

»54. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2020«

**PRIMERJAVA VSEBNOSTI ANTIOKSIDANTOV IN
FENOLNIH SPOJIN V RAZLIČNIH VRSTAH
SLOVENSKEGA MEDU IN NJIHOVA
ANTIMIKROBNA UČINKOVITOST NA USTNO
MIKROBIOTO**

Raziskovalno področje: INTERDISCIPLINARNO (KEMIJA IN BIOLOGIJA)

Raziskovalna naloga

Avtorja: Alja Petrović, Urban Bauman

Mentorici: Tamara Šiško, Anita Mustać

Šola: II. gimnazija Maribor

Maribor, 2020

**PRIMERJAVA VSEBNOSTI ANTIOKSIDANTOV IN
FENOLNIH SPOJIN V RAZLIČNIH VRSTAH
SLOVENSKEGA MEDU IN NJIHOVA
ANTIMIKROBNA UČINKOVITOST NA USTNO
MIKROBIOTO**

Raziskovalno področje: INTERDISCIPLINARNO (KEMIJA IN BIOLOGIJA)

Raziskovalna naloga

Avtorja: Alja Petrović, Urban Bauman

Mentorici: Tamara Šiško, Anita Mustać

Šola: II. gimnazija Maribor

Maribor, 2020

KAZALO

KAZALO GRAFOV	7
KAZALO TABEL.....	7
KAZALO SLIK.....	8
POVZETEK.....	9
ZAHVALE	10
1. UVOD	11
1.1 Cilji raziskovalne naloge	12
1.2 Raziskovalno vprašanje	12
1.3 Hipoteze.....	12
2. TORETIČNO OZADJE	14
2.1 FENOLNE SPOJINE	14
2.1.1 FLAVONOIDI.....	14
2.1.2 FLAVONOIDI V MEDU	15
2.1.3 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST MEDU	15
2.2 MED IN ČEBELE	16
2.2.1 MED KOT ZDRAVILO	18
2.2.2 VRSTE MEDU	19
2.2.3 SESTAVA MEDU IN NJEGOVE LASTNOSTI.....	21
2.2.3.1 FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI MEDU - določeni v Pravilniku o medu.....	21
2.2.3.2 FIZIKALNE LASTNOSTI MEDU	24
2.2.3.3 SENZORIČNE LASTNOSTI MEDU	25
2.2.4 BAKTERIJE V MEDU.....	27
2.2.4.1 PROTIMIKROBNE SNOVI V MEDU	27
2.2.4.2 PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST MEDU	28
2.3 USTNA MIKROBIOTA	28
2.3.1 MIKROFLORA OB ROJSTVU IN PO NJEM	29
2.3.2 USTNI STREPTOKOKI	30
2.3.3 KARIES	30
3. MATERIALI IN METODE	32
3.1 VZORCI MEDU.....	32

3.2 VZORCI ZOBNIH PAST	33
3.3 KEMIJSKE METODE	33
3.3.1 Redčenje vzorcev medu	33
3.3.2 Določanje pH vzorcev medu.....	33
3.3.3 Določanje skupnih fenolov	33
3.3.4 Določanje antioksidantne aktivnosti (AOA).....	35
3.4 MIKROBIOLOŠKE METODE	39
3.4.1 Seznam materialov.....	39
3.4.2 Metoda difuzije na trdnem gojišču (difuzijski antibiogram)	40
4. REZULTATI	43
4.1 Določanje pH medu	43
4.2 Določanje skupnih fenolov.....	44
4.2.1 Umeritvena krivulja	44
4.2.2 Določanje skupnih fenolov v vzorcih medu	45
4.3 Antioksidativne lastnosti vzorcev medu.....	46
4.4 Določitev pH vrednosti, vsebnosti skupnih in prostih kislin ter laktonov.....	48
4.5 Antimikrobni učinek različnih vrst medu na ustno mikrobioto.....	50
5. RAZPRAVA	54
6. ZAKLJUČEK.....	59
7. DRUŽBENA ODGOVORNOST	60
BIBLIOGRAFIJA.....	61
PRILOGE	64

KAZALO GRAFOV

Graf 1: pH vrednosti posameznih vrst medu.....	43
Graf 2: Umeritvena premica z galno kislino	44
Graf 3: Koncentracije skupnih fenolnih spojin za posamezno vrsto medu.....	46
Graf 4: Absorbanca posameznih vzorcev pri valovni dolžini 515,5 nm po določenem času ..	47
Graf 5: Vrednosti % inhibicije za posamezno vrsto medu po določenem času	48
Graf 6: Vsebnosti laktonov, prostih in skupnih kislin.....	49
Graf 8: Povprečni premer inhibicijskih con posameznih medov, kontrol in zobnih past	52

KAZALO TABEL

Tabela 1: Opis vzorcev medu.....	32
Tabela 2: Opis vzorcev zobnih past	33
Tabela 3: pH vrednosti pri 10% razredčitvi medu	43
Tabela 4: Podatki za umeritveno krivuljo za določitev skupnih fenolov	44
Tabela 5: Absorbanca vzorcev pri valovni dolžini 635 nm	45
Tabela 6: Koncentracija skupnih fenolov v posameznih vzorcih medu.....	45
Tabela 7: Absorbanca posameznih vzorcev pri valovni dolžini 515,5 nm po določenem času	46
Tabela 8: Izračunane vrednosti % inhibicije za posamezno vrsto medu po določenem času....	47
Tabela 9: Porabljene količine NaOH in HCl za določitev vsebnosti skupnih in prostih kislin ter laktonov	48
Tabela 10: Vsebnosti laktonov, prostih in skupnih kislin	48
Tabela 11: Povprečni premer inhibicijske cone z standardno deviacijo za posamezno vrsto medu.....	50
Tabela 12: Povprečni premer inhibicijske cone s standardno deviacijo za posamezno vrsto zobne paste in antibiotika.....	52
Tabela 13: Izmerjene vrednosti premera inhibicijskih con zobnih past in kontrol	64
Tabela 14: Izmerjene vrednosti premera inhibicijskih con medov in kontrol.....	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Medovi uporabljeni v raziskovalni nalogi (lasten vir)	32
Slika 2: Titracija (lasten vir).....	38
Slika 3: Priprava antibiogramov z medom (lasten vir).....	41
Slika 4: Inhibicijske cone žajbljevega medu (lasten vir).....	50
Slika 5: Inhibicijske cone kostanjevega medu (lasten vir).....	50
Slika 6: Inhibicijske cone ajdovega medu (lasten vir).....	51
Slika 7: Inhibicijske cone hojevega medu (lasten vir)	51
Slika 8: Inhibicijske cone medicinskega medu (lasten vir).....	51
Slika 9: Inhibicijske cone zobne paste Bluem (lasten vir)	53
Slika 10: Inhibicijske cone zobne paste Vademecum (lasten vir).....	53
Slika 11: Inhibicijske cone antibiotikov (lasten vir)	53

POVZETEK

V raziskovalni nalogi smo se ukvarjali z antimikrobnimi lastnostmi medu na mikroorganizme v ustih. Med je namreč tudi priljubljeno ljudsko zdravilo, ki se uporablja že tisoče let. Zanimale so nas predvsem vsebnosti različnih značilnih učinkovin v medu, kot so antioksidanti, kisline, encimi, minerali, vitamini in fenolne spojine. Za vzorce smo izbrali štiri različne vrste slovenskega jedilnega medu in medicinski med, ki je namenjen zunanji uporabi. S pomočjo Vis spektrofotometra smo izmerili absorbance posameznih vzorcev medu ter izračunali koncentracijo fenolnih spojin, ki smo jih primerjali z rezultati merjenja različnih koncentracij vodne raztopine galne kisline. Prav tako smo izmerili absorbanco antioksidantov v medu. Pri mikrobiološkem delu smo skupnim izmerjenim učinkovinam v posameznem medu dokazali še antimikrobni učinek z metodo difuzije na trdem gojišču na mikrobioto ustne votline, ki smo jo pridobili z brisom ustne sluznice zdravega človeka.

ZAHVALE

Zahvaljujema se mentoricama za potrebno pomoč in podporo pri izvajanju eksperimentov, predstavitev postopkov izoliranja posameznih učinkovin ter čas, ki sta ga namenili za sprotni in končni pregled najine naloge v tednih pred oddajo. Prav tako bi se rada zahvalila aktivu kemikov in biologov za dovoljeno uporabo pripomočkov, potrebnih za izvedbo eksperimentov.

1. UVOD

Čebelji pridelki so popolnoma naravna živila, ki jih pridobivamo neposredno iz narave. Te majhne rumeno-črne živalce z oprasovanjem pripomorejo k ohranjanju biološkega ravnovesja v naravi, omogočajo obstoj različnim živalskim vrstam ter tudi človeku. Ob vsem tem pa izdelujejo čebelje pridelke, ki nam v našem vsakdanjem hitrem tempu življenja pomagajo krepiti in ohranjati zdravje. Med ni le odličen vir energije ter vitaminov in mineralnih snovi, pač pa omogoča tudi boljše izkoriščanje drugih snovi iz hrane (Goljat, 2007).

Ko govorimo o medu, ga ponavadi obravnavamo kot preprosto živilo, s katerim se otroci radi posladkajo ali pa z njim sladimo čaj. Pa je med res samo namaz za kruh?

Tematika za raziskovalno delo je postala zanimiva predvsem zaradi uporabnosti naravno pridobljenih učinkovin, ki naj bi na našo ustno mikrofloro delovale protimikrobno in s tem učinkovito lajšale probleme v ustih. V splošnem je med čebelji proizvod, ki ima lastnosti, za katere se človeštvo zanima že tisočletja. Že v starem Egiptu so poznali njegove antiseptične lastnosti. Ima dokazano velik učinek na splošne mikroorganizme, kar potrjuje obstoj virov starih civilizacij, katerih zdravniki so z medom razkuževali rane, in različnih, dandanes dostopnih, razkužil na osnovi medu. Ta se uporabljajo tako v obliki ustne vodice in zobne paste kot v obliki mazil (lahko je tudi čisti med) za zunanjo uporabo. Med namreč zaradi različnih koncentracij vodikovega peroksida, ki nastane kot stranski produkt pretvorbe glukoze v glukonsko kislino in močno zavira rast bakterij, učinkovito preprečuje vnetje odrgnin in površinskih ran. Je sladkega okusa, saj vsebuje veliko sladkorjev (do 75%), pa tudi mnoge druge snovi. Vsebuje več vrst flavonoidov, razne vitamine, mineralne snovi, encime (npr. invertaza in katalaza), hormone, kisline in do 20% vode, čeprav je najboljši med naj ne bi vseboval več kot 18,6%. Po sladkosti se od vrste do vrste razlikuje zaradi različnih razmerij med glukozo, fruktozo in saharozo, včasih tudi maltozo in levulozo. Poleg sladkorjev k okusu pripomorejo še različne aromatične, mineralne in druge snovi. Vsem vrstam medu je skupno to, da so kemijsko rahlo kisle in med drugim zaradi koncentracij sladkorjev uničujoče za veliko večino mikroorganizmov, ki se ne morejo razmnoževati. Deluje podobno kot sol pri konzerviranju mesa, rib, sira in drugih živil, ker deluje antioksidativno na lipide v hrani oziroma živilu. Kljub temu, da se nekateri njegovi encimi razgradijo na višjih temperaturah, je tudi po daljšem kuhanju delno učinkovit, prav tako pa je uporaben tudi razredčen z vodo v razmerju 1:64 (Kapš, 1998).

Po pregledu virov smo zasledili, da med učinkuje kot protivnetno zdravilo zaradi kombinacije svojih lastnosti, in ne samo zaradi ene od njih. Že pH medu, ki naj bi se gibal med 4,5 in 6, preprečuje razvoj različnih bakterij, ki lahko preživijo le v bolj ali manj pH nevtralnem okolju. Vrednost pH je tudi v splošnem lastnost medu, ki vpliva na stabilnost, rok uporabnosti in teksturo medu (Bertoncelj, 2008).

Vsaka vrsta medu ima značilno barvo, ki je po rezultatih nekaterih raziskav tesno povezana s količino prostih in skupnih kislin. Tako so mane ali vrste medu, ki nastanejo iz rastlinskih sokov dreves ali raznih žuželk, ki se z njimi hranijo v povprečju temnejši, medtem, ko so vrste iz cvetnega prahu praviloma svetlejša barve. Ajdov in akacijev med sicer ne ustrežata temu opisu, saj je prvi temen, drugi pa svetlo rumene barve (Bertoncelj, 2008).

1.1 Cilji raziskovalne naloge

Cilja najine raziskovalne naloge sta bila predvsem razumeti in pojasniti delovanje medu na bakterije v ustih in ugotoviti korelacije med vsebnostjo fenolnih spojin v medu in protimikrobno učinkovitostjo na ustno mikrobioto, zaradi česar so ga uporabljali v ljudskem zdravstvu že pred tisočletji, nato pa z eksperimenti dokazati delovanje posameznih učinkovin medu.

1.2 Raziskovalno vprašanje

- 1. Kako in zakaj vrsta medu vpliva na protibakterijsko učinkovitost posameznega medu na mikrobioto ustne sluznice zdravega človeka?*
- 2. Kakšne so vsebnosti skupnih fenolnih spojin, protioksidativnih lastnosti in skupnih kislin ter laktonov v medu glede na vrsto medu?*
- 3. Ali so med izmerjenimi parametri možne korelacije, s katerimi lahko dokažemo zdravilni učinek medu v ustih?*

1.3 Hipoteze

- 1. Vrsta medu vpliva na protimikrobno učinkovitost. Največjo protimikrobno učinkovitost imata žajbelj in kostanjev med. Viri namreč trdijo, da žajbelj del svojih zdravilnih lastnosti ohranja tudi v nektarju in cvetnem prahu, kostanj pa ima malo encima katalaze in zato več vodikovega peroksida, ki na bakterije deluje zaviralno (Kapš, 1998).*

2. ***Večja kot je vsebnost skupnih fenolnih spojin in večja kot je antioksidativna učinkovitost, temnejša je barva medu.*** Vela in sod. (2010) so dokazali korelacijo med vsebnostjo fenolnih spojin in barvo medu ter med antioksidativno učinkovitostjo in barvo medu.
3. ***Višja kot je masna koncentracija fenolnih spojin, večji je vpliv antioksidativne lastnosti posameznega medu.*** Aljadi in sod. (2004) v svoji raziskavi navajata, da je med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo fenolnih spojin dobra korelacija ter na podlagi tega sklepata, da je med oksidativno učinkovit predvsem zaradi fenolnih spojin, ki jih vsebuje.
4. ***pH medu je odvisen od količine skupnih kislin in skupnih fenolnih spojin v medu.*** Kisline medu dajejo učinek, pa tudi značilen okus. Tudi flavonoidi so rahlo kisli, skupaj s kislinami pa dajejo medu pH vrednost, nižjo od 7 (Kozlar, 2007).
5. ***Višja vsebnost fenolnih spojin in skupnih kislin posameznega medu vpliva na antimikrobno učinkovitost medu na mikrobioto ustne sluznice.*** Kombinacija kislin in fenolnih spojin naj bi bila namreč tista, ki uničuje mikrobo. Ti naj bi se zaradi teh spojin nehali razmnoževati in sčasoma izginili (Ahčin, 2015).

2. TORETIČNO OZADJE

2.1 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti in so prisotne v vseh rastlinah. Imajo najmanj en aromatski obroč z eno ali več hidroksilnimi (-OH) skupinami direktno vezanimi na obroč. Njihova strukturna oblika variira od enostavnih fenolnih molekul do kompleksnih polimerov z visoko molsko maso. Običajno so v glikozilirani obliki, kar poveča njihovo topnost v vodi (Bravo, 1998).

Struktura fenolnih spojin določa njihov antioksidativni potencial. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, nastali iz primarnih metabolitov. Te spojine imajo pomembno vlogo tako pri rasti in razmnoževanju celic, omogočajo zaščito pred patogenimi mikroorganizmi in škodljivci (Kaiser, 2012).

2.1.1 FLAVONOIDI

Flavonoidi so zelo razširjene v vodi topne fenolne spojine, ki imajo 15 C-atomov in osnovno strukturo C₆-C₃-C₆ imenovano 2-fenilbenzopiran ali flavan. Naš vir pravi, da poznamo več kot 500 flavonoidov. (Bravo, 1998)

Flavonoidi spadajo v skupino nizkomolekularnih polifenolnih spojin. Nastanjevo v glavnem s povezavo dveh biositeznih poti šikimat/arogenat in acetat/malonatne poti. Struktura flavonoidov je odvisna od flavonoidnega jedra, ki sestoji iz treh fenolnih obročev. Benzenov obroč je kondenziran s šestčlenskimi obročem, ki ima na drugem mestu vezano fenilno skupino. Ta obroč je lahko heretociklični piran ali piron.

Flavonoidi so razdeljeni v skupine na stopnjo oksidacije na obroču z vezano fenilno skupino, delimo jih na flavone, flavonole, flavanole, flavanone, izoflavone in antocianidine. K flavonoidom spadajo tudi halkoni, dihidrohalkoni in avroni, ki strukturno sicer niso flavonoidi, pač pa so z njimi sorodni, tako biosintetsko kot kemijsko. (Bravo, 1998)

Flavonoidi so rastlinske snovi, ki jih tako človek kot živali ne morejo sintetizirati. Nahajajo se v sadju, žitaricah, zrnih, zeliščih, stročnicah, zelenjavi in tudi v medu. Tudi v pijačah rastlinskega izvora lahko najdemo flavonoide, npr. v čaju, vinu, kavi, kakavu, sokovih, ... Mesni in mlečni izdelki ter ribe in morski sadeži jih ne vsebujejo. V rastlinah se flavonoidi pogosto

nahajajo kot O- ali C-glikozidi; O-glikozidna vez je veliko pogostejša kot C-glikozidna vez. O-glikozidi imajo hidrat vezan na hidroksilno skupino aglikona, medtem ko je pri C-glikozidih ogljikohidratna komponenta vezana na ogljikov atom aglikona. Vezani ogljikovi hidrati so večinoma glukoza, arabinoza, galaktoza, ramnoza, redkeje lahko tudi kislota in manosa (Bertoncelj, 2008).

2.1.2 FLAVONOIDI V MEDU

Flavonoidi v medu so zelo pomembne spojine, ki so prisotne v manjših količinah z glavnim izvorom iz cvetnega prahu rastlin katere obiskujejo čebele. Rastline biosintetizirajo različne fitokemijske sestavine, ki lahko ugodno vplivajo na zdravje. Med ima zaradi tega glede na botanično poreklo večjo ali manjšo antioksidativno in antibakterijsko aktivnost. Od botaničnega porekla medu je prav tako odvisna tudi vsebnost različnih flavonoidov (Gaber Žveplan, 2013). Bioaktivne substance iz rastlin v nektar in nato ter naprej v med. Ločimo dve vrsti flavonoidov, glede na to ali izvirajo iz propolisa ali čebeljega voska, kot so npr. pinocembrin, krizin, galangin... ali pa je njihov vir nektar ali cvetni prah, kot so npr. kamferol, luteolin in drugi (Bertoncelj, 2008).

Propolis je naravni izdelek čebel, sestavljen iz različnih rastlinskih smol, balzamov, voskov in eteričnih olj, ki jih proizvedejo rastline, obogaten z izločki čebeljih žlez. Kemijske sestavine propolisa čebele vgradijo v med, v katerem najpogosteje najdemo flavonoide, ki izvirajo iz propolisa. Medtem ko flavonoidi ki so iz nektarja in peloda, se večinoma nahajajo v obliki glikozidov, vendar, če so od vplivom encima glikozidaze, ki je prisotna v čebeljih žlezah slinavkah, hidrolizirajo, zato v medu najdemo le flavonoide v obliki aglikonov (Bertoncelj, 2008).

2.1.3 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST MEDU

Med vsebuje veliko komponent, ki delujejo kot antioksidanti. Npr. α -tokoferol, askorbinska kislina, flavonoidi, fenolne kisline ter encimi. Botanično poreklo medu ima največji vpliv na antioksidativno učinkovitost medu, v manjši meri pa nanjo vplivata tudi predelava in skladiščenje medu.

Na antioksidativno učinkovitost ima vpliv tudi toplotna obdelava. Pri 100 °C je antioksidativna učinkovitost medu strmo padla za 10-30 min. Vzrok za to je v razgradnji vitaminov B₁, B₂, C in encimov katalaze in peroksidaze ter v razgradnji še nekaterih ostalih komponent (Gaber Žveplan, 2013).

Antioksidanti so tiste sestavine živil oz. dodatki živil, ki so bodisi lovilci radikalov, tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali pa kot reducenti kako drugače preprečujejo ali zmanjšujejo pojav žarkosti živil in druge oksidativne spremembe senzoričnih in prehranskih lastnosti živil. Spojine, ki so antioksidanti, preprečujejo oksidacijo snovi. Oksidacijo, ki je verižna reakcija povzročajo oksidanti in radikali (Abram, 2000).

2.2 MED IN ČEBELE

Med je gosto tekoče ali pa kristalizirano živilo, ki ga proizvajajo čebele. Nastane iz različnih virov; predvsem iz cvetličnega nektarja ali drugih izločkov živih rastlinskih delov ali pa iz vrst mane, izločkov žuželk, ki so na živih delih rastlin. Osnovni material prinašajo čebele v panj, kjer ga obdelajo ter mu dodajo izločke svojih žlez, ga zgostijo in nato shranjujejo v pokritih celicah satja (Božnar A., 1998). Preprosto povedano je med razmeroma nasičena raztopina različnih sladkorjev v spremenljivih deležih v vodi. Vsebuje pa tudi fenolne spojine, mineralne snovi, kot so železo, natrij in kalcij, vitamine, antioksidante in tudi majhne količine beljakovin (Lužar, 2020). Kljub temu, da nastane z mešanjem rastlinskih in živalskih izločkov, je med živilo živalskega izvora. Ljudje ga uporabljamo vsak dan, tako za uživanje kot zdravljenje, že več tisoč let. Med naj bi veljal za edino sladilo, ki velja za zdravo tako za mlade kot za stare. Izjema so otroci, mlajši od enega leta, saj je njihov imunski sistem še preslabo razvit, da bi bil odporen na spore bakterije *Clostridium botulinum*, ki so lahko prisotne v medu.

Glavna sestavina medu so sladkorji, med katerimi prevladujeta monosaharida fruktoza in glukoza. Različne vrste medu poleg njiju vsebujejo tudi več različnih oligosaharidov. Vsebnost posameznih sladkorjev je močno povezana z botaničnim izvorom medu. Med iz mane vsebuje več oligosaharidov, ki za nekatere vrste medu iz nektarja niso značilni. Zraven sladkorjev so v medu še beljakovine, voda, aminokisline, organske kisline, encimi, vitamini in fenolne spojine. V njem najdemo tudi elemente iz okolja, predvsem cvetni prah, sledi voska, različne količine kvasovk tolerantnih na sladkor ter tudi kristale D-glukoze hidrata. Ker je med naravno živilo,

se lahko vsebnosti sestavin ter razmerja med njimi med različnimi letinami seveda spreminjajo (Korošec, 2012).

Z ustrezno tehnologijo konfekcioniranja in točenja medu, ki lahko vključuje tudi segrevanje pri 35-40°C ali kratkotrajno segrevanje pri 50-60°C, se vsebnost sestavin v medu ne spremeni, kar pa pomeni da se ohrani tudi kakovost medu. Glede na izvor, torej glede na glavno surovino iz katere je med, ga delimo na dve večji skupini:

- med iz nektarja, ki se ga pogovorno pogosto imenuje kar cvetlični med, saj je pridobljen iz nektarja cvetov medonosnih rastlin. Ima vonj in aromo cvetlice iz katere izhaja. Ima slajši okus in svetlejšo barvo kot gozdni med, nižjo električno prevodnost ter višjo kislost. V cvetličnem medu je prisotno precej cvetnega prahu, na osnovi katerega tudi določimo vrsto medu z mikroskopsko analizo.
- med iz mane za katerega se je uveljavilo tudi ime gozdni med in ga čebele izdelajo večinoma iz sekretov žuželk, ki živijo na živih delih rastlin ali pa ga izdelajo iz izločkov rastlin samih. Je bolj moten kot cvetlični med, od njega se razlikuje tudi po gostoti in sestavu. Vonj je različen glede na vrsto mane, okus pa ima po žganju, karameli ali smoli. V ustih se težko raztaplja (Plut, 2020).

Čebele, posebej slovenska avtohtona vrsta medonosne čebele (*Apis mellifera*) sivke, so za človeka pomembne ne samo zaradi medu ampak tudi zaradi drugih snovi, ki jih pridelujejo v panju. Za svoj panj uporabljajo vosek, ki ga dobijo iz posebnih žlez na zadku, in tega so ljudje v preteklosti uporabljali za sveče. Sestavljen je iz več kot 500 sestavin, glavna pa so estri nenasičenih maščobnih kislin z enovalentnimi alifatskimi alkoholi. Pomaga pri vnetju ustne votline in požiralnika, pri čemer ga uporabljamo tako, da koščke, ki so pri sobni temperaturi (zaradi svojih neobičajnih lastnosti) zelo trdni, že pri 35°C pa zelo mehki in elastični, ga žvečimo (Žnidar, 2020).

Poleg tega čebele izdelujejo tudi propolis ali zadelavino, ki ščiti panj pred vlago, poleg tega pa čebele, vključno z matico, varuje pred boleznimi. Grško ime pomeni pred mestom, slovensko ime pa je posledica dejstva, da čebele včasih vhod v panj zagradijo s to snovjo. Sestavljajo ga smola, eterična olja, vitamini, cvetni prah in minerali (Bodi eko, 2020).

2.2.1 MED KOT ZDRAVILO

Že pred deset tisoč leti je med veljal za dragocen produkt. Sprva se je uporabljal le kot sladilo v prehrani, vendar so ljudje kmalu ugotovili, da je lahko še mnogo več kot le navadno prehransko dopolnilo. Prvi ohranjeni zapisi o uporabi medu v zdravilne in medicinske namene segajo daleč nazaj v obdobje Starega Egipta. V tistih časih so ga uporabljali za celjenje ureznin, opeklin, kožnih razjed in drugih odprtih ran. Med je bil tudi priljubljeno zdravilo najslovitejšega zdravnika antike Hipokrata. Že v 17. stoletju ga je Charles Butler v pomembni razpravi o medu in čebelah opisal kot čistilno in dezinfekcijsko sredstvo, zdravilo proti kašlju, prav tako naj bi pomagal pri vnetju grla, ustnih razjedah, kačjih ugrizih, uporabljal naj bi se tudi kot balzam za oči, pomirjevalo pri želodčnih težavah, odvajalo, ter kot krepčilno in obnovitveno sredstvo. Kljub vsem njegovim dobrim lastnostim je sčasoma začel izgubljati pomen, dandanes pa ponovno odkrivajo njegovo terapevtsko moč (Podržaj, 2011).

Med vsebuje hitro prebavljive enostavne sladkorje z nizki glikemičnim indeksom v različnem razmerju. Takšni sladkorji niso obremenjujoči za našo trebušno slinavko. Poleg sladkorjev vsebuje običajno še 17% delež vode ter številne koristne vitamine, aminokisline, encime, kisline, hormone in veliko mineralnih snovi (Maln, 2020).

V medu izstopa vsebnost vodotopnih vitaminov skupine B in vitamin C, ki imajo pomembno funkcijo za normalno delovanje živčevja, mišic in imunskega sistema. Prav tako sodelujejo pri metabolizmu energije, preprečujejo utrujenost in izčrpanost ter v telesu delujejo kot obramba pred napadom prostih radikalov – so naravni antioksidanti. Med minerali prevladujejo kalcij, baker, magnezij, železo, magnezij, cink, fosfor in mangan. Tudi minerali ohranjajo zdrav imunski sistem in živčevje, preprečujejo krče v mišicah, slabokrvnost, utrujenost ter skrbijo za nenehno mineralizacijo kosti in tako ščitijo pred osteoporozo. Flavonoidi v medu delujejo protivnetno, protimikrobno in preprečujejo oksidacijo škodljivega holesterola LDL in s tem nastanek krvnih strdkov. Prav tako delujejo kot antioksidanti in s tem ščitijo celice pred telesno poškodbo. Posebno vlogo pa ima hormon acetilholin, ki ohranja zdravo srce in živčevje (Maln, 2020). Encimi v medu izvirajo iz nektarja ali mane in cvetnega prahu ter imajo pomembno vlogo pri nastanku medu iz medicne. Encim glukoza oksidaza izvira iz čebel in je odgovoren za antibakterijsko delovanje medu. V medu je ta encim normalno neaktiven, če med ni nezrel ali razredčen. Največjo aktivnost ima pri 25 do 30% koncentraciji sladkorja in pri pH 6,1. Oksidira glukozo pri čemer se tvori glukonska kislina. Vzporedno nastaja vodikov peroksid, ki

deluje bakteriocidno. Del ga razpade v vodo in kisik, del ga ostane in varuje med pred škodljivimi mikroorganizmi. Katalaza je encim, ki vodikov peroksid razgradi v vodo in kisik. Prisotna je v medicini in cvetnem prahu. Nekatere vrste medu ne vsebujejo katalaze in spadajo med vrste medu z visokim mikrobiocidnim delovanjem. Beljakovine prav tako izvirajo iz medicine, delno pa tudi iz prebavnih žlez čebel. Med vsebuje malo beljakovin (Gaber Žveplan, 2013), (Plut, 2020).

2.2.2 VRSTE MEDU

Poznamo mnogo vrst medu, vsaka vrsta posebej je dobila ime po rastlini iz katere čebele med pridelujejo. V raziskovalni nalogi sva uporabila pet različnih medov; žajbljev med, kostanjev med, ajdov med, hojev med in medicinski med. Večinoma velja, da lahko med pridobljen iz nektarja ali mane označimo kot vrstni med, če je v končnem pridelku več kot 45% cvetnega prahu ene vrste rastlin. Pri tem mora imeti tudi barvo, vonj in okus, značilen za med iz te vrste rastlin ali mane (Božnar A., 1998). Različne vrste medu so dobile ime po rastlinah, na katerih čebele nabirajo nektar oziroma mano. Med se loči po geografskem in botaničnem izvoru, po načinu pridobivanja in letnem času, v katerem je bil pridobljen (Podržaj, 2011).

- 1) **Žajbljev med** je med z žajblja, ki ga večinoma pridelujejo v Istri, Hrvaškem primorju in Dalmaciji. Včasih je veljal za najboljši jugoslovanski med. V Sloveniji ga pridelajo zelo malo. Žajbelj se ponaša s številnimi koristnimi lastnostmi za zdravje. Žajbelj je bil za Rimljane sveta rastlina njegovo nabiranje pa je bilo povezano s številnimi obredi. Grki so žajbelj uporabljali pri kačjih ugrizih. Ta rastlina ima v ljudskem zdravilstvu zares bogato zgodovino. Velja za izjemno aromatičen grm, ki izredno privablja čebele. Tekoč med je zlatorumene barve, medtem ko je v trdnem stanju živo rumen. Pogosto se nerad strdi, ima močan dišeč vonj, vendar ne toliko po žajblju. Je milega okusa, čeprav ob okušanju lahko zasledimo grenčino, ki pa v bistvu še povečuje njegovo sladkost. Uporablja se ga predvsem pri prehladu in boleznih dihal, prav tako tudi za pomiritev živcev, zlasti pred spanjem (Božnar A., 1998).
- 2) **Kostanjev med** je tekoč temno rjavkastordeče barve, strjen pa je le rjavkast in debelozrnat. Je grenek, vonj pa ima po pelinu. Pravi kostanj je za čebele zelo pomembna medovita rastlina. Čebelam nudi ob medicini tudi obilico cvetnega prahu. Dolgi resasti

cvetovi se odprejo v juniju, njegovo cvetenje pa traja vse do prvih dni julija. Kostanj je zelo občutljiv za medenje in če ga nekajkrat opere dež, to pomeni precej slabi donos s tega območja. Grenčina medu izvira iz zrn cvetnega prahu, ki ga je v kostanjevem medu zelo veliko. Zaradi tega je tudi izredno zdravilen, saj je njegova vitaminska in mineralna vrednost veliko večja kot pri drugih vrstah medu. Okus po grenkem je dolgotrajno obstojen, lahko pa ima tudi blag okus po kovini. Njegova aroma pa je zelo karakteristična. Poleg tega ta med vsebuje med vsemi medi največ vodikovega peroksida. V zadnjih letih je postal zelo iskano blago tudi v severnoevropskih državah, predvsem v Veliki Britaniji (Božnar A., 1998).

3) **Ajdov med** je tekoč temno rdečkastorjav, ko je strjen je svetlo rjav. Ajda (*Fagopyrum esculentum*) je enoletnica, ki sodi v družino dresnovk. Čeprav botanično ne sodi med žita, jo zaradi načina predelave zrn v kašo, zdrob, kosmič in moko, uvrščamo mednje. Predelava ajde je enostavna. Ajda začne cveteti v drugi polovici avgusta ter cveti do sredine septembra. Njeni cvetovi izločajo nektar le zjutraj in zvečer. Njeno medenje pospešuje visoka zračna vlaga, zato so zanjo posebno ugodni soparni dnevi ter dnevi z jutranjo vlago. Med ima kiselkast okus, sladno aromo ter značilen ter močan živalski vonj. Ajdov med naj bi deloval antioksidativno in antibakterijsko ter vplival na hitrejše celjenje ran. Kmalu po točenju kristalizira v velike kristale. Znan je kot najboljši med za pecivo in potice. Od druge svetovne vojne naprej ga v Sloveniji skoraj ni več mogoče dobiti, ker ajda v Sloveniji skoraj da ne medí več (Božnar A., 1998).

4) **Hojev med**, drugače imenovan tudi hojavec je v tekočem stanju temno rjav in precej gost, strjen pa je sivozelen in nenavadno trd, nerad kristalizira. Medenje na hoji ali navadni jelki se začne aprila ali maja z medenjem malega hojevega kaparja (*Physokermes abietinus*) in kasneje se brstenje hoieve ušice (*Mindarus abietinus*). Za pridobivanje medu je najpomembnejše medenje v juliju in avgustu. Nosilki medenja sta velika hojeva ušica in zelena hojeva ušica. Na medenje močno vplivajo zračni tokovi ter nočne temperature. Padec temperatur pod 13 stopinj Celzija ali celo 10 stopinj Celzija, ni najbolj primeren za medenje hoje. Pri nizkih temperaturah se v mani tvori več melicitoze, kar povzroča zgodnjo kristalizacijo medu. Med je skoraj brez vonja in je milega ter prijetnega okusa. Po svetu je zelo cenjen, je tudi naše prvo izvozno blago.

Je zelo temen in vsebuje dosti več rudninskih snovi kot druge svetlejšje vrste. Uporablja se kot zdravilo proti kašlju ter raznim pljučnim boleznim (Božnar A., 1998).

- 5) **Medicinski med** proizvajalca Tosama v tubi Vivamel je kostanjev med, ki je v celoti naravno pridelan in nerazredčen. Je samostojna primarna obloga, namenjena namestitvi neposredno na rano. Namenjen je torej celjenju ran. Spodbuja čiščenje rane, omogoča vlažno celjenje, prav tako deluje antimikrobno in preventivno, pospešuje zapiranje rane, nastajanje novega tkiva, celjenje z manj brazgotinami ter zmanjšuje neprijeten vonj. Med je popolnoma naraven in brez sintetičnih ter gensko spremenjenih komponent. Ni namenjen oralni uporabi (Tosama, 2020).

2.2.3 SESTAVA MEDU IN NJEGOVE LASTNOSTI

Pravilnik o medu (2011) definira med kot naravno sladko snov, ki izdelajo čebele *Apis mellifera* iz nektarja cvetov ali izločkov iz živih delov rastlin ali iz izločkov žuželk, ki sesajo rastlinski sok iz živih delov rastlin, ki jih čebele izberejo, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju. Pravilnik o medu (2011) tudi predpisuje zakonsko določene meje za posamezne parametre ter prav tako opredeljuje sestavo medu (Ahčin, 2015). Kemijsko gledano je med visoko koncentrirana raztopina sladkorjev, predvsem monosaharidov fruktoze in glukoze, v vodi. V manjših količinah vsebuje tudi še različne disaharide in trisaharide, beljakovine, aminokisline, encime, fenolne spojine, organske kisline ter pelodna zrna. Prisotnost vseh teh snovi vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti (npr. pH, hitrost kristalizacije, viskoznost, električna prevodnost), vpliva tudi na senzorične značilnosti (barva, vonj, aroma ter okus) in pelodno sliko medu. Kljub raznolikostim v vsebnosti posameznih sestavin in razmerij med njimi, ki so največkrat odraz izvora medu, je pristnemu medu različnih vrst skupno to, da ne vsebujejo dodatnih sestavin ali neznanih primesi, nima nepoznanega okusa ali vonja ter nima spremenjene stopnje kislosti. Poleg tega se z uporabljenim tehnološkim postopkom aktivnost encimov v medu ni zmanjšala ali uničila (Plut, 2020).

2.2.3.1 FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI MEDU - določeni v Pravilniku o medu (mag. Dejan Židan, Minister za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, 2011)

Med, ki je dozorel v satju, vsebuje običajno manj kot 20% vode. Ta vrednost je zaradi tega tudi zakonsko postavljena kot najvišja. Izjeme so nekatere vrste medu iz rase *Calluna*, ki lahko vsebuje do 23% vode. **Količina vode v medu** vpliva na hitrost kristalizacije medu, na viskoznost ter na specifično težo medu. Odvisna je od klimatskih pogojev, v katerih je bil med pridelan, odvisna je tudi od pasme čebel in moči čebelje družine, prav tako pa tudi od pogojev pri točenju in skladiščenju medu. Včasih na količino vode v medu vpliva tudi njegovo botanično poreklo, kar pa ne velja za med, pridelan v Sloveniji. Vsebnost vode je pomemben parameter medu, saj vpliva na stabilnost medu, prav tako pa je od nje odvisna tudi odpornost na fermentacijo v času skladiščenja. Večji kot je delež vode v medu, večja je verjetnost, da bodo osmofilne kvasovke pričele s fermentacijo medu, kar pa ima vpliv na spremembo okusa medu (med fermentacijo medu nastaja etanol, ki ob prisotnosti kisika lahko oksidira do nastanka očetne kisline in vode, ki povzroči kislost medu) in poslabšanje kakovosti medu. Do fermentacije ne bo prišlo v medu, kjer je vsebnost vode pod 18%, vendar ta meja prav tako ni povsem zanesljiva, saj na začetek fermentacije vpliva tudi število kvasovk v medu, odvisen je tudi od temperature skladiščenja in vsebnosti proste vode (v kristaliziranem medu je več proste vode) (Korošec, 2012).

Ogljikovi hidrati predstavljajo med 73 in 83 % mase medu. Glavna sladkorja v medu sta monosaharida glukoza in fruktoza, slednja v večini vrst medu prevladuje. Ogljikovi hidrati kot glavna sestavina medu vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti medu; na gostoto, viskoznost, hitrost kristalizacije in higroskopsnost, na mikrobiološko aktivnost ter na senzorične lastnosti medu, predvsem na sladkost. Omenjena monosaharida prav tako prispevata velik del k energijski vrednosti medu. Ker so v maninem medu prisotne večje količine oligosaharidov, je skupna količina fruktoze in glukoze manjša kot v nekaterih drugih vrstah medu. Večje količine saharoze v medu so lahko znak pretvorbe medu kot posledica intenzivnega hranjenja čebel s saharozo ali neposrednega dodajanja tega sladkorja v med (Gaber Žveplan, 2013).

V vodi netopne snovi, ki jih lahko najdemo v medu, so cvetni prah, ostanki čebel in satja, prav tako pa tudi delci prahu ter druge nečistoče. Vsebnost teh v vodi netopnih snovi v medu je kriterij čistosti medu. Njihova skupna masa ne sme predstavljati več kot 0,1 % mase medu (Korošec, 2012).

Med ima kisel **pH**, njegove vrednosti pa naj bi bile med 3,5 in 5,5. Kislost medu je posledica prisotnosti organskih kislin, ki prispevajo tudi k okusu in barvi medu, prav tako pa tudi k

odpornosti pred mikrobiološkim kvarom. Dolgo je veljalo prepričanje, da v medu prevladuje mravljična kislina, kasneje pa je bilo dokazano da je v medu pravzaprav največ glukonske kisline, ki je prisotna v spremenljivem ravnotežju z glukonolaktonom. Poleg omenjenih kislin so v medu v relativno visokem deležu prisotne še piruvična, jabolčna, citronska, jantarna, oksalna, maslena, očetna, vinska, mlečna, benzojska, piroglutaminska, valerijanska, α -ketoglutarina, glikolna in 2,3-fosfoglicerinska kislina. Skupna vsebnost kisline je običajno manjša od 0,5g/100g medu. Vir nekaterih kislin sta nektar in mana, medtem ko druge nastajajo med zorenjem in skladiščenjem medu. Vsebnost prostih ter skupnih kislin ter vrednost pH so parametri, ki nam omogočajo razlikovanje med različnimi vrstami medu glede na botanični izvor, vsebnosti laktonov zaradi prevelike variabilnosti ne moremo upoštevati (Korošec, 2012).

Diastaza je encim v medu, sestavljen iz α -amilaze in β -amilaze. Prva cepi škrob na dekstrine, druga pa ga razgradi do maltoze. V medu škroba skorajda ni, encim pa naj bi b med dodale čebele. Kljub temu se vrste medu razlikujejo v aktivnosti diastaze, kar je predvsem posledica količine nektarja in fiziološkega stanja čebeljih žlez v pašni sezoni. Aktivnost diastaze se s časom skladiščenja in s segrevanjem zmanjšuje, zato je ta parameter uporaben za razvrščanje po botaničnem izvoru le pri svežem medu. Ker je encim občutljiv na toploto, je njegova aktivnost eden glavnih parametrov za ugotavljanje intenzivnosti segrevanja medu med predelavo in skladiščenjem. V medu so poleg omenjenega encima prisotni tudi glukoza oksidaza, invertaza, katalaza, kislata fosfataza, polifenoloksidaza, esteraza, inulaza in proteolitični encimi. Večino encimov v med prispevajo čebele, nekateri pa lahko izvirajo tudi iz nektarja in peloda. Skupaj z drugimi proteini prispevajo v medu k značilnostim, ki jih ni mogoče doseči ali nadomestiti na umeten način (Gaber Žveplan, 2013).

Svež med skorajda ne vsebuje hidroksimetilfurfurala (**HMF**). Ta ciklični aldehyd nastaja pri razgradnji fruktoze in glukoze v kislem okolju ali kot eden od produktov Maillardove reakcije. Hitrost njegovega nastanka je odvisna od temperature. Vsebnost HMF v medu je sprva služila kot indikator potvorjenosti medu z invertnim sirupom, kmalu pa se je izkazalo, da je vsebnost lahko večja tudi v pregretem ali neprimerno skladiščenem naravnem medu. Vsebnost HMF v medu ni neposredno povezana z botaničnim izvorom medu, temveč z geografskim področjem iz katerega je med (Gaber Žveplan, 2013).

Električna prevodnost je fizikalna lastnost medu, odvisna predvsem od količine mineralnih snovi in kislin v medu. Med vsebnostjo pepela v medu in električno prevodnostjo obstaja

linearna zveza. Zaradi hitrosti in enostavnosti je merjenje električne prevodnosti v rutinski analizi že povsem nadomestilo analizo pepela. Električna prevodnost je lahko pokazatelj botaničnega porekla medu. Na splošno velja da ima med iz nektarja nižjo električno prevodnost kot med iz mane. Seveda so nekatere vrste medu iz nektarja tudi izjeme (Korošec, 2012).

Za spremljanje naštetih fizikalnih in kemijskih parametrov medu so na voljo standardizirane analitske metode, ki so v laboratorijih za spremljanje kakovosti medu rutinsko utečene. Vsebnost vode se običajno določa refraktometrično prek lomnega količnika. Vsebnost sladkorjev, med drugim tudi fruktoze, glukoze in saharoze se dandanes najpogosteje določa s kromatografskimi metodami, kot so HPLC metoda z amino kolono in refraktometričnim detektorjem, HPLC metoda z ionsko izmenjavo kolono in pulzno amperometričnim detektorjem ter tudi plinska kromatografija z uporabo kapilarne kolone za ločbo siliranih sladkornih derivatov. V vodi netopne snovi se določa gravimetrično s filtracijo raztopine medu prek steklenih filtrirnih lončkov. Aktivnost diastaze se najpogosteje določa s Schadejevo ali Phadebas spektrofotometrično metodo, rezultat pa se podaja kot diastazno število (DN). Za določanje vsebnosti HMF so bile testirane in validirane tri različne metode, in sicer HPLC in spektrofotometrična po Whiteu in Winklerju. Električno prevodnost medu pa se določa konduktometrično v 20% raztopini medu pri temperaturi 25°C (Bogdanov, in drugi, 1999).

2.2.3.2 FIZIKALNE LASTNOSTI MEDU

Fizikalne lastnosti medu so tesno povezane z njegovo kemijsko sestavo. Posamezni parametri medu lahko vplivajo na eno ali tudi na več fizikalnih lastnosti medu.

Vodna raztopina medu suče ravnino polarizirane svetlob. Za to lastnost so odgovorni ogljikovi hidrati v medu. Glukoza, disaharidi, trisaharidi in tetrasaharidi sučejo ravnino polarizirane svetlobe v desno, medtem ko je fruktoza zaslužna za zasuk v levo. Levosučnost preberemo kot negativno **vrednost optične rotacije**, zasuk v desno pa kot pozitivno vrednost. Merjenje specifičnega kota zasuka se uporablja za razlikovanje med medom iz mane in medom iz nektarja.

Delež suhe snovi v medu določamo z merjenjem lomnega količnika. Meritev se opravlja z refraktometrom, ki deluje na principu loma svetlobe ob prehodu skozi raztopino medu. Lomni količnik je odvisen od temperature, zato je potrebno meritve opravljati pri standardni

temperaturi 20°C. Za izračun vode v medu iz odčitka lomnega količnika se uporabljajo posebne tabele ali pa meritev izvedemo z refraktometrom, ki je prilagojen za med.

Viskoznost je oznaka za tekočnost medu. Na viskoznost vpliva vsebnost vode v medu, botanični izvor nektarja, temperatura ter število in velikost kristalov. Viskoznost se zmanjšuje z večanjem vsebnosti vode in naraščanjem temperature (Korošec, 2012).

Kristalizacija medu je naraven proces, do katerega pride zaradi spontanega izločanja glukoze iz nasičene raztopine sladkorjev. Je nastanek in rast kristalov, zgodi se skoraj v vseh sortah medu, vendar le v medu naravnega izvora. Pri tem se iz glukoze spusti voda, nastali glukoza monohidrat pa kristalizira. Kristali glukoze monohidrata tvorijo mrežo, ki imobilizira tudi druge sestavine v medu, prosta voda pa se nabira v vmesnih prostorih. Zaradi povečane količine vode je med bolj dovzeten pojav fermentacije. Kristaliziran med je svetlejši barve kot tekoči med, ima nekoliko drugačen okus in vpliva na taktilne zaznave v ustih. Pojav in hitrost kristalizacije nista odvisna le od vsebnosti vode v medu, temveč tudi od razmerja med fruktozo in glukozo ter prisotnosti nekaterih oligosaharidov. Med z manj glukozo kristalizira kasneje. Kristalizacija je odvisna tudi od vsebnosti nekaterih elementov, organskih kislin, beljakovin, temperature, in zračne vlage. Pospešijo jo tudi delci, ki predstavljajo kristalizacijska jedra, torej cvetni prah, delci prahu in vosek. Pri kristalizaciji nastane veliko praznega prostora, kamor med kristale vdre zrak in površina postane bele barve. Kristaliziran med je med potrošniki manj zaželen, zato se za upočasnitev kristalizacije uporablja filtracija, s katero se odstranijo kristalizacijska jedra, doma pa lahko sami kristalizacijo odpravimo s preprostim kratkotrajnim segrevanjem medu na temperaturi med 60 in 70°C (Plut, 2020).

Na **higroskopnost** prav tako vpliva velika količina sladkorjev v medu. Odvisno od relativne vlage v zraku in vsebovane vode, med odpušča ali privlači vodo. Ta proces poteka dokler se ne vzpostavi ravnotežje. Zaradi velike viskoznosti medu, se absorbirana voda nabira predvsem na površini, zaradi česar je bolj podvržen kvarjenju. Na higroskopnost vpliva predvsem fruktoza, ker je bolj higroskopska kot ostali ogljikovi hidrati v medu (Korošec, 2012).

2.2.3.3 SENZORIČNE LASTNOSTI MEDU

Glavne senzorične lastnosti medu; videz, vonj, okus in aroma, so v največji meri odvisne od botaničnega izvora medu, nanje pa lahko vplivajo tudi pogoji predelave in skladiščenja medu. Senzorična analiza medu se najpogosteje izvaja pri vrednotenju kakovosti medu, saj je

velikokrat le na ta način možno odkriti nekatere značilnosti medu, ki jih rutinske fizikalno-kemijske analize ne zaznajo. Nekatere tuje senzorične lastnosti so lahko posledica neprimerne tehnologije čebelarjenja, predelave ali sprememb medu (Korošec, 2012). Osnova za prepoznavanje medu je senzorična oziroma organoleptična ocena medu na podlagi konsistence, barve in arome medu (Plut, 2020).

Videz medu predstavljata dva parametra. Med ima zelo širok spekter barv od vodeno bele do temno rjave, skoraj črne. Po kristalizaciji med posvetli, staranje in segrevanje medu pa njegovo barvo intenzivirata. Barva svežega medu je odvisna od mineralne sestave in botaničnega izvora. Je posledica barvil, ki jih vsebuje, to so predvsem karotenoidi in ksantofili in tudi polifenoli in flavonoidi. Bistrost medu je odvisna od vrste nektarja oziroma mane. V večini primerov je med iz mane bolj moten kot med iz nektarja (Plut, 2020).

Za vonj medu so odgovorne hlapne organske komponente, ki jih zaznamo z vohanjem. Aroma medu zaznavamo retronazalno, medtem ko se med v ustih topi in se ob tem sproščajo komponente, ki hlapijo pri telesni temperaturi. Aroma medu je odvisna od njegove sestave, predvsem od vsebnosti različnih snovi v medu (metilantranilat, formaldehid, acetataldehid, izomilformitat, acetat, fenilacetat, različni alkoholi...). Vrste medu se med seboj razlikujejo v intenzivnosti vonja, tako kot tudi v notah vonja, podobno pa velja tudi za aromo (Plut, 2020).

Okus se vrednosti z ocenjevanjem štirih osnovnih okusov: sladkega, kislega, slanega in grenkega. V medu načeloma prevladuje sladek okus, vendar ni enako intenziven v vseh vrstah medu. Fruktoza je skoraj enkrat bolj sladka kot saharoza, maltoza pa je še manj sladka kot saharoza. Za nekatere vrste medu je značilen tudi kisel okus, prav tako se njegova intenzivnost razlikuje med vrstami medu. Enako velja tudi za grenek okus, ki pa je morda prisoten v nekoliko manjših količinah kot kisel okus. Slan okus v večini medenih vrst ni prisoten. Poleg osnovnih okusov lahko seveda zaznamo še katerega drugega (Plut, 2020).

Za karakterizacijo senzoričnih lastnosti medu uporabljamo kvalitativno ali kvantitativno opisno analizo, ki jo izvajajo s šolanim panelom senzoričnih preizkuševalcev. Največkrat se uporabljajo metode z lestvicami ali s točkovanjem.

2.2.4 BAKTERIJE V MEDU

V medu bakterije praviloma ne morejo preživeti, saj zaradi svojih sestavin deluje protimikrobno. Ena od takih lastnosti je vsebnost sladkorjev, kar 70 odstotna. Zaradi tako velike koncentracije sladkorjev je med učinkovit kot medicinsko sredstvo, ki se uporablja za celjenje ran, saj preprečuje okužbo s tujki iz zraka. Druga sestavina, ki deluje na bakterije so flavonoidi, ki delujejo tudi protivnetno. V medu se pojavlja tudi več kot deset različnih organskih kislin, ki predstavljajo 0,5% snovi. Organske kisline dajejo medu kislost med 3,5 in 6,5. Ker večina bakterijskih vrst ne more preživeti na območju s pH, nižjim od 7,2 ali višjim od 7,4, med ni primeren za življenje bakterij. Bolj kisel kot je med, bolj je učinkovit. V medu lahko najdemo naslednje kisline: očetno, masleno, citronsko, mravljično, glukonsko, mlečno, maleinsko, jabolčno, oksalno, piroglutaminsko, jantarjevo, glikolno, piruvično in vinsko. Največji delež h kislosti prispeva glukonska kislina, ki nastane, ko se glukoza iz rastlin v medu meša z encimom glukoza oksidazo, ki nastane v žlezah čebel. Med pa ne vsebuje le organskih, ampak tudi anorganske kisline, med katerimi je najpomembnejša fosforjeva kislina. S kislostjo medu in vsebnostjo kislin lahko celo določimo kakovost medu s sorazmerno veliko natančnostjo (Božnar A., 1998).

2.2.4.1 PROTIMIKROBNE SNOVI V MEDU

Med zavira rast in razvoj velikega števila mikroorganizmov. Vzroki za to so lahko velika vsebnost sladkorjev, majhna vsebnost vode (14-21%), nizek pH, prisotnost snovi s protimikrobnim delovanjem, majhna vsebnost dušika (Plut, 2020).

Visoka vsebnost sladkorjev v medu pripomore k temu, da se zmanjša delež biološko dostopne vode, s tem pa se ustvari okolje, ki je skrajno neugodno za rast mikroorganizmov. Rast bakterijskih vrst, ki so občutljive na nizko vsebnost vode v okolju lahko med zavira že pri nizkih koncentracijah, če vsebuje dovolj veliko količino drugih protimikrobnih faktorjev. Za protimikrobno delovanje medu je pomembna tudi njegova kislost. Med je kislo živilo s pH vrednostjo med 3,5 in 5,5. Nizek pH deluje inhibitorno na številne živalske patogene, katerih optimalni pH rastnih pogojev se začnejo šele pri pH 7,2. Med prav tako zavira tudi rast nekaterih glavnih bakterijskih vrst, ki okužujejo rane in katerih minimalni pH za rast znaša 4,3

(*Escherichia coli*), 4,0 (*Salmonella sp.*), 4,4 (*Pseudomonas aeruginosa*) in 4,5(*Streptococcus pyogenes*) (Podržaj, 2011).

Med vsebuje številne koristne vitamine (vitamini kompleksa B, vitamin C, pantotenska kislina, folna kislina, vitamine A,D,E in K...) in veliko mineralnih in rudninskih snovi, nekaj beljakovin z aminokislinami, številne encime (katalzo, diatazo, glukozo oksidazo...), kisline in hormone (Plut, 2020).

2.2.4.2 PROTIBAKTERIJSKA UČINKOVITOST MEDU

Protibakterijska učinkovitost medu proti različnim patogenim bakterijam je bila dokazana že s strani številnih znanstvenikov. Dokazali so pomembno protibakterijsko delovanje lokalno pridobljenih ter komercialno dostopnih terapevtskih vrst medu proti širokemu spektru človeških patogenov. Prav tako je bilo dokazano, da protibakterijske učinkovitosti medu ne gre pripisovati le njegovi osmolarnosti, temveč tudi protibakterijskim komponentam, ki jih med vsebuje (encim glukosa oksidaza, encim katalaza, flavonidi, fenolne spojine...). Naravni med pa ne deluje protibakterijsko le na številne patogene bakterije, podoben učinek ima prav tako na ustne streptokoke (Podržaj, 2011).

2.3 USTNA MIKROBIOTA

Ustna mikroflora se pri posameznikih razlikuje, čeprav so v ustih večinoma prisotni nehemolitični in α -streptokoki ter laktobacili, vendar ti niso edini. V ustih zdravega človeka je namreč večinoma okoli 300 vrst bakterij. Med njimi so najbolj pogoste vrste *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* in *Streptococcus salivarius*. Uspevanje zgoraj naštetih vrst po Bassonu in sodelavcih (1994) zavre že 25% razredčina evkaliptusovega medu, za *Streptococcus anginosus* in *Streptococcus oralis* pa 17 in 12%. Poleg tega s hrano in pijačo v usta zanesemo tudi druge bakterije, ki pa tam ne ostanejo dolgo ampak potujejo naprej po prebavnem traktu. Nekatere bakterije so s celicami v ustih tudi v sožitju (Dragaš, 1996).

Ustna votlina človeka je okolje, ki ga naseljuje kompleksna in heterogena mikrobna združba. Zobje in usta so nenehno v stiku z mikrobi iz okolice. Bakterije pa se v ustih naseljujejo postopoma (Podržaj, 2011).

2.3.1 MIKROFLORA OB ROJSTVU IN PO NJEM

Ustna votlina je ob rojstvu dojenčka sterilna, vendar na različne načine kmalu pride v stik z različnimi tujki, tudi bakterijami. Že po nekaj urah (4-12 ur po porodu) jo poselijo bakterije, ki jim kisik ne škoduje. Te bakterije so predvsem streptokoki in laktobacili. V prvem letu so bakterije v ustih predvsem pripadnice rodov stafilokokov, streptokokov, rodov *Neisseria* in *Veillonella* ter vrste iz družine *Lactobacillus*. Med rastjo zob se v ustih najprej pojavijo streptokoki, po izrastu stalnih zob pa se začnejo pojavljati tudi bakterije, ki so prilagojene na rast in razvoj na zobni površini in v globokih parodontalnih žepih. Teh bakterij je pri zdravem odraslem človeku zelo malo (največ 1%). Pri bolnem človeku lahko zaradi močnih antibiotikov normalna mikroflora izgine. Na prosta mesta se nato naselijo druge nesimbiotske bakterije in tudi glive (Dragaš, 1996).

Pri prenosu bakterij igra pomembno vlogo slina. Sčasoma, ko otrok uživa vse bolj raznoliko hrano, začnejo v ustih prevladovati mikroaerofilne in aerobne paličaste bakterije, tako da se normalna ustna flora med 2. in 4. letom starosti že dokončno oblikuje. Pri otrocih, ki so popolnoma zdravi do pubertete najdemo bakterije vrste *Streptococcus*, *Actinomyces spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leptotrichia buccalis*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.* S poglobljanjem gingivalnih žepov se po končani rasti stalnih zob ustvari niša za anaerobne bakterije (Podržaj, 2011).

Pri odraslem človeku se njegovih v ustih poleg tistih bakterij iz otroštva nahajajo še vrste iz družin *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Rothia* in *Capnocytophaga*. V subgingivalni mikroflori je mogoče najti tudi treponeme (družina *Treponema*) in vrste iz rodu *Porphyromonas*, ki so pri zdravem človeku sicer redke, a se ob vnetnih spremembah močno razmnožijo. Ustna votlina starostnika je po raznolikosti bakterij podobna dojenčkovi, v brezzobih ustih pa ni možnosti za razrast anaerobnih bakterij. Prevladujejo vrste *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus epidermidis*, *Neisseria* in *Veillonella*. *Streptococcus mutans* in *Streptococcus sanguis* se pojavljata le, če oseba nosi zobno protezo, na splošno pa s staranjem in izpadanjem zob izginjata, ker preživita na zobeh (Podržaj, 2011), (Dragaš, 1996).

Ustna votlina torej zagotovo ni sterilni prostor. V ustni votlini bolnega človeka ob vsakem posegu, z namenom odstranjevanja patobiontov, se pozablja, da pri tem odstranimo tudi številne koristne bakterije. Zaradi tega je izredno pomembno kako z mikrobno združbo v ustni votlini upravljamo (Lapanje & Rijavec, 2019).

2.3.2 USTNI STREPTOKOKI

Streptokoki so najpogostejše bakterije, ki sodelujejo pri razvoju ustne gnilobe. Sicer jih najdemo tudi v normalni ustni flori, kjer naj bi predstavljali kar 80% vseh obstoječih bakterijskih vrst, ki jih najdemo v zdravi ustni votlini. Zaradi spremenjenih okoliščin, primernih za nastanek bolezni, kot so slaba higiena ust, neprimerna prehrana in oslavljen imunski sistem in odziv, pride do količinskih sprememb in povečanja števila bakterij, ki se prilepijo na zobe in dlesni v številnih plasteh, tvorijo debele polisaharidne zobne obloge ter povzročajo številne okužbe. Ustni streptokoki so po Gramu pozitivni koki v verižicah, negibljivi nesporogeni fakultativni anaerobi. Iz sladkorjev med hranjenjem in pridobivanjem energije tvorijo mlečno kislino. To omogoča izstopanje kalcija in demineralizacije sklenine in dentina ter posledično okvaro zobne, ki pri zdravih odraslih osebah varuje zobe pred vdorom bakterij (Dragaš, 1996).

2.3.3 KARIES

Karies imenujemo tudi zobna gniloba in je najbolj razširjena bolezen ustne votline. Povzročajo ga bakterije, ki tvorijo kisline, ki topijo sklenino, kar imenujemo demineralizacija sklenine. Ker je sklenina izredno trda, je proces razpadanja dokaj počasen. Ko pa proces preide globlje v dentinsko plast, se propadanje nadaljuje izredno hitro, tako da karies kmalu prodre do pulpe, ki se nahaja v sredini zoba (Babit, 2020).

V ustih se iz zobovine neprestano izplavljajo minerali in se vgrajujejo nazaj v zobovino. Tako neprestano poteka demineralizacija in remineralizacija zobovine. Kadar so vsi dejavniki v ravnovesju ter sta demineralizacija in remineralizacija zob v ravnovesju, zobovina ostane nepoškodovana. Karies lahko torej opredelimo kot lokalizirano kronično neravnovesje demineralizacije in remineralizacije trdih zobnih tkiv v prid demineralizacije (Kovačič, 2020).

Na splošno bi lahko rekli, da je nastanek kariesa pogojen z mikrobno združbo, ki omogoča nastanek zvišanega pH v ustni votlini. Kisel pH je posledica fermentacije ogljikovih hidratov,

bazičen pH pa je posledica razgradnje proteinov. Pri bolnikih s kariesom se mikrobna raznolikost zmanjša. Vrstna sestava bakterij se v primeru nastanka kariesa spremeni, saj se poveča število streptokokov in laktobacilov. Pri zdravih ljudeh so odsotne bakterije skupine *mutans*, od streptokokov pa so v zdravi ustni votlini prisotne le bakterije vrste *S. gordonii* in *S.mitis* (Lapanje & Rijavec, 2019)

3. MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI MEDU

Vzorci označeni s številkami od 1-4 so bili pridobljeni v trgovini Čebelarke zveze Maribor, proizvedeni s strani različnih proizvajalcev medu oziroma čebelarjev. Vsi medovi soslovenskega porekla.

Vzorec označen s številko 5 je medicinski med Vivamel, proizvajalca Tosama. Pridobljen je bil iz lekarne Poljčane.

Vzorci medu od 1-4 so bili shranjeni v kozarcih s pokrovom volumna 250 g sli 450 g. Vzorec 5 pa je bil shranjen v tubi volumna 20 g.

Vse analize vzorcev medu so bile opravljene v šolskem laboratoriju.

Tabela 1: Opis vzorcev medu

Vzorec	Proizvajalec	Rok uporabe	Ime vzorca - oznaka	Barva
1	Sedmak	15. 06. 2020	žajbljev med	zlato rumen
2	Bavar	31. 12. 2020	kostanjev med	temno rjavkasto oranžen
3	Čebelarstvo Cesar	28. 08. 2021	ajdov med	temno rjavkasto rdeč
4	Božnar d.o.o.	7. 10. 2021	hojev med	temno rjav
5	Tosama,	31. 03. 2022	medicinski med Vivamel	svetlo rjav



Slika 1: Medovi uporabljeni v raziskovalni nalogi (lasten vir)

3.2 VZORCI ZOBNIH PAST

Vzorec 1 je zobna pasta Bluem, ki vsebuje med, pridobljena je bila iz lekarne Poljčane.

Proizvedena je bila na Nizozemskem.

Vzorec 2 je zobna pasta Vademecum Mentol Fresh z mentolom in natrijevim fluoridom, kupljena v trgovini. Proizvedena je bila v Nemčiji.

Oba vzorca sta bila shranjena v tubi volumna 75 mL.

Vse analize zobnih past so bile opravljene v šolskem laboratoriju.

Tabela 2: Opis vzorcev zobnih past

Vzorec	Proizvajalec	Država porekla	Ime vzorca	Barva
1	Pillars Research B.	Nizozemska	Bluem	temno modra
2	Schwarzkopf & Henkel	Nemčija	Vademecum Menthol Fresh	svetlo modra

3.3 KEMIJSKE METODE

3.3.1 Redčenje vzorcev medu

V čašo smo natehtali 10,0 g medu ($\pm 0,01$ g) z uporabo sterilne žličke. Nato smo v čašo z merilnim valjem dodali 90 mL deionizirane vode. Z stekleno sterilno palčko smo mešali tako dolgo, da se ves med ne raztopi. Pripravili smo 10 % raztopine medu.

Tako razredčene vzorce smo uporabili pri metodah opisanih v poglavjih 3.2.2, 3.2.3 in 3.2.4.

3.3.2 Določanje pH vzorcev medu

pH medu je bil določen z elektronskim pH metrom (Vernier pH meter) v programu Logger Pro. Pred meritvami je bil pH meter kalibriran v Pufru (pH 4 in 7).

3.3.3 Določanje skupnih fenolov

Določanje skupnih fenolov izvedemo fotometrično s Folin-Ciocalteujevim reagentom (FC reagent), ki je mešanica fosfoživosrebrove in fosfomolibdenske kisline. Fenolne spojine v

bazični raztopini Na_2CO_3 reducirajo FC reagent. Galno kislino smo uporabili kot referenčno spojino oziroma standard (Cesar, 2018).

Kemikalije:

- FC reagent
- galna kislina
- absolutni (99,9%) etanol
- deionizirana voda
- Na_2CO_3

Aparature in pribor:

- kolorimeter (Vernier)
- merilne bučke
- avtomatske pipete
- kivete

Umeritvena premica:

Pripravili smo založno raztopino v 100 mL bučki z raztapljanjem 0,5000 g galne kisline () ($\pm 0,0001$ g) v približno 10 mL absolutnega etanola, nato smo z destilirano vodo dopolnili do oznake. Iz te raztopine smo z ustreznim razredčevanjem pripravili pet standardnih raztopin: 25,0/50,0/75,0/100,0/125,0 mg/L.

Merilna napaka je izračunana kot:

$$\text{Pipeta: } \frac{0.008 \text{ mL}}{1.00 \text{ mL}} \times 100 = 0.8\% \quad + \quad \text{Tehtnica: } \frac{0.0001 \text{ g}}{0.5000 \text{ g}} \times 100 = 0.02\%$$

Skupaj: 0,82%

Iz izvedenega izračuna lahko sklepamo, da je merilna napaka pri pripravi standardnih raztopin nizka ter ne bo vplivala na dobljene rezultate meritev.

Postopek za določanje skupnih fenolov:

Dodamo 1,00 ($\pm 0,008$) mL vsake standardne raztopine galne kisline k 5,00 mL FN reagenta (razredčimo 1:3 z destilirano vodo). Po 5. do 8. minuti z uporabo 50 ($\pm 0,1$) mL birete dodamo še 15,00 mL 20% Na_2CO_3 . Reakcijsko zmes pri sobni temperaturi, zavito v Al folijo, pustimo

stati 120 min, da se barva zmesi razvije v modro. Absorbanco zmesi merimo pri valovni dolžini maksimalne absorpcije z uporabo Vernierjevega kolorimetra ($\pm 0,3$ nm). Izrišemo graf *absorbance pri koncentraciji* in s pomočjo enačbe premice izračunamo koncentracije fenolnih spojin v preučevanih vzorcih. Vrednost skupnih fenolov izrazimo kot mg ekvivalenta galne kisline (mg EGK/L) (Cesar, 2018).

3.3.4 Določanje antioksidantne aktivnosti (AOA)

Antioksidativno učinkovitost smo analizirali z uporabo 2,2-difenil-1-pikrilhidraliza (DPPH).

Princip:

Metoda antioksidantne aktivnosti temelji na reakciji med antioksidativno komponento, ki je donor vodika in stabilnim prostim radikalom DPPH $\cdot$. Zanj je značilen absorpcijski maksimum pri 517 nm. Koncentracijo DPPH $\cdot$ v reakcijski zmesi določimo s spektrofotometrom z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 515,5 nm (Stankovič, 2016).

Kemikalije:

- 80 % etanol
- 0,0012 g DPPH $\cdot$ raztopimo v 0,05 L 80 % etanola
- absolutni etanol
- deionizirana voda

Aparature in pribor:

- spektrofotometer SpectroVis Plus (valovna dolžina 515,5 nm)
- kivete
- steklene čaše
- steklene merilne bučke
- avtomatske pipete
- steklene paličice

Izvedba:

Uporabili smo 10% raztopine medu (poglavje 3.2.1).

Priprava reakcijske mešanice: v kiveto smo odpipetirali 0,75 mL raztopine medu, dodali 2,25 mL že pripravljene raztopine DPPH· v 80% etanolu in dobro premešali. Mešanice smo hranili v temi, pri sobni temperaturi.

Merjenje absorbance: Spektrofotometer smo umerili z 80 % etanolom. Izvedli smo tudi kontrolo z 2,25 mL raztopine DPPH· zmešane z 0,75 mL destilirane vode, prav tako hranjene v temi. Nato smo na spektrofotometru izmerili absorbanco vsakega vzorca medu pri valovni dolžini 515,5 nm po 15., 60. in 120. minuti.

$$\text{Račun: \% inhibicije} = \left(\frac{\text{Absorbanca kontrole} - \text{absorbanca vzorca}}{\text{Absorbanca kontrole}} \right) \times 100$$

3.3.5 Titrimetrično določanje vrednosti pH in skupnih (titrabilnih) kislin

Proste kisline in laktone v medu določamo s potenciometrično titracijo. Pri titraciji z NaOH določamo vsebnost prostih kislin, medtem ko se ob titraciji s HCl sproščajo laktoni.

Vsebnost laktonov je presežek kislosti, ko postane med alkalen. Z vsoto prostih kislin in laktonov dobimo informacijo o vsebnosti skupnih kislin, ki se s časom in pod vplivom fermentacije povečuje (Cavia in sod., 2007).

Postopek:

Titracija 10% raztopine medu z 0,05 M raztopino NaOH do pH 8,5, ki ji sledi dodatek 10 mL 0,05 M raztopine NaOH in ponovna titracija z 0,05M raztopine HCl do pH 8,3 (Stankovič, 2016).

Kemikalije:

- 0,05 M NaOH
- 0,05 M HCl
- deionizirana voda

Aparature in pribor:

- pH meter (Vernier pH meter)
- magnetno mešalo (WiseStir)
- steklene čaše
- steklene paličice
- merilne bučke
- avtomatske pipete
- 2 bireti

Izvedba:

Priprava reagentov:

0,05 M raztopina NaOH: v 500 mL bučko odtehtamo 1 g NaOH in dopolnimo do oznake z destilirano vodo,

0,05 M raztopino HCl: V drugo 500mL bučko odpipetiramo 2 mL 37% HCl ter tudi tukaj dopolnimo do oznake z destilirano vodo.

Priprava vzorca: v 10 mL čašo smo odtehtali 10 g vzorca medu in ga raztopili v 75 mL destilirane vode. Tako pripravljenemu vzorcu smo dodali magnet, ga postavili na magnetno mešalo, potopili pH meter v raztopino ter po 2 min odčitali vrednost pH. Titrirali smo z 0,05 M NaOH do pH 8,5 in zapisali porabo reagenta (V_b). Nato smo dodali 10 mL 0,05M NaOH in titrirali z 0,05 M HCl do pH 8,3 ter zapisali porabo pri drugi titraciji (V_a).

Slepi vzorec: titracija 85 mL destilirane vode z 0,05 M NaOH do pH 8,5 ter zapisali porabo reagenta (V_x).



Slika 2: Titracija (lasten vir)

Račun:

Količino kislin izrazimo kot mekv/kg medu.

Vsebnost prostih kislin (FA, mekv/kg): $FA = (V_b - V_x) \cdot c_{(NaOH)} \cdot 100$

Vsebnost laktonov (LA, mekv/kg): $LA = (10 \text{ mL} - V_a) \cdot c_{(HCl)} \cdot 100$

Vsebnost skupnih kislin (SK, mekv/kg): $SK = FA + LA$

3.4 MIKROBIOLOŠKE METODE

3.4.1 Seznam materialov

Steklovina:

- steklena palčka
- 100 mL merilni valj
- 150 mL čaše
- petrijevka (premer 90 x 15 mm)
- spatula Drigalski
- standardna epruveta
- 1 L čaša
- 500 mL merilni valj
- plastične žličke
- pinceta iz nerjavnega jekla

Zaščita:

- plašč
- zaščitna očala
- rokavice

Laboratorijske aparature:

- laminarij (Iskra PIO)
- inkubator (Binder)
- kuhalnik (Bomann)
- avtomatska pipeta (LLG Labware)
- avtoklav (CertoClav)
- tehtnica (Kern PCB 1000)
- gorilnik (Campingaz)
- stresalec za epruvete (Phoenix instrument)

Kemikalije:

- 70 % etanol (Sigma - Aldrich)
- diski penicilina P1, P5 (Bioanalyse)

- diski streptomcina (Bioanalyse)
- diski kloramfenikola (Bioanalyse)
- glukoza (Sigma - Aldrich)
- kvasni ekstrakt (Fluka)
- tripton (Biomerieux)
- tehnični agar (Biolife)
- kuhinjska sol (Mercator)
- deionizirana voda

3.4.2 Metoda difuzije na trdnem gojišču (difuzijski antibiogram)

Protibakterijsko učinkovitost žajbljevega, kostanjevega, ajdovega, hojevega in medicinskega medu smo ugotavljali z metodo difuzije na agarju v šolskem laboratoriju na oddelku biologije. Difuzijski antibiogram je metoda za ugotavljanje občutljivosti določenega seva bakterij na različne antibiotike. Na ploščo nacepimo bakterijo tako, da je rast konfluentna ter nanjo položimo diske z antibiotiki. Vse vzorce nato inkubiramo pri primerni temperaturi. Zaradi difuzije učinkovin v gojišče se okrog diska vzpostavi koncentracijski gradient antibiotika. Nastane inhibicijska cona, cona brez bakterijske rasti. Premer te cone nam pove ali je sev odporen, intermediaren ali občutljiv za antibiotike, glukozo ter med, ki ga preizkušamo (Turk, 2012).

Cona inhibicije ni odvisna le od učinkovitosti antibiotikov (ter glukoze in medu v našem primeru), pač pa tudi od drugih dejavnikov (npr. debeline gojišča), zato je pomembno, da je naša metoda standardizirana (Turk, 2012).

Šolski laboratorij, kjer smo pripravljali vzorec je bil sterilan. Sterilnost smo dosegli z aseptično tehniko, čistim in z etanolom očiščenim laminarijem ter s sterilizacijo v avtoklavu.

Priprava gojišč - recept:

LB gojišč – trdno:

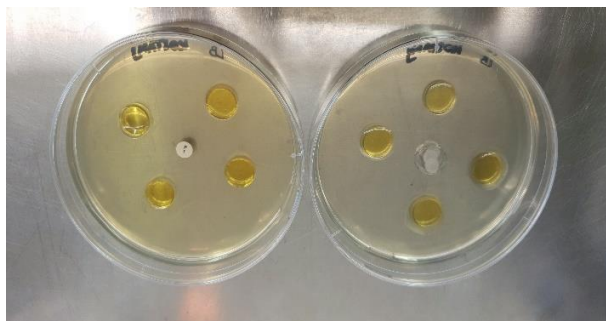
- agar – 20 g/L
- NaCl 10 g/L
- Trypton 10 g/L
- Kvasni ekstrakt 5 g/L

Za pripravo trdnega gojišča v petrijevki smo zapisanim sestavinam dodali destilirano vodo do končnega volumna 1 L ter kuhali na kuhalniku do vretja. Sterilnost smo dosegli z avtoklaviranjem v šolskem namiznem avtoklavu. Sterilni agar smo nato aseptično nalili v sterilne plastične petrijevke (Cold Spring Harbor Protocols, 2020).

Priprava vzorcev za test antimikrobne učinkovitosti medu:

V našem primeru smo uporabili mikroorganizme ustne sluznice. S sterilno vatirano palčko smo najprej odvzeli bris 1, nato bris 2 in ga inokulirali v 5 mL tekoče gojišče LB. Inokulum smo 24 ur inkubirali pri temperaturi 37 °C v šolskem inkubatorju.

Z avtomatsko pipeto smo jih nanesti na gojišče in jih s sterilno spatulo enakomerno razmazali po površini gojišča. Vanj smo s sterilno ozko epruveto naredili štiri vdolbinice, ki niso bile v bližini roba petrijevke. Vanje smo nanesti približno 2 ml nerazredčenega medu. Ta postopek smo ponovili za vsako vrsto medu posebej. Naredili smo 10 različnih vzorcev, 2 paralelni petrijevki za vsak med, s po štirimi vdolbinicami ponovitev. Vzorce smo nato 24 ur inkubirali pri temperaturi 37°C v inkubatorju. Po inkubiranju smo izmerili premere inhibicijskih con, ki so nastale pri posamezni vzorcih medu.



Slika 3: Primer pripravljenega antibiograma z medom (lasten vir)

Priprava vzorcev za test antimikrobne učinkovitosti zobnih past:

Po odvzetem brisu, ki smo ga 24 h inkubirali v namnoženo mešano kulturo, smo ponovno z avtomatsko pipeto nanesti 100 μ L na trdno gojišče LB. Po enakomernem razmazu smo z ozko sterilno epruveto naredili vdolbinice in vanje nanesti določeno pasto. Naredili smo po tri paralelne ponovitve za posamezno pasto in po en vzorec kontrole. Po 24 urni inkubaciji smo izmerili inhibicijske cone.

Pri obeh testih smo opravili (-) negativno kontrolo z antibiotičnimi diski penicilina (P1, P5), streptomicina (S) in kloramfenikola (C) ter (+) pozitivno kontrolo osmolarnosti sladkorja v medu in (+) kontrolo rasti kulture.

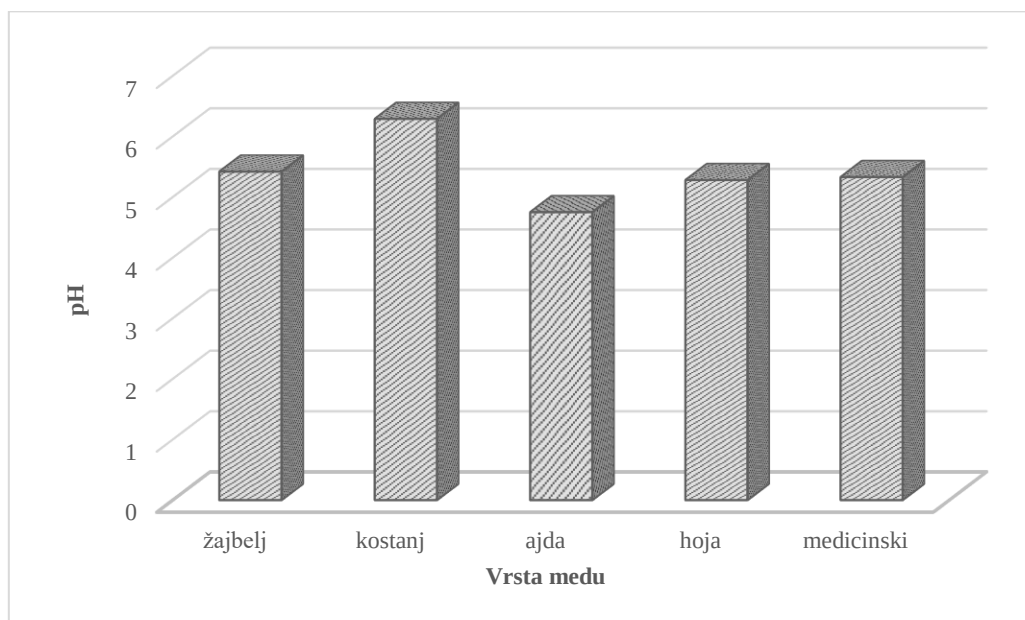
4. REZULTATI

4.1 Določanje pH medu

Tabela 3: pH vrednosti pri 10% razredčitvi medu

Številka vzorca	Vrsta medu	pH vrednost	Razredčenost raztopine (%)
1	žajbelj	5,42	10
2	kostanj	6,29	10
3	ajda	4,75	10
4	hoja	5,28	10
5	medicinski	5,33	10

pH medu navadno variira med 3,5 in 5,5. Vse izmerjene vrednosti pH razen pH kostanjevega medu so znotraj tega območja, kar je razvidno iz tabele 3.



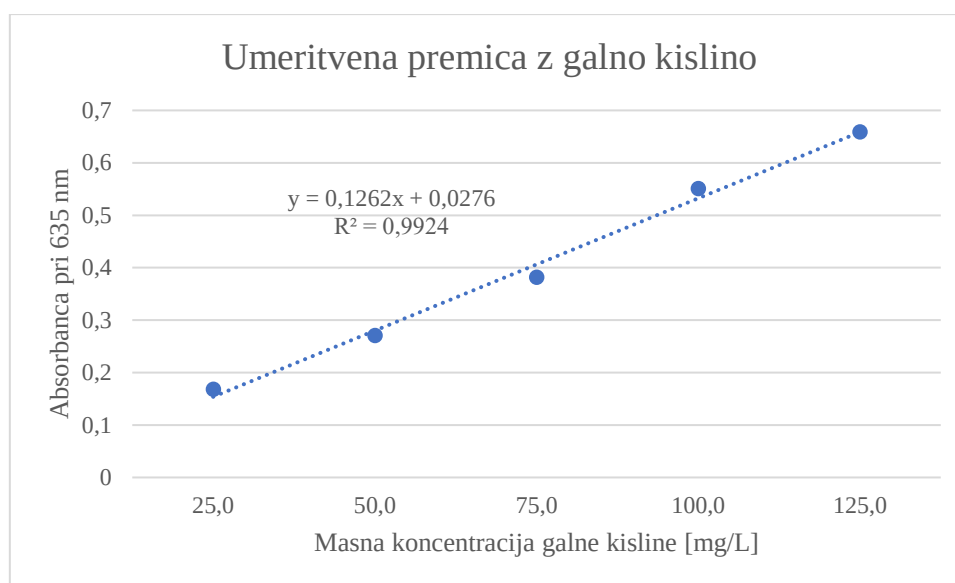
Graf 1: pH vrednosti posameznih vrst medu

4.2 Določanje skupnih fenolov

4.2.1 Umeritvena krivulja

Tabela 4: Podatki za umeritveno krivuljo za določitev skupnih fenolov

Masna koncentracija galne kisline (mg/L)	25,0	50,0	75,0	100,0	125,0
Absorbanca pri 635 nm ($\pm \dots\%$)	0,168	0,271	0,382	0,551	0,659



Graf 2: Umeritvena premica z galno kislino

Enačba premice je $y = 0,1262x + 0,0276$, kjer x predstavlja koncentracijo in y absorbanco.

$$\text{koncentracija} = \frac{A - 0,0276}{0,1262} \times \text{redčitveni faktor}$$

Korelacijski faktor (R^2) je **0,9924**.

4.2.2 Določanje skupnih fenolov v vzorcih medu

Tabela 5: Absorbanca vzorcev pri valovni dolžini 635 nm

Vzorec	Absorbanca pri $\lambda = 635$ nm ($\pm \dots\%$)
1	0,208
2	0,362
3	0,333
4	0,325
5	0,627

Primer izračuna koncentracije skupnih fenolov:

$$\text{koncentracija (vzorec 1)} = \frac{0,208 - 0,0276}{0,1262} \times 10 = 14,37 \frac{\text{mg GAE}}{\text{kg}}$$

Tabela 6: Koncentracija skupnih fenolov v posameznih vzorcih medu

Vzorec	Koncentracija skupnih fenolov v mg GAE/kg
1	14,37
2	26,30
3	24,20
4	23,57
5	47,50

Iz Tabele 6 je razvidno da je bila občutno največja vrednost skupnih fenolov v medicinskem medu in sicer 47,50 mg galne kisline na kilogram medu. Sledijo mu kostanjev med z 26,30 mg GAE/kg, ajdov med z 24,20 mg GAE/kg in hojev med z 23,57 mg GAE/kg. Najmanj skupnih fenolnih spojin pa je vseboval žajbljev med in sicer 14,37 mg GAE/kg.

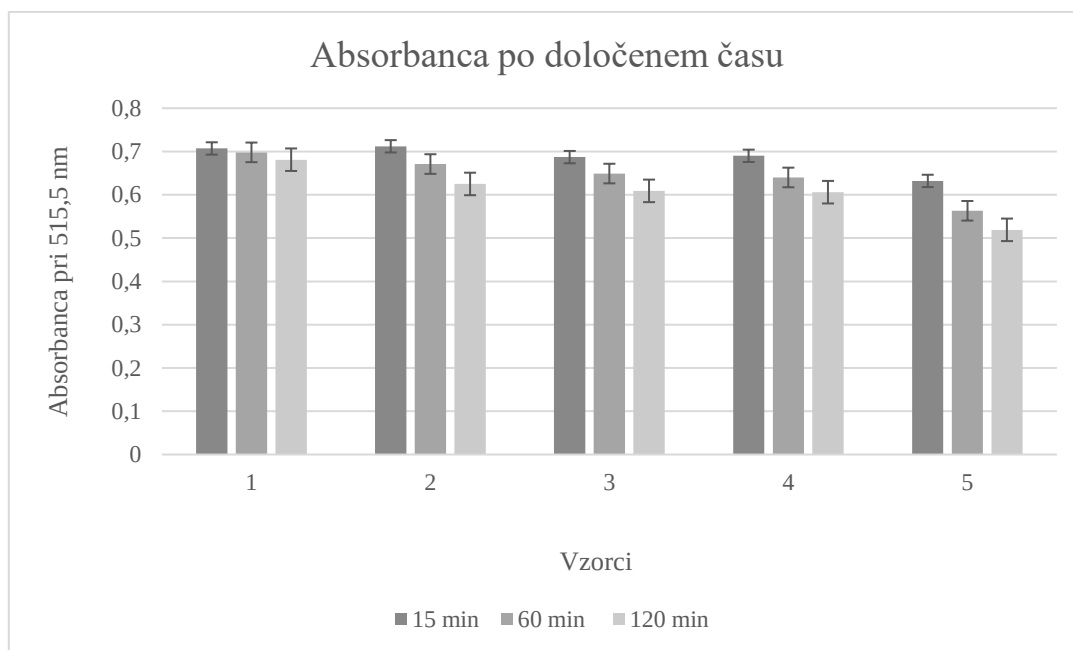


Graf 3: Koncentracije skupnih fenolnih spojin za posamezno vrsto medu

4.3 Antioksidativne lastnosti vzorcev medu

Tabela 7: Absorbanca posameznih vzorcev pri valovni dolžini 515,5 nm po določenem času

Vzorec	Absorbanca pri 515,5 nm po določenem času [min] (± 1 min)		
	15	60	120
1	0,707	0,698	0,681
2	0,712	0,671	0,625
3	0,687	0,649	0,609
4	0,690	0,640	0,606
5	0,632	0,563	0,519
slepi vzorec	0,78	0,74	0,71



Graf 4: Absorbanca posameznih vzorcev pri valovni dolžini 515,5 nm po določenem času

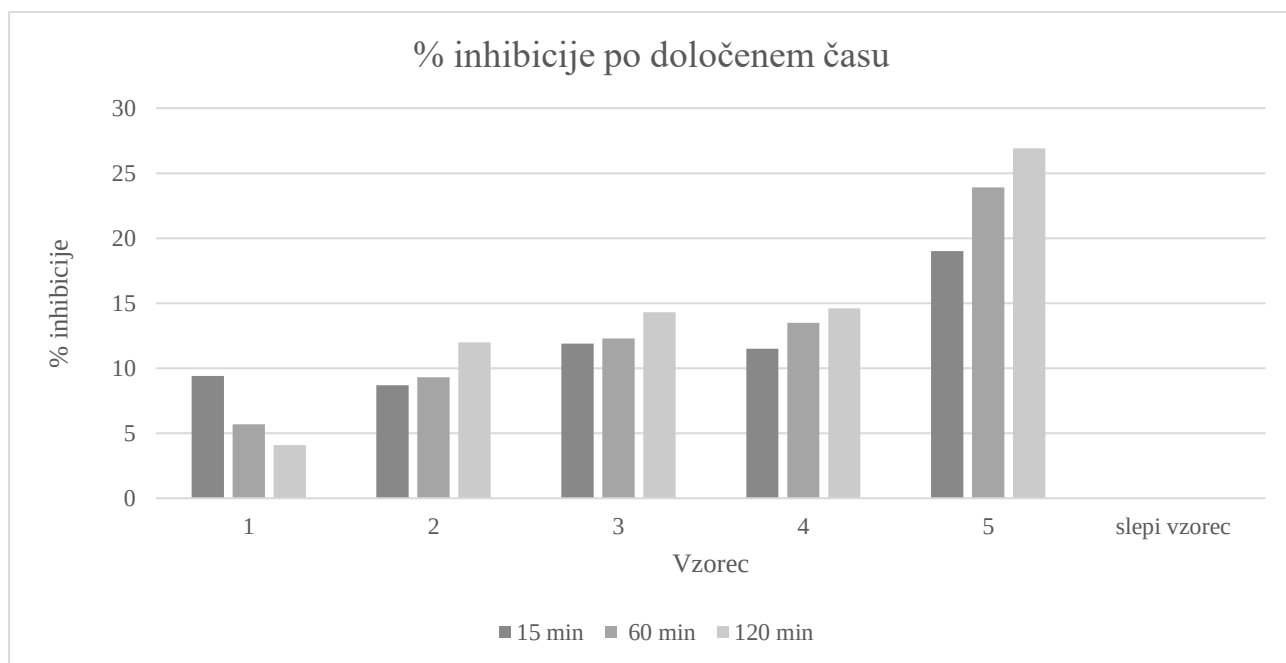
Antioksidativne učinkovitosti so bile izračunane kot odstotek inhibicije DPPH po spodnjem primeru:

$$\% \text{ inhibicije (vzorec 1 po 15 min)} = \left[\frac{0,78 - 0,707}{0,78} \right] \times 100 = 9,4\%$$

Tabela 8: Izračunane vrednosti % inhibicije za posamezno vrsto medu po določenem času

Vzorec	% inhibicije po določenem času		
	15 min	60 min	120 min
1	9,4	5,7	4,1
2	8,7	9,3	12,0
3	11,9	12,3	14,2
4	11,5	13,5	14,6
5	19,0	23,9	26,9
slepi vzorec	0	0	0

V Tabeli 8 je prikazana antioksidativna učinkovitost [%] po 15, 60 in 120 minutah. Antioksidativna učinkovitost je v povprečju naraščala po naslednjem vrstnem redu: žajbelj < kostanj < ajda < hoja < medicinski med. Antioksidativna učinkovitost izražena kot odstotek inhibicije je s časom naraščala pri vseh medovih razen pri žajbljevem medu.



Graf 5: Vrednosti % inhibicije za posamezno vrsto medu po določenem času

4.4 Določitev pH vrednosti, vsebnosti skupnih in prostih kislin ter laktonov

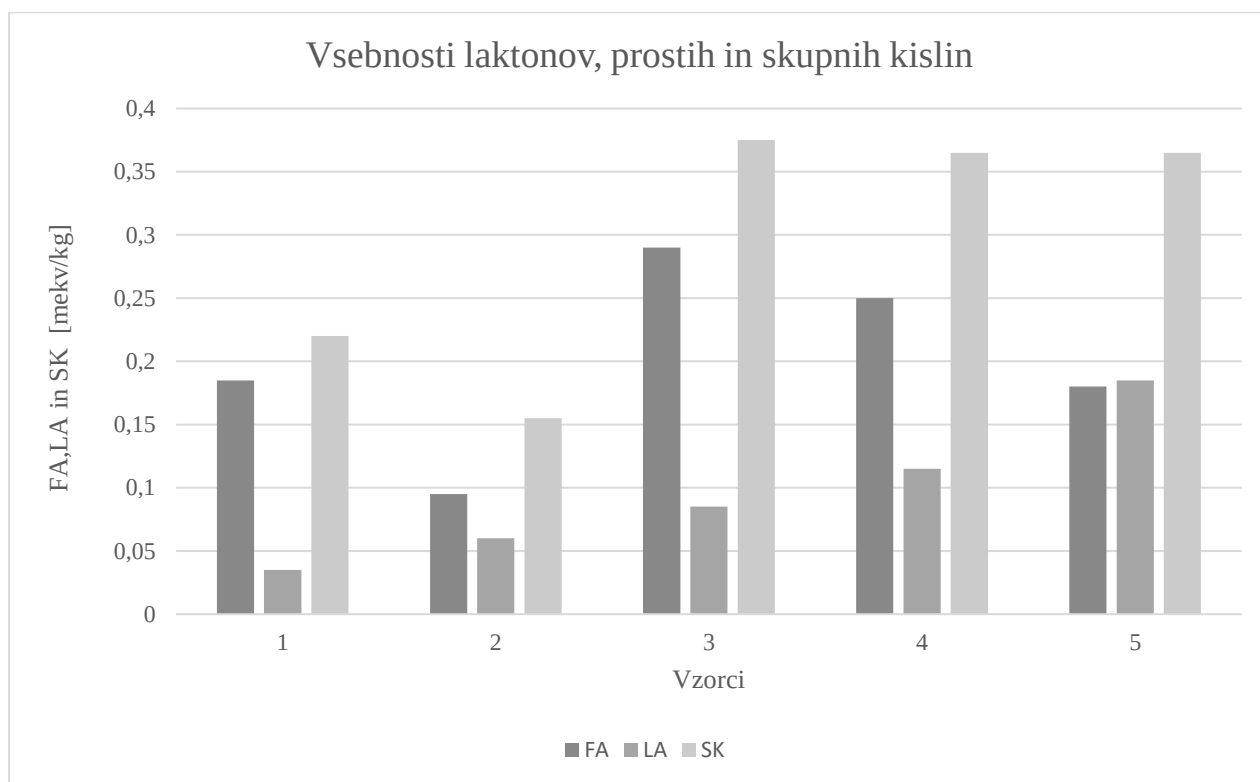
Tabela 9: Porabljene količine NaOH in HCl za določitev vsebnosti skupnih in prostih kislin ter laktonov

Vzorec	poraba NaOH [mL]	poraba HCl [mL]
1	3,8	9,3
2	2,0	8,8
3	5,9	8,3
4	5,1	7,7
5	3,7	6,3
slepi vzorec	0,1	/

Tabela 10: Vsebnosti laktonov, prostih in skupnih kislin

Vsebnost [mekv/kg]	Vzorec				
	1	2	3	4	5
FA	18,5	9,5	29,0	25,0	18,0
LA	3,5	6,0	8,5	11,5	18,5
SK	22,0	15,5	37,5	36,5	36,5

Iz Tabele 10 lahko razberemo da je vsebnost laktonov največja v medicinskem medu, kateremu sledijo hojev med, ajdov med, kostanjev med in z najmanj laktoni žajbljev med. Vsebnost prostih kislin je bila največja v ajdovem medu, ki mu sledijo hojev med, žajbljev med, medicinski med in z daleč najmanj prostimi kislinami še kostanjev med. Naši rezultati ustrezajo pravilniku o medu, ki pravi, da vrednost prostih kislin ne sme presegati 50 mekv/kg. Največjo vsebnost skupnih kislin je imel ajdov med in sicer 37,5 mekv/kg. Sledita mu hojev in medicinski med z popolnoma enako vrednostjo 36,5 mekv/kg, na predzadnjem mestu je žajbljev med z 22,0 mekv/kg. Vsebnost skupnih kislin je bila najmanjša pri kostanjevem medu in sicer le 15,5 mekv/kg.



Graf 6: Vsebnosti laktonov, prostih in skupnih kislin

4.5 Antimikrobni učinek različnih vrst medu na ustno mikrobioto

Naredili smo 10 antibiogramov s po štirimi vzorci medu v enem. Za vsak med smo naredili 8 paralel, vsakemu uspelemu vzorcu smo trikrat izmerili premer nastale inhibicijske cone. Za obe kontroli smo naredili 5 vzorcev in prav tako vsakemu trikrat izmerili premer. Nato smo iz vseh meritev za en med izračunali povprečni premer inhibicijske cone za posamezno vrsto medu. Enako smo storili za obe kontroli.

Tabela 11: Povprečni premer inhibicijske cone z standardno deviacijo za posamezno vrsto medu

	vrsta medu					vrsta kontrole	
	žajbelj	kostanj	ajda	hoja	medicinski	Penicilin P1	glukoza
povprečni premer inhibicijske cone [mm]	13,98	28,53	15,04	28,06	23,36	11,52	0
standardna deviacija	1,21	2,38	1,06	2,40	1,34	4,63	0

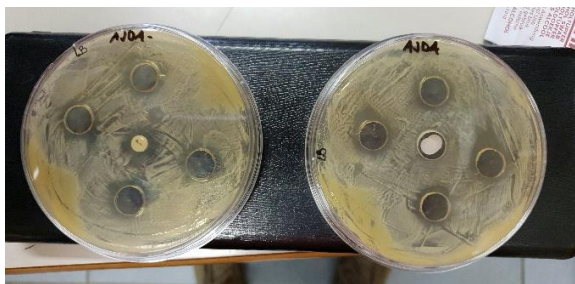
Iz Tabele 11 je razvidno, da imata kostanjev in hojev med najboljši antimikrobni učinek na bakterije ustne sluznice. Sledi jima medicinski med, dosti slabši antimikrobni učinek pa sta imela žajbljev in ajdov med. V Excelu smo izračunali standardno deviacijo.



Slika 4: Inhibicijske cone žajbljevega medu (lasten vir)



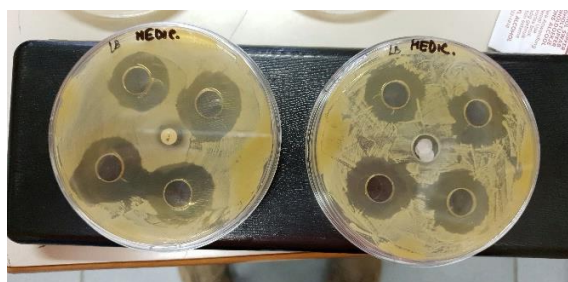
Slika 5: Inhibicijske cone kostanjevega medu (lasten vir)



Slika 6: Inhibicijske cone ajdovega medu (lasten vir)



Slika 7: Inhibicijske cone hojevega medu (lasten vir)



Slika 8: Inhibicijske cone medicinskega medu (lasten vir)

Na slikah so prikazani antibiogrami posameznih vrst medu. Vidimo, da imata kostanjev (Slika 6) in hojev (Slika 8) med imata največji premer inhibicijske cone, kar pomeni, da imata tudi najboljši protimikrobni učinek. Sledi jima medicinski med (Slika 9) z manjšim premerom inhibicijske cone. Občutno manjši premer inhibicijske cone pa imata žajbljev (Slika 5) in ajdov (Slika 7) med, torej tudi manjši protimikrobni učinek. Vsi medovi so bolj protimikrobno učinkoviti kot kontrole.

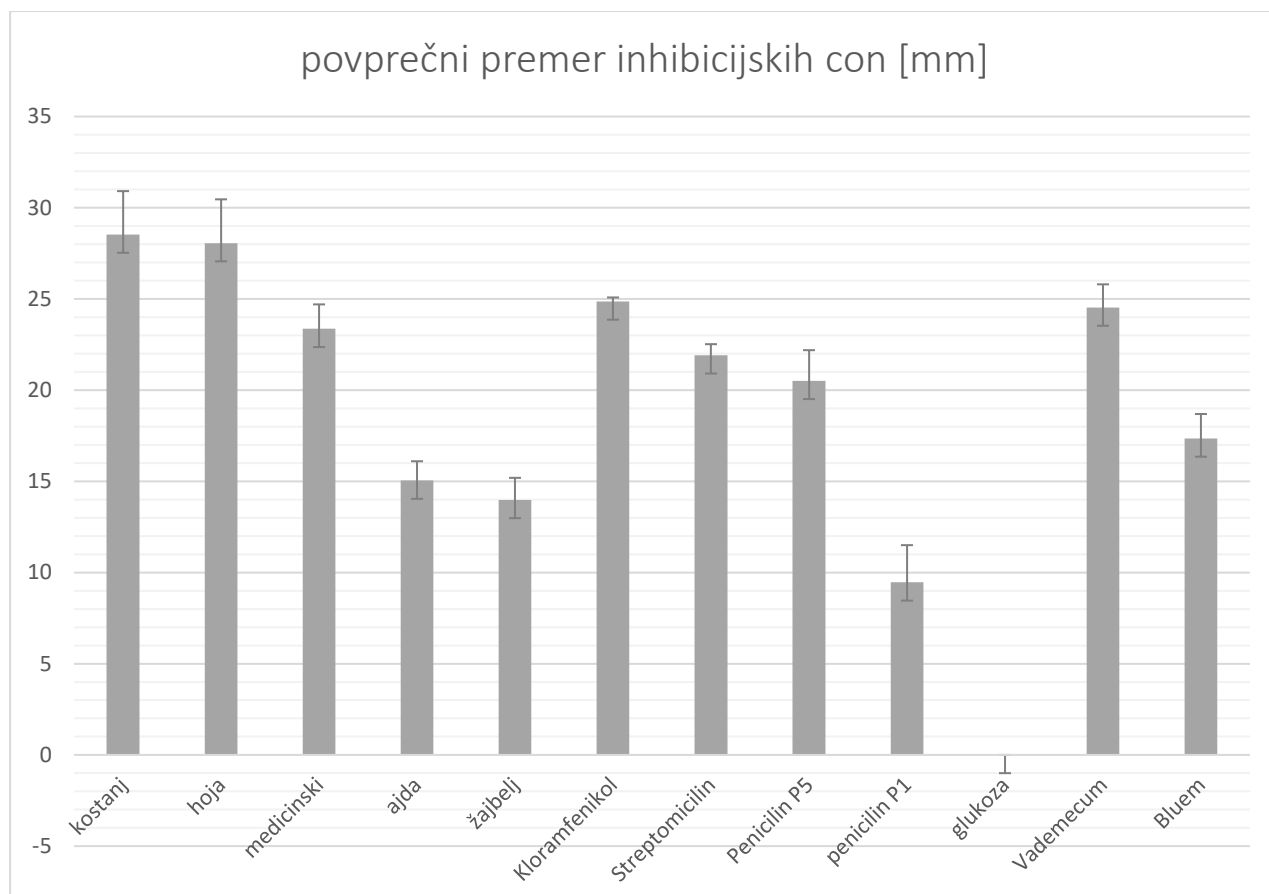
4.6 Antimikrobni učinek zobnih past na ustno mikrobioto

Zobni pasti sta bili testirani na 6 antibiogramih, s po štirimi vzorci zobnih past v enem. Za vsako zobno pasto smo naredili 12 paralelnih nanosov. Naredili smo tudi antibiogram s štirimi (-) kontrolami (antibiotičnimi diski), s po enim vzorcem za vsakega (premer za penicilin P1 je bil upoštevan v povprečju v Tabeli 11). Vsakemu vzorcu smo trikrat izmerili premer inhibicijske cone. Nato smo iz vseh meritev za posamezno zobno pasto in antibiotik izračunali povprečni premer inhibicijske cone.

Tabela 12: Povprečni premer inhibicijske cone s standardno deviacijo za posamezno vrsto zobne paste in antibiotika.

	Vrsta zobne paste		Vrsta kontrole (antibiotiki)		
	Bluem	Vademecum	Penicilin P5	Streptomicilin	Kloramfenikol
povprečni premer inhibicijske cone [mm]	17,35	24,53	20,51	21,91	24,86
standardna deviacija	1,34	1,27	1,68	0,61	0,22

Iz Tabele 12 je razvidno, da ima zobna pasta Vademecum, ki ne vsebuje medu, precej večji povprečni premer inhibicijske cone in s tem tudi večji antimikrobni učinek, kot zobna pasta Bluem v kateri je med. Standardno deviacijo smo izračunali s pomočjo Excela.



Graf 7: Povprečni premer inhibicijskih con posameznih medov, kontrol in zobnih past



Slika 9: Inhibicijske cone zobne paste Bluem (lasten vir)



Slika 30: Inhibicijske cone zobne paste Vademecum (lasten vir)



Slika 11: Inhibicijske cone antibiotikov (lasten vir)

Na slikah so prikazani antibiogrami zobnih past in antibiogram z (-) kontrolami (antibiotiki). Vidimo, da ima zobna pasta Vademecum (slika 11) brez medu, veliko večje inhibicijske cone kot zobna pasta Bluem (slika 10). To pomeni, da ima tudi večji protimikrobni učinek. Vsi antibiotiki (slika12) so bolj protimikrobno učinkoviti kot zobna pasta Bluem z medom. Bolj učinkovit kot zobna pasta Vademecum brez medu je le antibiotik kloramfenikol.

5. RAZPRAVA

Med se v ljudski medicini pojavlja že dolgo časa. Zaradi njegove velike energijske vrednosti in zdravilnih lastnosti so ga cenili in uporabljali že v davnih časih. Naši predniki so z izkušnjami in opazovanjem ter testiranjem odkrili antiseptične, dietetične, krepčilne, pomirjevalne, odvajalne, in diuretične lastnosti medu ter jih izkoriščali za zdravljenje številnih bolezni (Mihelič, 1984). Raznovrstna uporaba medu in njegovi učinki so vzpodbudili znanstvenike, da so rezultate ljudske medicine preverili tudi podrobno z znanstvenimi raziskavami. Sodobna medicina potrjuje rezultate ljudske medicine in na novo odkriva učinke zdravljenja in preprečevanja bolezni s pomočjo čebeljih pridelkov. Množično zanimanje uporabnikov vseh starosti ter tudi zdravnikov dokazuje resnično uporabnost in vrednost čebeljih izdelkov.

V znanstveni literaturi mnogo člankov dokazuje protibakterijsko učinkovitost medu proti številnim anaerobnim in aerobnim, po Gramu pozitivnim in negativnim bakterijam, vendar na področju njegove klinične rabe ostaja še veliko neraziskanega in nepotrjenega. Med že pri nizkih koncentracijah zaradi svoje antibakterijske učinkovitosti ustavi rast najpomembnejših škodljivih bakterijskih vrst, ki okužujejo rane. Postal je sestavni del številnih oblog in mazil za sodobno oskrbo ran, ima pa tudi velik potencial pri zdravljenju ran ter razjed na ustni sluznici, s svojim antibakterijskim učinkom in delovanjem preprečuje številne okužbe v ustni votlini (Molan, 2001).

Protibakterijsko delovaje medu je posledica kombinacije različnih dejavnikov v medu. Najpomembnejši so: visoka vsebnost sladkorjev, encima glukoza oksidaze, kisel pH in prisotnost protibakterijskih komponent, ki izvirajo iz rastlin na katerih čebele nabirajo cvetni prah. Velik delež sladkorjev ustvari plazmolizo bakterijskih celic. Glukoza oksidaza oksidira glukozo pri čemer se tvori glukonska kislina, vzporedno pa nastaja vodikov peroksid, ki deluje bakteriocidno. Za protibakterijsko delovanje so zaslužne tudi neperoksidne spojine, povezane z rastlinskim izvorom medu. K temu prispeva tudi kisel pH, saj je neugoden za rast bakterijskih celic (Molan, 1992). Na antimikrobno delovanje medu torej vpliva tudi vrsta rastline in posledično tudi vrsta medu, kar potrjuje prvi del naše prve hipoteze.

V raziskovalni nalogi smo za določanje antibakterijske učinkovitosti medu uporabili metodo difuzije na trdem gojišču z difuzijskimi antibiogrami. Metoda temelji na vnosu medu v vdolbinico na agarju, inokuliranim z brisom iz zob. Med inkubacijo med iz začetne točke

nanosa pronica v agar in v okolici, kjer je njegova koncentracija še dovolj velika, prepreči rast bakterijske kulture. To se pokaže kot čisto območje okoli vdolbinice, ki mu pravimo inhibicijska cona. Večji kot je premer inhibicijske cone bolj antibakterijsko učinkovit je med.

Podržaj (2011) je v svoji raziskavi ugotovila največjo antimikrobno učinkovitost kostanjevega, hojevega in repičnega medu za različne bakterijske vrste iz ust. Naši rezultati se s tem ujemajo, saj sta bila na mikrobe ustne sluznice najbolj učinkovita kostanjev in hojev med, ki sta imela povprečni premer inhibicijskih con več kot 28 mm. Malo manj učinkovit je bil medicinski med, ki je imel povprečni premer inhibicijskih con 23,36 mm. Občutno manjši povprečni premer inhibicijskih con pa sta imela ajdov in žajbljev med in s tem smo dokazali, da sta tudi najmanj antimikrobno učinkovita. To nasprotuje drugemu delu naše prve hipoteze, saj naj bi žajbelj del svojih zdravilnih lastnosti ohranjal tudi v cvetnem prahu in nektarju ter bil zaradi tega med antimikrobno učinkovitejšimi medovi, vendar to očitno ni pogoj. Naredili smo tudi kontrolo z različnimi antibiotiki, ki so bili vsi manj učinkoviti kot kostanjev in hojev med. S tem smo dokazali, da ima med s svojim antimikrobnim učinkom in delovanjem res velik potencial za preprečevanje ter morda tudi za zdravljenje številnih okužb v ustni votlini.

Mateja Gaber Žveplan (2013) je v svoji raziskavi potrdila, da temnejši medovi vsebujejo več skupnih fenolnih spojin in so bolj antioksidativno učinkoviti. Flavonoidi so v vodi topne fenolne spojine, ki so zelo razširjene v rastlinah in imajo več funkcij. So rastlinski pigmenti, ki dajejo rdečo, rumeno in modro barvo cvetovom in plodovom. Zaradi tega lahko potrdimo korelacijo med temno barvo medu in veliko vsebnostjo fenolnih spojin. Iz vira prav tako vemo, da je tudi antioksidativna učinkovitost povezana z barvo medu, saj je barva medu odvisna od prisotnih pigmentov (karotenoidov in flavonidov), ki imajo antioksidativne lastnosti. Naši rezultati potrjujejo teorijo. Najvišjo vrednost fenolnih spojin in največjo antioksidativno učinkovitost smo določili pri temnejših medovih. Najbolj antioksidativno učinkovit je bil hojev med (14,5%), sledi mu ajdov med (14,2%) ter kostanjev med (12,0%). Žajbljev med (4,1%) po rezultatih izstopa, kar lahko pripisujemo njegovi svetlejši barvi. Prav tako je koncentracija skupnih fenolnih spojin višja pri temnejših medovih. Na prvo mesto uvrščamo kostanjev med (26,30 mg GAE/kg), na drugem mestu je ajdov med (24,20 mg GAE/kg) in na tretjem hojev med (23,57 mg GAE/kg). Žajbljev med spet izstopa z manjšo koncentracijo skupnih fenolov (14,37 mg GAE/kg), kar še dodatno potrди našo hipotezo. Pri obeh meritvah pa izstopa medicinski med, kar je dokaj razumljivo, glede na to, da to ni le med, ki ga pridelajo čebele, ampak je farmacevtsko izboljššan in predelan produkt.

Socha in sod. (2011) so ugotovili močno povezavo med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo. Pravijo, da na večjo antioksidativno učinkovitost vplivajo v glavnem fenolne spojine. Manjši delež pa prispevajo tudi ostale spojine, kot so askorbinska kislina, tokoferol, karotenoidi in prolin.

Perna in sod. (2012) določili le zmerno povezavo med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo. Naši rezultati le delno potrjujejo našo hipotezo. Res je da je medicinski med z največ skupnimi fenolnimi spojinami (47,50 mgGAE/kg) najbolj antioksidativno učinkovit (26,9%). Prav tako je tudi žajbljev med z najmanj skupnimi fenoli (14,37 mg GAE/kg) najmanj antioksidativno učinkovit (4,1%). Ajdov med s tretjo največjo vrednostjo skupnih fenolov (24,20 mg GAE/kg) je tudi po antioksidativni učinkovitosti na tretjem mestu (14,2%). Kostanjev med, ki ima drugi največ skupnih fenolnih spojin (26,20 mg GAE/kg), je komaj na četrtem mestu po antioksidativni učinkovitosti (12,0%). Hojev med pa je na četrtem mestu po skupnih fenolnih spojinah (23,57 mg GAE/kg) in ima drugo največjo antioksidativno učinkovitost (14,6%). Naša raziskava ne potrjuje popolnoma naše tretje hipoteze, ki pravi da je med z več skupnimi fenoli tudi bolj antioksidativno učinkovit. Kljub manjšim odstopanjem so rezultati primerljivi s podatki iz literature, odstopanja bi lahko pripisali manj natančnim meritvam. Vsekakor pa smo dokazali, da je antioksidativna učinkovitost medu res posledica vsebnosti skupnih fenolnih spojin.

Med vsebuje različne organske kisline, kot so očetna, maslena, citronska, mravljična, mlečna in druge. Medu dajejo značilen okus in aromo ter vplivajo na antioksidativno in antimikrobno lastnost (Gaber Žveplan, 2013). Vrednost pH smo merili z relativno natančnim merilnikom, ki je pri vseh vrstah testiranega medu pokazal kislost, nižjo od 6,5. Najvišjo vrednost je imel kostanjev (6,29), najnižjo pa ajdov med (4,75). Med vsebuje več vrst kislin in razne fenolne spojine, od fenolov do flavonoidov, ki so po kislosti šibke kisline (Gaber Žveplan, 2013). Kombinacije teh dveh skupin snovi so različno kisle, pH variira od 3,2 do 6,5. To so tudi pričakovane vrednosti pH medu. Na pH medu vpliva še količina vodikovega peroksida, ki ima sicer nevtralen pH, vendar vpliva na kislost medu. Poleg tega imajo medovi iz mane v povprečju več fenolnih spojin in mineralnih snovi, pa tudi več kislin in več vodikovega peroksida zaradi pomanjkanja encima katalaze. Med zorenjem medu, se v določenem času lahko zniža pH vrednost medu zaradi daljšega delovanja encima glukoza oksidaza, ki iz glukoze izdeluje kisline, stranski produkt pa je vodikov peroksid. Občutno se poveča količina prostih kislin v medu, količina fenolnih spojin pa ostaja bolj ali manj nespremenjena (Kozlar, 2007).

Da so v medu različne kombinacije fenolnih spojin in raznih kislin, tako anorganskih kot organskih, je že jasno. Osnova za to je že pH vrednost. Mikroorganizmi večinoma najbolje uspevajo v nevtralnem ali rahlo bazičnem okolju. Izjeme so nekatere bakterije, ki se prilagodijo na ekstremne pogoje, tako bazične kot kisle. Poleg tega so različne vrste odporne na določene tujke iz okolja, ki jih v svojo notranjost ne sprejemajo ter se tako obvarujejo pred tujki, tudi fenolnimi spojinami. Rastline namreč fenolne spojine uporabljajo za obrambo pred bakterijami, nekaj teh spojin pa se prenese tudi v med. Fenolne spojine imajo sposobnost razgrajevati in naluknjati celično membrano bakterijskih celic. Lahko delujejo tudi v sinergiji s sintetičnimi antibiotiki in čeprav mehanizem ni znan, je najverjetnejša teorija ta, da, ko delujejo v kombinaciji z antibiotikom, onemogočijo iztočne črpalke bakterij, ki bi brez prisotnosti fenolnih spojin antibiotik izčrpale iz bakterije in s tem organizem obvarovale pred uničenjem. Ta sinergija sicer ne velja vedno, saj lahko bakterije čez čas razvijejo odpornost na fenolno spojino (Wiki FKKT UL, 2020).

Največjo vsebnost skupnih kislin je imel ajdov med (37,5 mekv/kg), najnižja pa je bila pri kostanjevem medu (15,5 mekv/kg). Daleč največ fenolnih spojin ima medicinski med (47,5 mg GAE/kg), najmanj pa žajbljev (14,37 mg GAE/kg). Na tej točki je treba upoštevati tudi dejstvo, da je gozdni med iz mane dodatno učinkovit tudi zaradi večje vsebnosti vodikovega peroksida. To je razvidno tudi iz rezultatov, saj ima kostanjev z največjo antimikrobno učinkovitostjo, najmanj skupnih kislin. Vrednost pH je višja, ker je peroksida z nevtralnimi pH sicer več kot kislin, a je prav zaradi te velike količine peroksida med toliko bolj učinkovit. Hojev med ima več skupnih kislin kot kostanjev med, čeprav imata oba približno enako količino fenolnih spojin. Pri cvetličnem medu je podobno. Žajbelj ima manj skupnih kislin in fenolnih spojin. Ajdov med ima višje vrednosti preizkušenih sestavin kot kostanjev, a je njegov učinek manjši. Medicinski med vsebuje veliko fenolnih spojin, skoraj dvakrat več od kostanjevega, kljub domnevnemu izvoru (bil naj bi kostanjev). V prvem je koncentracija fenolnih spojin večja kot v drugem. Drugače je z njegovim vplivom na razvoj bakterij. V primerjavi s kostanjevim medom ima medicinski med manjši premer inhibicijskih con. Tako smo ugotovili, da neposredne povezanosti med antimikrobnim učinkom in skupnimi fenolnimi spojinami in kislinami ni. S tem smo ovrgli našo zadnjo hipotezo. Antimikrobni učinek medu je najverjetneje posledica vsebnosti vodikovega peroksida v medu, le ta pa je pogojen s količino encima glukoza oksidaza. Fenolne spojine najbrž imajo vpliv na antimikrobno delovanje medu, vendar vse med njimi niso bakteriocidne. Posameznih antimikrobno delujočih flavonoidov v našem šolskem

laboratoriju nismo določili, saj bi za to potrebovali specifično opremo. Tako fenolne spojine in skupne kisline najbrž vplivajo ali pomagajo pri antimikrobnem delovanju, a le ob prisotnosti določenih encimov, ki delujejo v določenih pogojih. Medicinski med vsebuje največ skupnih fenolov in ima veliko skupnih kislin, njegov antimikrobni učinek pa je povprečen. Bil je namreč steriliziran, s čimer so najverjetneje uničili večino encimov v njem. Visoka vrednost skupnih fenolnih spojin pa bi lahko bila posledica dodanih sintetičnih fenolov.

Z našo raziskovalno nalogo smo se trudili doseči večjo prepoznavnost medu ne samo kot živila, ampak tudi kot zdravila in uporabne sestavine produktov na področju ustne higiene. S testiranjem dveh izdelkov za nego ust smo poskušali dokazati učinkovitost medu na mikroorganizme v ustih s tem, da smo zobno pasto s vsebnostjo medu primerjali z običajno, ki pa je vsebovala različne fluoride. Zaradi tega je bila sicer učinkovitejša, vendar vpliva fluoridov na učinkovitost ne moremo zanemariti.

S podrobnejšo analizo medu bi lahko preverili njegovo učinkovitost na več posameznih vrst patogenih mikrobov v ustih. Prav tako bi lahko določili vrsto in količino vsebnosti flavonoidov in encimov, kar pa v šolskem laboratoriju ni bilo mogoče. Določene flavonoide bi lahko testirali na določeno ustno bakterijsko kulturo in tako pridobili točne informacije o posameznih učinkih. To iztočnico bi predlagali v nadaljnjih raziskavah o medu, saj bi kot naravno živilo in hkrati učinkovina vkomponirana v prodajni produkt, lahko bil bolj izkoriščen v namene lajšanja težav ali preventive v ustih.

6. ZAKLJUČEK

V raziskovalno nalogo smo vključili 4 vrste slovenskega medu ter medicinski med, prav tako pa tudi dve vrsti zobne paste, eno z medom in eno brez.

Z eksperimenti smo vsem vzorcem medu določali pH, vsebnost skupnih fenolnih spojin, antioksidativne lastnosti, vsebnost laktonov ter prostih in skupnih kislin. Čisto vsem vzorcem, tudi zobnima pastama, pa smo določali še antimikrobno delovanje na ustno mikrobioto. Namen je bil ugotoviti njihovo učinkovitost.

Ugotovili smo, da vrsta medu vpliva na njegov antimikrobni učinek in dokazali, da je bil največji pri kostanjevem in hojevem medu.

Prav tako smo dokazali, da količina skupnih fenolnih spojin vpliva na barvo medu, ne pa popolnoma tudi na antioksidativno učinkovitost.

Rezultati kažejo, da je pH odvisen tudi od vsebnosti skupnih kislin in skupnih fenolnih spojin. Ugotovili smo, da neposredne povezave med antimikrobnim delovanjem medu in vsebnostjo skupnih kislin in skupnih fenolnih spojin v njem ni.

Med se v zdravstvu že uporablja, vendar njegova prisotnost ostaja v dokaj majhni meri. Zato predlagamo nadaljnje raziskave na področju učinkovanja medu v medicini. S podrobnejšimi raziskavami bi bilo na podlagi naše raziskovalne naloge mogoče izdelati produkte za higieno ustne votline z vsebnostjo medu, ki bi morda lahko nadomestil razne učinkovine v pastah in ustnih vodica.

7. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Med je v zadnjem času tarča številnih kritik, ki obtožujejo slovenske čebelarje, da v slovenski med, na katerega smo vedno bili ponosni, dajejo prepovedane antibiotike, ki so prepovedani že 20 let. Odkrili so jih pri treh čebelarjih, ki so svoj med prodajali tovarni Medex. Vzorce so odkrili še pred vstopom v proizvodnjo in uničili več kot tri tone medu. Antibiotiki naj bi se v medu znašli zaradi poskusa preprečevanja hude gnilobe čebelje zalege (Lozar & Tjaša, 2019). V naših vzorcih antibiotiki naj ne bi bili prisotni, vendar pa so naprave in kemikalije v srednješolskem laboratoriju nezadostne in premalo natančne za preizkus vsebnosti antibiotikov, zato ne moremo biti prepričani. Vseeno pa je iz različnih poročil jasno, da je velika večina slovenskega medu povsem varna.

Varno smo eksperimentalno delo v šolskem laboratoriju opravljali tudi mi. Vzorce smo v skladu s pravili zavrgli, sterilizirali in v vseh primerih ravnali po predpisih.

Z našo raziskavo želimo vzpodbuditi uporabo medu kot ekološko zdravilo, ki je okolju nenevarno, a je lahko učinkovito antimikrobno sredstvo. Želeli bi vplivati na farmacevtska podjetja, da razvijejo linije prodajnih produktov za ustno higieno, v katero bi vkomponirali antimikrobno najučinkovitejši med, ki bi učinkovito deloval na patogene mikroorganizme v ustih in zobeh in hkrati ugodno vplival na celice in telo ter ne onesnaževal okolja v katerem živimo.

BIBLIOGRAFIJA

- Abram, V. (2000). *Antioksidativno delovanje flavonoidov. Antioksidanti v živilstvu*. Ljubljana: Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Odd. za živilstvo.
- Ahčin, J. (2015). *Preverjanje parametrov kakovosti hojevega medu*. Ljubljana: Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, odd. za živilstvo.
- Aljadi, A., & Kamuruddin, M. (2004). *Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. Food chemistry*.
- Babit, d. c. (15. januar 2020). *Babit, dental center*. Pridobljeno iz Karies - zobna gniloba: <https://www.babit.si/karies-zobna-gniloba/>
- Bertoncelj, J. (2008). *Identifikacija in vsebnosti nekaterih antioksidantov v slovenskem medu*. Ljubljana: Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Bodi eko. (29. januar 2020). Pridobljeno iz Propolis - spoznajte njegove zdravilne lastnosti: <https://www.bodieko.si/propolis>
- Bogdanov, S., Lullmann, Martin, Ohe, v. d., Russmann, Vorwohl, . . . Ivanov. (1999). *Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Honey Commission. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 90: 108-125*.
- Božnar A., S. J. (1998). *Od čebele do medu*. Ljubljana: Kmečki glas.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutrition Significance. *Nutrition Reviews, Volume 56, Issue 11*, 317-333.
- Cesar, M. (2018). *Čigav je Teran?* Maribor: II. gimnazija Maribor.
- Cold Spring Harbor Protocols*. (11. december 2020). Pridobljeno iz LB Agar recipe: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/3/pdb.rec11683.full>
- Dragaš, A. Z. (1996). *Oralna bakteriologija*. Ljubljana: DZS.
- Gaber Žveplan, M. (2013). *Antioksidativna učinkovitost slovenskega medu v povezavi z nekaterimi fizikalno kemijskimi parametri*. Ljubljana : Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo.

- Goljat, A. (2007). *Med*. Ljubljana: ČZD Kmečki glas.
- Kaiser, J. (2012). *Vsebnost fenolnih splojin in antioksidativni učinek ekstrata oljnih pogač bele gorjušice in lanu*. Ljubljana: Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo.
- Kapš, P. (1998). *Med in zdravje*. Novo mesto: Založba Erro.
- Korošec, M. (2012). *Določitev fizikalnih in kemijskih parametrov za ugotavljanje pristnosti medu*. Ljubljana: Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Kovačič, M. (15. januar 2020). *Mirjam Kovačič, dr. dent. med.* Pridobljeno iz Kaj je karies - zobna gniloba in kako se ga obvarovati?: <https://www.zobozdravstvo.com/blog/objava/kaj-je-karies-zobna-gniloba-in-kako-se-ga-obvarovati-.html>
- Kozlar, S. (2007). *Vpliv letnika na vsebnost sladkorjev in kislin v medu*. Ljubljana: Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo.
- Lapanje, A., & Rijavec, T. (2019). *Mikrobiota ustne votline - Human oral microbiome*. Ljubljana: Institut Jožefa Stefana, Odsek za znanosti o okolju.
- Lozar, S., & Tjaša, D. (5. November 2019). *24ur.com*. Pridobljeno iz Nova medena afera: v medu odkrili sledi prepovedanih antibiotikov: <https://www.24ur.com/novice/slovenija/nova-medena-aferra-v-medu-odkrili-sledi-prepovedanih-antibiotikov.html>
- Lužar. (27. januar 2020). *Čebelarstvo Lužar*. Pridobljeno iz O medu: <https://www.cebelarstvo-luzar.si/o-medu>
- mag. Dejan Židan, Minister za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. (14. januar 2011). *Uradni list RS*. Pridobljeno iz Pravilnik o medu: <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2011-01-0104?sop=2011-01-0104>
- Maln.* (28. januar 2020). Pridobljeno iz Med : <https://maln.eu/med/>
- Mihelič, S. (1984). *Čebele in čebelji proizvodi v preteklosti*. Ljubljana: Založba Centralnega zavoda za napredek gospodinjstva.

- Molan, P. (1992). *The antibacterial activity of honey. Variation in the potency of antibacterial activity.*
- Molan, P. (2001). *Potential of honey to promote oral wellness.* General Dentistry.
- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Sofo, A., & Gambacorta, E. (2012). *Metal content of southern Italy honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity.* International Journal of Food Science and Technology.
- Plut, S. (27. januar 2020). *Čebelarska zveza Slovenije.* Pridobljeno iz Med: <http://www.czs.si/content/C21>
- Podržaj, S. (2011). *Protibakterijska učinkovitost različnih vrst medu na paradontopatogene bakterije in ustne streptokoke.* Ljubljana: Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, enota medoddelčnega študija mikrobiologije.
- Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Galkowska, D., Fortuna, T., & Witczak, T. (2011). *Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys.* International Journal of Food Science and Technology.
- Stankovič, K. (2016). *Karakterizacija manj znanih vrst slovenskega medu.* Ljubljana: Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, odd. za živilstvo.
- Tosama. (20. december 2020). Pridobljeno iz Vivamel tuba medicinski med, steril 20 g: https://www.tosama.si/104_Medicinski-izdelki/oskrba-rane2/i_1194_vivamel-tuba-medicinski-med-steril-20-g-1-kos
- Turk, M. (2012). *Mikrobiologija, gradivo za vaje.* Ljubljana: Odd. za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univ. v Ljubljani.
- Vela, L., Kolayli, S., & A.O., S. (2010). *Antioxidant and antimicrobial activity of different floral origins of honey from Turkey.* Journal of Food Biochemistry.
- Wiki FKKT UL. (2. februar 2020). Pridobljeno iz Delovanje rastlinskih fenolnih spojin na bakterije: http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Delovanje_rastlinskih_fenolnih_spojina_na_bakterije
- Žnidar, E. (29. januar 2020). *Bodi eko.* Pridobljeno iz Čebelji vosek in njegova uporaba skozi zgodovino: <https://www.bodieko.si/cebelji-vosek-in-njegova-uporaba>

PRILOGE

Tabela 13: Izmerjene vrednosti premera inhibicijskih con zobnih past in kontrol

Vrsta zobne paste		Vrsta kontrole		
Bluem	Vademecum	Penicilin P5	Streptomicilin	Kloramfenikol
PREMER INHIBICIJSKE CONE (mm)				
16,49	24,28	21,42	22,55	24,82
17,32	23,92	18,57	21,34	24,66
17,31	24,85	21,53	21,85	25,1
15,64	26,15			
15,87	26,06			
16,26	25,89			
15,85	25,8			
13,94	24,11			
15,13	23,7			
18,46	25,56			
17,27	25,35			
19,86	25,27			
17,6	24,03			
17,22	23,89			
17,05	23,17			
15,86	25,41			
17,24	24,97			
15,2	24,88			
19,17	25,28			
18,07	24,23			
19,1	23,67			
17,48	23,25			
17,45	24,14			
17,51	23,97			
18,67	26,08			
19,12	26,65			
18,87	28,21			
18,07	23,87			
17,98	22,8			
17,67	22,14			
16,76	22,88			
16,25	23,69			
17,04	23,4			
18,21	23,82			
18,74	22,94			
18,94	24,64			
17,35	24,53	20, 51	21,91	24,86

Tabela 14: Izmerjene vrednosti premera inhibicijskih con medov in kontrol

vrsta medu					vrsta kontrol	
žajbelj	kostanj	ajda	hoja	medicinski	penicilin P1	glukoza
PREMER INHIBICIJSKE CONE (mm)						
15,27	26,43	15,04	26,45	22,86	6,79	0
15,06	28,6	14,46	26,57	21,76	6,16	
14,38	29,49	15,98	26,43	22,66	7,01	
16,89	34,06	15,05	25,41	25,07	12,75	
15,92	26,92	14,46	26,14	26,36	12,23	
16,64	29,35	15,71	26,35	22,36	10,27	
13,86	28,21	16,42	28,39	25,43	10,93	
14,26	30,92	14,88	26,06	24,11	9,32	
13,65	29,45	15,79	27,44	23,1	9,31	
13,3	25,54	15,03	28,82	23,34	9,78	
12,48	25,97	14,32	28,41	24,29	9,95	
13,54	27,46	15,01	28,67	22,34	9,02	
14,03		14,64	31,08	20,44	19,4	
13,1		14,19	34,36	23,65	20,22	
13,49		14,48	30,26	23,23	19,59	
13,94		14,78		22,98		
14,05		15,04		23,9		
13,71		17,58		22,44		
12,92		14,28		24,83		
13,6		13,54		22,48		
12,67		14,34		22,97		
13,15		17,76				
13,6		14,34				
12,11		13,72				
13,9842	28,53	15,04	28,06	23,36	11,52	0