

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tjaša ŠTAUDOHAR

**KARAKTERIZACIJA SLOVENSKEGA MATIČNEGA
MLEČKA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tjaša ŠTAUDOHAR

KARAKTERIZACIJA SLOVENSKEGA MATIČNEGA MLEČKA

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

CHARACTERIZATION OF SLOVENIAN ROYAL JELLY

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija druge stopnje Prehrana. Opravljeno je bilo na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Odseku za znanosti o okolju Instituta »Jožef Stefan«.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Jasno Bertonceľ, za somentorja doc. dr. Tomaža Polaka in za recenzenta prof. dr. Rajka Vidriha.

Mentorica: doc. dr. Jasna BERTONCELJ

Somentor: doc. dr. Tomaž POLAK

Recenzent: prof. dr. Rajko VIDRIH

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Tjaša Štaudohar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 638.17:543.2/.9:641.1(043)=163.6
KG matični mleček/karakterizacija/geografsko poreklo/kemijska sestava/10-HDA/HPLC/kontrola kakovosti/standardna sestava/pristnost matičnega mlečka
AV ŠTAUDOHAR, Tjaša, dipl. inž. živ. in prehr. (UN)
SA BERTONCELJ, Jasna (mentorica)/POLAK, Tomaž (somentor)/VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2014
IN KARAKTERIZACIJA SLOVENSKEGA MATIČNEGA MLEČKA
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana)
OP VIII, 62 str., 7 pregl., 20 sl., 3 pril., 69 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen magistrske naloge je bil določiti parametre kakovosti slovenskega matičnega mlečka. V analizo smo vključili 21 vzorcev svežega matičnega mlečka, 18 vzorcev je bilo slovenskega porekla. Analizirali smo vsebnost vode, pepela, prostih titrabilnih kislin, maščob, beljakovin in 10-hidroksi-2-decenojske kisline, vrednost pH ter določili izotopsko sestavo. Vse analizirane parametre smo statistično obdelali z različnimi metodami. Rezultati analiziranih parametrov predstavljajo osnovo za definiranje standardne sestave slovenskega matičnega mlečka. Rezultate analiz smo primerjali s standardi kakovosti za svež matični mleček, definiranimi s strani Mednarodne komisije za med, ter z razpoložljivimi podatki iz tuje literature. Vsi vzorci slovenskega matičnega mlečka so ustrezali postavljenim standardom kakovosti. Eden izmed vzorcev matičnega mlečka tujega porekla ni ustrezal minimalno določeni vrednosti kislosti. Vsebnost 10-hidroksi-2-decenojske kisline, spojine, ki se nahaja samo v matičnem mlečku, je bila v vseh analiziranih vzorcih nad predpisano mejo. Vzorci slovenskega matičnega mlečka so jo v primerjavi z vzorci tujega izvora v povprečju vsebovali 61 % več. Ugotovili smo, da so rezultati analiz slovenskega matičnega mlečka primerljivi z rezultati tujih avtorjev, večje razlike so le pri dveh parametrih, in sicer v vsebnosti maščob in vrednosti $\delta^{15}\text{N}$. Rezultati multivariatne analize so pokazali, da se analizirani vzorci slovenskega matičnega mlečka dobro ločijo od analiziranih vzorcev tujega porekla. Slovenski matični mleček vsebuje statistično značilno več vode, maščob in 10-hidroksi-2-decenojske kisline ter manj beljakovin. Ti parametri bi zato lahko služili za določanje kakovosti in pristnosti slovenskega matičnega mlečka in omogočili tudi kontrolo matičnega mlečka tujega porekla na slovenskem tržišču.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
 DC UDC 638.17:543.2/.9:641.1(043)=163.6
 CX royal jelly/characterization/geographic origin/chemical composition/10-HDA/HPLC/quality control/standard composition/royal jelly authenticity
 AU ŠTAUDOHAR, Tjaša
 AA BERTONCELJ, Jasna (supervisor)/POLAK, Tomaž (co-advisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2014
 TI CHARACTERIZATION OF SLOVENIAN ROYAL JELLY
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Nutrition)
 NO VIII, 62 p., 7 tab., 20 fig., 3 ann., 69 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The aim of this research was to determine quality parameters of Slovenian royal jelly (RJ). Twenty-one samples of fresh royal jelly were included, 18 samples were of Slovenian origin. The contents of water, ash, free acids, fat, protein, 10-hidroxy-2-decenoic acid, pH value and stable carbon and nitrogen isotopes were determined by chemical analyses. All analyzed parameters were statistically evaluated with different methods. The results of the analyzed parameters provide a foundation for definition of the standard composition of Slovenian RJ. Results of analyses were compared with the quality standards for fresh RJ, defined by the International Honey Commission, and with the available data from foreign literature. All samples of Slovenian RJ met the established quality criteria. One of the samples of RJ of foreign origin did not meet the minimum defined value of acidity. The content of 10-hidroxy-2-decenoic acid, a compound found only in RJ, was in all analyzed samples above defined value. Samples of Slovenian RJ in comparison with samples of foreign origin, on average contained 61 % more of 10-hydroxy-2-decenoic acid. The results of analyzed Slovenian RJ are comparable with results obtained by other researchers; bigger differences were found in only two parameters, fat content and $\delta^{15}\text{N}$ value. The multivariate analysis showed that the analyzed samples of Slovenian RJ can be well separated from the analyzed samples of foreign origin. Slovenian RJ contains significantly more water, fat, and 10-hydroxy-2-decenoic acid and less protein. Therefore, these parameters could serve for determination of the quality and authenticity of the Slovenian RJ and could also enable us to control the presence of RJ of foreign origin on the Slovenian market.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PRIDOBIVANJE MATIČNEGA MLEČKA	3
2.2 SENZORIČNE LASTNOSTI IN SESTAVA MATIČNEGA MLEČKA	4
2.2.1 Senzorične lastnosti	4
2.2.2 Makroskopska in mikroskopska sestava	4
2.2.3 Voda	5
2.2.4 Ogljikovi hidrati	5
2.2.5 Pepel	6
2.2.6 Beljakovine	6
2.2.7 Vrednost pH in vsebnost kislin v matičnem mlečku	7
2.2.8 Maščobe	7
2.2.8.1 10-hidroksi-2-decenojska kislina	8
2.2.8.2 Določanje 10-HDA v matičnem mlečku	9
2.2.9 Stabilni izotopi	10
2.2.9.1 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov ^{12}C in ^{13}C	11
2.2.9.2 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov ^{14}N in ^{15}N	12
2.2.9.3 Analiza stabilnih izotopov z metodo IRMS	13
2.3 KAKOVOST MATIČNEGA MLEČKA	14
2.3.1 Svežost matičnega mlečka	14
2.3.2 Potvorjenost matičnega mlečka	15
2.3.3 Ugotavljanje potvorjenosti matičnega mlečka z metodo IRMS	16
2.4 FUNKCIONALNE LASTNOSTI MATIČNEGA MLEČKA	17
2.5 UPORABA MATIČNEGA MLEČKA V PREHRANI	18
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 VZORCI	19
3.2 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE	19
3.2.1 Določanje vsebnosti vode (Sesta in Lusco, 2008)	19
3.2.2 Določanje vsebnosti pepela (Plestenjak in Golob, 2003)	20
3.2.3 Določanje vrednosti pH v matičnem mlečku (Olimpia in sod., 2008)	21
3.2.4 Določanje kislosti matičnega mlečka (Olimpia in sod., 2008)	21
3.2.5 Določanje vsebnosti beljakovin z metodo po Kjeldahlu (Plestenjak in Golob, 2003)	23
3.2.6 Določanje vsebnosti maščob z metodo po Soxhletu (Plestenjak in Golob, 2003)	25

3.2.7	Določanje vsebnosti 10-HDA s tekočinsko kromatografijo z masnim spektrometrom (LC/MS)	26
3.2.8	Določanje razmerij izotopov ogljika in dušika v matičnem mlečku z metodo IRMS (aoac 998.12, 1999)	28
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	29
3.3.1	Enovzorčna analiza	29
3.3.1.1	Aritmetična sredina ali povprečna vrednost	29
3.3.1.2	Standardni odklon	30
3.3.1.3	Koeficient variabilnosti ali variance	30
3.3.2	Dvovzorčna analiza	30
3.3.2.1	Koeficient korelacije po Pearsonu	30
3.3.2.2	Koeficient determinacije	31
3.3.3	Večvzorčna analiza	31
3.3.3.1	Levenov test homogenosti varianc	31
3.3.3.2	ANOVA-analiza variance	32
3.3.3.3	Studentov t-test	32
3.3.3.4	Mann-Whitney U test	32
3.3.4	Faktorska analiza	32
3.3.4.1	PCA- metoda glavnih komponent	33
3.3.5	Diskriminantna analiza	33
3.3.5.1	LDA- linearna diskriminantna analiza	33
4	REZULTATI	34
4.1	REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI VODE V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA	35
4.2	REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI PEPELA V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA	36
4.3	REZULTATI MERJENJA VREDNOSTI pH V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA	36
4.4	REZULTATI DOLOČANJA KISLOSTI VZORCEV MATIČNEGA MLEČKA	37
4.5	REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI BELJAKOVIN V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA	38
4.6	REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI MAŠČOB V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA	39
4.6.1	Rezultati določanja vsebnosti 10-HDA v vzorcih matičnega mlečka	40
4.7	REZULTATI IZOTOPSKE SESTAVE	42
4.8	PRIMERJAVA NAŠIH REZULTATOV Z REZULTATI TUJIH AVTORJEV	44
4.9	REZULTATI STATISTIČNE OBDELAVE	45
4.9.1	Korelacije med posameznimi parametri	45
4.9.2	Vpliv geografskega porekla	46
4.9.2.1	Rezultati multivariatne analize (PCA in LDA)	48
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.2	SKLEPI	55

6	POVZETEK.....	56
7	VIRI.....	58
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava svežega matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009).....	5
Preglednica 2: Vzorci matičnega mlečka (poreklo, število in oznaka)	19
Preglednica 3: Povprečne vrednosti in osnovni statistični parametri za analizirane vzorke matičnega mlečka slovenskega in tujega porekla	34
Preglednica 4: Primerjava rezultatov analiz slovenskega matičnega mlečka s tujimi raziskavami	44
Preglednica 5: Povprečne vrednosti analiziranih parametrov v matičnem mlečku glede na geografsko poreklo in rezultati t-testa	47
Preglednica 6: Rezultati analize glavnih komponent za vse analizirane parametre	48
Preglednica 7: Vrednosti komponente 1 in komponente 2 glede na analiziran parameter	48
Preglednica 8: Predlagano območje sestave svežega matičnega mlečka slovenskega porekla	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Matični mleček (levo) in matični mleček v matičnem lončku (desno) (Bogdanov, 2011).	3
Slika 2: Kemijska struktura 10-hidroksi-2-decenojske kisline (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012).	8
Slika 3: Princip delovanja sistema IRMS (Kelly, 2003: 163).	13
Slika 4: Linearna zveza med vsebnostjo vode, določeno s sušenjem (%Wvo) in refrakcijskim indeksom(RI) (Sesta in Lusco, 2008).	20
Slika 5: Umeritvena krivulja s standardnim dodatkom za določanje vsebnosti 10-HDA v matičnem mlečku	27
Slika 6: Vsebnost vode (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka	35
Slika 7: Vsebnost pepela (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka.....	36
Slika 8: Vrednost pH v vzorcih matičnega mlečka	37
Slika 9: Kislost (ml 0,1 M NaOH/g) vzorcev matičnega mlečka.....	38
Slika 10: Vsebnost beljakovin (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka	39
Slika 11: Vsebnost maščob (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka	40
Slika 12: Kromatogram vzorca matičnega mlečka.....	41
Slika 13: Vsebnost 10-HDA (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka	42
Slika 14: Vrednost $\delta^{13}\text{C}$ (‰) v vzorcih matičnega mlečka	43
Slika 15: Vrednost $\delta^{15}\text{N}$ (‰) v vzorcih matičnega mlečka	43
Slika 16: Zveza med vsebnostjo 10-HDA (g/100 g) in vsebnostjo maščob (g/100 g) v analiziranih vzorcih matičnega mlečka.....	45
Slika 17: Analizirani parametri predstavljeni v štirih kvadrantih	49
Slika 18: Razvrstitev posameznih vzorcev matičnega mlečka z metodo PCA	50
Slika 19: Razvrstitev posameznih vzorcev matičnega mlečka z metodo LDA.....	51

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

10-HDA	10-hidroksi-2-decenojska kislina
CE	kapilarna elektroforeza (angl. <i>Capillary Electrophoresis</i>)
CZE	kapilarna conska elektroforeza (angl. <i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
FAA	proste aminokisline (angl. <i>Free Amino Acids</i>)
g	gram
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IRMS	masna spektrometrija za analitiko stabilnih izotopov (angl. <i>Isotope Ratio Mass spectrometry</i>)
LDA	linearna diskriminantna analiza
MM	matični mleček
MRJP	glavni proteini matičnega mlečka (angl. <i>Major Royal Jelly Proteins</i>)
ml	mililiter
N	število vzorcev
PCA	metoda glavnih komponent (angl. <i>Principal Component Analysis</i>)
RJ	royal jelly
SD	standardni odklon
UHPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (angl. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
$\bar{x}$	aritmetična sredina
$x_{\max}$	največja vrednost
$x_{\min}$	najmanjša vrednost

1 UVOD

Prehrana je pomemben dejavnik v vzdrževanju dobrega zdravstvenega stanja organizma. K temu lahko pripomorejo tudi funkcionalna živila, ki ugodno vplivajo na človeka, lahko z izboljšanjem zdravstvenega stanja ali počutja ali pa z znižanjem tveganja za nastanek bolezni. V skupino funkcionalnih živil zaradi številnih pozitivnih lastnosti, kot so antibakterijsko, antioksidativno, protivnetno in antitumorsko delovanje, sodi tudi matični mleček. Biološka aktivnost matičnega mlečka je povezana z vsebnostjo bioaktivnih maščobnih kislin, proteinov in fenolnih spojin (Sabatini in sod., 2009). Poleg izjemnih bioloških lastnosti ima matični mleček tudi veliko tržno vrednost in se danes uporablja v mnogih sektorjih, tako v živilski kot farmacevtski industriji ter v kozmetičnem sektorju. Zaradi tega mnoge države, katerih proizvodnja ne zadosti potrebam po matičnem mlečku, le-tega uvažajo. Uradni podatki o velikosti trga matičnega mlečka zaenkrat še ne obstajajo, vendar pa lahko z gotovostjo trdimo, da je največji svetovni proizvajalec in izvoznik matičnega mlečka Kitajska, proizvodnja je tam ocenjena na 2000 ton/leto (Sabatini in sod., 2009).

Matični mleček je izloček žlez čebel dojilj in je izključno hrana matice ter ličink v začetnem stadiju. Je blede rumene barve in gosto tekoč, z ostrim vonjem in sladko-kislím okusom. Sestava matičnega mlečka je dokaj kompleksna. Kemijsko je sestavljen iz vode (60-70 %), beljakovin (12-15 %), ogljikovih hidratov (10-16 %), maščob (3-6 %) ter manjših količin mineralnih snovi, vitaminov in fenolnih spojin. Poznavanje sestave matičnega mlečka je bistveno za definiranje standardne sestave in oceno kakovosti ter kontrolo pristnosti (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012; Sabatini in sod., 2009).

Pomemben problem kakovosti matičnega mlečka predstavlja njegova potvorjenost z različnimi sladkorji C₄ rastlin (sladkorni trst) (Daniele in sod., 2011), medom, fruktoznim koruznim sirupom ter kvasom, kot virom beljakovin (Stocker in sod., 2006). Eden izmed parametrov kakovosti matičnega mlečka je vsebnost 10-hidroksi-2-decenojske kisline (10-HDA), ki je za matični mleček specifična in je ne najdemo v nobenem drugem naravnem proizvodu (Antinelli in sod., 2003).

Standardno sestavo in parametre kakovosti matičnega mlečka je do danes definiralo le 5 držav, in sicer Švica, Bolgarija, Brazilija, Urugvaj in Japonska. S standardizacijo matičnega mlečka se intenzivno ukvarja tudi Mednarodna komisija za med (angl. *International Honey Commission*) (Sabatini in sod., 2009). Poleg tega je bil v letih 2010 do 2013, v sklopu 7. okvirnega programa Evropske skupnosti, financiran triletni projekt Apifresh, katerega namen je bil razvoj evropskih standardov kakovosti za cvetni prah in matični mleček, določitev standardnih analitskih metod ter določitev standardne metodologije za nadzor potvorjenosti matičnega mlečka (Apifresh Project, 2010).

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bil določiti parametre kakovosti slovenskega matičnega mlečka. Analizirali smo vsebnost vode, vrednost pH, vsebnost prostih titrabilnih kislin, vsebnost maščob, vsebnost beljakovin in vsebnost 10-hidroksi-2-decenojske kisline ter določili izotopsko sestavo. Poznavanje sestave svežega matičnega mlečka je bistveno za definiranje standardne sestave in oceno kakovosti. V Sloveniji doslej raziskava o matičnem mlečku še ni bila izvedena, tako da kemijske lastnosti matičnega mlečka naše kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*) niso poznane. Zato smo želeli s študijo svežih vzorcev matičnega mlečka z različnih področij Slovenije karakterizirati slovenski matični mleček.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da bomo z analizo večjega števila vzorcev slovenskega matičnega mlečka lahko definirali standardno sestavo ter parametre kakovosti tega čebeljega pridelka.

Pričakujemo, da razlike v vrednostih analiziranih parametrov med posameznimi vzorci ne bodo statistično značilne.

Predvidevamo, da bodo rezultati raziskave omogočili izbor parametrov za določanje pristnosti matičnega mlečka in s tem kontrolo matičnega mlečka tujega porekla na slovenskem tržišču.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PRIDOBIVANJE MATIČNEGA MLEČKA

Matični mleček (MM) je izloček hipofaringealnih in mandibularnih žlez čebelj dojilj in je izključno hrana čebele matice (Zheng in sod., 2010). Je blede rumene barve in gosto tekoč, značilnega vonja in kiselkastega, rahlo pekočega in nekoliko sladkastega okusa. Matični mleček igra ključno vlogo v razvoju čebel matic (Wytrychowski in sod., 2013). Stocker in sod. (2006) so ugotovili, da ima MM v razvoju čebel podobno vlogo kot jo ima mleko pri sesalcih. Iz vseh jajčec se lahko razvije matica, vendar se to dejansko zgodi le v primeru, če so čebele skozi celoten stadij ličinke in posebej prve štiri dni, tretirane in hranjene kot matice (Märghitas in sod., 2010). Zaradi posebne prehrane se matice od čebel delavk ločijo v velikosti, proizvodnji jajčec in daljšem življenju (Wytrychowski in sod., 2013).

Matični mleček pridobivajo tako, da v umetne letvice z matičnimi nastavki, vcepijo en dan stare čebelje ličinke, z namenom da jih čebele dojilje preskrbijo z matičnim mlečkom (Chen in sod., 2002). Večina proizvajalcev matičnega mlečka le-tega pobere tri dni (72 ur) po cepitvi ličink (tradicionalna metoda pobiranja matičnega mlečka), ker je količina proizvedenega matičnega mlečka takrat največja (Lercker in sod., 1985 cit. po Zheng in sod., 2010).



Slika 1: Matični mleček (levo) in matični mleček v matičnem lončku (desno) (Bogdanov, 2011).

V zadnjih letih je na tržišču mogoče opaziti bolj “zgoden” matični mleček, pobran dva dni (48 ur) ali le en dan (24 ur) po cepitvi ličink, kar privede do skrajšanega časa produkcije, vendar do podobne količine matičnega mlečka kot pri tradicionalni metodi pobiranja. Ker je matični mleček v nastavku shranjen krajši čas in tako manj časa izpostavljen temperaturi in vlagi čebelnjaka, naj bi bil takšen matični mleček tudi bolj svež. Večina raziskav o sestavi matičnega mlečka je narejena na vzorcih matičnega mlečka, pridobljenih po tradicionalni metodi, zato ni veliko podatkov o kakovosti matičnega mlečka, pridelanega prej kot v 72 urah (Zheng in sod., 2010). Zheng in sod. (2010) navajajo tudi, da je sestava matičnega mlečka odvisna od časa njegovega pobiranja in je to potrebno upoštevati pri

definiranju standardov njegove kakovosti; optimalna kakovost matičnega mlečka naj bi bila dosežena prav 72 ur po cepitvi ličink.

2.2 SENZORIČNE LASTNOSTI IN SESTAVA MATIČNEGA MLEČKA

2.2.1 Senzorične lastnosti

Matični mleček je belkaste do blede rumene barve, gosto tekoč, pogosto nehomogen (zrnast, peskast) zaradi prisotnosti netopnih granul različnih velikosti. Ima značilen oster vonj in okus. Vonj je lahko po kislem, po čebeljem vosku, včasih neprijeten (po hlevu, po živalih). Okus je kisel, lahko nekoliko sladek, oster, pekoč. Je delno topen v vodi in ima nizko vrednost pH (3,4-4,5) (Sabatini in sod., 2009) ter gostoto 1,1 g/ml (Bogdanov, 2011). Senzorične lastnosti so pomemben kriterij kakovosti matičnega mlečka. Star matični mleček, ki ni pravilno skladiščen, je temnejše barve in lahko postane žarkega okusa (Bogdanov, 2011). Po pobiranju in ob stiku z zrakom postane matični mleček pri temperaturi 15 °C rumen, zaradi prisotnosti albumina, ki nastane med sušenjem (Olimpia in sod., 2008).

2.2.2 Makroskopska in mikroskopska sestava

Sestava matičnega mlečka je dokaj kompleksna. Različni avtorji podobno opisujejo matični mleček in njegovo sestavo. Sabatini in sod. (2009) navajajo, da matični mleček sestavljajo različni proteini, aminokisline, organske kisline, steroidi, estri, fenolne spojine, sladkorji, minerali, elementi v sledovih in druge snovi. Kemijsko je matični mleček sestavljen iz vode (60-70 %), beljakovin (9-18 %), ogljikovih hidratov (7-18 %), maščob (3-8 %) in mineralnih snovi (okoli 1,5 %) (preglednica 1).

Bíliková in sod. (2001) so matični mleček definirali kot svež, belo-rumen izloček čebel z vrednostjo pH med 3,6 in 4,2, večinoma sestavljen iz vode (60-70 %), beljakovin (12-15 %), ogljikovih hidratov (10-16 %), maščob (3-6 %) in sledi soli, vitaminov in prostih aminokislin. Navajajo še, da znatno količino matičnega mlečka, približno 35-50 % suhe snovi, predstavljajo beljakovine (Bíliková in sod., 2001).

Sestava matičnega mlečka je odvisna od sezonskih in okoljskih dejavnikov (Ramadan in Al-Ghamdi, 2011). Wongchai in Ratanavalachai (2002) poročata, da ima sezona največji vpliv na vsebnost ogljikovih hidratov in maščob, medtem ko vsebnost pepela in vrednost pH nista odvisna od sezonskih vplivov. Ramadan in Al-Ghamdi (2011) navajata, da je veliko variabilnost zaznati tudi pri vsebnosti sladkorjev. Do razlik pride zaradi različnega števila odvzetih vzorcev matičnega mlečka iz različnih krajev, časa pridelave, različnih metod odvzema vzorcev ter različnih analiznih metod (Ramadan in Al-Ghamdi, 2011). Poleg tega je matični mleček naravno nehomogena snov. Sabatini in sod. (2009) so z analizo vzorcev matičnega mlečka različnega geografskega porekla ugotovili, da ni

značilnih razlik v sestavi matičnega mlečka. Povprečna sestava matičnega mlečka je podana v preglednici 1.

Preglednica 1: Sestava svežega matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009)

Parameter	območje
vsebnost vode (g/100 g)	60-70
vsebnost maščob (g/100 g)	3-8
vsebnost 10-HDA (g/100 g)	>1,4
vsebnost beljakovin (g/100 g)	9-18
vsebnost fruktoze (g/100 g)	3-13
vsebnost glukoze (g/100 g)	4-8
vsebnost saharoze (g/100 g)	0,5-2,0
vsebnost pepela (g/100 g)	0,8-3,0
vrednost pH	3,4-4,5
kislost (ml 0,1 N NaOH/g)	3,0-6,0

2.2.3 Voda

Vsebnost vode v matičnem mlečku je pomemben parameter kakovosti in njena določitev je vedno del kontrole kakovosti matičnega mlečka. Poznamo več načinov določanja vsebnosti vode v matičnem mlečku. Med njimi so najpogostejši: Karl-Fischerjeva titracijska metoda, različne tehnike sušenja in določanje vsebnosti vode z refraktometrom. Slednja je zaradi enostavne uporabe in hitrosti zelo primerna (Sesta in Lusco, 2008).

Običajno svež matični mleček vsebuje nad 60 % vode in je kljub visoki a_w vrednosti, nad 0,92, mikrobiološko dokaj stabilen. V liofiliziranem matičnem mlečku je vsebnost vode znatno manjša, in sicer pod 5 g/100 g (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012). Konstantna vsebnost vode je zagotovljena že znotraj čebelnjaka z nenehno (kontinuirano) preskrbo s svežimi zalogami matičnega mlečka s strani čebel dojlj, naravno higroskopsnostjo matičnega mlečka ter prizadevanjem celotne kolonije čebel za ohranitev okoljske vlažnosti; variacije v vsebnosti vode lahko razloži netopnost nekaterih komponent v matičnem mlečku (Sabatini in sod., 2009).

Zheng in sod. (2010) navajajo, da je čas pobiranja matičnega mlečka pri oceni kakovosti le-tega zelo pomemben, saj vpliva na vsebnost vode v matičnem mlečku. Poročajo, da se vsebnost vode v matičnem mlečku s časom povečuje, najbolj med 24 in 48 urami po cepitvi ličink (Zheng in sod., 2010).

2.2.4 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati predstavljajo okoli 30 % suhe snovi matičnega mlečka. Glavna sladkorja sta, tako kot pri medu, monosaharida fruktoza in glukoza, ki skupaj predstavljata 90 %

vseh sladkorjev. Vedno je prisotna tudi saharoza, vendar v zelo variabilnih koncentracijah. V manjših koncentracijah so prisotni tudi določeni oligosaharidi (maltoza, erloza, isomaltoza), ki so lahko v nekaterih primerih primerni tudi za določanje pristnosti matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009). Intenzivno hranjenje čebel s sladkorji C₃ in C₄ rastlin ne privede do sprememb vsebnosti glavnih sladkorjev MM, kot sta glukoza in fruktoza, do razlik pride v vsebnostih drugih sladkorjev, ki so v matičnem mlečku prisotni v manjših količinah (saharoza, erloza in maltoza) (Daniele in Casablanca, 2012). Zato je vsebnost teh sladkorjev primernejša za določitev pristnosti matičnega mlečka.

Na vsebnost ogljikovih hidratov v matičnem mlečku vplivajo tudi klimatske razmere. Wongchai in Ratanavalachai (2002) sta preučevala vpliv le-teh na vzorce MM iz Tajske in ugotovila, da se je vsebnost ogljikovih hidratov povečala med vročim (april-junij) ter deževnim obdobjem (julij-avgust).

2.2.5 Pepel

Vsebnost pepela v svežem matičnem mlečku znaša od 0,8 do 3 % (Garcia-Amoedo in Almeida-Muradian, 2007). Glavni elementi so K, P, S, Na, Ca, Al, Mg, Zn, Fe, Cu in Mn. Vsebnost natrija v matičnem mlečku variira med 11 in 14 mg/100 g (Stocker in sod., 2006). Elementi, prisotni v matičnem mlečku, so posledica tako zunanjih dejavnikov (okolje, pridobivanje hrane, obdobje pridelave matičnega mlečka) kot notranjih dejavnikov (biološke lastnosti čebel) (Bärnuțiu in sod., 2011).

Različen čas pobiranja (sezonske razlike) ima vpliv na kemijsko sestavo matičnega mlečka, vendar na vsebnost pepela ne vpliva (Wongchai in Ratanavalachai, 2002). Stocker in sod. (2006) so ugotovili, da je koncentracija mineralov in elementov v sledovih v matičnem mlečku konstantna, zaradi homeostatskega uravnavanja s strani čebel dojilj.

2.2.6 Beljakovine

Beljakovine predstavljajo približno 50 % suhe snovi matičnega mlečka (Šimúth, 2001). Proteinska frakcija vsebuje številne pomembne komponente in biološko aktivne snovi (Bärnuțiu in sod., 2011). Več kot 80 % beljakovin matičnega mlečka je topnih proteinov, t.i. glavnih proteinov matičnega mlečka (MRJP - angl. *Major Royal Jelly Proteins*) (Šimúth, 2001). MRJP naj bi bili izmed vseh sestavin MM najbolj pomembni za razvoj čebele matice, saj vključujejo številne esencialne aminokisline (Schmitzova in sod., 1998). Čebele izločajo na stotine proteinov, predvsem iz hipofaringealnih in mandibularnih žlez ter žlez slinavk. Čebela matica, ki je hranjena z matičnim mlečkom, živi 4-5 let, medtem ko čebele delavke živijo le 3-4 tedne. Za ta fenomen naj bi bili zaslužni predvsem proteini MM (Šimúth in sod., 2003). Poleg glavnih proteinov matični mleček vsebuje tudi manjše proteine, vključno z antimikrobnimi peptidi (peptidnimi antibiotiki). Ti bioaktivni peptidi

lahko po zaužitju v telesu delujejo kot regulatorne snovi s podobno aktivnostjo kot hormoni (Bärnujiu in sod., 2011).

Proste aminokisline predstavljajo samo 0,6 do 1,5 % beljakovin, od katerih je večina L-aminokislin (Sabatini in sod., 2009). Aminokisline, ki jih je v matičnem mlečku največ, so prolin, lizin, glutaminska kislina, β -alanin, fenilalanin, aspartat in serin. Po skladiščenju matičnega mlečka (4 °C, 10 mesecev) ni bilo značilnih razlik v vsebnosti aminokislin, medtem ko se je vsebnost prolina in lizina povečala pri skladiščenju pri sobni temperaturi (Boselli in sod., 2003).

2.2.7 Vrednost pH in vsebnost kislin v matičnem mlečku

Matični mleček ima nizko vrednost pH (od 3,6 do 4,2) (Šimúth in sod., 2003). Scarselli (2005) navaja, da je matični mleček rumeno-bel proizvod s pH med 3,6 in 4,2. Olimpia in sod. (2008) pa navajajo malo višjo vrednost pH matičnega mlečka in sicer od 4 do 5, ki se med procesom liofilizacije ne spremeni in ostane relativno konstantna.

Kislost se med skladiščenjem matičnega mlečka poveča (Chen in Chen, 1995), Zheng in sod. (2010) pa opazajo značilen padec kislosti v obdobju treh dni po cepitvi. Kislost matičnega mlečka variira med 3 in 6 ml 0,1 M NaOH/g v svežem matičnem mlečku in 9 do 15 ml 0,1 M NaOH/g v liofiliziranem matičnem mlečku (Olimpia in sod., 2008).

2.2.8 Maščobe

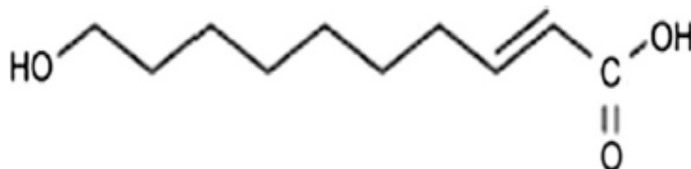
Svež matični mleček vsebuje 3-8 g maščob/100 g, medtem ko znaša vsebnost maščob v liofiliziranem MM približno 15-30 g/100 g. V največji meri maščobno frakcijo matičnega mlečka predstavljajo maščobne kisline (80-90 %), ostalo so voski (5-6 %), steroidi (3-4 %) in fosfolipidi (0,4-0,8 %) (Bogdanov, 2011; Sabatini in sod., 2009; Ramadan in Al-Ghamdi, 2012).

Maščobne kisline matičnega mlečka so večinoma kratkoverižne mono- in dihidroksi maščobne kisline z 8-10 ogljikovimi atomi ali dikarboksilne kisline, v nasprotju z maščobnimi kislinami s 14-20 ogljikovimi atomi, ki jih običajno vsebujejo živila živalskega in rastlinskega izvora (Sesta, 2006).

Maščobe so najpomembnejša komponenta matičnega mlečka pri določitvi avtentičnosti oziroma potvorjenosti le-tega, saj nekaterih maščobnih kislin, ki jih MM vsebuje, ne najdemo v nobenem drugem naravnem proizvodu. Kvalitativna in kvantitativna analiza maščobne frakcije prav tako omogoča določitev količine dodanega matičnega mlečka v drugih proizvodih (Mărghitaş in sod., 2010).

2.2.8.1 10-hidroksi-2-decenojska kislina

Maščobno-kislinska frakcija je sestavljena iz različnih maščobnih kislin, med katerimi je tudi trans-10-hidroksi-2-decenojska kislina (10-HDA), ki je za matični mleček značilna in jo je v matičnem mlečku največ (32 % vseh maščobnih kislin) (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012). Kemijska struktura omenjene kisline je predstavljena na sliki 2.



Slika 2: Kemijska struktura 10-hidroksi-2-decenojske kisline (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012).

10-HDA je značilna samo za matični mleček, zato je vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku pomemben kriterij njegove pristnosti (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012). Vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku je odvisna od njegovega izvora (Genç in Aslan, 1999; Ferioli in sod., 2007) in lastnosti čebel (Genç in Aslan, 1999).

V nekaterih državah je vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku tudi zakonsko predpisana. Tajska zakonodaja določa 1,5 g/100 g kot minimalno vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku, za izdelke, ki vsebujejo matični mleček, pa je minimalna vsebnost manjša in sicer znaša 0,16 g/100 g izdelka. V Turčiji se ta vrednost le malo razlikuje, in sicer mora matični mleček vsebovati vsaj 1,4 g 10-HDA/100 g, da ga lahko označimo kot pristnega. Predpisana vsebnost te kisline v izdelkih, ki vsebujejo matični mleček je enaka kot v tajski zakonodaji (vsaj 0,16 g 10-HDA/100 g izdelka z matičnim mlečkom) (Genç in Aslan, 1999). Kitajska zakonodaja določa minimalno vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku 1,4 g/100 g in 4,2 g/100 g liofiliziranega matičnega mlečka (Zhou in sod., 2007). V Koreji pa vsebnost 10-HDA v svežem matičnem mlečku ne sme biti manjša od 1,6 g/100 g, v liofiliziranem matičnem mlečku ne manjša od 4,0 g/100 g, medtem ko v proizvodih z dodanim matičnim mlečkom ne sme biti manjša od 0,56 g/100 g (Kim in sod., 1989).

Antinelli in sod. (2003) so proučevali vsebnost 10-HDA kot potencialen parameter svežosti matičnega mlečka. Matični mleček, ki vsebuje vsaj 1,8 g/100 g 10-HDA, se smatra za svežega in pristnega, vendar razlike v vsebnosti 10-HDA glede na pogoje skladiščenja (čas in temperatura skladiščenja) niso dobro raziskane. Matični mleček se smatra kot svež, če je star manj kot tri mesece. Vsebnost 10-HDA pada z naraščajočo temperaturo skladiščenja, vendar povezava med vsebnostjo te kisline in časom skladiščenja, ne glede na temperaturo, ni bila dokazana. Nizke temperature upočasnijo razgradnjo 10-HDA med skladiščenjem matičnega mlečka, zato omenjenega parametra ne moremo uporabiti kot parameter svežosti tega produkta (Atinelli in sod., 2003).

10-HDA ima antitumorsko (Oršolič, 2013) in antibakterijsko delovanje (Bíliková in sod., 2001) in je le ena izmed bioloških učinkovin matičnega mlečka. Liu in sod. (2008) navajajo, da je vsebnost 10-HDA v vzorcih matičnega mlečka največja 24 ur po pobiranju 2-3 dni starih ličink. Matični mleček pridelan 24 ur po cepitvi ličink ima zato večjo biološko aktivnost (tudi zaradi takrat največje vsebnosti polifenolnih spojin, ki so zelo biološko aktivne).

2.2.8.2 Določanje 10-HDA v matičnem mlečku

Za določanje vsebnosti 10-HDA v matičnem mlečku se lahko uporabljajo različne separacijske metode. Ferioli in sod. (2007) so vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku določili s kapilarno consko elektroforezo (CZE) in rezultate primerjali z vsebnostjo 10-HDA, določeno s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Kapilarna elektroforeza (CE) je separacijska analizna metoda, pri kateri se komponente vzorca ločijo zaradi različne hitrosti potovanja v kapilari pod vplivom električnega polja. Pri CZE metodi se molekule ločujejo na podlagi mobilnosti električno nabitih delcev v električnem polju. Občutljivost in čas analize ter učinkovitost sta med omenjenima metodama primerljiva. Zaradi dobre ponovljivosti ter majhne porabe topila je CZE metoda primerna kot alternativna metoda HPLC (Ferioli in sod., 2007). Zhou in sod. (2007) so pokazali, da je tudi tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (UHPLC) za določanje vsebnosti 10-HDA v MM primerna kot alternativa HPLC metodi, saj je hitrejša, učinkovitejša in omogoča manjšo porabo topila. Lercker in sod. (1981) so vsebnost 10-HDA v MM določili s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masnim spektrometrom (GC-MS). Pred analizo je potrebno maščobne kisline iz vzorca najprej ekstrahirati ter pretvoriti v hlapne komponente. Med ekstrakcijo maščobnih kislin lahko pride do oblikovanja stabilnih emulzij, posebno če je vzorec viskozen, kar lahko povzroči izgubo 10-HDA (Genç in Aslan, 1999).

Ena izmed najbolj pogosto uporabljenih metod za določanje vsebnosti 10-HDA v matičnem mlečku je metoda HPLC, ki spada med kromatografske metode, s katerimi ločujemo snovi na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave, velikosti molekul in biološke afinitete (Kregar, 1996). Kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze, zaradi selektivnega zadrževanja (retenzije) komponent na stacionarni fazi. Komponente se porazdelijo med topilom (mobilno fazo) in nosilcem (stacionarno fazo). Porazdelitev komponent se ponavlja vzdolž kolone in končno se komponente ločeno eluirajo iz kolone, kjer jih zaznamo z detektorji, kot je masni spektrometer (Žorž, 1991). HPLC metoda je zelo učinkovita, ima visoko stopnjo ločljivosti, je hitra in primerna tudi za določanje zelo majhnih vsebnosti analiziranih komponent (Kregar, 1996). Genç in Aslan (1999) sta na podlagi rezultatov določanja vsebnosti 10-HDA z metodo HPLC zaključila, da je omenjena metoda hitra in natančna za določanje vsebnosti omenjenega parametra.

Sesta (2006) je določil vsebnost 10-HDA in nekaterih drugih maščobnih kislin v matičnem mlečku s HPLC metodo, sklopljeno z masnim spektrometrom (HPLC-MS). Masni spektrometer je inštrument, kjer v plinski fazi nastanejo molekularni ioni spojin, ki jih aparat nato loči glede na razmerje masa/naboj (m/z) (Savarese in sod., 2007). Sesta (2006) je določil povprečno vsebnost 10-HDA v svežem matičnem mlečku 1,97 g/100 g, kar je v skladu s standardi kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009), ki določajo, da mora svež matični mleček vsebovati vsaj 1,4 g 10-HDA /100 g. Masna spektrometrija se je izkazala kot primerna metoda za določanje maščobne frakcije v matičnega mlečku in posledično njegove pristnosti. HPLC-MS je v primerjavi s klasično plinsko kromatografijo bolj enostavna, varnejša in bolj specifična (Sesta, 2006).

2.2.9 Stabilni izotopi

Izotopi so atomi kemijskega elementa z enakim vrstnim številom in različnim masnim številom (Lazarini in Brenčič, 1992). Stabilni izotopi so tisti izotopi elementa, ki ne razpadejo tekom radioaktivnih procesov. Mnogi elementi sestojijo iz več stabilnih izotopov. Na primer vodik obstaja v obliki dveh stabilnih izotopov, ^1H in ^2H (devterij), ogljik prav tako v obliki dveh, ^{12}C in ^{13}C , kisik pa v obliki treh, in sicer ^{16}O , ^{17}O in ^{18}O (Ghidini in sod., 2006).

V literaturi zasledimo podatke o določanju različnih stabilnih izotopov v živilih. Najbolj pogosto omenjeno je določanje razmerja ogljikovih stabilnih izotopov ^{13}C in ^{12}C ($\delta^{13}\text{C}$), sledi razmerje dušikovih izotopov ^{15}N in ^{14}N ($\delta^{15}\text{N}$), razmerje med devterijem in vodikom ($^2\text{H}/^1\text{H} - \delta\text{D}$), razmerje med kisikovima izotopoma ^{18}O in ^{16}O ($\delta^{18}\text{O}$) in razmerje med izotopi žvepla ^{34}S in ^{32}S ($\delta^{34}\text{S}$) (Rapisarda in sod., 2010).

Izotopsko sestavo oziroma razmerje med deležem težjega in lažjega izotopa v spojini izražamo z vrednostjo δ , ki pomeni relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st), in jo izražamo v promilih (‰):

$$\delta_X = \frac{R_{\text{vz}} - R_{\text{st}}}{R_{\text{st}}} \times 1000 \quad \dots (1)$$

V enačbi pomeni X težji izotop določenega elementa (^{13}C , ^{15}N), vrednost R pa je razmerje med izotopi ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), in jo podajamo kot razmerje med težjim in lažjim izotopom v vzorcu in standardu. Mednarodne standarde sta določila Mednarodna agencija za atomsko energijo na Dunaju (IAEA) in Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo iz ZDA (NIST) (Craig, 1957). Standardi so izbrani tako, da so izotopska razmerja čim bolj podobna povprečni razširjenosti določenega izotopa v naravi (Engel in Macko, 1993). Delta (δ) vrednost vsakega standarda je definirana z vrednostjo 0 ‰. Pozitivne vrednosti pomenijo, da vsebuje vzorec več težkega izotopa kot standard, negativne pa, da ga je manj.

(Craig, 1957). Za ogljik je privzet standard PDB (Pee Dee Belemnite) z vrednostjo $R_{st} = 0,0112372$, za dušik pa atmosferski zrak (AIR) in ima vrednost $R_{st} = 0,0036765$ (Ghidini in sod., 2006).

2.2.9.1 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov ^{12}C in ^{13}C

Primarna rezervoarja ogljika v naravi sta HCO_3^- v hidrosferi in CO_2 v atmosferi. V morskih vodah se nahaja velika količina ogljika, ki omogoča nadzor izotopskega razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ preko različnih ravnotežnih reakcij, v katerih je udeležen tudi atmosferski CO_2 . Rezultat izotopske frakcionacije je, da je razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v večini bioloških sistemov v primerjavi z morji vedno občutno nižje (Bréas in sod., 1994).

Razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pri ogljikovem dioksidu, ki nastane iz organskih materialov (v našem primeru nektar in cvetni prah) je lahko precej drugačno od razmerja pri mineralnih karbonatih in atmosferskem CO_2 . Do razlik pride zaradi izotopske frakcionacije med fotosintezo pri višjih rastlinah, kjer določeni encimi raje vežejo $^{13}\text{CO}_2$. Produkti iz rastlin s C_4 ciklom so praviloma znatno bogatejši s težjimi izotopi glede na produkte rastlin s C_3 ciklom (Calvinovim ciklom). Te razlike so dovolj velike, da lahko na njihovi osnovi določimo botanično poreklo omenjenih spojin, kar omogoča potrjevanje avtentičnosti končnih izdelkov. Primarni encim, odgovoren za fiksacijo anorganskega ogljika je ribuloza 1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO), ki močno diskriminira težji izotop ^{13}C , zato imajo C_3 rastline (v C_3 rastlinah je RuBisCO edini encim, ki veže CO_2) bolj negativno izotopsko sestavo. Izotopska frakcionacija fotosintetskega ogljika združuje izotopski efekt med difuzijo CO_2 v rastlino (celico) in kombiniran izotopski efekt, ki poteka med fiksacijo CO_2 z RuBisCO-m in fosfoenolpiruvat (PEP) karboksilazo (Guček in sod., 1998).

V Calvinovem ali C_3 ciklu se atmosferski CO_2 takoj po vstopu v kloroplast veže na akceptor, to je na ribulozo-1,5-difosfat. V omenjeni reakciji nastane vmesni produkt s šestimi C-atomi, ki hitro razpade v dve molekuli 3-fosfoglicerata. Ta snov ima tri C-atome, zato se ta pot imenuje C_3 cikel. V omenjenem ciklu encim RuBisCO kaže nagnjenost k manjši vezavi $^{13}\text{CO}_2$ (Boyer, 2005). C_3 rastline imajo zato vrednost $\delta^{13}\text{C}$ med -28 in -23 ‰ (Gonzalez-Martin in sod., 1997).

C_4 cikel ali Hatch-Slackov cikel je posebna oblika fotosinteze, ki poteka v listih predvsem tropskih trav, kot sta sladkorni trs in koruza (Dermastia, 2007). Rastline, ki uporabljajo C_4 pot fotosinteze imajo alternativni encim, fosfoenolpiruvat karboksilazo (PEP karboksilaza) za prvi korak fiksacije CO_2 . Izotopski efekt, povezan s tem encimom (2,2 ‰) je veliko manjši od efekta RuBisCO, zato imajo C_4 rastline v primerjavi s C_3 rastlinami bolj pozitivno izotopsko sestavo v obsegu od -8 ‰ do -18 ‰, povprečno -11 ‰ (Engel in Macko, 1993).

CAM (Crassulacean acid metabolism) rastline lahko uporabljajo oba cikla vezave CO_2 , C_3 in C_4 cikel, zato vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ variirajo med -10 in -34 ‰ (Muccio in Jackson, 2008). To

jim omogoča, da časovno ločijo pridobivanje in konvertiranje CO₂ iz zraka in ter njegovo nadaljnjo porabo v C₃ ciklu. CO₂ ponoči vstopa v liste, kjer se v vakuolah veže z fosfoenolpiruvatom, pri čemer nastane oksalocetna kislina. Le ta se reducira in nastane jabolčna kislina, ki se akumulira v vakuolah listnih celic. Podnevi, ko so listne reže zaprte, se malat transportira v citosol in nato v kloroplast, kjer se dekarboksilira. Nastaneta piruvat in CO₂, ki nato vstopi v C₃ cikel (Uno in sod., 2001).

Poznavanje geografskega porekla (izvora) je nujno za sledljivost določenega proizvoda in določitev njegove pristnosti. Z analizo stabilnih izotopov lahko določimo geografsko poreklo različnih živil (Ghidini in sod., 2006). Wytrychowski in sod. (2013) so z analizo glavnih komponent pokazali, da je vrednost $\delta^{13}\text{C}$ uporaben parameter za ločevanje vzorcev matičnega mlečka glede na geografsko poreklo. Stocker in sod. (2006) so v svoji raziskavi pokazali, da je analitika stabilnih izotopov primerna tudi za ugotavljanje potvorjenosti matičnega mlečka bodisi kot samostojna metoda ali skupaj z določitvijo vsebnosti nekaterih sladkorjev v matičnem mlečku. Potvorjenost matičnega mlečka z analitiko stabilnih izotopov je bila dokazana s strani številnih avtorjev (Stocker in sod., 2006, Daniele in sod., 2011, Daniele in Casabianca, 2012, Wytrychowski in Daniele, 2012, Wytrychowski in sod., 2013). Ker ni veliko podatkov o izotopski sestavi matičnega mlečka, so Daniele in sod. (2011) s svojo raziskavo določili zanesljivo bazo podatkov za vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ pristnih vzorcev matičnega mlečka.

Na razmerje stabilnih izotopov poleg botaničnega izvora vplivajo tudi klimatske razmere (Stocker in sod., 2006). Najnižje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ (ca. -27 do -25 ‰) so imeli vzorci matičnega mlečka vlažnega in hladnega podnebja. Višje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ pa so imeli mnogi komercialno dostopni vzorci (predvsem azijskega porekla), kot posledica subtropskega in tropskega podnebja. Majhna količina padavin in visoke poletne temperature kontinentalnega podnebja vplivajo na metabolno pot rastlin (vodni stres, ki ga povzroči pomanjkanje padavin, se odraža v manjši frakcionaciji stabilnega ogljikovega izotopa in posledično večji vsebnosti ^{13}C (Stocker in sod., 2006). Na frakcionacijo stabilnih izotopov vplivajo tudi okoljski dejavniki, kot so temperatura, padavine, količina sončne svetlobe, in sicer lahko vplivajo na kinetične procese kot je na primer difuzija CO₂ skozi liste rastlin (Muccio in Jackson, 2008).

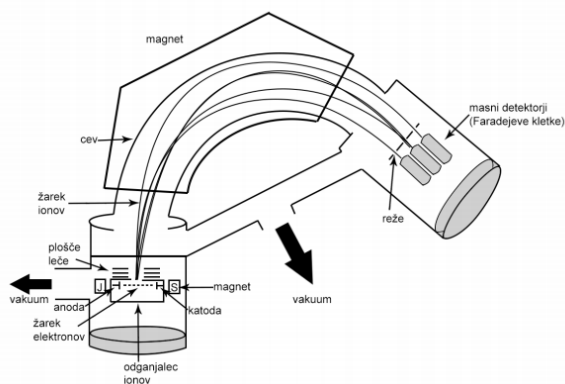
2.2.9.2 Vplivi na porazdelitev stabilnih izotopov ^{14}N in ^{15}N

Izotopsko razmerje dušika v živalih narašča znotraj prehranjevalne verige (DeNiro in Epstein, 1981), plenilec ima za 3 ‰ višje razmerje $\delta^{15}\text{N}$ kot njegov plen (Ghidini in sod., 2006). To se odraža tudi na živalskih produktih kot so mleko pri kravah (Kornexl in sod., 1997) in matični mleček pri čebelah (Stocker in sod., 2006). V obeh primerih so raziskovalci potrdili odvisnost lastnosti produkta od vrste prehrane živali.

Vpliv botaničnega porekla (v primeru matičnega mlečka poreklo nektarja in cvetnega prahu) je večji na dušikove kot na ogljikove izotope. Poleg tega imajo v vročih in suhih pokrajinah rastline iste skupine, višje vrednosti ^{15}N , kot v vlažnih in hladnih območjih (Stocker in sod., 2006). Prav tako na dušikove izotope vpliva čas pobiranja matičnega mlečka (višja vrednost $\delta^{15}\text{N}$ na začetku obdobja rasti), vrsta kmetijstva (nižje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v območjih z ekstenzivnim kmetijstvom). Vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v rastlinah je odvisna tudi od zemlje, kjer rastline rastejo, saj lahko uporaba gnojil in kroženje dušika vplivajo na razmerje N izotopov v zemlji (Werner in Schmidt, 2002). Uporaba sintetičnih gnojil lahko vpliva na vrednosti $\delta^{15}\text{N}$, saj imajo sintetična gnojila nižje $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti od organskih (Bateman in sod., 2007).

2.2.9.3 Analiza stabilnih izotopov z metodo IRMS

Izotopsko sestavo lahkih izotopov merimo z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov (IRMS- angl. *Isotope Ratio Mass Spectrometry*). To je naprava, v kateri najprej ioniziramo delce (atome, molekule ali fragmente molekul), nato pa snop takih delcev v električnem polju pospešimo ter v magnetnem polju odklonimo. Odklon je odvisen od razmerja med maso delca in nabojem (m/z). Iz odklona, ki ga merimo, sklepamo na vrsto delca ali na masno število izotopa. Natančnost meritev se izboljša, ker vzorec primerjamo s standardom, ki ima natančno znano izotopsko sestavo. V masni spektrometer uvajamo vzorec vedno v obliki plina, zato imamo za določanje razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ v trdnih in tekočih vzorcih različne preparacijske sisteme. Masni spektrometer je povezan z elementnim analizatorjem, kjer vzorec v toku čistega kisika sežgemo, nastalo plinsko mešanico pa ločimo na kromatografski koloni in plin CO_2 ali N_2 uvajamo z metodo, ki se izogne kakršnikoli izotopski frakcionaciji in omogoča zbiranje plina brez vsakršnih izgub. Pri določanju vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ moramo vse, v procesu izogrevanja nastale produkte dušika (NO , NO_2 ...), reducirati do N_2 , saj samo to obliko dušika uvajamo v ionski izvor (Kelly, 2003). Princip delovanja sistema IRMS je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Princip delovanja sistema IRMS (Kelly, 2003: 163).

2.3 KAKOVOST MATIČNEGA MLEČKA

Poznavanje kemijske sestave matičnega mlečka in sprememb, ki nastanejo med skladiščenjem tega proizvoda, je bistveno za oceno njegove kakovosti.

Do danes še nimamo referenčnih metod za analize matičnega mlečka. Trenutno poteka določeno mednarodno sodelovanje v okviru Mednarodne organizacije za standardizacijo (ISO) za vzpostavitev mednarodnega standarda za definicijo, fizikalno-kemijske parametre in kakovost matičnega mlečka. Določitev standardne sestave matičnega mlečka je pomembna za kontrolo trga ter za zaščito potrošnika (Daniele in Casabianca, 2012).

Najpogosteje uporabljeni kriteriji kakovosti in pristnosti matičnega mlečka so sestava sladkorjev, vsebnost vode, vsebnost beljakovin ter vsebnost 10-hidroksi-2-decenojske kisline (10-HDA). Vendar pa sta vsebnost beljakovin in vode v MM prevelika, da bi bila dober pokazatelj njegovega izvora (Wytrychowski in sod., 2013). 10-HDA, maščobna kislina, specifična samo za matični mleček, se zato smatra za glavni parameter svežosti, kakovosti in avtentičnosti matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009).

Pomemben kriterij kakovosti matičnega mlečka so tudi senzorične lastnosti. Po pobiranju, ob stiku z zrakom in pri temperaturi 15 °C postane matični mleček temnejše, rumene barve zaradi prisotnosti albumina, ki nastane med sušenjem (Bärnuțiu in sod., 2011; Olimpia in sod., 2008). Star matični mleček, ki ni bil primerno skladiščen, postane temnejše barve, saj po nekaj tednih skladiščenja pri sobni temperaturi pride do reakcije porjavenja (Chen in Chen, 1995), razvije pa se lahko tudi žarek okus.

2.3.1 Svežost matičnega mlečka

Poleg nekaterih kemijskih parametrov je pomemben kriterij kakovosti matičnega mlečka tudi njegova svežost. Če ni skladiščen pravilno, se matični mleček lahko pokvari in izgubi svojo kakovost (Bogdanov, 2011). Star, neprimerno shranjen matični mleček postane rjave barve in ima žarek okus (Ramadan in Al-Ghamdi, 2011). Takoj po obiranju je matični mleček potrebno shraniti v temnem prostoru pri temperaturi 0-5 °C. Pri takih pogojih ohrani svojo kakovost približno šest mesecev. Če je matični mleček shranjen pri višjih temperaturah, kot sta sobna temperatura ali temperatura hladilnika (5 °C), postane bolj viskozen. Viskoznost je odvisna predvsem od starosti matičnega mlečka, vsebnost vode in temperature skladiščenja. Povečana viskoznost je posledica v vodi netopnih dušikovih spojin, njihova vsebnost pa se poveča zaradi aktivnosti encimov in interakcije med maščobno in beljakovinsko frakcijo (Ramadan in Al-Ghamdi, 2011).

Li in sod. (2007) navajajo, da samo skladiščenje matičnega mlečka v zmrznjeni obliki prepreči razgradnjo biološko aktivnih proteinov, zato naj bi bil matični mleček takoj po obiranju shranjen pri temperaturi -18°C ali liofiliziran. Takšen proces sušenja najbolje ohrani prvotne karakteristike matičnega mlečka; ohranijo se hlapne komponente, termolabilne komponente pa se ne poškodujejo (Bogdanov, 2011). Da zmrzovanje matičnega mlečka podaljša njegovo obstojnost navaja tudi Bogdanov (2011), in sicer ga v zmrznjeni obliki lahko skladiščimo 2-3 leta, brez izgube kakovosti.

Čeprav je makroskopska sestava matičnega mlečka dokaj stabilna, njegova sestava ni primeren kriterij za ugotavljanje njegove svežosti, saj vsebnost posameznih komponent lahko variira (Sabatini in sod., 2009). Različni avtorji navajajo različne parametre svežosti. Eden izmed parametrov svežosti matičnega mlečka bi lahko bila določitev encima glukoza-oksidadaza, saj na njegovo aktivnost vplivata tako temperatura kot čas skladiščenja (Boselli in sod., 2002). Pri višji temperaturi (20°C) in po 30 dneh skladiščenja, se aktivnost encima znatno zmanjša, po enem letu skladiščenja pride do popolne deaktivacije encima, manjšo aktivnost encima pa je lahko opaziti tudi pri skladiščenju pri 4°C (Boselli in sod., 2002).

Marconi in sod. (2002) ugotavljajo, da je za določanje svežosti in kakovosti matičnega mlečka primerno tudi določanje vsebnosti furozina, ki je produkt Maillardove reakcije. Vsebnost furozina je v svežem matičnem mlečku zelo nizka, od 0 do 10 mg/100 mg beljakovin (Messia in sod., 2003), vendar s časom narašča v odvisnosti od temperature (Sabatini in sod., 2009). Reakcijo spodbujajo visoke temperature, vendar pa tudi nizke temperature v daljšem časovnem obdobju lahko sprožijo začetno stopnjo procesa porjavenja, zato je določitev vsebnosti furozina lahko dober parameter svežosti izdelkov, hranjenih na sobni temperaturi (Marconi in sod., 2002).

Kot potencialni parameter svežosti matičnega mlečka Boselli in sod. (2003) navajajo vsebnosti prostih aminokislin (FAA) in spremembe v njihovi koncentraciji med skladiščenjem. Poročajo, da je vsebnost prostih aminokislin med skladiščenjem pri 4°C konstantna zaradi upočasnjene encimske aktivnosti in Maillardove reakcije pri teh pogojih. Nasprotno se med skladiščenjem pri sobni temperaturi vsebnost prostih aminokislin najprej poveča (po treh mesecih), nato pa je razgradnja prostih aminokislin večja kot njihova tvorba, z izjemo prolina, lizina in β -alanina. Ker se v procesu Maillardove reakcije proste aminokisline razgradijo, so raziskovalci zaključili, da njihova določitev ni primeren parameter za oceno kakovosti matičnega mlečka (Boselli in sod., 2003).

2.3.2 Potvorjenost matičnega mlečka

Pridelava matičnega mlečka je zelo zamudna in draga, zato prihaja tudi to potvorb tega čebeljega pridelka, katere predstavljajo resen problem kakovosti matičnega mlečka. Zaradi

vse večjega povpraševanja po matičnem mlečku, je zelo razširjena uporaba nizko cenovnih sirupov in/ali beljakovin za povečanje proizvodnje matičnega mlečka in zmanjšanje stroškov. Potvrjenost matičnega mlečka s fruktoznim koruznim sirupom in biotehnoško proizvedenim kvasnim prahom kot virom proteinov je že bila ugotovljena (Stocker in sod., 2006; Daniele in sod., 2011). Matičnemu mlečku mnogokrat dodajajo tudi koruzni škrob, jogurt, jajčni beljak, kondenzirano mleko z dodatkom propolisa, nezrele banane in vodo (Garcia-Amoedo in Almeida-Muradian, 2007). Matični mleček lahko vsebuje tudi primesi meda, kar povzroči višje vrednosti sladkorjev ter nižje vrednosti ostalih kemijskih parametrov (Ramadan in Al-Ghamdi, 2011). V svoji raziskavi sta Garcia-Amoedo in Almeida-Muradian (2007) dokazala potvrjenost matičnega mlečka z več kot 25 % jogurta, jajčnim beljakom, vodo in koruznim škrobom. Analizirani vzorci so imeli večjo vsebnost vode ter manjšo vsebnost maščob, beljakovin in 10-HDA. Za ugotovitev morebitne potvrjenosti matičnega mlečka se poleg osnovnih kemijskih parametrov, uporablja tudi določitev kompleksnih sladkorjev (Šimúth in sod., 2011) ter analitika stabilnih izotopov, zlasti določanje izotopov ogljika (Daniele in sod., 2011).

2.3.3 Ugotavljanje potvrjenosti matičnega mlečka z metodo IRMS

Pristen matični mleček nastane s pretvorbo nektarja in cvetnega prahu, ki ga čebele naberejo na paši, in posledično odraža okolje panjev. Da lahko kontroliramo pristnost matičnega mlečka, je zelo pomembno, da vemo, ali so čebele bile dodatno hranjene s sladkorji (največkrat je to sladkor, proizveden iz sladkornega trsa in koruzni sirup).

IRMS metoda je posebna tehnika, ki nam poda informacijo o geografskem, kemijskem in biološkem poreklu določenega vzorca (Muccio in Jackson, 2008). Analitika stabilnih izotopov (IRMS) se je že izkazala za uspešno pri ugotavljanju potvrjenosti in izvora medu. Stocker in sod. (2006) so z analizo stabilnih izotopov $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v matičnem mlečku ugotovili, da je s tema parametroma možno dokazati potvrjenost matičnega mlečka z neustreznim hranjenjem čebel, uporabo koruznega sirupa z visokim deležem fruktoze kot vira sladkorja in uporabo suhega kvasa kot vira dušika v hrani čebel. V naravnem matičnem mlečku so vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ variirale v območju med -26,7 in -24,9 ‰, vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ pa med -1,1 in 5,8 ‰ (Stocker in sod., 2009).

Daniele in sod. (2011) so določili širše območje pristnosti matičnega mlečka, pridobljenega po tradicionalni metodi čebelarjenja (brez hranjenja čebel), v primerjavi z območjem pristnosti, ki so ga določili Stocker in sod. (2006) in sicer so vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ variirale med -22,48 in -27,90 ‰. Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ pa so variirale med -1,58 do 7,98 ‰, odvisno od botaničnega izvora nektarja in cvetnega prahu. Proučevali so tudi vpliv hranjenja čebel s C_3 in C_4 rastlinami, kot virom sladkorja na izotopsko razmerje ogljika in dušika v komercialnih vzorcih matičnega mlečka (v glavnem azijskega porekla). Ugotovili so, da je večina komercialno dostopnega matičnega mlečka proizvedena z intenzivnim

hranjenjem čebel s sladkorji C_4 rastlin. $\delta^{13}C$ vrednosti vzorcev matičnega mlečka, proizvedenega s hranjenjem čebel s sladkorji C_4 rastlin, so bile znatno višje, medtem ko so vzorci MM čebel, hranjenih s C_3 sladkorji in medom, bili določeni kot pristni.

Da IRMS metoda ni primerna za detekcijo C_3 sladkorjev so pokazali tudi Wytrychowski in sod. (2013). Daniele in Casabianca (2012) poročata, da so nekateri sladkorji, ki so v MM prisotni v manjših količinah, dober pokazatelj C_3 sladkorjev in je njihova kvantitativna določitev dober pokazatelj potvorjenosti matičnega mlečka. Hranjenje čebel s C_4 oziroma C_3 sladkorji namreč povzroči večjo vsebnost saharoze in erloze oziroma maltoze in maltotrioze. Wytrychowski in sod. (2013) so šli še korak dlje in uporabili kombinacijo IRMS metode in kvantitativne določitve sladkorjev za detekcijo dodanih sladkorjev v matičnem mlečku. Ker IRMS metoda ni primerna za detekcijo C_3 sladkorjev ($\delta^{13}C$ vrednosti C_3 rastlin ne dajo uporabne informacije o uporabi teh sladkorjev), je nujna še detekcija maltoze in maltotrioze, katerih vsebnost v matičnem mlečku naraste ob uporabi C_3 rastlin (Wytrychowski in sod., 2013).

2.4 FUNKCIONALNE LASTNOSTI MATIČNEGA MLEČKA

Matični mleček zaradi številnih pozitivnih lastnosti sodi v skupino funkcionalnih živil. Nekateri biološki in terapevtski učinki uživanja matičnega mlečka so že bili potrjeni, vendar pa kemijska sestava in biološko aktivne snovi matičnega mlečka še niso v celoti poznane. Matični mleček je eden najbolj cenjenih čebeljih proizvodov, ki je zaradi svojega antioksidativnega, antibakterijskega in protivnetnega delovanja tudi uporabna sestavina kozmetičnih in negovalnih izdelkov (Pavel in sod., 2011). Matični mleček antibakterijsko deluje tako na gram-pozitivne kot na gram-negativne bakterije. Boukraâ in sod. (2009) antibakterijski učinek matičnega mlečka predpisujejo prostim maščobnim kislinam, medtem ko Fujiwara in sod. (1990) močan antibakterijski učinek MM na gram-pozitivne bakterije predpisujejo proteinu rojalizinu.

Matični mleček zaradi vsebnosti proteinov in fenolnih spojin, ki so zelo učinkovite pri odstranjevanju prostih radikalov, deluje tudi antioksidativno (Nagai in Inoue, 2004). Največjo antioksidativno učinkovitost ima matični mleček pobran 24 ur po cepitvi ličink (Liu in sod., 2008). Študije na živalih kažejo, da ima matični mleček tudi antitumorsko delovanje, ki se ga pripisuje predvsem vsebnosti 10-HDA ter nasičenim dikarboksilnim kislinam (Oršolić, 2013). Honda in sod. (2011) so nakazali, da bi matični mleček lahko vseboval sestavine, ki ugodno vplivajo na življenjsko dobo (študija na *C.elegans*). Podobne rezultate podajajo Inoue in sod. (2003) s študijo na miškah, kjer je hranjenje mišk z matičnem mlečkom podaljšalo njihovo življenjsko dobo. Matični mleček ima ugoden učinek tudi na diabetes. Kitajska in japonska medicina matični mleček uporabljata v boju proti diabetesu in za uravnavanje krvnega sladkorja (Pavel in sod., 2011). Guo in sod. (2007) so pozitiven učinek uživanja matičnega mlečka pokazali tudi pri ljudeh. Pokazali so, da uživanje matičnega mlečka izboljša metabolizem lipoproteinov ter zmanjša serumski

celokupni holesterol ter vsebnost lipoproteinov nizke gostote (LDL - angl. *Low Density Lipoprotein*) v krvi. Matičnemu mlečku se pripisuje številne pozitivne lastnosti, vendar pa so potrebne nadaljnje študije (*in vitro*, poskusi na živalih ter klinične študije), da se dokaže pozitiven učinek matičnega mlečka in njegovih sestavin, predvsem na ljudi.

2.5 UPORABA MATIČNEGA MLEČKA V PREHRANI

Matični mleček je ena najbolj zanimivih sestavin zdrave prehrane. Zelo razširjena je njegova uporaba v prehranskih dopolnilih zaradi prepričanja, da ima njegovo uživanje podobne učinke na ljudi kot jih ima na čebele (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012). Čebela matica, ki je izključno hranjena z matičnim mlečkom, ima daljšo življenjsko dobo ter bolj razvite žleze v primerjavi s čebelo delavko (Morita in sod., 2012). Zato se matični mleček že od nekdaj uporablja kot prehransko dopolnilo. Uživanje matičnega mlečka vpliva tudi na boljšo vzdržljivost pri športnikih. Športniki, ki uživajo matični mleček kot prehransko dopolnilo (1,2 g/dan), so bolj vzdržljivi v primerjavi s športniki, ki tega prehranskega dodatka ne uživajo. Med fizično aktivnostjo vzdržljivost pada zaradi povišanja lipidnih hidroperoksidov v krvi. Matični mleček s svojimi sestavinami kot antioksidant pomaga pri zniževanju hidroperoksidov v krvi in posledično pripomore k boljši vzdržljivosti (Bogdanov, 2011). Matični mleček se zaradi bioloških in funkcionalnih lastnosti zdi kot idealno prehransko dopolnilo, ki ga lahko kombiniramo z drugimi sestavinami, kot so vitamini, antioksidanti in minerali (Bogdanov, 2011). Povečano uživanje matičnega mlečka kot prehranskega dodatka pa lahko poveča pojavnost alergijskih reakcij, zato je treba matični mleček obravnavati kot možni alergen (Katayama in sod., 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili 21 vzorcev svežega matičnega mlečka različnega porekla. 18 vzorcev matičnega mlečka je bilo slovenskega porekla (vzorci MM1 do MM18), katere smo prevzeli neposredno pri čebelarjih, en vzorec matičnega mlečka je bil kitajskega porekla (MM20) ter en vzorec bolgarskega porekla (MM21). Vzorec MM19 smo kupili v Sloveniji (Medex), poreklo ni bilo deklarirano, zato smo predvidevali, da je kitajskega izvora. Podatki o analiziranih vzorcih (poreklo, število vzorcev in oznaka) so zbrani v preglednici 2.

Preglednica 2: Vzorci matičnega mlečka (poreklo, število in oznaka)

Poreklo matičnega mlečka		Število vzorcev	Oznaka vzorcev
Slovensko		18	MM1-MM18
Tuje	kitajsko	2	MM19, MM20
	bolgarsko	1	MM 21

Vzorke smo hranili v pokritih, z aluminijasto folijo ovitih, steklenih kozarčkih, v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Pred analizami smo vzorce dobro premešali.

3.2 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE

3.2.1 Določanje vsebnosti vode (Sesta in Lusco, 2008)

Princip:

Princip metode temelji na refraktometričnem določanju odstotka vode.

Pribor:

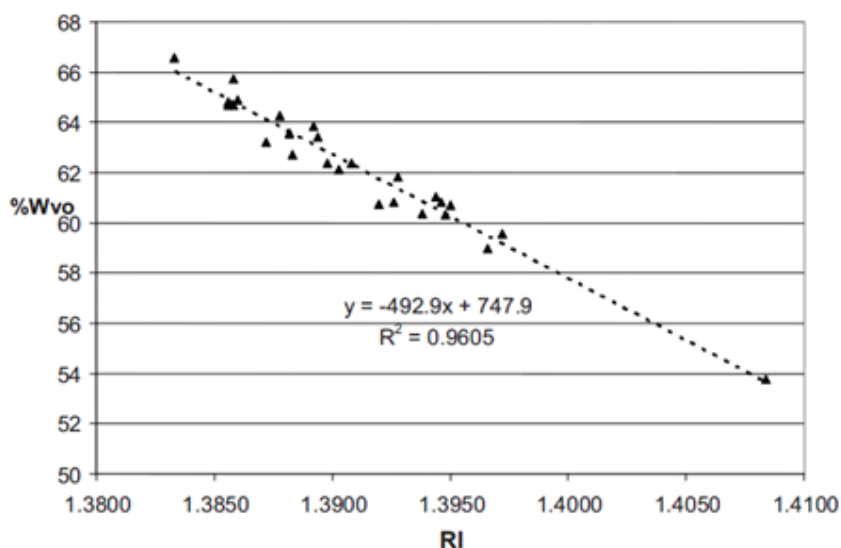
- digitalni refraktometer RX-5000 α (ATAGO, Japonska)
- plastična žlička

Izvedba:

Matični mleček pred začetkom analize premešamo s plastično žličko. Tako pripravljenemu vzorcu določimo indeks refrakcije (RI) pri konstantni temperaturi 20 °C. Na podlagi indeksa refrakcije s pomočjo enačbe izračunamo vsebnost vode.

Izračun:

Sesta in Lusco (2008) sta ugotovila, da obstaja korelacija med vsebnostjo vode, določeno s sušenjem v vakuumskem sušilniku in refrakcijskim indeksom (RI) matičnega mlečka, kot je prikazano na sliki 4.



Slika 4: Linearna zveza med vsebnostjo vode, določeno s sušenjem (%Wvo) in refrakcijskim indeksom(RI) (Sesta in Lusco, 2008).

Zelo visok determinacijski koeficient ($R^2 = 0,9605$) nam omogoča izračun vsebnosti vode neposredno iz meritev refrakcijskega indeksa z naslednjo enačbo:

$$\text{vsebnost vode (\%)} = (-492,9 \times \text{RI}) + 747,9 \quad \dots(2)$$

3.2.2 Določanje vsebnosti pepela (Plestenjak in Golob, 2003)

Princip:

Suhi sežig vzorca pri temperaturi 550 °C do konstantne teže.

Pribor:

- žarilni lonček
- električna kuhalna plošča
- žarilna peč (Nabertherm, Nemčija)
- gorilnik
- plastična žlička
- tehtnica (Scaltec SBC 21)

Izvedba:

V prežarjen in stehtan žarilni lonček odtehtamo 2 g vzorca ($\pm 0,1$ g) in ga segrevamo na električni kuhalni plošči ter nad gorilnikom, dokler večji del vode ne izhlapi. Ostanek žarimo v žarilni peči pri 550 °C do konstantne teže. Ohladimo in stehtamo.

Izračun:

$$\text{vsebnost pepela (g/100 g)} = \frac{b}{a} \times 100 \quad \dots (3)$$

a - odtehta vzorca (g)

b - masa pepela (g)

3.2.3 Določanje vrednosti pH v matičnem mlečku (Olimpia in sod., 2008)

Princip:

S pH metrom izmerimo vrednost pH v 2 % vodni raztopini matičnega mlečka.

Pribor:

- pH meter MA 5736 (Metrel, Slovenija)
- čaša (50 ml)
- plastična žlička
- steklena palčka

Izvedba:

V čašo odtehtamo 0,5 g matičnega mlečka in dopolnimo z destilirano vodo do 25 g ($\pm 0,05$ g). S stekleno palčko premešamo, da se ves vzorec raztopi in na predhodno umerjenem pH metru takoj izmerimo vrednost pH.

3.2.4 Določanje kislosti matičnega mlečka (Olimpia in sod., 2008)

Princip:

Titracija vzorca z 0,1 M NaOH ob dodatku indikatorja fenolftaleina do preskoka v rožnato barvo.

Pribor in reagenti:

- 0,1 M NaOH (Merck, Nemčija)
- 0,1 M HCl (Merck, Nemčija)
- indikator metiloranž
- indikator fenolftalein
- erlenmajerica (250 ml)
- magnetno mešalo
- pH meter MA 5736 (Metrel, Slovenija)
- steklena palčka
- merilni valj

Izvedba:

V 250 ml erlenmajerico odtehtamo 0,50 g matičnega mlečka, z merilnim valjem dodamo 50 ml destilirane vode, v erlenmajerico položimo magnet in do izvedbe analize mešamo na magnetnem mešalu (4000 obratov/min). Po umeritvi pH metra, potopimo elektrode v raztopino matičnega mlečka in izmerimo vrednost pH. Sledi titracija z 0,1 M NaOH do preskoka v rožnato barvo ob dodatku indikatorja fenolftaleina. Po titraciji vzorcu ponovno izmerimo pH vrednost.

Standardizacija NaOH s HCl:

V 250 ml erlenmajerico odpipetiramo 10 ml 0,1 M NaOH, dodamo kapljico indikatorja metiloranža in titriramo z 0,1 M NaOH do preskoka v čebulno barvo.

Pri tem velja:



$$\frac{n(\text{NaOH})}{n(\text{HCl})} = \frac{1}{1} \quad \dots (5)$$

$$n(\text{NaOH}) = n(\text{HCl}) \quad \dots (6)$$

$$c(\text{NaOH}) \times V(\text{NaOH}) = c(\text{HCl}) \times V(\text{HCl}) \quad \dots (7)$$

Izračun faktorja standardne raztopine NaOH:

$$F(\text{NaOH}) = \frac{c(\text{NaOH})}{c(0,1 \text{ M NaOH})} \quad \dots (8)$$

Slepi vzorec:

50 ml destilirane vode titriramo z 0,1 M NaOH do preskoka v rožnato barvo, ob dodatku indikatorja fenolftaleina.

Izračun:

$$\text{kislost} \left(\frac{\text{ml}}{\text{g}} \right) = \frac{(a-b) \times F(\text{NaOH})}{\text{odtehta (g)}} \quad \dots (9)$$

a - volumen 0,1 M NaOH pri titraciji vzorca (ml)

b - volumen 0,1 M NaOH pri titraciji slepega vzorca (ml)

3.2.5 Določanje vsebnosti beljakovin z metodo po Kjeldahlu (Plestenjak in Golob, 2003)

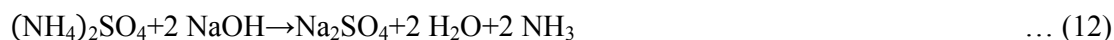
Princip:

Metoda temelji na določanju beljakovin posredno preko dušika, ob upoštevanju, da je ves dušik, prisoten v živilu, beljakovinski. Za preračunavanje dušika v beljakovine uporabljamo ustrezne empirične faktorje.

$$\% \text{ beljakovin} = \% \text{ N} \times F \quad \dots (10)$$

Vzorec pred analizo razklopimo z mokrim sežigom s pomočjo kisline (H_2SO_4), katalizatorja (bakrov katalizator) in visoke temperature. Z destilacijo z vodno paro ob dodatku močne baze sprostimo amonijak (NH_3), ki ga lovimo v prebitek borove kisline in nato nastali amonijev borat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$) titriramo s standardno raztopino klorovodikove kisline (HCl).

Reakcije, ki potekajo pri tem:



Če enačbi (13) in (14) združimo dobimo:



Iz enačbe (15) sledi:

$$1 \text{ mol HCl} = 1 \text{ mol N} = 14 \text{ g N}$$

$$1 \text{ ml } 0,1 \text{ M HCl} = 0,0014 \text{ g N}$$

Reagenti:

- koncentrirana H_2SO_4 (Merck, Nemčija)
- katalizator Kjeltabs Cu/3,5 (3,5 g K_2SO_4 + 0,4 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) (Foss, Švedska)
- nasičena raztopina (ca 3 %) borove kisline H_3BO_3 (Sigma-Aldrich Co., ZDA)
- 30 % raztopina NaOH (Merck, Nemčija)
- 0,1 M HCl (Merck, Nemčija)

Aparatura in pribor:

- blok za razklop oz. mokri sežig vzorca (Digestion Unit K-426, Büchi, Švica)
- enota za odvod zdravju škodljivih hlapov (Scrubber, Büchi, Švica)
- destilacijska enota (Distillation Unit B-324, Büchi, Švica)
- titracijska enota (Titrino 702 SM, Metrohm, Švica)
- sežigne epruvete (Büchi, Švica)
- tehtnica (Sartorius A120S)
- tehtirne ladjice

Izvedba analize:

a) Priprava vzorca:

V sežigno epruveto s pomočjo tehtirnih ladjic odtehtamo 0,5 - 0,9 g vzorca.

b) Razklop:

V epruveto dodamo 2 tableti bakrovega katalizatorja in 20 ml koncentrirane H_2SO_4 . Epruvete postavimo v stojalo in pokrijemo s steklenimi zvonci. Vse skupaj postavimo v ogreto enoto za razklop (Digestion Unit), kjer je temperatura 370 °C. Z vodno črpalko odvajamo zdravju škodljive hlape prek enote imenovane Scrubber. Del hlapov se utekočini, preostanek pa se nevtralizira v ca 15 % raztopini NaOH in končno vodi prek aktivnega oglja. Sežig je končan po 1 uri oziroma takrat ko se vsebina v epruveti preneha peniti in postane bistro zelena.

c) Destilacija:

Vzorec v epruveti ohladimo na sobno temperaturo. Epruveto postavimo v destilacijsko enoto (Distillation Unit), kjer poteče doziranje 50 ml destilirane vode in 70 ml baze (NaOH) v vzorec. V destilacijsko predložko se dozira 60 ml borne kisline (H_3BO_3). Nato se začne uvajati para v vzorce. Destilacija traja 4 minute.

d) Titracija:

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

Izračun:

$$\text{vsebnost beljakovin } \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{V_{0,1 \text{ HCl}} (\text{ml}) \times 1,4}{\text{odtehta (mg)}} \times 100 \times 6,25 \quad \dots (16)$$

V_{HCl} = poraba 0,1 M HCl (ml)

1,4 = ekvivalent (1 ml 0,1 M HCl = 1,4 mg N)

6,25 = F = splošni empirični faktor za preračun N v beljakovine

3.2.6 Določanje vsebnosti maščob z metodo po Soxhletu (Plestenjak in Golob, 2003)

Princip:

Direktna ekstrakcija maščobe v Soxhletovem aparatu z nepolarnim topilom. Odparevanje topila, sušenje ekstrahirane snovi, tehtanje in izračun.

Pribor in reagenti:

- aparat po Soxhletu
- natrijev sulfat (Na_2SO_4) (Kemika)
- čaša (25 ml)
- steklena palčka
- etanol (95 %)
- topilo (petroleter, Sigma-Aldrich Co.)
- ekstraktor
- vata
- celulozne kapice
- vrelne kroglice
- bučke (250 ml)
- sušilnik (Sterimatic ST-11, Hrvaška)

Izvedba:

a) Priprava vzorca:

Približno 3,5 g suhega natrijevega sulfata (sušenje Na_2SO_4 3 h, 105 °C) zmešamo v čaši s ca 1,5 g matičnega mlečka. Premešamo s stekleno palčko in kvantitativno prenesemo v tulce za ekstrakcijo (stekleno palčko in čašo obrišemo z etanolom in vato ter nato vato prenesemo v tulec).

b) Ekstrakcija maščobe:

Ekstrakcijske tulce pokrijemo z vato, vstavimo v ekstraktorje in vstavimo v ekstrakcijski nastavek Soxhletovega aparata. Na aparat namestimo čisto, stehtano bučko z vrelnimi kroglicami in prelijemo s topilom. Topila mora biti dovolj, da se v ekstraktorju lahko pretaka. Ekstrahiramo približno 4 ure, nato topilo oddestiliramo, ostanek v bučki sušimo 3 ure pri temperaturi 105 °C, ohladimo in stehtamo.

Izračun:

$$\text{vsebnost maščobe} \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{b-c}{a} \times 100 \quad \dots (17)$$

b- teža bučke z ostankom (g)

c- teža prazne bučke (g)

a- odtehta vzorca (g)

3.2.7 Določanje vsebnosti 10-HDA s tekočinsko kromatografijo z masnim spektrometrom (LC/MS)

Princip:

Separacija 10-hidroksi-2-decenojske kisline je potekala na reverznofazni koloni z gradientom dveh mobilnih faz. 10-HDA smo identificirali na osnovi retenzijskega časa in molske mase. Kvantitativna določitev je bila možna s pomočjo umeritvene krivulje s standardnim dodatkom (modificirano po Sesta, 2006).

Reagenti:

- metanol, HPLC grade (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- acetonitril, LC/MS grade (Merck, Nemčija)
- 1 % mravljična kislina, HCOOH (Merck, Nemčija)
- standard 10-HDA (Stanford Materials Corporation SMC20120926, ZDA)

Aparatura in kromatografski pogoji ločbe:

HPLC sistem	Agilent 1100		
Binarna gradientna črpalka:	Agilent 1100, G1312A		
Avtomatski podajalnik:	Agilent 1100, G1330B		
Volumen injiciranja:	10 µl		
Predkolona:	Phenomenex AFO-8497		
Kolona:	Phenomenex Kinetex C18, 2,6 µm, 100 mm x 2,1 mm		
Mobilna faza:	mobilna faza A: 1 % HCOOH (Merck, Nemčija)		
	mobilna faza B: acetonitril, LC/MS grade (Merck, Nemčija)		
Pretok:	0,4 ml/min		
Temperatura kolone:	25 °C		
Gradient:	t (min)	A	B
	0	75 %	25 %
	8	60 %	40 %
	9	75 %	25 %
	12	75 %	25 %
Detektor:	masni spektrometer (Micromass Quattro micro [®] API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (ESI+) (pozitiven način ionizacije)		
Program za obdelavo podatkov:	MassLynx [™] V4,0 (Micromass, 2004)		
Pogoji ionizacije (ESI+):	napetost kapilare (kV)	4,4	
	napetost vhodne leče (V)	15	
	temperatura izvora (°C)	120	
	temperatura razpršilnega plina dušika (°C)	350	
	pretok razpršilnega plina dušika (l/h)	350	
	pretok plina dušika vhodne leče (l/h)	30	

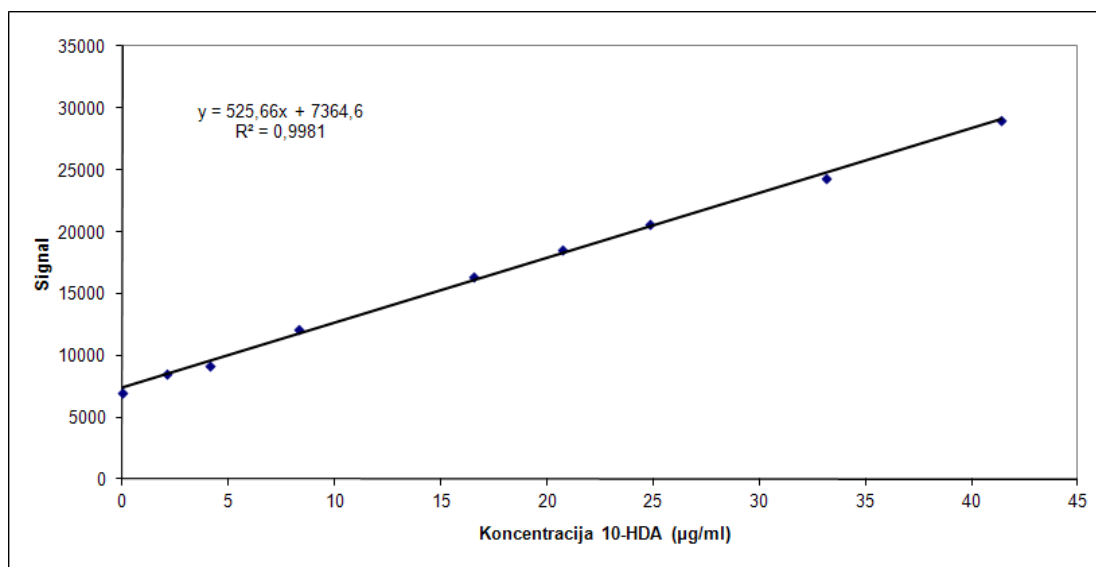
Izvedba:

Odtehtamo 0,25 g matičnega mlečka in dodamo 15 ml raztopine metanol/voda (45:55, v/v). Vzorec ekstrahiramo 15 minut z mešanjem v ultrazvočni kopeli, prenesemo v 25 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake. Sledi centrifugiranje 10 minut pri 3000 obratih/minuto. Nato odpipetiramo 0,4 ml supernatanta in dopolnimo do 5 ml z mešanico metanol/voda (45:55, v/v), filtriramo preko 0,45 µm membranskega filtra v vialo in analiziramo z LC/MS.

Priprava umeritvene krivulje s standardnim dodatkom:

Za kvantitativno določanje 10-HDA smo uporabili standard 10-HDA (SMC20120926). V 100 ml bučko smo odtehtali okoli 0,02 g standarda in dopolnili do oznake z mešanico metanol/voda (45:55 v/v). Tako smo pripravili standardno raztopino.

Za umeritveno krivuljo smo uporabili metodo standardnega dodatka. V 0,2 ml raztopine izbranega vzorca matičnega mlečka (MM6) odpipetiramo različne volumne (0 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,8 ml in 1,0 ml) predhodno pripravljene standardne raztopine 10-HDA, in z raztopino metanol/voda (45:55, v/v) dopolnimo do 5 ml. Filtriramo preko 0,45 µm membranskega filtra v vialo in analiziramo z LC/MS.



Slika 5: Umeritvena krivulja s standardnim dodatkom za določanje vsebnosti 10-HDA v matičnem mlečku

Izračun:

Vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku smo ovrednotili s primerjavo površin vrhov raztopin matičnega mlečka s površino vrhov standardnih raztopin. Pri preračunu smo upoštevali tudi maso odtehtanega vzorca in faktor razredčitve.

$$\text{vsebnost 10-HDA} \left(\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{A_{10\text{-HDA}}}{k \times m_{\text{vz}}} \times R \quad \dots (18)$$

$A_{10\text{-HDA}}$ - površina pod vrhom za 10-HDA

k - naklon premice

m_{vz} - masa vzorca matičnega mlečka (g)

R - faktor razredčitve

3.2.8 Določanje razmerij izotopov ogljika in dušika v matičnem mlečku z metodo IRMS (AOAC 998.12, 1999)

Princip:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega in lažjega izotopa ogljika oz. dušika z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov lahkkih elementov (IRMS). Izotopska razmerja podajamo z vrednostjo $\delta^{13}\text{C}$ oz. $\delta^{15}\text{N}$ v ‰, ki je definirana z enačbo (1).

Reagenti:

- interni, laboratorijski standard: ureaC (urea) in europaN ((NH_4) $_2$ SO $_4$)),
- referenčni standardi: IAEA-NBS 22 (oil), IAEA-CH-7, IAEA-CH-6, IAEA-N-1, IAEA-N-2.

Aparatura in pribor:

- kositrove kapsule dimenzije 6x4 mm (SerCon, Velika Britanija),
- plastični nosilci za kapsule,
- pinceta za zatesnitev kositrovih kapsul,
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL preparativnim nastavkom za trdne in tekoče vzorce.

Priprava vzorcev za analizo:

Homogenizirane vzorce matičnega mlečka (okoli 5 mg) smo z ozko spatulo prenesli v kositrovo kapsulo, jo s pinceto zatisnili in oblikovali v kroglico ter prenesli v nosilec za kapsule. Nosilec smo postavili na avtomatski podajalnik masnega spektrometra. Sledil je sežig posameznih vzorcev.

Izvedba analize:

Kakovost meritev določanja $\delta^{13}\text{C}$ spremljamo z analizo referenčnih standardov IAEA-NBS 22 (oil), IAEA-CH-7 in IAEA-CH-6 z vrednostmi $\delta^{13}\text{C}$: $-29,7 \pm 0,2$ ‰, $-31,8 \pm 0,2$ ‰ in $-10,4 \pm 0,2$ ‰. Za vsakodnevno preverjanje pravilnosti meritev, to je na začetku in koncu merjenja ter na vsakih pet do deset izmerjenih vzorcev, uporabljamo laboratorijski standard ureaC z izotopsko sestavo $-30,6 \pm 0,2$ ‰. Napaka meritev $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti znaša $\pm 0,2$ ‰.

Kakovost meritev določanja $\delta^{15}\text{N}$ spremljamo z občasno analizo referenčnih standardov IAEA-N-1 in IAEA-N-2, ki imata naslednji vrednosti $\delta^{15}\text{N}$: $+0,4 \pm 0,2 \text{ ‰}$ in $+20,3 \pm 0,2 \text{ ‰}$. Pravilnost meritev dnevno preverjamo z analizo laboratorijskega standarda europaN z izotopsko sestavo $+2,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$. Napaka meritev $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti znaša $\pm 0,3 \text{ ‰}$.

Izračun:

Razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini izražamo z vrednostjo, ki predstavlja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st). Enota so promili (‰). Za izračun smo uporabili enačbo 1, predstavljeno v poglavju 2.2.9.

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Dobljene rezultate smo statistično obdelali s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel 2007 in računalniškega programa SPSS ter jih ovrednotili z naslednjimi statističnimi parametri:

- aritmetično sredino - povprečno vrednostjo ($\bar{x}$)
- standardnim odklonom (SD)
- koeficientom variacije (KV)
- minimalno (min) vrednostjo
- maksimalno (max) vrednostjo
- Levenovim testom homogenosti variance
- parametričnimi testi (analiza variance - ANOVA, Studentov t-test)
- Pearsonovim koeficientom korelacije (r)
- PCA
- LDA

3.3.1 Enovzorčna analiza

Pri enovzorčni analizi obravnavamo statistične parametre znotraj posameznih statističnih vzorcev, v našem primeru znotraj vzorcev matičnega mlečka.

3.3.1.1 Aritmetična sredina ali povprečna vrednost

Od srednjih vrednosti najpogosteje uporabljamo aritmetično sredino ali povprečje. Dobimo jo tako, da seštejemo vrednosti spremenljivke vseh enot (x_i) in vsoto delimo s številom enot (n) (enačba 19). Vsota vseh odklonov od aritmetične sredine je vedno enaka nič (Adamič, 1989).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (19)$$

3.3.1.2 Standardni odklon

Varianca (s^2) je povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine (enačba 20). Kot opisni parameter variacije se bolj uporablja kvadratni koren variance, ki se imenuje standardna deviacija ali standardni odklon (SD), njegov izračun je prikazan v enačbi 19 (Adamič, 1989).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \dots (20)$$

3.3.1.3 Koeficient variabilnosti ali variance

Koeficient variabilnosti (KV) uporabimo, kadar želimo primerjati variiranje različnih spremenljivk, ki so med seboj v vsebinski zvezi. Primerjamo lahko le relativno variiranje, ki ga podajamo z variacijskim koeficientom. Izračunamo ga tako, da standardno deviacijo delimo z aritmetično sredino istega vzorca in KV izrazimo kot odstotek, (enačba 21) (Adamič, 1989).

$$KV(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad \dots (21)$$

3.3.2 Dvovzorčna analiza

Za statistično analizo povezanosti dveh spremenljivk uporabljamo metodo regresije in metodo korelacije. Korelacijo opisujejo različni koeficienti korelacije, med katerimi je tudi Pearsonov koeficient korelacije (r) (Adamič, 1989).

3.3.2.1 Koeficient korelacije po Pearsonu

Pearsonov koeficient korelacije je merilo linearne povezanosti dveh številskih spremenljivk, ki sta naključni, med seboj povezani, vendar ne nujno odvisni ena od druge (Adamič, 1989).

Označujemo ga z r in je enak razmerju med kovarianco (C_{xy}) in zmnožkom standardnih deviacij za obe spremenljivki x in y :

$$R = \frac{C_{xy}}{SD_x \times SD_y} \quad \dots (22)$$

Pearsonov korelacijski koeficient se uporablja, kadar so spremenljivke normalno porazdeljene (Košmelj, 2007). Koeficient korelacije po Pearsonu ima lahko vse vrednosti med -1 in +1 (Adamič, 1989).

Na osnovi velikosti koeficienta korelacije lahko sklepamo samo, kako močna je povezava med statističnimi enotami, ne vemo pa, ali je povezava značilna. Kadar je vrednost koeficienta korelacije nad 0,7 pomeni, da je povezanost močna.

3.3.2.2 Koeficient determinacije

Koeficient determinacije (r^2) je ena izmed najenostavnejših mer, ki vrednosti kakovost regresijskega modela. Izraža delež variance odvisne številske spremenljivke (y), ki je pojasnjen z regresijskim modelom ene ali več neodvisnih spremenljivk (x) (Košmelj, 2007). Koeficient determinacije (r^2) je kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (r). Povezava med dvema obravnavanima spremenljivkama je močna, ko je koeficient determinacije večji od 0,5 (Adamič, 1989).

3.3.3 Večvzorčna analiza

Statistične metode temeljijo na postavljanju, preverjanju, sprejemanju ali zavračanju domnev. Po izbrani metodi, jasno postavimo osnovno (alternativno) domnevo (H_1), ki v splošnem pravi, da se preiskovane vrednosti med seboj statistično značilno razlikujejo. Letej priredimo nasprotno, ničelno domnevo (H_0), ki trdi, da razlik ni ali pa so zgolj naključne. Pred preverjanjem domnev določimo kritično oziroma zgornjo mejo tveganja (α), pri kateri bomo zavrnili ničelno domnevo (Adamič, 1989).

V biostatistiki so najpogostejše izbrane vrednosti 0,05, 0,01 ali 0,001 kot zgornje meje tveganja, pri katerih zavržemo ničelno domnevo. Glede na te meje govorimo o 5 %, 1 % ali 0,1 % stopnji značilnosti rezultatov (Adamič, 1989).

3.3.3.1 Levenov test homogenosti varianc

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

3.3.3.2 ANOVA-analiza variance

Analiza variance je parametrična metoda, ki temelji na dejstvu, da so porazdelitve vzorcev ene statistične spremenljivke normalne in da se variance statističnih vzorcev med seboj statistično ne razlikujejo. Enakost varianc med vzorci imenujemo tudi homogenost varianc in jo predhodno preverimo z Levenovim testom (Adamič, 1989).

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

3.3.3.3 Studentov t-test

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

3.3.3.4 Mann-Whitney U test

Mann-Whitneyev test uporabljamo za ugotavljanje razlik med dvema povprečnima vrednostma za neodvisna vzorca, ko proučevana številska spremenljivka ni normalno porazdeljena ali za opisne spremenljivke, merjene na ordinalni skali. Test predstavlja neparametrični ekvivalent parametričnemu t-testu. Vrednosti številske spremenljivke se pretvorijo v range, tako da se najmanjši vrednosti pripiše rang 1, naslednji najmanjši rang 2, itd. Za izračun testne statistike se uporabijo vrednosti rangov (Bastič, 2006).

3.3.4 Faktorska analiza

Faktorska analiza je metoda za redukcijo podatkov. Z njo analiziramo povezave med spremenljivkami tako, da poizkušamo najti novo množico spremenljivk, ki predstavljajo to, kar je skupnega opazovanim spremenljivkam. Cilj je, da ugotovimo ali je zveze med opazovanimi spremenljivkami mogoče pojasniti z manjšim številom posredno opazovanih spremenljivk ali faktorjev (Kropf, 2009).

3.3.4.1 PCA- metoda glavnih komponent

Metoda glavnih komponent (angl. *Principal component analysis, PCA*) je statistična tehnika, ki analizira medsebojno soodvisnost spremenljivk z namenom, da se število spremenljivk zmanjša. Pri tem osnovni nabor spremenljivk preslikamo v množico novih spremenljivk, ki jih imenujemo glavne komponente (Košmelj, 2007). V splošnem je potrebno p glavnih komponent za predstavitev celotne variabilnosti prvotne množice spremenljivk (n večrazsežnih opazovanj p spremenljivk). V praksi pa pogosto lahko pretežni del variabilnosti prvotne množice spremenljivk izrazimo z manjšim številom k glavnih komponent ($k \ll p$). Zato p prvotnih spremenljivk zamenja prvih k glavnih komponent oz. prvotno množico podatkov (matriko reda $n \times p$) zamenja skrčena množica vrednosti glavnih komponent (matrika reda $n \times k$) (Rovan, 2006). Glavnih komponent je toliko, kolikor je osnovnih spremenljivk in so med seboj neodvisne (pravokotne). Glavne komponente se izražajo kot linearna kombinacija osnovnih spremenljivk in ohranjajo njihovo skupno variabilnost. Prva glavna komponenta je določena tako, da pojasni kar se da velik del celotne variance osnovnih spremenljivk. Druga glavna komponenta je določena tako, da je neodvisna od prve in pojasni kar se da velik del še nepojasnjene variance. Tretja glavna komponenta je neodvisna od prve in od druge glavne komponente in pojasni kar se da velik del še nepojasnjene variance, itd. (Košmelj, 2007).

Običajni cilj te analize je poiskati nekaj prvih komponent, ki pojasnjujejo večji del razpršenosti analiziranih podatkov. S tem se bistveno zmanjša količina podatkov (število spremenljivk- glavnih komponent), ki vstopajo v nadaljnjo analizo. Zato spada metoda glavnih komponent med t.i. metode zmanjšanja razsežnosti (Rovan, 2006).

3.3.5 Diskriminantna analiza

Diskriminantna analiza se uporablja za nadzorovano razvrščanje v skupine. Z analizo se ugotavlja podobnosti neznanega vzorca z drugimi vzorci, katerih lastnosti so nam znane (Adams, 1998).

3.3.5.1 LDA- linearna diskriminantna analiza

Linearna diskriminantna analiza se uporablja za ločevanje dveh ali več vrst podatkov. Princip delovanja je v večvariatnem prostoru najti smeri, ki ločujejo posamezne vrste vzorcev. Najprej določimo prvo novo smer, poiščemo naslednjo takšno smer z enakimi lastnostmi, toda informacije, ki jih vsebujejo obe smeri, ne smejo korelirati. Postopek iskanja novih smeri zaključimo, ko poiščemo zadostno število novih smeri, ki zadovoljivo opišejo sistem (Adams, 1998).

4 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 21 vzorcev svežega matičnega mlečka. Od analiziranih vzorcev jih je bilo 18 slovenskega porekla, 3 vzorci so bili tujega porekla.

Na vzorcih smo opravili naslednje analize: vsebnost vode, pepela, vrednost pH, vsebnost kislin, beljakovin, maščob in 10-hidroksi-2-decenojske kisline ter določali izotopsko sestavo.

Posamezne analizirane parametre smo opisali z osnovnimi statističnimi parametri ter jih z različnimi metodami statistično obdelali. Rezultate smo primerjali s standardi kakovosti za svež matični mleček, katere so definirali Sabatini in sod. (2009) (preglednica 1) ter z razpoložljivimi podatki iz tuje literature (preglednica 4).

V preglednici 3 so zbrani rezultati kemijskih analiz 21 vzorcev matičnega mlečka. Rezultati za posamezne vzorce so predstavljeni grafično v posameznih poglavjih ter zbrani v prilogi A1.

Preglednica 3: Povprečne vrednosti in osnovni statistični parametri za analizirane vzorce matičnega mlečka slovenskega in tujega porekla

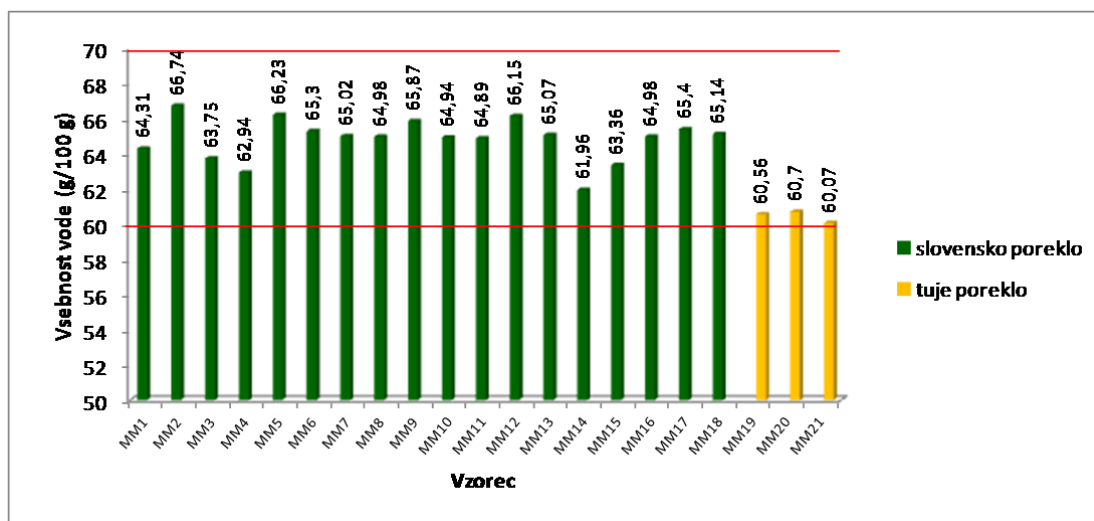
Parameter	Poreklo matičnega mlečka	n	Statistični parameter	
			$\bar{x} \pm SD$	$x_{min}-x_{max}$
vsebnost vode (g/100 g)	slovensko	18	64,8±1,2	62,0-66,7
	tuje	3	60,4±0,3	60,0-60,5
vsebnost pepela (g/100 g)	slovensko	18	1,07±0,08	0,94-1,23
	tuje	3	1,17±0,06	1,11-1,23
vrednost pH	slovensko	18	4,3±0,1	4,08-4,48
	tuje	3	4,1±0,01	4,05-4,06
kislost (ml 0,1 M NaOH/g)	slovensko	18	3,90±0,29	3,27-4,46
	tuje	3	3,0±0,26	2,71-3,20
vsebnost beljakovin (g/100 g)	slovensko	18	12,6±0,5	11,6-13,6
	tuje	3	14,7±0,2	14,56-14,96
vsebnost maščob (g/100 g)	slovensko	18	5,14±0,51	4,44-6,19
	tuje	3	3,3±0,18	3,08-3,44
vsebnost 10-HDA (g/100 g)	slovensko	18	2,77±0,25	2,32-3,21
	tuje	3	1,72±0,08	1,65-1,81
$\delta^{13}C$ (‰)	slovensko	18	-25,25±1,00	-26,1 - (-22,4)
	tuje	3	-22,30±1,95	-24,3 - (-20,4)
$\delta^{15}N$ (‰)	slovensko	18	1,22±1,43	-0,6 - 3,9
	tuje	3	2,03±0,15	1,9-2,2

N: število vzorcev, $\bar{x}$: povprečna vrednost, SD: standardni odklon, x_{min} : minimalna vrednost, x_{max} : maksimalna vrednost

Iz preglednice 3 je razvidno, da so med matičnim mlečkom slovenskega porekla in matičnim mlečkom tujega porekla največje razlike v vsebnosti vode, beljakovin, maščob in 10-HDA ter vrednostjo $\delta^{15}\text{N}$.

4.1 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI VODE V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA

Vsebnost vode smo določili refraktometrično. Na podlagi izmerjenega indeksa refrakcije smo s pomočjo enačbe (Sesta in Lusco, 2008) izračunali vsebnost vode v vzorcih matičnega mlečka. Povprečni rezultati določanja vsebnosti vode glede na poreklo matičnega mlečka so predstavljeni v preglednici 3. Rezultati določanja vsebnosti vode so za posamezne vzorce predstavljeni grafično na sliki 6.



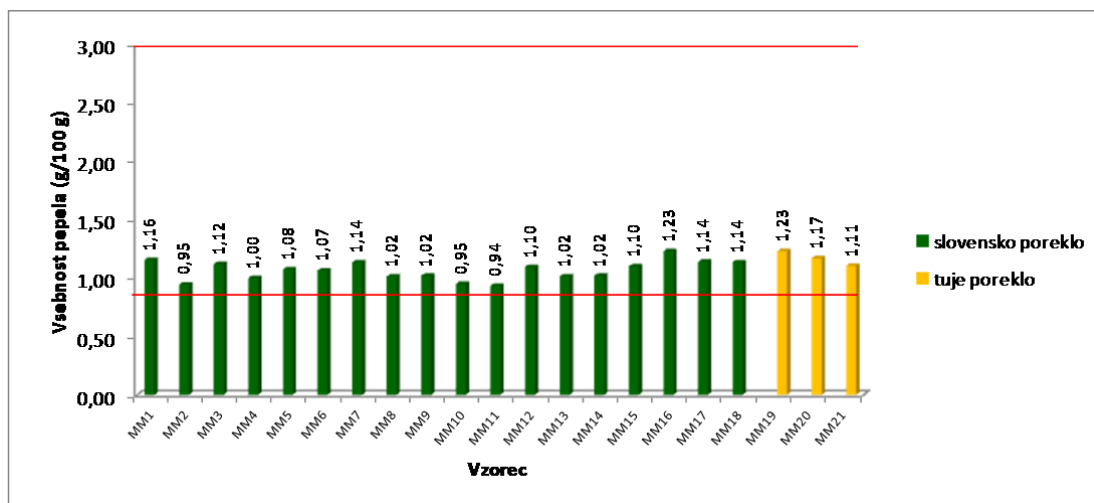
Slika 6: Vsebnost vode (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka

Rdeči črti predstavljata mejne vrednosti vsebnosti vode po standardih kakovosti (Sabatini in sod., 2009).

Iz preglednice 3 je razvidno, da je vsebnost vode v vzorcih matičnega mlečka slovenskega porekla variirala med 62,0 in 66,7 g/100 g, v matičnem mlečku tujega porekla pa med 60,0 in 60,5 g/100 g. S slike 7 je razvidno, da so vsi vzorci ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009) in sicer, da mora biti vsebnost vode v svežem matičnem mlečku med 60 in 70 g/100 g (rdeči črti na sliki). Vsebnost vode v vzorcih matičnega mlečka tujega porekla je manjša kot v vzorcih slovenskega matičnega mlečka, vrednosti so le malo nad določeno spodnjo mejo.

4.2 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI PEPELA V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA

Vsebnost pepela smo določili s suhim sežigom vzorca pri temperaturi 550 °C do konstantne teže. Povprečni rezultati določanja vsebnosti pepela so predstavljeni v preglednici 3. Rezultati določanja vsebnosti pepela so za posamezne vzorce predstavljeni grafično na sliki 7.

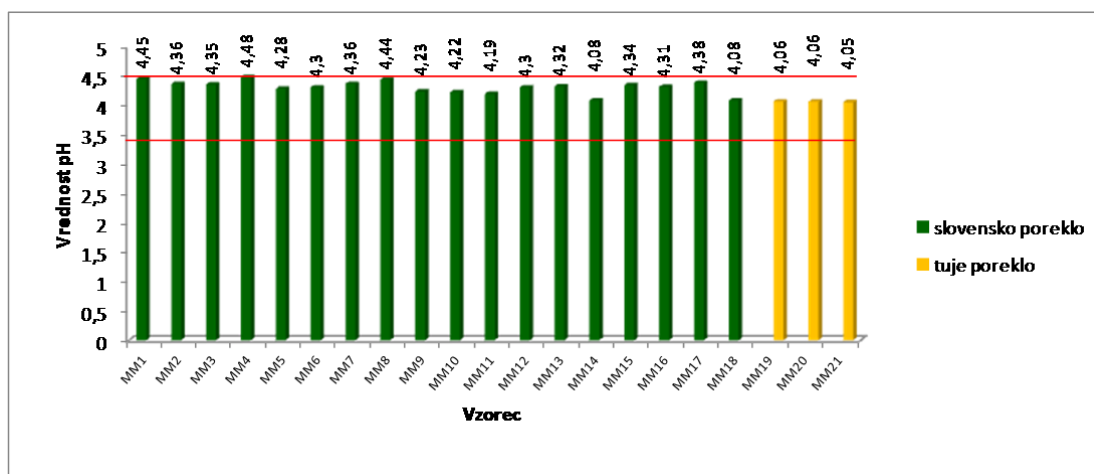


Slika 7: Vsebnost pepela (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka
Rdeči črti predstavljata mejne vrednosti vsebnosti pepela po standardih kakovosti (Sabatini in sod., 2009).

Povprečna vsebnost pepela v vzorcih slovenskega matičnega mlečka je bila 1,07 g/100 g, medtem ko je bila v vzorcih matičnega mlečka tujega porekla nekoliko večja, in sicer 1,17 g/100 g. Vsi analizirani vzorci so ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009) in sicer, da mora biti vsebnost pepela v matičnem mlečku v območju med 0,8 in 3 g/100 g pepela (rdeči črti na sliki).

4.3 REZULTATI MERJENJA VREDNOSTI pH V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA

Vrednost pH smo določili z merjenjem pH vodne raztopine vzorcev na predhodno umerjenem pH metru. Iz preglednice 3 in s slike 8 je razvidno, da je vrednost pH matičnega mlečka slovenskega porekla variirala med 4,08 in 4,48, vrednosti pH matičnega mlečka tujega porekla pa so bile nižje, znašale so 4,05 in 4,06.

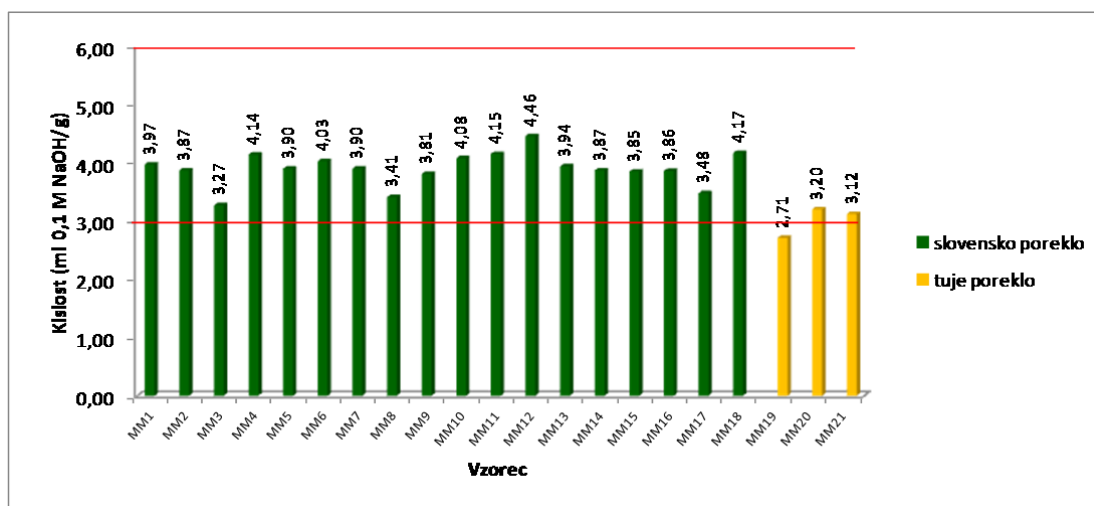


Slika 8: Vrednost pH v vzorcih matičnega mlečka
Rdeči črti predstavljata mejne vrednosti pH po standardih kakovosti (Sabatini in sod., 2009).

Rezultati določanja vrednosti pH za posamezne vzorce matičnega mlečka so predstavljeni grafično na sliki 8. Vsi analizirani vzorci so ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009) in sicer, da mora biti vrednost pH svežega matičnega mlečka v območju med 3,4 in 4,5 (rdeči črti na sliki).

4.4 REZULTATI DOLOČANJA KISLOSTI VZORCEV MATIČNEGA MLEČKA

Kislost matičnega mlečka smo določili titrimetrično s titracijo vzorca z 0,1 M NaOH ob dodatku indikatorja fenolftaleina do preskoka v rožnato barvo. Iz preglednice 3 je razvidno, da je bila povprečna kislost vzorcev matičnega mlečka slovenskega porekla 3,90 ml 0,1 M NaOH/g, medtem ko je bila povprečna kislost vzorcev matičnega tujega porekla manjša, in sicer 3,00 ml 0,1 M NaOH/g.

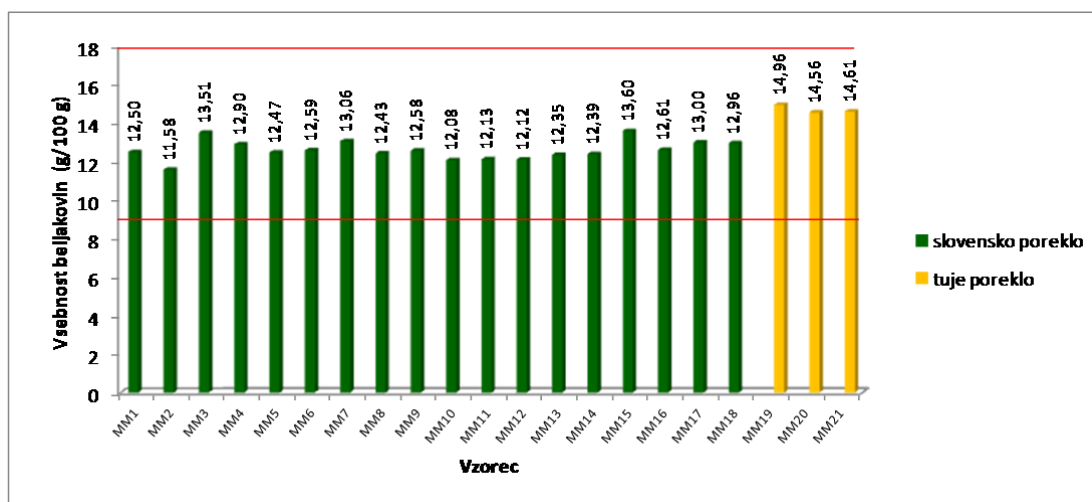


Slika 9: Kislost (ml 0,1 M NaOH/g) vzorcev matičnega mlečka
 Rdeči črti predstavljata mejne vrednosti kislosti po standardih kakovosti (Sabatini in sod., 2009).

Rezultati kislosti za posamezne vzorce matičnega mlečka so predstavljeni na sliki 9. Razvidno je, da so vsi analizirani vzorci, z izjemo enega, ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009) in sicer, da mora biti kislost svežega matičnega mlečka v območju med 3,0 in 6,0 ml 0,1 M NaOH/g (rdeči črti na sliki). Vzorec z oznako MM19, za katerega smo predvidevali, da je kitajskega izvora, ni ustrezal minimalno določeni vrednosti za omenjeni parameter, in sicer je bila kislost tega vzorca pod spodnjo mejo, znašala je 2,71 ml 0,1 M NaOH/g.

4.5 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI BELJAKOVIN V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA

Vsebnost beljakovin smo določili z metodo po Kjeldahlu. Iz preglednice 3 je razvidno, da je bila povprečna vsebnost beljakovin v vzorcih matičnega mlečka slovenskega porekla 12,6 g/100 g, medtem ko je bila povprečna vsebnost beljakovin matičnega mlečka tujega porekla večja, in sicer 14,7 g/100 g.

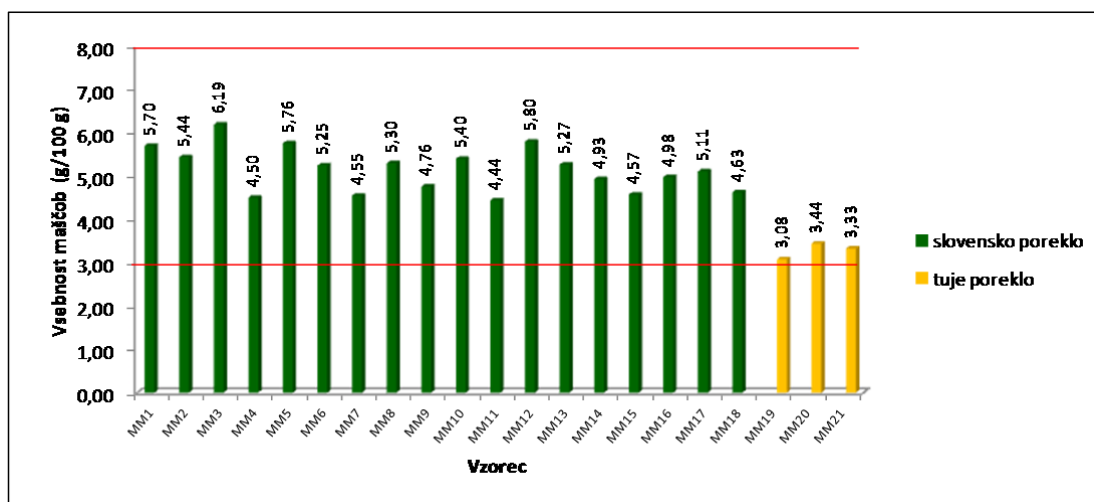


Slika 10: Vsebnost beljakovin (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka
Rdeči črti predstavljata mejne vrednosti vsebnosti beljakovin po standardih kakovosti (Sabatini in sod., 2009).

Rezultati vsebnosti beljakovin za posamezne vzorce matičnega mlečka so predstavljeni na sliki 10. Razvidno je, da so vsi vzorci ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009) in sicer, da mora biti vsebnost beljakovin v območju med 9 in 18 g/100 g.

4.6 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI MAŠČOB V VZORCIH MATIČNEGA MLEČKA

Vsebnost maščob smo določili z direktno ekstrakcijo v Soxhletovem aparatu. Iz preglednice 3 je razvidno, da je bila povprečna vsebnost maščob v vzorcih matičnega mlečka slovenskega porekla 5,14 g/100 g, medtem ko je bila povprečna vsebnost maščob vzorcev tujega porekla za 36 % manjša, znašala je 3,3 g/100 g.

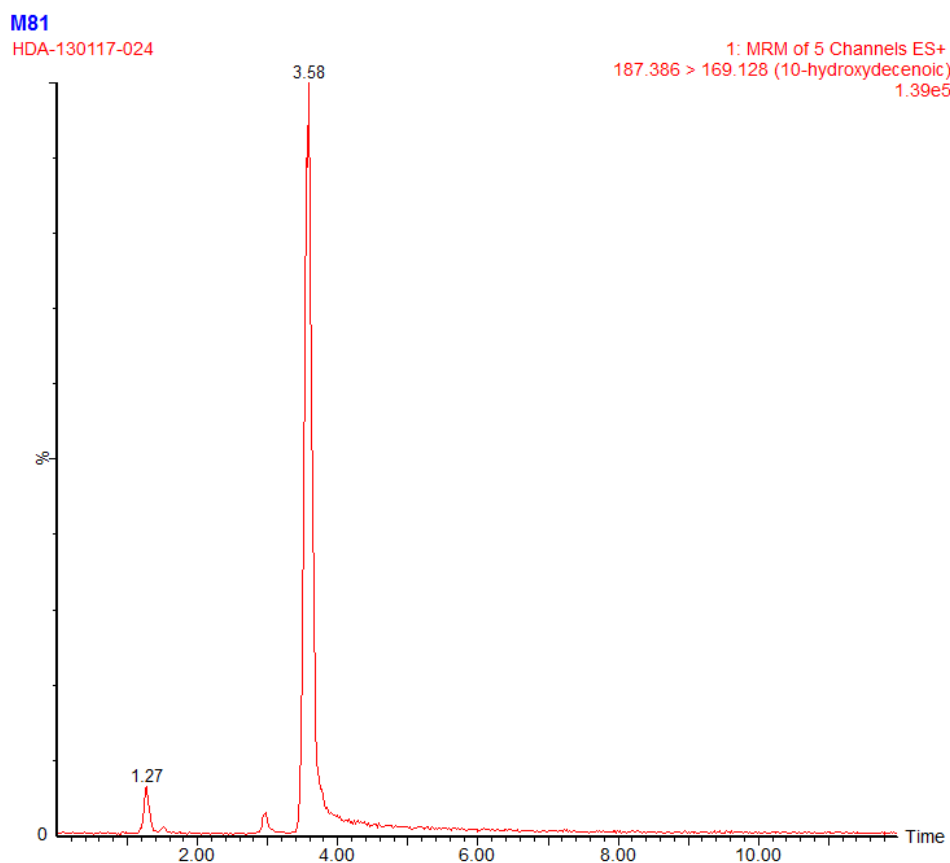


Slika 11: Vsebnost maščob (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka
Rdeči črti predstavljata mejne vrednosti vsebnosti maščob po standardih kakovosti (Sabatini in sod., 2009).

Rezultati vsebnosti maščob za posamezne vzorce matičnega mlečka so predstavljeni na sliki 11. Razvidno je, da so vsi vzorci ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009) in sicer, da mora biti vsebnost maščob v svežem matičnem mlečku v območju med 3 g/100 g in 8 g/100 g (rdeči črti na sliki).

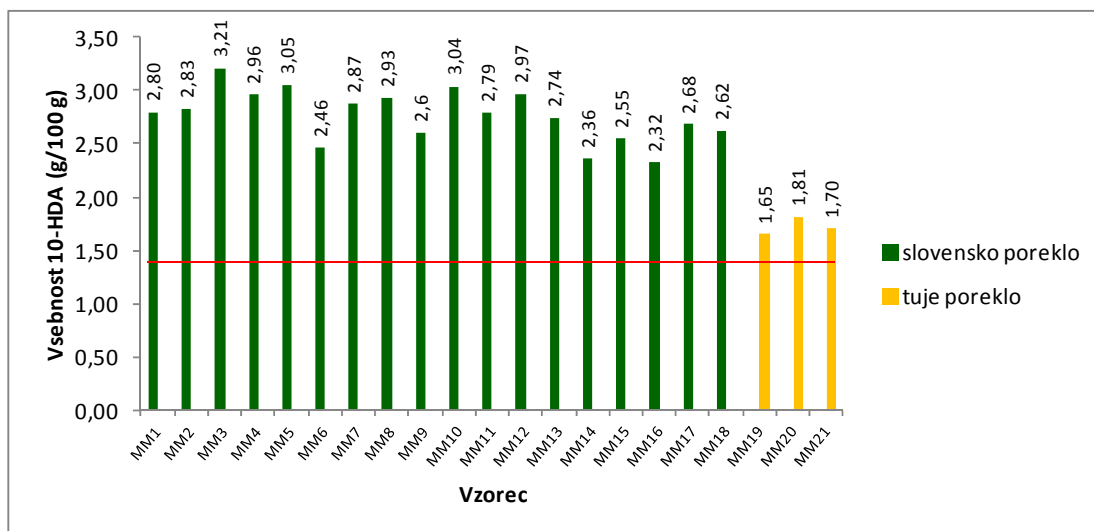
4.6.1 Rezultati določanja vsebnosti 10-HDA v vzorcih matičnega mlečka

Vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku smo določili s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masnim spektrometrom (LC/MS). Kromatogram vzorca matičnega mlečka je prikazan na sliki 12. Retenzijski čas 10-hidroksidecenojske kisline je znašal 3,58 minut.



Slika 12: Kromatogram vzorca matičnega mlečka

Iz preglednice 3 je razvidno, da je bila povprečna vsebnost 10-HDA vzorcev matičnega mlečka slovenskega porekla 2,77 g/100 g, medtem ko je bila povprečna vsebnost 10-HDA vzorcev matičnega mlečka tujega porekla precej manjša, in sicer le 1,72 g/100 g. Dobljeni rezultati so v skladu z rezultati tujih raziskovalcev. Wrytrychowski in sod. (2013) ugotavljajo, da vzorci MM neevropskega porekla vsebujejo manj 10-HDA v primerjavi z vzorci iz Italije in Francije. Ferioli in sod. (2007) prav tako ugotavljajo, da vzorci MM neevropskega porekla, vsebujejo manj 10-HDA v primerjavi z vzorci italijanskega MM.

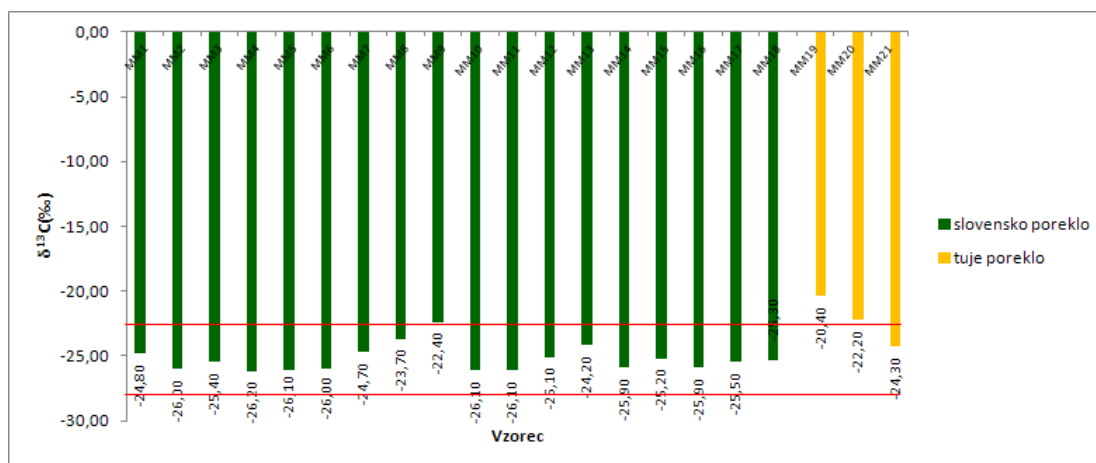


Slika 13: Vsebnost 10-HDA (g/100 g) v vzorcih matičnega mlečka
 Rdeča črta predstavlja mejne vrednosti vsebnosti 10-HDA po standardih kakovosti (Sabatini in sod., 2009).

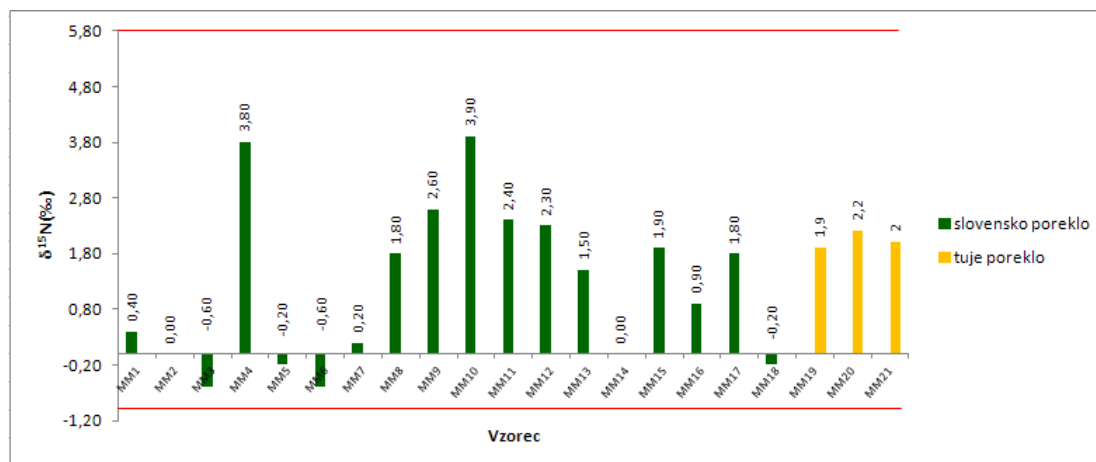
Rezultati vsebnosti 10-HDA za posamezne vzorce matičnega mlečka so predstavljeni na sliki 13. Razvidno je, da so vsi vzorci ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009) ki določajo, da mora svež matični mleček vsebovati vsaj 1,4 g 10-HDA/100 g (rdeča črta na sliki).

4.7 REZULTATI IZOTOPSKE SESTAVE

Izotopsko sestavo (vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$) matičnega mlečka smo določali z metodo IRMS. Iz preglednice 3 je razvidno, da je bila povprečna vrednost $\delta^{13}\text{C}$ v matičnem mlečku slovenskega porekla -25,25 ‰, medtem ko je bila v vzorcih matičnega mlečka tujega porekla nekoliko višja, in sicer -22,30 ‰. Povprečna vrednost $\delta^{15}\text{N}$ v matičnem mlečku slovenskega porekla je bila 1,22 ‰, medtem ko je bila v vzorcih matičnega mlečka tujega porekla višja, in sicer 2,03 ‰.



Slika 14: Vrednost $\delta^{13}\text{C}$ (‰) v vzorcih matičnega mlečka
Rdeči črti predstavljata mejne vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ po standardih kakovosti (Daniele in sod., 2011).



Slika 15: Vrednost $\delta^{15}\text{N}$ (‰) v vzorcih matičnega mlečka
Rdeči črti predstavljata mejne vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ po standardih kakovosti (Daniele in sod., 2011).

Rezultati vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ za posamezne vzorce matičnega mlečka so predstavljeni na slikah 14 in 15. Razvidno je, da smo najnižjo vrednost $\delta^{13}\text{C}$, in sicer -26,1 ‰ določili pri štirih vzorcih matičnega mlečka slovenskega porekla, vzorec z oznako MM10 je poleg tega imel tudi najvišjo vrednost $\delta^{15}\text{N}$, in sicer 3,9 ‰. Najmanj negativno (najvišjo) vrednost $\delta^{13}\text{C}$, in sicer -20,4 ‰ smo določili v vzorcu z oznako MM19, za katerega smo predvidevali, da je kitajskega porekla. Najnižjo vrednost $\delta^{15}\text{N}$, in sicer -0,6 ‰ smo določili v dveh vzorcih matičnega mlečka slovenskega porekla. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ vseh vzorcev slovenskega matičnega mlečka, z izjemo vzorca MM9, so ustrezale mejam (območju pristnosti), ki so jih postavili Daniele in sod. (2011), in sicer da vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v naravnem MM variirajo v območju med -27,9 in -22,48 ‰ (rdeči črti na sliki 14). Vzorcju z oznako MM9 smo določili vrednost $\delta^{13}\text{C}$ izven tega območja (-22,40 ‰). Če bi upoštevali

območje pristnosti, ki so ga v svoji raziskavi definirali Stocker in sod. (2006) (-26,7 do -24,9 ‰), bi bilo 5 vzorcev slovenskega MM izven postavljenih mej. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ pri dveh vzorcih MM tujega porekla (MM19 in MM20) niso ustrezale mejam, ki so jih postavili Daniele in sod. (2011). Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ vseh analiziranih vzorcev slovenskega in tujega MM so bile v območju vrednosti, ki so jih v svojih raziskavah določili Stocker in sod. (2006) ter Daniele in sod. (2011), med -1,1 in 5,8 ‰ oz -1,58 in 7,89 ‰.

4.8 PRIMERJAVA NAŠIH REZULTATOV Z REZULTATI TUJIH AVTORJEV

V preglednici 4 je prikazana primerjava rezultatov analiz slovenskega matičnega mlečka z rezultati drugih avtorjev. Podane so povprečne vrednosti in območja analiziranih parametrov.

Preglednica 4: Primerjava rezultatov analiz slovenskega matičnega mlečka s tujimi raziskavami

Parameter	Slovenija* (n=18)	Francija** (n=500)	Apifresh*** (interval)	Brazilija**** (n=7)
	povprečje (interval)	povprečje (interval)		povprečje (interval)
vsebnost vode (g/100 g)	64,8 (62,0 – 66,7)	65,3 (60,3 – 69,3)	(63,24 – 70,21)	63,2 (61,5 – 67,6)
vsebnost pepela (g/100 g)	1,07 (0,94 – 1,23)	/	(0,86 – 1,52)	1,06 (0,93 – 1,17)
vrednost pH	4,30 (4,08 – 4,48)	/	(2,96 – 4,85)	/
kislost (ml 0,1 M NaOH/g)	3,90 (3,27 – 4,46)	/	(3,71 – 4,85)	/
vsebnost beljakovin (g/100 g)	12,6 (11,6 – 13,6)	13,9 (11,4 – 16,9)	(11,25 – 17,19)	13,1 (12,0 – 14,0)
vsebnost maščob (g/100 g)	5,14 (4,44 – 6,19)	/	(2,44 – 5,47)	3,28 (2,17 – 4,22)
vsebnost 10-HDA (g/100 g)	2,77 (2,32 – 3,21)	2,3 (1,4 – 3,7)	(1,37 – 3,32)	2,53 (1,58 – 3,39)
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-25,25 (-26,1 do -22,4)	-25,18 (-27,64 do -22,40)	(-28,27 do -21,55)	/
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	1,22 (-0,6 do 3,9)	2,36 (-1,58 do 6,48)	/	/

*naša raziskava; **Wytrychowski in sod. (2013); ***Bakan in sod. (2013); ****Garcia-Amoedo in Almeida-Muradian (2007)

/: ni podatka

Iz zgornje preglednice lahko razberemo, da so rezultati analiz slovenskega MM primerljivi z rezultati tujih raziskav MM. Rezultati določanja vsebnosti vode, pepela, beljakovin ter 10-HDA (območja vrednosti) v analiziranih vzorcih slovenskega MM se najbolj ujemajo z rezultati, ki jih za omenjene parametre navajata Garcia-Amoedo in Almeida-Muradian (2007). Območje vrednosti pH ter kislosti naših analiziranih vzorcev je ožje v primerjavi z rezultati, ki jih v svoji raziskavi navajajo Bakan in sod. (2013). Rezultati vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v slovenskih vzorcih MM so najbolj primerljivi z rezultati vrednosti $\delta^{13}\text{C}$, ki so jih v 500 naravnih vzorcih francoskega MM določili Wytrychowski in sod. (2013). Najbolj se naši

rezultati od rezultatov tujih raziskav MM različnega geografskega porekla razlikujejo v dveh parametrih, in sicer v vsebnosti maščob ter vrednosti $\delta^{15}\text{N}$. Analizirani vzorci slovenskega MM vsebujejo bistveno več maščob in imajo približno dvakrat nižjo vrednost $\delta^{15}\text{N}$.

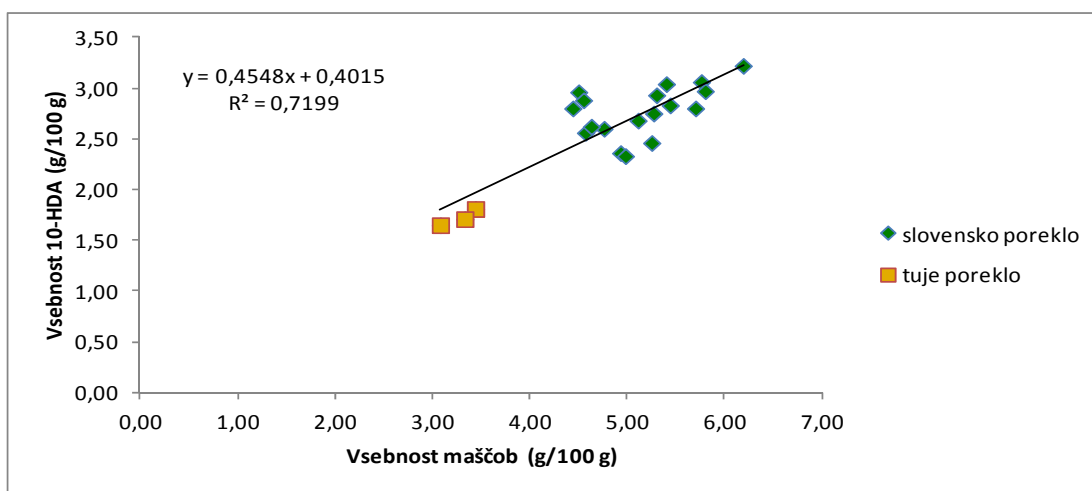
4.9 REZULTATI STATISTIČNE OBDELAVE

4.9.1 Korelacije med posameznimi parametri

Korelacijsko analizo smo opravili s pomočjo računalniškega programa SPSS. Rezultati, ki smo jih dobili s korelacijsko analizo so prikazani v prilogi A2. V nadaljnjo razpravo rezultatov smo vključili povezave, ki so imele koeficient korelacije nad 0,7.

Vsebnost beljakovin je v negativni korelaciji z vsebnostjo vode, in sicer znaša vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta -0,83. Visok koeficient korelacije je tudi med vsebnostjo maščob in vsebnostjo vode, in sicer znaša 0,76. Prav toliko znaša koeficient korelacije za zvezo med vsebnostjo vode in vsebnostjo 10-HDA. Omenjene korelacije so statistično značilne pri 0,01 stopnji tveganja. Kislost je v negativni korelaciji z vsebnostjo beljakovin, in sicer znaša vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta -0,79. Z vsebnostjo beljakovin je v negativni korelaciji poleg kislosti tudi vsebnost maščob (Pearsonov koeficient korelacije znaša -0,75). Omenjene korelacije so statistično značilne pri 0,01 stopnji tveganja.

Na sliki 16 je prikazana zveza med vsebnostjo 10-HDA in vsebnostjo maščob. Grafični prikaz linearne regresije smo naredili s pomočjo programa Excel. Izračunali smo tudi koeficient determinacije (R^2).



Slika 16: Zveza med vsebnostjo 10-HDA (g/100 g) in vsebnostjo maščob (g/100 g) v analiziranih vzorcih matičnega mlečka

Ugotovili smo, da obstaja pozitivna zveza med vsebnostjo maščob in vsebnostjo 10-HDA v matičnem mlečku. Vzorci MM z večjo vsebnostjo maščob imajo posledično več 10-HDA, zvezo lahko opišemo z regresijskim modelom $y = 0,4548x + 0,4015$. Koeficient determinacije znaša 0,72, kar pomeni, da neodvisna spremenljivka vsebnost maščob pojasnjuje 72 % variance vrednosti 10-HDA. Vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta znaša 0,849, kar pomeni, da sta spremenljivki dobro povezani. Zveza je statistično značilna pri 0,01 stopnji tveganja. Prav tako je s slike 16 razvidno, da se vzorci MM tujega porekla dobro ločijo od vzorcev MM slovenskega porekla (vzorci MM tujega porekla vsebujejo manj maščob in manj 10-HDA).

Iz priloge A2 lahko razberemo, da je vsebnost 10-HDA v MM v negativni zvezi tudi z vsebnostjo beljakovin (Pearsonov koeficient korelacije znaša -0,74), kar pomeni, da več beljakovin kot vsebuje MM, manjša je vsebnost 10-HDA. Vsebnost 10-HDA pa je v pozitivni korelaciji z vrednostjo pH.

4.9.2 Vpliv geografskega porekla

Ugotavljali smo ali geografsko poreklo vpliva na posamezne parametre matičnega mlečka. Obravnavali smo naslednje parametre: vsebnost vode, vrednost pH, vsebnost pepela, vsebnost beljakovin, kislost, vsebnost maščob, vsebnost 10-HDA in izotopsko sestavo - vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$.

Uporabili smo Levenov test, ki nam je podal statistično značilnost za vsak analiziran parameter posebej. Vsi parametri, z izjemo vrednosti $\delta^{15}\text{N}$, so imeli statistično značilnost večjo od 0,05. Pri teh parametrih smo potrdili ničelno hipotezo (potrdili homogenost vzorcev) in s tem ugotovili, da različne vzorce matičnega mlečka lahko primerjamo med seboj.

S t-testom smo preverili vpliv geografskega porekla (slovenski in tuji vzorci) na analizirane parametre posameznih vzorcev matičnega mlečka. V preglednici 5 so zbrane povprečne vrednosti merjenih parametrov glede na geografsko poreklo MM in stopnje značilnosti.

T-test nam je podal stopnjo značilnosti analiziranih parametrov za posamezne vzorce matičnega mlečka glede na geografsko poreklo. Ničelna domneva trdi, da so povprečja po obravnavanjih enaka, osnovna pa, da obstaja vsaj en par, kjer povprečji po obravnavanjih nista enaki. V primeru, da je bila stopnja značilnosti manjša od izbrane stopnje tveganja ($p < 0,05$), smo ničelno domnevo zavrnil in sprejeli osnovno. S tem smo potrdili, da v povprečnih vrednostih analiziranih parametrov po obravnavanjih obstajajo statistično značilne razlike med vzorci matičnega mlečka slovenskega in tujega porekla.

Preglednica 5: Povprečne vrednosti analiziranih parametrov v matičnem mlečku glede na geografsko poreklo in rezultati t-testa

Merjeni parameter	Poreklo matičnega mlečka	n	t-test	
			$\bar{x}$	Sig.
vsebnost vode (g/100 g)	slovensko	18	64,8	0,000*
	tuje	3	60,4	0,000*
vsebnost pepela (g/100 g)	slovensko	18	1,07	0,045*
	tuje	3	1,17	0,079
vrednost pH	slovensko	18	4,3	0,001*
	tuje	3	4,1	0,000*
kislost (ml 0,1 M NaOH/g)	slovensko	18	3,90	0,000*
	tuje	3	3,0	0,015*
vsebnost beljakovin (g/100 g)	slovensko	18	12,6	0,000*
	tuje	3	14,7	0,000*
vsebnost maščob (g/100 g)	slovensko	18	5,14	0,000*
	tuje	3	3,3	0,000*
vsebnost 10-HDA (g/100 g)	slovensko	18	2,77	0,000*
	tuje	3	1,72	0,000*
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	slovensko	18	-25,25	0,001*
	tuje	3	-22,30	0,114
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	slovensko	18	1,22	0,347
	tuje	3	2,03	0,031*

N: število vzorcev, $\bar{x}$: povprečna vrednost, *statistično značilen rezultat ($p < 0,05$)

Pri skoraj vseh obravnavanih parametrih je bila stopnja tveganja manjša od 0,05, zato smo ničelno hipotezo zavrnili in sprejeli osnovno domnevo, s tem pa potrdili, da med povprečnimi vrednostmi po obravnavanih obstajajo statistično značilne razlike. Pri vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ smo ničelno hipotezo sprejeli, saj je bila stopnja tveganja večja od 0,05. Ugotovili smo, da slovenskih in tujih vzorcev matičnega mlečka ni mogoče razlikovati glede na omenjen parameter.

Nato smo naredili še neparametrični Mann-Whitneyev U test, ki je izpostavil enake parametre kot t-test. Rezultati so podani v prilogi A3. Stopnja tveganja je bila za naslednje analizirane parametre manjša od 0,05: vsebnost vode, vrednost pH, vsebnost pepela, vsebnost beljakovin, kislost, vsebnost maščob in vsebnost 10-HDA ter vrednost $\delta^{13}\text{C}$. Pri omenjenih parametrih smo ničelno hipotezo zavrnili in s tem potrdili, da se vzorci matičnega mlečka statistično razlikujejo glede na geografsko poreklo. Stopnja tveganja je bila za parameter $\delta^{15}\text{N}$ večja od 0,05, zato smo ničelno hipotezo sprejeli in s tem potrdili, da v omenjenem parametru ni statističnih razlik glede na geografsko poreklo.

4.9.2.1 Rezultati multivariatne analize (PCA in LDA)

Razlike v posameznih analiziranih parametrih matičnega mlečka so predstavljene v preglednici 3, ki obravnava posamezne kemijske parametre glede na geografsko poreklo matičnega mlečka.

Dobljene podatke o kemijskih parametrih in izotopski sestavi vseh vzorcev matičnega mlečka smo uporabili za razvrščanje vzorcev v skupine s statističnima metodama PCA in LDA. Najprej smo uporabili test PCA (slika 19). Pred metodo glavnih komponent smo naredili dva predtesta. Kaiser-Mayer-Olkinov test meri primernost podatkov za izvedbo analize in zavzema vrednosti med 0 in 1. V našem primeru smo dobili vrednost 0,710, kar je zadovoljivo, saj smo si želeli vrednosti blizu 1, kar nakazuje, da so vzorci povezanosti relativno kompaktni in bodo nastali faktorji zanesljivi. Z Bartlettovim testom smo dobili stopnjo značilnosti, ki je v našem primeru znašala $p < 0,001$, torej statistično značilen rezultat (stopnja značilnosti manjša od 0,05). Oba testa sta pokazala, da smemo nadaljevati s statistično analizo.

Pri analizi glavnih osi (PCA) smo določili parametre, ki največ prispevajo k razlikam med analiziranimi vzorci matičnega mlečka. Za analizo smo uporabili vse analizirane parametre. Iz preglednice 6 je razvidno, da se s prvo komponento (osjo) pojasni 57,4 % variabilnosti, z drugo osjo pa še 15,9 % variabilnosti med posameznimi vzorci. Torej lahko s prvima dvema komponentama (osema) pojasnimo približno 73 % variabilnosti osnovnih spremenljivk.

Preglednica 6: Rezultati analize glavnih komponent za vse analizirane parametre

Komponenta	skupna vrednost	% pojasnjene variance	% kumulative
1	5,164	57,374	57,374
2	1,429	15,878	73,252

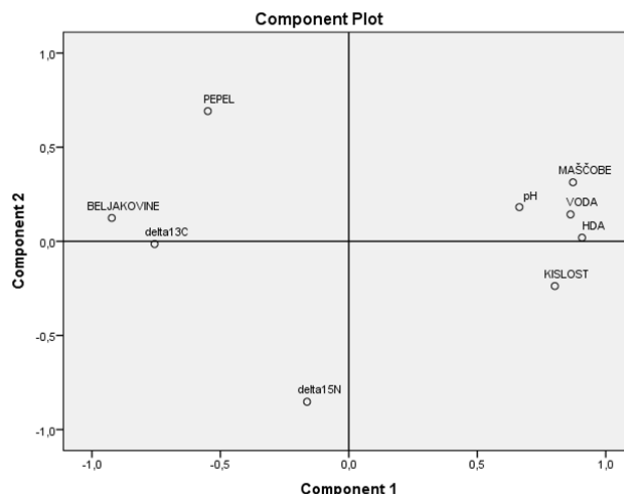
Vrednosti posameznih komponent glede na analiziran parameter so predstavljene v preglednici 7.

Preglednica 7: Vrednosti komponente 1 in komponente 2 glede na analiziran parameter

Parameter	Komponenta 1	Komponenta 2
vsebnost vode	0,863	0,143
vrednost pH	0,664	0,182
vsebnost pepela	-0,549	0,692
vsebnost beljakovin	-0,923	0,124
kislost	0,802	-0,237
vsebnost maščob	0,872	0,313
vsebnost 10-HDA	0,907	0,019
$\delta^{13}\text{C}$	-0,756	-0,014
$\delta^{15}\text{N}$	-0,163	-0,852

Čim višja je absolutna vrednost, tem bolj je parameter pomemben. Parametri, ki pomembno vplivajo na predstavljanje določene komponente, so odebeljeni. Prvo komponento najbolj predstavljajo naslednji parametri: vsebnost vode, vrednost pH, vsebnost beljakovin, kislost, vsebnost maščob, vsebnost 10-HDA in vrednost $\delta^{13}\text{C}$. Drugo komponento najbolj predstavljata vsebnost pepela in vrednost $\delta^{15}\text{N}$.

Analizirane prametere lahko predstavimo tudi grafično v štirih kvadrantih (slika 17).

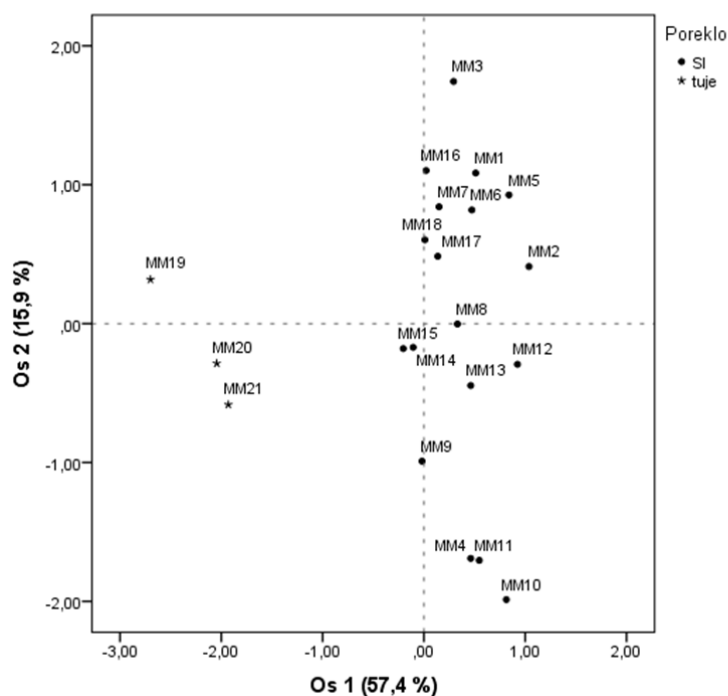


Slika 17: Analizirani parametri predstavljeni v štirih kvadrantih

S slike 17 lahko razberemo naslednje:

- vzorci se v levem spodnjem kvadrantu najbolj razlikujejo po vrednosti $\delta^{15}\text{N}$,
- vzorci ob glavni vodoravni osi se najbolj razlikujejo po vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in vsebnosti 10-HDA,
- vzorci v desnem spodnjem kvadrantu se najbolj razlikujejo od drugih vzorcev po kislosti,
- vzorci v levem zgornjem kvadrantu se od drugih vzorcev najbolj razlikujejo po vsebnosti pepela in beljakovin,
- vzorci v desnem zgornjem kvadrantu se od drugih vzorcev najbolj razlikujejo po vsebnosti maščob, vode in vrednosti pH.

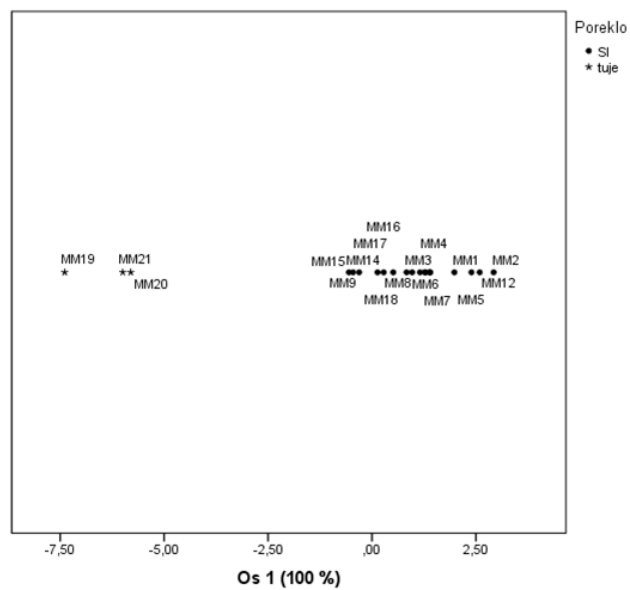
Pri metodi glavnih komponent dobimo izračunane vrednosti glavnih osi za vsak posamezen vzorec. Na sliki 18 so rezultati predstavljeni z razsevnim grafikonom. Razvidno je, da se tuji vzorci dobro ločijo od vzorcev slovenskega matičnega mlečka. Vzorci matičnega mlečka tujega porekla tvorijo ločeno skupino, v kateri se vzorca MM20 (kitajsko poreklo) in MM21 (bolgarsko poreklo) med seboj slabše ločita.



Slika 18: Razvrstitev posameznih vzorcev matičnega mlečka z metodo PCA

S slik 17 in 18 je, ob upoštevanju povprečnih vrednosti analiziranih parametrov glede na geografsko poreklo, ki so podane v preglednici 5, razvidno, da vzorci slovenskega matičnega mlečka (MM1 - MM18) v primerjavi z vzorci tujega izvora (MM19 - MM21) vsebujejo statistično značilno več vode, maščob in 10-hidroksi-2-decenojske kisline (10-HDA) ter manj beljakovin. Poleg tega lahko vidimo, da se vzorec MM19 od ostalih vzorcev najbolj razlikuje po vsebnosti beljakovin in pepela, vzorca MM20 in MM21 pa se od ostalih vzorcev najbolj ločita po vrednosti $\delta^{13}\text{C}$. Prav tako slika 18 razloži že zgoraj omenjen delež pojasnitve variabilnosti med spremenljivkami. Os 1 pojasni 57,4 % variabilnosti med vzorci matičnega mlečka, os 2 pa 15,9 % variabilnosti, skupno torej 73,3 %.

Pri LDA metodi smo uporabili vse analizirane parametre. Že s prvo osjo smo pojasnili 100 % variabilnosti vhodnih podatkov. S slike 19 je, tako kot pri metodi PCA, razvidno, da se vzorci slovenskega matičnega mlečka (MM1 – MM18) dobro ločijo od vzorcev matičnega mlečka tujega izvora (M19 – MM21). Na osnovi vseh obravnavanih parametrov smo s 100 % uspešnostjo razvrstili posamezne vzorce glede na geografsko poreklo.



Slika 19: Razvrstitev posameznih vzorcev matičnega mlečka z metodo LDA

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen magistrske naloge je bila karakterizacija slovenskega matičnega mlečka. Z analizami smo želeli določiti osnovne značilnosti slovenskega matičnega mlečka. V raziskavo smo vključili 21 vzorcev svežega MM, od tega 18 vzorcev matičnega mlečka slovenskega porekla in 3 vzorce matičnega mlečka tujega porekla. Analizirali smo osnovne kemijske parametre, in sicer vsebnost vode, vsebnost pepela, vrednost pH, vsebnost kislin, vsebnost beljakovin, vsebnost maščob, vsebnost 10-hidroksi-2-decenojske kisline in izotopsko sestavo. S statistično analizo smo želeli ugotoviti ali obstajajo razlike v vrednostih analiziranih parametrov med posameznimi vzorci matičnega mlečka ter določiti parametre za določanje pristnosti slovenskega matičnega mlečka in s tem omogočiti kontrolo matičnega mlečka tujega porekla na slovenskem tržišču.

Pričakovali smo, da bomo z analizo večjega števila vzorcev slovenskega matičnega mlečka lahko definirali standardno sestavo ter parametre kakovosti tega čebeljega pridelka. Rezultati analiz posameznih kemijskih parametrov predstavljajo osnovo za definiranje standardne sestave slovenskega matičnega mlečka, saj se vrednosti analiziranih parametrov med posameznimi vzorci MM niso zelo razlikovale (priloga A1), prav tako pa so vsi parametri slovenskega MM ustrezali postavljenim standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009, preglednica 1). Poleg tega so rezultati analiz slovenskega MM primerljivi z rezultati tujih avtorjev (preglednica 4). Na podlagi rezultatov naših analiz smo predlagali okvirna območja za sestavo slovenskega matičnega mlečka (preglednica 8). Za potrditev pa bi potrebovali večje število vzorcev ter standardizirane metode za analize MM.

Preglednica 8: Predlagano območje sestave svežega matičnega mlečka slovenskega porekla

Parameter	$x_{min}-x_{max}$
vsebnost vode (g/100 g)	60,0-70,0
vsebnost pepela (g/100 g)	0,8-1,5
vrednost pH	3,8-4,6
kislost (ml 0,1 M NaOH/ g)	3,0-5,0
vsebnost beljakovin (g/100 g)	11,0-14,0
vsebnost maščob (g/100 g)	4,0-7,0
vsebnost 10-HDA (g/100 g)	> 2
$\delta^{13}C$ (‰)	-26,0- (-22,5)
$\delta^{15}N$ (‰)	0,5-4,5

Vsebnost nekaterih komponent matičnega mlečka je konstantna, tako je na primer konstantna vsebnost vode zagotovljena že znotraj čebelnjaka (Sabatini in sod., 2009). Vsebnost vode v vzorcih slovenskega MM je bila dokaj izenačena (62,0-66,7 g/100 g), povprečno pa je MM slovenskega porekla vseboval 64,8 g/100 g vode. Prav tako je

koncentracija mineralov in elementov v sledovih v MM konstantna zaradi homeostatskega uravnavanja s strani čebel dojlj (Stocker in sod., 2006). Pričakovano je bila vsebnost pepela v vzorcih slovenskega MM zelo izenačena (0,94-1,23 g/100 g), tudi zaradi tega, ker klimatske razmere na vsebnost pepela ne vplivajo (Wongchai in Ratanavalachai, 2002). Podobno opazimo tudi pri vrednosti pH; naša analiza merjenja vrednosti pH je pokazala, da imajo vzorci slovenskega MM povprečno vrednost pH 4,3, kar je v skladu z rezultati, ki so jih določili Olimpia in sod. (2008). Kislost MM je variirala med 3,27 in 4,46 ml 0,1 M NaOH/g, kar je značilno za svež matični mleček. Za razliko od vsebnosti pepela in vrednosti pH MM, katerih vrednosti se s klimatskimi razmerami ne spreminjajo, pa sezonske razlike lahko vplivajo na vsebnost beljakovin in vsebnost maščob (Wongchai in Ratanavalachi, 2002). To bi lahko bil razlog za variabilnost rezultatov vsebnosti beljakovin in vsebnosti maščob tudi v slovenskem matičnem mlečku, saj so slovenski čebelarji, pri katerih smo vzorčili matični mleček, le-tega pobirali v različnih časovnih obdobjih, od maja do avgusta 2012. Vsebnost beljakovin je v slovenskem MM variirala med 11,6 in 13,6 g/100 g, vsebnost maščob pa med 4,44 in 6,19 g/100 g. Rezultati vsebnosti maščob, kot tudi vrednosti $\delta^{15}\text{N}$, določeni v naši raziskavi, so se najbolj razlikovali od rezultatov tujih avtorjev. Odstopanja so lahko posledica različnih dejavnikov. Do razlik lahko pride zaradi različnega vzorčenja in zaradi različnih analiznih metod, saj do danes še ne obstajajo referenčne metode za določanje osnovnih parametrov MM. Do razlik najverjetneje prihaja tudi zaradi različnih zunanjih dejavnikov.

Določitev standardne sestave MM je pomembna za kontrolo trga in zaščito potrošnika (Daniele in Casabianca, 2012), ter bistvena za oceno njegove kakovosti. Predvidevali smo, da bodo rezultati raziskave omogočili izbor parametrov za določanje pristnosti MM in s tem kontrolo MM tujega porekla na slovenskem tržišču. Najpogosteje uporabljeni kriteriji kakovosti in pristnosti MM so sestava sladkorjev, vsebnost vode, vsebnost beljakovin ter vsebnost 10-HDA. Ker je vsebnost vode v MM konstantna (Sabatini in sod., 2009) in prevelika, ni dober pokazatelj izvora matičnega mlečka. Enako lahko trdimo za vsebnost beljakovin; povprečno slovenski MM vsebuje 12,6 g/100 g beljakovin. Najpomembnejši kriterij pristnosti matičnega mlečka je vsebnost 10-HDA, saj je to maščobna kislina, ki jo je v MM največ in je ne najdemo v nobenem drugem naravnem proizvodu. Vsebnost 10-HDA je v vzorcih slovenskega MM variirala med 2,32 in 3,21 g/100 g.

Poleg vsebnosti 10-HDA je pomemben parameter za ugotavljanje morebitne potvorjenosti MM določitev izotopske sestave MM. Številni avtorji (Stocker in sod., 2006, Daniele in sod., 2011, Wytrychowski in sod., 2013) navajajo podobne rezultate analiz ogljikovih in dušikovih izotopov, kot smo jih določili v naši raziskavi. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ slovenskega MM so variirale med -26,1 in -22,4 ‰ in so, z izjemo vzorca MM9, ustrezale območju pristnosti, ki so ga postavili Daniele in sod. (2011) (od -27,9 do -22,48 ‰). Če pa bi upoštevali območje pristnosti, ki so ga definirali Stocker in sod. (2006) (-26,7 do -24,9 ‰),

bi bilo 5 vzorcev slovenskega MM izven postavljenih mej. Visoke $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti so tipične za koruzni sirup in sirup sladkornega trsa, ki imata različno vsebnost ^{13}C zaradi različne fotosintetske poti, ki jo te rastline uporabljajo. Zaradi razlik v izotopski sestavi C_3 in C_4 rastlin, lahko zaznamo potvorjenost MM s temi sladkorji. Tako lahko ločimo med MM, proizvedenim na tradicionalen način, in industrijskim MM z uporabo dodanih sladkorjev (višje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ sladkornega trsa in koruze, ki sta C_4 rastlini). Na podlagi območja pristnosti, ki so ga definirali Stocker in sod. (2006) bi torej nekateri vzorci slovenskega MM lahko bili označeni kot potvorjeni, saj smo jim določili višjo $\delta^{13}\text{C}$ vrednost. Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ so se med posameznimi analiziranimi vzorci MM zelo razlikovale, in sicer so vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ variirale med -0,6 in 3,9 ‰, vsi vzorci slovenskega MM pa so ustrezali postavljenim standardom kakovosti za svež MM. Razlike v vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ so lahko posledica različnega porekla nektarja in cvetnega prahu ter časa pobiranja matičnega mlečka.

Ugotavljali smo tudi vpliv geografskega porekla na posamezne parametre MM. Pričakovali smo, da se bodo vzorci slovenskega MM statistično razlikovali od tujih vzorcev MM. S t-testom smo ugotovili, da se slovenski in tuji vzorci MM statistično razlikujejo v vseh analiziranih parametrih, z izjemo vrednosti $\delta^{15}\text{N}$. Enako so pokazali rezultati Mann-Whitneyevega U-testa, in sicer, da slovenskih in tujih vzorcev MM ni mogoče razlikovati glede na vrednost $\delta^{15}\text{N}$. Ker so med slovenskimi in tujimi (bolgarsko oziroma kitajsko poreklo) vzorci MM očitne sezonske klimatske razlike, ki lahko poleg geografskega porekla vplivajo na nekatere komponente MM, bi bilo smotrno med seboj primerjati tudi vzorce slovenskega MM in vzorce matičnega mlečka obmejnih pokrajin sosednjih držav (Hrvaška, Avstrija, Italija in Madžarska). Ker se klimatske razmere, sezonske razmere (čas pobiranja oziroma pridelave matičnega mlečka) ter botanično poreklo lahko tudi med sosednjimi državami lahko zelo razlikujejo, bi bilo potrebno določiti bazo podatkov o fizikalno-kemijskih parametrih MM, značilnih za različne regije v Sloveniji.

Z multivariatno analizo smo pokazali, da se tuji vzorci dobro ločijo od vzorcev matičnega mlečka slovenskega porekla (sliki 19 in 20). Slovenski matični mleček vsebuje statistično značilno več vode, maščob in 10-hidroksi-2-decenojske kisline ter manj beljakovin. Ti parametri bi zato lahko služili za določanje pristnosti našega matičnega mlečka in s tem kontrolo matičnega mlečka tujega porekla na slovenskem tržišču. Za potrditev pa bi morali nadaljevati z analizami večjega števila vzorcev matičnega mlečka. Potrebno je potrditi standardno sestavo slovenskega matičnega mlečka, pridobiti čim več podatkov o MM ter določiti referenčne metode za analizo matičnega mlečka.

5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov kemijskih analiz in statistične obdelave lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Vzorci slovenskega matičnega mlečka v primerjavi z vzorci tujega izvora vsebujejo statistično značilno več vode, maščob in 10-hidroksi-2-decenojske kisline ter manj beljakovin.
- Vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku je odvisna od vsebnosti maščob. Vzorci matičnega mlečka z večjo vsebnostjo maščob vsebujejo več 10-HDA. Zvezo lahko opišemo z regresijskim modelom $y = 0,4548x + 0,4015$.
- Rezultati analiz vzorcev slovenskega matičnega mlečka so primerljivi z rezultati tujih avtorjev. Večja odstopanja je zaznati samo v dveh parametrih, in sicer v vsebnosti maščob in vrednosti $\delta^{15}\text{N}$.
- Rezultati PCA in LDA analize nam pokažejo, da se tuji vzorci matičnega mlečka dobro ločijo od vzorcev matičnega mlečka slovenskega izvora, kar nam omogoča izbor parametrov za določanje pristnosti matičnega mlečka in s tem kontrolo tujega matičnega mlečka na slovenskem tržišču.
- Parametri, ki bi bili primerni za določanje porekla MM so vsebnost vode, maščob, beljakovin ter vsebnost 10-HDA.
- T-test in Mann-Whitneyev U test nam pokažeta, da obstajajo statistično značilne razlike v analiziranih parametrih glede na geografsko poreklo. Ugotovili smo, da slovenskih in tujih vzorcev med seboj ni mogoče razlikovati le glede na vrednost $\delta^{15}\text{N}$.

6 POVZETEK

Matični mleček je izloček žlez čebel dojlj in je izključno hrana matice. Je blede rumene barve in gosto tekoč, z ostrim vonjem in okusom. Sestava matičnega mlečka je dokaj kompleksna. Kemijsko je sestavljen iz vode (60-70 g/100 g), beljakovin (12-15 g/100 g), ogljikovih hidratov (10-16 g/100 g), maščob (3-6 g/100 g) ter majhnih količin mineralnih snovi, vitaminov in fenolnih spojin. Poznavanje kemijske sestave in sprememb, ki nastanejo med skladiščenjem MM, je bistveno za oceno kakovosti matičnega mlečka. Matični mleček zaradi svojih številnih pozitivnih lastnosti, kot so antioksidativno, antibakterijsko in protivnetno delovanje sodi v skupino funkcionalnih živil. Antibakterijski učinek se predpisuje predvsem prostim maščobnim kislinam, proteini in fenolne spojine pa imajo visoko antioksidativno učinkovitost. Matični mleček vsebuje številne biološko aktivne snovi, vendar pa so potrebne nadaljnje študije, da se dokaže pozitivne učinke njegovega uživanja.

Osnovni namen magistrskega dela je bila karakterizacija slovenskega matičnega mlečka, saj v Sloveniji raziskava o matičnem mlečku še ni bila izvedena. V analizo smo vključili 21 vzorcev svežega matičnega mlečka, od tega 18 vzorcev slovenskega porekla. V analiziranih vzorcih smo določili vsebnost vode, pepela, beljakovin, maščob in 10-HDA, vrednost pH, kislost ter izotopsko sestavo. Analizirane parametre smo opisali z osnovnimi statističnimi parametri ter jih z različnimi metodami statistično obdelali z namenom, da bi ugotovili ali obstajajo statistično značilne razlike med posameznimi vzorci. Rezultate smo primerjali s standardi kakovosti, ki so jih definirali Sabatini in sod. (2009) ter z razpoložljivimi podatki iz tuje literature.

Vsi parametri slovenskega matičnega mlečka so ustrezali postavljenim standardom kakovosti. Z analizo PCA in LDA smo ugotovili, da se slovenski vzorci MM dobro ločijo od vzorcev MM tujega izvora. Vzorci slovenskega MM so vsebovali statistično značilno več vode, maščob, 10-hidroksi-2-decenojske kisline ter manj beljakovin. Povprečna vsebnost vode v vzorcih MM slovenskega porekla je bila 64,8 g/100 g, vrednost pH 4,3, vsebnost pepela 1,07 g/100 g, vsebnost beljakovin 14,7 g/100 g, kislost 3,90 ml 0,1 M NaOH/g, vsebnost maščob 5,14 g/100 g, vsebnost 10-HDA 2,77 g/100 g, vrednost $\delta^{13}\text{C}$ -25,25 ‰ ter vrednost $\delta^{15}\text{N}$ 1,22 ‰.

Ugotovili smo, da obstaja zveza med vsebnostjo maščob in vsebnostjo 10-HDA v matičnem mlečku. Zvezo lahko opišemo z regresijskim modelom $y = 0,4548x + 0,4015$. Koeficient korelacije je 0,849, kar pomeni, da sta spremenljivki dobro povezani. Matični mleček z večjo vsebnostjo maščob ima posledično več 10-HDA.

Primerjava naših rezultatov z rezultati tujih avtorjev je pokazala, da so naše vrednosti primerljive z vrednostmi tujih avtorjev. Rezultati naših analiz se od rezultatov drugih

avtorjev najbolj razlikujejo v dveh parametrih, in sicer v vsebnosti maščob ter vrednosti $\delta^{15}\text{N}$.

Rezultati raziskave predstavljajo osnovo za definiranje standardne sestave slovenskega matičnega mlečka. Izpostavljeni so tudi parametri, ki bi lahko služili za določanje kakovosti in pristnosti slovenskega matičnega mlečka in omogočili tudi kontrolo matičnega mlečka tujega porekla na slovenskem tržišču.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani: 195 str.
- Adams M.J. 1998. The principle of multivariate data analysis. V: Analytical methods of food authentication. Ashurt P.R., Dennis M.J. (eds.). London, Blackie Academic and Professional: 308-336
- AOAC Official Method 998.12. c-4 plant sugars in honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International, Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 27-30
- Apifresh Project. 2010. Developing European standards for bee pollen and royal jelly: quality, safety and authenticity. Project objectives. 7th Framework Programme. Madrid, Tecnologías Avanzadas Inspiralía (ITAV): 1 str.
<http://www.apifresh.eu> (marec 2014)
- Atinelli J.-F., Zeggane S., Davico R., Rognone C., Faucon J.-P., Lizzani L. 2003. Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly. Food Chemistry, 80, 1: 85-89
- Bakan A., Aslan O., Cevikkalp SA., Oktay I., Demirtas I., Ozer H. 2013. Physicochemical characterisation of royal jellies collected from different countries. Beyond the hive: beekeeping & global challenges: scientific program: oral presentation abstracts & poster list V: XXXXIII International Apicultural Congress, 29 September - 04 October 2013, Kyiv, Ukraine. Kiev, Apimondia: 304-305
- Bărnuțiu I.L., Mărghitaș Al.L., Dezmirean S.D., Mihai M.C., Bobiș O. 2011. Chemical composition and microbial activity of royal jelly – review. Animal Science and Biotechnologies, 44, 2: 67-72
- Bastič M. 2006. Metode raziskovanja. Maribor, Univerza v Mariboru, Ekonomsko-poslovna fakulteta Maribor: 22 str.
- Bateman A.S., Kelly S.D., Woolfe M. 2007. Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 7: 2664-2670
- Biliková K., Wu G.S., Simuth J. 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. Apidologie, 32: 275-283
- Bogdanov S. 2011. The royal jelly book: Royal jelly and bee bread: harvest, composition, quality. Muehlethurneu, Bee Hexagon: 13 str.
<http://www.bee-hexagon.net> (december 2013)

- Boselli E., Fiorenza Caboni M., Sabatini G.A., Marcazzan L.G., Lercker G. 2003. Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage. *Apidologie*, 34, 2: 129-137
- Boselli E., Caboni M.F., Lercker G., Marcazzan G.L., Sabatini A.G., Baggio A., Prandin L. 2002. Valutazione di produzioni apistiche: gelatina reale e cera. V: Atti del convegno finale del Progetto Finalizzato AMA "Il ruolo della ricerca in apicoltura". Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna: 321-329
- Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 478 str.
- Boukraâ L., Meslem A., Benhanifa M., Hammoudi S.M. 2009. Synergistic effect of starch and royal jelly against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15: 755-757
- Bréas O., Reniero F., Serini G. 1994. Isotope ratio mass spectrometry: analysis of wines from different European countries. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8: 967-970
- Craig H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12: 133-149
- Chen C., Chen S. 1995. Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food Chemistry*, 54, 2: 195-200
- Chen S.L., Su S.K., Lin X.Z. 2002. An introduction to high yielding royal jelly production methods in China. *Bee World*, 83, 2: 69-77
- Daniele G., Casabianca H. 2012. Sugar composition of French royal jelly for comparison with commercial and artificial sugar samples. *Food Chemistry*, 134: 1025-1029
- Daniele G., Wytrychowski M., Batteau M., Guibert S., Casabianca H. 2011. Stable isotope ratio measurements of royal jelly samples for controlling production procedures: impact of sugar feeding. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 25, 14: 1929-1932
- DeNiro M.J., Epstein S. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45: 341-351
- Dermastia M. 2007. Pogled v rastline. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 130 str.
- Engel M.H., Macko S.A. 1993. Organic geochemistry: principles and applications. New York, London, Plenum Press: 861 str.
- Feroli F., Marcazzan L.G., Caboni F.M. 2007. Determination of (E)-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly: A comparison between a new CZE method and HPLC. *Journal of Separation Science*, 30: 1061-1069

- Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 19: 11333-11337
- Garcia-Amoedo L.H., Almeida-Muradian L.B. 2007. Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. *Quimica Nova*, 30, 2: 257-259
- Genç M., Aslan A. 1999. Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 839, 1-2: 265-268
- Ghidini S., Ianieri A., Zanardi E., Conter M., Boschetti T., Iacumin P., Bracchi P.G. 2006. Stable isotopes determination in food authentication: A review. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, 26: 193-204
- Gonzalez-Martin I., Gonzalez-Perez C., Marques-Macias E. 1997. Contribution to the study of the origin of CO₂ in sparkling wines by determination of the ¹³C/¹²C isotope ratio. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 1149-1151
- Guček M., Marsel J., Ogrinc N., Lojen S. 1998. Stable isotopes determinations in some fruit juices to detect added sugar. *Acta Chimica Slovenica*, 45, 3: 217-228
- Guo H., Saiga A., Sato M., Miyazawa I., Shibata M., Takahata Y., Morimatsu F. 2007. Royal jelly supplementation improves lipoprotein metabolism in humans. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 53: 345-348
- Honda Y., Fuyita Y., Maruyama H., Araki Y., Ichihara K., Sato A., Kojima T., Tanaka M., Nozawa Y., Ito M., Honda S. 2011. Lifespan-extending effects of royal jelly and its related substances on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 6, 8: e23527, doi: 10.1371/journal.pone.0023527: 10 str.
- Katayama M., Aoki M., Kawana S. 2008. Case of anaphylaxis caused by ingestion of royal jelly. *Journal of Dermatology*, 35, 4: 222-224
- Kelly S.D. 2003. Using stable isotope ratio mass spectroscopy (IRMS) in food authentication and traceability. V: Food authenticity and traceability. Less M. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 156-183
- Kim K.J., Son H.J., Kim H.K. 1989. A survey of analyzing in gradient of royal jelly in Korea on majoring 10-HDA. *Korean Journal of Apiculture*, 4: 34-40
- Kornel B.E., Werner T., Rossmann A., Schmidt H.-L. 1997. Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients – a possible tool for origin assignment and quality control. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 205, 1: 19-24

- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. dop. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 239 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_01.pdf
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632
- Kropf U. 2009. Elementna in izotopska sestava medu iz različnih geografskih regij Slovenije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 22-23
- Lazarini F., Brenčič J. 1992. Splošna in anorganska kemija. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 55 str.
- Lercker G., Capella P., Conte L.S., Ruini F., Giordani G. 1981. Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids. *Lipids*, 16, 12: 912-919
- Lercker G., Caboni M., Vecchi M., Sabatini A., Nanetti A., Piana L. 1985. Composizione della frazione glucidica della gelatina reale e della gelatina reale e della gelatina delle api operaie in relazione all'età, *Apicoltura*, 8: 27-37. Cit po: Zheng H.Q., Hu F.L., Dietemann V. 2010. Changes in composition of royal jelly harvested at different times: consequences for quality standards. *Apidologie*, 41: 1-9
- Liu J.R., Yang Y.C., Shi L.S., Peng C.C. 2008. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 23: 11447-11452
- Li J.R., Wang T., Zhang Z., Pan Y. 2007. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 21: 8411-8422
- Marconi E., Fiorenza Caboni M., Messina C.M., Panfili G. 2002. Furosine: a suitable marker for assessing the freshness of royal jelly. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2825-2829
- Mărghitas Al.L., Morar O., Bobiş O., Bonta V., Dezmirean D., Tofalvi M. 2010. Evaluation of fresh royal jelly in different larvae stage. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 67, 1-2: 29-35
- Messia C.M., Caboni F.M., Marconi E. 2005. Storage stability assessment of freeze-dried royal jelly by furosine determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 11: 4440-4443
- Morita H., Ikeda T., Kajita K., Fujioka K., Mori I., Okada H., Uno Y., Ishizuka T. 2012. Effect of royal jelly ingestion for 6 months on healthy volunteers. *Nutrition Journal*, 11, 77: 1-7

- Muccio Z., Jackson P.G. 2008. Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst*, 134: 213-222
- Nagai T., Inoue R. 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*, 84, 2: 181-186
- Olimpia P., Mărghitas Al.L., Dezmirean S.D., Mureșan O.L., Laslo L., Tofalvi M. 2008. A characterization about physical-chemical composition of royal jelly. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 67, 1- 2: 244-248
- Oršolić N. 2013. Učinkovitost biološki aktivnih sestavnica matične mlječi: Analiza i standardizacija. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 64: 445-461
- Pavel I.C., Mărghitaș L., Bobiș O., Dezmirean S.D., Șapcaliu A., Radoi I., Mădaș N. 2011. Biological activities of royal jelly – review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44, 2: 108-118
- Plestenjak A., Golob T. 2003. Analiza kakovosti živil. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 96-98
- Ramadan F.M., Al-Ghamdi A. 2013. Bioactive compounds and health – promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4, 1: 39-52
- Rapisarda P., Camin F., Fabroni S., Perini M., Torrisi B., Intrigliolo F. 2010. Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the d15N, d13C, d2H, d34S, and d18O values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6: 3502-3506
- Rovan J. 2006. Metoda glavnih komponent. Ljubljana, Ekonomska fakulteta: 13 str.
http://miha.ef.uni-lj.si/_dokumenti3plus2/192138/Metoda_glavnih_komponent_2006.pdf
(julij 2013)
- Sabatini G.A., Marcazzan L.G., Caboni F.M., Bogdanov S., Bicudo de Almeida-Muradian L. 2009. Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 1: 16-21
- Savarase M., De Marco E., Sacchi R. 2007. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105, 2: 761-770
- Sesta G., Lusco L. 2008. Refractometric determination of water content in royal jelly. *Apidologie*, 39: 225-232
- Sesta G. 2006. Sviluppo di metodologie analitiche per la determinazione di residue la caratterizzazione applicate alla gelatin reale. Tesi di Dottorato. Sapienza, Università Degli Studi la Sapienza. Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali Dipartimento di Chimica: 114 str.

http://padis.uniroma1.it/bitstream/10805/1064/1/Sesta_RoyalJelly_residues_characterization.pdf (marec, 2014)

- Scarselli R., Donadio E., Giuffrida G.M., Fortunato D., Conti A., Balestreri E. 2005. Towards royal jelly proteome. *Proteomics*, 5, 2: 769-776
- Schmitzova J., Klaudiny J., Albert S., Schroder W., Schreckengost W., Hanes J. 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54: 1020-1030
- Stocker A., Rossmann A., Kettrup A., Bengsch E. 2006. Detection of royal jelly adulteration using carbon and nitrogen stable isotope ratio analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2: 181-184
- Šimúth J. 2001. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 32, 1: 69-80
- Šimúth J., Bíliková K., Kováčová E. 2003. Royal jelly proteins as a tool for development of functional ingredients for health. *Apimondia Journal*: 1-5
- Uno G., Storey R., Moore R. 2001. *Principles of botany*. New York, The McGraw Hill Companies: 245-249
- Werner R.A., Schmidt H.L. 2003. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds – review. *Phytochemistry*, 61: 465-484
- Wongchai V., Ratanavalachai T. 2002. Seasonal variation of chemical composition of royal jelly produced in Thailand. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 7, 2: 1-8
- Wytrychowski M., Daniele G. 2012. Combination of sugar analysis and stable isotope ratio mass spectrometry to detect the use of artificial sugars in royal jelly production. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403: 1451-1456
- Wytrychowski M., Chenavas, Gaëlle D., Casabianca H., Batteau M., Guibert S., Brion B. 2013. Physicochemical characterization of French royal jelly: Comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 2: 126-133
- Zheng H.Q., Hu F.L., Dietemann V. 2010. Changes in composition of royal jelly harvested at different times: consequences for quality standards. *Apidologie*, 41: 1-9
- Zhou J., Zhao J., Yuan H., Meng Y., Li Y., Wu L., Xue X. 2007. Comparison of UPLC and HPLC for determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in royal jelly by ultrasound-assisted extraction with internal standard. *Chromatographia*, 66, 3-4: 185-190

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, Samozaložba: 5-38

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se rada zahvalila vama, mami in ati, da sta mi omogočila študij in me vseskozi podpirala na vseh področjih ter sestri Nini za prijateljske nasvete. Posebej hvala stari mami in staremu atu, ki sta vedno z zanimanjem spremljala napredek moje magistrske naloge.

Ob tej priložnosti se iskreno zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. Jasni Bertoncely za vso pomoč, trud, potrpežljivost in strokovne nasvete pri nastajanju magistrske naloge.

Hvala somentorju doc. dr. Tomažu Polaku za strokovne nasvete in skrben pregled magistrske naloge.

Hvala recenzentu prof. dr. Rajku Vidrihu za hiter in natančen pregled magistrske naloge.

Lini Burkan Makivić se iskreno zahvaljujem za pregled referenc in za končni pregled magistrske naloge ter prijaznost.

Za prijetno vzdušje ter pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem vsem zaposlenim na Katedri za vrednotenje živil.

Jerca in Damir, vama iskrena hvala za vse nasvete, podporo in pomoč med študijem ter zabavno popestritev študentskih let.

Največja zahvala pa gre tebi Matej, ker verjameš vame in me spodbujaš.

PRILOGE

Priloga A1. Rezultati kemijske sestave posameznih vzorcev matičnega mlečka.

Vzorec	Poreklo	Vsebnost vode (g/100 g)	Vsebnost pepela (g/100 g)	Vrednost pH	Kislost (ml 0,1 N NaOH/g)	Vsebnost beljakovin (g/100 g)	Vsebnost maščob (g/100 g)	Vsebnost 10-HDA (g/100 g)	Izotopska sestava	
									$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
MM1	Slovenija	64,3	1,15	4,45	3,97	12,50	5,70	2,80	-24,8	0,4
MM2	Slovenija	66,7	1,02	4,36	3,87	11,58	5,44	2,83	-26,0	0,0
MM3	Slovenija	63,8	1,12	4,35	3,27	13,51	6,19	3,21	-25,4	-0,6
MM4	Slovenija	62,9	1,00	4,48	4,14	12,90	4,50	2,96	-26,1	3,8
MM5	Slovenija	66,2	1,08	4,28	3,90	12,47	5,76	3,05	-26,1	-0,2
MM6	Slovenija	65,3	1,07	4,30	4,03	12,59	5,25	2,46	-26,0	-0,6
MM7	Slovenija	65,0	1,14	4,36	3,90	13,06	4,55	2,87	-24,7	0,2
MM8	Slovenija	65,0	1,05	4,44	3,41	12,43	5,30	2,93	-23,7	1,8
MM9	Slovenija	65,9	1,02	4,23	3,81	12,58	4,76	2,60	-22,4	2,6
MM10	Slovenija	64,9	0,95	4,22	4,08	12,08	5,40	3,04	-26,1	3,9
MM11	Slovenija	64,9	0,94	4,19	4,15	12,13	4,44	2,79	-26,1	2,4
MM12	Slovenija	66,2	1,10	4,30	4,46	12,12	5,80	2,97	-25,1	2,3
MM13	Slovenija	65,1	1,01	4,32	3,94	12,35	5,27	2,74	-24,2	1,5
MM14	Slovenija	62,0	1,02	4,08	3,87	12,39	4,93	2,36	-25,9	0,0
MM15	Slovenija	63,4	1,10	4,34	3,85	13,60	4,57	2,55	-25,2	1,9
MM16	Slovenija	65,0	1,23	4,31	3,86	12,61	4,98	2,32	-25,9	0,9
MM17	Slovenija	65,4	1,14	4,38	3,48	13,00	5,11	2,68	-25,5	1,8
MM18	Slovenija	65,1	1,13	4,08	4,17	12,96	4,63	2,62	-25,3	-0,2
MM19	Kitajska*	60,6	1,23	4,06	2,71	14,96	3,08	1,65	-20,4	1,9
MM20	Kitajska	60,7	1,17	4,06	3,20	14,56	3,44	1,81	-22,2	2,2
MM21	Bolgarija	60,1	1,11	4,05	3,12	14,61	3,33	1,70	-24,3	2

*poreklo ni bilo deklarirano, predvidevamo, da je kitajskega izvora

Priloga A2. Pearsonovi koeficienti korelacije.

	voda	pH	pepel	beljakovine	kislost	maščobe	10-HDA	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
voda	1								
pH	0,54**	1							
pepel	-0,32	-0,14	1						
beljakovine	-0,83**	-0,49*	0,61**	1					
kislost	0,66	0,34	-0,50*	-0,79**	1				
maščobe	0,76**	0,63**	-0,28	-0,75**	0,53**	1			
10-HDA	0,76**	0,70**	-0,49*	-0,74**	0,62**	0,85**	1		
$\delta^{13}\text{C}$	-0,49*	-0,39	0,42	0,65	-0,68**	-0,56**	-0,60*	1	
$\delta^{15}\text{N}$	-0,22	-0,02	-0,33	0,11	-0,01	-0,36	-0,09	0,23	1

**statistično značilne povezave pri stopnji tveganja 0,01

*statistično značilne povezave pri stopnji tveganja 0,05

Priloga A3. Rezultati Mann-Whitney U testa.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of VODA is the same across categories of poreklo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,002 ¹	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of pH is the same across categories of poreklo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,002 ¹	Reject the null hypothesis.
3	The distribution of PEPEL is the same across categories of poreklo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,047 ¹	Reject the null hypothesis.
4	The distribution of BELJAKOVINE is the same across categories of poreklo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,002 ¹	Reject the null hypothesis.
5	The distribution of KISLOST is the same across categories of poreklo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,002 ¹	Reject the null hypothesis.
6	The distribution of MAŠČOBE is the same across categories of poreklo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,002 ¹	Reject the null hypothesis.
7	The distribution of HDA is the same across categories of poreklo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,002 ¹	Reject the null hypothesis.
8	The distribution of delta13C is the same across categories of poreklo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,011 ¹	Reject the null hypothesis.
9	The distribution of delta15N is the same across categories of poreklo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,262 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.