



## **Encimi v medu in vpliv povišane temperature na antibakterijske dejavnike v medu**

---

Raziskovalna naloga  
s področja živilske tehnologije

**Avtorja: Huber K., Jocić G.**

**Mentorica: mag. Žuman N.**

**Šola: Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer**

Ljutomer, marec 2021

## **Povzetek**

Pri uporabi medu pogosto prihaja do napačnih načinov uporabe. Med uporabljamo kot sladilo v kulinariki in kot domače zdravilo pri lažji obliki prehlada ali bolečine v grlu. Ker pa ga zaužijemo v razredčeni obliki, raztopljenega v čaju ali drugih napitkih in v drugih živilih, izgubi svoje osnovne sposobnosti zdravljenja ali zaviranja bolezenskih stanj.

Z našo raziskovalno nalogo smo želeli potrditi prisotnost aktivnih encimov v medu pri sobni temperaturi in izmeriti koncentracijo prostega vodikovega peroksida in antibakterijsko ali antimikrobno aktivnost medu. Encimska števila in encimske aktivnosti smo merili s pomočjo standardiziranih in prirejenih metod. Koncentracijo vodikovega peroksida smo izmerili v različno segretyh vzorcih medu: kot jo ima pri sobnih pogojih (298,15 K (25 °C)), v ohlajenem čaju (333,15 K (60 °C)) in v segretem čaju (353,15 K (80 °C)). Antibakterijsko učinkovitost smo izmerili s pomočjo difuzijskega antibiograma, prav tako v različno segretyh vzorcih medu.

## **Abstract**

While using honey at home, there usually comes to wrong using of it. Honey is used in culinary as a sweetener and as home-medicine for strep throat or common cold. But because of being consumed in low concentrations, usually in tea or other beverages or in dishes, it loses its fundamental abilities of healing or curing diseaseous states.

With our work, we wanted to confirm the existence of active enzymes in honey at room temperature and measure concentration of free hydrogen peroxide and antibacterial or antimicrobial activity of honey. The presence of enzymes was being confirmed by measuring their numbers or activities. These measurements were done following a series of standardised methods and also some adapted methods. The concentration of hydrogen peroxide was measured in honey samples, differently heated, according to the states of consumption: at room temperature (298,15 K (25 °C)), in cooled tea (333,15 K (60 °C)) and in hot tea (353,15 K (80 °C)). Antibacterial efficiency was measured by use of diffusion antibiogram, also at differently heated honey samples.

### **Zahvala**

Velika zahvala gre mentorici mag. Nini Žuman za vse spodbude, predloge in vložen trud ter čas za uresničitev te raziskovalne naloge. Zahvala gre tudi laborantki Sonji Koroša za pomoč pri izvedbi praktičnega dela raziskovalne naloge. Lepa hvala tudi gospodu Francu Idiču za priskrbljene vzorce medu in poduk o čebelarstvu. Zahvaljujeva se tudi profesorici Klaudiji Tivadar za lektoriranje raziskovalne naloge.

## Kazalo

1. Uvod.....	7
2. Pregled literature .....	8
2.1 Med.....	8
2.1.1 Vrste medu .....	8
2.1.2 Izvor medu.....	8
2.1.3 Sestava medu.....	9
2.2 Spektroskopija.....	15
3. Metode dela.....	17
3.1 Vzorci medu .....	17
3.2 Metoda za merjenje vsebnosti vode .....	17
3.3 Metoda za ugotavljanje pepela.....	17
3.4 Metoda za določanje skupne kislosti.....	18
3.5 Metoda za določanje vrednosti pH v medu .....	19
3.7 Metoda za merjenje aktivnosti invertaze.....	21
3.8 Metoda za določanje katalazne aktivnosti.....	22
3.10 Difuzijski antibiogram.....	25
4. Rezultati in diskusija .....	27
4.1 Fizikalno kemijske lastnosti .....	27
4.2 Biokemijske lastnosti .....	28
4.2.1 Diastazno število .....	28
4.2.2 Invertazno število .....	29
4.2.3 Katalazna aktivnost .....	29
4.2.4 Prost vodikov peroksid.....	29
4.2.5 Difuzijski antibiogram.....	31
5. Sklepi in zaključek .....	34
6. Uporabljeni viri in literatura.....	37
7. Priloge .....	39

**Seznam okrajšav:**

<b>DN</b>	Diastazno število
<b>IN</b>	Invertazno število
<b>CA</b>	Katalazna aktivnost
<b>U</b>	Mednarodna enota snovi
<b>HMF</b>	Hidroksimetilfurfural
<b>n</b>	Število vzorcev
$\bar{x}$	Aritmetična sredina
$\Delta x$	Absolutna napaka
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of Mean</i> – standardna napaka povprečja
<b>PPB</b>	<i>Potassium Phosphate Buffer</i> – kalijev fosfatni pufer
<b>SPB</b>	<i>Sodium Phosphate Buffer</i> – natrijev fosfatni pufer
<b>M2019</b>	Vzorec medu iz leta 2019
<b>M2020</b>	Vzorec medu iz leta 2020

## 1. Uvod

Med, vsestransko uporaben in nepogrešljiv v vsakdanjem življenju, preprost čebelji produkt, skriva še veliko raznovrstnih in uporabnih lastnosti. V našem delu smo se osredotočili na njegove antibakterijske značilnosti. Preučevali smo vsebnost tipičnih encimov v medu, ki mu določajo različne lastnosti, in vsebnost prostega vodikovega peroksida, ki je poglavitni faktor v antibakterijskem delovanju medu. Meritve smo opravljali glede na različna stanja medu pri zauživanju: uporabili smo med pri sobni temperaturi, segret med, raztopljen v toplem čaju, in pregret med, raztopljen v vročem čaju.

Medu smo določali diastazno število, ki je pokazatelj pregretosti medu, in je odvisno od časa in temperature shranjevanja medu, invertazno število, ki nam da podatke o izvoru medu – invertaza pride v med predvsem iz golšnih žlez, katalazno aktivnost, ki nam pove, kakšna je vsebnost encima, ki razkrajata vodikov peroksid in vsebnost prostega vodikovega peroksida. Z vsemi temi meritvami smo dokazovali prisotnost encimov v medu in njihovo aktivnost ter prisotnost vodikovega peroksida v medu. Encimska števila in aktivnosti ter točno koncentracijo prostega vodikovega peroksida pa smo izmerili iz praktičnih razlogov. Z njihovo pomočjo smo lahko predvidevali o samem stanju medu in njegovih biokemijskih lastnostih.

Poleg meritev encimskih števil in aktivnosti ter vsebnosti vodikovega peroksida smo antibakterijsko aktivnost preverili z antibiogramom. Z njim smo ugotavljali antibakterijsko učinkovitost medu pri sobni temperaturi, pri medu, segretem na 333,15 K (60°C), in medu, segretem na 353,15K (80°C).

Preden smo pričeli raziskovati, smo si zadali naslednje cilje in hipotezi:

### Cilji:

- Dokazali in izmerili bomo encimsko aktivnost v medu, ki bo korelirala z vsebnostjo encima v medu.
- Dokazali in izmerili bomo količino prostega vodikovega peroksida v medu.
- Izbrane metode za določanje encimskih števil in določanje količine prostega vodikovega peroksida bodo ustrezne in bodo podale rezultate, primerljive s povprečji iz drugih raziskav.
- Dokazali bomo, da je z vidika vsebnosti prostega vodikovega peroksida med antibakterijsko učinkovitejši in bolj zdravilen, če je zaužit pri sobni temperaturi.

### Hipotezi:

H1: V medu bomo dokazali encime, ki so biološko aktivni.

H2: Količina prostega vodikovega peroksida v medu bo v vzorcih segretega medu manjša kot v vzorcih medu pri sobni temperaturi.

H3: Med, segret na previsoko temperaturo, ne bo ohranil antimikrobnih lastnosti, kar bo vidno na difuzijskem antibiogramu.

## 2. Pregled literature

### 2.1 Med

Med je živilo z veliko hranilno vrednostjo, ki ga medonosne čebele (*Apis sp.*) pripravljajo iz nektarja cvetov medonosnih rastlin ali iz mane. Čebele eno izmed sladkih tekočin spravljajo v medeno golšo, kjer jo obogatijo z različnimi encimi.

Preprosto povedano je med razmeroma koncentrirana vodna raztopina predvsem treh vrst sladkorjev: fruktoze, glukoze in saharoze, s spremljajočimi drugimi sladkorji, poleg njih pa vsebuje še beljakovine, aminokisliline, vitamine in rudninske ter aromatične snovi.

#### 2.1.1 Vrste medu

Po izvoru medonosnih rastlin oziroma delov medonosnih rastlin razlikujemo:

- sortni med
- cvetlični med
- gozdni med.

Sortni med je po Pravilniku (2015) med, ki je v celoti ali pretežno iz navedenega izvora in ima njegove senzorične, fizikalno-kemijske in mikroskopske lastnosti – tako mora med, z navedbo specifične sorte, imeti specifičen vonj, okus in barvo te sorte, prav tako pa mora v njem prevladovati tudi število pelodnih zrn specifične sorte rastline.

Cvetlični med je pridelek, ki ga medonosne čebele pridelajo iz nektarja medonosnih cvetov različnih rastlin, zato gre v večini primerov za mešan med, ki pa lahko poseduje različne specifične lastnosti različnih rastlinskih vrst in se njegov izvor določi z mikroskopsko analizo cvetnega prahu ali z UV-spektrometrijo.

Gozdni med pa je pridelek iz medonosnih sestavin živih delov gozdnih rastlin – listavcev in iglavcev. Glede na čas obiranja ima lahko različne vsebnosti peloda listavcev ali iglavcev, vendar mora med, namenjen za prodajo kot sortni med, imeti okus in vonj, ki sta značilna za določeno rastlinsko vrsto.

V tabeli iz Pravilnika (2015), v prilogi 1, so navedene mejne vrednosti sestavin medu, da med izpopolnjuje pogoje za prodajo.

#### 2.1.2 Izvor medu

##### 2.1.2.1 Med iz nektarja

Med iz nektarja ali medicine predstavlja večino vrst pridelovalnega medu. Nektar izločajo celice nektarije, ki se nahajajo v cvetni časi cvetov večine cvetočih rastlin. Sestavljen je večinoma iz vode, vsebnost katere se giblje od 20 do 97 odstotkov glede na rastlinsko vrsto, vlago in temperaturo zraka ter zemlje, pogostejši pa so nektarji z večjo vsebnostjo vode.<sup>(8)</sup> Druga pomembna sestavina so še sladkorji: fruktoza, glukoza in saharoza v različnih razmerjih, kar je odvisno od vsebnosti encimov in od rastlinske vrste.<sup>(10)</sup> V manjših količinah so v nektarju še beljakovine – večinoma encimi: invertaza, tranzglukozidaza, tranfruktozidaza in fosfataza iz rastlin in peloda, posamične aminokisliline: fenilalanin, tirozin, treonin in histidin ter lipidi, organske kisline, iridoidni glikozidi: kalpol in vitamini, alkaloidi ter terpentini, glukotinolati in kardenolidi ter aromati, ki predstavljajo sestavine esencialnih olj. V nektarju predstavljajo najmanjši delež mineralne snovi, ki so večinoma sestavljene iz kalijevih in natrijevih ionov, včasih pa tudi iz kalcijevih in magnezijevih ionov.<sup>(7)</sup>



Čebele običajno nabirajo nektar, ki vsebuje 50 ali več odstotkov sladkorjev, privlačijo jih pa tudi nekatere druge lastnosti – vsebnost fenilalanina, ki deluje kot fagostimulant in pa specifični eterični elementi.<sup>(7)</sup>

Izogibajo pa se nektarjev z visoko vsebnostjo kalijeve in natrijeve ionov, prav tako pa nektarjev z vsebnostjo aspartinske kisline, glicil treonina, serina,  $\beta$ -alanina, valina in levcina.<sup>(7)</sup>

Čebele nektar shranijo v golšo in ga odnesejo v panj. Tam ga iztisnejo na konec rilčka in ga sušijo 5 sekund ter ponovno vrnejo v golšo. To ponavljajo 20 minut in tako nektar posušijo in zmanjšajo vsebnost vode v njem. Na koncu kapljico pritrdijo na steno satja. To predstavlja napol zrel med s 30 do 40 odstotki vode, ki je pripravljen na staranje. Nad satjem čebele nenehno mahajo s krili in tako ustvarjajo kroženje zraka v panju, kar omogoči sušenje medu oziroma dozorevanje do primerne vsebnosti količine vode. Ko je med zrel, ga čebele pokrijejo z zaščitnim slojem voska, da ga zaščitijo pred zunanji dejavniki.



Slika 1: Zrel med v satnicah, čebela delavka pokriva satnice s plastjo voska

### 2.1.2.2 Med iz mane

Mana je izloček drevesnih ušic in kaparjev, ki je za razliko od izhodiščnega drevesnega soka okraden beljakovin in dela sladkorjev, ki ga žuželke porabijo za svojo prehrano. Neprabljen del izločijo kot sladke in lepljive kapljice mane. Te so večinoma iz vode, 67–80%, ostalo pa predstavljajo sladkorji in mineralne snovi, ki jih je v mani veliko več kot v nektarju. V mani najdemo več kalija, magnezija in fosforja kot v medicini, a je med iz mane veliko manj hranljiv od medu iz nektarja.<sup>(3)(10)</sup>

Mano čebele pobirajo na podoben način kot medicino, le da jo namesto v globini cveta najdejo na deblih dreves in grmičevja. Tako jo odnesejo v panj, kjer jo na podoben način prenesejo v satnice in ga pustijo zoreti. Med iz mane je enako potrebno dozoreti do primerne vsebnosti količine vode.

### 2.1.3 Sestava medu

Med je lahko tekoče ali kašaste konsistence, delno ali popolnoma kristaliziran. V tekočem stanju je viskozen, kar pa določajo razmerja sladkorjev, vode in beljakovin. V nadaljevanju je navedenih nekaj osnovnih parametrov, ki določajo sestavo medu.

#### 2.1.3.1 Vsebnost vode

Vsebnost vode v medu je odvisna od vrste medu in od časa sušenja oziroma zorenja medu. Dlje časa zorjen med vsebuje manj vode od mlajšega in je tako tudi viskoznejši, saj se razmerje sladkorjev proti vodi poveča. Vsebnost vode je omejena z zgornjo in s spodnjo mejo. Spodnjo določajo topnosti snovi v medu, zgornjo pa omejujejo predpisi. Po predpisih med ne sme vsebovati več kot 21 odstotkov vode, saj je to meja za razvoj ozmofilnih kvasovk, ki bi lahko povzročile fermentacijo medu v zgornjih plasteh.

Metodi, ki se najpogosteje uporabljata za določanje vsebnosti vode v medu, sta metoda merjenja lomnega količnika z refraktometrom in ugotavljanje relativne gostote z aerometrom.

Lomni količnik merimo v razponu vsebnosti vode od 13 do 44 odstotkov pri konstantni temperaturi 293,15 K (20 °C).

Od količine vode in temperature pa sta odvisna viskoznost in s tem tekočnost medu. Če koncentracijo vode povečamo s 15,0 na 18,6 odstotkov, se tekočnost poveča za trikrat. Če zvišamo temperaturo z 293,15 K (20 °C) na 305,15 K (32 °C) se tekočnost poveča za štirikrat.<sup>(3)</sup>

### 2.1.3.2 Kisline v medu

Med ima zaradi vsebnosti kislin kislno reakcijo. Vrednost pH medu se giblje med 3,2 in 4,5 in je pretežno odvisna od kislinskih anionov. Med z višjo vsebnostjo kalijevih, natrijevih in kalcijevih kationov ima višji pH. Največji delež predstavljajo organske kisline: očetna, maslena, metanojska, glukonska, mlečna, maleinska, jabolčna, citronska, sukcijska, oksalna, piroglutaminska, glikolna,  $\alpha$ -keto glutaminska, piruvična in vinska ter prolin, manjši delež pa predstavljajo anorganske kisline, med katerimi je najpomembnejša fosforjeva kislina.<sup>(3)(5)(10)</sup>

Izvor večine organskih kislin je rastlinski, saj je edina v medu nastajajoča kislina glukonska, ki nastane pri delovanju encima glukoza oksidaze pri oksidaciji glukoze, kjer nastane tudi vodikov peroksid.<sup>(5)</sup> Vsebnost večine kislin pa ni odvisna od vrste medu, ampak od pogojev njihovega nastanka. Pravilnik (2015) dovoljuje 50 miliekivalentov kisline na kilogram medu.

### 2.1.3.3 Sladkorji

Delež različnih sladkorjev in njihovih razmerij v medu sta odvisna od botaničnega porekla in sestave nektarja, klimatskih razmer, vrste in fizičnega stanja čebel ter moči čebeljih družin.<sup>(3)</sup>

Med je sestavljen večinoma iz sladkorjev, s čimer poimenujemo preprosto zgrajene ogljikove hidrate, torej monosaharide in disaharide. Najpomembnejši so fruktoza: 33 do 42 %, in glukoza: 27 do 36 %, ki skupaj predstavljata invertni sladkor, ter saharoza: 1 do 4 %.<sup>(4)(5)</sup>

Fruktoza je monosaharid in spada med heksoze. Je zelo higroskopična snov, ki ne kristalizira hitro. Je aktivna komponenta v neencimskih reakcijah porjavenja in Maillardovi reakciji.

Glukoza je monosaharid in spada med heksoze. Stabilna kristalna oblika je  $\alpha$ -D-glukopiranoza monohidrat, ki kristalizira pri temperaturah, nižjih od 333,15 K (60 °C). Viskoznost raztopine glukoze pada s temperaturo in narašča s koncentracijo.

Saharoza je disaharid, sestavljen iz molekule fruktoze in molekule glukoze, povezanimi z  $\alpha$ -1,2 glikozidno vezjo. Je izjemno dobro topna v vodi, njena topnost narašča s temperaturo. Ker se v medu pod vplivom invertaze razgraja na fruktozo in glukozo, je njena vsebnost v medu nizka. Več saharoze pa je v akacijevem medu, medu iz mane, nezrelem medu in medu čebel, hranjenih s saharozo.<sup>(4)</sup>

Razmerje Fru/Glu vpliva na kristalizacijo medu in je specifično za posamezno vrsto medu. Golob in Plestenjak (1999) navajata visoko korelacijo za akacijev med (1,5), najnižjo pa za hojev med (1,22). Persano et. al. (1995) tudi navaja največje razmerje za akacijev med (1,67).

Med vsebuje tudi manjše količine disaharidov: maltoze, trehaloze, melobioze, kojibioze in izomaltoze, in trisaharidov: rafinoze, panoze, erloze in turanoze. V medu je največ maltoze, ki se s staranjem kopiči, saj nastaja iz glukoze. Trisaharidi in višji oligosaharidi pa nastajajo kasneje, ko se združujejo disaharidi in monosaharidi.<sup>(14)</sup>

### 2.1.3.4 Encimi

Kljub nizki vsebnosti beljakovin v medu najdemo številne pomembne encime, ki imajo pomembno vlogo pri nastanku medu. Ker so občutljivi na temperaturo shranjevanja in se deaktivirajo po določenem času, lahko na podlagi njihove aktivnosti sklepamo o njihovi pristnosti v medu in pogojih shranjevanju medu. Zaradi njihove občutljivosti na segrevanje (nad 313,15 K (40 °C), še posebej če je dolgotrajno) se uporabljajo kot kriterij za pregretost in kakovost medu.

Encimi so delno iz nektarja ali mane in iz cvetnega prahu, večinoma pa iz izločkov žlez v čebelji golši.<sup>(3)(10)</sup>

Najpomembnejši in najpogostejši encimi v medu so diastaza, invertaza in glukoze oksidaza, pojavljajo pa se tudi kislja fosfataza, katalaza in  $\beta$ -glukozidaza.

#### 2.1.3.4.1 Diastaza

S stališča analize medu je diastaza ali amilaza eden najpomembnejših encimov v medu. Vanj pride deloma iz nektarja in cvetnega prahu, v veliki večini pa iz izločkov žlez v čebelji golši. Pod imenom diastaza ali amilaza prepoznamo dva encima, to sta  $\alpha$ -amilaza in  $\beta$ -amilaza.

Po zgradbi sta oba encima podobna,  $\alpha$ -amilaza je iz verige 496 aminokislin, ki se oblikujejo v treh sklopih,  $\beta$ -amilaza je 498 aminokislin in prav tako iz več podenot. Razlika med encimoma se pojavi v delovanju:  $\alpha$ -amilaza deluje kot endoglukozidaza, to pomeni, da cepi molekule škroba na naključnem mestu in odceplja krajše molekule dekstrinov.  $\beta$ -amilaza je eksoglukozidaza in odceplja enote maltoze na koncu verige škroba.

Optimalen pH delovanja encima diastaze je 5,3. Da se encim aktivira, pa je potrebna prisotnost kloridnih ionov pri obeh amilazah, pri  $\alpha$ -amilazi pa je za aktivacijo in delovanje potrebna tudi prisotnost kalcijevih ionov.

Encim diastaza je precej občutljiv na povišanje temperature. Sorazmerno s temperaturo se diastazna aktivnost zmanjšuje, encim je najbolj aktiven pri 313,15 K (40 °C), se pa  $\alpha$ -amilaza deaktivira pri 343,15 K (60 °C),  $\beta$ -amilaza pa pri 323,15 K (50 °C). Razpolovni čas diastazne aktivnosti v odvisnosti od temperature skladiščenja je podan v tabeli 1. Zaradi te občutljivosti je mogoče na podlagi aktivnosti določati kakovost medu.<sup>(11)(12)(13)(16)</sup>

Tabela 1: Razpolovni čas diastazne aktivnosti glede na temperaturo skladiščenja<sup>(19)</sup>

T (°C)	T (K)	t <sub>1/2</sub>
20	293,15	1480 dni
30	303,15	200 dni
40	313,15	31 dni
50	323,15	5,4 dni
60	333,15	25 ur
70	343,15	5,3 ure
80	353,15	1,2 uri

Aktivnost encima izražamo z diastaznim številom. Podaja se v mL/g/h – volumen v mL 1 % raztopine škroba, ki ga hidrolizira encim iz 1 g medu v eni uri pri 313,15 K (40 °C). Pri metodi ugotavljanja se dodajo kloridni ioni v obliki natrijevega klorida, da se aktivira vsa v medu prisotna amilaza.<sup>(9)(3)</sup>

Diastazno število lahko ob pravilnem shranjevanju zelo niha, vendar je navadno razpon aktivnosti med 13 in 24. Pregret med pa zaradi neaktivnega encima ne preseže aktivnosti 8.<sup>(3)(5)</sup>

V tabeli 2 so podane vrednosti diastaznega števila za nekatere slovenske sortne vrste medu.

Tabela 2: Diastazno število nekaterih vrst slovenskega medu <sup>(17)</sup>

VRSTA MEDU	n	DIASTAZNO ŠTEVILO	
		$\bar{x}$	interval
akacijev	20	9,27	6,62–12,76
kostanjev	14	17,45	12,72–21,82
cvetlični	16	13,37	8,87–20,76
mešan gozdni	18	17,04	5,36–27,30
gozdni	4	18,59	12,52–22,95
hojev	5	16,55	12,30–21,14
lipov	6	13,22	10,56–15,44

Ker je diastazno število kakovostno merilo svežosti in kvalitete medu, je več znanstvenikov opravilo raziskave v povezavi s spreminjajočim se diastaznim številom v odvisnosti od časa shranjevanja medu.

Bertoncelj et. al. (1998)<sup>(17)</sup> navajajo, da po šestmesečnem opazovanju ni prišlo do spremembe diastaznega števila medu, hranjenega v temi, in da se je to število spremenilo pri medu, izpostavljenem svetlobi za povprečno 6 %. Krauze in Krauze (1991)<sup>(30)</sup> pa sta po 26- in 30-mesečnem opazovanju ugotovila, da se je diastazna aktivnost zmanjšala za povprečno 16,5 %.

#### 2.1.3.4.2 Invertaza

Encim invertaze je po izvoru lahko iz nektarja ali mane, v med pa pride predvsem iz čebelje slin, ki nastaja v posebnih žlezah slinavkah. Ima eno izmed glavnih vlog pri dozorevanju medu, sodeluje namreč pri pretvarjanju nektarja v med. V nektarju je njeno delovanje omejeno, poveča pa se v medu, ko ta nastaja v panju. Večino encima v med vnesejo mlade čebele, ki imajo goltne žleze na vrhuncu svoje aktivnosti. <sup>(3)(10)</sup> Invertaza celičnih sten ali  $\beta$ -frutofuranozidaza je sestavljena iz 577 aminokislin in tvori pet podenot. Pri delovanju cepi glikozidne vezi v saharozi: med molekulo glukoze in molekulo fruktoze, pri čemer pa se porabi molekula vode. Produkt aktivnosti se imenuje invertni sladkor, ki je sestavljen iz obeh sladkorjev, glukoze in fruktoze. Optimalni pogoji za delovanje encima so pri pH = 6,0 in temperaturi 313,15 K (40 °C).<sup>(3)(5)</sup>

Povišana temperatura in dolgotrajno skladiščenje deaktivirata invertazo še prej kot diastazo. Razpolovna doba delovanja encima se zmanjša že pri 318,15 K (45 °C), popolna deaktivacija pa nastopi pri 343,15 K (70 °C).<sup>(18)</sup> Podatki o razpolovnih dobah delovanja so navedeni v tabeli 3.

Tabela 3: Razpolovni čas aktivnosti invertaze glede na temperaturo skladiščenja. <sup>(19)</sup>

T (°C)	T (K)	t <sub>1/2</sub>
20	293,15	820 dni
30	303,15	83 dni
40	313,15	9,6 dni
50	323,15	31 ur
60	333,15	4,7 ur
70	343,15	47 minut
80	353,15	8,6 minut

Aktivnost invertaze izražamo z invertaznim številom, ki se lahko meri polarimetrično ali preko razpada substrata, 4-nitrofenil  $\beta$ -D-glukopiranozida, ki pa se, namesto v obliki števila, zapiše kot  $\mu\text{mol/kg/h}$  – mikromolov razgrajenega substrata na kilogram medu v eni uri. Invertazno število pa predstavlja maso

saharoze v gramih, ki jo razgradi encim v 100 g medu v eni uri. Vrednosti invertaznega števila se gibljejo od 4 do 25. <sup>(5)</sup>

#### 2.1.3.4.4 Katalaza

Katalaza, peroksidaza ali oksidoreduktaza je encim, ki razgrajuje vodikov peroksid na vodo in kisik. Encim katalaze v medu je drugačen od živalskih vrst katalaze. Za razliko od hema in železovega iona, v rastlinskih katalazah najdemo kalcijeve ione, ki na podoben način cepijo molekulo vodikovega peroksida. Razlika je tudi v tem, da rastlinske katalaze opravljajo več funkcij: razgradnja indol-3-acetne kisline, izgradnja celične stene in podobno. Optimalni pogoji za delovanje katalaze so pri 310,15K (37 °C) in pri pH = 7,4.

Katalazno aktivnost merimo kot mM vodikovega peroksida, razgrajenega v minuti (mM/min) pri temperaturi 298,15 K (25 °C) in pH = 7,4. To predstavlja tudi enoto katalaze, ki je enaka količini katalaze, ki razgradi 1,0 mM vodikovega peroksida v raztopini pri temperaturi 298,15 K (25 °C) in pH = 7,4.

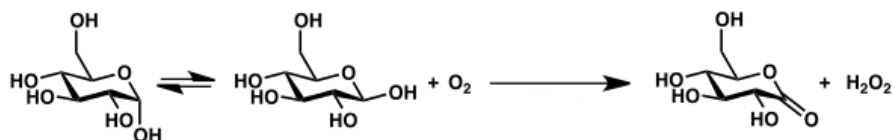
Večina katalaze pride v med iz nektarja, nekaj pa tudi iz cvetnega prahu. Nekatere vrste medu, z majhno vsebnostjo katalaze, imajo visoko antimikrobno aktivnost, zaradi vsebujočega vodikovega peroksida (primer: med žlahtnega kostanja). <sup>(5)</sup>

#### 2.1.3.4.5 Glukoze oksidaza

Glukoze oksidaza predstavlja pomembno vlogo v medu. Ker katalizira oksidacijo glukoze, pri kateri nastane glukonska kislina, prispeva k vsebnosti vodikovega peroksida, ki je stranski produkt oksidacije. Reakcija je prikazana na sliki 2. Nastali vodikov peroksid pa je odgovoren za antimikrobno aktivnost medu in s tem za večino zdravnih učinkov medu (največ so ga določili v kostanjevem medu: vrednosti so se gibale med 120 in 605 mg/kg).

Glukonska kislina pa se nahaja večinoma v obliki glukonolaktona in v običajnih pogojih nastaja zelo počasi: 0,002 do 0,012 µg/h na gram medu. Encim je najaktivnejši pri pH = 3, pri pH = 7 ali več pa je nedelujoč. Podobno kot na diastazo in invertazo ima tudi na glukoze oksidazo vpliv povišana temperatura, občutljiva pa je tudi na svetlobo.

V med pride od čebel, saj izvira iz njihovih hipofarnigalnih žlez, ki ga izločajo v medeno golšo. <sup>(16)</sup>



Slika 2: Reakcija oksidacije glukoze z encimom glukoze oksidazo: prvi del reakcije predstavlja tautomerizacijo  $\alpha$ -D-glukoze v  $\beta$ -D-glukozo, drugi del pa predstavlja vezavo kisika na  $\beta$ -D-glukozo, katalizirano z glukoze oksidazo in nastanek D-glukono-1,5-laktona in vodikovega peroksida

#### 2.1.3.5 Vodikov peroksid

Vodikov peroksid ali vodikov oksid (I) je molekula, sestavljena iz dveh med sabo z enojno nepolarno kovalentno vezjo, povezanih atomov kisika, ki predstavlja osnovno strukturo peroksidov. Na mestu radikalov pa je na vsakega od njiju vezan po en vodikov atom. Ker je oksidacijsko število vsakega kisika v molekuli  $-1$ , je njuna, že tako nestabilna, kovalentna vez v reakciji redukcije-oksidacije hitro pretrgana. Ker je hidroksilni radikal nestabilen, si eden izmed atomov kisika prisvoji vodik in tako nastaneta voda in oksidni radikal. Ta pa zaradi dveh nevezanih elektronov povzroči, da se druga molekula vodikovega peroksida cepi in se sprosti molekula kisika in še ena molekula vode.

Vodikov peroksid je dokaj močan oksidant in ga v laboratoriju običajno najdemo v 30 % (w/w) raztopini. Njegovo vrelišče je višje od vrelišča vode ( $T_{\text{vrelišča}}(\text{H}_2\text{O}_2) = 323,35 \text{ K} (150,2 \text{ °C})$ ), hlapeti pa začne že pri nižjih temperaturah. Hitrost razpada je pri različnih temperaturah različna. Vodikov peroksid razpade že pri sobni temperaturi, hitrost razpada pa se pri višji temperaturi in prisotnosti svetlobe, predvsem iz UV-spektra, poveča. Vpliv na razpad imajo tudi sprememba pH in drugih okoljskih dejavnikov.

Njegov izvor v medu predstavlja predvsem encim glukoze oksidaza, ki oksidira glukozo, pri reakciji pa se sprosti stranski produkt, vodikov peroksid. Del pa ga lahko pride v med tudi skupaj s cvetnim prahom. Običajna koncentracija prostega vodikovega peroksida se giblje med 1,0 in 6,0 mM. Zaradi svojih oksidantnih značilnosti je tudi pomemben mikrobicid – zavira delovanje bakterij in tudi gliv, ki lahko skupaj z nektarjem ali s cvetnim prahom pridejo v med, panj ali na čebelo.

V medu in ostalih živilih ga je mogoče določati s pomočjo različnih peroksidnih testov, natančneje pa s kompleksometričnimi metodami s spektrofotometričnim določanjem.

### 2.1.3.6 Cvetni prah

Cvetni prah ali pelod je stranski pridelek, ki ga čebele nabirajo, ko srkajo nektar. Shranijo ga na zadnje okončine, ki so narejene posebej za to, da lahko vežejo cvetni prah – imajo več dlačic in tudi več različnih, ki sprimejo cvetni prah. Del pa se ga prime po vsem telesu, saj imajo čebele tudi na nekaterih drugih delih telesa dlačice. Čebela s cvetnim prahom na zadnjih nožicah in na spodnjem delu telesa je prikazana na sliki 3. Po prenosu v panj ga ali shranjujejo v obliki zrn ali ga inkorporirajo v medeno strukturo.



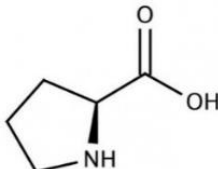
Slika 3: *Apis mellifera*, na zadnjih nožicah vidimo nabran cvetni prah

Čeprav ga je v medu v zelo majhni količini, je pomemben dejavnik v vsebnosti mnogih organskih snovi v njem. Prispeva k encimski diverziteti in medu daje značilen vonj, barvo in okus. Več vrst cvetnega prahu pomeni mešanje ali prevlado okusa barve in vonja najbolj izrazito obarvanega ali aromatičnega cvetnega prahu.

S pomočjo cvetnega prahu je tudi mogoče določiti izvor medu, saj je ta odvisen od vrste rastline, kot tudi vsebnost določenega peloda. Metoda za ugotavljanje cvetnega prahu je s pomočjo mikroskopa.

### 2.1.3.8 Prolin

Prolin je neesencialna ciklična aminokislina, ki spada med amfoterične nepolarne aminokisliline. Je  $\alpha$ -aminokislina, kar pomeni, da ima aaminsko, v tem primeru sekundarno aaminsko ali imido skupino, vezano na drugi ogljikov atom. Sestavljen je iz karboksilne skupine, vezane na pirolidinski obroč, na ogljik zraven sekundarne aminske skupine. Zgradba prolina je prikazana na sliki 4. Prolin se v živilih določa s pomočjo obarvanja z ninhidrinom. Aminokisliline tvorijo kompleks z ninhidrinom, ki se obarva vijolično, pri reakciji s prolinom pa se obarva rumeno.



Slika 4: Skeletna formula L-prolina

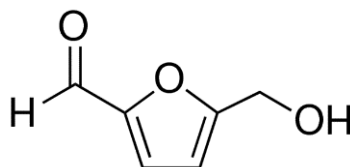


Prolin pride v med predvsem od čebele, vpliv na količino prolina v medu pa ima tudi njegov izvor – Von der Ohe et. al. (1991)<sup>(27)</sup> so ugotovili, da je vsebnost prolina odvisna od izvornih spojin oziroma paše čebel.

Joshi et. al. (2000)<sup>(28)</sup> pa so raziskali vpliv vrste čebele na vsebnost prolina in ugotovili, da je vsebnost prolina v medu odvisna tudi od vrste čebele.

### 2.1.3.9 Hidroksimetilfurfural

Hidroksimetilfurfural je ciklični aldehid (5-hidroksimetil-2-furaldehid). Njegova zgradba je prikazana na sliki 5. Hidroksimetilfurfural, v nadaljevanju HMF, nastaja z dehidracijo glukoze iz medu v kislem mediju oziroma nizkem pH. Najprej iz glukoze nastane na tretjem mestu dehidriran glukozid, ki se pri nadaljnji dehidraciji spremeni v alkohol-aldehid z dvojno vezjo. To se ponovi na štirih alkoholnih skupinah in na koncu dobimo končni produkt – HMF. Vsebnost HMF v medu in ostalih živilih se določa s pomočjo barbiturne kisline in p-toluidina, s katerima tvori rožnato barvilo, ki se v raztopinah meri s pomočjo spektrofotometrije.



Slika 5: Skeletna formula hidroksimetilfurfurala

Hidroksimetilfurfural nastaja, ko se med stara – vpliv na to ima tudi temperatura skladiščenja. Papić et. al. (1988)<sup>(11)</sup> navajajo, da se je enajstim od dvajsetih vzorcev vrednost HMF povečevala, ostalim devetim pa zmanjševala. Na podlagi tega ne povezujejo povečanja količine HMF s staranjem medu.

Balenović et. al. (1998)<sup>(16)</sup> navajajo, da je vsebnost HMF odvisna od pregetosti medu – medu z diastaznim številom, manjšim od osem, so ugotovili vrednosti HMF večje od dovoljenih (maksimum = 208 mg/kg medu, najvišje dovoljeno = 40 mg/kg medu).

Sancho et. al. (1992)<sup>(29)</sup> pa po analizi španskih vrst medu navajajo, da je linearno odvisen logaritem vsebnosti HMF od časa skladiščenja medu.

## 2.2 Spektroskopija

Prehod molekule iz osnovnega energijskega stanja v vzbujeno stanje je pogojen s kvantom energije, ki jo dovedemo molekuli oziroma atomom v molekuli.

Energetski nivoji molekule so kvantizirani – to pomeni, da je za prehod elektrona iz nižje orbitale v višjo potreben kvant energije, ki jo moramo dovesti atomu.

Če elektron preide iz višje orbitale v nižjo, pa odda sprejeti kvant energije.

Kvantizirana energija, ki jo sprejme ali odda atom, ima značaj korpuskule in elektromagnetnega valovanja. To opisuje naslednja enačba.

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Kjer je:

E energija [J]

h Planckova konstanta,  $6,62607015 \times 10^{-34}$  Js

c svetlobna hitrost,  $299\,792\,485$  ms<sup>-1</sup>

$\lambda$  valovna dolžina [m<sup>-1</sup>].

Enačba nam pove, da je pri nižjih valovnih dolžinah svetlobe za prehod iz osnovnega energijskega stanja v vzbujeno stanje potreben višji energetski nivo.

Sprejem svetlobne energije v molekuli označujemo kot absorpcijo svetlobe. Absorpcijo svetlobne energije določamo z merjenjem padca intenzitete svetlobe pri prehodu skozi vzorec. Naprava za merjenje sprememb absorpcije v odvisnosti od valovne dolžine je spektrofotometer.

Padec intenzivnosti vstopnega svetlobnega žarka pri prehodu skozi vzorec je premo sorazmeren koncentraciji spojine, dolžini poti in molarnemu ekstinkcijskemu koeficientu. To je Beer-Lambertov zakon in ga opisuje naslednja enačba:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Kjer je:

- $\varepsilon$  molarni ekstinkcijski koeficient, ki poda sposobnost spojine za absorpcijo svetlobe [ $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]
- $I_0$  intenziteta vstopnega žarka
- $I$  intenziteta izstopnega žarka.

Produkt  $\varepsilon \cdot c \cdot l$  imenujemo optična gostota ali absorbanca ( $A$ ). Zakon velja za nizke koncentracije raztopin. Pri višjih koncentracijah pa pride do odstopanj in linearna odvisnost ne velja več.

Absorbanco merimo le pri eni valovni dolžini ali pri določenem razponu valovnih dolžin, odvisno od lastnosti in snovi, ki jo želimo izmeriti. Za naše meritve smo uporabili kolorimeter Vernier COL-STA (slika 6).



Slika 6: Kolorimeter Vernier COL-STA



### 3. Metode dela

#### 3.1 Vzorci medu

Preden smo začeli z eksperimentalnim delom raziskovalne naloge, smo si določili vzorce, na katerih smo izvedli meritve. Vzorca smo pridobili pri lokalnem čebelarju, Francu Idiču iz Malih Bakovcev. Lokacija čebelnjaka je v prilogi 3.

Za meritve smo izbrali vzorca cvetličnega medu, en vzorec cvetličnega medu iz leta 2019 (lot: L19) in en vzorec cvetličnega medu iz leta 2020 (lot: L20). Vzorca smo označili z oznakama: M2019 za vzorec cvetličnega medu iz leta 2019 in M2020 za vzorec cvetličnega medu iz leta 2020. Sliki etiket sta v prilogi 4.

#### 3.2 Metoda za merjenje vsebnosti vode

*Refraktometrična metoda*

##### Princip

Merjenje vsebnosti vode na podlagi lomnega količnika.

##### Aparatura

Poleg običajne laboratorijske opreme je potreben še refraktometer. Pri naših meritvah smo uporabljali refraktometer Xiamen RHB-90 (slika 7).



Slika 7: Refraktometer Xiamen RHB-90  
in pogled skozi kukalo

##### Priprava vzorca in meritev

Nekaj mililitrov medu nanesimo na površino prizme refraktometra. Rezultat odčitamo skozi kukalo. Prelom modrega čez belo ustreza količini vode v medu, podane v g/100g medu ali %.

#### 3.3 Metoda za ugotavljanje pepela

##### Princip

Suhi sežig vzorca pri 873,15 K (600 °C) do konstantne mase.

##### Aparature in pribor

Poleg običajne laboratorijske opreme uporabljamo še posodo za žarenje iz keramike, sušilnik (instrumentaria Zagreb, ST-01/02) z možnostjo sušenja do 373,15 K (100 °C), gorilnik, eksikator in peč za žarjenje (peč PIKA, 851 za žganje keramike).

##### Določanje

V prežarjeno in stehano posodo za žarjenje odtehtamo 5 do 10 g vzorca in ga sušimo v sušilniku pri 363,15 K (90 °C) da večji del vode izpari. Nato vzorec postavimo nad plamen gorilnika, da zogleni. Ostanek žarimo v peči za žarjenje pri 873,15 K (600 °C) do konstantne mase, ohladimo v eksikatorju in stehamo.

### Izračun

Količino pepela izrazimo v g/100 g vzorca in jo izračunamo po formuli:

$$\text{količina pepela g/100 g} = \frac{m_o}{m_v} \cdot 100$$

Kjer je:

- $m_o$  masa ostanka po žarenju v g
- $m_v$  masa vzorca v g.

## 3.4 Metoda za določanje skupne kislosti

### Titracija

#### Princip

Titracija z raztopino natrijevega hidroksida z uporabo fenolftaleina kot indikatorja.

#### Potrebne kemikalije:

- destilirana voda,
- natrijev hidroksid, NaOH, Sigma Aldrich,
- fenolftalein, C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>, Fluka,
- etanol, 96 %, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, Sigma Aldrich.

#### Reagenti:

1. destilirana voda brez CO<sub>2</sub>, prekuhana in ohlajena:

destilirano vodo prekuhamo v čaši in pokrijemo z urnim steklom. Ko se ohladi, jo uporabimo.

2. raztopina natrijevega hidroksida, c(NaOH) = 0,1 mol/l:

v 1 L merilno bučko zatehtamo 4 g natrijevega hidroksida in dopolnimo s prekuhana destilirano vodo do enega litra.

3. 1 % raztopina fenolftaleina (m/V) v etanolu, nevtralizirana, prekuhana:

v 100 mL merilno bučko zatehtamo 1 g fenolftaleina in ga raztopimo v etanolu ter dopolnimo do 100 mL. Raztopino prenesemo v čašo in jo prekuhamo. Vsebinsko ponovno prenesemo v 100 mL merilno bučko ter dopolnimo z etanolom do oznake.

#### Določanje

Odtehtamo 10 g vzorca in ga raztopimo v 75 mL destilirane vode. Raztopljenemu vzorcu dodamo štiri do pet kapljic fenolftaleina in titriramo z raztopino NaOH do rožnate barve, obstojne 30 sekund. Če je med obarvan, odtehtamo manj vzorca. Ekvivalentno točko lahko določimo tudi s pH-metrom.

#### Izračun

Kislost izrazimo v milimolih kisline/kg vzorca ali miliekvivalentih kisline/kg vzorca in jo izračunamo po formuli:

$$\text{kislost v meq/kg} = 10 \cdot V$$

Kjer je:

$$V \text{ volumen} = \text{NaOH } c(0,1 \text{ mol/L}) \text{ v mL za nevtralizacijo } 10 \text{ g medu.}$$

### 3.5 Metoda za določanje vrednosti pH v medu

(Bogdanov, 2009)

#### Princip

Vrednost pH vodne raztopine medu izmerimo s pH-metrom.

#### Aparatura

Za merjenje vrednosti pH smo uporabili pH-merilnik Vernier PH-BTA.

#### Izvedba

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

### 3.6 Metoda za merjenje aktivnosti diastaze

*Metoda po Shadeu*

#### Princip

Enourna hidroliza 1 % raztopine škroba z encimom iz 1 kg medu.

#### Aparature

Poleg običajne laboratorijske opreme uporabljamo še vodno kopel pri  $313,15 \text{ K} \pm 0,5 \text{ K}$  ( $40 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ ) in kolorimeter (Vernier, COL-BTA) z odčitavanjem pri valovni dolžini 635 nm.

#### Uporabljene kemikalije:

- destilirana voda,
- jod,  $\text{I}_2$ , Sigma Aldrich,
- kalijev jodid, KI, Sigma Aldrich,
- brezvodni natrijev acetat,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , Sigma Aldrich,
- led – očetna kislina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Sigma Aldrich,
- natrijev klorid, NaCl, Fluka,
- koruzni škrob,  $\text{HO}[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]_n\text{H}$ , Podravka.

#### Reagenti

1. Osnovna raztopina joda,  $c(\text{I}_2) = 0,07 \text{ mol/L}$ :

raztopimo 8,8 g joda, pomešamo z 22 g kalijevega jodida in raztopimo v 30–40 mL vode, nato pa razredčimo do enega litra.

2. Razredčena raztopina joda,  $c(\text{I}_2) = 0,0007 \text{ mol/L}$ :

v 500 mL merilni bučki raztopimo 20 g kalijevega jodida v 30–40 mL vode. Nato dodamo 5 mL osnovne raztopine joda in dopolnimo z vodo do oznake. Raztopino moramo pripraviti vsak drugi dan.

3. Acetatni pufer – pH 5,3:

v 400 mL vode raztopimo 69,6 g brezvodnega natrijevega acetata, dodamo 10,5 mL led – očetne kisline in dopolnimo z vodo do 500 mL. Izmerimo vrednost pH in jo, če je potrebno, uravnamo na 5,3 z natrijevim acetatom ali očetno kislino.

4. Raztopina natrijevega klorida,  $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/L}$ :

raztopimo 14,5 g natrijevega klorida v prekuhani destilirani vodi v merilni bučki in dopolnimo do 500 mL. Raztopina je uporabna, dokler se ne razvije plesen.

5. Raztopina škroba:

v 250 mL erlenmajerico odtehtamo 2,0 g brezvodnega škroba, pomešamo z 90 mL vode, takoj segrejemo in pustimo zmerno vreti 3 minute. Raztopino pokrijemo, ohladimo do sobne temperature in prenesemo v 100 mL merilno bučko. Nato jo na vodni kopeli segrejemo na 213,15 K (40 °C) in dopolnimo z vodo do oznake.

## Določanje

### *Priprava vzorca za določanje*

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

### *Standardizacija raztopine škroba*

S pipeto odmerimo 5 mL raztopine škroba, segrete na 313,15 K (40 °C) in 10 mL vode. V drugo čašo odmerimo s pipeto 1 mL pripravljene mešanice, 10 mL razredčene raztopine joda in dobro premešamo. Nastalo barvo odčitamo pri 635 nm proti slepemu vzorcu.

Vrednost ekstinkcije mora biti  $0,760 \pm 0,020$ . Če je potrebno, lahko dodamo določeno prostornino vode, tako da dobimo pravilno absorbanco.

### *Slepi vzorec*

10 mL raztopine joda, 1 mL vode in dodatna voda

$V(\text{dodane vode}) = 26 \text{ mL}$

$A_{635}(\text{škrob}) = 0,760$

### *Merjenje absorbance*

S pipeto odmerimo 10 mL raztopine medu in jo prenesemo v čašo ter damo v vodno kopel pri temperaturi 313,15 K (40 °C) skupaj s posodo, v kateri je raztopina škroba.

Po 15 minutah odmerimo s pipeto 5 mL raztopine škroba in jo dodamo v raztopino medu, premešamo in vključimo uro.

V petminutnih presledkih odmerimo 1 mL raztopine in jo dodamo v 10 mL razredčene raztopine joda z dodanim prej določenim volumnom vode v čaši. Premešamo in takoj izmerimo absorbanco pri 635 nm. Postopek ponavljamo, dokler se absorbanca ne zmanjša pod vrednost 0,235.

### **Izračun**

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

To število izraža aktivnost diastaze kot mL 1 % raztopine škroba, ki je z encimom iz 1 g medu eno uro hidrolizirana pri temperaturi 313,15 K (40 °C).

Aktivnost diastaze (DN) = volumen 1 % raztopine škroba v mL na g medu na h pri temperaturi 313,15 K (40 °C).

$$\text{Število diastaze} = \frac{60}{t} \cdot \frac{0,10}{0,01} \cdot \frac{1,0}{2,0} = \frac{300}{t}$$

kjer je:

t čas v minutah.

### 3.7 Metoda za merjenje aktivnosti invertaze

*Kompleksometrična metoda*

#### Princip

Enourna hidroliza 1 % raztopine saharoze z encimom iz 100 g medu.

#### Aparature

Poleg običajne laboratorijske opreme uporabljamo še vodno kopel pri 313,15 K ± 0,5 K (40 °C ± 0,5 °C) in kolorimeter (Verier, COL-BTA) z odčitavanjem pri valovni dolžini 635 nm.

#### Uporabljene kemikalije:

- destilirana voda,
- Fehlingova raztopina 1, Sigma Aldrich,
- Fehlingova raztopina 2, Sigma Aldrich,
- kalijev dihidrogenfosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Kemika,
- dinatrijev fosfat dihidrat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, Kemika,
- saharoza, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, Agragold,
- fruktoza, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, Diasan,
- glukoza monohidrat, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> · H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich.

#### Reagenti:

1. Razredčena Fehlingova raztopina:

pomešamo enaka volumna Fehlingove raztopine 1 in raztopine 2 ter s pipeto odmerimo 1 mL reagenta in ga prenesemo v 100 mL merilno bučko. Reagent razredčimo s 30–40 mL vode in dodamo 0,50 g natrijevega hidroksida ter dopolnimo z vodo do 100 mL. Mešanje zaradi varnosti izvedemo v digestoriju. Raztopina je uporabna en dan.

2. Fosfatni pufer, pH = 6,0:

v 1 L merilni bučki raztopimo 11,66 g osušenega kalijevega dihidrogenfosfata in 2,56 g osušenega dinatrijevega dihidrogenfosfata ter dopolnimo do enega litra.

## Določanje

### *Priprava vzorca za določanje*

Vzorca za analizo ne smemo segrevati. V 50 mL čašo zatehtamo 10 g vzorca, dodamo 20 mL fosfatnega pufra ter premešamo, da se raztopi. Raztopino kvantitativno prenesemo v 50 mL merilno bučko, dodamo in dopolnimo s pufrom do oznake (raztopina medu).

### *Merjenje absorbance*

S pipeto odmerimo 10 mL raztopine medu in jo prenesemo v čašo ter damo v vodno kopel pri temperaturi 313,15 K (40 °C) skupaj s posodo, v kateri je raztopina saharoze.

Po 15 minutah odmerimo s pipeto 5 mL raztopine saharoze in jo dodamo v raztopino medu, premešamo in vključimo uro.

Po petih minutah odmerimo 1 ml raztopine in jo dodamo v 10 mL razredčene raztopine Fehlingovega reagenta v čaši. Raztopino nato segrevamo v čaši, pokriti z urnim steklom. Ohlajeno raztopino filtriramo in takoj izmerimo absorbanco pri 635 nm.

### **Izračun**

Absorbanco izmerjeno po petih minutah s pomočjo umeritvene krivulje (Priloga 2) spremenimo v maso razgrajene saharoze. To maso vstavimo v enačbo in končni rezultat predstavlja aktivnost invertaze.

To število izraža aktivnost invertaze kot g saharoze, ki je z encimom iz 100 g medu eno uro hidrolizirana pri temperaturi 313,15 K (40 °C) in pH = 6,0.

Aktivnost invertaze (IN) = masa saharoze v g na 100 g medu na h pri temperaturi 313,15 K (40 °C) in pH = 6,0.

$$IN = \frac{1,00}{0,02} \cdot \frac{60}{5,0} \cdot m = 600 \cdot m$$

Kjer je:

m masa razgrajene saharoze v g.

## **3.8 Metoda za določanje katalazne aktivnosti**

### *Metoda po Hadwanu*

#### **Princip**

Dvominutna redukcija-oksidacija vodikovega peroksida z encimom iz 1 kg medu.

#### **Aparature**

Poleg standardne laboratorijske opreme potrebujemo še vodno kopel pri 298,15 K ± 0,5 K (25 °C ± 0,5 °C) in kolorimeter (Vernier, COL-BTA) z odčitavanjem absorbance pri 430 nm.

#### **Uporabljene kemikalije:**

- destilirana voda,
- natrijev hidrogenkarbonat, NaHCO<sub>3</sub>, Solvay,
- kobaltov nitrat, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Merck,

- vodikov peroksid, 30 %,  $H_2O_2$ , Belox 30, Belinka,
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat,  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , Kemika,
- kalijev dihidrogenfosfat,  $KH_2PO_4$ , Kemika.

### Reagenti:

1. Raztopina kobaltovega nitrata:

v 1 L merilni bučki raztopimo 20,3 g kobaltovega nitrata in dopolnimo do enega litra z destilirano vodo.

2. Raztopina natrijevega hidrogenkarbonata:

v 1 L merilni bučki raztopimo 90 g natrijevega hidrogenkarbonata in dopolnimo do enega litra z destilirano vodo.

3. Fosfatni pufer,  $pH = 7,4$ :

V 1 L merilno bučko zatehtamo 6,81 g osušenega kalijevega dihidrogenfosfata dihidrata in ga raztopimo v malo destilirane vode ter dopolnimo do enega litra (PPB). V drugo 1 L merilno bučko zatehtamo 8,90 g osušenega natrijevega hidrogenfosfata in raztopimo v malo destilirane vode ter dopolnimo do enega litra (SPB). Raztopini zmešamo v razmerju 1 : 1,5; PPB : SPB.

4. Reagent, raztopina kobaltovega nitrata in natrijevega hidrogenkarbonata:

900 mL raztopine natrijevega hidrogenkarbonata dodamo 50 mL raztopine kobaltovega nitrata in 50 mL destilirane vode. Raztopino premešamo in filtriramo. Raztopino je uporabna 24 ur.

5. Raztopina vodikovega peroksida,  $c(H_2O_2) = 0,10 M$ :

V 100 mL merilno bučko odpipetiramo 11,3 mL 30 % (w/w) vodikovega peroksida. Z destilirano vodo dopolnimo do oznake. Raztopina je obstojna 12 ur.

6. Razredčena raztopina vodikovega peroksida,  $c(H_2O_2) = 10 mM$ :

Odpipetiramo 1 mL raztopine vodikovega peroksida in jo prenesemo v 100 mL merilno bučko ter z destilirano vodo dopolnimo do oznake. Raztopino pripravimo svežo.

### Določanje

#### *Priprava vzorca za določanje*

V 50 mL čašo zatehtamo 25 g medu in ga raztopimo v 10 mL fosfatnega pufera. Kvantitativno prenesemo raztopino v 50 mL merilno bučko in dopolnimo s fosfatnim pufrom do 50 mL.

#### *Merjenje absorbance*

V 25 mL čašo, ki je v vodni kopeli, odpipetiramo 1 mL raztopine medu. Dodamo 2 mL raztopine vodikovega peroksida, ki smo ga predhodno ogreli v vodni kopeli, in začnemo meriti čas. Po pretečenih 2 minutah, dodamo 12 mL reagenta in premešamo. Absorbanco izmerimo takoj.

### Izračun

Količino razgrajenega vodikovega peroksida preračunamo s pomočjo umeritvene krivulje (Priloga 2). Nato vstavimo koncentracijo vodikovega peroksida v naslednjo enačbo in izračunamo katalazno aktivnost.

Katalazna aktivnost nam pove, za koliko mM se je zmanjšala koncentracija vodikovega peroksida v eni minuti.

Katalazna aktivnost (CA) je mM vodikovega peroksida na minuto pri 298,15 K (25 °C) in pH = 7,4.

$$CA = \Delta c \cdot \frac{2,0}{1,0} \cdot \frac{1,0}{2,0} \cdot \frac{2,0}{3,0} = \Delta c \cdot \frac{2,0}{3,0}$$

Kjer je:

$\Delta c$  sprememba koncentracije vodikovega peroksida v mM = mmol/L.

### 3.9 Metoda za merjenje količine prostega vodikovega peroksida

*Metoda po Hadwanu*

#### Princip

Reakcija prostega vodikovega peroksida s kobaltovimi (II) ioni in hidrogenkarbonatnimi ioni ter nastanek trikarbonatokobaltatnega (III) iona.

#### Aparature

Poleg standardne laboratorijske opreme potrebujemo še vodno kopel pri 333,15 K  $\pm$  0,5 K (60 °C  $\pm$  0,5 °C) in 353,15 K  $\pm$  0,5 K (80 °C  $\pm$  0,5 °C) ter kolorimeter (Vernier, COL-BTA) za odčitavanje pri 430 nm.

#### Uporabljene kemikalije:

- destilirana voda,
- natrijev hidrogenkarbonat, NaHCO<sub>3</sub>, Solvay,
- kobaltov nitrat, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Merck,
- vodikov peroksid, 30%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Belox 30, Belinka.

#### Regenti:

1. Raztopina kobaltovega nitrata:

v 1 L merilni bučki raztopimo 20,3 g kobaltovega nitrata in dopolnimo do enega litra z destilirano vodo.

2. Raztopina natrijevega hidrogenkarbonata:

v 1 L merilni bučki raztopimo 90 g natrijevega hidrogenkarbonata in dopolnimo do enega litra z destilirano vodo.

3. Reagent, raztopina kobaltovega nitrata in natrijevega hidrogenkarbonata:

900 mL raztopine natrijevega hidrogenkarbonata dodamo 50 mL raztopine kobaltovega nitrata in 50 mL destilirane vode. Raztopino pustimo stati 48 ur. Pred uporabo jo je potrebno filtrirati.



## Določanje

### *Priprava vzorca za določanje*

Vzorca za analizo ne smemo segrevati. V 50 mL čašo zatehemo 10 g vzorca, dodamo 20 mL destilirane vode ter premešamo, da se raztopi. Raztopino kvantitativno prenesemo v 50 mL merilno bučko in dopolnimo z destilirano vodo do oznake (raztopina medu).

### *Merjenje absorbance*

S pipeto odmerimo 4 mL raztopine medu in jo prenesemo v čašo. Nato odpipetiramo 2 mL destilirane vode in 24 mL raztopine reagenta ter ju dodamo v 4 mL raztopine v čaši. Premešamo in takoj izmerimo absorbanco pri 435 nm.

### **Merjenje gostote medu**

Gostoto medu izmerimo s pomočjo menzure. Meritev izvedemo pri temperaturi, pri kateri je menzura umerjena. Volumen preverimo z destilirano vodo.

### **Izračun**

Izmerjeno absorbanco s pomočjo umeritvene krivulje (Priloga 2) spremenimo v količino vsebujočega prostega vodikovega peroksida in ga vstavimo v spodnjo enačbo.

$$c = \frac{1,0}{0,2} \cdot c_i \cdot \rho_m$$

Kjer je:

$c_i$  koncentracija vodikovega peroksida v mM = mmol/L

$\rho_m$  gostota medu podana v kg/L.

## **3.10 Difuzijski antibiogram**

### *Metoda Kirby-Bauer*

### **Princip**

Območje inhibicije nam pove antibakterijsko učinkovitost snovi.

### **Aparature**

Poleg standardne laboratorijske opreme potrebujemo še sterilizator (KAMIĆ, A-7), kljunasto merilo (MIB Messzeuge, Nemčija, DIN EN ISO 9002) in sušilnik ali inkubator (instrumentaria Zagreb, STA-01/02) z zmožnostjo segrevanja na 298,15 K (25 °C).

### **Uporabljene kemikalije:**

- vodovodna voda,
- LC agar-agar, Sigma Aldrich,
- glukoza monohidrat,  $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ , Sigma Aldrich.

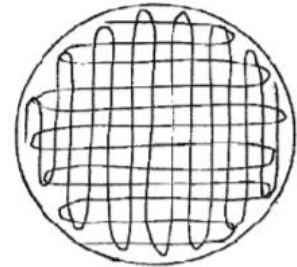
### **Priprava substrata**

Agar-agar raztopimo v ustrezni količini vode. Dodamo toliko glukoze monohidrata, da ustreza 1/50 mase agar-agarja. Raztopino zavremo in jo pustimo vrti eno minuto. Nato jo prelijemo v petrijevke in

jih pokrijemo. Položimo jih v sterilizator, v katerem je manjša količina vode. Lonec pokrijemo in zaklenemo z varnostnim mehanizmom ter steriliziramo.

### Priprava gojišča

Prižgemo gorilnik. Sterilno vatirano palčko pomočimo v starano juho, nato odpremo eno od petrijevk in nanesimo kulturo po površini, kot prikazuje slika 8. Nanos osušimo pri plamenu in sterilno zapremo. Kulturo nato gojimo 24 ur pri temperaturi 298,15 K (25 °C).



Slika 8: Potek razmaza brisa

### Priprava testa

V površino gela s pomočjo steklene cevke zvrtno luknjico vse do dna gela. V nastalo praznino odmerimo 1 g prvega vzorca. Drugi in tretji vzorec pa pripravimo tako, da ju najprej segrevamo v vodni kopeli. Drugi vzorec pri 333,15 K (60 °C), tretji vzorec pa pri 353,15 K (80 °C).

Kulturo pustimo gojiti 24 ur pri 298,15 K (25 °C).

### Vrednotenje testa

Po koncu gojenja bi morale biti vidne inhibicijske cone pri vzorcih, ki so antibakterijsko aktivne. Te cone ocenimo po mednarodnem standardu S I R – *Sensitive* ali občutljivo, *Intermediate* ali delno občutljivo in *Resistant* ali odporno.

## 4. Rezultati in diskusija

Po končanih meritvah smo vse podatke zbrali in zapisali v sklopih glede na vrsto lastnosti. Vzorcju medu iz leta 2019 (M2019) in vzorcju medu iz leta 2020 (M2020) smo določili vsebnost vode, pepel, skupne kisline, pH, encimska števila in vsebnost prostega vodikovega peroksida pri različnih temperaturah. Te lastnosti smo razdelili v dve skupini: fizikalno kemijske, ki predstavljajo temeljne značilnosti medu, in biokemijske, ki predstavljajo organski del lastnosti medu.

### 4.1 Fizikalno kemijske lastnosti

V sklopu fizikalno kemijskih lastnosti se nahajajo rezultati, ki podajajo najosnovnejše lastnosti, ki niso posledice biokemijske aktivnosti in izvora medu. Sem spadajo vsebnost vode, pepel, skupna kislost in pH.

Na podlagi teh lastnosti lahko predvidevamo o določenih biokemijskih lastnostih, od kislosti je odvisno delovanje encimov, ki je prav tako povezano z vsebnostjo ionov in s trdno snovjo v medu, ki jo predstavlja pepel. Vsebnost vode pa nam pove stopnjo zorenja medu. Manj je vode, bolj je med zorjen.

Nekatere izmed teh lastnosti so pomembne tudi za proizvajalce medu, saj so določene z mejnimi vrednostmi v Pravilniku (2015).

Tabela 4: Podatki o vsebnosti vode ( $w_{H_2O}$ ), pepela, skupnih kislin (SK) in pH za vzorca medu M2019 in M2020

Vzorec	$w_{H_2O}$ (%)	Pepel (g/100 g)	SK (meq/kg)	pH ( $\bar{x} \pm \Delta x$ )
M2019	16,8	0,194	27	4,03 ± 0,08
M2020	17,5	0,332	34	3,62 ± 0,07

#### Vsebnost vode

Vsebnost vode nam pove količino vode v medu, podano v g/100 g medu ali %. Vsebnost vode smo merili z refraktometrom pri temperaturi 298,1 K (24,9 °C). Iz tabele 4 je razvidno, da starejši med (M2019) vsebuje manj vode (16,8 %) kot mlajši med (M2020) (17,5 %). Razlika v vsebnosti vode (0,7 %) lahko govori o starosti medu ali dozorelosti oziroma zorenju medu. Med, ki je bil dlje časa zorjen, lahko vsebuje manj vode kot med, zorjen krajši čas. Med pa tudi čez čas, ko je že shranjen v posodi, izgublja vodo, saj ta počasi hlapi. Ker pa se med ne shranjuje v ampulah ali popolnoma zaprti posodi, lahko vodna para prosto hlapi iz posode in tako se količina vode v medu počasi zmanjšuje.

Tako lahko sklepamo, da je bil starejši med (M2019) najverjetneje dlje časa zorjen kot mlajši (M2020). Vsebnost vode je omejena tudi z najvišjo dovoljeno v Pravilniku (2015). Med lahko vsebuje največ 20 g/100 g medu. Oba naša vzorca izpolnjujeta te pogoje.

#### Pepel

Pepel predstavlja trdni anorganski ostanek po žarenju. Vsebnost pepela v medu pa je odvisna predvsem od vrste cvetnega prahu, vrste rastlinskega nektarja in vremenskih ter drugih geografskih dejavnikov. Tako lahko razliko pripišemo le vsebnosti specifične vrste cvetnega prahu in metabolnih razmer pri čebelah. Vzorec M2019 ima 0,194 g pepela na 100 g medu, vzorec M2020 pa 0,332 g pepela na 100 g medu.

### Skupne kisline

Vzorec M2019 vsebuje manj miliekvivalentov kisline na kilogram (27) kot vzorec M2020 (34). Ker je vsebnost različnih organskih kislin odvisna od vsebnosti specifičnih vrst cvetnega prahu ter metabolizma čebel in ne od staranja medu, ki ima sicer manjši vpliv na padanje vsebnosti kislin, lahko razliko pripišemo le vsebnosti specifičnega peloda in razmeram v panju.

Skupne kisline so po Pravilniku (2015) omejene z maksimalno mejno vrednostjo pri 50 meq/kg medu. Oba naša vzorca padeta pod to vrednost in dosejata ta pogoj.

### pH

Kislost medu določajo različne organske kisline, prisotne v medu, ki so posledica vsebnosti peloda različnih rastlin. Kislost oziroma pH se medu določa s pomočjo merilnika pH. Izmerjene vrednosti so bile povprečje treh meritev za vsak vzorec:  $4,03 \pm 0,08$  za vzorec M2019 in  $3,62 \pm 0,07$  za vzorec M2020. Nižji pH ima vzorec M2020 kot posledico vsebnosti večje količine organskih kislin ali več večprotonskih kislin, kar razberemo iz podatka za skupne kisline.

## 4.2 Biokemijske lastnosti

V sklopu biokemijskih lastnosti so rezultati, ki podajajo najosnovnejše lastnosti, ki so posledica biokemijske aktivnosti in izvora medu, torej vsebnosti različnih encimov, prostega vodikovega peroksida. Vsi ti dejavniki so poglavitni elementi antibakterijske aktivnosti.

Podatke smo pridobili s pomočjo spektrofotometričnih metod; s pomočjo metode po Shadeu diastazno število, s pomočjo metode s Fehlingovim reagentom invertazno število in s pomočjo metode po Hadwanu katalazno aktivnost in koncentracijo prostega vodikovega peroksida. Rezultati so podani v spodnji tabeli (tabela 5).

Tabela 5: Podatki o diastaznem (DN) in invertaznem številu (IN) ter katalazni aktivnosti (CA)

Vzorec	DN	IN	CA
M2019	11,24	4,28	4,72
M2020	12,06	6,48	4,81

### 4.2.1 Diastazno število

Pravilnik o medu (2015) dovoljuje najmanjšo vrednost diastaznega števila 8 in za med z naravno nižjo vsebnostjo diastaze diastazno število 3. V primeru, da je diastazno število medu manjše od navedenih podatkov, lahko sklepamo, da je bil med predhodno ogrevan ali izpostavljen svetlobi. Koščak (2001) <sup>(1)</sup> sicer navaja, da se diastazno število medu, shranjenega na svetlobi, po 18 mesecih shranjevanja ni spremenilo oziroma je bilo odstopanje minimalno.

Vzorec medu M2019 ima diastazno število 11,24, vzorec medu M2020 pa 12,06. Iz podatkov vidimo, da ima starejši med nekoliko manjše diastazno število, kar lahko pojasnimo s postopnim razpadom in z deaktivacijo diastaze s časom ali pa razliko pripišemo nižji začetni vsebnosti diastaze in tako manjšemu diastaznemu številu.

Naša vzorca izpolnjujeta pogoj, ki ga določa Pravilnik (2015) in tako lahko sklepamo, da nista bila predhodno pogreta ali shranjena na direktni sončni svetlobi. Na podlagi tega predvidevamo, da so ostala encimska števila in aktivnosti ter vsebnost prostega vodikovega peroksida ohranjeni kot začetni in sta se spreminjali korelacijsko s staranjem in ne z okoljskimi dejavniki.

Vrednosti diastaznega števila naših vzorcev so sicer nekoliko nižje od običajne vrednosti (od 13 do 24), vendar je ta razlika zanemarljiva, saj diastazna števila vzorcev še vedno ustrezajo kriterijem.

#### 4.2.2 Invertazno število

Invertaza je pomemben encim pri spreminjanju nektarja v med oziroma saharoze v invertni sladkor, torej zmes fruktoze in glukoze. Pri procesu se porablja voda, kar še dodatno pripomore k zorenju medu.

Pravilnik (2015) ne predpisuje minimalne vrednosti invertaznega števila, zato smo se oprli na predpostavke Molan et. al. (1996)<sup>(5)</sup>, ki predpostavljajo običajne vrednosti invertaznega števila med 4 in 25. Kot je razvidno iz tabele 5, ima vzorec M2019 vrednost invertaznega števila 4,28, vzorec M2020 pa 6,48. Obe vrednosti sta sicer bližje spodnji meji običajne vrednosti, vrednost invertaznega števila vzorca medu M2019 korelira z daljšim časom skladiščenja medu, vrednost invertaznega števila vzorca M2020 pa je zaradi krajšega časa skladiščenja primerno višja. Razliko pa lahko pripišemo tudi razmeram v panju in številu mladih čebel, ki v večji meri pogojujejo vsebnost invertaze v zorečem medu.

#### 4.2.3 Katalazna aktivnost

Aktivnost encima katalaze je pomemben dejavnik pri razgradnji vodikovega peroksida, ki predstavlja pomemben dejavnik pri antibakterijski aktivnosti medu. Na podlagi katalazne aktivnosti lahko sklepamo o vsebnosti prostega vodikovega peroksida, ki je del antibakterijske aktivnosti. Encim pa je kljub točnosti medu omejen zaradi njegove viskoznosti in majhne količine vode.

Katalazna aktivnost vzorca medu M2019 je 4,72, vzorca medu M2020 pa 4,81. Starejši med ima le za 0,09 mM/min manjšo katalazno aktivnost, kar je najverjetneje razlika v začetni vsebnosti katalaze v posameznem vzorcu medu, ki je najverjetneje blago variirala zaradi deaktivacije katalaze.

Katalaza je pri majhnih temperaturnih spremembah stabilna in se ne deaktivira s primerljivo hitrostjo kot ostali encimi. Katalazna aktivnost je običajno med 2 in 150, kjer velja, da manjše število pomeni manjšo aktivnost. Naša vzorca torej izkazujeta majhno katalazno aktivnost. Na podlagi tega lahko sklepamo, da imata višjo ali večjo vsebnost prostega vodikovega peroksida v primerjavi z drugimi vzorci medu oziroma vzorci medu z višjo katalazno aktivnostjo. Posledično iz tega sklepamo, da bosta antibakterijsko aktivnejša.

#### 4.2.4 Prost vodikov peroksid

Koncentracija prostega vodikovega peroksida predstavlja merilo za sklepanje o antibakterijski aktivnosti medu. Če je koncentracija vodikovega peroksida v medu visoka, lahko sklepamo, da bo ta vzorec medu antibakterijsko tudi aktivnejši v primerjavi z drugimi, ki imajo nižjo koncentracijo vodikovega peroksida.

Vsebnost prostega vodikovega peroksida smo merili v medu pri sobni temperaturi (298,15 K (25 °C)), v medu, segretem na 333,15 K (60 °C), in v medu, segretem na 353,15 K (80 °C). Različne temperature smo določili glede na sobno temperaturo (298,15 K (25 °C)) in temperaturo čaja, ko si vanj raztopimo med – temperatura 333,15 K (60 °C) za ohlajen čaj in 353,15 K (80 °C) za vroč čaj. Koncentracije smo nato zbrali v tabelo (6).

Tabela 6: Podatki o koncentraciji prostega vodikovega peroksida pri vzorcih medu M19 in M20 pri različnih temperaturah

Vzorec	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mM)		
	298,15 K (25 °C)	333,15 K (60 °C)	353,15 K (80 °C)
M2019	1,79	0,03	0,00*
M2020	0,70	0,01	0,00*

\*koncentracija je bila premajhna, da bi jo zaznali z uporabo naše metode

Iz tabele 6 lahko razberemo, da je imel vzorec medu M2019 koncentracijo prostega vodikovega peroksida pri sobni temperaturi 1,79 mM, vzorec M2020 pa 0,70 mM. Razlika med vzorcema medu je 1,09 mM, kar je velika razlika glede na majhno razliko v katalazni aktivnosti. Vzorec medu M2019 ima višjo vsebnost prostega vodikovega peroksida najverjetneje zaradi vsebnosti specifične vrste peloda. Kostanjev in hojev med imata zaradi vsebnosti kostanjevega peloda ali hojeve mane tudi višjo vsebnost vodikovega peroksida in zato lahko sklepamo, da ima vzorec medu M2019 višjo vsebnost kostanjevega peloda ali hojeve mane kot vzorec medu M2020. Ni izključljivo tudi to, da vzorec medu M2020 sploh nima kostanjevega cvetnega prahu ali hojeve mane.

Vzorci medu smo segrevali v vodnih kopelih pri določeni temperaturi. Določeno količino medu smo zaprli v posodo in jo potopili v ogreto vodo. Ko smo posode potopili, smo vodno kopel odstavili z ognja in jo pustili, da se sama ohladi. Tako smo simulirali segrevanje medu v čaju, saj običajno med raztopimo v čaju in počakamo, da se ohladi. Zaradi merodajnih meritev pa smo počakali, da sta se vzorca ohladila na 298,15 K (25 °C) in nato pripravili raztopine za določanje prostega vodikovega peroksida.

Pri segretyh vzorcih se je koncentracija prostega vodikovega peroksida opazno zmanjšala. Pri 333,15 K (60 °C) je bila koncentracija prostega vodikovega peroksida v vzorcu medu M2019 0,03 mM, v vzorcu medu M2020 pa 0,01 mM. Absolutna sprememba koncentracije vzorca medu iz leta 2019 je bila 1,76 mM, vzorca medu iz leta 2020 pa 0,69 mM.

Pračunano v relativno spremembo ali odstotke je to za vzorec medu M2019 98,3 %, za vzorec medu M2020 pa 98,6 %. Iz tega je razvidno, da se že pri segrevanju vzorcev medu na 333,15 K (60 °C), razgradi skoraj ves prost vodikov peroksid, ki je bil prisoten v vzorcih.

Pri segrevanju vzorcev medu na višje temperature smo izmerili koncentracijo prostega vodikovega peroksida pri 0,00 mM. To pomeni, da se je pri segrevanju vzorcev medu na 353,15 K (80 °C) razgradilo toliko prostega vodikovega peroksida, da ga z uporabo naše metode nismo mogli več zaznati.

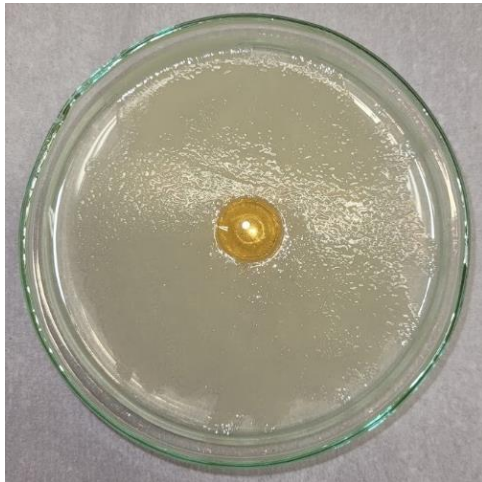
Vodikov peroksid je dokaj stabilen, dokler ne pride do velikih sprememb temperature, tlaka ali pH. Ko smo med segrevali, se je najprej pri 310,55 K (37,5 °C) popolnoma aktivirala katalaza, ki je do določene mere razgradila del prostega vodikovega peroksida. Ta je začel razpadati hitreje, saj se je temperatura hitro poviševala. Pri 333,15 K (60 °C) se encimi deaktivirajo. Vodikov peroksid razpada naprej, pride do disociacije vodikovega protona in nastane reaktivni delec peroksidni anion, ki reagira veliko hitreje kot sam vodikov peroksid in se veže v različne okside in perokside organskih spojin. Majhna količina, ki ga ostane na koncu, pa je premajhna, da bi jo lahko zaznali s pomočjo Hadwanove kompleksometrične metode.



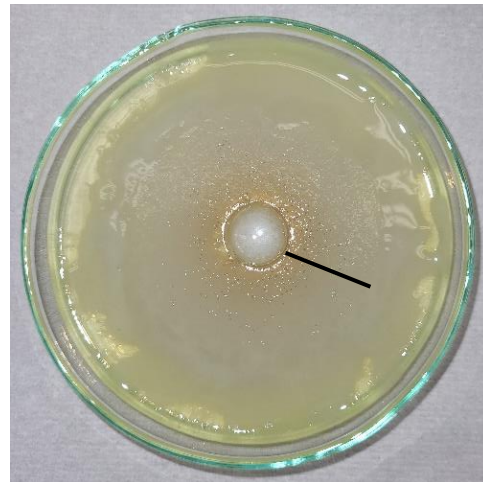
#### 4.2.5 Difuzijski antibiogram

S pomočjo difuzijskega antibiograma smo našima vzorcema merili antibakterijsko aktivnost. Bakterije (streptokoke in bacile iz juhe) smo najprej gojili na podlagi iz agar-agarja. Po 24 urni inkubaciji pri 298,15 K (25 °C) smo v površino izvrtali luknjo in vanjo nanесли 1 g vzorca medu (slike 9, 10, 11, 12).

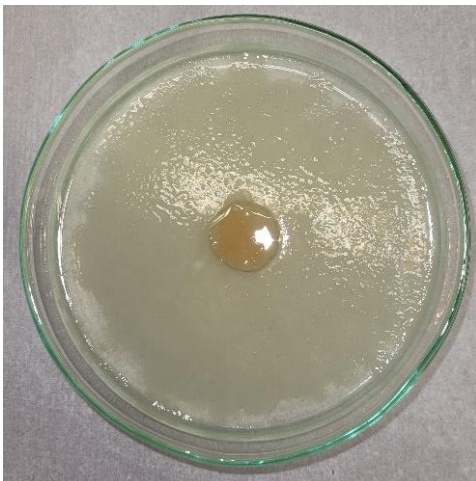
Meritve smo ponovili še pri vzorcu medu, segretem na 333,15 K (60 °C) in 353,15 K (80 °C). Gojišča smo nato ponovno inkubirali in izmerili območja inhibicije rasti bakterij. Inhibicijska območja so bila v primerjavi s preostalo kulturo suha in rast bakterij je bila zaustavljena (slike 9 a, 10 a, 11 a, 12 a).



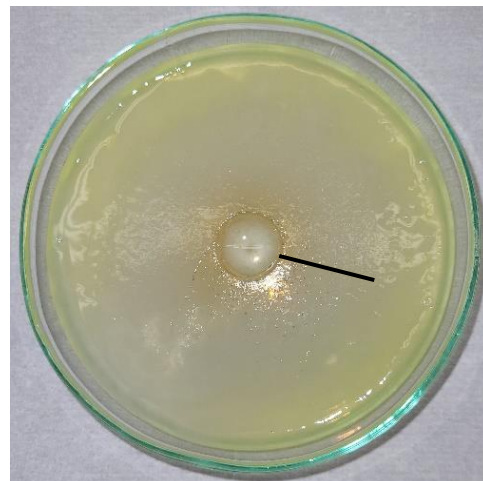
Slika 9: Vzorec medu M2019 na gojišču 298,15 K (25 °C), pred inkubacijo



Slika 9 a: Vzorec medu M2019 na gojišču 298,15 K (25 °C), po inkubaciji. Območje inhibicije je označeno s črto.



Slika 10: Vzorec medu M2019 na gojišču 333,15 K (60 °C), pred inkubacijo



Slika 10 a: Vzorec medu M2019 na gojišču 333,15 K (60 °C), po inkubaciji. Območje inhibicije je označeno s črto



Slika 11: Gojišče z vzorcema medu, od leve: M2019, M2020. 333,15 K (60 °C), pred inkubacijo



Slika 11 a: Gojišče z vzorcema medu, od leve: M2019, M2020. 333,15 K (60 °C), po inkubaciji. Območje inhibicije je označeno s črto.



Slika 12: Gojišče z vzorcema medu, od leve: M2019, M2020. 353,15 K (80 °C), pred inkubacijo



Slika 12 a: Gojišče z vzorcema medu, od leve: M2019, M2020. 353,15 K (80 °C), po inkubaciji

V tabeli (7) spodaj so podane izmerjene inhibicijske cone. Merili smo razdaljo od notranjega roba ali od roba luknjic do navidezne meje med inhibiranimi in živimi bakterijami.

Tabela 7: Velikost inhibicijskih območij za vzorca medu M2019 in M2020 pri različnih temperaturah

Vzorec	Območje inhibicije (cm)		
	298,15 K (25 °C)	333,15 K (60 °C)	353,15 K (80 °C)
M2019	2,10	1,99	0,00
M2020	1,96	1,61	0,00

Območje inhibicije je bilo pri sobni temperaturi za vzorec medu M2019 2,10 cm, za vzorec medu M2020 pa 1,96 cm. Primerljivo veliki vrednosti nam potrjujejo antibakterijsko aktivnost medu, ki je v



tem primeru precejšnja. Razliko med aktivnostma lahko pojasnimo z vsebnostjo prostega vodikovega peroksida, ki je bila pri vzorcu medu iz leta 2020 manjša kot pri vzorcu medu iz leta 2019.

Pri vzorcih, segretilih na 333,15 K (60 °C), je območje inhibicije že manjše, ni pa pričakovane spremembe, ki bi bilo zmanjšanje inhibicijskih območij za približno 90 % ali več v skladu z zmanjšanjem koncentracije prostega vodikovega peroksida. Pri vzorcu medu M2019 je bilo območje inhibicije 1,99 cm, pri vzorcu medu M2020 pa 1,61 cm. Absolutna sprememba je tako znašala 0,11 cm za vzorec medu M2019 in 0,35 cm. Preračunano v relativno spremembo ali odstotke je bila sprememba pri vzorcu medu M2019 5,24 %, pri vzorcu medu M2020 pa 17,9 %. V primerjavi s spremembo količine prostega vodikovega peroksida se antibakterijska aktivnost ni zmanjšala tako izrazito.

Na podlagi te primerjave lahko sklepamo, da je v medu še neka učinkovina, ki je zavrla rast bakterij, ali da je vodikov peroksid nelinearno učinkovit in je potrebna le manjša količina za velik učinek. Na robovih luknjic, v katere smo nanесли vzorce medu, je vidna difuzirana temna snov.

Predvidevamo, da gre za polifenolne spojine, ki imajo značilno temno barvo, ki se običajno vidi tudi v svežem medu. Vsebnost polifenolov bi lahko potrdili s Folin-Ciocalteuovim reagentom.

Vzorci medu, ki so bili segreti na temperaturo 353,15 K (80 °C), pa niso izkazovali antibakterijske aktivnosti. To potrjuje rast bakterij, ki se ni spremenila v območju difuzije medu. Inhibicijska območja so tako merila 0,00 cm. Ker pa tukaj kljub vidnim temnim difuzijskim vzorcem polifenolov ni bilo inhibicijskih območij, lahko sklepamo, da so za antibakterijsko aktivnost pomembni tako koncentracija prostega vodikovega peroksida kot tudi vsebnost polifenolov in drugih komponent.

Na podlagi izmerjenih območij inhibicije smo določili kvalifikator občutljivosti bakterij na posamezen vzorec medu. Podatki so predstavljeni v tabeli (8).

Tabela 8: Kvalifikatorji občutljivosti bakterij na vzorca medu M2019 in M2020 pri različnih temperaturah

Vzorec	Kvalifikator občutljivosti		
	298,15 K (25 °C)	333,15 K (60 °C)	353,15 K (80 °C)
M2019	S	S	R
M2020	S	S/I	R

Kultura streptokokov in bacilov je bila občutljiva (S) na vzorce medu M2019 in M2020 pri sobni temperaturi in na vzorec medu M2019 pri 333,15 K (60 °C). Vzorec medu M2020 pri 333,15 K (60 °C) smo ovrednotili z občutljivo / delno občutljivo (S/I), saj je izkazoval nekoliko manjšo antibakterijsko aktivnost. Vzorca medu M2019 in M2020, segreta na 353,15 K (80°C), nista izkazovala antibakterijske aktivnosti in smo ju označili z odporno (R).

Primerjava kvalifikatorjev nam pove, da med ohrani nekaj antibakterijskih lastnosti tudi po segrevanju na 333,15 K (60 °C) in da pri segrevanju na 353,15 K (80 °C) izgubi svoje antibakterijske lastnosti.

## 5. Sklepi in zaključek

Dobljene rezultate smo oblikovali v sklepe, s katerimi smo predstavili osnovne ugotovitve:

- Naša vzorca medu ustrezata pogojem v Pravilniku o medu (2015).
- Naša vzorca vsebujeta encime diastazo, invertazo in katalazo.
- Naša vzorca vsebujeta prost vodikov peroksid.
- Med, segret na temperaturo 333,15 K (60 °C), ne ohrani začetne koncentracije prostega vodikovega peroksida, ohrani pa antibakterijsko aktivnost.
- Med, segret na temperaturo 353,15 K (80 °C), ne ohrani začetne koncentracije prostega vodikovega peroksida, prav tako ne ohrani antibakterijske aktivnosti.

Na podlagi dobljenih rezultatov in sklepov smo ovrednotili naše cilje in hipoteze.

### Cilji:

- Dokazali in izmerili bomo encimsko aktivnost v medu, ki bo korelirala z vsebnostjo encima v medu.

Ta cilj smo dosegli, encimske aktivnosti smo izmerili in ustrezajo običajnim vrednostim encimskih števil in aktivnosti.

- Dokazali in izmerili bomo količino prostega vodikovega peroksida v medu.

Ta cilj smo tudi dosegli, koncentracijo prostega vodikovega peroksida smo izmerili in s tem dokazali prisotnost prostega vodikovega peroksida v medu.

- Dokazali bomo, da je z vidika vsebnosti prostega vodikovega peroksida med antibakterijsko učinkovitejši, zaužit pri sobni temperaturi.

Ta cilj smo tudi dosegli, vsebnost prostega vodikovega peroksida je bila večja v medu pri sobni temperaturi, prav tako je antibakterijska učinkovitost večja v medu pri sobni temperaturi. Je pa antibakterijska učinkovitost medu pri 333,15 K (60 °C) tudi precejšnja, kljub nizki vsebnosti vodikovega peroksida.

### Hipotezi:

H1: Med vsebuje encime, ki so biološko aktivni.

To hipotezo smo potrdili. Encimska števila in encimska aktivnost nam podajo količino posameznega encima oziroma njegovo aktivnost. Ker smo z našimi metodami izmerili spremembe količin substratov, ki jih razgrajujejo specifični encimi: diastaza; škrob, invertaza; saharozo in katalaza; vodikov peroksid, smo dokazali prisotnost specifičnega encima v medu in tudi njegovo aktivnost.

H2: Količina prostega vodikovega peroksida v medu bo v vzorcih segretega medu manjša kot v vzorcih medu pri sobni temperaturi.

To hipotezo smo potrdili. Vzorca nesegetega medu sta imela višjo koncentracijo vodikovega peroksida od vzorcev segretega medu. Vzorca medu, segreta na 333,15 K (60 °C), sta imela za 98 % nižjo koncentracijo prostega vodikovega peroksida, v vzorcih medu, segretilih na 353,15 K (80 °C), pa sploh nismo izmerili koncentracije prostega vodikovega peroksida, saj je bila ta prenizka oziroma smo uporabili premalo občutljivo metodo določanja.

H3: Med, segret na previsoko temperaturo, ne bo ohranil antimikrobnih lastnosti, kar bo vidno na difuzijskem antibiogramu.

To hipotezo smo delno potrdili. Med, segret na temperaturo 333,15 K (60 °C), je ohranil antibakterijske lastnosti, saj je bilo na difuzijskem antibiogramu s tem vzorcem vidno območje inhibicije rasti bakterij. Med, segret na 353,15 K (80 °C), pa ni ohranil antibakterijskih lastnosti. Na difuzijskem antibiogramu ni bilo vidnih območij inhibicije in tako smo dokazali antibakterijsko neučinkovitost medu, segretega na 353,15 K (80 °C).

## Zaključek

Med je vsestransko uporabno sladilo, ki pa zaradi nepravilne uporabe ne doseže viška svoje učinkovitosti. Naša vzorca medu vsebujeta aktivne encime in zadostujeta pogojem, ki jih določa Pravilnik (2014). Encimi, ki smo jih dokazali in določali njihova števila ali aktivnosti, so bili: diastaza, invertaza in katalaza. Na podlagi vsebnosti ali aktivnosti teh encimov pa smo sklepali o koncentraciji prostega vodikovega peroksida in antibakterijski učinkovitosti.

Koncentracijo prostega vodikovega peroksida smo merili pri različnih temperaturah, ki smo jih določili na podlagi temperature, pri kateri zaužijemo med: 298,15 K (25 °C): med pri sobni temperaturi, 333,15 K (60 °C): med v ohlajenem čaju in 353,15 K (80 °C): med v vročem čaju. Izmerjene koncentracije prostega vodikovega peroksida so bile za 98 % manjše v medu pri temperaturi 333,15 K (60 °C) in premajhne, da bi jih zaznali s pomočjo naše metode v medu pri 353,15 K (80 °C).

Na podlagi koncentracije prostega vodikovega peroksida pa smo sklepali o antibakterijski učinkovitosti medu pri določeni temperaturi. Kljub naši hipotezi, da med ne bo ohranil antibakterijskih lastnosti pri 333,15 K (60 °C) in nizki izmerjeni koncentraciji prostega vodikovega peroksida, je med, segret na te temperature, vseeno ohranil celotno ali delno antibakterijsko učinkovitost in se izkazal kot učinkovit pri zaviranju rasti bakterij (streptokokov in bacilov iz starane juhe).

### *Možne izboljšave:*

- Spremljanje encimskih števil in aktivnosti v različnih sortah medu.
- Spremljanje encimskih števil in aktivnosti s staranjem medu.
- Spremljanje koncentracije prostega vodikovega peroksida in antibakterijske aktivnosti v različnih sortah medu.
- Spremljanje koncentracije prostega vodikovega peroksida in antibakterijske aktivnosti s staranjem medu.
- Izmeriti vsebnost polifenolov in ugotoviti korelancio med vsebnostjo polifenolov, koncentracijo prostega vodikovega peroksida in antibakterijsko aktivnostjo medu.
- Primerjati antibakterijsko učinkovitost medu pri različnih koncentracijah v vodni raztopini.

## 6. Uporabljeni viri in literatura

- (1) Koščak T. Vpliv pogojev skladiščenja medu na diastazno število. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za Živilstvo. 2001.
- (2) Golob T. in Plestenjak A. The physico-chemical characteristics of Slovenian honey. Research Reports of the Biotechnical Faculty University of Ljubljana. Agricultural Issue. Ljubljana. Univerza v Ljubljani. 1998. ISSN 1408–340X.
- (3) Babnik J. in Poklukar J. Od čebele do medu. Ljubljana. Kmečki glas, 1998. ISSN 961–203–140–1.
- (4) Ipavec H. Vsebnost sladkorjev in skupnih kislin v slovenskih sortnih medovih. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. 1997.
- (5) Molan P. C. 1996. Authenticity of honey. V: Food authentication. Ashurst P. R., Dennis M. J. (eds.). London, Chapman & Hall. ISSN 259–296.
- (6) Mato I. S., Huidobro J. F., Simal-Lozano J. S., Sancho M. T. Significance of Nonaromatic Organic Acids in Honey. J. Food Prot. 2003, 66, ISSN 2371–2376.
- (7) Akšič M.F., Čolić S., Meland M., Natić M. Sugar and Polyphenolic Diversity in Floral Nectar of Cherry. V: Merillon JM., Ramawat K. (eds) Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. 2019. ISBN 978–3–319–76887–8.
- (8) Petruzzello M. Nectar. Encyclopedia Britannica, 2019. <https://www.britannica.com/science/nectar>.
- (9) Accorti M., Persano Oddo L., Piazza M.G. in Sabatini A.G. Characterization of unifloral honeys. Apidologie 26 (6), 1995. ISSN 453–465.
- (10) Javornik F., Kastelic L., Kranjc A., Mihelič J., Senegačnik E., Senegačnik J., Vidmar U. Čebelarstvo. Ljubljana, ČZP Kmečki glas. 1987. 378.
- (11) Papić J., Perkovac M., Balenović J. Utjecaj vremena skladištenja na količino hidrosimetilfurfurala i na katalitičku aktivnot amilaza u medu. Prehrambeno-tehnološka i Biotehnološka revija, 26 (4), 1988. ISSN 147–150.
- (12) Thrasyvoulou A.T. The use of HMF and diastase as criteria of Greek honey. Journal of Apicultural Research 25 (3), 1986. ISSN 186–195.
- (13) Železnikar D. Pridobivanje in promet s čebeljimi pridelki. V: Zdravstveno varstvo čebel. Ljubljana, Zveza čebelarских društev Slovenije in Republiška veterinarska uprava SR Slovenije. ISSN 72–78.
- (14) Rybak-Chimielewska H., Szczesna T. Coposition and Properties of Polish Buckwheat Honey. V: Current Advances in Buckwheat Research. 114. 1995. ISSN 793–799.
- (15) Veljanovski V. Sladkorji, aminokislina in drugi kakovostni parametri lipovega, kostanjevega in žajbljevega medu. Ljubljana, 1993.
- (16) Balenović J., Perkovac M., Papić J. Količina hidrosimetilfurfurala i katalitička aktivnot amilaza u medu. Prehrambeno-tehnološka i biotehnološka revija, 26 (4). ISSN 143–146.
- (17) Bertonec J. Diastazna aktivnost in vsebnost cvetnega prahu slovenskih medovih. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. 1998. 55.
- (18) Minicione B., U. Leuzzi, E. Manzi, G. Scirto and E. Cirino. "Research on honey. I. Commercial and melissopalynological characterization of honey produced in Calabria." (1992).
- (19) White J.W. (1994) The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. Bee World, 75(3), ISSN 104–17.

- (20) Bogdanov S. Harmonised Methods of the International Honey Commission. Bern, Swiss Bee Research Center, International Honey Commission World Network of Honey Science. 2009. 63
- (21) Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. Food Chemistry 63 (4), 1998. ISSN 549–562.
- (22) Robbins R.J., Bean S.R. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. Journal of Chromatography A. 2004. 1038. 1-2. ISBN 97–105
- (23) Kočevar U. Vpliv temperature in časa segrevanja na nekatere fizikalnokemijske lastnosti medu. Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. Ljubljana, 2016.
- (24) Ovčec S. Encimska aktivnost medu. Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani. Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo. Ljubljana, 2007.
- (25) Hadwan M. H. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. BMC Biochemistry. 2018. 19. 1. 10.1186/s12858-018-0097-5.
- (26) Shade J. E., Marsh G. L., Eckart J. E. Diastase activity and Hydroxy-methyl-furfuralin honey and their usefulness in detecting heat alteration. Food Research 23. ISSN 446–463
- (27) Von der Ohe W. Unifloral honeys: chemical conversion and pollen reduction. Grana 33 (4-5) 1994. ISSN 292–294.
- (28) Joshi S. R., Pechhacer H., William A., von der Ohe W. Physicochemical characteristics of Apis dorsata, A. cerana and A. mellifera honey from Chitwan district, central Nepal. Apidologie 31 (3). 2000.
- (29) Sancho M. T., Muniategui S., Huidobro J. F., Lozano J. S. Agin gof honey. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 40 (1). ISSN 134–138.
- (30) Krauze A. in Krauze J. Changes in chemical composition of stored honeydew honeys. Acta Alimentaria Polonica 2. 17 (41), 1991.

Viri slik:

- (1) <https://radio.ognjisce.si/sl/221/utrip/?ls-art2=231> Dostopano: 13. 9. 2020.
- (2) [https://en.wikipedia.org/wiki/Glucose\\_oxidase#/media/File:Glucose\\_oxidase\\_rxn.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Glucose_oxidase#/media/File:Glucose_oxidase_rxn.svg) Dostopano: 16. 9. 2020.
- (3) <https://www.med-honey.com/sl/kaj-je-polen/> Dostopano: 25. 9. 2020.
- (4) <https://www.genaxxon.com/shop/en/shop-all-products/cell-biology/amino-acids/1784/l-proline-biochemica> Dostopano: 23. 9. 2020.
- (5) <https://5-hmf.com/> Dostopano: 23. 9. 2020.
- (6) Avtorska delo, Huber K., Jocić G.
- (7) Avtorsko delo, Huber K., Jocić G.
- (8) Avtorsko delo, Rinc Črnko L., Dobnik A.
- (9) Avtorsko delo, Huber K., Jocić G.
- (9a) Avtorsko delo, Huber K., Jocić G.
- (10) Avtorsko delo, Huber K., Jocić G.
- (10a) Avtorsko delo, Huber K., Jocić G.
- (11) Avtorsko delo, Huber K., Jocić G.
- (11a) Avtorsko delo, Huber K., Jocić G.
- (12) Avtorsko delo, Huber K., Jocić G.
- (12a) Avtorsko delo, Huber K., Jocić G.



## 7. Priloge

- (1) Tabela iz Pravilnika (2015)
- (2) Umeritveni krivulji
- (3) Zemljevid območja okoli panja
- (4) Deklaracija na medu

Priloga 1:

Tabela iz pravilnika iz leta 2011, dopoljenega 2014 in 2015. Navedeno kot Pravilnik (2015)

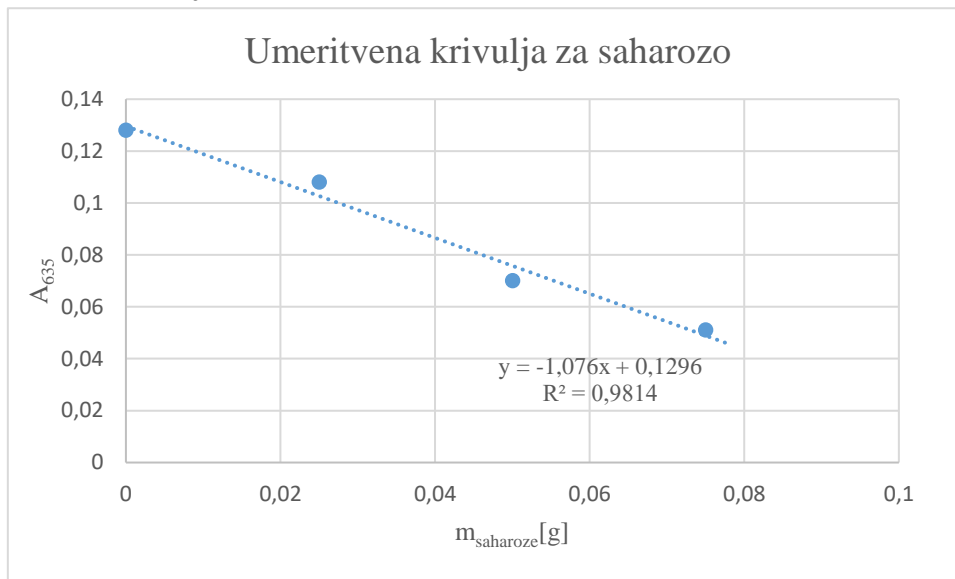
### PARAMETRI IN MERILA SESTAVE MEDU

Med, ki se daje v promet kot med ali je uporabljen v proizvodni za prehrano ljudi, mora glede sestave ustrezati naslednjim merilom:

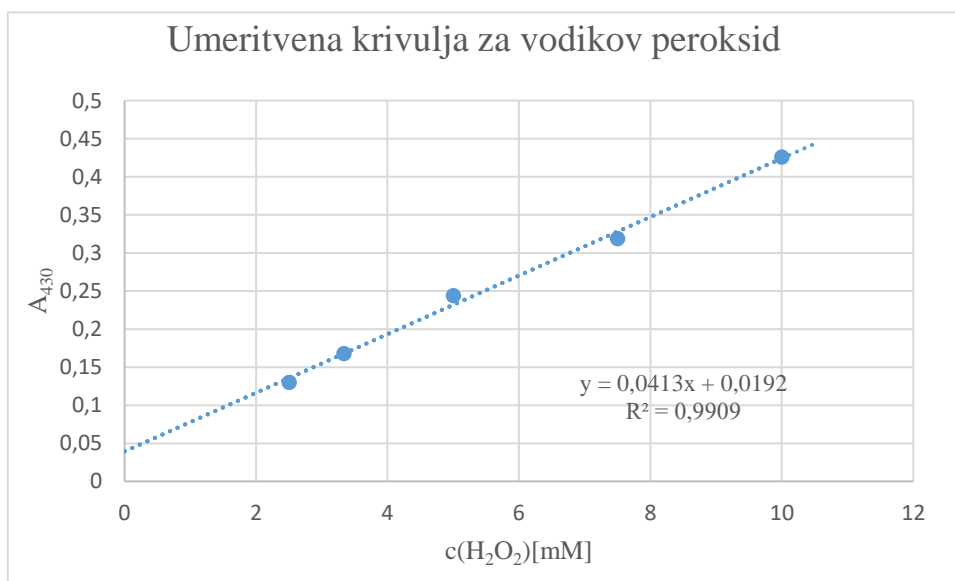
I. Vsebnost sladkorja	Količina
1.1 Vsebnost fruktoze in glukoze (vsota)	
- cvetlični med	najmanj 60 g/100 g
- gozdni med, mešanica gozdnega in cvetličnega medu	najmanj 45 g/100 g
1.2 Vsebnost saharoze	
- splošno	največ 5 g/100 g
- med iz akacije ( <i>Robinia pseudoaccacia</i> ), lucerne ( <i>Medicago sativa</i> ), Menzies Banksie ( <i>Banksia menziesii</i> ), medenice ( <i>Hedysarum</i> ), rdečega gumija ( <i>Eucalyptus camadulensis</i> ), evkririje ( <i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia milliganii</i> ), citrusov ( <i>Citrus spp.</i> )	največ 10 g/100 g
- med iz sivke ( <i>Lavandula spp.</i> ), boreča ( <i>Borago officinalis</i> )	največ 15 g/100 g
2. Vsebnost vode	
- splošno	največ 20 %
- med iz rese ( <i>Calluna</i> ) in pekovski med splošno	največ 23 %
- pekovski med iz rese ( <i>Calluna</i> )	največ 25 %
3. Vsebnost v vodi netopnih snovi	
- splošno	največ 0,1 g/100 g
- prešani med	največ 0,5 g/100 g
4. Električna prevodnost	
- vrste medu, ki niso navedene pod spodnjima alineama, in mešanice teh vrst medu	največ 0,8 mS/cm
- gozdni med, kostanjev med in mešanica obeh vrst medu, razen tistih, ki so navedeni med izjemami	najmanj 0,8 mS/cm
- izjeme: med iz navadne jagodičnice ( <i>Arbutus unedo</i> ), spomladanske rese ( <i>Erica</i> ), evkaliptusa, lipe ( <i>Tilia spp.</i> ), jesenske rese ( <i>Calluna vulgaris</i> ), manuke ( <i>Leptospermum</i> ), čajevca ( <i>Melaleuca spp.</i> )	za izjeme ni omejitve vrednosti
5. Proste kisline	
- splošno	največ 50 miliekvivalentov prostih kislin v 1000 g
- pekovski med	največ 80 miliekvivalentov prostih kislin v 1000 g
6. Diastazno število in vsebnost hidroksi metil furfurala (v nadaljnjem besedilu: HMF), določena po obdelavi in mešanju	
a) Diastazno število (lestvica po Schade-ju)	
- splošno, razen pekovskega medu	najmanj 8
- vrste medu z majhno naravno vsebnostjo encimov (npr. medovi iz citrusov) in vsebnostjo HMF največ 15 mg/kg	najmanj 3
b) HMF	
- splošno, razen pekovskega medu	največ 40 mg/kg (oziroma po določbi druge alinee 6a) točke)
- med z deklariranim poreklom iz območij s tropsko klimo in mešanice teh vrst medu	največ 80 mg/kg

## Priloga 2: Umeritveni krivulji

### 2.1 Umeritvena krivulja za saharozo



### 2.2 Umeritvena krivulja za vodikov peroksid





Priloga 3: Zemljevid območja okoli panja

Lokacija panja je označena s piko.

Ocenjeno območje paše je označeno z rdečo krožnico.

Lokacija: Mali Bakovci 46, Bakovci, 9000 Murska Sobota, Slovenija

Koordinate: 46,614412 S g. š.  
16,132971 V g. d.

Območje, prikazano na sliki, meri v naravi 6750 m × 9000 m.



Priloga 4

Deklaracije vzorcev cvetličnega medu

Deklaracija vzorca cvetličnega medu iz leta 2019 (L19), navajamo kot M2019



Deklaracija vzorca cvetličnega medu iz leta 2020 (L20), navajamo kot M2020

