002).

K antioksidativni učinkovitosti medu lahko prispevajo tudi produkti Maillardove reakcije, pri kateri reducirajoči ogljikovi hidrati reagirajo s prostimi aminokislinami in nastanejo rjavi pigmenti (Bertoncelj, 2008).

#### **2.9.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti medu z FRAP metodo**

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), temelji na določanju antioksidativne moči redukcije železa. Gre za preprosto, hitro, poceni, ponovljivo in avtomatizirano metodo, katera temelji na redukciji železa iz feri v fero obliko v prisotnosti antioksidanta. Pri nizki vrednosti pH se razvije intenzivno modro obarvan kompleks fero tripiridiltriazin, ki ima absorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie in Strain, 1996; Beretta in sod., 2005).

### **2.10 VPLIV TEMPERATURE IN ČASA SEGREVANJA NA AKTIVNOST ENCIMA DIASTAZE, VSEBNOST HMF, VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN, ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST, BARVO IN PORJAVENJE MEDU**

Pri segrevanju medu prihaja do različnih procesov, kot so inaktivacija encimov, razgradnja sladkorjev, poslabšanje senzoričnih lastnosti, povečanje vsebnosti HMF in drugih sprememb, ki lahko vplivajo na kakovost medu. Z vidika potrošnika je pomembno, da med ohrani svoje lastnosti tudi med segrevanjem, ki je potrebno v primeru kristaliziranega medu. Zato je za toplotno obdelavo medu z namenom utekočinjanja le-tega potrebno uporabiti primerne temperature in čas segrevanja. Vpliv segrevanja na določene kakovostne parametre medu je že dalj časa predmet številnih raziskav.

#### **Diastaza in HMF**

- Vsebnost HMF in aktivnost encima, diastaze se uporabljata kot pokazatelja staranja. Diastazna aktivnost se zmanjša med skladiščenjem ali, ko izdelek segrevamo nad 60 °C (Yücel in Sultanoglu, 2013).
- Za medove, ki imajo nizko diastazno aktivnost, je bistvenega pomena, da vsebujejo največ 15 mg/kg HMF, saj moramo dokazati, da nizka diastazna aktivnost ni posledica segrevanja medu ali dolgotrajnega skladiščenja (Da Silva in sod., 2015).
- White in sod. (1964) so dokazali, da je invertaza bolj občutljiva na segrevanje kot diastaza. Preučevali so vpliv skladiščenja medu pri različnih temperaturah, z namenom, vrednotenja oz. določanja optimalnih pogojev toplotne obdelave in shranjevanja medu.
- Hasan (2013) je v svoji študiji pokazal, da je dvig temperature (55, 65 in 75 °C) pri treh različnih vzorcih medu izzval precej podobne rezultate – v vseh treh primerih je diastazno in invertazno število upadlo. Rezultati so pokazali, da se diastazno število ni znatno zmanjšalo, prav tako ni prišlo do znatnega zmanjšanja invertaznega števila. Vendar, če primerjamo rezultate diastaznega in invertaznega

števila, lahko vidimo, da je vseeno pri invertazi prišlo do malo večjega upada v primerjavi z diastazo. Zato lahko zaključimo, da je invertaza bolj občutljiva na segrevanje kot diastaza. Invertaza je zato boljši parameter za vrednotenje vpliva toplotne obdelave medu.

- Dustmann in sod. (1993) so ugotovili, da se invertaza pri segrevanju poškoduje. Podobne posledice zaznamo tudi pri predolgem skladiščenju. HMF je precej neprimeren za ugotavljanje pregretosti medu, v kolikor bi bila temperatura edini kriterij, kajti tudi drugi dejavniki lahko vplivajo na vsebnost HMF (količina sladkorja v medu, prisotnost organskih kislin, vrednost pH,  $a_w$  vrednost in vrsta nektarja oz. mane). Zato je HMF samo pokazatelj pregrevanja ali neustreznih pogojev skladiščenja medu. Poleg tega se lahko HMF tvori tudi pri nizki temperaturi, celo pod kislimi pogoji (Casto-Vazquez in sod., 2007; Wang in sod., 2009; Barra in sod., 2010; Tornuk in sod., 2013).
- HMF nastane kot vmesni produkt pri Maillardovi reakciji in pri neposredni dehidraciji sladkorjev (Casto-Vazquez in sod., 2007; Wang in sod., 2009 Barra in sod., 2010).
- Hasan (2013) je s svojo študijo dokazal, da segrevanje pri temperaturi 55 °C ne pokaže značilnih razlik v vsebnosti HMF v primeru treh različnih vzorcev. Segrevanje pri 65 °C je povzročilo povečanje vsebnosti HMF v dveh od treh vzorcev. Povišanje temperature na 75 °C pa je povzročilo da se je vsebnost HMF zelo povečala. V omenjeni študiji so torej dokazali, da je nastajanje HMF povezano z dvigom temperature.
- Tosi in sod. (2002) so prišli do podobnih ugotovitve, ko so med segrevali 1 minuto pri 100 °C in kasneje še pri temperaturi 140 °C. Segrevanje pri obeh temperaturah je povzročilo povečanje vsebnosti HMF iz 10,1 mg/kg na 32,8 mg/kg. Tudi Karabournioti in Zervalaki (2001) sta ugotovila, da povišanje temperature ( 55, 65 in 75°C) vpliva na povečanje vsebnosti HMF.
- Vsebnost HMF v svežem medu je precej nizka v primerjavi z vsebnostjo HMF v pregretyh oziroma dolgo shranjenih medovih (Kowalski, 2013).

### **Vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativna učinkovitost**

- Kowalski (2013) je proučeval spremembe v vsebnosti skupnih fenolnih spojin in antioksidativni učinkovitosti v medu med klasičnim segrevanjem in segrevanjem z mikrovalovi. Pri klasičnem segrevanju je med segreval v vodni kopeli 60 min pri 90 °C. Pri segrevanju z mikrovalovi pa je uporabil mikrovalovni reaktor z močjo 1,26 W/g in med segreval 6 min. Ugotovil je, da se vsebnost skupnih fenolnih spojin v medu iz mane po končanem segrevanju zmanjša, v lipovem medu poveča, medtem ko segrevanje v primeru akacijevega in ajdovega medu ni imelo vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin. Preverjal je tudi spremembe antioksidativne učinkovitosti medu. Po segrevanju je v medu iz mane določil manjšo

antioksidativno učinkovitost tako pri segrevanju z mikrovalovi, kot pri klasičnem segrevanju, sprememba je bila večja pri klasičnem segrevanju. V lipovem in ajdovem medu se je AU povečala, v akacijevem medu pa ni bilo razlik v antioksidativni učinkovitosti med nesegetimi in segretemi vzorci medu.

### **Barva in porjavenje**

- Potemnitev medu je lahko posledica dolgotrajnega shranjevanja medu, kar je povezano predvsem s temperaturo shranjevanja in sestavo samega medu (Vaikousi in sod., 2009).
- Barva je eden od najbolj variabilnih parametrov in je predvsem odvisna od rastlinskega izvora. Nanjo pa vpliva tudi vsebnost pepela, sama temperatura v panju in čas ter pogoji shranjevanja medu (Gambaro in sod., 2007).
- Segrevanje spodbuja porjavenje in tvorbo melanoidinov v svetlih in srednje obarvanih medovih. Poleg tega pa vpliva na topnost rjavih pigmentov in potencialno na njihovo stabilnost v temnih medovih. (Brudzynski in Miotto, 2011).

Za merjenje spremembe barve in vsebnosti melanoidinov so uporabili medove, ki so se že v osnovi zelo različnih barv. Uporabili so med iz detelje (zelo svetla barva), med manuke (srednje intenzivna barva) in ajdov med (temna barva). Medove so segrevali 30 minut pri 121 °C. Segrevanje je povzročilo vidne spremembe barve medov, vsi obravnavani medovi so postali temnejši. Vsebnost melanoidinov (določenih na osnovi neto absorbance:  $A_{450}-A_{720}$ ) se je najbolj povečala v najsvetlejšem medu, za 2,5-krat. Pri medu s srednjo intenzivnostjo barve (manuka med) se je vsebnost melanoidinov povečala za 1,4-krat. V najtemnejšem ajdovem medu se je neto absorbanca celo zmanjšala, kar pomeni, da ima segrevanje večji vpliv pri svetlejših vrstah medu (Brudzynski in Miotto, 2011).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 VZORCI MEDU

V raziskavo smo vključili 8 vzorcev slovenskega medu, po 2 vzorca akacijevega, cvetličnega, kostanjevega in gozdnega medu, ki smo jih dobili neposredno od čebelarjev. Medovi so bili letnik 2010 in iz različnih regij Slovenije. Vrste medu in oznake vzorcev so predstavljene v preglednici 2. Posamezni vzorec medu smo prenesli v 5 kozarčkov, od katerih je en ostal neseget, ostale pa smo segrevali v sušilniku določen čas (24 ali 48 ur) pri določeni temperaturi (40 ali 65 °C).

Preglednica 2: Vrste medu, število vzorcev in oznake vzorcev

| VRSTA MEDU |    | ŠTEVILO<br>VZORCEV | OZNAKA VZORCEV             |
|------------|----|--------------------|----------------------------|
| Akacijev   | A1 | 5                  | A1, A1-1, A1-2, A1-3, A1-4 |
|            | A2 | 5                  | A2, A2-1, A2-2, A2-3, A2-4 |
| Cvetlični  | C1 | 5                  | C1, C1-1, C1-2, C1-3, C1-4 |
|            | C2 | 5                  | C2, C2-1, C2-2, C2-3, C2-4 |
| Kostanjev  | K1 | 5                  | K1, K1-1, K1-2, K1-3, K1-4 |
|            | K2 | 5                  | K2, K2-1, K2-2, K2-3, K2-4 |
| Gozdni     | G1 | 5                  | G1, G1-1, G1-2, G1-3, G1-4 |
|            | G2 | 5                  | G2, G2-1, G2-2, G2-3, G2-4 |

Režim segrevanja vzorcev (temperatura in čas) je prikazan v preglednici 3. Skupno število vzorcev, vključenih v analizo je bilo 40. Vzorce smo po toplotni obdelavi, do začetka analiz, hranili v temnem prostoru pri sobni temperaturi.

Nesegetim vzorcem smo določili vsebnost vode, električno prevodnost in vrednost pH, vsem vzorcem pa aktivnost encima diastaze, vsebnost HMF, vsebnost skupnih fenolnih spojin, antioksidativno učinkovitost s (FRAP metodo), barvo ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  parametri) in indeks porjavenja. Meritve smo opravili v dveh oz. treh ponovitvah in rezultate podali kot povprečne vrednosti.

Preglednica 3: Oznake vzorcev, temperatura in čas segrevanja

| VRSTA IN<br>OZNAKA<br>OSNOVNEGA<br>VZORCA MEDU | OZNAKE VZORCEV<br>ZA ANALIZO | TEMPERATURA<br>SEGREVANJA<br>(°C) | ČAS<br>SEGREVANJA<br>(h) |
|------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Akacijev<br>A                                  | A1*                          | /                                 | /                        |
|                                                | A1-1                         | 40                                | 24                       |
|                                                | A1-2                         |                                   | 48                       |
|                                                | A1-3                         | 65                                | 24                       |
|                                                | A1-4                         |                                   | 48                       |
|                                                | A2*                          | /                                 | /                        |
|                                                | A2-1                         | 40                                | 24                       |
|                                                | A2-2                         |                                   | 48                       |
|                                                | A2-3                         | 65                                | 24                       |
|                                                | A2-4                         |                                   | 48                       |
| Cvetlični<br>C                                 | C1*                          | /                                 | /                        |
|                                                | C1-1                         | 40                                | 24                       |
|                                                | C1-2                         |                                   | 48                       |
|                                                | C1-3                         | 65                                | 24                       |
|                                                | C1-4                         |                                   | 48                       |
|                                                | C2*                          | /                                 | /                        |
|                                                | C2-1                         | 40                                | 24                       |
|                                                | C2-2                         |                                   | 48                       |
|                                                | C2-3                         | 65                                | 24                       |
|                                                | C2-4                         |                                   | 48                       |
| Kostanjev<br>K                                 | K1*                          | /                                 | /                        |
|                                                | K1-1                         | 40                                | 24                       |
|                                                | K1-2                         |                                   | 48                       |
|                                                | K1-3                         | 65                                | 24                       |
|                                                | K1-4                         |                                   | 48                       |
|                                                | K2*                          | /                                 | /                        |
|                                                | K2-1                         | 40                                | 24                       |
|                                                | K2-2                         |                                   | 48                       |
|                                                | K2-3                         | 65                                | 24                       |
|                                                | K2-4                         |                                   | 48                       |
| Gozdni<br>G                                    | G1*                          | /                                 | /                        |
|                                                | G1-1                         | 40                                | 24                       |
|                                                | G1-2                         |                                   | 48                       |
|                                                | G1-3                         | 65                                | 24                       |
|                                                | G1-4                         |                                   | 48                       |
|                                                | G2*                          | /                                 | /                        |
|                                                | G2-1                         | 40                                | 24                       |
|                                                | G2-2                         |                                   | 48                       |
|                                                | G2-3                         | 65                                | 24                       |
|                                                | G2-4                         |                                   | 48                       |

\*nesegeti vzorci

## 3.2 FIZIKALNOKEMIJSKE LASTNOSTI

### 3.2.1 Določanje vsebnosti vode v medu (Bogdanov, 2009)

#### Princip:

Metoda temelji na principu refraktometrijskega določanja vsebnosti vode (na osnovi merjenja lomnega količnika medu).

#### Aparatura in pribor:

- ročni refraktometer Atago HHR-2N
- steklena čaša
- steklena palčka

#### Priprava vzorca:

Pred začetkom analize tekoč, med premešamo s palčko. Kadar je med kristaliziran, ga v zaprti posodi segrevamo na 50 °C do utekočinjenja. Med segrevanjem posodico krožno pretresamo ali med premešamo s palčko. Nato ga na hitro ohladimo.

#### Izvedba:

Tanko plast medu, nanesemo na merilno prizmo ročnega refraktometra. Paziti moramo, da v medu ni zračnih mehurčkov in, da je merilna prizma popolnoma pokrita z medom. Nato refraktometer usmerimo proti dovolj močnemu viru svetlobe in pogledamo skozi okular. Odčitamo vsebnost vode v % in upoštevamo tudi temperaturno korekcijo. Po opravljeni meritvi odstranimo med s prizme, jo očistimo z destilirano vodo in obrišemo do suhega.

#### Rezultat:

Odčitamo % vode in upoštevamo korekcijsko vrednost.

### 3.2.2 Merjenje električne prevodnosti medu (Kropf in sod., 2008)

#### Princip:

Merjenje električne prevodnosti 20 % (w/w) raztopine medu (glede na suho snov v medu) s konduktometrom pri temperaturi 20 °C. Rezultat podamo v mili Siemensih na centimeter (mS/cm).

#### Reagenti:

- destilirana voda
- 0,1 M raztopina KCl za umerjanje konduktometra

#### Aparatura in pribor:

- konduktometer, Cyberscan 510
- steklena čaša
- steklena palčka
- mala plastična žlička

Izvedba:

Odtehta medu je odvisna od količine vode, ki jo med vsebuje. Po določanju vsebnosti vode v medu, preračunamo kakšna mora biti odtehta medu, da bo končna raztopina vsebovala 20 % suhe snovi (w/w). Med z destilirano vodo v plastični časi mešamo s stekleno palčko, da se popolnoma raztopi. Nato raztopini medu izmerimo prevodnost tako, da v raztopino potopimo elektrodo predhodno umerjenega konduktometra in odčitamo prevodnost medu.

Rezultat:

Rezultate direktno odčitamo s konduktometra v mS/cm.

### **3.2.3 Določanje vrednosti pH v medu (Bogdanov, 2009)**

Princip:

Vrednost pH vodne raztopine medu izmerimo s pH metrom.

Izvedba:

Odtehtamo 10 g vzorca medu, dodamo 25 ml destilirane vode in s stekleno palčko premešamo, da se ves med raztopi. S predhodno umerjenim pH metrom takoj izmerimo vrednost pH.

### **3.2.4 Določanje aktivnosti encima diastaze z metodo po Schadeju (Bogdanov, 2009)**

Princip:

Standardna raztopina škroba ob prisotnosti raztopine joda razvije različno intenzivno barvo. Intenzivnost modre barve s časom pada, odvisna je od aktivnosti encima v vzorcu medu pod standardnimi pogoji. Nastanek modro obarvanega produkta spremljamo z merjenjem absorbance pri 660 nm v določenih časovnih intervalih. Aktivnost diastaze izrazimo z diastaznim številom, ki izraža aktivnost diastaze kot volumen (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 prekuhani destilirani vodi, prenesemo v 100 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake
- 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 in prenesemo v 250 ml merilno bučko. Dodamo približno 10,5 ml ledocentne kisline in z destilirano vodo dopolnimo do oznake.
- 2 % raztopina škroba: raztopina mora biti dnevno sveža
- raztopina joda



#### Aparatura in pribor:

- spektrofotometer (Cecil CE 2021)
- vodna kopel (Lab – line, Aqua bath)
- steklene čaše
- steklene merilne bučke
- steklene erlenmajerice
- steklene palčke
- pipeta
- štoparica

#### Določitev suhe snovi v škrobu:

Zatehtamo približno 2 g škroba v tehtič in ga sušimo 3 ure pri 105 °C. Tehtič pustimo približno eno uro v eksikatorju, nato ga stehtamo. Na podlagi izgube mase lahko določimo vsebnost vode oz. vsebnost suhe snovi v škrobu.

#### Priprava raztopine škroba:

V 100 ml čašo zatehtamo količino škroba, ki ustreza masi 2 g suhega škroba. Da se škrob rehidrira, mu dodamo nekaj kapljic destilirane vode. Nato vse skupaj kvantitativno prenesemo v 100 ml bučko. Čašo spiramo z vročo destilirano vodo in z njo tudi dopolnimo bučko, tako, da ta vsebuje približno 60 ml. Bučko pokrijemo z alu folijo na kateri so luknjice. Bučko postavimo na kuhalnik in pustimo, da 10 min počasi vre in vmes ves čas mešamo. Nato bučko čim hitreje ohladimo pod tekočo vodo. Z destilirano vodo dopolnimo do oznake.

#### Priprava osnovne raztopine joda:

11 g joda pomešamo z 22 g kalijevega jodida in raztopimo v 30 do 40 ml destilirane vode. Kvantitativno prenesemo v 500 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake. Hranimo v temnem prostoru.

#### Dnevna raztopina joda:

Raztopina mora biti dnevno sveža. V 30 - 40 ml destilirane vode raztopimo 20 g kalijevega jodida, prelijemo v 500 ml merilno bučko, dodamo 2 ml osnovne raztopine joda, premešamo ter dopolnimo do oznake z destilirano vodo.

#### Priprava vzorca:

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

#### Določitev modre vrednosti škroba:

V erlenmajerici zmešamo 5 ml škroba in 10 ml vode ter segrevamo na vodni kopeli pri 40 °C. V čašo odpipetiramo 5 ml dnevne raztopine joda in mu dodamo 0,5 ml na 40 °C segrete raztopine škroba in vode. Razredčimo s toliko ml vode, da je vrednost absorbance pri 660 nm med 0,770 in 0,745. Tako določimo količino vode, katero potem dodajamo vsakemu vzorcu.

#### Izvedba analize:

Slepi vzorec: 10 ml raztopine vzorca medu dodamo 5 ml vode ter premešamo. 0,5 ml te raztopine dodamo 5 ml raztopine dnevnega joda in ustrezno količino destilirane vode, ki določeno pri modri vrednosti škroba, premešamo in takoj zmerimo absorbanco pri valovni dolžini 660 nm.

#### Merjenje absorbance vzorcev:

V 100 ml erlenmajerico s pipeto odmerimo 10 ml raztopine medu. V čašo odmerimo vsaj 6 ml dnevnne raztopine škroba. Erlenmajerjevo bučko in čašo damo v vodno kopel pri 40 °C za 15 min. Po tem času v erlenmajerico z vzorcem dodamo 5 ml raztopine škroba. Po točno 5 minutah damo v čašo 0,5 ml vzorca in 5 ml dnevnne raztopine joda in vse skupaj dobro premešamo. Nato dodamo količino vode, ki ustreza modri vrednosti škroba in ponovno premešamo. Absorbanco izmerimo takoj pri valovni dolžini 660 nm. Meritve ponavljamo v časovnih intervalih 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 3 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 (enačba 1) in tako določimo diastazno število.

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

t: čas v minutah

### **3.2.5 Določanje vsebnosti HMF z metodo po Winklerju (Bogdanov, 2009)**

#### Princip:

Metoda temelji na principu reakcije HMF z barbiturno kislino in *p*-toluidinom, pri čemer nastane spojina rožnate barve, kateri izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 550 nm.

#### Reagenti:

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

Aparatura in pribor:

- merilne bučke (50 ml in 100 ml)
- vodna kopel
- spektrofotometer (Cecil CE 2021)
- pipeta

Izvedba:

Odtehtamo 10 g vzorca medu in ga raztopimo v 20 ml destilirane vode, medu ne segrevamo. Raztopino prenesemo v 50 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake. Odmerimo s pipeto 2 ml pripravljene raztopine medu in jo prenesemo v vsako od dveh epruvet, ter dodamo 5 ml p-toluidina. V eno od epruvet odmerimo s pipeto 1 ml vode, v drugo pa 1 ml barbiturne kisline, vsebino dobro premešamo. Epruveto, v katero smo dali destilirano vodo, uporabimo kot slepi vzorec. Reagente dodajamo brez prekinitve v 1 do 2 minutah. Ko intenziteta barve doseže maksimum, odčitamo absorbanco pri 550 nm v 1 cm kivetu. Vsebnost HMF izračunamo po enačbi 2 in jo izrazimo v mg/kg medu.

Račun:

$$\text{Vsebnost HMF medu [mg/kg]} = (A_{vz} - A_{sl}) \cdot 192 \quad \dots(2)$$

$A_{vz}$ : izmerjena absorbanca raztopine vzorca

$A_{sl}$ : izmerjena absorbanca slepega vzorca

### **3.2.6 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteuovo metodo (Beretta in sod., 2005)**

Princip:

Spektrofotometrična metoda temelji na oksidaciji fenolnih spojin s FC reagentom, ki vsebuje volframat in molibdat. Obarvanemu produktu izmerimo absorbanco pri 750 nm. Za umeritveno krivuljo uporabimo raztopino galne kisline, ki se uporablja kot standardna referenčna raztopina za določanje skupnih fenolnih spojin. Rezultate izrazimo v mg galne kisline na kilogram medu ( $\text{mg}_{GA}/\text{kg}$ ). Analizo smo izvedli v kislih pogojih, s čimer smo preprečili vpliv sladkorjev in obarjanje med samim izvajanjem analize.

Reagenti:

- Folin-Ciocalteuov reagent razredčen z destilirano vodo v razmerju 1:10
- sladkorni analog (40 % fruktoze, 30 % glukoze, 10 % maltoze in 20 % vode)
- galna kislina
- destilirana voda

Aparatura:

- spektrofotometer (Cecil CE 2021)

#### Izvedba:

5 g vzorca medu smo zatehtali v stekleno čašo in ga raztopili v 20 ml destilirane vode. Vzorec smo prenesli v 50 ml bučko in dopolnili do oznake. Za analizo smo odpipetirali 200  $\mu$ l vzorca, mu dodali 2,0 ml FC reagenta in na stresalniku mešali 2 min. Po 20 min smo na spektrofotometru izmerili absorbanco proti sladkornemu analogu, ki ima podobno sestavo sladkorjev kot med in služi kot slepi vzorec. Vsak vzorec medu smo določili v treh vzporednih določitvah. Koncentracijo skupnih fenolnih spojin v medu smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo pripravimo z galno kislino s koncentracijo od 8,0 do 120,0 mg/l, (prilogi C in D).

### **3.2.7 Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo FRAP (Benzie in Strain, 1996)**

#### Princip:

FRAP metoda temelji na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  v  $\text{Fe}^{2+}$  ob prisotnosti antioksidanta. Nastali  $\text{Fe}^{2+}$  ioni ob prisotnosti TPTZ reagenta (2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazin) tvorijo obarvan kompleks, ki doseže absorpcijski maksimum pri 593 nm. Reakcija poteka v kislem mediju.

#### Reagenti:

- 10 mM TPTZ (2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazin)
- 40 mM HCl
- 20 mM železov klorid ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- 300 mM acetatni pufer ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), pH 3,6
- 20 mM železov sulfat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- destilirana voda

#### Aparatura:

- spektrofotometer (Cecil CE 2021)

#### Izvedba:

##### Priprava FRAP reagenta:

Na analitski tehtnici smo odtehtali 31,0 mg TPTZ reagenta in mu dodali 10 ml 40 mM HCL, ter mešanico popolnoma raztopili v vodni kopeli na 50 °C. Nato smo odtehtali 54,0 mg železovega klorida in ga raztopili v 10 ml destilirane vode. Za pripravo FRAP reagenta smo odpipetirali TPTZ reagent,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in acetatni pufer v razmerju 1:1:10. FRAP reagent vedno pripravimo tik pred uporabo in ga med analizo hranimo v vodni kopeli pri 37 °C.

#### Umeritvena krivulja:

Pripravili smo standardne raztopine železovega sulfata s koncentracijo od 0,1 do 1,0 mM. Odpipetirali smo 0,2 ml posamezne standardne raztopine, dodali 1,8 ml FRAP reagenta, dobro premešali in inkubirali 10 min pri 37 °C. Nato smo na spektrofotometru pri valovni dolžini 593 nm izmerili absorbance standardnih raztopin proti slepemu vzorcu. Iz izmerjenih absorbanc in znanih koncentracij standardnih raztopin smo narisali umeritveno krivuljo (prilogi E in F).

#### Vzorci:

V stekleno čašo smo odtehtali 5,0 g vzorca medu in ga raztopili v ca. 20 ml destilirane vode. Nato smo vzorec kvantitativno prenesli v 50 ml bučko in dopolnili do oznake. Za analizo smo odpipetirali 200  $\mu$ l vzorca in mu dodali 1,8 ml FRAP reagenta ter inkubirali 10 min pri 37 °C. Nato smo na spektrofotometru izmerili absorbanco pri 593 nm proti slepemu vzorcu. Vsak vzorec smo analizirali v treh vzporednih določitvah. Rezultate izrazimo kot FRAP vrednost ( $\mu$ M Fe II) 10 % raztopine medu.

### **3.2.8 Merjenje barve z Minolta kromometrom**

#### Princip:

Kromometer Minolta CR-200B deluje na principu odboja svetlobe, ki ga naše oko zazna v obliki barve. Barvo vzorca razdeli na tri komponente ( $L^*$ ,  $a^*$  in  $b^*$ ), ki jih predstavi v določenem koordinatnem sistemu. Vrednost  $L^*$  določa svetlost vzorca (višje so vrednosti, svetlejši je vzorec). Vrednosti  $a^*$  in  $b^*$  določata odtenek barve. Parameter  $a^*$  določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju in intenziteto zelene barve v negativnem območju. Parameter  $b^*$  določa intenzivnost rumene barve v pozitivnem območju in modre v negativnem.

#### Aparatura in pribor:

- kromometer Minolta CR-200B (Konica Minolta, Japonska)
- računalnik DATA DP 100
- plastične petrijevke

#### Izvedba:

Plastične prozorne petrijevke smo napolnili z medom in jih previdno pokrili s pokrovom. Tako smo se izognili nastanku zračnih mehurčkov. Kristalizirane vzorce smo predhodno utekočinili v sušilniku pri 40 °C. Nato smo na petrijevko nastavili merilno glavo kromometra Minolta CR-200B in na računalniku odčitali  $L^*$ ,  $a^*$  in  $b^*$  vrednosti za posamezne vzorce. Meritve smo ponovili trikrat na različnih mestih za vsak vzorec in rezultat podali kot povprečje.

### **3.2.9 Spektrofotometrično določanje barve in indeksa porjavenja medu (Brudzynski in Miotto, 2011)**

#### Princip:

Barvne raztopine medu absorbirajo svetlobo pri določenih valovnih dolžinah. Barvo in indeks porjavenja smo določili na osnovi vrednosti absorbanc, merjenih pri valovnih dolžinah 450, 560 in 720 nm.

#### Aparatura:

- spektrofotometer (Cecil CE 2021)

Izvedba:

Pripravili smo 50 % raztopino posameznega vzorca medu (w/v) in jo filtrirali preko filter papirja (modri trak, 391 Sartorius). Filtratu smo izmerili absorbanco pri treh valovnih dolžinah, 450, 560 in 720 nm.

Rezultat:

Barva medu:  $A_{560}-A_{720}$

Indeks porjavenja:  $A_{450}-A_{720}$

### 3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate kemijske analize smo uredili in statistično obdelali s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel. Za obdelavo samih podatkov, pa smo uporabljali naslednje statistične parametre: minimalno vrednost (min), maksimalno vrednost (max), povprečno vrednost ( $\bar{x}$ ), koeficient variabilnosti, standardno deviacijo, Pearsonov koeficient determinacije ( $r^2$ ) in koleracije ( $r$ ).

## 4 REZULTATI

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti vpliv temperature in časa segrevanja na izbrane parametre medu. V raziskavo smo vključili 8 vzorcev medu, katere smo dobili neposredno od čebelarjev. Nesegetim vzorcem akacijevega, cvetličnega, gozdnega in kostanjevega medu, smo določili vsebnost vode, električno prevodnost in vrednost pH. Nato smo vzorce segrevali določen čas (24 oz. 48 ur) pri dveh temperaturah (40 in 65 °C) in jim določili diastazno aktivnost, vsebnost HMF, vsebnost skupnih fenolnih spojin in barvo. S korelacijsko analizo smo iskali morebitne zveze med obravnavanimi parametri.

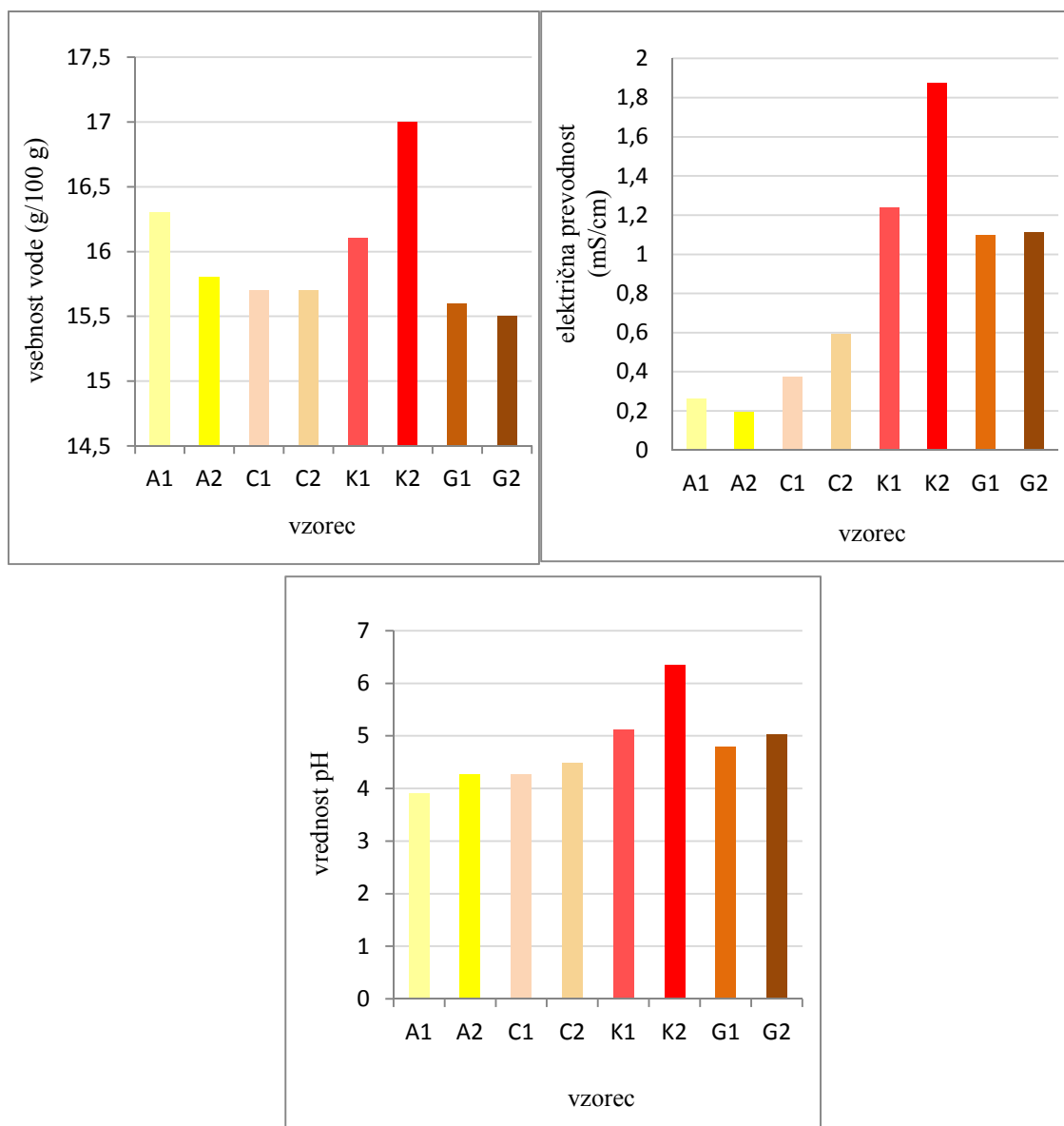
### 4.1 REZULTATI DOLOČANJA FIZIKALNOKEMIJSKIH PARAMETROV

#### 4.1.1 Rezultati vsebnosti vode, električne prevodnosti in vrednosti pH.

Vsebnost vode, električno prevodnost in vrednost pH smo določili v nesegetih vzorcih medu. Rezultati so predstavljeni na sliki 4. V analiziranih vzorcih, medu je bila vsebnost vode precej izenačena, gibala se je od 15,7 do 17,0 g/100 g medu. V vzorcih akacijevega medu je vsebnost vode znašala 15,8 oz. 16,3 g/100 g. Pri cvetličnem medu, sta oba vzorca medu imela vsebnost vode 15,7 g/100 g. Vzorca kostanjevega medu sta imela vsebnost vode 16,1 in 17,0 g/100 g, vzorca gozdnega medu pa 15,5 oz. 15,6 g vode/100 g. Pravilnik o medu (2011) določa, da lahko med vsebuje do 20 g vode/100 g, kar pomeni, da vsi vzorci ustrezajo pravilniku. Poleg tega lahko rečemo, da gre glede vsebnosti vode za medove višje kakovosti, saj niso presegli vrednosti 18,6 g/100 g.

Električna prevodnost vzorcev medu je bila v pričakovanih območjih za posamezne vrste medu. Vzorca akacijevega medu sta imela električno prevodnost 0,194 in 0,266 mS/cm, vzorca cvetličnega medu 0,376 in 0,592 mS/cm, kostanjevega 1,240 in 1,876 in gozdnega medu 1,100 in 1,114 mS/cm. Pravilnik o medu (2011) določa, da morajo imeti medovi iz nektarja, kamor spadata akacijev in cvetlični med, električno prevodnost največ 0,8 mS/cm, gozdni in kostanjev med pa najmanj 0,8 mS/cm. Iz rezultatov je razvidno, da analizirani vzorci medu ustrezajo pravilniku. S slike 4 je razvidno, da imata najnižjo električno prevodnost oba vzorca akacijevega medu, sledijo cvetlični, gozdni in kostanjev med.

Vrednosti pH znašajo za akacijev med 3,90 in 4,27, za cvetlični med 4,26 in 4,49, za kostanjev med 5,11 in 6,35 ter za gozdni med 4,80 in 5,04. Kostanjev in gozdni med, dosegata nekoliko višjo vrednost pH od ostalih dveh vrst medu, vključenih v raziskavo. To smo tudi pričakovali, saj vsebujeta več mineralnih snovi v primerjavi z akacijevim in cvetličnim medom.



Slika 4: Vsebnost vode, električna prevodnost, in vrednost pH v nesegetih vzorcih medu

#### 4.1.2 Rezultati določanja diastaznega števila

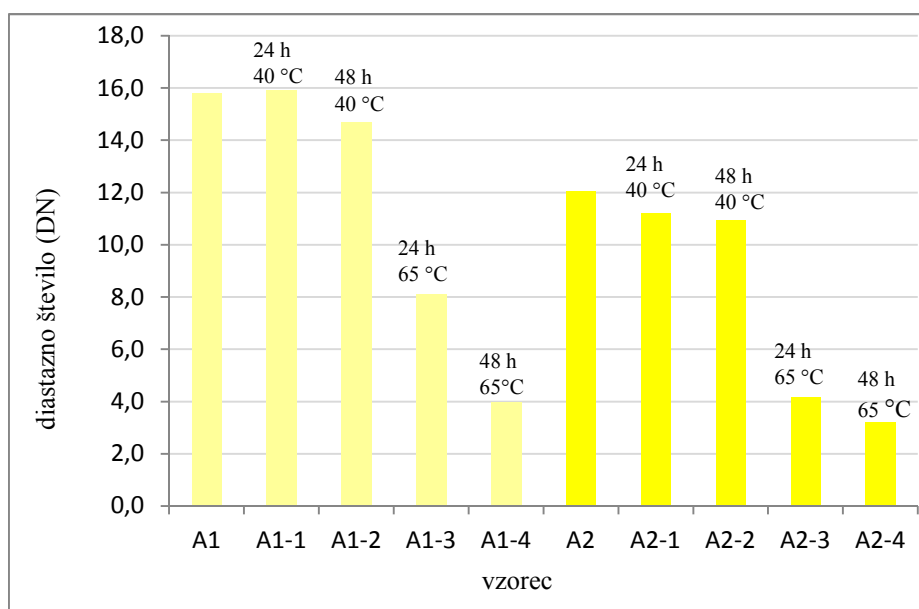
Z metodo po Schadeju smo obravnavanim vzorcem medu določili aktivnost encima diastaze, po Pravilniku o medu (2011) mora diastazno število dosegati vrednost najmanj 8. Če ima med diastazno število manj kot 8, je bil najverjetneje pregret ali predolgo in neustrezno skladiščen pri previsoki temperaturi.

S slik 5 do 8 je razvidno, da imajo vzorci pri segrevanju pri višji temperaturi, daljši čas manjše diastazno število.



Akacijev med (slika 5):

- vzorci A1, A1-1, A1-2 z diastaznim številom od 14,7 do 15,9 ustrezajo Pravilniku o medu (2011). Vzorec A1 je neseget med, vzorca A1-1 in A1-2 smo segrevali pri 40 °C (A1-1, 24 ur in A1-2, 48 ur).
- vzorec A1-3, ki smo ga segrevali 24 ur na 65 °C, je imel diastazno število za skoraj 50 % manjše od začetne vrednosti, znašalo je 8,1, kar je ravno na meji določil pravilnika.
- vzorec A1-4, ki je bil segrevan na 65 °C, dalj časa (48 ur), pa ima vrednost diastaznega števila 4,0 in ne ustreza zahtevam pravilnika.
- vzorci A2, A2-1, A2-2 z diastaznim številom od 11,0 do 12,1 ustrezajo pravilniku. Vzorca A2-1 in A2-2 smo segrevali pri 40 °C (A2-1, 24 ur in A2-2, 48 ur).
- vzorca A2-3 in A2-4, ki smo jih segrevali pri 65 °C (A2-3, 24 ur in A2-4, 48 ur), imata tako nizko diastazno število (4,2 oz. 3,2), da ne ustrezata zahtevam pravilnika.

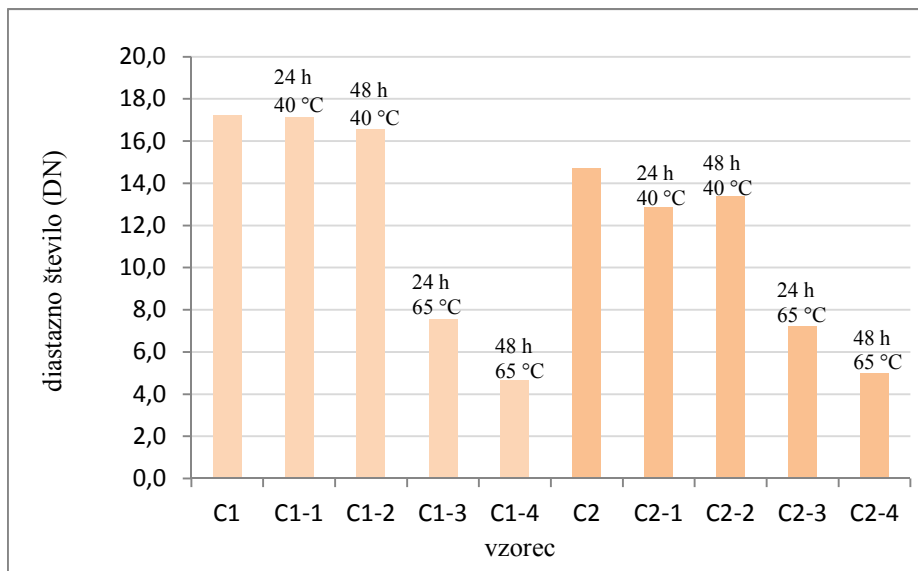


Slika 5: Diastazno število analiziranih vzorcev akacijevega medu

Cvetlični med (slika 6):

- vzorci C1, C1-1 in C1-2 z diastaznim številom od 16,6 do 17,2 vsi ustrezajo Pravilniku o medu (2011). Vzorca C1-1 in C1-2 sta bila segrevana pri 40 °C (C1-1, 24 ur in C1-2, 48 ur).
- vzorec C1-3, segrevan pri 65 °C, 24 ur ima diastazno število za 56 % manjše od nesegetega vzorca medu (DN = 7,6) in zato ne ustreza zahtevam pravilnika. Vzorec C1-4 z diastaznim številom 4,7, ki smo ga segrevali pri 65 °C 48 ur, ima v primerjavi z nesegetim vzorcem že močno zmanjšano diastazno število (za 73 %). Vidimo, da gre skoraj za popolno inaktivacijo encima.
- vzorci C2, C2-1, C2-2 z diastaznim številom od 12,9 do 14,7 ustrezajo pravilniku. Vzorca C2-1 in C2-2 smo segrevali pri 40 °C (C2-1, 24 ur in C2-2, 48 ur), kar ni povzročilo bistvenega zmanjšanja tega parametra (za 9 oz. 13 %).

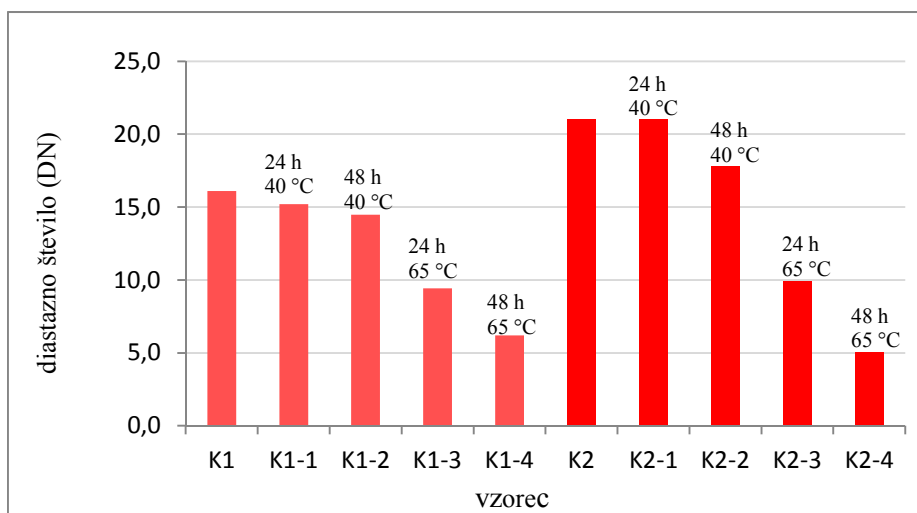
- vzorca C2-3 in C2-4, ki smo ju segrevali pri 65 °C, (C2-3, 24 ur in C2-4, 48 ur), imata tako nizko diastazno število (7,2 oz. 5,0), da ne ustrezata zahtevam pravilnika. Vzorec C2-4 ima v primerjavi z nesegetim vzorcem C2 za 66 % manjše diastazno število.



Slika 6: Diastazno število analiziranih vzorcev cvetličnega medu

Kostanjev med (slika 7):

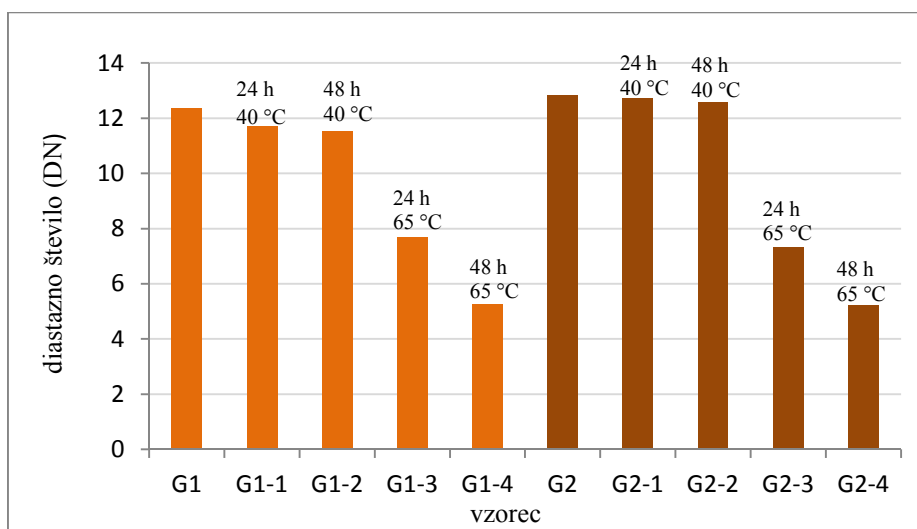
- vzorci K1, K1-1, K1-2 z diastaznim številom od 14,5 do 16,1 ustrezajo Pravilniku o medu (2011). Vzorca K1-1 in K1-2 smo segrevali pri 40 °C (K1-1, 24 ur in K1-2, 48 ur), vrednost diastaznega števila v tako segretyh vzorcih je bila do 10 % manjša.
- vzorec K1-3 z diastaznim številom 9,4 smo segrevali pri 65 °C 24 ur, diastazno število je 41 % manjše od začetne vrednosti, vendar še ustreza pravilniku.
- vzorec K1-4, ki smo ga segrevali 48 ur pri 65 °C, ima diastazno 6,2, kar je za 62 % manj od vzorca K1 in ne ustreza več zahtevam pravilnika.
- vzorci K2, K2-1, K2-2 z diastaznim številom od 17,8 do 21,1 ustrezajo zahtevam pravilnika. Vzorca K2-1 in K2-2 smo segrevali pri 40 °C (K2-1, 24 ur in K2-2, 48 ur).
- Diastazno število vzorca K2-3, ki smo ga segrevali 24 ur pri 65 °C znaša 9,9 in še ustreza pravilniku.
- vzorec K2-4, ki smo ga segrevali pri 65 °C 48 ur, ima diastazno število za 76 % manjše od vrednosti diastaznega števila nesegetega vzorca (K2) in ne ustreza več zahtevam pravilnika.



Slika 7: Diastazno število v analiziranih vzorcih kostanjevega medu

Gozdni med (slika 8):

- vzorci G1, G1-1, G1-2 z diastaznim številom od 11,5 do 12,4 ustrezajo Pravilniku o medu (2011). Vzorca G1-1 in G1-2 smo segrevali pri 40 °C (G1-1, 24 ur in G1-2, 48 ur).
- vzorca G1-3 in G1-4, ki smo ju segrevali pri 65 °C 24 oz. 48 ur, imata tako nizko diastazno število (7,7 in 5,2), da ne ustrezata zahtevam pravilnika. Vzorec G1-4 ima diastazno število za 57 % nižje od neseGREtega vzorca G1.
- vzorci G2, G2-1, G2-2 z diastaznim številom od 12,6 do 12,9 ustrezajo zahtevam pravilnika.
- vzorca G2-3 in G2-4, ki smo ju segrevali 24 oz. 48 ur pri 65 °C, imata diastazno število 7,3 in 5,2, zato ne ustrezata več zahtevam pravilnika.



Slika 8: Diastazno število analiziranih vzorcev gozdnega medu

#### 4.1.3 Rezultati določanja vsebnosti hidroksimetilfurfurala (HMF)

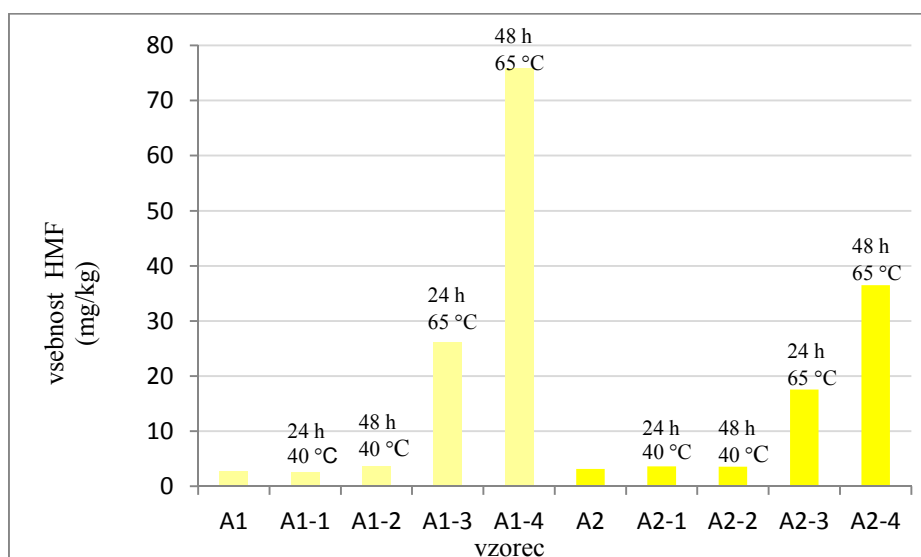
V medu smo z metodo po Winklerju, določili organsko spojino hidroksimetilfurfural. Pravilnik za med (2011) navaja, da lahko med vsebuje največ 40 mg HMF na kg.

S slik 9 do 12 je razvidno, da imajo neseGRETI medovi in medovi, ki smo jih segrevali pri nižji temperaturi, to je 40 °C, manjšo vsebnost HMF v primerjavi z medovi, ki smo jih segrevali pri 65 °C.

HMF je tudi parameter kakovosti medu. Vsebnost HMF nam pove ali je bilo ravnanje z medom ustrezno. Kakovost medu se z višjo temperaturo in daljšim časom segrevanja slabša, kar pomeni da je med, ki je bil segrevan daljši čas, slabše kakovosti. HMF se lahko poveča do te mere, da med ne ustreza več zahtevam pravilnika.

##### 4.1.3.1 Vsebnost HMF v vzorcih akacijevega medu

S slike 9 je razvidno, da analizirani vzorci medu z oznakami A1, A1-1 in A1-2 ter A2, A2-1 in A2-2 vsebujejo od 2,50 do 3,65 mg HMF/kg medu. Vzorca A1 in A2 sta bila neseGRETA, vzorce A1-1 in A1-2 ter A2-1 in A2-2 pa smo segrevali pri 40 °C 24 ur (A1-1 in A2-1) oz. 48 ur (A1-2 in A2-2). Vseh šest vzorcev glede vsebnosti HMF ustreza Pravilniku o medu (2011). Vzorca A1-3 in A2-3 smo segrevali 24 ur pri temperaturi 65 °C, vsebnost HMF se je povečala na 17,57 oz. 26,21 mg/kg medu, kar še vedno ustreza zahtevam pravilnika. Pri vzorcu A1-4, ki smo ga segrevali pri temperaturi 65 °C 48 ur, pride do tolikšnega povečanja vsebnosti HMF (75,94 mg/kg), da ne ustreza več pravilniku (največ 40 mg HMF/kg medu), vzorec A2-4 pa kljub visoki temperaturi (65 °C) in daljšemu času segrevanja, (48 ur), ni presegel s pravilnikom predpisane vrednosti, vsebnost HMF znaša 36,48 mg/kg.



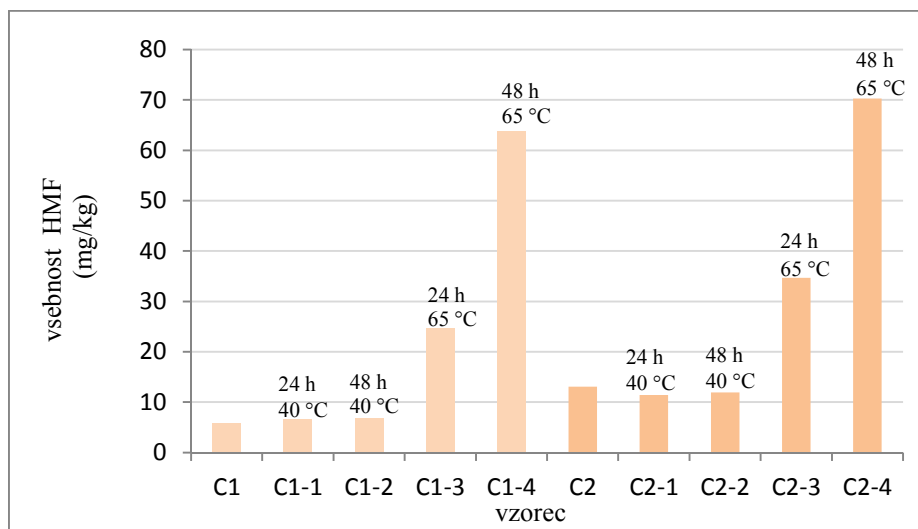
Slika 9: Vsebnost HMF v analiziranih vzorcih akacijevega medu

#### 4.1.3.2 Vsebnost HMF v vzorcih cvetličnega medu

S slike 10 je razvidno, da analizirani vzorci z oznako C1, C1-1, C1-2, vsebujejo 5,86 do 6,82 mg HMF/kg medu. Vzorec C1 je bil neseget, C1-1 in C1-2 pa sta bila segrevana pri 40 °C, 24 oz. 48 ur. Vsi trije vzorci ustrezajo Pravilniku o medu (2011).

Vzorec C1-3 smo segrevali pri 65 °C, 24 ur, vsebnost HMF je znašala 24,77 mg/kg medu, kar še vedno ustreza pravilniku. Pri vzorcu C1-4, ki smo ga segrevali pri temperaturi 65 °C 48 ur, pride do tolikšnega povečanja HMF (63,74 mg/kg), da ne ustreza več zahtevam pravilnika.

Drugi vzorec cvetličnega medu (C2) ima večjo začetno vsebnost HMF, 13,06 mg/kg medu. Po segrevanju na 40 °C je bila določena vsebnost HMF v obeh vzorcih (C2-1 in C2-2) celo malo manjša od začetne, kar lahko pripišemo metodi. Vsi trije vzorci ustrezajo pravilniku. Vzorec C2-3 smo segrevali 24 ur pri 65 °C, določena vsebnost HMF je bila 34,66 mg/kg medu, kar še vedno ustreza pravilniku. Pri vzorcu C2-4, pride do tolikšnega povečanja vsebnosti HMF (70,27 mg/kg), da ne ustreza zakonsko določeni vrednosti, vzorec smo segrevali pri temperaturi 65 °C in sicer 48 ur.

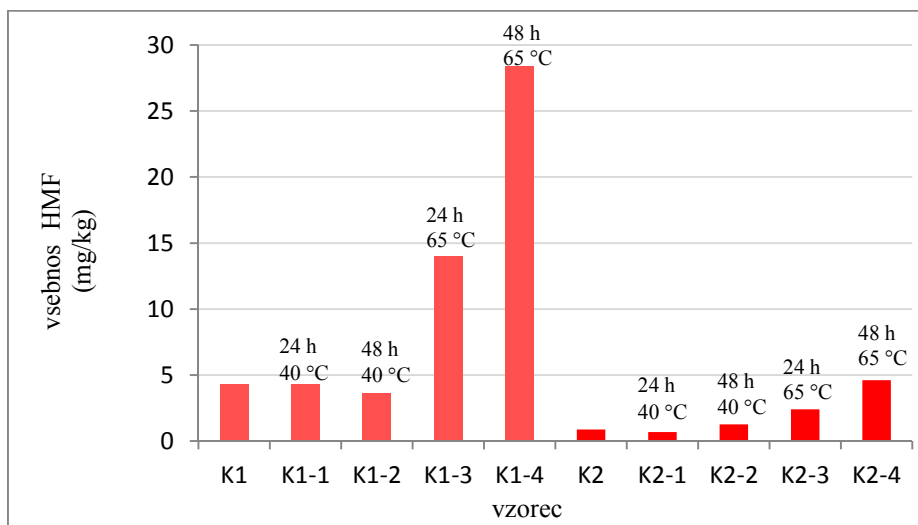


Slika 10: Vsebnost HMF v analiziranih vzorcih cvetličnega medu

#### 4.1.3.3 Vsebnost HMF v vzorcih kostanjevega medu

S slike 11 je razvidno, da analizirani vzorci medu z oznakami K1, K1-1 in K1-2, ter K2, K2-1 in K2-2 vsebujejo od 0,67 do 4,32 mg HMF/kg medu. Vzorca K1 in K2 sta bila nesegeta, vzorce K1-1 in K1-2 ter K2-1 in K2-2 pa smo segrevali pri 40 °C 24 ur (K1-1 in K2-1) oz. 48 ur (K1-2 in K2-2). Vseh šest vzorcev glede vsebnosti HMF ustreza Pravilniku o medu (2011). Prav tako tudi vzorci K1-3 in K1-4, ter K2-3 in K2-4, ki smo jih segrevali pri 65 °C 24 ur (K1-3 in K2-3) oz. 48 ur (K1-4 in K2-4), z vsebnostjo HMF od 2,40 do 28,42 mg/kg medu še vedno vsi ustrezajo zahtevam pravilnika. Zanimivo je zelo majhno povečanje vsebnosti HMF pri vzorcu K2, saj je imel vzorec K2-4, ki smo ga

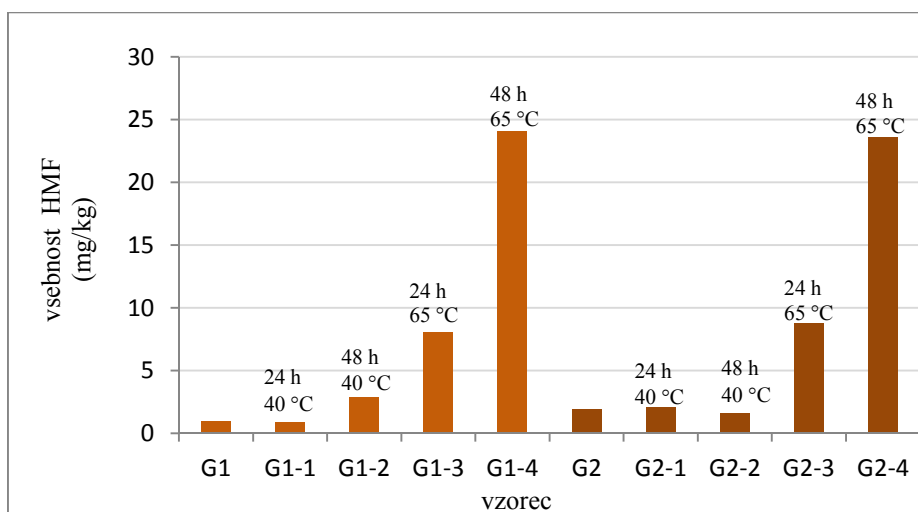
segrevali dalj časa pri višji temperaturi (48 ur pri 65 °C), zelo majhno vsebnost HMF, samo 4,61 mg/kg, kar je celo manj od začetne vsebnosti HMF pri vzorcih C1 in C2.



Slika 11: Vsebnost HMF v analiziranih vzorcih kostanjevega medu

#### 4.1.3.4 Vsebnost HMF v vzorcih gozdnega medu

S slike 12 je razvidno, da analizirani vzorci z oznako G1, G1-1 in G1-2, ter G2, G2-1 in G2-2 vsebujejo od 0,86 do 2,88 mg HMF/kg medu. Vzorca G1 in G2 sta bila nesegeta, vzorce G1-1 in G1-2 ter G2-1 in G2-2 pa smo segrevali pri 40 °C 24 ur (G1-1 in G2-1) oz. 48 ur (G1-2 in G2-2). Vseh šest vzorcev ustreza Pravilniku o medu (2011). Prav tako tudi vzorci G1-3 in G1-4 ter G2-3 in G2-4, katere smo segrevali pri 65 °C 24 ur (G1-3 in G2-3) oz. 48 ur (G1-4 in G2-4) z vsebnostjo HMF od 8,06 do 24,10 mg/kg medu še vedno ustrezajo pravilniku.

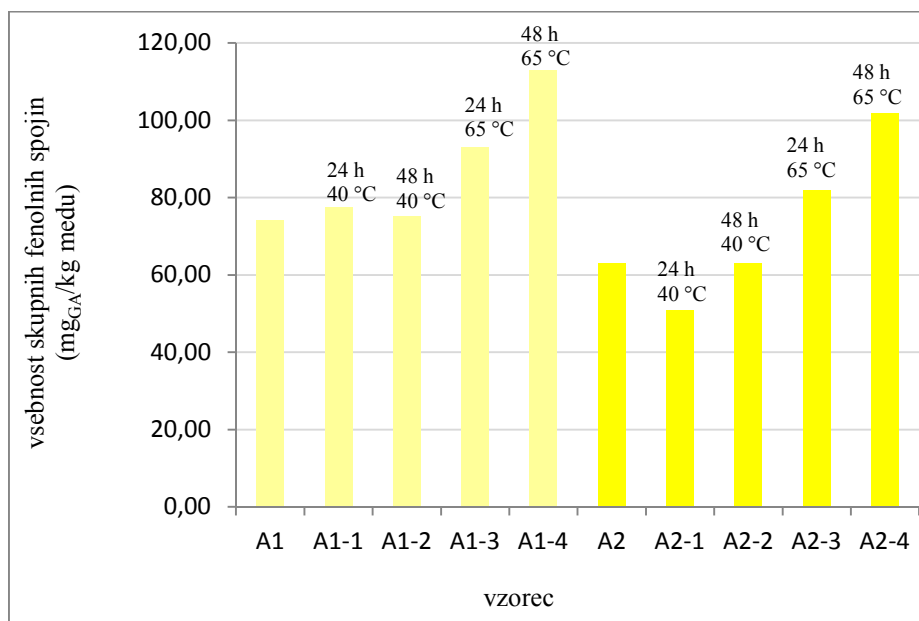


Slika 12: Vsebnost HMF v analiziranih vzorcih gozdnega medu

#### 4.1.4 Rezultati določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin

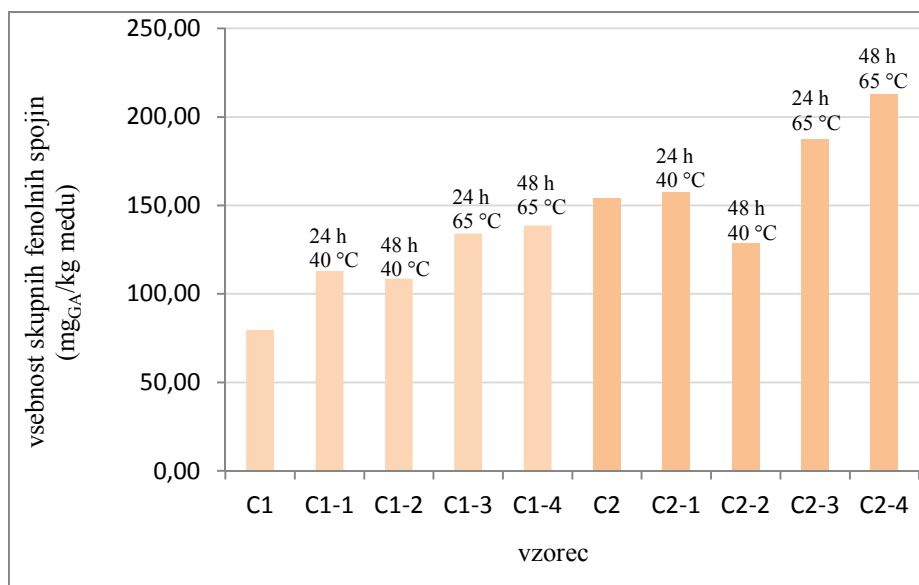
S Folin-Ciocalteuovo metodo smo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin in jih izrazili v mg galne kisline na kg medu ( $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu). Iz rezultatov na slikah 13 do 16 lahko vidimo, da največ skupnih fenolnih spojin pri nesegetih vzorcih medu vsebujeta kostanjev in gozdni med. Vzorca kostanjevega medu K1 in K2 vsebujeta 183,0 in 164,1  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu, vzorca gozdnega medu G1 in G2 pa vsebujeta 171,9 oz. 140,8  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu skupnih fenolnih spojin. Sledita cvetlična medova C1 in C2 (79,7 in 154,1  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu), najmanj skupnih fenolnih spojin pa vsebujeta vzorca akacijevega medu, vzorec A1 74,1  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu in vzorec A2 63,0  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu.

Pri vseh segretyh vzorcih pride do povečanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin. S slike 13 je razvidno, kako se vsebnost skupnih fenolnih spojin v akacijevem medu povečuje od A1-1 do A1-4. Vzorec A1-1, katerega smo segrevali 24 ur pri 40 °C, je imel vsebnost skupnih fenolnih spojin 77,4  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu. V Vzorc A1-4 smo določili 113,0  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu, ta vzorec je bil segrevan pri 65 °C, 48 ur. Pri vzorcih od A2-1 do A2-4 je situacija podobna, vsebnost se povečuje od 50,8 do 101,9  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu.



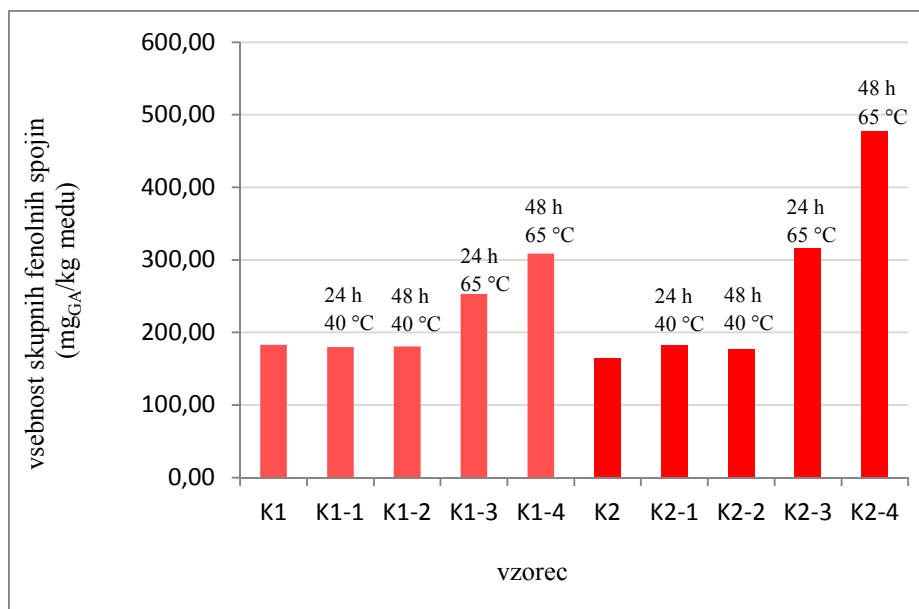
Slika 13: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih akacijevega medu

S slike 14 je razvidno, da pride pri segretyh vzorcih cvetličnega medu do povečanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin. Vrednosti se povečujejo pri vzorcih C1-1 do C1-4 s 113,0 na 138,6  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu, pri vzorcih C2-1 do C2-4, pa s 157,4 na 213,0  $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$  medu. Pri vzorc C2 je končna vsebnost skupnih fenolnih spojin bistveno večja, ker je imel ta vzorec že večjo začetno vsebnost.



Slika 14: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih cvetličnega medu

Na sliki 15 so prikazani rezultati za kostanjev med. Pri kostanjevem medu je vsebnost skupnih fenolnih spojin že pri nesegetih vzorcih večja kot pri svetlejših vrstah medu, s segrevanjem pa se ta vrednost še poveča. Tako imamo pri vzorcih od K1-1 do K1-4 vsebnosti skupnih fenolnih spojin v območju od 179,7 do 308,6 mg<sub>GA</sub>/kg medu. Pri vzorcih K2-1 do K2-4 pa je vsebnost skupnih fenolnih spojin od 183,0 do 477,4 mg<sub>GA</sub>/kg medu.

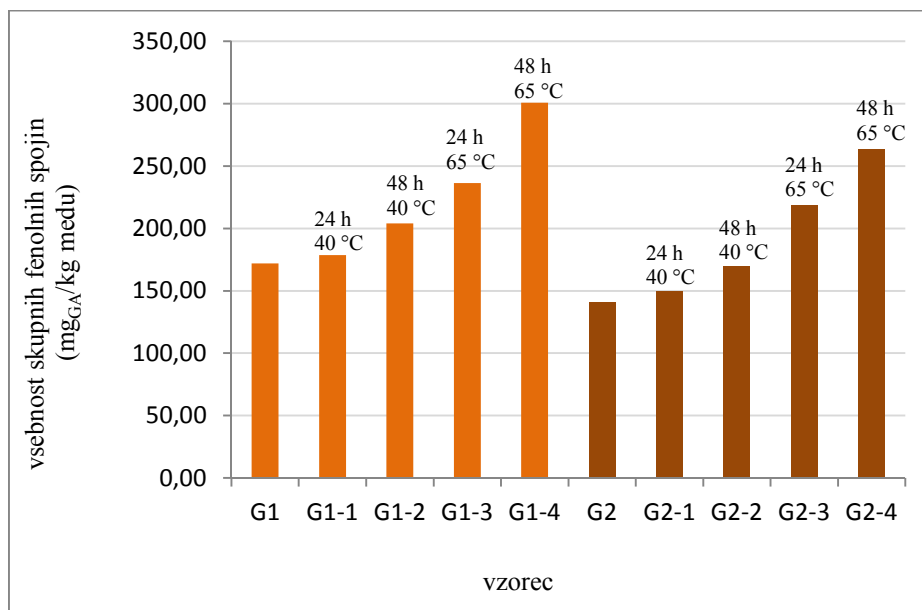


Slika 15: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih kostanjevega medu

Pri gozdnem medu (slika 16) imajo nesegeti vzorci, podobno kot pri kostanjevem medu, že naravno prisotno večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin. Z dlje trajajočim segrevanjem pa se vsebnost še poveča. Tako imajo vzorci G1-1 do G1-4 vsebnost skupnih fenolnih



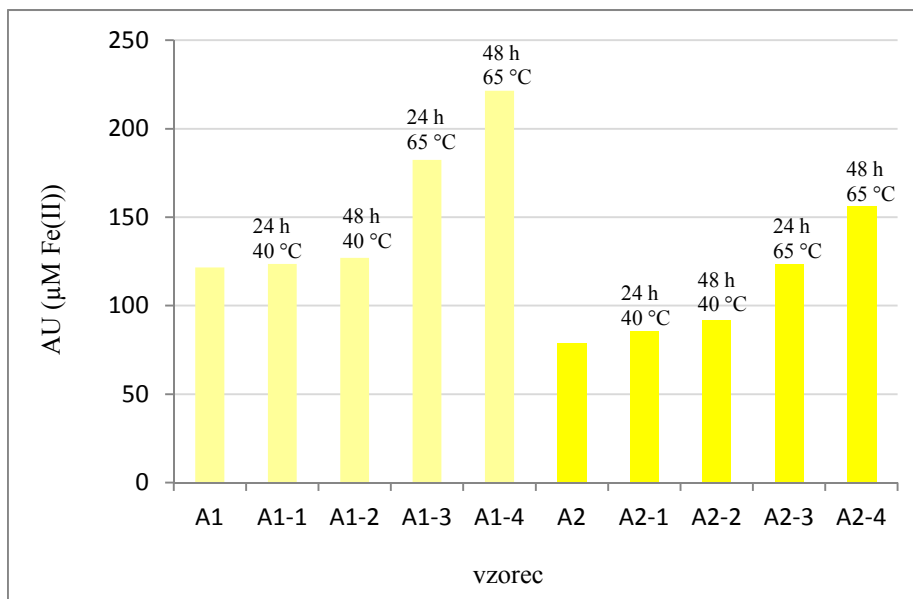
spojin od 178,6 do 300,8 mg<sub>GA</sub>/kg medu, vzorci G2-1 do G2-4 pa od 149,7 do 263,0 mg<sub>GA</sub>/kg medu.



Slika 16: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih gozdnega medu

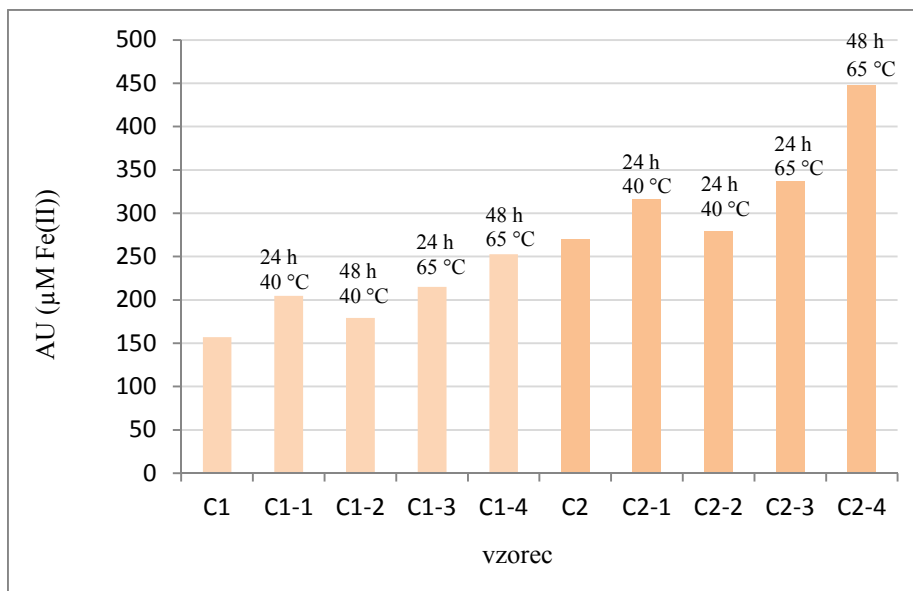
#### 4.1.5 Rezultati določanja antioksidativne učinkovitosti

Antioksidativno učinkovitost (AU) medu smo določali s pomočjo FRAP metode. Metoda deluje na osnovi sposobnosti fenolnih spojin, da reducirajo  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$ . Rezultati so podani kot FRAP vrednosti ( $\mu\text{M Fe(II)}$ ) 10 % raztopine medu. Antioksidativna učinkovitost nesegetih vzorcev medu je naraščala v naslednjem vrstnem redu: akacijev < cvetlični < gozdni < kostanjev med (slike 17 do 20). Pri segretyh vzorcih je razlog za povečanje AU nastanek produktov Maillardove reakcije. S slike 17 je razvidno, da AU akacijevega medu narašča s temperaturo in časom segrevanja. Pri vzorcih A1-1 do A1-4 se AU poveča od 123,6 do 221,5  $\mu\text{M Fe(II)}$ , pri vzorcih A2-1 do A2-4 pa od 85,3 do 156,6  $\mu\text{M Fe(II)}$ .



Slika 17: Antioksidativna učinkovitost vzorcev akacijevega medu

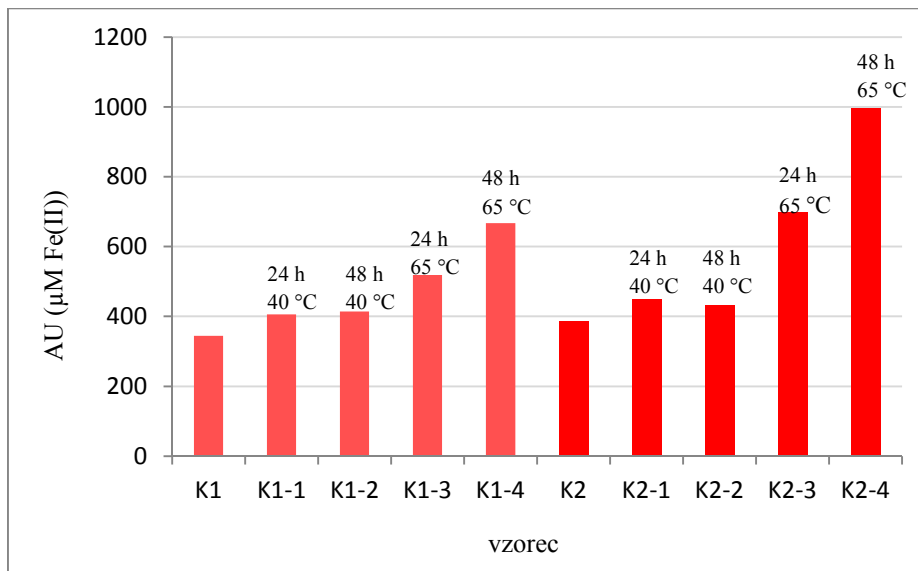
Slika 18 prikazuje AU cvetličnega medu. Pri vzorcih C1-1 do C1-4 dobimo vrednosti od 179,2 do 252,7 μM Fe(II), za vzorce C2-1 do C2-4 pa od 279,2,0 do 447,4 μM Fe(II). Tudi tu AU narašča s časom in temperaturo segrevanja, z izjemo vzorcev C1-2 in C2-2, kjer je AU nižja od vzorca medu, ki smo ga pri temperaturi 40 °C segrevali krajši čas.



Slika 18: Antioksidativna učinkovitost vzorcev cvetličnega medu

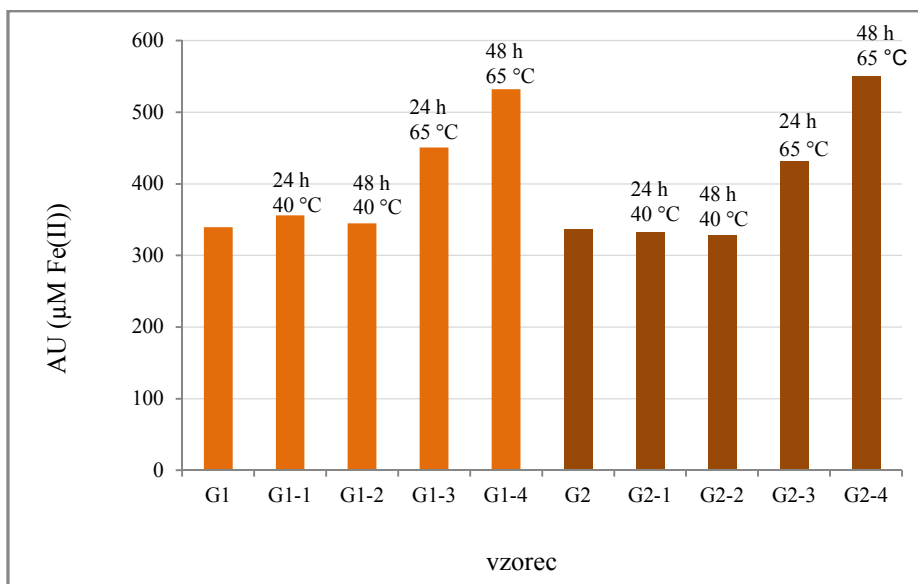
Slika 19 prikazuje AU za vzorce kostanjevega medu. Pri vzorcih K1-1 do K1-4 je AU od 406,2 do 667,3 μM Fe(II), za vzorce od K2-1 do K2-4 pa je AU največja med obravnavanimi vzorci, in sicer od 448,0 do 997,4 μM Fe(II). Tako visoke vrednosti so

posledica naravno večje AU nesegetih vzorcev. Zaradi segrevanja pride tudi do nastanka produktov Maillardove reakcije in posledično še večje AU.



Slika 19: Antioksidativna učinkovitost vzorcev kostanjevega medu

Slika 20 prikazuje AU gozdnega medu. Vzorci G1-1 do G1-4 imajo AU od 356,0 do 532,2 μM Fe(II), vzorci G2-1 do G2-4 pa 332,7 do 550,6 μM Fe(II). Tudi pri teh vzorcih, enako kot pri drugih vrstah medu, pride do povečanja AU zaradi nastanka produktov Maillardove reakcije. AU večinoma narašča s časom in temperaturo segrevanja.



Slika 20: Antioksidativna učinkovitost vzorcev gozdnega medu

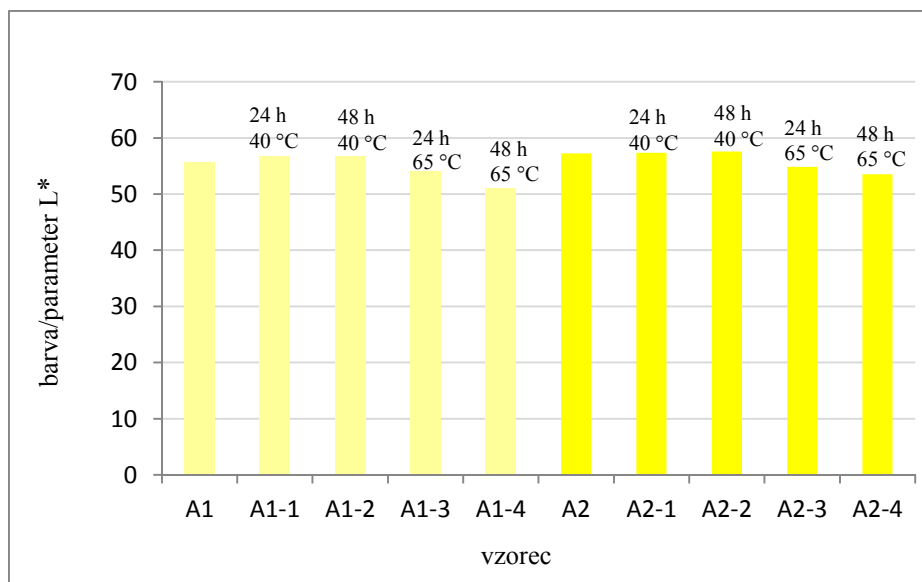
## 4.1.6 Rezultati merjenja barve medu

### 4.1.6.1 $L^*$ , $a^*$ in $b^*$ vrednosti barve medu

S pomočjo kromametra Minolta CR-200B smo določili barvo medu. Kromameter barvo vzorca razdeli na tri komponente ( $L^*$ ,  $a^*$  in  $b^*$ ) in jih predstavi v določenem koordinatnem sistemu. Parameter  $L^*$  določa svetlost medu. Višja je njegova vrednost, svetlejši je med. Odtенок barve pa določata parametra  $a^*$  in  $b^*$ . Parameter  $a^*$  določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju in, intenziteto zelene barve v negativnem območju. Parameter  $b^*$  določa intenzivnost rumene barve v pozitivnem območju in modre v negativnem območju.

Rezultati določanja vrednosti parametra  $L^*$  za posamezne vzorce medu so predstavljeni na slikah 21 do 24. Pri nesegetih vzorcih je imel najvišjo vrednost  $L^*$  akacijev med ( $A1 = 55,7$  in  $A2 = 57,2$ ). To pomeni, da je bil akacijev med izmed vseh obravnavanih vzorcev medu najsvetlejši. Sledi mu cvetlični med ( $C1 = 51,0$  in  $C2 = 44,3$ ). Neseget kostanjev med ( $K1 = 41,45$  in  $K2 = 38,04$ ) je imel primerljivo vrednost parametra  $L^*$  kot gozdni med ( $G1 = 39,0$  in  $G2 = 42,4$ ).

Pri segretyh vzorcih so rezultati zelo različni. S slike 21, kjer so predstavljeni rezultati za akacijev med je razvidno, da imata vzorca A1-1 in A1-2 celo nekoliko višjo vrednost parametra  $L^*$  v primerjavi z vzorcem A1, kar lahko pripišemo metodi. A1 je neseget vzorec, vzorca A1-1 in A1-2 pa smo segrevali 24 oz. 48 ur pri temperaturi 40 °C. Vzorca A1-3 in A1-4, ki smo jih segrevali 24 oz. 48 ur pri temperaturi 65 °C, pa imata nižjo vrednost parametra  $L^*$ , zaradi segrevanja je med temnejši v primerjavi z vzorci A1, A1-1 in A1-2.

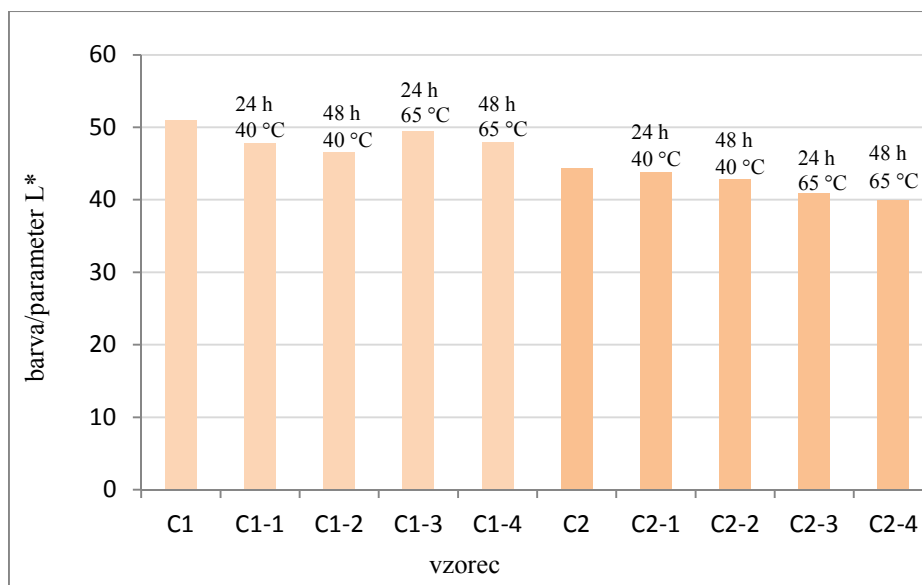


Slika 21: Vrednost parametra  $L^*$  za posamezne vzorce akacijevega medu

Podobno pri vzorcih A2-1 in A2-2, dobimo najprej minimalno višjo vrednost parametra  $L^*$ . Nato pa se s časom in temperaturo segrevanja, pri vzorcih A2-3 in A2-4, ta vrednost

znižuje. Zaključimo lahko, da segrevanje vzorcev akacijevega medu pri temperaturi 40 °C ne vpliva na barvo.

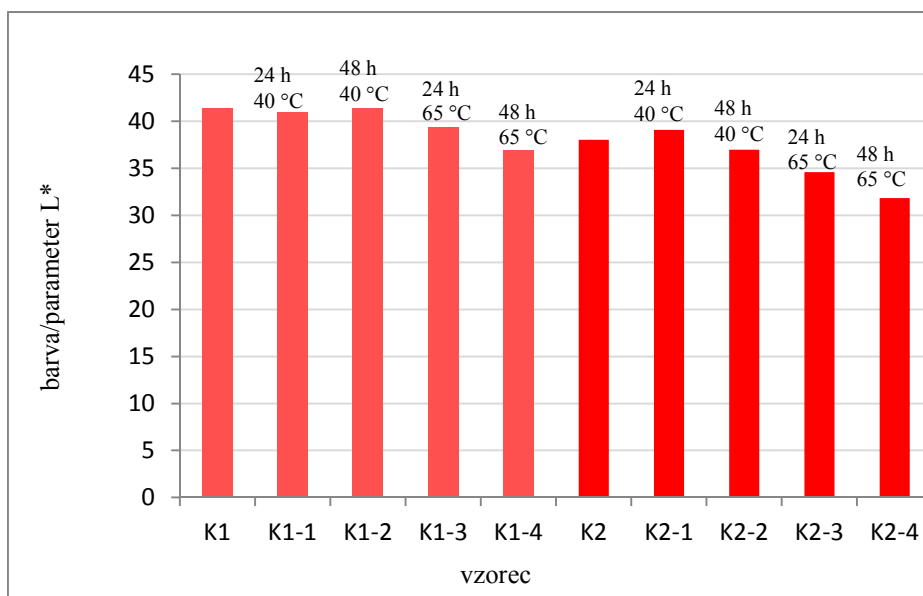
S slike 22, ki prikazuje vrednosti  $L^*$  za vzorce cvetličnega medu, je razvidno, da je pri vseh segretyh vzorcih: C1-1 (24 h pri 40 °C), C1-2 (48 h pri 40 °C), C1-3 (24 h pri 65 °C) in C1-4 (48 h pri 65 °C), vrednost parametra  $L^*$  v primerjavi z nesegetim vzorcem (C1) nižja. Dobimo nekoliko temnejšo barvo medu. Enako je pri vzorcih od C2-1 do C2-4, tudi tu se vrednost parametra  $L^*$  v primerjavi z vrednostjo  $L^*$  v nesegetem vzorcu (C2) znižuje s časom in temperaturo segrevanja, dobimo temnejše odtenke medu.



Slika 22: Vrednost parametra  $L^*$  za posamezne vzorce cvetličnega medu

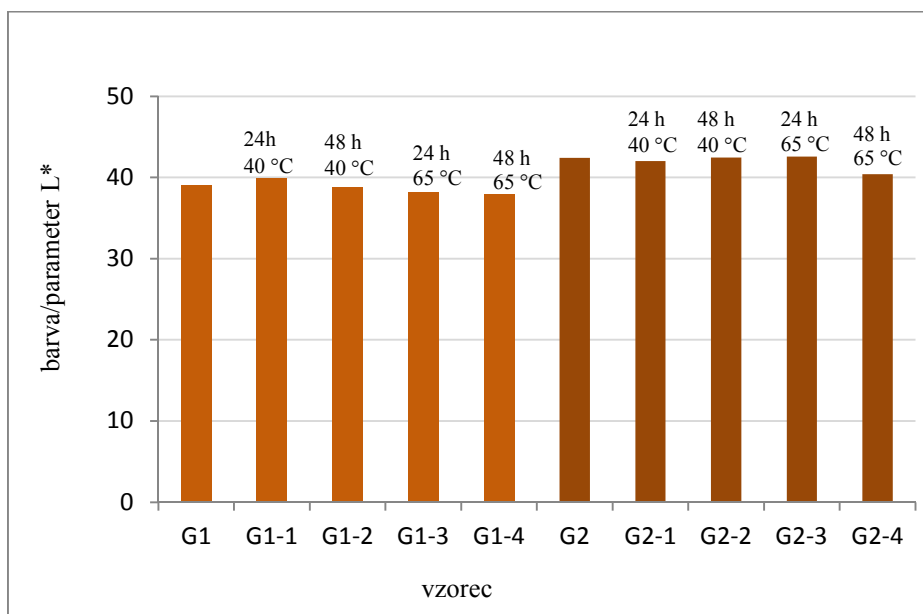
S slike 23, ki prikazuje vrednosti  $L^*$  za vzorce kostanjevega medu, je razvidno, da je pri vseh segretyh vzorcih: K1-1 (24 h pri 40 °C), K1-2 (48 h pri 40 °C), K1-3 (24 h pri 65 °C) in K1-4 (48 h pri 65 °C), vrednost parametra  $L^*$  v primerjavi z nesegetim vzorcem (K1) nižja. Segrety vzorci medu so temnejši.

Podobno je pri vzorcih K2-2, K2-3 in K2-4, tudi tu vrednost parametra  $L^*$  v primerjavi z vrednostjo  $L^*$  v nesegetem vzorcem (K2) pada s časom in temperaturo segrevanja. Izjema je vzorec K2-1, pri katerem se v primerjavi z nesegetim vzorcem (K2) parameter  $L^*$  nekoliko zviša, kar lahko pripišemo metodi.



Slika 23: Vrednost parametra L\* za posamezne vzorce kostanjevega medu

S slike 24, ki prikazuje vrednosti L\* za vzorce gozdnega medu, je razvidno, da je pri večini segretyh vzorcev: G1-2 (48 h pri 40 °C), G1-3 (24 h 65 °C) in G1-4 (48 h 65 °C), vrednost parametra L\* v primerjavi z nesegetim vzorcem (G1) nižja, vzorci medu so temnejši. Izjema je vzorec G1-1 (24 h pri 40 °C), ki ima 4 % višjo vrednost L\* v primerjavi z nesegetim vzorcem (G1), kar lahko pripišemo sami metodi. Vzorca G2-2 in G2-3 imata višjo vrednost L\*, G2-1 in G2-4 pa nižjo, v primerjavi z nesegetim vzorcem G2.



Slika 24: Vrednost parametra L\* za posamezne vzorce gozdnega medu

Rezultati parametrov  $a^*$  in  $b^*$  so podani v prilogi B. Parameter  $a^*$  določa intenziteto rdeče (v pozitivnem območju) in zelene (v negativnem območju) barve. Pozitivne vrednosti tako pomenijo bolj rdečo barvo, negativne pa bolj zeleno.

Povprečne vrednosti parametra  $a^*$  pri analiziranih nesegetih vzorcih se gibljejo od -2,1 v akacijevem medu (vzorec A2) do 9,7 v kostanjevem medu (vzorec K1). To pomeni, da je med obravnavanimi vrstami medu (nesegeti vzorci) najintenzivnejše rdeče obarvan kostanjev med, sledi gozdni med. Pri akacijevem medu prevladuje zelena in rumena barva.

Pri segretyh vzorcih akacijevega medu je vrednost parametra  $a^*$  pri vzorcih A1-1 in A1-2 podobna vrednosti nesegetega vzorca, pri vzorcu A1-3 je manj negativna, pri A1-4 pa je vrednost parametra  $a^*$  pozitivna. Vzorci A2-1, A2-2, A2-3 in A2-4 imajo vsi vrednost parametra  $a^*$  v negativnem območju, od -2,2 do -0,3. Zeleni odtenek barve akacijevega medu se torej s časom in temperaturo segrevanja manjša.

Pri analiziranih segretyh cvetličnih medovih, se vrednost parametra  $a^*$  za vse vzorce C1-1, C1-2, C1-3 in C1-4 (od 0,5 do 3,7), ter za vzorce C2-1, C2-2, C2-3 in C2-4 (od 4,8 do 10,2) povečuje v pozitivno območje. S časom in temperaturo segrevanja se intenzivnost rdeče barve spreminja.

Tudi pri kostanjevem in gozdnem medu se vrednost parametra  $a^*$  med segrevanjem za vse vzorce povečuje v pozitivno območje. Pri vzorcih K1-1, K1-2, K1-3 in K1-4: od 8,4 do 14,9, pri vzorcih K2-1, K2-2, K2-3 in K2-4: od 8,5 do 15,8, pri vzorcih G1-1, G1-2, G1-3 in G1-4: od 8,5 do 11,6, ter pri vzorcih G2-1, G2-2, G2-3 in G2-4: od 6,3 do 10,4. S časom in temperaturo segrevanja se intenzivnost rdeče barve večinoma povečuje.

Za parameter  $b^*$  je značilno, da določa intenzivnost rumene barve v pozitivnem območju in modre barve v negativnem območju. Vse vrednosti so pozitivne, kar potrjuje dejstvo, da v medu ni modrih pigmentov.

Pri analiziranih vzorcih akacijevega medu se vrednost parametra  $b^*$  s temperaturo in časom segrevanja povečuje. Pri vzorcih A1-1, A1-2, A1-3 in A1-4 se vrednost  $b^*$  poveča od 18,4 do 25,1, pri vzorcih A2-1, A2-2, A2-3 in A2-4 pa od 15,9 do 24,7. To pomeni, da je intenzivnost rumene barve večja.

Pri vzorcih cvetličnega medu pride le do manjših sprememb v vrednosti parametra  $b^*$ . Pri vzorcu C1 je vrednost parametra  $b^*$  pri vzorcu, ki smo ga segrevali 48 h pri 65 °C celo višja (26,3) v primerjavi z nesegetim vzorcem cvetličnega medu C1 (25,78). Pri vzorcu C2 pa se intenzivnost rumene barve med segrevanjem zmanjša (od 23,4 do 21,3)

Pri vzorcih segretega kostanjevega medu je vrednost parametra  $b^*$  manjša, kar pomeni, da se s časom in temperaturo segrevanja intenzivnost rumene barve manjša. Bolj občutna je sprememba pri vzorcu K2, kjer vrednost  $b^*$  pade iz začetne vrednosti 19,2 na 14,6.

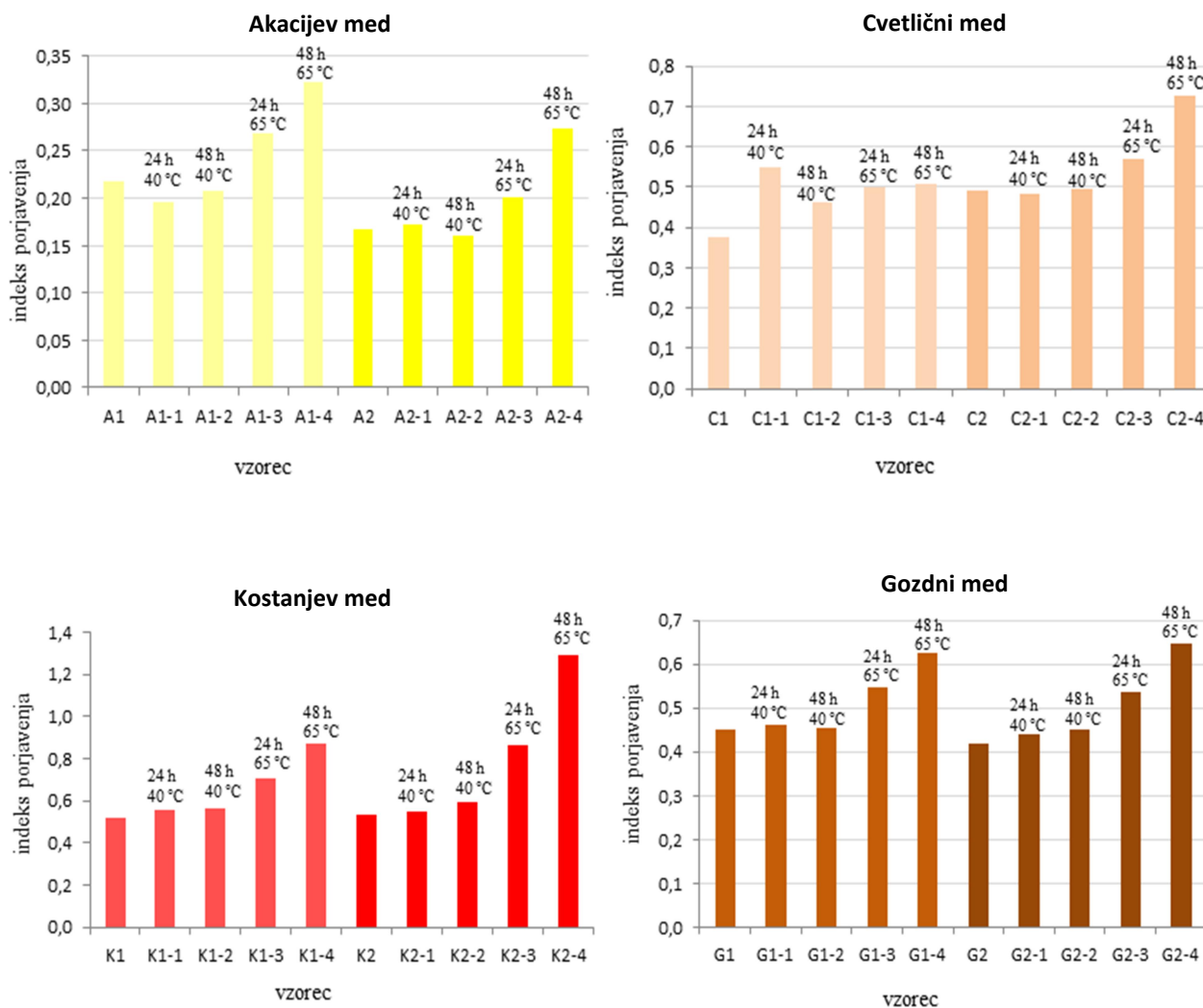
Pri vzorcih gozdnega medu so v vrednostih parametra  $b^*$  majhne razlike, vrednosti so v območju 19,4 do 22,9.

#### 4.1.6.2 Spektrofotometrično določanje barve medu

Barvo medu smo določili tudi spektrofotometrično, z merjenjem absorbance 50 % vodne raztopine medu, izražena je kot razlika absorbanc pri valovnih dolžinah 560 in 720 nm. Rezultati so predstavljeni v prilogi B, iz katere je razvidno, da so vrednosti barve, izražene kot neto absorbanca, najmanjše pri vzorcih akacijevega medu in največje pri vzorcih kostanjevega medu.

#### 4.1.6.3 Rezultati določanja indeksa porjavenja medu

Indeks porjavenja medu smo določili s pomočjo spektrofotometričnega merjenja 50 % vodnih raztopin medu, izražen je kot razlika absorbanc pri valovnih dolžinah 450 in 720 nm. Rezultati za vse vzorce medu so prikazani na sliki 25.



Slika 25: Indeks porjavenja za analizirane vzorce medu



S slike 25 je razvidno, da se je indeks porjavenja povečeval s časom in temperaturo segrevanja. Pri nesegetih vzorcih medu je indeks porjavenja najmanjši pri vzorcih akacijevega medu (0,218) in največji pri kostanjevem medu (0,532). Pri segrevanju 24 ur pri 40 °C so bile spremembe v indeksu porjavenja zelo majhne, z izjemo vzorca C1. Pri tem vzorcu medu se je indeks porjavenja povečal z 0,38 na 0,55 po 24-urnem segrevanju na 40 °C. Segrevanje pri 65 °C je povzročilo večje spremembe v vrednosti indeksa porjavenja, izstopa vzorec kostanjevega medu K2, kjer se je indeks porjavenja povečal z 0,532 (neseget vzorec) na 1,292 (vzorec K2-4, ki smo ga segrevali 48 ur pri 65 °C). Zaradi segrevanja medu pride do nastanka produktov Maillardove reakcije in posledica tega je temnejša barva medu in večji indeks porjavenja.

#### 4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV DIASTAZNEGA ŠTEVILA, VSEBNOSTI HMF IN SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN, ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI IN BARVE MEDU

Na sliki 26 so predstavljeni vzorci posamezne vrste medu (nesegeti vzorci A1, C2, K2 in G1 in isti vzorci, ki smo jih segrevali) z rezultati določanja diastaznega števila, vsebnosti HMF, vsebnosti skupnih fenolnih spojin, antioksidativne učinkovitosti, parametra barve L\* in indeksa porjavenja. Pri vseh prikazanih vzorcih se je diastazno število zmanjšalo, odvisno od časa in temperature segrevanja. Vsebnost HMF se je s časom in temperaturo segrevanja povečala, enako velja za vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost. Kot je razvidno s slike 26, pride postopoma tudi do spreminjanja same barve medu, med postane temnejši. Vrednost parametra L\*, ki predstavlja svetlost vzorca, se počasi zmanjšuje, nižja vrednost parametra L\* pomeni temnejši vzorec. Vrednosti indeksa porjavenja so naraščale s časom in temperaturo segrevanja. S slike 26 je razvidno, da so bile spremembe obravnavanih parametrov bolj občutne pri vrstnih medovih, akacijevem in kostanjevem medu.

|                                                              | Nesegret med | 24 ur pri 40 °C | 48 ur pri 40 °C | 24 ur pri 65 °C | 48 ur pri 65 °C |               |
|--------------------------------------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| <b>Diastazno število</b>                                     | 15,8         | 15,9            | 14,7            | 8,1             | 4,0             | AKACIJEV MED  |
| <b>Vsebnost HMF (mg/kg)</b>                                  | 2,69         | 2,50            | 3,65            | 26,21           | 75,94           |               |
| <b>Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg<sub>GA</sub>/kg)</b> | 74,1         | 77,4            | 75,2            | 93,0            | 113,0           |               |
| <b>AU (μM Fe(II))</b>                                        | 121,6        | 123,6           | 127,1           | 182,3           | 221,5           |               |
| <b>Barva/parameter L*</b>                                    | 55,7         | 56,8            | 56,7            | 54,1            | 51,0            |               |
| <b>Indeks porjavenja</b>                                     | 0,22         | 0,20            | 0,21            | 0,27            | 0,32            |               |
| <b>Diastazno število</b>                                     | 14,7         | 12,9            | 13,5            | 7,2             | 5,0             | CVETLIČNI MED |
| <b>Vsebnost HMF (mg/kg)</b>                                  | 13,10        | 11,42           | 11,90           | 34,70           | 70,30           |               |
| <b>Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg<sub>GA</sub>/kg)</b> | 154,1        | 157,4           | 128,6           | 187,4           | 213,0           |               |
| <b>AU (μM Fe(II))</b>                                        | 270,4        | 316,0           | 279,2           | 336,7           | 447,4           |               |
| <b>Barva/parameter L*</b>                                    | 44,3         | 43,8            | 42,8            | 40,9            | 40,0            |               |
| <b>Indeks porjavenja</b>                                     | 0,49         | 0,48            | 0,49            | 0,57            | 0,73            |               |
| <b>Diastazno število</b>                                     | 21,0         | 21,0            | 17,8            | 9,9             | 5,1             | KOSTANJEV MED |
| <b>Vsebnost HMF (mg/kg)</b>                                  | 0,86         | 0,67            | 1,25            | 2,40            | 4,61            |               |
| <b>Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg<sub>GA</sub>/kg)</b> | 164,1        | 183,0           | 177,4           | 316,3           | 477,4           |               |
| <b>AU (μM Fe(II))</b>                                        | 385,7        | 448,0           | 432,7           | 697,6           | 997,4           |               |
| <b>Barva/parameter L*</b>                                    | 38,0         | 39,1            | 37,0            | 34,6            | 31,8            |               |
| <b>Indeks porjavenja</b>                                     | 0,53         | 0,55            | 0,59            | 0,86            | 1,29            |               |
| <b>Diastazno število</b>                                     | 12,4         | 11,7            | 11,5            | 7,7             | 5,3             | GOZDNI MED    |
| <b>Vsebnost HMF (mg/kg)</b>                                  | 0,96         | 0,86            | 2,90            | 8,06            | 24,10           |               |
| <b>Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg<sub>GA</sub>/kg)</b> | 171,9        | 178,6           | 204,1           | 236,3           | 300,8           |               |
| <b>AU (μM Fe(II))</b>                                        | 339,5        | 356,0           | 344,6           | 451,0           | 532,2           |               |
| <b>Barva/parameter L*</b>                                    | 39,0         | 39,9            | 38,8            | 38,2            | 38,0            |               |
| <b>Indeks porjavenja</b>                                     | 0,50         | 0,46            | 0,46            | 0,55            | 0,63            |               |

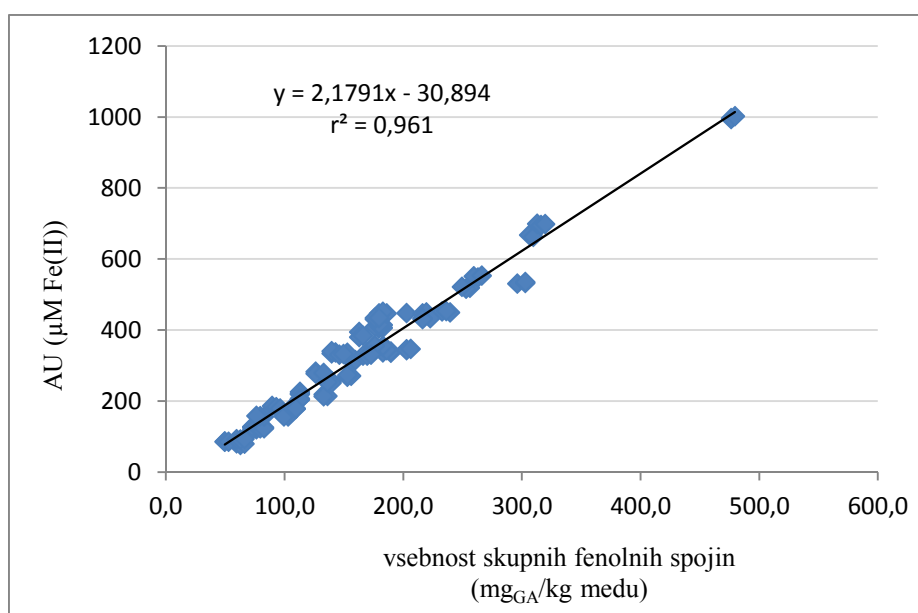
Slika 26: Primerjava analiziranih parametrov za različne vrste medu

#### 4.3 KORELACIJE MED ANALIZIRANIMI PARAMETRI MEDU

Pri iskanju značilnih in močnih povezav med obravnavanimi parametri smo izračunali Pearsonov korelacijski koeficient ( $r$ ). Pozitivna vrednost koeficienta pomeni, da so vrednosti parametrov, ki ju primerjamo, sorazmerne. Pri negativnih vrednostih  $r$  pa so vrednosti parametrov, ki ju primerjamo, obratne sorazmerne. Povezanost spremenljivk delimo glede na vrednost  $r$  na šibko povezanost ( $0,2 < r \leq 0,4$ ), zmerno povezanost ( $0,4 < r \leq 0,7$ ) in močno povezanost ( $0,7 < r \leq 1,0$ ). Pri vrednostih  $r$  manjših od 0,2 povezanosti ni. Korelacijski koeficienti med obravnavanimi parametri so predstavljeni v preglednici 4, nekatere od zvez pa so grafično predstavljene na slikah 27 do 29.

##### 4.3.1 Zveza med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin

Antioksidativna učinkovitost, določena s FRAP metodo, je v pozitivni zvezi z vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, s koeficientom korelacije  $r = 0,980$  in koeficientom determinacije  $r^2 = 0,961$  (slika 27). Zvezo lahko opredelimo kot močno ( $r > 0,7$ ), opišemo jo z regresijskim modelom  $y = 2,1791x - 30,894$ .

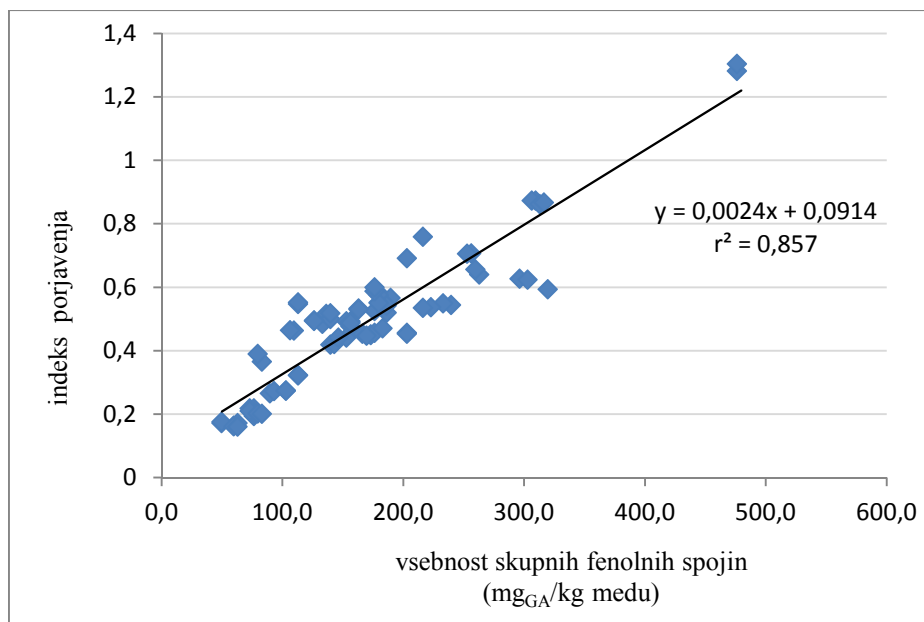


Slika 27: Zveza med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih medu

Ta zveza se je pokazala za značilno v številnih raziskavah, kjer so obravnavali nesegete vzorce medu. Segrevanje povzroči nastanek produktov Maillardove reakcije, kar povzroči povečanje antioksidativne učinkovitosti, nastali produkti pa verjetno reagirajo s FC reagentom, ki je nespecifičen, kar vpliva tudi na višji rezultat vsebnosti skupnih fenolnih spojin.

#### 4.3.2 Zveza med indeksom porjavenja in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin

Vsebnost skupnih fenolnih spojin je v pozitivni zvezi z indeksom porjavenja, koeficient korelacije znaša 0,926 in koeficient determinacije 0,857. Zvezo lahko opredelimo kot močno ( $r > 0,70$ ), opišemo jo z regresijskim modelom  $y = 0,0024x + 0,0914$  (slika 28).



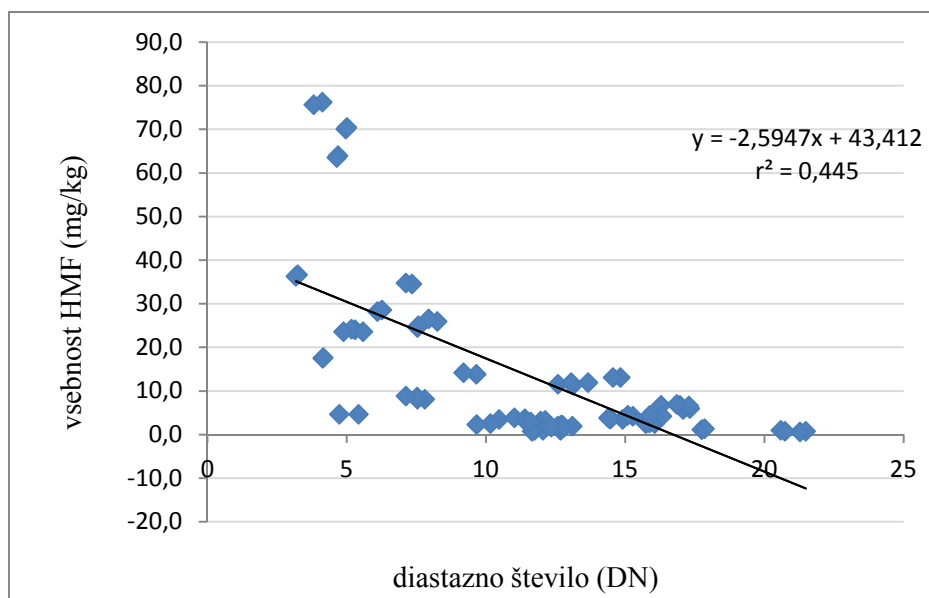
Slika 28: Zveza med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in indeksom porjavenja v analiziranih vzorcih medu

Močna korelacija je posledica naraščanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin in indeksa porjavenja med segrevanjem, pri čemer nastanejo produkti Maillardove reakcije – melanoidini, ki prispevajo k temnejši barvi medu.

#### 4.3.3 Zveza med vsebnostjo HMF in diastaznim številom (DN)

Vsebnost HMF je v negativni zvezi z diastaznim številom, s koeficientom korelacije  $r = -0,667$  in koeficientom determinacije  $r^2 = 0,445$ . Spremenljivki sta zmerno negativno povezani. S slike 29 lahko razberemo, da večja kot je vsebnost HMF, manjše je diastazno število.

Zvezo med vsebnostjo HMF in diastaznim številom (DN) lahko opišemo z regresijskim modelom  $y = -2,5947x + 43,412$ . Zmerna korelacija je posledica naraščanja vsebnosti HMF, diastazno število pa se zmanjšuje zaradi segrevanja medu.



Slika 29: Zveza med vsebnostjo HMF in diastaznim številom (DN) v analiziranih vzorcih medu

Iz preglednice 4 je razvidno, da so tudi med preostalimi pari obravnavanih parametrov močne medsebojne zveze, koeficienti korelacije se gibajo od 0,747 do 0,956.

Preglednica 4: Korelacije med obravnavanimi parametri

| ZVEZA                                                                          | PEARSONOV KOEFICIENT KORELACIJE (r) |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| AU – vsebnost skupnih fenolnih spojin                                          | 0,980                               |
| AU – indeks porjavenja                                                         | 0,933                               |
| AU – a*                                                                        | 0,931                               |
| AU – L*                                                                        | - 0,871                             |
| AU – barva (A <sub>560</sub> -A <sub>720</sub> )                               | 0,755                               |
| vsebnost skupnih fenolnih spojin – indeks porjavenja                           | 0,926                               |
| vsebnost skupnih fenolnih spojin – a*                                          | 0,906                               |
| vsebnost skupnih fenolnih spojin barva – (A <sub>560</sub> -A <sub>720</sub> ) | 0,747                               |
| vsebnost skupnih fenolnih spojin – L*                                          | - 0,842                             |
| L* – barva (A <sub>560</sub> -A <sub>720</sub> )                               | - 0,824                             |
| L* – indeks porjavenja                                                         | - 0,846                             |
| barva (A <sub>560</sub> -A <sub>720</sub> ) – indeks porjavenja                | 0,868                               |
| barva (A <sub>560</sub> -A <sub>720</sub> ) – a*                               | 0,785                               |
| a* – indeks porjavenja                                                         | 0,865                               |
| a* – L*                                                                        | - 0,956                             |
| HMF–DN                                                                         | - 0,667                             |

AU: antioksidativna učinkovitost, L\*, a\*: parametra barve, HMF: hidroksimetilfurfural, DN: diastazno število

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Z analizami v sklopu diplomskega dela smo proučevali vpliv temperature in časa segrevanja na nekatere fizikalnokemijske lastnosti medu. Obravnavali smo vzorce akacijevega, cvetličnega, kostanjevega in gozdnega medu, po 2 vzorca vsake vrste, letnika 2010, pridobljene neposredno od čebelarjev. Vzorce smo analizirali sveže in segrete pri temperaturah 40 in 65 °C 24 oz. 48 ur. Skupno smo v analizo vključili 40 vzorcev medu.

Nesegretim vzorcem smo določili vsebnost vode, električno prevodnost in vrednost pH. Segretim vzorcem (segrevani pri 40 ali 65 °C, 24 ali 48 ur) pa smo s kemijsko analizo določili aktivnost encima diastaze, vsebnost HMF, vsebnost skupnih fenolnih spojin, antioksidativno učinkovitost, barvo, L\*, a\*, b\* parametre in indeks porjavenja. Preverili smo tudi ali obstajajo zveze (korelacije) med analiziranimi parametri.

Vsebnost vode smo analizirali s pomočjo refraktometrijskega določanja deleža vode. Vsebnost vode se je gibala od 15,7 do 17 g/100 g medu (povprečna vrednost 16,0 g/100 g). Rezultati za vsebnost vode ustrezajo zahtevam Pravilniku o medu (2011). Če primerjamo tujo literaturo vidimo, da so si podatki zelo podobni. Escuredo in sod. (2013) so ocenili vsebnost vode 187 vzorcem medu. Med je bil pridelan v severozahodni Španiji in vsebnost vode se je gibala od 16,9 do 18,0 g/100 g, povprečna vrednost 17,6 g/100 g. Medovi so bili v skladu s špansko zakonodajo, ki predpisuje, da vsebnost vode v medu ne sme biti večja od 20 g/100 g medu.

Električno prevodnost raztopine medu smo merili s konduktometrom. Najnižjo električno prevodnost je imel akacijev med 0,194 mS/cm, najvišjo pa kostanjev med 1,876 mS/cm. Tudi električna prevodnost se lahko uporablja za določanje kakovosti samega medu, kar navajajo tudi tuji viri. Yucel in Sultanoglu (2013) navajata, da je električna prevodnost medu odvisna od vsebnosti pepela (mineralov) in kislosti medu. Karabagias in sod. (2014) navajajo, da večja je vsebnost mineralov, večja je tudi električna prevodnost. Vrednost električne prevodnosti se lahko uporablja pri razlikovanju nektarnega in maninega medu.

Vrednosti pH vodne raztopine smo merili s pH metrom. Najnižjo povprečno vrednost je imel akacijev med, znašala je 3,90. Najvišjo vrednost pH smo določili v vzorcu kostanjevega medu, 6,35. Kot navajajo tuji viri mejne vrednosti za vrednost pH niso zakonodajno določene. Raven pH med 3,2 in 4,5, ter naravna kislost medu zavirajo rast mikroorganizmov, saj je optimalen pH za večino organizmov med 7,2 in 7,4 (Karabagias in sod., 2014; Suárez-Luque in sod., 2002).

Povzamemo lahko, da so rezultati vsebnosti vode, električne prevodnosti in vrednosti pH vzorcev medu, vključenih v našo raziskavo, v območjih vrednosti, ki jih za te vrste slovenskega medu navajajo tudi Korošec in sod. (2016).

Diastazno število smo določali z metodo po Schadeju in dobili sledeče rezultate: Vzorca akacijevega medu, ki smo ju segrevali pri 40 °C imata diastazno število še vedno znotraj meje, katero določa Pravilnik o medu (2011). Enako velja za vzorec akacijevega medu (A1-3), ki smo ga segrevali 24 ur pri 65 °C. Pri vzorcih akacijevega medu, ki smo jih segrevali 24 ur pri 65 °C (vzorec A2-3) ter 48 ur pri 65 °C (vzorca A1-4 in A2-4), določeno diastazno število ne dosega več predpisane vrednosti najmanj 8. Pri ostalih vrstah medu (cvetlični, kostanjev in gozdni) je situacija zelo podobna. Zaključimo lahko, da se z daljšim segrevanjem pri višji temperaturi, diastazna aktivnost zmanjšuje. Če je temperatura segrevanja medu previsoka in čas segrevanja predolg, vrednosti diastaznega števila ne ustrezajo več zakonsko predpisanim.

Cozmuta in sod. (2011) so ravno tako prišli do ugotovitve, da se s segrevanjem medu, diastazno število manjša. Vzorci medu so bili izpostavljeni temperaturi 50, 80 in 100 °C, različno dolgo (30 min, 1 uro, 2 uri, 3 ure in 5 ur). DN se je močno zmanjšalo z večjo intenzivnostjo in časom segrevanja za vse vzorce. Po 30 min segrevanja se je aktivnost diastaze zmanjšala za 7,9 % pri 50 °C, 15,3 % pri 80 °C in 48,3 % pri 100 °C, pri daljših časih segrevanja je bila encimska aktivnost še nižja, po treh urah pri 80 °C oz. petih urah pri 50 °C je prišlo do popolne inaktivacije encima diastaze. Segrevanje pri 100 °C, pa je po dveh urah povzročilo 93,57 % inaktivacijo encima. Podobne ugotovitve v svoji raziskavi navajajo tudi Tosi in sod. (2008), ki predvidevajo, da pride s segrevanjem medu do strukturnih sprememb v sami molekuli encima.

Vsebnost hidroksimetilfurfurala (HMF) smo določali z metodo po Winklerju. Največjo vsebnost HMF je imel akacijev med (vzorec A1-4), ki smo ga segrevali 48 ur pri 65 °C, znašala je 75,94 mg/kg medu. Ta vsebnost je že zelo visoka in potrjuje dejstvo, da je bilo ravnanje z medom neustrezno. Visoke vsebnosti smo dobili tudi pri vzorcih C1-4 (63,74 mg HMF/kg) in C2-4 (70,27 mg HMF/kg). Pri segrevanju medu je temperatura 40 °C še primerna, če pa med segrevamo pri temperaturi 65 °C, vzorci večinoma vsebujejo preveč HMF in ne ustrezajo Pravilniku o medu (2011), ki kot zgornjo mejo vsebnosti HMF določa 40 mg/kg.

Vsebnost HMF v segretem medu so proučevali tudi Cozmuta in sod. (2011). Ugotovili so, da je povečanje vsebnosti HMF močno odvisno od temperature. Ko so med segrevali pri temperaturi 50 °C, 30 min, je bila vsebnost HMF enaka kot pri nesegretem medu (2,14 mg/kg medu). Pri segrevanju medu 30 min pri temperaturi 80 °C je prišlo do povečanja vsebnosti HMF na 2,97 mg/kg medu. Če so med segrevali 30 minut pri 100 °C, je vsebnost HMF znašala 5,36 mg/kg medu. Po 3-urnem segrevanju na 50 °C, se je vsebnost HMF povečala za 47 % glede na začetno vsebnost. Po treh urah segrevanja pri 80 oz. 100 °C pa se je vsebnost HMF povečala za 220 oz. 872 % glede na začetno vsebnost. Tudi ostali avtorji (Tosi in sod., 2002; Tarhan in sod., 2008), ki so proučevali vpliv segrevanja na vsebnost HMF v medu navajajo podobne ugotovitve.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določali s pomočjo Folin-Ciocalteujeve metode in dobili sledeče rezultate: Največ skupnih fenolnih spojin pri nesegetih medovih vsebujeta kostanjev in gozdni med. Pri segretyh vzorcih pride do povečanja skupnih fenolnih spojin, po vsej verjetnosti poleg fenolnih spojin tudi na novo nastali produkti Maillardove reakcije reagirajo s FC reagentom, ki je nespecifičen, zato so rezultati verjetno previsoki. Največ skupnih fenolnih spojin vsebuje vzorec K2-4 (477,44 mg<sub>GA</sub>/kg medu), ki smo ga segrevali pri temperaturi 65 °C, 48 ur.

AU medu smo določili s pomočjo FRAP metode. Tudi tu smo, enako kot pri določanju skupnih fenolnih spojin, najvišje vrednosti za nesegete vzorce medu določili pri gozdnem in kostanjevem medu. Najmanjšo AU je imel akacijev med. Po segrevanju medu smo največjo AU določili pri vzorcu K2-4 (segrevan 48 ur na 65 °C), in sicer 997,44 (μM Fe(II)). Predvidevamo, da se AU poveča zaradi nastanka melanoidinov, produktov Maillardove reakcije.

Šarić in sod. (2013) so proučevali kako se antioksidativna učinkovitost in vsebnost skupnih fenolnih spojin v medu spremenita, ko je med podvržen visoki temperaturi. AU so določali z dvema metodama, FRAP in DPPH. Skupno vsebnost fenolnih spojin pa so določali z modificirano FC metodo. Raziskavo so izvedli na 31 vzorcih akacijevega medu in 8 vzorcih kostanjevega medu. Vse meritve so bile izvedene pri dveh temperaturah, pri 23 °C (sobna temperatura) in po 5 minutnem segrevanju na 95 °C. Dobljeni rezultati kažejo na neenotno spremembo AU in vsebnosti skupnih fenolnih spojin, v nekaterih vzorcih se je AU povečala, v drugih pa zmanjšala, podobno velja za vsebnost skupnih fenolnih spojin.

Vrednosti parametrov barve medu L\*, a\* in b\* smo določili s pomočjo kromametra Minolta CR-200B. Pri nesegetih vzorcih je imel najvišjo vrednost L\*, ki določa svetlost medu, akacijev med, kar smo pričakovali, saj je akacijev med med obravnavanimi vrstami medu najsvetlejši. Najnižjo vrednost L\* smo določili v kostanjevem medu. Segrevanje medu je vplivalo na vrednost L\*, v vseh segretyh vzorcih medu je bila vrednost nižja, znižanje je bilo večje pri vzorcih, ki smo jih segrevali pri višji temperaturi, daljši čas. Spremembo barve medu smo opazili tudi z vidno zaznavo. Segrety vzorci medu so imeli minimalne razlike pri parametu a\* znotraj iste vrste, na splošno pa je imel najnižjo vrednost tega parametra barve akacijev, najvišjo pa kostanjev med. Parameter b\*, ki v medu kaže na intenzivnost rumene barve, je bil pri segretyh vzorcih najnižji pri kostanjevem medu in najvišji pri cvetličnem medu.

Inan in sod. (2012), ki so vrednotili barvo cvetličnega in borovega medu, navajajo, da je povprečna vrednost parametra L\* cvetličnega medu, segrevanega pri 75 °C, nižja (31,34) od medu, segretega pri 55 °C (31,99). Nesegeti vzorci so imeli višje vrednosti parametra L\* od vzorcev, ki so jih segrevali, kar se kaže v svetlejši barvi. Povečanje temperature segrevanja cvetličnega medu je verjetno privedlo do nižje vrednosti parametra L\* zaradi pojava karamelizacije. Nasprotno pa pri borovem medu segrevanje ni vplivalo na vrednost



parametra  $L^*$ . Vrednosti parametra  $a^*$  v cvetličnem medu so bile višje kot pri borovem medu. Ko so temperaturo segrevanja povečevali, se je pri obeh vrstah medu pokazala nižja vrednost parametra  $a^*$ . Vrednosti parametra  $b^*$  cvetličnega medu so bile višje kot pri borovem medu, cvetlični med je bolj rumen kot borov med. Segrevanje medu ni pomembno vplivalo na parameter  $b^*$  pri borovem medu, je pa imelo segrevanje vpliv na parameter  $b^*$  cvetličnega medu, vrednosti  $b^*$  v segretem medu so bile nižje kot pri nesegretem vzorcu (Inan in sod., 2012).

Indeks porjavenja se je s časom in temperaturo segrevanja povečeval. Pri segrevanju 24 ur pri 40 °C so bile spremembe indeksa porjavenja večinoma zelo majhne. Segrevanje pri 65 °C pa je povzročilo večje spremembe v vrednosti indeksa porjavenja. Zaradi segrevanja medu pride do nastanka produktov Maillardove reakcije in posledica tega je temnejša barva medu in večji indeks porjavenja. Brudzynski in Miotto (2011) navajata, da zlasti pri svetlejših vrstah medu segrevanje povzroči tvorbo melanoidinov, kar vpliva na potemnenje medu.

Med obravnavanimi parametri smo iskali tudi obstoj značilnih povezav in ugotovili, da so skoraj vse zveze močne, z vrednostjo korelacijskega koeficienta nad 0,7. Najvišje vrednosti korelacijskega koeficienta ( $r$ ) so imele zveze med AU in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ( $r = 0,980$ ), indeksom porjavenja in AU ( $r = 0,933$ ), AU in parametrom  $a^*$  ( $r = 0,931$ ), indeksom porjavenja in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ( $r = 0,926$ ). Ostale vrednosti korelacijskih koeficientov so podane v preglednici 4.

Rezultati naše raziskave, s katero smo proučevali vpliv temperature in časa segrevanja na nekatere fizikalnokemijske parametre medu, nakazujejo, da med do določene temperature lahko segrevamo in pri tem ne pride do zmanjšanja aktivnosti encima diastaze, povečanja vsebnosti HMF ter zmanjšanja vsebnosti in učinka bioaktivnih spojin. V segretyh vzorcih medu se je antioksidativna učinkovitost celo povečala, verjetno zaradi nastanka produktov Maillardove reakcije.

Povzamemo lahko, da je temperatura 40 °C primerna, če želimo med utekočiniti, saj v analiziranih vzorcih medu tudi po 48-urnem segrevanju pri tej temperaturi ni prišlo do bistvenih sprememb v analiziranih parametrih. Temperatura 65 °C pa se je izkazala za neprimerno, ker pride do povečanja vsebnosti HMF in zmanjšanje diastazne aktivnosti, spremembe so pri nekaterih vzorcih tako velike, da le-ti ne ustrezajo več zakonodajno določenim vrednostim, tako segret med je slabše kakovosti.

Z rezultati raziskave smo tudi potrdili vse, na začetku raziskave postavljene hipoteze.

## 5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov določanja nekaterih fizikalnokemijskih lastnosti segretyh vzorcev medu lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Med segrevanjem se je diastazno število zmanjšalo, parametri, kot so vsebnost HMF, vsebnost skupnih fenolnih spojin ter antioksidativna učinkovitost pa se povečali. Barva segretyh vzorcev medu je bila temnejša, kar se kaže z zmanjšano vrednostjo parametra  $L^*$  in večjim indeksom porjavenja.
- Diastazno število se je pri vzorcih, ki smo jih segrevali pri višji temperaturi daljši čas močno zmanjšalo, s čimer smo potrdili postavljeno hipotezo.
- Vsebnost HMF je bila v nesegretyh vzorcih medu relativno majhna, s segrevanjem pa se povečuje. Največje vsebnosti HMF smo določili pri vzorcih medu, ki smo jih segrevali 48 ur na 65 °C.
- Vrednosti diastaznega števila in vsebnost HMF pri nekaterih vzorcih, ki smo jih segrevali 48 ur pri 65 °C, ne ustrezajo zahtevam Pravilnika o medu.
- Vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativna učinkovitost sta se s segrevanjem medu povečali. Povečanje antioksidativne učinkovitosti pripišemo nastanku produktov Maillardove reakcije.
- Vrednost parametra  $L^*$ , ki predstavlja svetlost medu, se z višanjem temperature in daljšim časom segrevanja znižuje. Vzorci, ki smo jih segrevali pri višji temperaturi, daljši čas so imeli nižje vrednosti parametra  $L^*$  in postali temnejše barve, s čimer potrjujemo postavljeno hipotezo.
- Vrednosti indeksa porjavenja so naraščale s časom in temperaturo segrevanja.
- Spremembe v obravnavanih parametrih so bile bolj občutne v vrstnih medovih – akacijevem in cvetličnem medu in manj v mešanih medovih – cvetličnem in gozdnem medu.
- Vse spremembe fizikalnokemijskih parametrov medu so bile pri temperaturi segrevanja 40 °C majhne oz. v nekaterih primerih zanemarljive. Segrevanje pri višji temperaturi, 65 °C, pa je znatno vplivalo na analizirane fizikalnokemijske parametre in bioaktivne lastnosti medu ter poslabšalo kakovost medu.

## 6 POVZETEK

Med je sladko in gosto tekoče živilo, ki ga proizvajajo čebele *Apis mellifera* iz nektarja rastlin ali mane. Sestava in lastnosti medu se spreminjajo glede na izvor, kot tudi zaradi regionalnih in podnebnih pogojev. Ogljikovi hidrati predstavljajo največji delež v medu (75-80 %), ostalo so voda, organske kisline, aminokisline, cvetni prah, vitamini, minerali, encimi, fenolne spojine in barvila. Kristalizacija medu je naraven pojav, ki mu je podvržena večina medov in se pojavi med staranjem medu. Za nadaljnje rokovanje z medom je potrebno le-tega utekočiniti. Zaželeno je, da segrevanje ne vpliva oz. vpliva le v manjši meri na fizikalnokemijske lastnosti in posledično na samo kakovost medu. Med namreč vsebuje tudi spojine, ki imajo lahko pozitiven učinek na zdravje, to so encimi, fenolne spojine, vitamini in aminokisline. Uporaba previsokih temperatur in predolgega časa segrevanja lahko povzroči zmanjšanje vsebnosti in manjši učinek teh bioaktivnih spojin.

Namen raziskave je bil zato ugotoviti vpliv temperature in časa segrevanja na izbrane parametre medu, kot so diastazno število, vsebnost hidroksimetilfurfurala, skupnih fenolnih spojin, antioksidativna učinkovitost in barva. Rezultati številnih raziskav kažejo, da sta diastazno število in vsebnost hidroksimetilfurfurala dobra pokazatelja neustreznega ravnanja z medom, saj segrevanje povzroči zmanjšanje encimske aktivnosti, vsebnost HMF pa se poveča. Mejne vrednosti teh dveh parametrov so tudi zakonsko določene. V raziskavo smo vključili vzorce akacijevega, cvetličnega, kostanjevega in gozdnega medu, po 2 vzorca vsake vrste, ki smo jih analizirali sveže in segrete pri temperaturah 40 in 65 °C 24 oz. 48 ur. Na splošno je segrevanje povzročilo zmanjšanje diastaznega števila, povečanje vsebnosti HMF in skupnih fenolnih spojin ter večjo antioksidativno učinkovitost. Segreti vzorci medu so bili temnejše barve kot neobdelani vzorci. Te spremembe so bile pri vzorcih, ki smo jih segrevali pri temperaturi 40 °C majhne oz. v nekaterih primerih zanemarljive. Nasprotno je segrevanje pri višji temperaturi, pri 65 °C, znatno vplivalo na analizirane fizikalnokemijske in bioaktivne lastnosti medu. Vrednosti diastaznega števila in vsebnost HMF so pri vzorcih, ki smo jih segrevali 48 ur pri 65 °C presegle zakonsko določene vrednosti, ki jih predpisuje Pravilnik o medu. Spremembe v analiziranih parametrih so bile na splošno bolj opazne v vrstnih medovih, akacijevem in kostanjevem medu, kot v vzorcih mešanega medu, kamor spadata cvetlični in gozdni med. S korelacijsko analizo smo ugotovili, da so med obravnavanimi parametri močne medsebojne zveze, saj so bili koeficienti korelacije večji od 0,7, z izjemo zveze med diastaznim številom in vsebnostjo HMF, kjer  $r$  znaša - 0,667. Najvišji koeficient korelacije ( $r = 0,980$ ) smo določili za zvezo med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, kar se je pred tem že potrdilo v številnih raziskavah. Zelo močno zvezo smo določili tudi med antioksidativno učinkovitostjo in indeksom porjavenja ( $r = 0,933$ ), kar nakazuje, da se med segrevanjem tvorijo nove spojine z antioksidativnim delovanjem, kot so produkti Maillardove reakcije.

Zaključimo lahko, da primerna temperatura, ki ne preseže 40 °C, in ustrezen čas segrevanja ne vplivata na kakovost medu.

## 7 VIRI

- Ahmed M., Djebil N., Aissat S., Khiati B., Meslem A., Bacha S. 2013. *In vitro* activity of natural honey alone and in combination with surcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3: 816-821
- Aljadi A.M., Kamaruddin M.Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. Food Chemistry, 85, 4: 538-542
- Al-Mamary M., Al-Meer A., Al-Habori M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. Nutrition Research, 22, 9: 1041-1047
- Anklam E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. Food Chemistry, 63, 4: 549-562
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. Analyst, 127: 183-198
- Babacan S., Pivarnik L.F., Rand A.G. 2002. Honey amylase activity and food starch degradation. Journal of Food Science, 67, 5: 1625-1630
- Baltrušaityte V., Venskutonis P.R., Čeksteryte V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. Food Chemistry, 101, 2: 502-514
- Barra M.P.G., Ponce-Diaz, M.C., Venegas-Gallegos C. 2010. Volatile compounds in honey produced in the central valley of Nuble Province, Chile. Chilean Journal of Agricultural Research, 70: 75-84
- Bath P.K., Singh N. 1999. A comparison between helianthus annuus and eucalyptus lanceolatus honey. Food Chemistry, 67: 389-397
- Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of »antioxidant power«: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76
- Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Maffei Facino R. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. Analytica Chimica Acta, 533, 2: 185-191
- Bertoncelj J. 2008. Identifikacija in vsebnost nekaterih antioksidantov v slovenskem medu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 124 str.
- Bertoncelj J., Golob T., Kropf U., Korošec M. 2011. Characterisation of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. International Journal of Food Science and Technology, 46: 1661-1671

- Bogdanov S. 2009. Harmonised methods of the international honey commission. Bern, Swiss Bee Research Center, International Honey Commission, World Network of Honey Science: 63-63  
[http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/IHCPapers/IHC-methods\\_2009.pdf](http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/IHCPapers/IHC-methods_2009.pdf) (marec, 2016)
- Bogdanov S. 2014. Honey as nutrient and functional food. Bee Product Science, 1-48  
<http://www.beehexagon.net/files/file/fileE/HealthHoney/8HoneyNutrientFunctionalReview.pdf> (maj, 2016)
- Božič J. 1998. Nektarne paše. V: Od čebele do medu. Poklucar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 146-161
- Božnar A., Senegačnik J. 1998. Med. V: Od čebele do medu. Poklucar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 472 str.
- Božnar M. 2002. Zaklad iz čebeljega panja. Ljubljana, Kmečki glas: 13-13
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. 1. izd. Ljubljana, Študentska založba: 126-126
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56, 11: 317-333
- Brudzynski K., Miotto D. 2011. The recognition of high molecular weight melanoidins as the main components responsible for radical-scavenging capacity of unheated and heat-treated Canadian honeys. Food Chemistry, 125: 570-575
- Burkan L. 2006. Povezava med vsebnostjo vode in aktivnostjo vode v medu. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45-45
- Capuano E., Fogliano V. 2011. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. Food Science and Technology, 44: 793-810
- Castro-Vazquez L., Diaz-Maroto M.C., Perez-Coello M.S. 2007. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. Food Chemistry, 103: 601-606
- Challacombe C.A., Abdel-Aal E.M., Seetharamana K., Duizer L.M. 2012. Influence of phenolic acid content on sensory perception of bread and crackers made from red or white wheat. Journal of Cereal Science, 56: 181-188
- Cozmuta A.M., Cozmuta L.M., Varga C., Marian M., Peter A. 2011. Effect of thermal processing on quality of polyfloral honey. Romanian Journal of Food Science, 1: 45-52

- Da Silva P.M., Gauche C., Gonzaga L.V., Oliveira Costa A.C. 2015. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196: 309-323
- Dustmann J.H. 1993. Honey quality and its control. *American Bee Journal*, 133: 648-651
- Escuredo O., Miguez M., Fernandez-Gonzalez M., Seijo M.C. 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138: 851-856
- Fallico B., Zappala M., Arena E., Verzera A., 2004. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85: 305-313
- Fleetwood J. 2009. Med. Tržič, Učila: 26-26
- Fleuriet A., Macheix J-J. 2003. Phenolic acids in fruits and vegetables. V: *Flavonoids in health and disease*. Rice-Evans C.A., Packer L. (ur.). New York, Marcel Dekker: 1-42
- Frankel S., Robinson G.E., Berenbaum M.R. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37, 1: 27-3
- Gambaro A., Ares G., Gimenez A., Pahor. 2007. Preference mapping of color of Uruguayan honeys. *Journal of Sensory Studies*, 22: 507-519
- Gheldof N., Engeseth N.J. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 10: 3050-3055
- Gheldof N., Wang X-H., Engeseth N.J. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 21: 5870-5877
- Golob T., Jamnik M., Božič J., Kropf U., Kandolf A., Bertoneclj J., Zdešar P., Meglič M., Goljat A. 2008. Med: značilnosti slovenskega medu. Brdo pri Lukovici, Čebelarska zveza Slovenije: 84-84
- Guler A., Kocaokutgen H., Garipoglu A.V., Onder H., Ekinci D., Biyik S. 2014. Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis Mellifera L.*) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants) syrups by the carbo isotope ratio analysis. *Food Chemistry*, 155: 155-160
- Hasan S.H. 2013. Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Journal of Babylon University. Pure and Applied Science*, 6, 21: 2244-2253

- Inan Ö., Özcan M.M., Arslan D., Ünver A. 2012. Some physico-chemical and sensory properties of heat treated commercial pine and blossom honey. *Journal of Apicultural Research* 51: 347-352
- Kapš P. 2012. Zdravljenje s čebeljimi pridelki (apiterapija). Novo Mesto, Grafika Tomi: 413 str.
- Karabagias I. K., Badeka A., Kontakos S., Karabournioti S., Kontominas M. G. 2014. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry*, 146: 548-557
- Karabournioti S., Zervalaki P. 2001. The effect of heating on honey HMF and invertase. *Apiacta*, 36: 177-181
- Korošec L., 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000. Portorož, 26.-27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Korošec M., Kropf U., Golob T., Bertoneclj J. 2016. Functional and nutritional properties of different types of Slovenian honey. V: Functional properties of traditional foods. Kristbergsson K., Ötles S. (ur.) New York, Springer: 323-338
- Kowalski S. 2013. Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. *Food Chemistry*, 141: 1378-1382
- Kozmus P., Smodiš-Škerl M.I., Nakrst M., 2011. Čebelarjenje za vsakogar. Ljubljana, Kmečki glas: 128 str.
- Krauze A., Krauze J. 1991. Changes in chemical composition of stored honeydew honeys. *Acta Alimentaria Polonica*, 17, 2: 119-125
- Kropf U., Jamnik M., Bertoneclj 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
- Marini F., D'Aloise A., Bucci R., Buiarelli F., Magrì A.L., Magrì A.D. 2011. Fast analysis of 4 phenolic acids in olive oil by HPLC-DAD and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 106: 142-149
- Marston A., Hostettmann K. 2005. Separation and quantification of flavonoids. V: Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. Andersen Ø. M., Markham K.R. (ur.). New York, Taylor & Francis: 1-36

- Mendes E., Brojo Proenca E., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Ferreira M.A. 1998. Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydrate Polymers*, 37: 219-223
- Molan P.C. 1996. Authenticity of honey. V: Food authentication. Ashurst P.R., Dennis M.J. (ed.). London, Chapman & Hall: 259-296
- Nagai T., Sakai M., Inoue R., Inoue H., Suzuki N. 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 75: 237-240
- Nardini M., Ghiselli A. 2004. Determination of free and bound phenolic acid in beer. *Food Chemistry*, 84: 137-143
- Ovčec S. 2007. Encimska aktivnost medu. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 62 str.
- Pedrotti W. 2003. Med, cvetni prah, matični mleček, propolis in strup: lastnosti in učinki pridelkov čebelnjega panja in apiterapija. Ljubljana, Pisanica, Delo revije: 13-13
- Persano Oddo L., Piazza M.G., Pulcini P. 1999. Invertase activity in honey. *Apidologie*, 30: 57-65
- Pravilnik o medu. 2011. Uradni list Republike Slovenije, 21, 4: 345-347
- Puscas A., Hosu A., Cimpoiu C. 2013. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal of Chromatography A*, 1272: 132-135
- Robbins R.J., Bean S.R. 2004. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1038, 1-2: 97-105
- Silici S., Sagdic O., Ekici L. 2010. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chemistry*, 121: 238-243
- Suárez-Luque S., Mato I., Huidobro J.F., Simal-Lozano J., Sancho M.T. 2002. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 955: 207-214
- Šarić G., Marković K., Vukičević D., Lež E., Hruškar M., Vahčić N. 2013. Changes of antioxidant activity in honey after heat treatment. *Czech Journal of Food Sciences*, 31: 601-606
- Šenk N. 2006. Vrednotenje medu: zveza med barvo medu in antioksidativno aktivnostjo. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 61 str.



- Taranov G.F. 2013. Hrana in prehrana čebel. Grosuplje, Partner graf: 8 str.
- Tomas-Barberan F.A., Martos I., Ferreres F., Radovic B., Anklaam E. 2001. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 5: 485-496
- Tornuk F., Karaman S., Ozturk L., Toker O.S., Tastemur B., Sagdic O. 2013. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, 46: 124-131
- Tosi E., Ciappini M., Ré E., Lucero H. 2002. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*, 77: 71-74
- Tosi E., Martinet R., Ortega M., Lucero H., Re E. 2008. Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry*, 106: 883-887
- Tsao R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2: 1231-1246
- Tuberoso C.I.G., Jerkovic I., Sarais G., Congiu F., Marijanovic Z., Kus P.M. 2014. Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE  $L^*C_{ab}^*h_{ab}^\circ$  chromaticity coordinates. *Food Chemistry*, 145: 284-291
- Turhan I., Tetika N., Karhana M., Gurelb F., Reyhan Tavukcuoglua H. 2008. Quality of honeys influenced by thermal treatment. *Food Science and Technology*, 41: 1396-1399
- Turkmen N., Sari F., Poyrazoglu E.S., Velioglu Y.S. 2006. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95, 4: 653-657
- Vaikousi H., Koutsoumanis K., Biliaderis C.G. 2009. Kinetic modelling of nonenzymatic browning in honey and diluted honey systems subjected to isothermal and dynamic heating protocols. *Journal of Food Engineering*, 95: 541-550
- Vorlovà L., Přidal A. 2002. Invertase and diastase activity in honeys of Czech provenience. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 5: 57-66
- Wang X.H., Gheldof N., Engeseth N.J. 2004. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science*, 69, 2: 96-101
- Wang Y., Juliani R., Simon J.E., Ho C. 2009. Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 115: 233-327

- Webb E.C. 1992. Enzyme nomenclature: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. San Diego, Academic Press: 862 str.
- White J.W., Kushnir I., Subers M.H. 1964. Effect of storage and processing temperatures on honey quality. Food Technology, 18: 153-156
- Yücel Y., Sultanoglu P. 2013. Characterization of honey from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. Food Bioscience, 1: 16-25

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Jasni Bertoncelej za vso njeno strokovno pomoč.

Zahvala velja tudi recenzentu prof. dr. Rajku Vidrihu za strokoven pregled diplomske naloge.

Knjižničarki ga. Barbari Slemenik se zahvaljujem za tehnični pregled diplome.

Največja zahvala pa gre mojemu partnerju Sandiju in moji zlati mami, da sta vse to zdržala in sta verjela vame.

Moja dva sončka, hvala vama, zmogla sem samo zaradi vaju. Upam, da bosta nekoč ponosni name in bosta pozabili na to, koliko časa je mamica presedela za računalnikom. Rada vaju imam.

## PRILOGE

Priloga A: Povprečne vrednosti analiziranih parametrov (voda, EP, DN, HMF, vsebnost skupnih fenolnih spojin in AU) pri različnih temperaturah in času segrevanja

| VZOREC | VODA<br>(g/100 g) | EP<br>(mS/cm) | DN    | HMF<br>(mg/kg) | Vsebnost skupnih<br>fenolnih spojin<br>(mg <sub>GA</sub> /kg medu) | AU<br>(μM Fe(II)) |
|--------|-------------------|---------------|-------|----------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------|
| A1     | 16,30             | 0,266         | 15,81 | 2,688          | 74,11                                                              | 121,63            |
| A1-1   |                   |               | 15,91 | 2,496          | 77,44                                                              | 123,57            |
| A1-2   |                   |               | 14,67 | 3,648          | 75,22                                                              | 127,10            |
| A1-3   |                   |               | 8,11  | 26,208         | 93,00                                                              | 182,33            |
| A1-4   |                   |               | 3,98  | 75,936         | 113,00                                                             | 221,50            |
| A2     | 15,80             | 0,194         | 12,05 | 3,168          | 63,00                                                              | 78,67             |
| A2-1   |                   |               | 11,21 | 3,648          | 50,78                                                              | 85,33             |
| A2-2   |                   |               | 10,95 | 3,552          | 63,00                                                              | 92,18             |
| A2-3   |                   |               | 4,16  | 17,568         | 81,89                                                              | 123,58            |
| A2-4   |                   |               | 3,22  | 36,480         | 101,89                                                             | 156,56            |
| C1     | 15,70             | 0,376         | 17,21 | 5,856          | 79,67                                                              | 156,91            |
| C1-1   |                   |               | 17,14 | 6,624          | 113,00                                                             | 204,81            |
| C1-2   |                   |               | 16,58 | 6,816          | 108,56                                                             | 179,19            |
| C1-3   |                   |               | 7,57  | 24,768         | 134,11                                                             | 214,98            |
| C1-4   |                   |               | 4,68  | 63,744         | 138,56                                                             | 252,70            |
| C2     | 15,70             | 0,592         | 14,71 | 13,056         | 154,11                                                             | 270,42            |
| C2-1   |                   |               | 12,87 | 11,424         | 157,44                                                             | 316,04            |
| C2-2   |                   |               | 13,37 | 11,904         | 128,56                                                             | 279,19            |
| C2-3   |                   |               | 7,24  | 34,656         | 187,44                                                             | 336,74            |
| C2-4   |                   |               | 5,00  | 70,272         | 213,00                                                             | 447,44            |
| K1     | 16,10             | 1,240         | 16,11 | 4,320          | 183,00                                                             | 344,81            |
| K1-1   |                   |               | 15,20 | 4,320          | 179,67                                                             | 406,21            |
| K1-2   |                   |               | 14,47 | 3,648          | 180,78                                                             | 413,75            |
| K1-3   |                   |               | 9,43  | 14,016         | 253,00                                                             | 518,83            |
| K1-4   |                   |               | 6,19  | 28,416         | 308,56                                                             | 667,26            |
| K2     | 17,00             | 1,876         | 21,05 | 0,864          | 164,11                                                             | 385,70            |
| K2-1   |                   |               | 21,01 | 0,672          | 183,00                                                             | 447,96            |
| K2-2   |                   |               | 17,81 | 1,248          | 177,44                                                             | 432,70            |
| K2-3   |                   |               | 9,93  | 2,400          | 316,33                                                             | 697,61            |
| K2-4   |                   |               | 5,09  | 4,608          | 477,44                                                             | 997,44            |
| G1     | 15,60             | 1,100         | 12,37 | 0,960          | 171,89                                                             | 339,54            |
| G1-1   |                   |               | 11,71 | 0,864          | 178,56                                                             | 356,04            |
| G1-2   |                   |               | 11,54 | 2,880          | 204,11                                                             | 344,63            |
| G1-3   |                   |               | 7,68  | 8,064          | 236,33                                                             | 450,95            |
| G1-4   |                   |               | 5,25  | 24,096         | 300,78                                                             | 532,18            |
| G2     | 15,50             | 1,114         | 12,85 | 1,920          | 140,78                                                             | 336,74            |
| G2-1   |                   |               | 12,73 | 2,112          | 149,67                                                             | 332,53            |
| G2-2   |                   |               | 12,57 | 1,632          | 169,67                                                             | 328,49            |
| G2-3   |                   |               | 7,34  | 8,736          | 218,56                                                             | 431,82            |
| G2-4   |                   |               | 5,24  | 23,616         | 263,00                                                             | 550,60            |

EP: električna prevodnost, DN: diastazno število, HMF: hidroksimetilfurfural, AU: antioksidativna učinkovitost

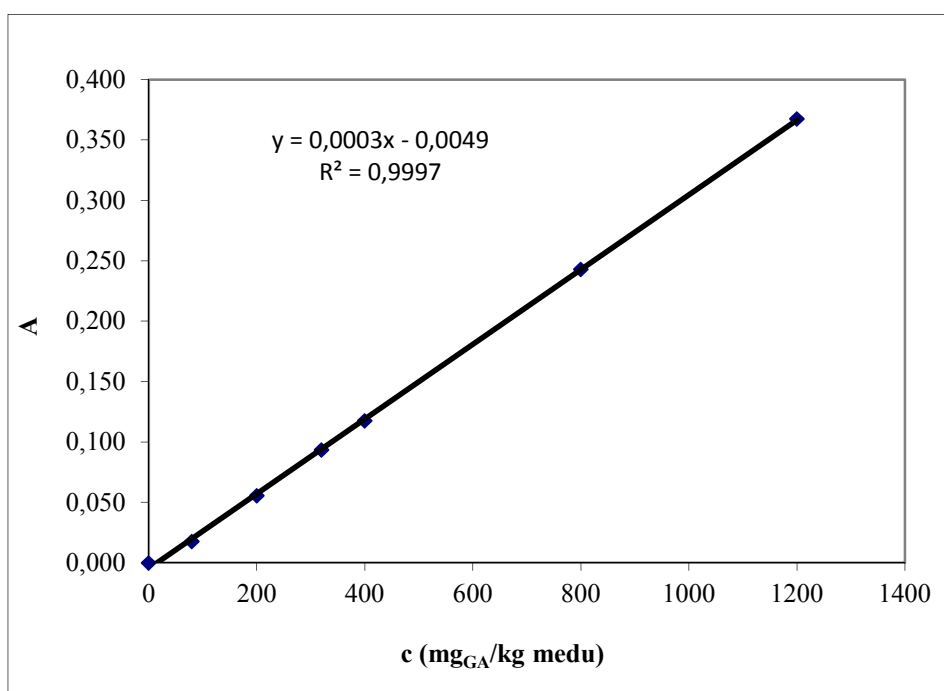
Priloga B: Povprečne vrednosti analiziranih parametrov ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , barva, indeks porjavenja) pri različnih temperattaurah in času segrevanja

| VZOREC | $L^*$ | $a^*$ | $b^*$ | BARVA<br>( $A_{560}-A_{720}$ ) | INDEKS<br>PORJAVENJA<br>( $A_{450}-A_{720}$ ) |
|--------|-------|-------|-------|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| A1     | 55,65 | -1,68 | 18,44 | 0,073                          | 0,218                                         |
| A1-1   | 56,75 | -1,75 | 18,62 | 0,062                          | 0,196                                         |
| A1-2   | 56,68 | -1,71 | 18,61 | 0,069                          | 0,208                                         |
| A1-3   | 54,11 | -0,72 | 22,56 | 0,084                          | 0,269                                         |
| A1-4   | 50,97 | 2,01  | 25,16 | 0,087                          | 0,323                                         |
| A2     | 57,26 | -2,08 | 16,34 | 0,058                          | 0,167                                         |
| A2-1   | 57,36 | -2,02 | 16,53 | 0,058                          | 0,173                                         |
| A2-2   | 57,58 | -2,15 | 15,94 | 0,051                          | 0,161                                         |
| A2-3   | 54,87 | -1,93 | 20,14 | 0,059                          | 0,202                                         |
| A2-4   | 53,52 | -0,28 | 24,73 | 0,075                          | 0,274                                         |
| C1     | 50,96 | -0,58 | 25,78 | 0,105                          | 0,377                                         |
| C1-1   | 47,86 | 1,03  | 25,70 | 0,175                          | 0,550                                         |
| C1-2   | 46,60 | 0,45  | 24,47 | 0,136                          | 0,464                                         |
| C1-3   | 49,43 | 1,8   | 26,93 | 0,155                          | 0,500                                         |
| C1-4   | 47,91 | 3,73  | 26,30 | 0,138                          | 0,508                                         |
| C2     | 44,33 | 5,65  | 23,44 | 0,136                          | 0,492                                         |
| C2-1   | 43,77 | 5,02  | 22,64 | 0,134                          | 0,482                                         |
| C2-2   | 42,84 | 4,81  | 22,37 | 0,139                          | 0,494                                         |
| C2-3   | 40,89 | 7,05  | 21,57 | 0,144                          | 0,568                                         |
| C2-4   | 39,97 | 10,23 | 21,32 | 0,194                          | 0,725                                         |
| K1     | 41,45 | 9,72  | 22,08 | 0,119                          | 0,522                                         |
| K1-1   | 40,98 | 9,48  | 21,62 | 0,160                          | 0,553                                         |
| K1-2   | 41,38 | 8,41  | 21,94 | 0,154                          | 0,565                                         |
| K1-3   | 39,37 | 11,86 | 20,94 | 0,157                          | 0,706                                         |
| K1-4   | 36,95 | 14,92 | 19,15 | 0,190                          | 0,873                                         |
| K2     | 38,04 | 9,14  | 19,16 | 0,117                          | 0,532                                         |
| K2-1   | 39,10 | 9,68  | 20,16 | 0,121                          | 0,546                                         |
| K2-2   | 36,99 | 8,47  | 18,49 | 0,156                          | 0,593                                         |
| K2-3   | 34,59 | 13,27 | 17,33 | 0,152                          | 0,864                                         |
| K2-4   | 31,84 | 15,78 | 14,63 | 0,197                          | 1,292                                         |
| G1     | 39,04 | 8,67  | 19,40 | 0,136                          | 0,450                                         |
| G1-1   | 39,87 | 9,00  | 20,02 | 0,139                          | 0,463                                         |
| G1-2   | 38,80 | 8,49  | 19,51 | 0,133                          | 0,455                                         |
| G1-3   | 38,15 | 9,65  | 19,55 | 0,146                          | 0,547                                         |
| G1-4   | 37,99 | 11,62 | 19,71 | 0,139                          | 0,625                                         |
| G2     | 42,42 | 7,07  | 21,97 | 0,113                          | 0,420                                         |
| G2-1   | 42,03 | 6,97  | 21,69 | 0,114                          | 0,648                                         |
| G2-2   | 42,45 | 6,3   | 21,88 | 0,136                          | 0,450                                         |
| G2-3   | 42,58 | 8,14  | 22,91 | 0,145                          | 0,536                                         |
| G2-4   | 40,41 | 10,41 | 21,75 | 0,163                          | 0,648                                         |

Priloga C: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin

| <b>c (mg<sub>GA</sub>/kg medu)</b> | <b>A<sub>1</sub></b> | <b>A<sub>2</sub></b> | <b><math>\bar{A}</math></b> |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| 0                                  | 0                    | 0                    | 0,000                       |
| 80                                 | 0,017                | 0,018                | 0,018                       |
| 200                                | 0,056                | 0,055                | 0,056                       |
| 320                                | 0,093                | 0,094                | 0,094                       |
| 400                                | 0,118                | 0,117                | 0,118                       |
| 800                                | 0,238                | 0,248                | 0,243                       |
| 1200                               | 0,368                | 0,367                | 0,368                       |

$\bar{A}$  - povprečna vrednost absorbance A<sub>1</sub> in A<sub>2</sub>

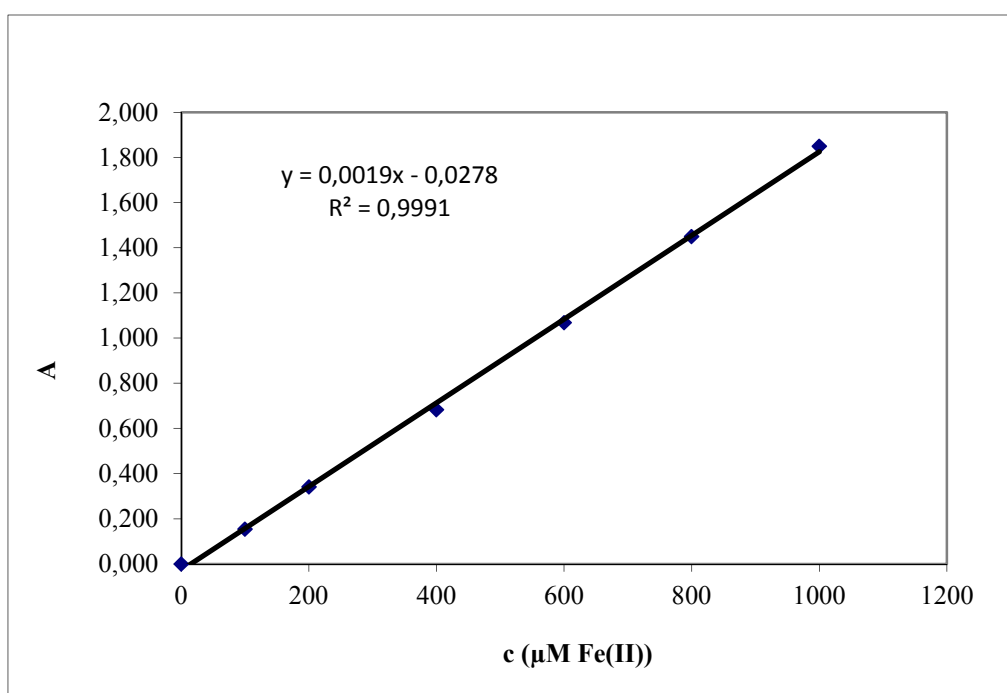


Priloga D: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin (odvisnost absorbance od koncentracije, izražene kot mg galne kisline na kg medu)

Priloga E: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje AU s FRAP metodo

| c (μM Fe(II)) | A <sub>1</sub> | A <sub>2</sub> | $\bar{A}$ |
|---------------|----------------|----------------|-----------|
| 0             | 0              | 0              | 0,000     |
| 100           | 0,152          | 0,158          | 0,155     |
| 200           | 0,343          | 0,340          | 0,342     |
| 400           | 0,678          | 0,690          | 0,684     |
| 600           | 1,078          | 1,060          | 1,069     |
| 800           | 1,442          | 1,458          | 1,450     |
| 1000          | 1,854          | 1,846          | 1,850     |

$\bar{A}$  - povprečna vrednost absorbance A<sub>1</sub> in A<sub>2</sub>



Priloga F: Umeritvena krivulja za določanje AU s FRAP metodo (odvisnost absorbance od koncentracije Fe(II))

