

**Letno poročilo aplikativne raziskave
Karakterizacija čebeljih pridelkov ter vpliv postopkov obdelave in shranjevanja
cvetnega prahu na njegovo kemijsko in mikrobiološko sestavo**

za leto 2018

v skladu z Uredbo o izvajanju programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v
letih 2017-2019 (Uradni list RS, 73/16)

Izvajalec:
Čebelarska zveza Slovenije
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (podizvajalec)
Erico d.o.o. (podizvajalec)
Intertek GmbH (podizvajalec)

Lukovica, julij 2018

Naslov: Letno poročilo aplikativne raziskave

**Karakterizacija čebeljih pridelkov ter vpliv postopkov obdelave in shranjevanja
cvetnega prahu na njegovo kemijsko in mikrobiološko sestavo**

Naročnik: REPUBLIKA SLOVENIJA,
MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO, GOZDARSTVO IN
PREHRANO
Dunajska cesta 22
1000 Ljubljana

Oznaka pogodbe: POGODBA št. 2330-17-000096

Izvajalec: Čebelarska zveza Slovenije
Brdo pri Lukovici 8
1225 Lukovica

Podizvajalci: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (BF), (podizvajalec)
Erico d.o.o., Velenje (podizvajalec)
Intertek GmbH, Nemčija (podizvajalec)

Vodja projekta: dr. Peter Kozmus
Skrbnica pogodbe: mag. Andreja Kandolf Borovšak (ČZS)

Sodelavci: Nataša Lilek, Boštjan Noč, Jure Justinek, Aleš Bozovičar, Nataša Klemenčič
Štrukelj, Maja Lončar, ČZS
dr. Jasna Bertoncelej, dr. Mojca Korošec, dr. Emil Zlatič, dr. Helena Abramovič,
dr. Sonja Smole Možina, Katarina Šimunović, BF
mag. Andrej Glinšek, Biserka Gračner, Darja Dimec, Vlasta Landekar, ERICO
dr. Martin Schubert, Intertek

Avtorji poročila: Andreja Kandolf B., Nataša Lilek, dr. Jasna Bertoncelej (BF), dr. Mojca
Korošec (BF), Nataša Klemenčič Štrukelj

Rezultati so nastali v okviru Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih
2017-2019, ki je bil financiran iz sredstev državnega proračuna in proračuna Evropske unije.

Lukovica, 19.7.2018

Boštjan Noč, predsednik ČZS

1	UVOD.....	8
1.1	CILJ APLIKATIVNE RAZISKAVE	8
2	PREGLED OBJAV O CVETNEM PRAHU.....	9
2.1	SESTAVA CVETNEGA PRAHU	10
2.1.1	Vsebnost vode v cvetnem prahu	11
2.1.2	Vsebnost beljakovin v cvetnem prahu	12
2.1.3	Vsebnost maščob v cvetnem prahu.....	12
2.1.4	Vsebnost ogljikovih hidratov v cvetnem prahu	12
2.1.5	Vsebnost pepela v cvetnem prahu	13
2.1.6	Vsebnost polifenolnih spojin v cvetnem prahu.....	13
2.1.7	Mikrobiološka slika cvetnega prahu	15
2.2	PRIDOBIVANJE CVETNEGA PRAHU.....	16
2.2.1	Smukalniki	17
2.3	SUŠENJE IN STARANJE CVETNEGA PRAHU	19
2.4	STANDARDIZACIJA CVETNEGA PRAHU	20
2.5	POVZETEK OPRAVLJENEGA DELA V LETU 2017.....	21
3	MATERIAL IN METODE	22
3.1	KARAKTERIZACIJA IN VPLIV POSTOPKOV OBDELAVE IN SHRANJEVANJA CVETNEGA PRAHU NA NJEGOVO KEMIJSKO IN MIKROBIOLOŠKO SESTAVO	22
3.1.1	Zbiranje vzorcev in načrt dela	22
3.1.2	Metode določanja parametrov cvetnega prahu	24
3.2	SPREMLJANJE EKONOMIČNOSTI SMUKANJA V ZUNANJEM OZIROMA NOTRANJEM SMUKALNIKU	27
3.2.1	Statistična analiza	28
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1	KEMIJSKA SESTAVA CVETNEGA PRAHU	29
4.2	MIKROBIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA CVETNEGA PRAHU IZ RAZLIČNIH GEOGRAFSKIH REGIJ SLOVENIJE.....	30
4.3	MIKROBIOLOŠKA ANALIZA CVETNEGA PRAHU, HRANJENEGA V HLADILNIKU	32
4.4	MIKROBIOLOŠKA ANALIZA CVETNEGA PRAHU, SUŠENEGA PRI 35 °C IN 40 °C	34

4.5	VSEBNOST SKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJIN	37
4.6	SPREMLJANJE EKONOMIČNOSTI SMUKANJA V ZUNANJEM OZIROMA NOTRANJEM SMUKALNIKU	39
5	ZAKLJUČEK.....	41
6	VIRI.....	43
7	PREGLED OBJAV O MATIČNEM MLEČKU	46
7.1	KAJ JE MATIČNI MLEČEK?	47
7.2	LASTNOSTI SVEŽEGA MATIČNEGA MLEČKA.....	47
7.2.1	Senzorične značilnosti svežega matičnega mlečka.....	47
7.3	SESTAVA MATIČNEGA MLEČKA.....	48
7.3.1	Voda.....	49
7.3.2	Beljakovine	49
7.3.3	Ogljikovi hidrati.....	50
7.3.4	Pepel.....	50
7.3.5	Vrednost pH in vsebnost kislin v matičnem mlečku	51
7.3.6	Maščobe	51
7.3.7	Pelod	53
7.3.8	Lastnosti slovenskega matičnega mlečka	53
7.4	SKLADIŠČENJE MATIČNEGA MLEČKA.....	54
8	MATERIAL IN METODE	55
8.1	ZBIRANJE VZORCEV	55
8.2	ANALIZE MATIČNEGA MLEČKA	56
8.2.1	Pelodna analiza (Piana in sod., 2006)	56
8.2.2	Fizikalno-kemijske analize	56
9	REZULTATI IN RAZPRAVA	59
9.1	PELOD V MATIČNEM MLEČKU	59
9.2	FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI	60
9.3	VSEBNOST SLADKORJEV	62
9.4	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA.....	64
9.5	IZBRANI FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI SKLADIŠČENIH VZORCEV 65	
10	ZAKLJUČEK.....	67
11	VIRI.....	68
12	PREGLED OBJAV O PROPOLISU	72

12.1	NASTANEK IN NALOGA PROPOLISA	73
12.2	SESTAVA PROPOLISA.....	73
12.2.1	Flavonoidi	74
12.2.2	Fenolne spojine	74
12.2.3	Terpenoidi	74
12.2.4	Druge snovi.....	74
12.3	VRSTE PROPOLISA	75
12.4	LASTNOSTI PROPOLISA	76
12.5	PRIDOBIVANJE PROPOLISA	77
13	MATERIAL IN METODE	78
13.1	NAČRT ZBIRANJA VZORCEV	78
13.2	ANALIZA PROPOLISA	79
14	REZULTATI IN RAZPRAVA	79
14.1	SENZORIČNA OCENA IN IZVOR OSNOVNE SUROVINE	79
14.2	VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN.....	80
15	ZAKLJUČEK.....	80
16	VIRI.....	82

KAZALO SLIK

Slika 1:	Primer zunanjega smukalnika za cvetni prah.....	18
Slika 2:	Primer notranjega smukalnika cvetnega prahu (foto: B. Borštnik)	18
Slika 3:	Vzorčenje in obdelava vzorcev	24
Slika 4:	Po namestitvi smukalnikov cvetnega prahu (notranji smukalniki) Tip 3	28
Slika 5:	Nameščeni zunanji smukalniki in pobiranje cvetnega prahu v zunanjih smukalnikih.....	28
Slika 6:	Grafični prikaz zbranih rezultatov mikrobiološke analize cvetnega prahu iz različnih geografskih regij Slovenije.....	31
Slika 7:	Zmanjšanje števila mikroorganizmov, shranjenih v hladilniku 2 tedna (2 t), 1 mesec (1 m) in 3 mesece (3 m) prikazano v % s standardnim odklonom.	33
Slika 8:	Redukcija števila mikroorganizmov pri procesu sušenja pri 40 °C, prikazana v % redukcije. Graf prikazuje povprečne vrednosti in standardne odklone.	36
Slika 9:	Redukcija števila mikroorganizmov pri procesu sušenja pri 35 °C, prikazana v % redukcije. Graf prikazuje povprečne vrednosti in standardne odklone.	36
Slika 10:	Tehtanje dnevnega donosa cvetnega prahu.....	40
Slika 11:	Matični mleček.....	48
Slika 12:	Kemijska struktura 10-HDA (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012).	52
Slika 13:	Spekter peloda analiziranih vzorcev matičnega mlečka (N=12)	60
Slika 14:	Propolis pridobljen na namensko vstavljenih pripomočkih.....	72

Slika 15: Povprečna sestava propolisa	75
Slika 16: Vzorci propolisa.....	78

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Analize čebeljih pridelkov v sklopu aplikativne raziskave	8
Preglednica 2: Kemijska sestava cvetnega prahu (Campos in sod., 2008)	10
Preglednica 3: Predlog za standardizacijo kemijske sestave posušenega cvetnega prahu-osmukanca (Campos in sod., 2008; Bogdanov, 2012).....	20
Preglednica 4: Seznam vzorcev po oznakah in statističnih regijah.....	22
Preglednica 5: Načrt izvajanja kemijskih analiz	23
Preglednica 6: Kemijska sestava cvetnega prahu osmukanca, pridobljenega v različnih regijah Slovenije (g/100 g svežega vzorca).....	29
Preglednica 7: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, plesni, kvasovk in koliformnih bakterij prikazano v enotah, ki tvorijo kolonije, <i>angl.</i> colony forming units na 1 gram vzorca (CFU/g) cvetnega prahu.	30
Preglednica 8: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov (mo), plesni, kvasovk in koliformnih bakterij prikazanih kot povprečno število CFU/g vzorca D1 cvetnega prahu s standardnim odklonom (SD), svežega vzorca cvetnega prahu ter vzorcev, shranjenih v hladilniku 2 tedna (2t), 1 mesec (1m) in 3 mesece (3m).....	32
Preglednica 9: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov (mo), plesni, kvasovk in koliformnih bakterij prikazanih kot povprečno število CFU/g vzorca K1 cvetnega prahu s standardnim odklonom (SD), svežega vzorca cvetnega prahu ter vzorcev, shranjenih v hladilniku 2 tedna (2t), 1 mesec (1m) in 3 mesece (3m).....	32
Preglednica 10: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov (mo), plesni, kvasovk in koliformnih bakterij prikazanih kot povprečno število CFU/g vzorca H1 cvetnega prahu s standardnim odklonom (SD), svežega vzorca cvetnega prahu ter vzorcev, shranjenih v hladilniku 2 tedna (2t), 1 mesec (1m) in 3 mesece (3m).....	32
Preglednica 11: Zmanjšanje števila mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih bakterij v vzorcih cvetnega prahu shranjenih v hladilniku 2 tedna (2t), 1 mesec (1m) in 3 mesece (3m) prikazanih v % kot povprečje in standardni odklon.....	33
Preglednica 12: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih bakterij prikazano v enotah, ki tvorijo kolonije, <i>angl.</i> colony forming units na 1 gram vzorca (CFU/g) cvetnega prahu D1-17, svežega ter sušenega pri 35 °C in 40 °C in shranjenega 3 dni, 5 mesecev (5m) in 1 leto (1l). Prikazane so povprečne vrednosti s pripadajočim standardnim odklonom (sd).	34
Preglednica 13: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih bakterij prikazano v enotah, ki tvorijo kolonije, <i>angl.</i> colony forming units na 1 gram vzorca (CFU/g) cvetnega prahu K1-17 svežega ter sušenega pri 35 °C in 40 °C in shranjenega 3 dni, 5 mesecev (5m) in 1 leto (1l). Prikazane so povprečne vrednosti s pripadajočim standardnim odklonom (sd).	34

Preglednica 14: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih bakterij prikazano v enotah, ki tvorijo kolonije, <i>angl.</i> colony forming units na 1 gram vzorca (CFU/g) cvetnega prahu H1-17, svežega ter sušenega pri 35 °C in 40 °C in shranjenega 3 dni in 5 mesecev (5m). Prikazane so povprečne vrednosti s pripadajočim standardnim odklonom (sd).....	35
Preglednica 15: Zmanjšanje števila mikroorganizmov v vzorcih cvetnega prahu, posušenih pri 35°C in shranjenih 3 dni, 5 mesecev in 1 leto, prikazano v % zmanjšanja s pripadajočim standardnim odklonom.....	35
Preglednica 16: Zmanjšanje števila mikroorganizmov v vzorcih cvetnega prahu posušenih pri 40°C in shranjenih 3 dni, 5 mesecev in 1 leto prikazano v % zmanjšanja s pripadajočim standardnim odklonom.....	36
Preglednica 17: Vsebnost skupnih polifenolnih spojin v vzorcih cvetnega prahu izraženo kot mg galne kisline na gram suhe snovi cvetnega prahu (mg GK/g s.s.) in AOP izvlečkov izraženo kot koncentracija polifenolnih spojin v reakcijski zmesi, ki za 50 % zniža začetno vsebnost radikala DPPH• (EC ₅₀). Rezultati so podani kot povprečna vrednost najmanj treh ponovljenih analiz.	37
Preglednica 18: Povprečne vrednosti mesečnega donosa cvetnega prahu, moči, števila odkrite in pokrite zalege, zaloge medu ter zaloge cvetnega prahu v plodišču v mesecu avgustu 2017.	39
Preglednica 19: Povprečne vrednosti mesečnega donosa cvetnega prahu, moči, števila odkrite in pokrite zalege, zaloge medu ter zaloge cvetnega prahu v plodišču v mesecu maju 2018. ..	40
Preglednica 20: Povprečne vrednosti mesečnega donosa cvetnega prahu, moči, števila odkrite in pokrite zalege, zaloge medu ter zaloge cvetnega prahu v plodišču v mesecu juniju 2018. .	41
Preglednica 21: Sestava svežega matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009; ISO, 2016)	48
Preglednica 22: Minimalne, zakonsko predpisane vrednosti 10-HDA v matičnem mlečku v različnih državah	52
Preglednica 23: Vzorci matičnega mlečka, analizirani v programskem letu 2018	55
Preglednica 24: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz slovenskega matičnega mlečka programskega leta 2018	61
Preglednica 25: Vsebnost sladkorjev v slovenskem matičnem mlečku	63
Preglednica 26: Maščobnokislinska sestava slovenskega matičnega mlečka	64
Preglednica 27: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz slovenskega matičnega mlečka po skladiščenju	66
Preglednica 28: Vsebnost sladkorjev v slovenskem matičnem mlečku po skladiščenju	67
Preglednica 29: Seznam vzorcev propolisa.....	78
Preglednica 30: Rezultati senzorične ocene posameznih vzorcev	79
Preglednica 31: Vsebnost posameznih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih propolisa.	81

1 UVOD

Poleg medu so primarni čebelji pridelki cvetni prah, matični mleček in propolis. Sestava teh pridelkov je bolj kot sestava medu odvisna od okolja in tehnologije pridelave. Zaradi funkcionalnih lastnosti in s tem koristnosti uporabe čebeljih pridelkov v humani prehrani se njihova poraba povečuje, s tem pa tudi možnost, da se na naših prodajnih policah znajdejo čebelji pridelki vprašljive kakovosti in porekla. Ker v Sloveniji, z izjemo medu, še nimamo izdelane karakterizacije čebeljih pridelkov, morebitnih potvorb cvetnega prahu, matičnega mlečka in propolisa ne moremo prepoznati in jih odpraviti, zato se pojavlja potreba, da se izdelajo osnovni kriteriji kakovosti slovenskega cvetnega prahu, matičnega mlečka in propolisa, hkrati pa se podajo navodila za pridelavo in predelavo cvetnega prahu.

1.1 CILJ APLIKATIVNE RAZISKAVE

Cilji aplikativne raziskave karakterizacije čebeljih pridelkov ter vpliv postopkov obdelave in shranjevanja cvetnega prahu na njegovo kemijsko in mikrobiološko sestavo:

- v pisni obliki izdelati bazo podatkov, ki vključuje zbrane podatke po posameznem analiziranem vzorcu cvetnega prahu, matičnega mlečka in propolisa s povprečnimi, minimalnimi in maksimalnimi vrednostmi;
- glede na pridobljene rezultate izdelati priporočila čebelarjem za obdelavo in shranjevanje cvetnega prahu,
- podati rezultate o učinkovitosti smukanja v zunanjem oziroma notranjem smukalniku.

Glede na programsko nalogo omenjene aplikativne raziskave (priloga 1) je v čebeljih pridelkih potrebno opraviti različne analize in ugotoviti vpliv staranja in shranjevanja na sestavo cvetnega prahu ter matičnega mlečka (preglednica 1).

Preglednica 1: Analize čebeljih pridelkov v sklopu aplikativne raziskave

Čebelji pridelek	Vrsta analiz
CVETNI PRAH	Vsebnost vode, beljakovin, maščob, pepela, skupnih polifenolov in mikrobiološka slika Vpliv obdelave in shranjevanje cvetnega prahu
MATIČNI MLEČEK	Vsebnost vode, pepela, beljakovin, maščob, 10-hidroksi-2-decenojske kisline (10-HDA), sladkorjev, pelodna analiza, vrednost pH, kislost, maščobnokislinska sestava Vpliv staranja matičnega mlečka
PROPOLIS	Vsebnost skupnih flavonoidov

2 PREGLED OBJAV O CVETNEM PRAHU

Cvetni prah ali pelod je osnova spolnega razmnoževanja rastlin (Kandolf, 2008). Pelod vsebuje moške oplojevalne celice rastlin (Bogdanov, 2012). Značilen je za vsako posamezno cvetočo rastlinsko vrsto in je nekakšen prstni odtis vsake rastline, zaradi česar je edinstven. Nastaja v štirih podolgovatih pelodnih vrečkah t.i. prašnici, ki je spodnji, razširjeni del cvetnega organa prašnika. Ko prašnica dozori se odpre in na prašnikovo površino se sprosti na milijone pelodnih zrn. Cvetovi rastlin vsebujejo različno število zrn cvetnega prahu. Tako kot so različne tudi rastline so različna tudi zrnca cvetnega prahu. Razlikujejo se po obliki, barvi in velikosti. Glede na velikost pelodnih zrn je tudi različen način opráševanja (Kandolf, 2008).

Opráševanje rastlin poteka na več načinov. Tiste rastline, ki jih oprášuje veter, imenujemo vetrocvetke. Pelod vetrocvetk je drobnejši lažji in suh, zaradi česar ga lahko prenaša veter. Rastline, oprášene s pomočjo oz. posredovanjem žuželk, pa imenujemo žužkocvetke. Zrnca peloda žužkocvetk so hrapava, lepljiva, med seboj se sprijemajo in oprijemajo žuželk. Vetrocvetke imajo večje količine pelodnih zrn kot žužkocvetke. Žužkocvetke imajo zelo različno oblikovane cvetove, zato so tudi med rastlinami, ki jih oprášujejo žuželke, razlike v količini peloda (Kandolf, 2008).

Pri opráševanju žužkocvetk so izredno pomembne čebele. Sodelujejo pri opráševanju okoli 40.000 rastlinskih vrst in s svojo aktivnostjo v naravi predstavljajo nenadomestljivo vlogo pri ohranjanju biotske pestrosti in pri opráševanju različnih kmetijskih kultur (Bogdanov, 2012).

Čebela med vsakim letom v panj prinese od 16 do 24 mg cvetnega prahu (približno 3 do 4 milijone pelodnih zrn), kar predstavlja desetino njene teže. Cvetni prah nabirajo pašne čebele. Po cvetni prah lahko letijo dlje kot po nektar, saj porabijo manj časa na rastlino za nabiranje v primerjavi z nabiranjem nektarja; poleg tega pa je tovor peloda lažji kot tovor nektarja. Nekatere rastline izločajo nektar in cvetni prah v točno določenem delu dneva. Čebele si to zapomnijo in se vračajo na te rastline vsak dan ob istem času. Po navadi na enem izletu čebele nabirajo surovino samo na eni rastlini, kar se lahko ponavlja več dni (Kandolf, 2008). V času nabiranja cvetnega prahu naredi čebela delavka okoli deset izletov dnevno (Bogdanov, 2012).

Cvetni prah predstavlja za čebeljo družino glavni vir beljakovin, ki so nujno potrebne za preživetje čebel. Čebelja družina porabi na leto od 30 do 50 kg cvetnega prahu. Čebele cvetni prah potrebujejo za vzrejo zalege in za razvoj. Velike količine cvetnega prahu potrebujejo predvsem v prvih dveh tednih življenja. Cvetni prah je nepogrešljiv pri razvoju krmilnih (goltnih) žlez pri mladih čebelah, ki izločajo matični mleček, saj v nasprotnem primeru ne morejo krmiti ličink. Pomanjkanje cvetnega prahu po izleganju čebel vpliva tudi na slab razvoj voskovnih žlez. Nepogrešljiv je tudi pri razvoju trotov, saj v primeru pomanjkanja ti ne razvijejo dovolj sperme, ki je potrebna za oprášitev matice. V jesenskem času, ko se čebele pripravljajo

na prezimovanje, je cvetni prah velikega pomena za ustvarjanje maščobnih zalog in beljakovin, pomanjkanje pa je lahko tudi vzrok za nastanek bolezni (Kandolf, 2008).

Kakovost cvetnega prahu je različna od rastline do rastline. Čebele imajo nepogrešljiv nagon za ugotavljanje kakovosti oziroma hranilne vrednosti cvetnega prahu. Hranilno vrednost se ocenjuje glede na vsebnost beljakovin (Kandolf, 2008), pomembna pa je prisotnost tudi ostalih sestavin kot so aminokisliline, maščobne kisline, vitamini, itd.

Čebele nabirajo cvetni prah na različnih rastlinah, kar ima za posledico raznoliko prehrano. Čebelje družine, ki se jih uporablja za oprasevanje na velikih plantažah, zasajenih z samo eno kulturno rastlino ne zaužijejo dovolj raznolike prehrane, kar ima za posledico, da takšna prehrana ne zagotavlja vseh potrebnih hranilnih snovi za čebeljo družino. Samo nekaj monofloernih kultur je priznanih, da so po hranilni vrednosti za čebele boljše od mešanega cvetnega prahu, čeprav slabega (Brodschneider in Crailsheim, 2010).

Mešan, raznolik cvetni prah v prehrani čebel je pomemben, da ne pride do pomanjkanja esencialnih hranil, kar se lahko zgodi pri uživanju cvetnega prahu samo ene vrste. Če cvetni prah ne zagotavlja potrebnih esencialnih hranil za čebele, potem tudi uživanje večje količine takšnega cvetnega prahu ne prispeva k zagotavljanju potrebnih esencialnih hranil. V zadnjih letih je hranilni stres poleg ostalih faktorjev odgovoren za visoko umrljivost čebeljih družin (Brodschneider in Crailsheim, 2010).

2.1 SESTAVA CVETNEGA PRAHU

Med predstavlja čebelji družini vir energije, cvetni prah pa je za čebeljo družino glavni vir ostalih pomembnih hranil, kot so proteini, minerali, maščobe in ostale substance. Prisotnost teh sestavin dokazuje, da se cvetni prah lahko uporablja tudi v prehrani ljudi (Campos in sod., 2008).

Cvetni prah je lahko mešanica različnih rastlinskih pelodov, zaradi česar se razlikuje tudi vsebnost hranilnih komponent (Campos in sod., 2008).

Preglednica 2: Kemijska sestava cvetnega prahu (Campos in sod., 2008)

Glavne sestavine	Vsebnost g/100 g suhe snovi (min – maks)
Beljakovine	10-40
Maščobe	1-13
Skupni ogljikovi hidrati	13-55
Vlaknine, Pektin	0,3-20
Pepel	2-6
Nedoločljivo	2-5

Minerali, elementi v sledovih	mg/kg
Kalij (K)	4000-20000
Magnezij (Mg)	200-3000
Kalcij (Ca)	200-3000
Fosfor (P)	800-6000
Železo (Fe)	11-170
Cink (Zn)	30-250
Baker (Cu)	2-16
Mangan (Mn)	20-110
Vitamini	mg/kg
β-karoten	10-200
Tiamin (B1)	6-13
Riboflavin (B2)	6-20
Niacin (B3)	40-110
Pantotenska kislina (B5)	5-20
Piridoksin (B6)	2-7
Askorbinska kislina (vitamin C)	70-560
Biotin (H)	0,5-0,7
Folna kislina (B9)	3-10
Tokoferol (E)	40-320

Iz preglednice 2 je razvidno, da vsebnosti posameznih kemijskih spojin v cvetnem prahu zelo variirajo, razlike med minimalno in maksimalno vrednostjo so velike. Do variiranja pride najverjetneje zaradi različnega botaničnega izvora cvetnega prahu, lahko pa je tudi posledica uporabe različnih kvantitativnih metod (Campos in sod., 2010).

2.1.1 Vsebnost vode v cvetnem prahu

Voda je v cvetnem prahu naravno prisotna. V svežem cvetnem prahu je med 20-30 % vode, količina le-te pa je odvisna od rastline, vremena in načina pridobivanja cvetnega prahu (Božnar, 2011).

Vsebnost vode v cvetnem prahu je pomemben kriterij kakovosti. Velika vsebnost vode lahko poveča aktivnost mikroorganizmov in encimov, ki lahko vplivajo na spremembo senzoričnih lastnosti proizvoda (Morgano in sod., 2011).

Če je vsebnost vode v cvetnem prahu večja kot 10 %, je nevarnost, da bo pričel fermentirati (Bogdanov, 2012). Pri shranjevanju svežega cvetnega prahu na sobni temperaturi pa lahko pride do kontaminacije s plesnimi, ki lahko proizvajajo kancerogene mikotoksine.

Shranjevanje svežega cvetnega prahu mora potekati v zamrzovalniku, da se izognemo pojavu bakterij in plesni (Campos in sod., 2008). Cvetni prah moramo pred skladiščenjem sušiti, da zmanjšamo vsebnost vode v njem. Sušenje moramo izvesti pod kontroliranimi pogoji, da ne uničimo občutljivih sestavin. Preveliko zmanjšanje vsebnosti vode pa lahko vpliva na hiter

pojavnost žarkosti. Določanje vode je zelo težavno, saj se pri sušenju cvetnega prahu zaradi visoke temperature razgrajujejo organske sestavine, na katere je vezana voda, zato se izgubljajo aromatične snovi (Gergen in sod., 2006).

Pri ocenjevanju senzoričnih lastnosti cvetnega prahu so v Švici ugotovili, da cvetni prah, ki vsebuje manj kot 6 % vode, postane preveč suh in je s senzoričnega vidika manj sprejemljiv (Bogdanov, 2012).

2.1.2 Vsebnost beljakovin v cvetnem prahu

Beljakovine so najvažnejši gradbeni elementi celic, so sestavni deli encimov in hormonov, brez katerih ne bi bilo življenja. Sestavljene so iz aminokislin, standardnih, ki tvorijo beljakovine je 24. V cvetnem prahu so jih doslej določili 17. Osem od 24 aminokislin mora telo dobiti s hrano, ker jih samo ne more sintetizirati; imenujemo jih esencialne ali nezamenljive aminokisliline. Vsebnost in vrsta beljakovin se v cvetnem prahu dokaj razlikuje, vendar je pomembna ugotovitev, da vsak cvetni prah vsebuje vse esencialne aminokisliline (Kurinčič Tomšič, 2008). Prevladujejo prolin, glutaminska in asparaginska kislina, lizin in levcin (Campos in sod., 2008).

Proteini v cvetnem prahu so tudi alergeni zato se ljudem, pred uživanjem priporoča test na preobčutljivost (Bogdanov, 2012).

2.1.3 Vsebnost maščob v cvetnem prahu

V maščobni sestavi cvetnega prahu obstajajo velike razlike v povezavi z botaničnim poreklom. V večini so v cvetnem prahu zastopane predvsem polarne in nevtralne maščobe (monogliceridi, digliceridi in trigliceridi) kot tudi majhne količine maščobnih kislin in sterinov (Campos in sod., 2008). Analize cvetnega prahu s plinsko kromatografijo kažejo, da izvleček maščob iz cvetnega prahu sestavljajo predvsem linolenska, palmitinska, linolna in oleinska kislina. Nenasičene maščobne kisline predstavljajo v povprečju 70 % vseh maščobnih kislin (Campos in sod., 2008).

2.1.4 Vsebnost ogljikovih hidratov v cvetnem prahu

V večini so v cvetnem prahu prisotni polisaharidi, kot so: škrob in prehranska vlaknina (različne sestavine celične stene). Med nižje molekularnimi sladkorji predstavljajo fruktoza, glukoza in saharoza okoli 90 % vseh sladkorjev, delež pa je odvisen tudi od vrste rastline (Campos in sod., 2008). Pogosto se vsebnost ogljikovih hidratov v cvetnem prahu določi z izračunom, saj je skupna vsebnost ogljikovih hidratov težko določljiva (Bogdanov, 2012).

2.1.5 Vsebnost pepela v cvetnem prahu

Cvetni prah je zaradi mineralnih snovi in elementov v sledovih zelo cenjena hrana, lahko bi rekli popolna hrana za človeka. V cvetnem prahu so našli vse elemente v sledovih, ki so tudi v človeškem telesu (Božnar, 2011).

Med elementi je v cvetnem prahu najbolj zastopan K (okoli 60 % celotne količine mineralov), sledijo Mg (okoli 20 % celotne količine mineralov), Na in Ca (okoli 10 % celotne količine mineralov) (Campos in sod., 2008).

2.1.6 Vsebnost polifenolnih spojin v cvetnem prahu

Polifenoli so najbolj razširjeni v rastlinah in do sedaj je poznanih najmanj 8000 različnih struktur polifenolov. Poleg tega se polifenoli pojavljajo v rastlinah tudi kot sekundarni metaboliti. Fenolne spojine lahko glede na njihovo osnovno strukturo delimo na enostavne fenole ali benzokinone, fenolne kisline, naftokinone, ksantone, stilbene, flavonoide, lignane, biflavonoide, lignine, kumarine in kondenzirane tanine (Gomez-Caravaca in sod., 2006).

V rastlinskem svetu opravljajo funkcijo barvil, koencimov, odvrčal, protimikrobnih agensov in fitoaleksinov. Rastlinam dajejo karakterističen okus, prehransko vrednost, farmakološke in toksične učinke. Polifenoli se v rastlinah redko pojavijo prosti, največkrat so vezani na sladkorje, amino skupine, lipide in terpenoide (Donko, 1995).

Polifenolne spojine vsebujejo vsaj en aromatski obroč, na katerem je ena ali več hidroksilnih skupin. Prehransko so najpomembnejše fenolne kisline, flavonoidi in tanini (Abramovič, 2011).

Flavonoidi predstavljajo najbolj pomembno polifenolno skupino s poznanimi več kot 5000 različnimi flavonoidi (Gomez-Caravaca in sod., 2006). Flavonoidi so rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. Zaradi možnosti absorpcije UV svetlobe delujejo kot zaščita rastlin pred vplivi UV žarkov (Abram, 2000).

Molekula flavonoidov je sestavljena iz dveh aromatskih obročev, ki ju povezuje heterociklični obroč. Glede na položaj heterocikličnega obroča razvrstimo flavonoide v naslednje skupine: flavani, flavanoni, flavanoli ali katehini, izoflavanoni, flavoni, flavonoli, izoflavoni, halkoni in antocianidini (Abramovič, 2011).

Cvetni prah vsebuje velike količine polifenolnih spojin, v največji meri flavonoidov, kateri se lahko vedejo kot potencialni antioksidanti in so specifični za posamezno rastlinsko vrsto (Marghitas in sod., 2009; Campos in sod., 2008).

Za določitev skupnih polifenolnih spojin se tradicionalno uporablja Folin-Ciocalteujeva metoda (Gutfinger, 1981).

Študije o antioksidativni učinkovitosti cvetnega prahu kažejo na visoko sposobnost lovljenja prostih radikalov. Antioksidativno delovanje cvetnega prahu je odvisno od vsebnosti polifenolnih spojin v cvetnem prahu. V cvetnem prahu rastlin so v veliki meri prisotni flavonoidi in njihovi glikozidi in derivati cimetine kisline (Leja in sod., 2007).

Antioksidant je molekula, ki lahko upočasni ali prepreči oksidacijo drugih molekul. Oksidacija je kemijska reakcija prenosa elektrona iz ene substance na spojino, ki se oksidira (reducent). Pri oksidacijskih reakcijah lahko nastajajo prosti radikali, ki v telesu sprožijo verižne reakcije, posledice teh pa so poškodbe celic. Antioksidanti so odstranjevalci prostih radikalov, saj reagirajo s prostimi radikali in jih tako nevtralizirajo ter tako preprečijo oksidacijo drugih molekul. Antioksidanti so dostikrat reducenti, kot so tioli in polifenoli. Čeprav so oksidacijske reakcije ključne za življenje, so lahko tudi usodne, saj naj bi bili prosti radikali vzrok za celično degradacijo, ki posledično vodi v celično smrt. Nizka raven antioksidantov privede do oksidativnega stresa, ki posledično povzroča razvoj kroničnih in degenerativnih bolezni kot so rak, avtoimunske bolezni, revmatični artritis in ostale nevrogene bolezni (Campos in sod., 2010).

Prosti radikali so ioni, atomi ali molekule z vsaj enim elektronom brez para. To so visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni. Prost radikali nastajajo pri cepitvi kovalentne vezi. So rezultat normalne celične presnove (dihanje) in posledica dejavnikov okolja kot so sevanje, toplota, kajenje, uživanje alkohola, zdravil, onesnaženega okolja in nekaterih drugih dejavnikov. V organizmu zdravega človeka so antioksidanti in prosti radikali v stalnem ravnotežju (Korošec, 2000).

Če se ravnotežje med antioksidanti in prostimi radikali poruši nastane za organizem neugodno stanje, ki ga imenujemo oksidativen stres. Antioksidanti ga preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov v našem telesu (Korošec, 2000).

Za določanje antioksidativne učinkovitosti je poznanih več načinov. Metode določanja antioksidativne učinkovitosti razvrstimo v dve skupini.: testi, ki spremljajo učinek dodanega antioksidanta na napredovanje oksidacije v lipidnem sistemu in testi, kjer v modelnem sistemu merimo, kako je antioksidant sposoben učinkovati na izbrano tarčo, ki je lahko npr. radikal, kovinski ion.... (Abramovič, 2011).

Za določanje antioksidativne učinkovitosti v cvetnem prahu se uporabljajo v veliki večini modelni testi in testi, ki spremljajo napredovanje oksidacije v lipidnem sistemu.

Redukcijsko sposobnost lovljenja radikalov določamo s pomočjo Folin-Ciocalteujeve metode in z določitvijo sposobnosti redukcije ionov Fe^{3+} v ione Fe^{2+} (Abramovič, 2011).

Neposredno sposobnost antioksidanta, da lovi radikale v modelnem sistemu, ki vsebuje antioksidant določimo z vsebnostjo ulovljenih radikalov. Reakcija antioksidantov z različnimi zvrstmi radikalov je različna, zato moramo vedno upoštevati in izvesti več metod, da dobimo čim bolj celovit odgovor o antioksidativni učinkovitosti spojine. Sposobnost lovljenja radikalov vključuje naslednje metode:

- določitev sposobnosti lovljenja DPPH radikala;
- določitev sposobnosti lovljenja ABTS⁺ radikala;
- določitev sposobnosti lovljenja O₂⁻ radikala;
- določitev sposobnosti lovljenja alkilperoksilnih radikalov v sistemu emulzije.

Za celovito oceno antioksidativne učinkovitosti ter uporabnosti antioksidanta v danih matriksih živila je potrebno opraviti različne teste, ki temeljijo na različnih reakcijskih mehanizmih. Povezava med rezultati določanja antioksidativne učinkovitosti različnih metod je velikokrat šibka, saj na antioksidativno učinkovitost pogosto poleg vrste reaktanta na katerega antioksidant učinkuje, vpliva tudi izbira medija v katerem antioksidant deluje (Abramovič, 2011).

Tudi čebelji pridelki so vir potencialnih antioksidativnih lastnosti. Največ študij o antioksidativni učinkovitosti čebeljih pridelkov je bilo opravljenih na medu, propolisu in tudi cvetnem prahu, medtem ko je študij, ki so določale antioksidativno učinkovitost voska, matičnega mlečka malo.

2.1.7 Mikrobiološka slika cvetnega prahu

Mikroorganizme, ki so prisotni v cvetnem prahu, razdelimo v tri skupine. Tiste, ki jih najdemo v cvetnem prahu (to so kvasovke, plesni, bakterije, ki tvorijo spore), tiste, ki kažejo na higieno pridobivanja (koliformne bakterije in kvasovke) in tiste, ki lahko povzročijo človeške bolezni (npr. *Clostridium botulinum*) (Snowdon in sod., 1996). Poznamo pa tudi bakterijo *Paenibacillus larvae*, ki povzroča bolezen pri čebelah – hudo gnilobo, tvori spore in se lahko prenaša z medom in cvetnim prahom, ki se uporablja za hranjenje čebel.

Mikroorganizmi se lahko znajdejo v cvetnem prahu, tako da vanj pridejo iz primarnega vira. To so predvsem bakterije in kvasovke, ki pridejo iz prebavnega trakta čebel, nektarja, mane, peloda, zraka, umazanije in okolja v katerem se nahajajo čebele. Vir mikroorganizmov v prebavilih čebel je cvetni prah. Nektar vsebuje malo oz. skoraj nič bakterij.

Sekundarni vir onesnaženja cvetnega prahu z mikroorganizmi je podoben kot za vsa druga živila. To so predvsem ljudje, veter, prah, žuželke, voda, živali, neustrezen pribor, smukalniki, itd.

V cvetnem prahu je mogoče zaznati tako plesni, kvasovke kot tudi bakterije. Nekatere izmed naštetih stopajo tudi v procese pretvorbe cvetnega prahu osmukanca v izkopanec in proizvajajo določene substance, ki povečajo prebavljivost cvetnega prahu za čebele.

Prisotnost plesni v cvetnem prahu je povezana z vsebnostjo plesni v prebavilih čebel, panju, okolju, kjer čebele nabirajo cvetni prah ter neprimerno očiščenih predalčkih in smukalnih mrežicah za pridobivanje cvetnega prahu. V cvetnem prahu se lahko nahajajo rodovi: *Atichia*, *Coniothecium*, *Hormiscium* in *Triposporium*, *Acosphaera*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* in *Penicillium*. Neustrezno shranjen cvetni prah pa lahko napade tudi goba *Bettsia alvei*.

Svež cvetni prah ima veliko vsebnost vode zaradi česar predstavlja gojišče tudi za rast kvasovk, ki lahko pridejo v cvetni prah iz primarnega ali sekundarnega vira. Ob zmerni temperaturi, veliki vsebnosti kvasovk, veliki vsebnosti vode, pridobivanju cvetnega prahu v vlažnem obdobju, neustreznem shranjevanju oz. skladiščenju cvetnega prahu lahko pride do fermentacije cvetnega prahu - osmukanca. V cvetnem prahu so najpogostejše kvasovke iz rodu *Saccharomyces spp.*, *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporan*, *Nematospora*, *Schizosaccharomyces*, *Torula*, *Zygosaccharomyces*. Cvetni prah osmukanec, namenjen za prehrano ljudi, ne sme biti izpostavljen procesom fermentacije.

Cvetni prah je presno živilo, katerega se pred uživanjem ne obdeluje, zato lahko vsebuje tudi bakterije ali njihove spore kot so npr. *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Salmonella*.

Iz higienskega vidika je izredno pomembna mikrobiološka varnost, ki je eden izmed glavnih kriterijev kakovosti. Potrebno je kontrolirati mikrobiološko varnost cvetnega prahu, še posebej prisotnost patogenih bakterij in plesni. Razkuževanje cvetnega prahu z obsevanjem in kemijskimi sredstvi ni dovoljeno, saj lahko pride do toksičnih ostankov (Bogdanov, 2012).

2.2 PRIDOBIVANJE CVETNEGA PRAHU

Barviti cvetovi in opojni vonji žužkocvetk privabljajo čebele. Čebele imajo telo pokrito z dlačicami, ki se jih cvetni prah, ko čebele sede na cvet oprime. Nabrana zrnca cvetnega prahu čebele med seboj lepijo s slino, nektarjem ali medom iz medenega želodčka. Pri tem procesu ga hkrati obogatijo s svojimi encimi. Med letom se čebele očistijo, tako da cvetni prah spravijo v strukturo za prenašanje cvetnega prahu, ki se nahaja na zadnjih nožicah in se imenuje košek (Kandolf, 2008).

Takšen skupek cvetnega prahu vsebuje do 10 % nektarja, ki je nujno potreben za zlepljanje zrn peloda (Campos in sod., 2008).

Cvetni prah čebele prinesejo v panj, odložijo v celice satja, ki jih napolnijo do dveh tretjin, ostalo tretjino pa napolnijo z medom in s tem preprečijo kvarjenje cvetnega prahu. Tako shranjen cvetni prah je nedostopen kisiku, zaradi česar začne fermentirati. Razvijejo se bakterije, ki izločajo mlečno kislino, ta je značilna sestavina tako skladiščenega cvetnega prahu. Takšnemu cvetnemu prahu pravijo čebelarji tudi čebelji kruh (Kandolf, 2008). Iz celic satja ga pridobivamo tako, da ga izkopljemo, zato mu pravimo izkopanec.

Hranilna vrednost cvetnega prahu - izkopanca je za čebeljo družino višja od hranilne vrednosti osmukanca. Za večjo hranilno vrednost so odgovorni mikroorganizmi, ki izvirajo iz prebavil čebel in nektarja ter pripadajo rodu *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* ki naj bi bili vključeni pri procesu fermentacije cvetnega prahu v celicah satja, zaradi česar prispevajo k povečanju hranilne vrednosti s proizvodnjem vitaminov (Brodschneider in Crailsheim, 2010).

Pri pridobivanju izkopanca se močno poškoduje satje, zato čebelarji v veliki meri raje pridobivajo osmukanec.

Pri pridelavi in predelavi cvetnega prahu moramo zagotoviti take pogoje, da cvetni prah ni podvržen fizikalnim, kemijskim ali mikrobiološkim tveganjem onesnaženja. Tako kot za med in ostale čebelje pridelke in izdelke iz čebeljih pridelkov čebelarji pri svojem delu upoštevajo Smernice dobrih higienskih navad v čebelarstvu na načelih sistema HACCP.

2.2.1 Smukalniki

Za pridobivanje osmukanca so čebelarji izdelali posebne naprave, ki se imenujejo smukalniki. Poznamo zunanje in notranje smukalnice cvetnega prahu.

Zunanji smukalnik je naprava, ki se je namesti na vhod čebeljega panja, sestavljena iz drobnih luknjic, skozi katere se mora čebela obložena s tovorom cvetnega prahu stlačiti, če želi priti v panj. Pri tlačenju skozi drobne luknjice se ji cvetni prah osmuka z njenih nogic. Osmukana grudica cvetnega prahu pade v smukalni predalček. Ker se v Sloveniji večinoma čebelarji v AŽ panjskem sistemu so zunanji smukalniki zanje najbolj uporabi, saj panj ne potrebuje predhodne predelave. Na tržišču se najde več vrst zunanjih smukalnikov. Uporabljajo pa se lahko tudi na nakladnih panjih.



Slika 1: Primer zunanjega smukalnika za cvetni prah.

Notranji smukalnik pa se lahko namesti v vse AŽ panje, ki imajo visoko podnico, uporablja pa se tudi v nakladnih sistemih. Posebnost tega smukalnika je, da je smukalna ploščica postavljena vodoravno in v sami notranjosti panja. Čebele tako v panj hodijo po klasični poti, cvetni prah pa se jim osmuka z nožic v notranjosti panja. Do zbirnega predalčka dostopamo iz zadnje strani čebeljega panja, kar nam omogoča enostavnejše pobiranje cvetnega prahu. Na slovenskem tržišču še vedno prevladujejo zunanji smukalniki cvetnega prahu, saj so zaradi obstoječih panjev najenostavneje uporabni.



Slika 2: Primer notranjega smukalnika cvetnega prahu (foto: B. Borštnik)

Za pridobivanje cvetnega prahu so v Sloveniji dobre možnosti (Klun, 1977), ki pa jih še vedno premalo izkoriščamo. V preteklih letih je ČZS izvajala testiranje zunanjih smukalnikov z našega tržišča. Po več letih testiranja smo ugotovili, da je uporaba teh smukalnikov težavna. Večina jih je brez predhodne domače predelave težko uporabna, smukalni predalčki niso zračni, pojavlja se plesnenje in tudi donosi se razlikujejo (Lilek in sod., 2016).

V letu 2015 se je oblikovala tudi projektna skupina za razvoj prototipa smukalnika, pri katerem bi bile v večji meri odpravljene napake in težave, ki so bile zaznane med testiranjem smukalnikov iz tržišča. Razvita sta bila dva tipa zunanjih smukalnikov. Pri testiranjih sta dosegala dobre

donose v primerjavi z smukalnikom, ki se je v treh letih izkazal za najdonosnejšega, zahtevala pa sta nadgradnjo glede konstrukcije, saj se je pri prvih testiranjih ravno tako pojavljalo nabiranje kondenza in plesnenje. Po nadgradnji je bilo nabiranje kondenza in plesnenje omejeno (Lilek in sod., 2016).

2.3 SUŠENJE IN STARANJE CVETNEGA PRAHU

Cvetni prah je priporočeno sušiti v električnih sušilnikih, kjer vlaga kontinuirano izhlapeva. Maksimalna temperatura sušenja je 30 °C in mora biti čim krajša, da se izognemo izgubi vitaminov. Svež cvetni prah vsebuje med 20-30 g/100 g vode. Velika vsebnost vode je odličen medij za razvoj mikroorganizmov, kot so bakterije in plesni. Da preprečimo kvarjenje cvetnega prahu in da dosežemo maksimalno kakovost, mora biti cvetni prah pobran vsak dan in po odvzemu takoj shranjen v zamrzovalnik. Po odtajanju ga je potrebno čim prej obdelati. Obdelamo ga s sušenjem, pri čemer se vsebnost vode v cvetnem prahu zmanjša pod 10 g/100 g. V večini slovenske in tudi tuje literature se priporoča sušenje cvetnega prahu na temperaturi 40 °C, kar je po različnih objavljenih študijah previsoka temperatura (Szczesna in sod. 1995; de Melo Pereira, 2008; Dominguez-Valhondo in sod., 2011 in 2013). V raziskavi na Poljskem so ugotovili, da zamrzovanje cvetnega prahu ne povzroči nobenih očitnih kemijskih sprememb, zato zmrzovanje priporočajo, ko se cvetni prah uporablja v terapevtske namene. Uporaba liofilizacije povzroči znatno izgubo vitamina C in provitamina A, sušenje na 40 °C pa ima na kakovost cvetnega prahu najslabši vpliv (Szczesna in sod., 1995).

V študiji iz Brazilije ugotavljajo, da sušenje cvetnega prahu na 45 °C 6 ur vpliva na znatno izgubo vitamina E in β -karotena, kakor tudi provitamina A (de Melo Pereira, 2008). Španci ugotavljajo, da je zamrzovanje boljši način shranjevanja cvetnega prahu ter ohranjanja njegovih kemijskih in bioloških lastnosti v primerjavi s sušenjem v sušilniku (Dominguez-Valhondo in sod., 2011). Portugalska študija pa je pokazala, da hitro sušenje cvetnega prahu (3 krat po 45 sekund) na 50 °C v infrardeči pečici ne povzroči zmanjšanja antioksidativne aktivnosti. Če povzamemo: cvetni prah se mora sušiti na nizkih temperaturah, pri največ 30 °C, najboljša alternativa je uporaba sušenja z zamrzovanjem, vendar vpliv le tega na cvetni prah po nam znanih podatkih do sedaj še ni bil preverjen. Sušenje povzroči tudi spremembo arome cvetnega prahu (Dominguez-Valhondo in sod., 2013).

Iz Švice poročajo, da je cvetni prah iz mikrobiološkega in senzoričnega vidika obstojen do 1,5 leta, če ga hranimo na sobni temperaturi. Pod temi pogoji se njegove mikrobiološke in senzorične lastnosti ohranijo do 2 leti, v kolikor je hranjen na hladnem, suhem in temnem mestu (Bogdanov, 2003).

Cvetnemu prahu kot funkcionalnemu živilu z vplivom na zdravje daje vrednost močna antioksidativna aktivnost. Cvetni prah po enoletnem skladiščenju izgubi veliko antioksidativne

učinkovitosti (okrog 59 %) (Campos in sod., 2003). Na to izgubo po vsej verjetnosti vpliva zmanjšanje vsebnosti polifenolnih spojin, kar so ugotavljali v študiji Rzepecka-Stojko in sod. (2012).

Solomka (2001) poroča, da le shranjevanje cvetnega prahu na 0-10 °C v vakuumu omogoča, da ne pride do izgub antioksidativne učinkovitosti. V brazilski študiji so ugotovili izgubo vitamina C, E in beta karotenov za 15-20 % med skladiščenjem posušenega cvetnega prahu na sobni temperaturi po enem letu (de Melo Pereira in sod., 2008).

2.4 STANDARDIZACIJA CVETNEGA PRAHU

Cvetni prah, ki ga nabirajo čebele, je poznan kot zdravo živilo s širokim spektrom hranilnih in terapevtskih lastnosti. Trenutno na področju cvetnega prahu ni nobene standardizacije glede njegove sestave, čeprav imajo nekatere države, kot so Brazilija, Bolgarija, Poljska in Švica nacionalne standarde. Mednarodno komisijo za med (IHC) sestavlja tudi delovna skupina strokovnjakov, ki se ukvarja s cvetnim prahom (*»Bee-pollen group«*). Prizadeva si postaviti mednarodne standarde kakovosti za cvetni prah in standardizirati analize metode za analizo cvetnega prahu osmukanca (Campos in sod., 2008).

Preglednica 3: Predlog za standardizacijo kemijske sestave posušenega cvetnega prahu- osmukanca (Campos in sod., 2008; Bogdanov, 2012).

Sestavina	Vsebnost
vsebnost vode	≤ 6-8 g/100 g
vsebnost beljakovin	≥ 15 g/100 g
vsebnost skupnih sladkorjev	≥ 40 g/100 g
vsebnost maščob	≥ 1,5 g/100 g
vsebnost pepela	≤ 6 g/100 g

Nekatere države so postavile minimalne zahteve vsebnosti vode za posušen cvetni prah. V Braziliji sme posušen cvetni prah vsebovati največ 4 g/100 g, v Švici in Poljski največ 6 g/100 g, v Urugvaju največ 8 g/100 g in Bolgariji največ 10 g/100 g (Campos in sod., 2008).

Monoflorni cvetni prah vsebuje konstantno oz. bolj enakomerno sestavo biološko aktivnih snovi (Bogdanov, 2012).

Parametri, kot sta antioksidativna učinkovitost in vsebnost vitaminov, bi nujno morali biti vključeni v standardizacijo sestave cvetnega prahu, saj bi le na takšen način v prehrano vključili cvetni prah z optimalnimi lastnostmi za potrebe posameznika (Campos in sod., 2008).

2.5 POVZETEK OPRAVLJENEGA DELA V LETU 2017

Rezultati vsebnosti beljakovin, maščob, pepela in vode ter preračunane vrednosti vsebnosti skupnih ogljikovih hidratov in energijske vrednosti so bili primerljivi s preteklimi objavami kemijskih lastnosti slovenskega cvetnega prahu (Lilek in sod., 2015). Ravno tako so vrednosti z izjemo vode, ki ni bila upoštevana (analize so bile opravljene na svežem cvetnem prahu) ustrezale predlaganemu normativu kakovosti za cvetni prah, ki se uporablja v prehrani ljudi (Campos in sod., 2008).

V cvetnem prahu so bili določeni mezofilni aerobni mikroorganizmi, koliformni mikroorganizmi ter plesni in kvasovke, ki so najpogostejši kvarljivci cvetnega prahu. S postopki obdelave (predvsem sušenjem) cvetnega prahu lahko vplivamo na zmanjšanje oz. redukcijo določenih mikroorganizmov.

Med vzorci cvetnega prahu smo ugotovili tudi razlike v vsebnosti polifenolnih spojin in AOP. Vsebnost polifenolnih spojin je bila manjša pri vseh preiskovanih vzorcih, ki so bili predhodno podvrženi sušenju in pri posameznih vzorcih, ki so bili skladiščeni v hladilniku.

Pri testiranju ekonomičnosti smukalnikov smo ugotavljali, da je pobiranje cvetnega prahu veliko lažje v notranjem smukalniku, saj se do smukalnega predalčka dostopa z zadnje strani čebeljega panja. Zunanji smukalniki so bolj izpostavljeni vremenskim pojavom, ob poletnih večerih se na njih zadržujejo čebele, ki ventilirajo, kar otežuje pobiranje cvetnega prahu. Pri vseh testiranih tipih je potrebna visoka stopnja higiene, saj morebitni drobni ostanki nepobranega cvetnega prahu hitro začnejo plesneti. Boljše donosnosti za posamezni tip smukalnika v letu 2017 nismo mogli dokazati.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KARAKTERIZACIJA IN VPLIV POSTOPKOV OBDELAVE IN SHRANJEVANJA CVETNEGA PRAHU NA NJEGOVO KEMIJSKO IN MIKROBIOLOŠKO SESTAVO

3.1.1 Zbiranje vzorcev in načrt dela

V raziskavo smo vključili 14 vzorcev cvetnega prahu iz šestih statističnih regij Slovenije. Podatki o analiziranih vzorcih (oznaka, statistična regija in letnik pridelave) so zbrani v preglednici 4.

Preglednica 4: Seznam vzorcev po oznakah in statističnih regijah

Oznaka	Statistična regija	Letnik pridelave
N 1 P 17	Gorenjska	2017
OS 1 17	Osrednjeslovenska	2017
OS 2 17	Osrednjeslovenska	2017
OS 3 17	Osrednjeslovenska	2017
OS 4 17	Osrednjeslovenska	2017
OS 5 17	Osrednjeslovenska	2017
SK 1 P 17	Jugovzhodna	2017
JV 1 18	Jugovzodna	2018
GOR 1 18	Gorenjska	2018
GOR 2 18	Gorenjska	2018
ZAS 1 18	Zasavska	2018
PN 1 18	Primorsko notranjska	2018
PN 2 18	Primorsko notranjska	2018
SAV 1 18	Savinjska	2018

Na zbranih vzorcih (Preglednica 4) smo opravili analize določanja vsebnosti vode, maščob, pepela, beljakovin, preračunana je bila vsebnost skupnih ogljikovih hidratov in energijska vrednost. Določena je bila vsebnost skupnih polifenolnih spojin in mikrobiološka slika.

Na vzorcih (H1 17, D1 17, K1 17) so se izvajale analize v skladu s preglednico 5 (Staranje in obdelava cvetnega prahu). Skupaj je bilo podvrženo analizam na vsebnost skupnih polifenolnih spojin in mikrobiološko sliko dodatnih 13 vzorcev cvetnega prahu.

Preglednica 5: Načrt izvajanja kemijskih analiz

Vzorčenje 2017/2018	Število analiz	Vzorci	Opravljene analize
Karakterizacija cvetnega prahu	14	vzorci v svežem stanju iz različnih geografskih območij Slovenije	B, M, V, P, PF, MIKRO (7 vzorcev-2017; 7 vzorcev 2018)
Staranje in obdelava cvetnega prahu	3	Svež CP, hranjen v hladilniku 3 mesece	PF, MIKRO
	3	Posušen CP na 35 °C, hranjen 5 mesecev na temperaturi 16 °C	PF, MIKRO
	3	Posušen CP na 40 °C, hranjen 5 mesecev na temperaturi 16 °C	PF, MIKRO
	2	Posušen CP na 35 °C, hranjen 1 leto na temperaturi 16 °C	PF, MIKRO
	2	Posušen CP na 40 °C, hranjen 1 leto na temperaturi 16 °C	PF, MIKRO

Legenda: B-beljakovine, M-maščobe, V- voda, P-pepel, PF-skupni polifenoli, MIKRO- mikrobiološka slika.





Slika 3: Vzorčenje in obdelava vzorcev

3.1.2 Metode določanja parametrov cvetnega prahu

Določanje vsebnosti vode v cvetnem prahu

Vsebnost vode smo določili gravimetrično s sušenjem na 105 °C do konstantne mase v laboratorijskem sušilniku (običajno > 6 ur) (Metoda povzeta po SIST EN 14346: 2007).

Določanje vsebnosti beljakovin v cvetnem prahu

V vzorcih smo določili vsebnost skupnega dušika (s Kjeldahlovo metodo), ki smo jo množili s splošnim faktorjem 6,25 ($C_N \times 6.25 = C_{\text{beljakovin}}$) in tako izračunali vsebnost beljakovin.

Zatehto vzorca (približno 0,2 g) smo kuhali v mešanici žveplene kisline, salicilne kisline in katalizatorja) minimalno 2 uri pod refluxom, da nastane bistra raztopina. V raztopini smo titrimetrično določili vsebnost dušika (kot amonij), titracija z 0,1 M HCl s potenciometrično indikacijo ekvivalentne točke.

(Reference: AOAC 945.23 in 981.10, Standard ISO 11261:1996 modif.)

Določanje vsebnosti maščob v cvetnem prahu

Zatehti vzorca (približno 1 g) smo dodali HCl in hidrolizirali pod reflukso 2 uri. Nato smo prefiltrirali, preostanek na filtru posušili in ekstrahirali na Soxhlet aparaturi s petroletrom. Topilo smo odparili, posušili in gravimetrično določili vsebnost maščob.

(Reference: Fat Determination according to Weibull-Stoldt-Standard Application, No. E-416-E-816-Sox-001, Buchi, AOAC 963.15)

Določanje vsebnosti pepela v cvetnem prahu

Vsebnost pepela v cvetnem prahu smo določali gravimetrično. Določimo ga s tehtanjem suhega, ohlajenega mineralnega preostanka, po sežigu organske snovi pri 500-600 °C ob prisotnosti kisika.

(AOAC 920.181)

Določanje vsebnosti skupnih ogljikovih hidratov v cvetnem prahu

Vsebnost skupnih ogljikovih hidratov je bila določena računsko. To pomeni da od vsebnosti suhe snovi odštejemo vsebnost vode, maščob, beljakovin in pepela.

$$\text{Skupni OH (g/100 g)} = 100 - (m_{\text{vode}} + m_{\text{pepela}} + m_{\text{maščob}} + m_{\text{beljakovin}})$$

Določanje energijske vrednosti cvetnega prahu

Hranilna vrednost cvetnega prahu je bila določena računsko.

$$\text{ENERG. (kJ/100 g)} = 17 * (\text{vsebnost beljakovin} + \text{vsebnost ogljikovih hidratov}) + 37 * \text{vsebnost maščob}$$

Določanje mikrobiološke slike v cvetnem prahu

Analize so bile opravljene v 2 tehničnih ponovitvah. Pri vzorcih, pri katerih se ugotavlja vpliv staranja in shranjevanja, pa so se izvajale 3 biološke ponovitve.

Priprava matične raztopine in redčitvene vrste

Matično raztopino smo pripravili tako, da smo 10 g posameznega vzorca razredčili v 90 ml fiziološke raztopine. Vzorce smo homogenizirali v laboratorijskem homogenizatorju. Iz matične raztopine smo nadaljevali z redčitveno vrsto tako, da smo po 1 ml vsakega predhodnega vzorca prenesli v 9 ml fiziološke raztopine. Ustrezne redčitve smo nacepili na agarske plošče.

Določanje skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

Za določanje skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov smo uporabili agar PC. Plošče smo inkubirali 3 – 5 dni pri 30 °C.

Določanje skupnega števila koliformnih bakterij

Za določanje skupnega števila koliformnih bakterij smo uporabili agar VRBL, kromogeno gojišče za prepoznavanje koliformnih bakterij. Plošče smo inkubirali pri 37 °C 24 ur.

Določanje skupnega števila kvasovk in plesni

Za določanje skupnega števila kvasovk in plesni smo uporabili agar DRBC z dodatkom antibiotika kloramfenikol, selektivno gojišče za kvasovke in plesni. Plošče smo inkubirali pri 28 °C 3-5 dni.

Določanje skupnih polifenolnih spojin v cvetnem prahu in njihov antioksidativni potencial (AOP)

Skupne polifenolne spojine in AOP smo določili v izvlečkih iz cvetnega prahu, ki smo jih pripravili s pomočjo solventne ekstrakcije trdno/tekoče z uporabo topila 96 % etanol. Pri tem smo k ustrezni zatehti cvetnega prahu dodali ekstrakcijsko topilo v razmerju 1 : 3 (masa cv. prahu (g) : volumen ekstr. topila (mL)). Ekstrakcija je potekala 24 ur na stresalniku v temi pri sobni temperaturi z vmesnim tretiranjem v ultrazvočni kopeli. Po ekstrakciji smo vzorce filtrirali in filtrat centrifugirali 10 min pri 4000 obr/min. Za vsak vzorec smo opravili ekstrakcijo v najmanj v treh ponovitvah in tako pridobili za vsak vzorec cvetnega prahu najmanj tri izvlečke. Ponovljivost ekstrakcije polifenolnih spojin je bila v okviru 5 %.

Skupne polifenolne spojine smo določili v vsakem posameznem izvlečku po Folin-Ciocalteu metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981). V reakciji Folin-Ciocalteu reagenta s polifenolnimi spojinami nastane modro obarvan kompleks, ki smo ga določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 765 nm (A_{765}). Analizo smo za vsak izvleček opravili v najmanj v treh ponovitvah. Napaka določitve je manj kot 3 %. Vsebnost skupnih polifenolnih spojin v vzorcih cvetnega prahu smo izrazili v ekvivalentih galne kisline kot mg galne kisline (GK) na gram suhe snovi cvetnega prahu (mg GK/g s.s.).

AOP izvlečkov fenolnih spojin iz cvetnega prahu smo določili z metodo določitve sposobnosti lovljenja radikala 1,1'-difetil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) (Brand-Williams in sod., 1995). Določitev temelji na reakciji med radikalom in fenolnimi spojinami, kar beležimo kot znižanje absorbance pri valovni dolžini 517 nm (A_{517}). Analizo smo opravili v treh do petih ponovitvah. AOP smo izrazili kot koncentracijo polifenolnih spojin v reakcijski zmesi, ki za 50 % zniža začetno vsebnost DPPH• (EC_{50}). Večja vrednost EC_{50} pomeni slabši AOP.

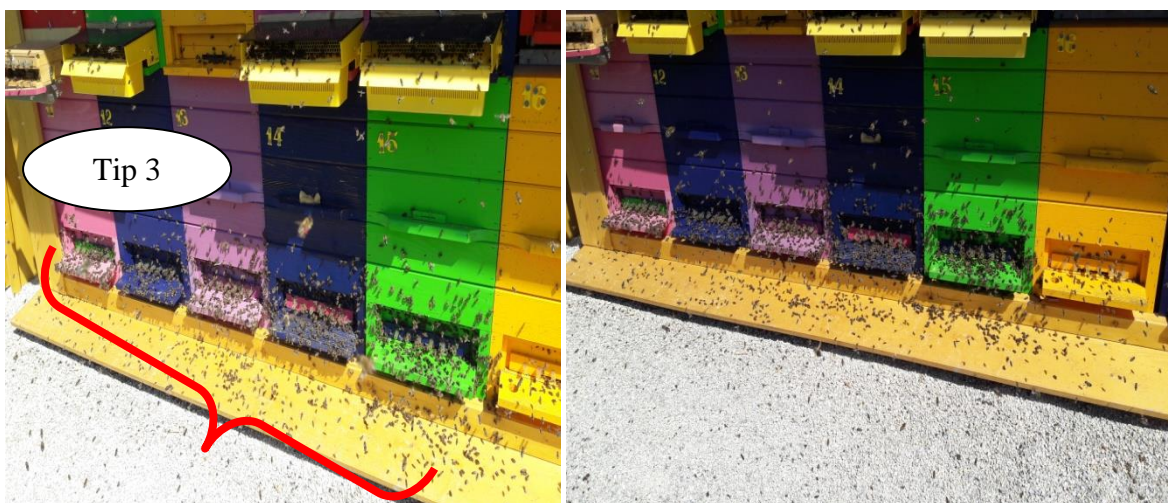
3.2 SPREMLJANJE EKONOMIČNOSTI SMUKANJA V ZUNANJEM OZIROMA NOTRANJEM SMUKALNIKU

Poskus spremljanja ekonomičnosti notranjega in zunanjega smukalnika se je izvajal na 15 čebeljih družinah. Šest čebeljih družin je imelo nameščen notranji smukalnik (tip 3), šest zunanji smukalnik (tip 1 in tip 2), tri čebelje družine so bile kontrolne brez nameščenih smukalnikov. Donose cvetnega prahu smo beležili dnevno, z izjemo dni ko nam vreme to ni omogočalo. V vseh družinah smo za določitev vitalnosti družin spremljali naslednje parametre:

- količino nepokrite in pokrite zalege, na osnovi subjektivne ocene, prirejene po *Standard methods for estimating strength parameters of Apis mellifera colonies (Keith S Delaplane, Jozef van der Steen and Ernesto Guzman)*. Ocenjevalec je na osnovi izkušenj ocenil količino nepokrite in pokrite zalege glede na površino zalege. Ocenjeval je vedno isti ocenjevalec.
- živalnost oz. moč smo določali na osnovi ocenjevanja glede na povprečje v poskus vključenih družin z ocenami od 1 do 4 (ocena 1 in 2: pod povprečjem, ocena 3 in 4: nad povprečjem). Ocenjeval je vedno isto ocenjevalec.
- zalogo medu in cvetnega prahu v plodišču smo ocenjevali z ocenami od 1 do 5, pri čemer 1 pomeni skoraj brez hrane, 2 malo hrane, 3 zadovoljivo veliko hrane, 4 veliko hrane, 5 nenormalno velika količina hrane v plodišču. Ocenjeval je vedno isti ocenjevalec.

Starost matic je bila eno leto. V juniju je bila izvedena prekinitvev zaleganja, posledično cvetnega prahu v določenem obdobju nismo pridobili (mesec julij).

V testiranje so bili vključeni notranji (Tip 3) in zunanji smukalniki (plastičen- tip 2 in leseni- tip 1), ki so na razpolago na slovenskem tržišču. Za izbor testiranih smukalnikov smo se odločili na podlagi lastnih izkušenj in predhodnih testiranj smukalnikov s slovenskega tržišča, ki so bila objavljena v reviji Slovenski čebelar. Cvetni prah smo vzorčili dnevno in tehtali donose. Za rezultat smo podali povprečne vrednosti za določen tip smukalnika.



Slika 4: Po namestitvi smukalnikov cvetnega prahu (notranji smukalniki) Tip 3



Slika 5: Nameščeni zunanji smukalniki in pobiranje cvetnega prahu v zunanjih smukalnikih

3.2.1 Statistična analiza

Podatke o vsebnosti vode, beljakovin, maščob, pepela, ogljikovih hidratov in energijski vrednosti ter vsebnosti skupnih fenolov smo prikazali kot povprečja \pm standardna deviacija (SD). Pri mikrobiološki sliki je bil preračunan odstotek redukcije rasti mikroorganizmov in zmanjšanje števila mikroorganizmov. Pri testiranju ekonomičnosti smukalnikov pa smo izvedli metodo analize variance (ANOVA), uporabili smo Duncanov post hoc test ($\alpha = 0.05$).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 KEMIJSKA SESTAVA CVETNEGA PRAHU

Preglednica 6: Kemijska sestava cvetnega prahu osmukanca, pridobljenega v različnih regijah Slovenije (g/100 g svežega vzorca)

Statistična regija	Oznaka vzorca	Leto	Vsebnost vode (g/100 g)	Vsebnost beljakovin * (g/100 g)	vsebnost maščob* (g/100 g)	Vsebnost pepela* (g/100 g)	Vsebnost ogljikovih hidratov* (g/100 g)	Energijska vrednost* kJ/ 100 g
Osrednjeslovenska	OS1 17	2017	18,91	16,4	4,8	2,41	57,48	1433,6
Osrednjeslovenska	OS 2 17	2017	18,52	17,9	6,2	1,98	55,40	1475,5
Osrednjeslovenska	OS 3 17	2017	15,19	17,8	5,3	2,05	59,66	1512,9
Osrednjeslovenska	OS 4 17	2017	22,95	14,6	5,4	2,02	55,03	1383,5
Osrednjeslovenska	OS 5 17	2017	17,83	17,0	7,3	2,04	55,83	1508,2
Jugovzhodna	SK1P 17	2017	12,37	27,4	7,3	2,73	50,20	1589,3
Gorenjska	N1P 17	2017	13,67	19,2	8,4	2,18	56,55	1598,6
min			12,37	14,6	4,8	1,98	50,20	1383,5
max			22,95	27,4	8,4	2,73	59,66	1598,6
povprečje			17,06	18,61	6,39	2,20	55,74	1500,2
± SD			3,60	4,13	1,32	0,28	2,90	78,0
Jugovzhodna	JV 1 18	2018	20,02	15,5	4,0	2,73	57,75	1393,3
Gorenjska	GOR 1 18	2018	27,52	17,2	7,5	2,72	45,06	1335,9
Gorenjska	GOR 2 18	2018	18,34	19,7	6,3	2,16	53,50	1477,5
Zasavska	ZAS 1 18	2018	26,69	15,3	7,5	2,46	48,05	1354,5
Primorsko Notranjska	PN 1 18	2018	30,07	19,4	6,6	1,90	42,03	1288,5
Primorsko Notranjska	PN2 18	2018	25,33	19,3	7,2	2,13	46,04	1377,2
Savinjska	SAV1 18	2018	27,89	17,1	6,6	2,54	45,87	1314,7
min			18,34	15,3	4,0	1,9	42,03	1288,5
max			30,07	19,7	7,5	2,73	57,75	1477,5
povprečje			25,12	17,64	6,53	2,38	48,33	1363,1
± SD			4,33	1,85	1,21	0,32	5,43	61,8

* vrednosti podane na svež vzorec

Povprečna vsebnost vode v cvetnem prahu je bila v vzorcih, pridobljenih v letu 2017 manjša (17,06 g/100 g) v primerjavi z vzorci, pridobljenimi v letu 2018 (25,12 g/100 g). Vsebnost vode v cvetnem prahu je odvisna od več faktorjev, nanjo pa vplivajo tudi vremenske razmere. V svežem cvetnem prahu se vsebnosti vode gibljejo od 20-30 g/100 g, kar pomeni da je cvetni prah mikrobiološko zelo občutljivo živilo. Največjo vsebnost vode je imel vzorec, pridobljen iz primorsko notranjske statistične regije (30,07 g/100 g) v letu 2018, najnižjo pa vzorec in jugovzhodne regije, pridobljen v letu 2017 (12,37 g/100 g).

Povprečna vsebnost beljakovin je bila med vzorci iz leta 2017 in 2018 primerljiva. V vzorcih, pridobljenih v poletnem času v letu 2017, se je gibala med 14,6 in 27,4 g/100 g. V vzorcih iz leta 2018, pridobljenih v spomladanskem času, pa je bila med 15,3 in 19,7 g/100 g.

Tudi povprečna vsebnost maščob v vzorcih cvetnega prahu iz leta 2017 in 2018 je bila primerljiva (6,39 g/100 g in 6,53 g/100 g).

Vsebnost pepela je med vzorci dokaj podobna in se med leti pridobivanja ni razlikovala. Vsebnost pepela se je gibala med 1,9 – 2,73 g/100 g, kar je primerljivo z drugimi objavami o vsebnosti pepela v slovenskem cvetnem prahu.

Povprečna vsebnost računsko določenih skupnih ogljikovih hidratov je bila v vzorcih iz leta 2017 večja (55,74 g/100 g). V vzorcih iz leta 2018 pa je bila za 13 % manjša (48,33 g/100 g). Posledično se je nekoliko razlikovala tudi energijska vrednost cvetnega prahu. Ta je bila v vzorcih iz leta 2017 med 1383,5 in 1598,6 kJ/100 g, v vzorcih iz leta 2018 pa med 1288,5 in 1477,5 kJ/100 g.

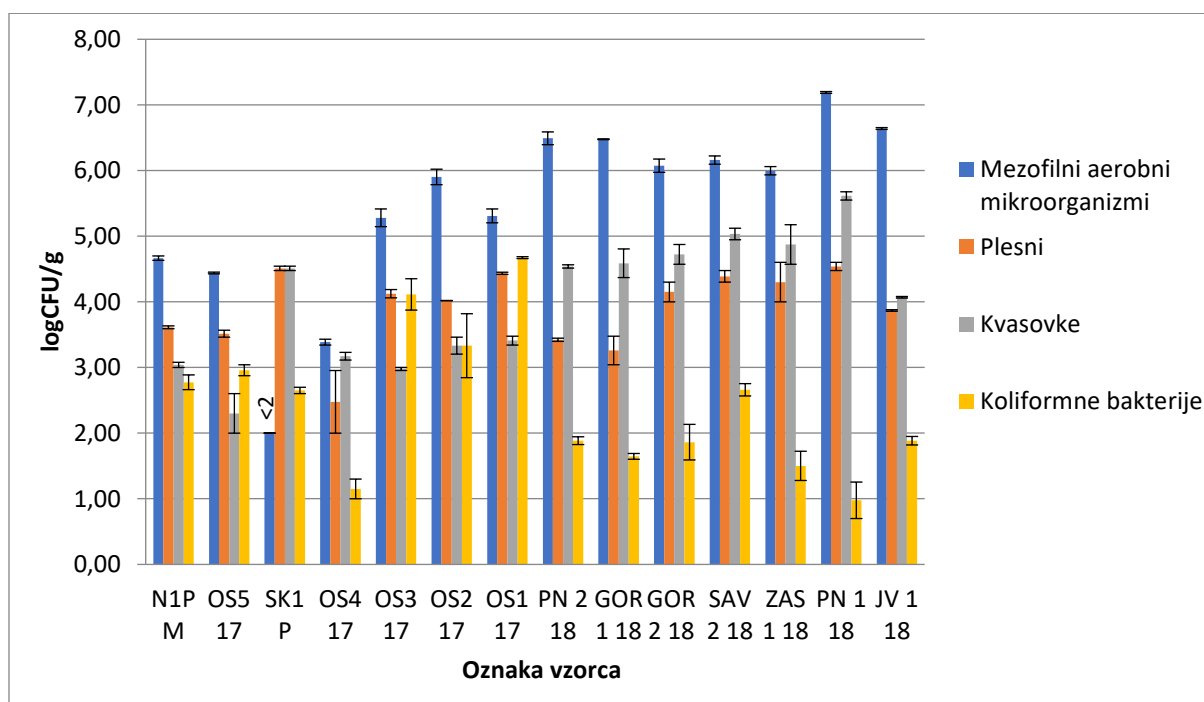
4.2 MIKROBIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA CVETNEGA PRAHU IZ RAZLIČNIH GEOGRAFSKIH REGIJ SLOVENIJE

Pri mikrobiološki karakterizaciji smo v svežih vzorcih cvetnega prahu določali število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih mikroorganizmov.

Preglednica 7: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, plesni, kvasovk in koliformnih bakterij prikazano v enotah, ki tvorijo kolonije, *angl.* colony forming units na 1 gram vzorca (CFU/g) cvetnega prahu.

Oznaka vz.	Mezofilni aerobni mikroorganizmi	Plesni	Kvasovke	Koliformne bakterije
N1P M	4,65X10 ⁴	4,10X10 ³	1,10X10 ³	6,15X10 ²
OS5 17	2,76X10 ⁴	3,30X10 ³	2,50X10 ²	9,25X10 ²
SK1 P	<10 ²	3,25X10 ⁴	3,25X10 ⁴	4,50X10 ²
OS4 17	2,45X10 ³	5,00X10 ²	1,50X10 ³	1,50X10 ¹
OS3 17	2,00X10 ⁵	1,35X10 ⁴	9,50X10 ²	1,50X10 ⁴
OS2 17	8,30X10 ⁵	1,05X10 ⁴	2,25X10 ³	3,65X10 ³
OS1 17	2,10X10 ⁵	2,73X10 ⁴	2,60X10 ³	4,72X10 ⁴
PN 2 18	3,18X10 ⁶	2,65X10 ³	3,50X10 ⁴	7,75X10 ³
GOR 1 18	3,00X10 ⁶	2,05X10 ³	4,00X10 ⁴	4,45X10 ³
GOR 2 18	1,22X10 ⁶	1,50X10 ⁴	5,50X10 ⁴	8,75X10 ³
SAV 1 18	1,46X10 ⁶	2,50X10 ⁴	1,10X10 ⁵	4,68X10 ⁴

ZAS 1 18	$1,01 \times 10^6$	$2,50 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$	$3,60 \times 10^3$
PN 1 18	$1,55 \times 10^7$	$3,50 \times 10^4$	$4,15 \times 10^5$	$1,15 \times 10^2$
JV 1 18	$4,38 \times 10^6$	$7,40 \times 10^3$	$1,20 \times 10^4$	$7,75 \times 10^3$
min	$<10^2$	$5,00 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$1,50 \times 10^1$
max	$1,55 \times 10^7$	$3,50 \times 10^4$	$5,50 \times 10^4$	$4,72 \times 10^4$
povprečje	$3,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
sd	$5,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$



Slika 6: Grafični prikaz zbranih rezultatov mikrobiološke analize cvetnega prahu iz različnih geografskih regij Slovenije.

Število mikroorganizmov je prikazano v logaritmu enot, ki tvorijo kolonije v 1 gramu vzorca (logCFU/g). Oznaka <2 pomeni, da je število mikroorganizmov manjše od 100 v 1 gramu vzorca (<2 logCFU/mL) cvetnega prahu. Meja detekcije mezofilnih aerobnih mikroorganizmov je 100 v 1 gramu vzorca oz 2 logCFU/g, kar je prikazano s črto na grafu.

Mikrobiološka slika svežih analiziranih vzorcev je raznolika. Največje število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov smo določili pri vzorcu z oznako PN 1 18, najmanjše pa v vzorcu z oznako SK1 P. Največje število plesni smo določili v vzorcu z oznako PN 1 18, najmanjše pa v vzorcu z oznako OS 4 18. Največje število kvasovk smo določili v vzorcu z oznako PN 1 18, najmanjše pa v vzorcu z oznako OS 5 17. Največje število koliformnih bakterij smo določili v vzorcu z oznako OS 1 17, najmanjše pa v vzorcu z oznako PN 1 18.

Vzorec z oznako PN 1 18 je imel največjo mikrobiološko obremenitev z mezofilnimi aerobnimi mikroorganizmi, plesnimi in kvasovkami, ampak je število koliformnih bakterij prav v tem vzorcu najmanjše. Prisotnost koliformnih mikroorganizmov je lahko pokazatelj fekalne

onesnaženosti vzorcev in je zato pomembno, da je število le teh v vzorcu majhno (preglednica 7, Slika 6).

4.3 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA CVETNEGA PRAHU, HRANJENEGA V HLADILNIKU

Na treh vzorcih cvetnega prahu iz različnih geografskih regij (D117, K117 in H117) smo nadaljevali shranjevanje v hladilniku. Vzorčenje je potekalo po treh mesecih hranjenja v hladilniku (<10 °C). V preglednicah so podani tudi rezultati iz prejšnjega leta.

Preglednica 8: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov (mo), plesni, kvasovk in koliformnih bakterij prikazanih kot povprečno število CFU/g vzorca D1 cvetnega prahu s standardnim odklonom (SD), svežega vzorca cvetnega prahu ter vzorcev, shranjenih v hladilniku 2 tedna (2t), 1 mesec (1m) in 3 mesece (3m).

	Mezofilni aerobni mo		Kvasovke		Plesni		Koliformne bakterije	
	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD
D1-17	2,03X10 ⁶	1,19X10 ⁵	1,60X10 ⁶	5,00X10 ⁵	3,00X10 ⁵	2,00X10 ⁵	1,30X10 ⁴	2,00X10 ²
D1 hladilnik 2t	2,12X10 ⁶	2,30X10 ⁵	4,02X10 ⁴	1,86X10 ⁴	1,65X10 ³	5,00X10 ¹	3,80X10 ³	1,10X10 ³
D1 hladilnik 1m	2,00X10 ²	1,00X10 ²	3,50X10 ²	2,50X10 ²	3,50X10 ²	2,50X10 ²	<10 ¹	-
D1 hladilnik 3m	5,50X10 ²	1,50X10 ²	<10 ²	-	2,50X10 ²	5,00X10 ¹	<10 ¹	-

Preglednica 9: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov (mo), plesni, kvasovk in koliformnih bakterij prikazanih kot povprečno število CFU/g vzorca K1 cvetnega prahu s standardnim odklonom (SD), svežega vzorca cvetnega prahu ter vzorcev, shranjenih v hladilniku 2 tedna (2t), 1 mesec (1m) in 3 mesece (3m).

	Mezofilni aerobni mo		Kvasovke		Plesni		Koliformne bakterije	
	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD
K1-17	6,30X10 ⁵	0,00X10 ⁰	1,55X10 ⁶	3,50X10 ⁵	3,50X10 ⁵	2,50X10 ⁵	1,02X10 ⁴	2,50X10 ²
K1 hladilnik 2t	2,20X10 ⁶	1,60X10 ⁵	2,70X10 ⁴	1,40X10 ³	1,50X10 ³	3,00X10 ²	1,50X10 ²	5,00X10 ¹
K1 hladilnik 1m	3,50X10 ²	5,00X10 ¹	7,50X10 ²	5,00X10 ¹	7,50X10 ²	5,00X10 ¹	<10 ¹	
K1 hladilnik 3m	1,05X10 ²	5,00X10 ⁰	<10 ²		2,00X10 ²	1,00X10 ²	<10 ¹	

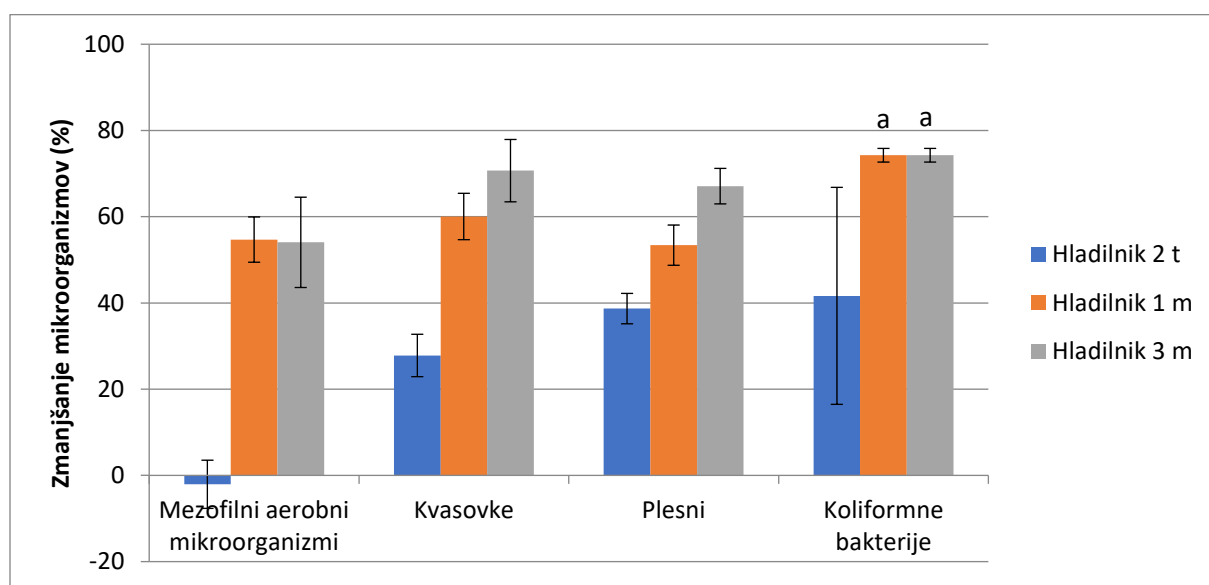
Preglednica 10: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov (mo), plesni, kvasovk in koliformnih bakterij prikazanih kot povprečno število CFU/g vzorca H1 cvetnega prahu s standardnim odklonom (SD), svežega vzorca cvetnega prahu ter vzorcev, shranjenih v hladilniku 2 tedna (2t), 1 mesec (1m) in 3 mesece (3m).

	Mezofilni aerobni mo		Kvasovke		Plesni		Koliformne bakterije	
	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD
H1-17	1,07X10 ⁶	7,43X10 ⁴	1,50X10 ⁶	2,00X10 ⁵	1,50X10 ⁵	5,00X10 ⁴	4,25X10 ³	4,50X10 ²
H1 hladilnik 2t	6,40X10 ⁵	1,30X10 ⁵	1,26X10 ⁴	6,50X10 ²	1,45X10 ³	5,00X10 ¹	2,00X10 ¹	1,00X10 ¹
H1 hladilnik 1m	1,90X10 ³	5,00X10 ²	3,50X10 ²	5,00X10 ¹	3,50X10 ²	5,00X10 ¹	<10 ¹	
H1 hladilnik 3m	4,30X10 ³	1,00X10 ²	<10 ²		5,50X10 ¹	4,50X10 ¹	<10 ¹	

Zmanjšanje števila mikroorganizmov v vzorcih cvetnega prahu, shranjenih v hladilniku

Preglednica 11: Zmanjšanje števila mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih bakterij v vzorcih cvetnega prahu shranjenih v hladilniku 2 tedna (2t), 1 mesec (1m) in 3 mesece (3m) prikazanih v % kot povprečje in standardni odklon.

	Mezofilni aerobni mikroorganizmi		Kvasovke		Plesni		Koliformne bakterije	
	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD
Hladilnik 2t	-2,06	5,59	27,82	4,92	38,69	3,53	41,64	25,16
Hladilnik 1m	54,69	5,25	60,05	5,38	53,41	4,67	74,26	1,58
Hladilnik 3m	54,05	10,47	70,68	7,23	67,09	4,12	74,26	1,58



a – število koliformnih bakterij se je zmanjšalo za več kot 75 %.

Slika 7: Zmanjšanje števila mikroorganizmov, shranjenih v hladilniku 2 tedna (2 t), 1 mesec (1 m) in 3 mesece (3 m) prikazano v % s standardnim odklonom.

Pozitivna vrednost pomeni zmanjšanje mikroorganizmov, negativno število pa rast števila mikroorganizmov (Preglednica11).

Spremljali smo mikrobiološko stabilnost cvetnega prahu v hladilniku. Če je vzorec stabilen, se število mikroorganizmov ne spreminja. Primer je število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov v vzorcu, shranjenem 2 tedna v hladilniku, kjer se število ni spremenilo. V ostalih vzorcih je prišlo do zmanjšanja števila mikroorganizmov.

Mikrobiološka slika vzorcev cvetnega prahu, shranjenih v hladilniku ni stabilna in s časom se nestabilnost povečuje.

V stabilnem vzorcu ne pričakujemo večjih sprememb v številu mikroorganizmov.

4.4 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA CVETNEGA PRAHU, SUŠENEGA PRI 35 °C IN 40 °C

Na treh vzorcih posušenega cvetnega prahu (pri 35 °C in 40 °C) je bila opravljena mikrobiološka slika po 5 in 12 mesecih shranjevanja na temperaturi 16 °C. V preglednicah so podani tudi rezultati iz prejšnjega leta.

Preglednica 12: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih bakterij prikazano v enotah, ki tvorijo kolonije, *angl.* colony forming units na 1 gram vzorca (CFU/g) cvetnega prahu D1-17, svežega ter sušenega pri 35 °C in 40 °C in shranjenega 3 dni, 5 mesecev (5m) in 1 leto (1l). Prikazane so povprečne vrednosti s pripadajočim standardnim odklonom (sd).

	Mezofilni aerobni m.o.		Kvasovke		Plesni		Koliformne bakterije	
	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd
D1-17	2,03X10 ⁶	1,19X10 ⁵	1,60X10 ⁶	5,00X10 ⁵	3,00X10 ⁵	2,00X10 ⁵	1,30X10 ⁴	2,00X10 ²
D1 POSUŠEN 35°C 3d	1,70X10 ⁵	8,00X10 ⁴	1,37X10 ⁴	1,25X10 ³	1,00X10 ³	1,00X10 ²	9,00X10 ²	3,00X10 ²
D1 POSUŠEN 35°C 5m	1,40X10 ⁴	1,15X10 ³	1,77X10 ⁴	1,10X10 ³	3,90X10 ³	4,00X10 ²	4,05X10 ²	3,50X10 ¹
D1 POSUŠEN 35°C 1L	8,50X10 ²	5,00X10 ¹	1,50X10 ¹	5,00X10 ⁰	3,00X10 ⁴	5,00X10 ¹	<10 ¹	-
D1 POSUŠEN 40°C 3d	5,05X10 ⁵	4,50X10 ⁴	2,00X10 ⁵	1,00X10 ⁵	<10 ²		9,20X10 ³	2,90X10 ³
D1 POSUŠEN 40°C 5m	1,95X10 ³	1,50X10 ²	3,50X10 ³	1,10X10 ³	9,00X10 ²	1,00X10 ²	<10 ¹	
D1 POSUŠEN 40°C 1L	3,15X10 ²	5,00X10 ⁰	3,00X10 ¹	0,00X10 ⁰	3,00X10 ⁴	5,00X10 ¹	<10 ¹	-

Preglednica 13: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih bakterij prikazano v enotah, ki tvorijo kolonije, *angl.* colony forming units na 1 gram vzorca (CFU/g) cvetnega prahu K1-17 svežega ter sušenega pri 35 °C in 40 °C in shranjenega 3 dni, 5 mesecev (5m) in 1 leto (1l). Prikazane so povprečne vrednosti s pripadajočim standardnim odklonom (sd).

	Mezofilni aerobni m.o.		Kvasovke		Plesni		Koliformne bakterije	
	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd
K1-17	6,30X10 ⁵	0,00X10 ⁰	1,55X10 ⁶	3,50X10 ⁵	3,50X10 ⁵	2,50X10 ⁵	1,02X10 ⁴	2,50X10 ²
K1 POSUŠEN 35°C 3d	3,50X10 ⁴	5,00X10 ³	1,50X10 ⁵	5,00X10 ⁴	1,17X10 ⁷	7,15X10 ⁶	5,50X10 ²	2,50X10 ²
K1 POSUŠEN 35°C 5m	4,30X10 ³	3,00X10 ²	7,25X10 ³	5,00X10 ¹	8,20X10 ³	2,00X10 ²	6,50X10 ¹	5,00X10 ⁰
K1 POSUŠEN 35°C 1L	4,00X10 ²	1,00X10 ²	7,00X10 ¹	1,00X10 ¹	3,50X10 ²	1,50X10 ²	<10 ¹	-
K1 POSUŠEN 40°C 3d	2,91X10 ⁴	2,45X10 ³	1,49X10 ⁴	9,50X10 ²	1,25X10 ³	1,50X10 ²	3,00X10 ¹	0,00X10 ⁰

K1 POSUŠEN 40°C 5m	5,65X10 ³	3,35X10 ³	2,95X10 ³	2,50X10 ²	3,55X10 ³	2,50X10 ²	<10 ¹	
K1 POSUŠEN 40°C 1L	4,00X10 ²	3,00X10 ²	4,50X10 ¹	1,50X10 ¹	1,50X10 ²	5,00X10 ¹	<10 ¹	-

Preglednica 14: Število mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih bakterij prikazano v enotah, ki tvorijo kolonije, *angl.* colony forming units na 1 gram vzorca (CFU/g) cvetnega prahu H1-17, svežega ter sušenega pri 35 °C in 40 °C in shranjenega 3 dni in 5 mesecev (5m). Prikazane so povprečne vrednosti s pripadajočim standardnim odklonom (sd).

	Mezofilni aerobni m.o.		Kvasovke		Plesni		Koliformne bakterije	
	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd	povprečje	sd
H1-17	1,07X10 ⁶	7,43X10 ⁴	1,50X10 ⁶	2,00X10 ⁵	1,50X10 ⁵	5,00X10 ⁴	4,25X10 ³	4,50X10 ²
H1 POSUŠEN 35°C 3d	2,71X10 ⁴	1,50X10 ³	4,23X10 ⁴	3,00X10 ²	1,05X10 ³	2,50X10 ²	3,00X10 ¹	0,00X10 ⁰
H1 POSUŠEN 35°C 5m	8,85X10 ³	1,05X10 ³	9,95X10 ³	8,50X10 ²	8,90X10 ³	2,00X10 ²	5,00X10 ¹	1,00X10 ¹
H1 POSUŠEN 40°C 5m	7,50X10 ²	1,50X10 ²	1,05X10 ³	2,50X10 ²	2,55X10 ³	5,00X10 ¹	<10 ¹	

Zmanjšanje števila mikroorganizmov v vzorcih cvetnega prahu po sušenju

Izračunali smo po naslednji enačbi:

$$\Delta \log_{10} MO \text{ po sušenju} = \text{svež vzorec} \left(\frac{\log_{10} CFU}{g} \right) - \text{posušen vzorec} \left(\frac{\log_{10} CFU}{g} \right)$$

$$\text{Zmanjšanje števila mikroorganizmov (\%)} = \left(\frac{\Delta \log_{10} MO \text{ po sušenju}}{\text{svež vzorec} \left(\frac{\log_{10} CFU}{g} \right)} \right) * 100$$

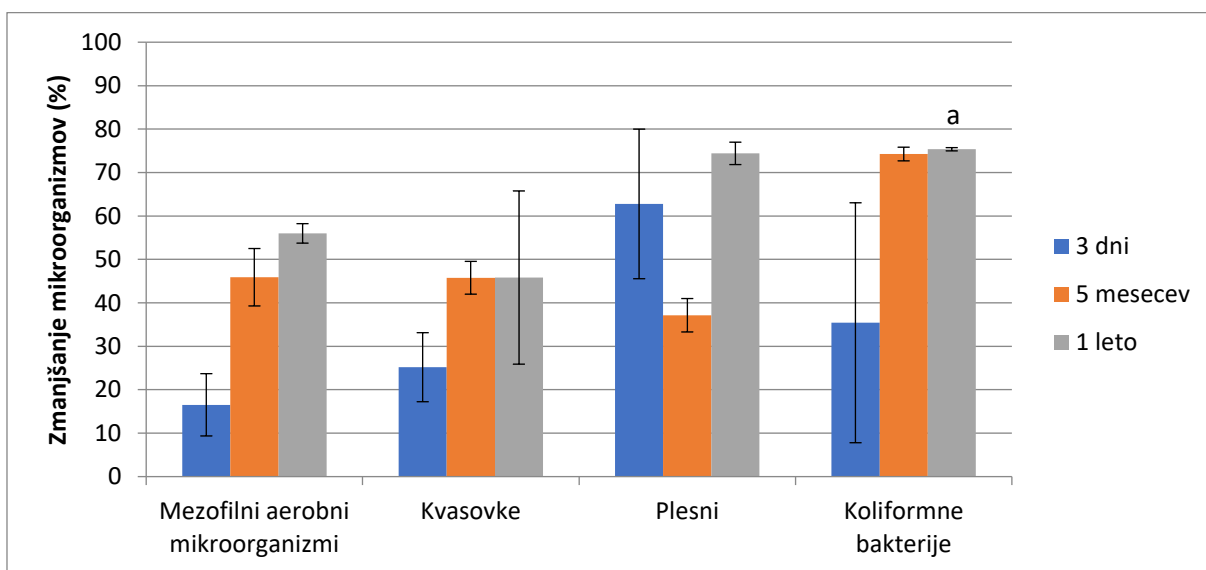
Iz razlik med svežimi vzorci in sušenimi vzorci smo izračunali % zmanjšanja za vzorce D1, K1 in H1 ter iz teh vrednosti povprečje in standardni odklon.

Preglednica 15: Zmanjšanje števila mikroorganizmov v vzorcih cvetnega prahu, posušenih pri 35°C in shranjenih 3 dni, 5 mesecev in 1 leto, prikazano v % zmanjšanja s pripadajočim standardnim odklonom.

	Mezofilni aerobni mo		Kvasovke		Plesni		Koliformne bakterije	
	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD
Posušen 35°C								
Shranjen 3 dni	23,9	2,4	24,1	6,8	22,0	31,3	40,7	13,8
Shranjen 5 mesecev	35,6	1,2	34,3	3,6	27,2	10,8	48,1	8,0
Shranjen 1 leto	54,6	0,8	43,0	17,1	72,6	4,4	75,4	0,4

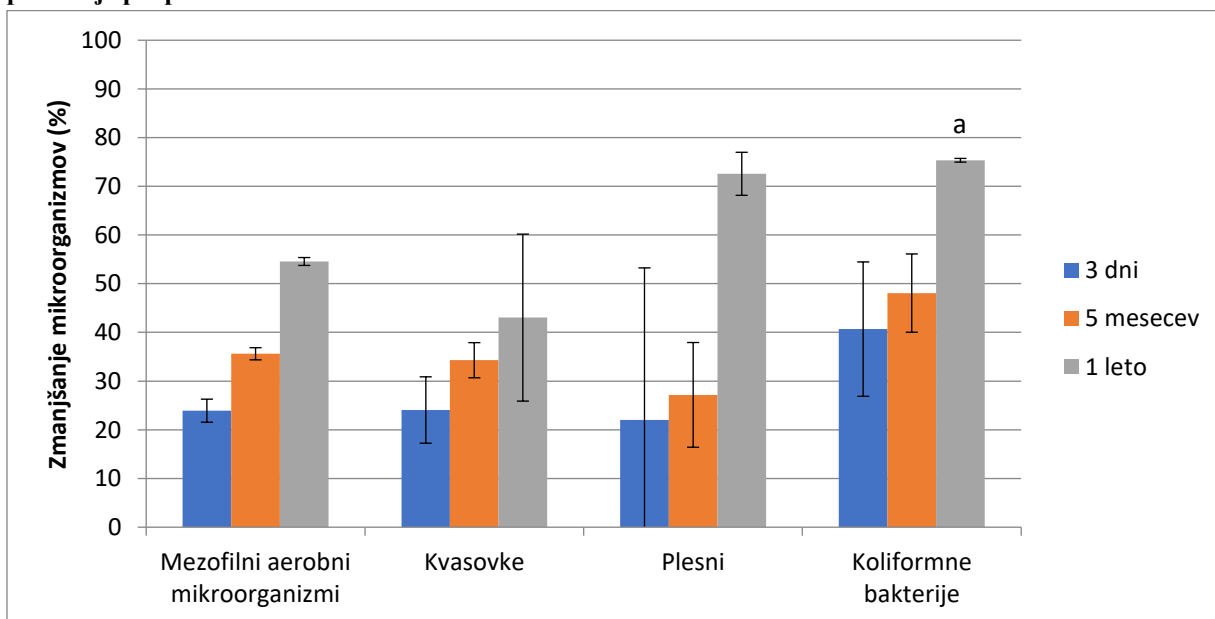
Preglednica 16: Zmanjšanje števila mikroorganizmov v vzorcih cvetnega prahu posušenih pri 40°C in shranjenih 3 dni, 5 mesecev in 1 leto prikazano v % zmanjšanja s pripadajočim standardnim odklonom.

	Mezofilni aerobni mo		Kvasovke		Plesni		Koliformne bakterije	
	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD	Povprečje	SD
Posušen 40°C								
Shranjen 3 dni	16,5	7,2	25,2	7,9	62,8	17,2	35,4	27,6
Shranjen 5 mesecev	45,9	6,6	45,8	3,8	37,1	3,9	74,3	1,6
Shranjen 1 leto	56,0	2,2	45,8	19,9	74,4	2,6	75,4	0,4



a – zmanjšanje koliformnih mikroorganizmov je >75 %

Slika 8: Redukcija števila mikroorganizmov pri procesu sušenja pri 40 °C, prikazana v % redukcije. Graf prikazuje povprečne vrednosti in standardne odklone.



a – zmanjšanje koliformnih mikroorganizmov je >75 %

Slika 9: Redukcija števila mikroorganizmov pri procesu sušenja pri 35 °C, prikazana v % redukcije. Graf prikazuje povprečne vrednosti in standardne odklone.

Sušenje je intervencija s katero želimo zmanjšati število mikroorganizmov v vzorcih cvetnega prahu zaradi boljše stabilnosti vzorcev in možnega shranjevanja pri sobni temperaturi. S sušenjem zmanjšamo vsebnost vode in vodno aktivnost vzorcev.

Na slikah (8 in 9) vidimo bistveno zmanjšanje števila vseh mikroorganizmov hitro po sušenju vzorcev (2 tedna po sušenju) ampak je ta vpliv sušenja bolj učinkovit pri 40 °C kot pri 35 °C. V vzorcih, posušenih pri 40 °C, se število mikroorganizmov stabilizira in zelo malo razlikuje, če so vzorci shranjeni 5 mesecev ali 1 leto. To kaže na stabilnost vzorca. Pri vzorcih, posušenih pri 35 °C, pa je prišlo do večjih sprememb s časom shranjevanja vzorca kar nakazuje nestabilnost vzorca.

Sušenje je učinkovita intervencija za zmanjševanje skupnega števila mezofilnih aerobnih mikroorganizmov, kvasovk, plesni in koliformnih bakterij.

Iz preglednic (15 in 16) lahko vidimo večjo razliko med svežimi vzorci in vzorci, posušenimi pri 40 °C, v primerjavi z vzorci, posušenimi pri 35 °C. Splošno je število vseh testiranih skupin mikroorganizmov bistveno manjše po sušenju in tudi mikrobiološko zaradi tega bolj ustrezno.

4.5 VSEBNOST SKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJIN

Preglednica 17: Vsebnost skupnih polifenolnih spojin v vzorcih cvetnega prahu izraženo kot mg galne kisline na gram suhe snovi cvetnega prahu (mg GK/g s.s.) in AOP izvlečkov izraženo kot koncentracija polifenolnih spojin v reakcijski zmesi, ki za 50 % zniža začetno vsebnost radikala DPPH• (EC₅₀). Rezultati so podani kot povprečna vrednost najmanj treh ponovljenih analiz.

Št. vzorca	Oznaka	Vsebnost skupnih polifenolov mg GA/ g s.s.	EC ₅₀ mg/l reak.zm.
1	OS1 17	6,7	8,3
2	OS2 17	12,8	4,1
3	OS3 17	6,5	5,3
4	OS4 17	8,7	14,0
5	OS5 17	6,9	5,4
6	SK1 P 17	11,3	7,5
7	N1 P 17	5,9	10,9
8	PN1 18	12,7	11,8
9	PN2 18	10,7	10,1
10	GOR1 18	8,4	10,6
11	GOR2 18	11,7	11,8
12	ZAS1 18	8,6	10,8
13	JV1 18	7,1	8,7
14	SAV1 18	7,1	9,5
15	D1 17 3 mesece hladilnik	15,1	12,3
16	K1 17 3 mesece hladilnik	13,0	17,2
17	H1 17 3 mesece hladilnik	13,0	12,6

18	D1 17 posuš 35 °C 5 mes. 16 °C	9,0	9,9
19	K1 17 posuš 35 °C 5 mes. 16 °C	6,4	13,6
20	H1 17 posuš 35 °C 5 mes. 16 °C	7,3	11,0
21	D1 17 posuš 40 °C 5 mes. 16 °C	8,8	9,6
22	K1 17 posuš 40 °C 5 mes. 16 °C	7,0	16,2
23	H1 17 posuš 40 °C 5 mes. 16 °C	7,4	10,8
24	D1 17 posuš 35 °C 1 leto 16 °C	8,7	9,6
25	K1 17 posuš 35 °C 1 leto 16 °C	6,4	15,4
26	D1 17 posuš 40 °C 1 leto 16 °C	8,6	10,1
27	K1 17 posuš 40 °C 1 leto 16 °C	6,3	17,1
karakterizacija 17	min	5,9	4,1
	maks	12,8	14,0
	povprečje	8,4	7,9
	SD	2,7	3,5
karakterizacija 18	min	7,1	8,7
	maks	12,7	11,8
	povprečje	9,5	10,5
	SD	2,2	1,1
3 mesece, hladilnik	min	13,0	12,3
	maks	15,1	17,2
	povprečje	13,7	14,0
	SD	1,2	2,7
posušen 35 °C, 5 mesecev	min	6,4	9,9
	maks	9,0	13,6
	povprečje	7,6	11,5
	SD	1,3	1,9
posušen 40 °C, 5 mesecev	min	7,0	9,6
	maks	8,8	16,2
	povprečje	7,7	12,2
	SD	0,9	3,5
posušen 35 °C, 1 leto	min	6,4	9,6
	maks	8,7	15,4
	povprečje	7,6	12,5
	SD	1,6	4,1
posušen 40 °C, 1 leto	min	6,3	10,1
	maks	8,6	17,1
	povprečje	7,5	13,6
	SD	1,6	4,9

Vsebnost skupnih polifenolnih spojin v preiskovanem cvetnem prahu slovenskega porekla sovпада z vrednostmi iz literature za cvetni prah (Carpes in sod., 2007).

Med vzorci so razlike v vsebnosti polifenolnih spojin in v AOP. Vsebnost skupnih polifenolnih spojin v vzorcih slovenskega cvetnega prahu, pridobljenih v drugi polovici leta 2017, se giblje med 5,9 in 12,8 mg GA/g s.s. s povprečno vrednostjo 8,4 mg GA/g s.s. v vzorcih, pridobljenih v prvi polovici leta 2018, pa med 7,1 in 12,7 mg GA/g s.s. s povprečno vrednostjo 9,5 mg GA/g s.s. Glede vsebnosti polifenolnih spojin sta vzorca OS2 17 in PN1 18 z največjo vsebnostjo skupnih polifenolnih spojin, pri čemer je vzorec OS2 17 pokazal največji AOP (najnižja vrednost EC₅₀). Med skladiščenjem posušenih vzorcev je opaziti, da se vsebnost polifenolnih spojin in AOP nekoliko zmanjšata.

Vrednosti za AOP polifenolnih spojin v preiskovanih vzorcih cvetnega prahu slovenskega porekla sovpadajo z vrednostmi AOP, ki smo jih v naših raziskavah določili za polifenolne spojine iz propolisa (Mavri in sod., 2012), semen oljnic (Terpinc in sod., 2012) in rožmarina (Klančnik in sod., 2009) ter z EC₅₀ vrednostjo za sintetični antioksidant butiliran hidroksitoluen.

4.6 SPREMLJANJE EKONOMIČNOSTI SMUKANJA V ZUNANJEM OZIROMA NOTRANJEM SMUKALNIKU

Ob spremljanju dnevni donosov cvetnega prahu smo tedensko spremljali in popisovali tudi čebelje družine. Beležili smo moč (živalnost) čebelje družine, število satov z odkrito in pokrito čebeljo zalogo, zalogo cvetnega prahu in medu v plodišču.

Preglednica 18: Povprečne vrednosti mesečnega donosa cvetnega prahu, moči, števila odkrite in pokrite zalege, zaloge medu ter zaloge cvetnega prahu v plodišču v mesecu avgustu 2017.

Smukalnik	N	min donos (g)	max donos (g)	SD±	povprečni donos (g)	moč družine	odkrita zalega	pokrita zalega	zaloga medu	zaloga cvetnega prahu
Tip 1	3	21,00	121,00	23,77	52,7 ^a	2,5 ^a	2,25	3,00	4,0 ^{ab}	3,75
Tip 2	3	27,00	86,00	19,25	52,2 ^a	3,7 ^b	2,67	3,50	4,17 ^b	3,83
Tip 3	6	30,00	118,00	23,67	61,4 ^a	3,0 ^{ab}	2,75	3,42	3,08 ^a	2,92
Kontrolna skupina	3	/	/	/	/	3,0 ^{ab}	2,500	3,00	3,5 ^{ab}	4,00

*Tip 1 (zunanji smukalnik, leseni); Tip 2 (zunanji smukalnik plastičen); Tip 3 (notranji smukalnik); Kontrolna skupina (brez smukalnikov)



Slika 10: Tehtanje dnevnega donosa cvetnega prahu

V mesecu avgustu (preglednica 18) nismo ugotovili statistično značilnih razlik v povprečnem dnevnem donosu med testiranimi tipi smukalnikov. Statistično značilne razlike so bile v moči družine in zalogi medu. Moč je bila nekoliko slabša v skupini, ki je imela nameščen smukalnik Tipa 1 v primerjavi s Tipom 2, statistično značilno pa se ni razlikovala od Tipa 3 in kontrolne skupine. Zaloga medu je bila največja v skupini smukalnika Tip 2 in se je statistično značilno razlikovala od Tipa 3.

Preglednica 19: Povprečne vrednosti mesečnega donosa cvetnega prahu, moči, števila odkrite in pokrite zalege, zaloge medu ter zaloge cvetnega prahu v plodišču v mesecu maju 2018.

	N	min donos (g)	max donos (g)	SD±	povprečni donos (g)	moč družine	odkrita zalega	pokrita zalega	zaloga medu	zaloga cvetnega prahu
Tip 1	3	191,00	791,00	187,56	301,9 ^a	3,25 ^{ab}	4,33	4,75	2,92	2,58 ^{bc}
Tip 2	3	118,00	931,00	237,26	299,4 ^a	2,75 ^a	4,17	4,92	3,00	1,75 ^a
Tip 3	6	264,00	1786,00	463,91	525,4 ^a	3,5 ^b	4,04	4,58	3,13	2,33 ^{ab}
Kontrolna skupina	3	/	/	/	/	3,0 ^{ab}	4,25	4,83	3,58	3,17 ^c

*Tip 1 (zunanji smukalnik, leseni), Tip 2 (zunanji smukalnik plastičen), Tip 3 (notranji smukalnik); Kontrolna skupina (brez smukalnikov)

V mesecu maju (preglednica 19) nismo ugotovili statistično značilnih razlik v povprečnem dnevnem donosu cvetnega prahu. Statistično značilne razlike so se pojavile pri moči čebelje družine in zalogi cvetnega prahu v plodišču.

Moč čebelje družine se je statistično značilno razlikovala med Tipoma 2 in 3, pri čemer je bila pri slednjem nekoliko boljša. Zaloga cvetnega prahu v plodišču pa se je razlikovala med kontrolno skupino, kjer je bila največja, ter Tipom 2 in 3, medtem ko je bila pri Tipu 1 primerljiva.

Preglednica 20: Povprečne vrednosti mesečnega donosa cvetnega prahu, moči, števila odkrite in pokrite zalege, zaloge medu ter zaloge cvetnega prahu v plodišču v mesecu juniju 2018.

	N	min donos (g)	max donos (g)	SD±	povprečni donos (g)	moč družine	odkrita zalega	pokrita zalega	zaloga medu	zaloga cvetnega prahu
Tip 1	3	67,00	604,00	143,3	232,9 ^{ab}	2,67	3,33	4,33	2,00	2,67
Tip 2	3	38,00	625,00	194,49	269,39 ^{ba}	3,00	4,00	4,67	2,33	3,00
Tip 3	6	153,00	1009,00	242,2	483,67 ^c	3,33	4,33	3,83	2,17	2,50
Kontrolna skupina	3	/	/	/	/	3,33	4,000	4,00	3,00	2,33

*Tip 1 (zunanji smukalnik, leseni), Tip 2 (zunanji smukalnik plastičen), Tip 3 (notranji smukalnik); Kontrolna skupina (brez smukalnikov)

V mesecu juliju (preglednica 20) statistično značilnih razlik med popisnimi parametri družin z nameščenimi smukalniki in brez nameščenih smukalnikov ne beležimo. Pojavile so se le razlike v donosnosti cvetnega prahu, in sicer se je statistično značilno razlikovala donosnost Tipa 3, kjer je bila največja. Posledično smo beležili manjše zaloge cvetnega prahu v plodišču, ki se pa statistično značilno niso razlikovale od ostalih skupin.

Tudi v letošnjem letu opažamo, da je potrebna visoka stopnja higiene pri pridobivanju cvetnega prahu, tako v zunanjih kakor tudi v notranjem smukalniku. Testiran notranji smukalnik predstavlja večji problem zaradi slabe zračnosti, saj se na podnici veliko hitreje začne pojavljati voščena vešča.

Zunanji smukalniki (Tip 1 in 2) so bolj izpostavljeni vremenskim pojavom, vendar ob rednem čiščenju težav z nečistočo nismo opazili. Ob morebitnih nenadnih vremenskih pojavih, kot so poletne nevihte, pa ga je potrebno prej pobrati, saj lahko dež uniči dnevni pridelek.

5 ZAKLJUČEK

Cvetni prah je edinstveno živilo. Čebelji družini predstavlja edini vir beljakovin, ki ga najdejo v naravi, prisotnost ostalih sestavin kot so minerali, vitamini, aminokisljine, fenolne spojine pa dokazuje, da se lahko uporablja tudi v prehrani ljudi. Po njem posegajo predvsem ljudje, ki jih zanima zdrav način prehranjevanja, predstavlja pa bogat vir hranilnih snovi tudi v različnih alternativnih dietah. Kot takšen mora biti cvetni prah kakovosten, varen ter pristen. Ker na področju cvetnega prahu ne obstaja standardizacija, je pomembno, da spoznamo lastnosti

slovenskega cvetnega prahu in določimo standarde glede prisotnosti hranilnih sestavin v njem. Na sestavo cvetnega prahu ima velik vpliv botanični izvor, stanje rastline, vremenske oz. podnebne razmere, geografski okoliš, itd. V strokovni literaturi je zelo malo podatkov o hranilni vrednosti svežega cvetnega prahu, saj se na trgu največkrat najde že obdelan (posušen) cvetni prah. Letošnji rezultati kemijskih parametrov cvetnega prahu so primerljivi z lansкими (Kandolf Borovšak in sod., 2017) in z že objavljenimi rezultati o kemijski sestavi cvetnega prahu iz Slovenije (Lilek in sod., 2015).

Cvetni prah je mikrobiološko občutljivo živilo. V svežem stanju vsebuje visok delež vode, zato predstavlja odličen medij za razvoj mikroorganizmov, med katerimi so lahko tudi patogeni. Viri mikroorganizmov so okolje, čebele, pribor in človek. S proučevanjem različnih vzorcev svežega cvetnega prahu iz različnih regij Slovenije smo prišli do pomembnih podatkov o mikrobiološki aktivnosti svežega cvetnega prahu. V cvetnem prahu so bili določeni mezofilni aerobni mikroorganizmi, koliformni mikroorganizmi ter plesni in kvasovke, ki so najpogostejši kvarljivci cvetnega prahu. Z nadaljnjo obdelavo cvetnega prahu (hranjenje v hladilniku, zamrzovalniku, sušenjem pri različnih temperaturah) smo ugotavljali najboljši način shranjevanja in obdelave cvetnega prahu. S postopki obdelave cvetnega prahu lahko vplivamo na zmanjšanje oz. redukcijo določenih mikroorganizmov.

Cvetni prah, katerega naberejo čebele, se že mnogo let uporablja v prehrani ljudi kot funkcionalno prehransko dopolnilo (Leja in sod., 2007), poleg pomembnih hranil vsebuje tudi velike količine polifenolnih spojin, v največji meri flavonoidov, ki lahko delujejo kot potencialni antioksidanti in so specifični za posamezno rastlinsko vrsto (Marghitas in sod., 2009; Campos in sod., 2008). Prisotne polifenolne spojine znižujejo tveganje za nastanek degenerativnih bolezni z zmanjšanjem oksidativnega stresa in preprečevanjem oksidacije. Delujejo tako, da reagirajo s prostimi radikali in vežejo nase kovinske ione (Morais in sod., 2011).

V Sloveniji nimamo optimizirane pridelave cvetnega prahu. V preteklih letih je ČZS testirala donosnost zunanjih smukalnikov, ki so najbolj primerni za obstoječe tipe panjev, ki jih uporabljamo v Sloveniji. Rezultati so pokazali, da so brez predhodne obdelave smukalniki s slovenskega tržišča težje uporabni, razlikujejo pa se tako v dnevni donosih, kot tudi v kakovosti materiala iz katerega so izdelani. V zadnjem času se pojavlja vse več čebelarjev, ki uporabljajo klasične AŽ panje z visoko podnico, kamor se lahko namesti notranji smukalnik cvetnega prahu. Pojavljajo se vprašanja o učinkovitosti enega in drugega ter vpliv smukanja na čebeljo družino. Dnevni donosi pa so poleg smukalnikov odvisni tudi od moči čebelje družine, vremenskih pojavov, geografskega območja, itd.

6 VIRI

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu.20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.-27. oktobra 2000. Žlender, B., Gašperlin, L. (ur.).Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32

Abramovič H. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti. Učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študijskem program bioznanosti. Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo. Ljubljana: 73-110

Bogdanov S., Bieri K., Gremaud G., Off D., Känzing A., Seiler K., Stöckli H., Zürcher K.2003. Bienenprodukte; 23 B Pollen. Swiss Food Manual (Schweiz.Lebensmittelbuch): 1-6

Bogdanov S. 2012. The Bee Pollen Book. Chapter 1. www.bee-hexagon.net 1-13

Božnar M. in sod. 2011. Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje. V: Cvetni prah. Zdešar, P. (ur.). Čebelarska Zveza Slovenije: 324 -333

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 28: 25-30.

Brodshneider R., Crailsheim K. 2010. Nutrition and health in honey bees. Apidologie, 41: 278-294

Campos M. G., Webby R. F., markham K. R, Mitchell K. A., Da Cunha A. P. 2003. Age-Induced Diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of Consistent flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 3:745-745

Campos M., Bogdanov S., Almeida-Muradian L. B., Szczesna T., Mancebo Y., Frigerio, C., Ferreira, F. 2008. Pollen composition and standardization of analytical methods. Journal of Apicultural Research and Bee World, 47, 2: 156-163

Campos M., Frigerio C., Lopes J., Bogdanov S. 2010. What is the future of bee pollen. Journal of Apiproducs and Apimedical Science, 2, 4: 131-144

Carpes T., Begnini R., Matias de Alencar S., Masson M.L., 2007. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. Ciência e Agrotecnologia, 31: 818-1825.

De Melo Pereira I., Almeida-Muradian L. 2010. Stability of antioxidant vitamins in bee pollen samples. Quimica Nova, 33: 514-518.

Dominguez-Valhondo D., Gil D.B., Hernandez M.T., Gonzales-Gomez D. 2011. Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 2204-2211.

Dominguez-Valhondo D., Gonzales-Gomez D., Hernandez-Mendez T., Bohoyo-Gil D. 2013. Influence of the industrial processing and floral origin into volatile constituents of honeybee-collected o pollen. *Food Science and Technology International* 19, 2:167-176

Donko M. 1995. Antimikrobna aktivnost natreska. Diplomsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 14, 19, 46

Gomez-Caravaca A.M. in sod. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220-1234

Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemist Society*, 58: 966-968

Kandolf A. in sod. 2008. Cvetni prah. V: O cvetnem prahu. Kandolf, A. (ur.). Čebelarska Zveza Slovenije: 5-11

Klančnik A., Guzej B., Hadolin Kolar M., Abramovič H., Smole Možina S. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72: 1744-1752

Klun L. 1977. Priprave za pridobivanje cvetnega prahu. Slovenski čebelar. ČZS

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu, 20, Bitenčevi živilski dnevi 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo: 11-21

Kurinčič Tomšič, M. 2008. Cvetni prah. V: Cvetni prah in zdravje. Kandolf, A. (ur.). Čebelarska Zveza Slovenije: 33-44

Mavri A., Abramovič H., Polak T., Bertoncej J., Jamnik P., Smole Možina S., Jeršek B. 2012. Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. *Chemistry & biodiversity*, 9: 1545-1558

Morgan, M. A., Milan, R.F., Martins M.C.T., Rodriguez-Amaya D.B. 2011. Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration. *Food Control*, 22: 1604-1608

Marghita L.A. in sod. 2009. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115: 878-883

Lilek N. 2013. Primerjava osmukalnikov za pridobivanje cvetnega prahu. *Čebelarska zveza Slovenije, Slovenski čebelar št. 1*

Lilek N., Noč, B., Dolinšek, M. 2015. Rezultati testiranja prototipa osmukalnika. *Čebelarska zveza Slovenije, Slovenski čebelar št. 11*

Lilek N., Pereyra Gonzales A., Božič, J. Kandolf Borovšak A., Bertoncej J. 2015. Chemical composition and content of free tryptophan in Slovenian bee pollen. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54: 323-333

Lilek N., Dolinšek M., Noč, B. 2016. Optimizacija pridelave cvetnega prahu (osmukanca). 2 znanstveno posvetovanje o čebelah in čebelarstvu, Poklukarjevi dnevi. SAČD in KIS, Ljubljana.

Leja M. in sod. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry* 100: 237-240

Snowdon J. A., Cliver D. O. 1996. Microorganisms in honey. *Food microbiology*, 31: 1-26

Solomka, V. 2001. On bees pollen storage technologies. *Pasika*, 3: 22-23

Szczesna T., Rybak H., Skowronek W. 1995. Alterations in chemical composition of the pollen loads stored under various conditions. III vitamin C and provitamin A (Beta-karoten). *Pszczelnictwo Zeszyty Naukowe*, 40: 171-189

Rzepecka-Stojko A., Stec M., Kurzeja E., Gawronska E., Pawlowska-Goral K. 2012. The effects of storage of bee pollen extracts on polyphenol content. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21, 4:1007-1011

Terpinc P., Polak T., Makuc D., Poklar Ulrih N., Abramovič H. 2012. The occurrence and characterisation of phenolic compounds in *Camelina sativa* seed, cake and oil. *Food Chemistry*, 131: 580-589

7 PREGLED OBJAV O MATIČNEM MLEČKU

Matični mleček je izloček krmilnih in mandibularnih žlez čebel delavk, starih od 6 do 15 dni, in ima ključno vlogo pri razvoju matice v družini.

Največ matičnega mlečka proizvedejo Kitajska, Japonska, Koreja ter države vzhodne Evrope pa tudi Španija, Grčija, Francija in Italija (Kanelis in sod., 2015).

Danes matični mleček uporabljajo v farmaciji, prehranski industriji kot tudi v kozmetiki (Božnar, 2011). Uvrščamo ga med funkcionalna živila, saj so rezultati raziskav pokazali, da ima matični mleček številne funkcionalne lastnosti, kot so antibakterijska aktivnost, protivnetna aktivnost, dezinfekcijsko delovanje, antioksidativna učinkovitost, antitumorsko delovanje,... Biološka aktivnost matičnega mlečka se večinoma pripisuje bioaktivnim maščobnim kislinam, proteinom in fenolnim spojinam. Ob upoštevanju potencialne uporabe je izrednega pomena podrobno poznavanje sestave matičnega mlečka (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012; Fratini in sod., 2016). Različne možnosti uporabe matičnega mlečka dajejo temu čebeljemu pridelku velik pomen. Posledica tega je tudi velik uvoz matičnega mlečka v vse države, ki nimajo zadostne lastne proizvodnje (Božnar, 2011).

O svetovni proizvodnji matičnega mlečka ni uradnih podatkov, vendar strokovnjaki ocenjujejo, da približno 60 % svetovne proizvodnje, to je okrog 2000 ton, proizvede Kitajska. Skoraj vsa proizvedena količina se izvozi na Japonsko, v ZDA in Evropo (Sabatini in sod., 2009).

Zakonodaja, ki bi določala minimalne kriterije kakovosti matičnega mlečka, še ni uveljavljena, kljub temu pa so nekatere države postavile nacionalne standarde in smernice, med njimi Argentina, Bolgarija, Poljska, Turčija, Brazilija, Srbija, Švica, Japonska, Kitajska, Indija in Koreja (Kanelis in sod., 2015). S standardizacijo matičnega mlečka se intenzivno ukvarja tudi Mednarodna komisija za med (angl. *International Honey Commission*) (Sabatini in sod., 2009) ter mednarodna strokovna javnost, ki je sprejela standard ISO 12824:2016 (ISO, 2016). Standard opredeljuje dva tipa matičnega mlečka, tip 1, kadar so hrana čebel izključno njihova naravna hrana (cvetni prah, med ali nektar), v primeru matičnega mlečka tipa 2 pa so poleg naravne hrane dovoljena še druga hranila (beljakovine, ogljikovi hidrati). Določitev standardne sestave matičnega mlečka je pomembna za kontrolo trga ter za zaščito potrošnika. V letih od 2010 do 2013 je bil, v sklopu 7. okvirnega programa Evropske skupnosti, financiran triletni projekt Apifresh, katerega namen je bil med drugim razvoj evropskih standardov kakovosti za matični mleček, določitev standardnih analitskih metod ter določitev standardne metodologije za nadzor potrjenosti matičnega mlečka.

7.1 KAJ JE MATIČNI MLEČEK?

Matični mleček izločajo mlade čebele delavke od 6. do 15. dneva starosti. Nastaja v njihovih krmilnih in mandibularnih žlezah. V tem času mlade čebele imenujemo čebele dojlje. Z matičnim mlečkom hranijo vse čebelje ličinke tri dni, po tretjem dnevu pa samo ličinko, iz katere se bo razvila matica. Kaj se bo razvilo iz oplojenega jajčeca, čebela delavka ali matica, je odvisno samo od hrane. Matica se celo življenje prehranjuje samo z matičnim mlečkom.

Zaradi hranjenja z matičnim mlečkom se matica bistveno razlikuje od čebele delavke. Je dvakrat večja od čebele, razvije se ji sposobnost zaleganja jajčec in živi 4–5 let, čebela delavka pa v povprečju 45 dni (razen zimskih čebel) (Winston, 1987).

7.2 LASTNOSTI SVEŽEGA MATIČNEGA MLEČKA

Matični mleček je pretežno topen v vodi, ima nizko vrednost pH (med 3,5 in 4,5), specifična gostota je 1,1 g/ml (Bogdanov, 2011; Sabatini in sod., 2003; Sabatini in sod., 2009). Viskoznost matičnega mlečka je odvisna od vsebnosti vode in starosti – če je shranjen na sobni temperaturi, počasi postaja bolj viskozen. Do teh sprememb pride zaradi delovanja encimov in reakcij med maščobami in beljakovinami. Kakovost matičnega mlečka se tako poslabša (Božnar, 2011). Star matični mleček, ki ni pravilno skladiščen, je tudi temnejše barve in ima lahko aromo po žarkem (Bogdanov, 2011). Po pobiranju in ob stiku z zrakom postane matični mleček pri temperaturi 15 °C rumen, zaradi prisotnosti albumina, ki nastane med sušenjem (Popescu in sod., 2008).

7.2.1 Senzorične značilnosti svežega matičnega mlečka

Barva: od umazano bele do belo rumene.

Videz: kremasta, viskozna struktura, običajno nehomogen, ker vsebuje netopna zrnca različnih oblik in velikosti.

Vonj: kiselkast, oster.

Okus: izrazito kisel, rahlo trpek, rahlo sladek, oster, pekoč pookus.

Napake: po daljšem skladiščenju barva postaja temnejša, bolj rumena, matični mleček lahko postane žarek (Božnar, 2011).



Slika 11: Matični mleček

7.3 SESTAVA MATIČNEGA MLEČKA

Sestava matičnega mlečka je dokaj kompleksna. Sestavljajo ga voda, maščobe, beljakovine, sladkorji, aminokisljine, organske kisline, steroli, estri, fenolne spojine, minerali, elementi v sledovih in druge snovi (preglednica 27) (Sabatini in sod., 2009). Sestava sladkorjev, vsebnost vode, beljakovin in 10-hidroksi-2-decenojske kisline (10-HDA) so najbolj pomembni kriteriji za karakterizacijo matičnega mlečka (Daniele in Casabianca, 2012).

Preglednica 21: Sestava svežega matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009; ISO, 2016)

Parameter	Sabatini in sod. (2009)	ISO (2016) MM tip 1
Vsebnost vode (g/100 g)	60-70	62,0-68,5
Vsebnost maščob (g/100 g)	3-8	2-8
Vsebnost 10-hidroksi-2-decenojske kisline (10-HDA) (g/100 g)	≥ 1,4	≥ 1,4
Vsebnost beljakovin (g/100 g)	9-18	11-18
Vsebnost sladkorjev (fruktoza + glukoza + saharoza) (g/100 g)	7-18	-
Vsebnost skupnih sladkorjev (g/100 g)	-	7-18
Vsebnost fruktoze (g/100 g)	3-13	2-9
Vsebnost glukoze (g/100 g)	4-8	2-9
Vsebnost saharoze (g/100 g)	0,5-2,0	< 3
Vsebnost erloze	-	< 0,5
Vsebnost maltoze	-	<1,5
Vsebnost maltotrioze	-	< 0,5
Vsebnost pepela (g/100 g)	0,8-3,0	-
Vrednost pH	3,4-4,5	-
Kislost (ml 0,1 M NaOH/g)	3,0-6,0	3,0-5,3
Furozin (mg/100 g beljakovin)	< 50	-

MM: matični mleček; - ni podatka

Sestava je odvisna od sezonskih in okoljskih dejavnikov (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012). Na vsebnost ogljikovih hidratov in maščob ima sezona velik vpliv, manjši na vsebnost beljakovin

in vode, medtem ko vsebnost pepela in vrednost pH nista odvisna od sezonskih vplivov (Wongchai in Ratanavalachai, 2002). Na vsebnost sladkorjev vpliva med drugim čas pridelave (Ramadan in Al-Ghamdi, 2013). Sicer v sestavi matičnega mlečka različnega geografskega porekla niso ugotovili značilnih razlik. Do razlik prihaja predvsem zaradi različne prehrane in starosti čebel proizvajalk, rase čebel ter od načina pridobivanja in shranjevanja matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009).

Matični mleček vsebuje tudi pelod rastlin, na katerih so čebele nabirale nektar in pelod, zato na osnovi pelodne analize matičnega mlečka lahko sklepamo na njegovo poreklo (Sabatini in sod., 2009).

7.3.1 Voda

Kljub visoki vsebnosti vode (med 62 in 68,5 g/100 g) (ISO, 2016) in vodni aktivnosti (a_w) nad 0,92 je matični mleček relativno mikrobiološko stabilen. Konstantna vsebnost vode v mlečku je posledica stalne proizvodnje mlečka s strani čebel do jilj v družini, njegove naravne higroskopsnosti in prizadevanj čebelje družine, da vzpostavlja konstantno vlažnost v panju. Razlike v vsebnosti vode so lahko posledica netopnosti nekaterih sestavin matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009).

Na vsebnost vode vpliva čas pobiranja matičnega mlečka in sicer se s časom povečuje. Najbolj vsebnost vode narašča od 24 do 48 ur po cepljenju ličink, naraščanje se upočasni 72 ur po cepljenju (Zheng in sod., 2010), tako da ima četrty dan po cepljenju matični mleček manj kot 50 g vode/100 g, prvi dan po cepljenju pa manj kot 60 g/100 g (Kanelis in sod., 2015). Vsebnost vode je nekoliko manjša tudi med sušnim obdobjem v primerjavi z deževnim obdobjem (Wongchai in Ratanavalachai, 2002).

7.3.2 Beljakovine

V matičnem mlečku je med 9 in 18 g beljakovin/100 g, ki predstavljajo 50 % suhe snovi matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009; Šimúth, 2001). ISO standard (2016) navaja območje vsebnosti 11-18 g beljakovin/100 g. Proteinska frakcija vsebuje številne pomembne komponente in biološko aktivne snovi (Bärnuțiu in sod., 2011). Več kot 80 % beljakovin matičnega mlečka je topnih proteinov, t.i. glavnih proteinov matičnega mlečka (MRJP - angl. *Major Royal Jelly Proteins*) (Šimúth, 2001). MRJP naj bi bili izmed vseh sestavin matičnega mlečka najbolj pomembni za razvoj čebele matice, saj vključujejo številne esencialne aminokisljine (Schmitzova in sod., 1998). Čebele izločajo na stotine proteinov, predvsem iz krmilnih in mandibularnih žlez ter žlez slinavk. Čebelja matica, ki je hranjena z matičnim mlečkom, živi 4-5 let, medtem ko čebele delavke živijo le 3-4 tedne. Za ta fenomen naj bi bili zaslužni predvsem proteini matičnega mlečka (Šimúth in sod., 2003). Poleg glavnih proteinov matični mleček vsebuje tudi manjše proteine, vključno z antimikrobnimi peptidi (peptidnimi

antibiotiki). Ti bioaktivni peptidi lahko po zaužitju v telesu delujejo kot regulatorne snovi s podobno aktivnostjo kot hormoni (Bärnuțiu in sod., 2011).

Proste aminokisliline predstavljajo samo 0,6 do 1,5 % beljakovin, večina je L-aminokislin (Sabatini in sod., 2009). V matičnem mlečku je največ prolina, lizina, glutaminske kisline, β -alanina, fenilalanina, aspartata in serina. Pri skladiščenju matičnega mlečka (4 °C, 10 mesecev) ni značilnih razlik v vsebnosti aminokislin, medtem ko se vsebnost prolina in lizina poveča pri skladiščenju pri sobni temperaturi (Boselli in sod., 2003).

7.3.3 Ogljikovi hidrati

V matičnem mlečku je povprečno 11 do 23 g/100 g ogljikovih hidratov oz. 30 % suhe snovi matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009), ISO standard (2016) navaja od 7 do 18 g skupnih sladkorjev/100 g. Glavna sladkorja sta, tako kot pri medu, monosaharida fruktoza in glukoza, ki skupaj predstavljata 90 % vseh sladkorjev. Vedno je prisotna tudi saharoza, vendar v zelo variabilnih koncentracijah. V manjših koncentracijah so lahko prisotni tudi nekateri oligosaharidi, ki so v nekaterih primerih primerni tudi za določanje pristnosti matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009). Intenzivno hranjenje čebel s sladkorji tako C₃ kot C₄ rastlin ne privede do sprememb vsebnosti glavnih sladkorjev matičnega mlečka, kot sta glukoza in fruktoza, temveč pride do razlik v vsebnostih drugih sladkorjev, ki so prisotni v manjših količinah (saharoza, erloza in maltoza), zato je vsebnost teh sladkorjev primernejša za določitev pristnosti matičnega mlečka. V primeru krmljenja s saharozo, se povečata vsebnosti saharoze in erloze (Daniele in Casabianca, 2012).

V matičnem mlečku so poleg fruktoze, glukoze ter saharoze določili še maltozo, trehalozo, melibiozo, ribozo in druge (Fratini in sod., 2016).

Na vsebnost ogljikovih hidratov v matičnem mlečku vplivajo tudi klimatske razmere, vsebnost ogljikovih hidratov v mlečku pridobljenem na Tajskem se je povečala med vročim (april-junij) ter deževnim obdobjem (julij-avgust) (Wongchai in Ratanavalachai, 2002).

7.3.4 Pepel

Vsebnost pepela v svežem matičnem mlečku znaša od 0,8 do 3 g/100 g (Garcia-Amoedo in Almeida-Muradian, 2007), med 4 in 8 % suhe snovi (Fratini in sod., 2016). Glavni elementi so K, P, S, Na, Ca, Al, Mg, Zn, Fe, Cu in Mn (Stocker in sod., 2006).

Elementi, prisotni v matičnem mlečku, so posledica tako zunanjih dejavnikov (okolje, pridobivanje hrane, obdobje pridelave matičnega mlečka) kot notranjih dejavnikov (biološke lastnosti čebel) (Bärnuțiu in sod., 2011). Koncentracija mineralov in elementov v sledovih v

matičnem mlečku je konstantna, zaradi homeostatskega uravnavanja s strani čebel doжил in ni odvisna od časa pobiranja mlečka (Wongchai in Ratanavalachai, 2002; Stocker in sod., 2006).

7.3.5 Vrednost pH in vsebnost kislin v matičnem mlečku

Matični mleček ima nizko vrednost pH (od 3,6 do 4,2) (Šimúth in sod., 2003). Nekateri avtorji navajajo nekoliko višjo vrednost pH matičnega mlečka in sicer od 4 do 5, ki se med procesom liofilizacije ne spremeni in ostane relativno konstantna (Popescu in sod., 2008).

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

7.3.6 Maščobe

Svež matični mleček vsebuje 3-8 g maščob/100 g, kar predstavlja 3 do 19 % suhe snovi matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009; Fratini in sod., 2016), liofiliziran približno 8-19 g/100 g. ISO standard (2016) navaja nižjo spodnjo mejo za vsebnost maščob, območje vsebnosti znaša 2-8 g maščob/100 g. V največji meri maščobno frakcijo matičnega mlečka predstavljajo maščobne kisline (80-90 %), ostalo so voski (5-6 %), steroidi (3-4 %) in fosfolipidi (0,4-0,8 %) (Bogdanov, 2011; Sabatini in sod., 2009; Ramadan in Al-Ghamdi, 2012).

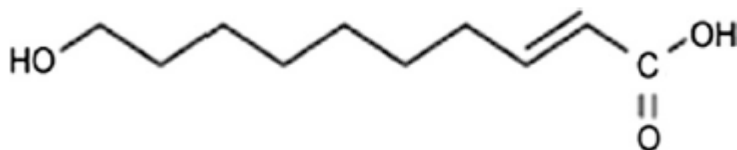
Vsebnost maščob se delno spreminja v odvisnosti od sezone, v primeru tajskega matičnega mlečka se je najbolj povečala pri prehodu iz hladnega v toplo obdobje, v 6 % pa se je zmanjšala pri prehodu iz deževne dobe v hladno obdobje. Tudi drugi avtorji poročajo, da se vsebnost maščob poveča poleti (Wongchai in Ratanavalachai, 2002).

Maščobne kisline matičnega mlečka so večinoma kratkoverižne mono- in dihidroksi maščobne kisline z 8-10 ogljikovimi atomi ali dikarboksilne kisline, v nasprotju z maščobnimi kislinami s 14-20 ogljikovimi atomi, ki jih običajno vsebujejo živila živalskega in rastlinskega izvora (Genç in Aslan, 1999; Sesta, 2006).

Maščobe so pomembna komponenta matičnega mlečka pri določitvi pristnosti oziroma potvorjenosti le-tega, saj nekaterih maščobnih kislin, ki jih matični mleček vsebuje, ne najdemo v nobenem drugem naravnem proizvodu. Kvalitativna in kvantitativna analiza maščobne frakcije prav tako omogoča določitev količine dodanega matičnega mlečka v drugih izdelkih (Mărghitaş in sod., 2010). V primeru potvorjenega matičnega mlečka s sladkorjem se zmanjša vsebnost beljakovin in maščob in poveča vsebnost sladkorjev, ki so prisotni v manjših količinah, matični mleček postane netopen v alkalnem mediju (Fratini in sod., 2016).

7.3.6.1 10-hidroksi-2-decenojska kislina (10-HDA)

Maščobnokislinska frakcija je sestavljena iz različnih maščobnih kislin, med katerimi je tudi trans-10-hidroksi-2-decenojska kislina (10-HDA), ki je za matični mleček značilna in jo je v matičnem mlečku največ (32 % vseh maščobnih kislin) (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012). Nekateri avtorji pa navajajo, da znaša vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku okoli 50 % vseh maščobnih kislin (Antinelli in sod., 2002; Ferioli in sod., 2014). Kemijska struktura 10-HDA kisline je predstavljena na sliki 12.



Slika 12: Kemijska struktura 10-HDA (Ramadan in Al-Ghamdi, 2012).

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

V nekaterih državah je minimalna vsebnost 10-HDA v matičnem mlečku tudi zakonsko predpisana, preglednica 22 (Genç in Aslan, 1999; Zhou in sod., 2007; Kim in sod., 1989), ISO standard (2016) navaja vrednosti vsaj 1,4 g 10-HDA/100 g.

Preglednica 22: Minimalne, zakonsko predpisane vrednosti 10-HDA v matičnem mlečku v različnih državah

Vsebnost 10-HDA	Tajska	Turčija	Kitajska	Koreja
Svež matični mleček	1,5 g/100 g	1,4 g/100 g	1,4 g/100 g	1,6 g/100 g
Izdelki, ki vsebujejo matični mleček	0,16 g/100 g izdelka	0,16 g/100 g izdelka	ni predpisa	0,56 g/100 g izdelka
Liofiliziran matični mleček	ni predpisa	ni predpisa	4,2 g/100 g	4,0 g/100 g

Svež matični mleček naj bi imel večjo vsebnost 10-HDA in bi lahko bila potencialen parameter svežosti matičnega mlečka, vendar ugotavljajo, da naj bi bila vsebnost kisline v mlečku stabilna in neodvisna od pogojev skladiščenja (Antinelli in sod., 2003). Nekateri avtorji poročajo, da je vsebnost 10-HDA največja v mlečku 24 ur po cepljenju ličink, medtem ko drugi, da je največja 48 ur po cepljenju (Zheng in sod., 2011).

7.3.7 Pelod

Matični mleček na evropskem trgu izvira predvsem s Kitajske, ki je glavna proizvajalka mlečka. Geografsko poreklo matičnega mlečka se da določiti s pelodno analizo. Ne glede na to, da matični mleček ne prihaja neposredno iz rastlin in je proizvod čebel, se v njem nahajajo pelodna zrna, kot posledica aktivnosti čebel, in odražajo okolje, kjer je bil matični mleček proizveden (Piana in sod., 2006). Pelodna zrna tudi obogatijo matični mleček z beljakovinami, ki izvirajo iz rastlin (Fratini in sod., 2016).

Matični mleček kaže podobno sestavo kot med z istega območja, s tem, da je v njem več vetrocvetk in rastlin, ki cvetijo kasneje (julij, avgust), kar se ujema s proizvodnjo matičnega mlečka (Piana in sod., 2006). S pelodno analizo lahko zaznamo lažne označitve geografskega porekla (Morgado in Barth, 2011).

7.3.8 Lastnosti slovenskega matičnega mlečka

V preteklem letu (programsko leto 2017) pridobljeni rezultati za slovenski matični mleček (Kandolf in sod., 2017) so v skladu s sestavo matičnega mlečka, kot jo predlagajo Sabatini in sod. (2009) v okviru določanja kakovosti in standardizacije matičnega mlečka, ter v okviru vrednosti, ki jih za svež matični mleček navaja standard ISO (ISO, 2016). Vode je bilo v slovenskem matičnem mlečku od 64,5 do 67,8 g/100 g.

Matični mleček ima po navedbah Sabatini in sod. (2009) nizko vrednost pH, od 3,6 do 4,2, v sklopu naše raziskave je bil razpon vrednosti bistveno manjši, med 3,73 in 3,87, v povprečju je vrednost pH 12 vzorcev matičnega mlečka znašala 3,81. Povprečna kislost vzorcev slovenskega matičnega mlečka je bila 4,19, območje pa od 3,74 do 4,51 mL 0,1 N NaOH/g.

Vsebnost maščob je odvisna od sezonskih vplivov, zato so vrednosti tega parametra bolj variabilne. Rezultati za vsebnost maščob so imeli največji razpon vrednosti med obravnavanimi fizikalno-kemijskimi parametri, od 4,59 do 7,65 g/100 g. Povprečna vsebnost maščob v vzorcih slovenskega matičnega mlečka znaša 5,95 g/100 g. Pomembna komponenta maščobne frakcije matičnega mlečka je 10-HDA. Te maščobne kisline v naravi ne najdemo, značilna je samo za matični mleček, zato je njena vsebnost pomemben kriterij njegove pristnosti. Pristen mleček mora vsebovati vsaj 1,4 g 10-HDA/100 g. V vzorcih slovenskega matičnega mlečka je bila povprečna vsebnost dvakrat višja od te vrednosti (2,81 g/100 g), območje je obsegalo vrednosti od 2,48 do 3,26 g/100 g.

Vsebnost beljakovin je bila v analiziranih vzorcih matičnega mlečka precej izenačena, v območju od 11,7 do 12,7 g/100 g, s povprečno vrednostjo 12,2 g/100 g.

Glavna sladkorja matičnega mlečka sta monosaharida fruktoza in glukoza, vedno je prisotna tudi saharoza, v manjših količinah so prisotni tudi nekateri oligosaharidi, ki so lahko v določenih primerih primerni tudi za določanje pristnosti matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009). Analizirani vzorci so vsebovali od 2,3 do 4,5 g /100 g fruktoze, med 3,4 in 5,3 g/100 g glukoze ter med 0,5 in 2 g/100 g saharoze, v treh vzorcih je bila vsebnost saharoze pod mejo detekcije. Vsi vzorci so vsebovali maltozo, nekateri pa tudi erlozo in melecitozo. Maltoze je bilo med 0,5 in 0,6 g/100 g, melecitozo so vsebovali samo trije vzorci, vsebnosti so znašale od 0,5 do 0,7 g/100 g, v drugih vzorcih matičnega mlečka je bilo melecitoze manj kot 0,5 g/100 g (pod mejo detekcije) (Kandolf in sod., 2017).

V analiziranih vzorcih matičnega mlečka je prevladoval pelod pravega kostanja (*Castanea sativa*), podobno kot v medu, pridelanem na območju RS. V več kot 97 % vzorcev slovenskega medu je prisoten pelod pravega kostanja, v mlečku pa je ta zastopan v skoraj 92 % vzorcev in je edini pelod v matičnem mlečku, ki je prevladujoč, druge vrste peloda so zastopane v manj kot 45 %. Glede na rezultate pelodne analize lahko rečemo, da so bili analizirani vzorci zagotovo slovenskega porekla (Kandolf in sod., 2017).

7.4 SKLADIŠČENJE MATIČNEGA MLEČKA

Matični mleček je občutljiv na toploto, svetlobo in zrak. V primeru neprimerne skladiščenja potemni, poveča se mu viskoznost, pojavijo se večje netopne frakcije proteinov, zmanjša se vsebnost prostih aminokislin in aktivnost encima glukoza oksidaza (Hu in sod., 2017). Matični mleček lahko med skladiščenjem postane žarek (Ramadan in Al-Ghamdi, 2011). Povečana viskoznost je posledica v vodi netopnih dušikovih spojin, njihova vsebnost pa se poveča zaradi aktivnosti encimov in interakcije med maščobno in beljakovinsko frakcijo (Ramadan in Al-Ghamdi, 2011).

Raziskave so pokazale, da se matični mleček najbolje ohrani z zmrzovanjem na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali pa z liofilizacijo. Takšen proces sušenja najbolje ohrani prvotne karakteristike matičnega mlečka; ohranijo se hlapne komponente, termolabilne komponente pa se ne poškodujejo. Zmrznjen je uporaben tudi do 3 leta, pri tem načinu ostaneta tudi barva in viskoznost skoraj nespremenjeni (Bogdanov, 2011).

Hranjenje v hladilniku pri $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je sicer slabši, vendar še sprejemljiv način skladiščenja. Barva se malenkostno spremeni, potemni, viskoznost pa se precej poveča v primerjavi z začetno vrednostjo (Božnar, 2012).

8 MATERIAL IN METODE

8.1 ZBIRANJE VZORCEV

V raziskavo smo vključili 12 vzorcev svežega matičnega mlečka slovenskega porekla iz štirih statističnih regij Slovenije. Podatki o analiziranih vzorcih (oznaka, statistična regija in letnik pridelave) so zbrani v preglednici 23.

Preglednica 23: Vzorci matičnega mlečka, analizirani v programskem letu 2018

Oznaka	Statistična regija	Letnik pridelave	Skladiščenje	Opravljene analize po skladiščenju
K. MLEČEK 2018-1	Podravska	2017	zmzovalnik	A
K. MLEČEK 2018-2	Podravska	2017	hladilnik	A
K. MLEČEK 2018-3	Podravska	2017	zmzovalnik	B
K. MLEČEK 2018-4	Podravska	2017	-	-
K. MLEČEK 2018-5	Osrednjeslovenska	2017	-	-
K. MLEČEK 2018-6	Osrednjeslovenska	2017	zmzovalnik	A
K. MLEČEK 2018-7	Posavska	2017	zmzovalnik	B
K. MLEČEK 2018-8	Podravska	2017	-	-
K. MLEČEK 2018-9	Gorenjska	2017	hladilnik	B
K. MLEČEK 2018-10	Gorenjska	2017	hladilnik	A
K. MLEČEK 2018-11	Osrednjeslovenska	2017	hladilnik	B
K. MLEČEK 2018-12	Posavska	2017	-	-

A: vsebnost vode, beljakovin, maščob, vrednost pH ter kislost

B: vsebnost vode, beljakovin, maščob, vrednost pH, kislost ter vsebnost 10-HDA in sladkorjev

-: vzorec ni bil shranjen za ugotavljanje vpliva skladiščenja

V programskem letu 2018 smo poleg analiz svežega matičnega mlečka, na osmih oz. štirih vzorcih matičnega mlečka opravili tudi analize vsebnosti vode, maščob, beljakovin, 10-HDA in sladkorjev ter kislosti in vrednosti pH za ugotavljanje sprememb v sestavi matičnega mlečka po določenem času skladiščenja v hladilniku oz. v zmzovalniku. V vzorcih z oznakami K. MLEČEK 2018-1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11 smo po skladiščenju (5 do 6 mesecev) določili vsebnost vode, beljakovin, maščob, vrednost pH ter kislost, v vzorcih z oznakami K. MLEČEK 2018-3, 7, 9, 11 pa po 2-mesečnem skladiščenju tudi vsebnost 10-HDA in sladkorjev. Iz preglednice 23 je razviden način shranjevanja vzorcev (hladilnik oz. zmzovalnik).

V okviru diplomskega dela na Biotehniški fakulteti (Žohar, 2018) pa smo vse vzorce matičnega mlečka skladiščili 5 do 6 mesecev v hladilniku oz. zmzovalniku ter potem analizirali vsebnost vode, vsebnost beljakovin, vrednost pH, kislost in barvo z Minolta kromometrom. Izvedli smo

tudi kromogeno reakcijo, katere namen je bil oceniti svežost vzorcev matičnega mlečka, shranjenih pri navedenih dveh pogojih.

Vzorci matičnega mlečka so imeli v primerjavi z vzorci matičnega mlečka, analiziranimi v programskem letu 2017, enake senzorične lastnosti. Bili so gosto tekoči, različne viskoznosti in blede rumene barve. Vonj je bil po kislem, po čebeljem vosku, lahko manj prijeten (po živalih, zato hlem, po sesirjenem mleku). Okus matičnega mlečka je bil rahlo sladek, od močno do izrazito kisel. Značilna je ostra, rezka aroma in pekoč pookus.

8.2 ANALIZE MATIČNEGA MLEČKA

8.2.1 Pelodna analiza (Piana in sod., 2006)

Princip: Z mikroskopskim pregledom preparata sedimenta matičnega mlečka določimo vrste peloda. Delež posamezne vrste peloda izrazimo v odstotkih od skupnega števila zrn peloda.

Oprema:

- svetlobni mikroskop (Zeiss AXIOSKOOP 2 plus, Imager A.1.)

8.2.2 Fizikalno-kemijske analize

Fizikalno-kemijske analize so bile opravljene v dveh oziroma treh vzporednih določitvah, rezultati katerih se niso razlikovali za več kot 5 %. Vzorce smo hranili v pokritih, pred svetlobo zaščitnih, steklenih kozarčkih, v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Pred analizami smo vzorce dobro premešali. Principi uporabljenih metod z referencami so opisani v nadaljevanju.

Določanje vsebnosti vode (Sesta in Lusco, 2008)

Princip:

Princip metode temelji na refraktometričnem določanju in preračunu vsebnosti vode na osnovi odčitane lomenega količnika.

Oprema:

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

Določanje vsebnosti pepela (Plestenjak in Golob, 2003)

Princip:

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

Oprema:

- žarilna peč (Nabertherm, Nemčija)

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

Princip:

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

Oprema:

- pH meter CyberScan pH/ion CON 510 (Eutech Instruments, Singapur)

Določanje kislosti matičnega mlečka (Popescu in sod., 2008)

Princip:

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

Oprema:

- pH meter MA 5736 (Metrel, Slovenija)

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

Princip:

Določanje vsebnosti beljakovin posredno preko dušika, ob upoštevanju, da prisoten dušik izvira iz beljakovin. Za preračun dušika v beljakovine smo uporabili splošni empirični faktor ($F=6,25$).

Oprema:

- blok za razklop vzorca (Digestion Unit Büchi)
- enota za odvod zdravju škodljivih hlapov (Scrubber Büchi)
- destilacijska enota (Distillation unit Büchi)
- titracijska enota (Titrino Büchi)
- katalizator KJELTABS Cu/3,5 (3,5 g K_2SO_4 + 0,4 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$)

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

Princip:

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

Oprema:

- aparat po Soxhletu
- sušilnik (Sterimatic ST-11, Hrvaška)

Določanje vsebnosti sladkorjev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC-RI) (Bogdanov, 2009)

Princip:

Ekstrakcija sladkorjev iz matičnega mlečka z metanolom in HPLC analiza z RI detektorjem z metodo eksterne standarda.

Oprema:

- tekočinski kromatograf (HPLC)
- RI detektor

Določanje vsebnosti 10-hidroksi-2-decenojske kisline (10-HDA) s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (Intertek, 2017)

Princip:

Ekstrakcija matičnega mlečka z mešanico fosfatnega pufru in metanola (55/45, v/v) in HPLC analiza z UV detektorjem z metodo eksterne standarda.

Oprema:

- tekočinski kromatograf (HPLC)
- reverznofazna kolona
- UV detektor

Določanje maščobnokislinske sestave s plinsko kromatografijo (GC) (Ferioli in sod., 2014; Isidorov in sod., 2012)

Princip:

Ekstrakcija maščob iz liofiliziranega matičnega mlečka z mešanico dietileter/izopropanol (50/1, v/v), priprava trimetilsililnih derivatov maščobnih kislin z derivatizacijskim reagentom BSTFA z 1 % TMCS (bis-trimetilsilil-trifluoroacetamid s trimetilklorosilanom) in piridinom in GC analiza.

Oprema:

- plinski kromatograf Agilent Technologies 6890
- kapilarna kolona
- plamensko ionizacijski detektor (FID)
- masni spektrometer

9 REZULTATI IN RAZPRAVA

9.1 PELOD V MATIČNEM MLEČKU

V 10 ml destilirane vode smo raztopili 1 g matičnega mlečka. Supernatant smo po centrifugiranju sprali najprej z ledocetno kislino ter anhidridom očetne kisline ter žveplene kisline, kar je značilno za standardno acetolizo (Morgado in Barth, 2011). Ker smo do podobne kakovosti vzorca prišli tudi s poenostavljeno metodo brez acetolize, smo v nadaljevanju uporabili to metodo (Piana in sod., 2006).

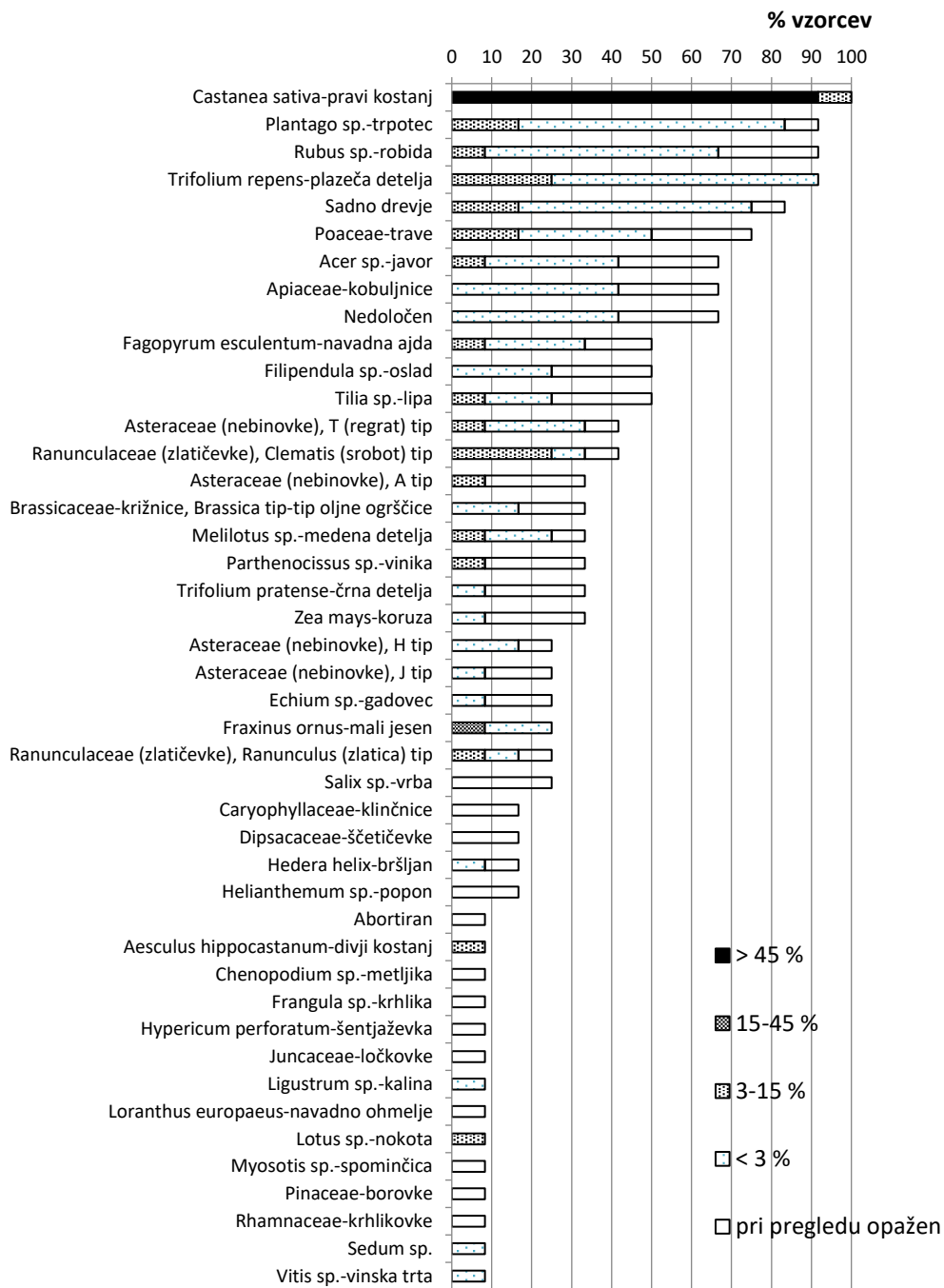
Pelod smo glede na relativno zastopanost razdelili v 4 skupine:

- vodilni pelod - prevladujoč: tega je v vzorcu več kot 45 %,
- spremljajoči pelod - sekundarni pelod: tega je več kot 15 in manj kot 45 %,
- pomembnejši posamični pelod - pomemben pelod, ki je v manjšini: tega je več kot 3 in manj kot 15 %,
- posamični pelod - pelod, ki je v manjšini: tega je manj kot 3 %,
- zapisali smo tudi tisti pelod, ki smo ga med analizo vzorca zgolj opazili.

Pelodna sestava matičnega mlečka odraža območje, v katerem je bil matični mleček pridelan, in je osnovna metoda za določitev geografskega porekla matičnega mlečka. Poleg tega pelodna zrna tudi obogatijo matični mleček z beljakovinami, ki izvirajo iz rastlin.

Tako kot v vzorcih iz preteklega leta, tudi tokrat prevladuje pelod pravega kostanja (*Castana sativa*), kar se sklada tudi s spektrom peloda v medu pridelanem na območju Republike Slovenije. V več kot 97 % vzorcev slovenskega medu je prisoten pelod pravega kostanja, v analiziranih vzorcih mlečka pridelanega v letu 2017 pa je bil le ta prisoten v vseh vzorcih in je edini pelod v matičnem mlečku, ki je prevladujoč, ostale vrste peloda so zastopane v manj kot 45 % (Kandolf in sod., 2017). V medu pridelanem v Republiki Sloveniji je poleg peloda pravega kostanja več tudi peloda sadnega drevja, detelje, javorja, trpotca in malega jesena (Kandolf Borovšak, 2011), ki so prav tako, razen malega jesena, vsi zastopani v več kot 60 % vzorcev matičnega mlečka (slika 13).

V preteklem letu smo v vzorcih matičnega mlečka slovenskega porekla v več kot 80 % vzorcev našli pelode pravega kostanja, plazeče detelje, robide in sadnega drevja, tokrat pa poleg naštetih še pelod trpotca, ki je bil v preteklem letu zastopan v nekaj več kot 70 % vzorcev. Vzorci, ki smo jih analizirali v programskem letu 2018 so bili pridelani večinoma v pozno poletnem času (2017), kar dokazuje večja pogostost peloda pravega kostanja, trpotca pa tudi navadne ajde, ki v vzorcih programskega leta 2017 ni bila prisotna.



Slika 13: Spekter peloda analiziranih vzorcev matičnega mlečka (N=12)

9.2 FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI

V preglednici 24 so predstavljeni rezultati določanja vsebnosti vode, pepela, maščob, beljakovin in 10-HDA ter vrednosti pH in kislosti 12 vzorcev svežega matičnega mlečka, vključenih v programsko leto 2018.

Preglednica 24: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz slovenskega matičnega mlečka programskega leta 2018

Oznaka vzorca	Parameter						
	Vsebnost vode (g/100 g)	Vsebnost pepela (g/100 g)	Vrednost pH	Kislost (ml 0,1 M NaOH/g)	Vsebnost beljakovin (g/100 g)	Vsebnost maščob (g/100 g)	Vsebnost 10-HDA (g/100 g)
K. MLEČEK 2018-1	64,7	1,01	3,91	4,06	13,30	5,20	2,82
K. MLEČEK 2018-2	66,5	1,00	3,91	4,38	12,24	5,71	3,05
K. MLEČEK 2018-3	65,4	1,08	3,82	4,63	12,79	5,81	3,11
K. MLEČEK 2018-4	64,6	1,04	3,81	4,26	12,96	5,03	2,71
K. MLEČEK 2018-5	65,7	1,17	3,80	4,28	12,37	5,28	3,01
K. MLEČEK 2018-6	64,9	1,11	3,85	4,31	12,68	5,09	2,83
K. MLEČEK 2018-7	62,9	1,15	3,86	4,77	13,94	5,38	2,86
K. MLEČEK 2018-8	64,4	0,98	3,84	4,73	12,22	5,97	3,31
K. MLEČEK 2018-9	64,4	0,95	3,94	3,89	12,24	4,02	2,46
K. MLEČEK 2018-10	66,2	0,94	3,75	3,95	11,33	4,04	2,56
K. MLEČEK 2018-11	64,8	1,05	3,82	4,57	12,54	5,01	2,81
K. MLEČEK 2018-12	67,7	1,01	3,94	4,16	11,86	5,34	2,62
Povprečje	65,2	1,04	3,85	4,33	12,54	5,16	2,85
S.D.	1,2	0,07	0,06	0,29	0,68	0,61	0,24
MIN	62,9	0,94	3,75	3,89	11,33	4,02	2,46
MAKS	67,7	1,17	3,94	4,77	13,94	5,97	3,31

S.D.: standardni odklon; MIN: minimalna vrednost; MAKS: maksimalna vrednost

Vsebnost vode v vzorcih matičnega mlečka smo izračunali na podlagi izmerjenega lomnega količnika. Iz preglednice 24 je razvidno, da je vsebnost vode v vzorcih matičnega mlečka slovenskega porekla variirala med 62,9 in 67,7 g/100 g, kar pomeni, da so vsi vzorci ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009) in sicer, da mora biti vsebnost vode v svežem matičnem mlečku med 60 in 70 g/100 g. Vrednosti so ustrezale tudi ISO standardu, ki navaja vsebnost vode v svežem matičnem mlečku v območju 62,0 do 68,5 g/100 g (ISO, 2016). Povprečna vsebnost vode v vzorcih programskega leta 2018 je bila nekoliko manjša (65,2 g/100 g) v primerjavi s programskim letom 2017, ko je znašala 66,3 g/100 g (Kandolf in sod., 2017).

Vsebnost pepela smo določili s suhim sežigom vzorca pri temperaturi 550 °C do konstantne mase. Povprečna vsebnost pepela v analiziranih vzorcih je bila 1,04 g/100 g, z razponom od 0,94 do 1,17 g/100 g. Vsi analizirani vzorci so ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009) in sicer, da mora biti vsebnost pepela v matičnem mlečku v območju med 0,8 in 3 g/100 g pepela. Vsebnosti so dobro primerljive z rezultati vsebnosti pepela v vzorcih matičnega mlečka programskega leta 2017 (od 0,94 do 1,08 g/100 g).

Vrednost pH smo določili z merjenjem pH vodne raztopine vzorcev na predhodno umerjenem pH metru. Vzorci matičnega mlečka so bili glede vrednosti pH zelo izenačeni, razpon je bil le nekoliko večji kot v preteklem letu. Vrednost pH je variirala med 3,73 in 3,87 v vzorcih programskega leta 2017 (Kandolf in sod., 2017) in med 3,75 in 3,94 v vzorcih programskega leta 2018 (preglednica 24).

Kislost matičnega mlečka smo določili titrimetrično, povprečna kislost vzorcev slovenskega matičnega mlečka je bila 4,33, območje pa od 3,89 do 4,77 mL 0,1 M NaOH/g. Vsi analizirani vzorci so glede vrednosti pH in kislosti ustrezali standardom kakovosti za svež matični mleček (Sabatini in sod., 2009; ISO, 2016). V primerjavi s programskim letom 2017 je bila kislost nekoliko večja, lanskoletno območje kislosti vzorcev matičnega mlečka je znašalo od 3,74 do 4,51 mL 0,1 M NaOH/g.

Vsebnost beljakovin smo določili z metodo po Kjeldahlu. Iz preglednice 24 je razvidno, da je bila vsebnost beljakovin v analiziranih vzorcih matičnega mlečka v območju od 11,3 do 13,9 g/100 g, s povprečno vrednostjo 12,5 g/100 g. Vsi vzorci so ustrezali priporočenim vrednostim, kot jih navajajo Sabatini in sod. (2009) (9 do 18 g/100 g) oz. ISO standard (11 do 18 g/100 g). Rezultati vsebnosti beljakovin so primerljivi z rezultati analiz matičnega mlečka v programskem letu 2017 (Kandolf in sod., 2017).

Vsebnost maščob v vzorcih matičnega mlečka smo določili z direktno ekstrakcijo v Soxhletovem aparatu. Vrednosti so variirale od 4,02 do 5,97 g/100 g. Povprečna vsebnost maščob v vzorcih slovenskega matičnega mlečka znaša 5,16 g/100 g, kar ustreza priporočilom za standardno sestavo, ki za svež matični mleček navajajo razpon vrednosti od 3 do 8 g /100 g maščob (Sabatini in sod., 2009) oz. 2 do 8 g/100 g maščob (ISO, 2016). V primerjavi s preteklim letom aplikativne raziskave, je bila v letošnjem letu (programsko leto 2018) vsebnost maščob v povprečju 15 % manjša.

Pomembna komponenta maščobne frakcije matičnega mlečka je 10-HDA. Ta maščobna kislina je značilna samo za matični mleček, zato je njena vsebnost pomemben kriterij njegove pristnosti. Pristen mleček mora vsebovati vsaj 1,4 g/100 g 10-HDA (Sabatini in sod., 2009; ISO, 2016). V vzorcih slovenskega matičnega mlečka je bila povprečna vsebnost 2-krat večja od te vrednosti (2,85 g/100 g), območje je znašalo od 2,46 do 3,31 g/100 g, kar je zelo podobno kot v vzorcih matičnega mlečka v programskem letu 2017 (Kandolf in sod., 2017).

9.3 VSEBNOST SLADKORJEV

Glavna sladkorja matičnega mlečka sta monosaharida fruktoza in glukoza, običajno je prisotna tudi saharoza, ki je bila v vzorcih programskega leta 2017 določena v vseh vzorcih, v vzorcih iz letošnjega leta pa je bila v treh vzorcih vsebnost saharoze pod mejo detekcije (preglednica 25). Za razliko od vzorcev preteklega leta, smo erlozo določili le v enem vzorcu, vsebnost maltoze in melecitoze pa je bila v vseh vzorcih pod mejo detekcije.

Glede na priporočila za standardno sestavo matičnega mlečka (Sabatini in sod., 2009) svež matični mleček vsebuje med 3 in 13 g/100 g fruktoze, med 4 in 8 g/100 g glukoze ter med 0,5 in 2 g/100 g saharoze. Vsota fruktoze, glukoze in saharoze naj bi bila med 7 in 18 g/100 g. ISO standard (2016) navaja nekoliko drugačne vrednosti, in sicer mora matični mleček vsebovati med 2 in 9 g/100 g fruktoze oz. glukoze, manj kot 3 g/100 g saharoze in manj kot 1,5 g/100 g maltoze. Erloze in maltotrioze je lahko manj kot 0,5 g/100 g, vsebnost skupnih sladkorjev pa mora biti v območju med 7 in 18 g/100 g.

V preglednici 25 so podani rezultati določanja vsebnosti posameznih sladkorjev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z IR detektorjem. Analizirani vzorci so vsebovali od 2,3 do 4,0 g/100 g fruktoze, med 4 in 6,2 g/100 g glukoze ter od <0,5 do 3,3 g/100 g saharoze, v treh vzorcih je bila vsebnost saharoze pod mejo detekcije. Vsebnost maltoze in melecitoze je bila v vseh vzorcih pod mejo detekcije, erlozo pa je vseboval le en vzorec matičnega mlečka.

Preglednica 25: Vsebnost sladkorjev v slovenskem matičnem mlečku

Oznaka vzorca	Vsebnost sladkorjev (g/100 g)							
	Fru	Glu	Sah	Mal	Er	Mel	Fru+Glu+Sah	Skupni sladkorji
K. MLEČEK 2018-1	2,6	4,8	1,8	n.d.	0,5	n.d.	9,2	9,7
K. MLEČEK 2018-2	2,3	4,8	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	8	8
K. MLEČEK 2018-3	3,3	6,2	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	10	10
K. MLEČEK 2018-4	2,9	5,1	1,4	n.d.	n.d.	n.d.	9,4	9,4
K. MLEČEK 2018-5	3,4	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,4	8,4
K. MLEČEK 2018-6	3,7	5,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,9	8,9
K. MLEČEK 2018-7	3,6	4	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	8,5	8,5
K. MLEČEK 2018-8	2,9	5,7	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	9,3	9,3
K. MLEČEK 2018-9	2,7	5,1	3,3	n.d.	n.d.	n.d.	11,1	11,1
K. MLEČEK 2018-10	3,2	5,9	1,2	n.d.	n.d.	n.d.	10,3	10,3
K. MLEČEK 2018-11	3,2	5,2	1	n.d.	n.d.	n.d.	9,4	9,4
K. MLEČEK 2018-12	4	5,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,8	9,8
Povprečje	3,15	5,23	1,30	n.d.		n.d.	9,36	9,40
S.D.	0,49	0,60	0,84	n.d.		n.d.	0,87	0,87
MIN	2,30	4,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,00	8,00
MAKS	4,00	6,20	3,30	n.d.	0,50	n.d.	11,10	11,10

Fru: fruktoza; Glu: glukoza; Sah: saharoza, Mal: maltoza; Er: erloza; Mel: melecitoza
 S.D.: standardni odklon; MIN: minimalna vrednost; MAKS: maksimalna vrednost
 n.d.: pod mejo detekcije (< 0,5 g/100 g)

Glede na predlog Sabatini in sod. (2009) pet vzorcev matičnega mlečka ne vsebuje zadostne količine fruktoze (med 3 in 13 g/100 g), glede na ISO standard (2016) pa vsi, razen enega vzorca

v sestavi sladkorjev ustrezajo standardu. Matični mleček tipa 1 ne sme vsebovati več kot 3 g/100 g saharoze, čemur eden od vzorcev ne ustreza. Tudi štirje vzorci v preteklem programskem letu so imeli manj kot 3 g/100 g fruktoze, medtem ko saharoze niso vsebovali več kot 2 g/100 g (Kandolf in sod., 2017).

Vsota vseh sladkorjev znaša od 8 in 11,1 g/100 g (preglednica 25), kar je za približno 8 % več kot v vzorcih iz preteklega leta in je v skladu z ISO standardom (2016).

9.4 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA

Z metodo plinske kromatografije smo v vzorcih matičnega mlečka, vključenih v programsko leto 2018, s pomočjo standardov in/ali masnih spektrov identificirali in kvantitativno določili 7-hidroksioktanojsko kislino, 8-hidroksioktanojsko kislino, 3-hidroksidekanojsko kislino, 9-hidroksidekanojsko kislino, 9-hidroksi-2-decenojsko kislino (9-HDA), 10-hidroksidekanojsko kislino (10-HDAA), 10-hidroksi-2-decenojsko kislino (10-HDA), sebacinsko kislino, 11-hidroksidodekanojsko kislino, 2-decen-1,10-diojsko kislino in 3,10-dihidroksidekanojsko kislino.

Preglednica 26: Maščobnokislinska sestava slovenskega matičnega mlečka

Oznaka vzorca	Vsebnost maščobnih kislin (g/100 g)							
	MK 1	MK 2	MK 3	MK 4	MK 5	MK 6	MK 7	MK 8
K. MLEČEK 2018-1	0,18	0,13	0,11	0,78	2,63	0,12	0,13	0,13
K. MLEČEK 2018-2	0,17	0,12	0,12	0,91	3,09	0,14	0,16	0,15
K. MLEČEK 2018-3	0,20	0,12	0,15	0,86	2,91	0,16	0,19	0,18
K. MLEČEK 2018-4	0,17	0,10	0,12	0,74	2,53	0,13	0,16	0,14
K. MLEČEK 2018-5	0,18	0,11	0,11	0,75	2,49	0,13	0,15	0,14
K. MLEČEK 2018-6	0,21	0,14	0,14	0,92	3,04	0,16	0,18	0,16
K. MLEČEK 2018-7	0,15	0,10	0,09	0,86	2,81	0,11	0,12	0,10
K. MLEČEK 2018-8	0,19	0,12	0,13	0,89	2,88	0,14	0,16	0,16
K. MLEČEK 2018-9	0,10	0,07	0,07	0,63	2,13	0,09	0,11	0,08
K. MLEČEK 2018-10	0,17	0,10	0,13	0,78	2,65	0,14	0,16	0,13
K. MLEČEK 2018-11	0,19	0,11	0,15	0,94	3,16	0,17	0,20	0,18
K. MLEČEK 2018-12	0,21	0,12	0,15	1,10	3,71	0,16	0,19	0,20
Povprečje	0,18	0,11	0,12	0,85	2,84	0,14	0,16	0,15
S.D.	0,03	0,02	0,03	0,12	0,40	0,02	0,03	0,03
MIN	0,10	0,07	0,07	0,63	2,13	0,09	0,11	0,08
MAKS	0,21	0,14	0,15	1,10	3,71	0,17	0,20	0,20

MK: maščobna kislina; S.D.: standardni odklon; MIN: minimalna vrednost; MAKS: maksimalna vrednost
 MK 1: 8-hidroksioktanojska kislina; MK2: 3-hidroksidekanojska kislina; MK 3: 9-HDA; MK 4: 10-HDAA; MK 5: 10-HDA;
 MK 6: sebacinska kislina; MK 7: 2-decen-1,10-diojska kislina; MK 8: 3,10-dihidroksidekanojska kislina

Osem identificiranih maščobnih kislin (8-hidroksioktanojska kislina, 3-hidroksidekanojska kislina, 9-HDA, 10-HDAA, 10-HDA, sebacinska kislina, 2-decen-1,10-diojska kislina in 3,10-dihidroksidekanojska kislina) predstavlja več kot 90 % odziva FID detektorja, vsebnosti teh maščobnih kislin so podane v preglednici 26. Vsebnost 8-hidroksioktanojske kisline, 10-HDAA, 10-HDA in sebacinske kisline smo določili s pomočjo umeritvene krivulje s standardi, ostale maščobne kisline smo podali kot ekvivalent 10-HDA.

Kot je razvidno iz preglednice 26, je matični mleček vseboval največ 10-HDA, sledi 10-HDAA. Razmerje maščobnih kislin v vzorcih matičnega mlečka je zelo konstantno. Delež 10-HDA od vseh določenih maščobnih kislin je znašal 59 do 64 %. Druga najbolj zastopana maščobna kislina matičnega mlečka, 10-HDAA, predstavlja 18 do 20 % delež. Rezultati so primerljivi z ugotovitvami v programskem letu 2017. Ostale maščobne kisline, ki smo jih določili v matičnem mlečku, so zavzele do 4,3 % od vseh določenih maščobnih kislin. Vsebnosti posameznih maščobnih kislin, v g/100 g matičnega mlečka, so podane v preglednici 26 in so približno 20 do 30 % manjše od vsebnosti, ki smo jih določili v vzorcih matičnega mlečka programskega leta 2017, kar lahko deloma pripišemo manjši vsebnosti skupnih maščob.

Povprečne vsebnosti 7-hidroksioktanojske, 9-hidroksidekanojske in 11-hidroksidodekanojske maščobne kisline so bile bistveno manjše in niso prikazane v preglednici 26, povprečne vsebnosti so znašale 0,028 g/100 g, 0,024 g/100 g oz. 0,037 g/100 g.

9.5 IZBRANI FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI SKLADIŠČENIH VZORCEV

Vzorci matičnega mlečka z oznakami K. MLEČEK 2018-1, 3, 6 in 7 smo od pet do šest mesecev skladiščili v zmrzovalniku, vzorce z oznakami K. MLEČEK 2018-2, 9, 10 in 11 pa 5 do šest mesecev v hladilniku ter po končanem skladiščenju določili vsebnost vode, beljakovin, maščob, pH vrednost ter kislost. V vzorcih z oznakami K. MLEČEK 2018 3, 7, 9,11 smo po 2-mesečnem skladiščenju v hladilniku oz. zmrzovalniku določili tudi vsebnost 10-HDA ter sladkorjev, rezultati so prikazani v preglednici 27.

Spremembe vsebnosti vode v vzorcih matičnega mlečka med shranjevanjem v hladilniku ali zmrzovalniku so zanemarljive, znašajo od 0 do 1,2 %. Vrednost pH vzorcev se je nekoliko znižala ne glede na način skladiščenja, vendar je še vedno primerljiva z analizirani vzorci v tem in preteklem letu, pred staranjem so bile vrednosti med 3,75 in 3,94, v povprečju 3,86, po staranju pa med 3,68 in 3,77 v povprečju 3,72. Tudi spremembe kislosti vzorcev matičnega mlečka so bile zelo majhne in so znašale do 3 %. Vsebnost beljakovin se je v skladiščenih vzorcih matičnega mlečka večinoma minimalno zmanjšala (do 6 %, preglednici 24 in 27), vsebnost maščob pa se je v vzorcih matičnega mlečka med 5 do 6-mesečnim skladiščenjem povečala od 4 do 8 %. Vsebnost 10-HDA se je zmanjšala minimalno ne glede na način skladiščenja, pred staranjem so bile vsebnosti 10-HDA v analiziranih vzorcih od 2,46 do 3,11

g/100 g v povprečju 2,81 g/100 g, po staranju pa od 2,47 do 3,13 g/100 g, v povprečju 2,78 g/100 g.

Preglednica 27: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz slovenskega matičnega mlečka po skladiščenju

Oznaka vzorca	Parameter					
	Vsebnost vode (g/100 g)	Vrednost pH	Kislost (ml 0,1 N NaOH/g)	Vsebnost beljakovin (g/100 g)	Vsebnost maščob (g/100 g)	Vsebnost 10-HDA (g/100 g)
K. MLEČEK 2018-1-Z	64,8	3,72	4,13	13,26	5,39	/
K. MLEČEK 2018-2-H	67,0	3,77	4,46	12,22	5,97	/
K. MLEČEK 2018-3-Z	66,0	3,74	4,62	12,29	6,19	3,13
K. MLEČEK 2018-6-Z	64,9	3,7	4,38	12,68	5,31	/
K. MLEČEK 2018-7-Z	62,8	3,71	4,62	13,13	5,63	2,76
K. MLEČEK 2018-9-H	63,6	3,75	3,91	12,02	4,34	2,47
K. MLEČEK 2018-10-H	66,2	3,71	4,09	11,50	4,38	-
K. MLEČEK 2018-11-H	65,0	3,68	4,54	12,60	5,27	2,74

Z: zmrzovalnik; H: hladilnik

Vsi parametri matičnega mlečka, ki smo ga nekaj mesecev skladiščili v hladilniku oz. zmrzovalniku so še vedno ustrezali kriterijem kakovosti mednarodnega standarda ISO in predlagane standardne sestave. Razlike med svežim in skladiščenim matičnim mlečkom so bile majhne (manj kot 10 %, v nekaterih primerih tudi manj kot 0,5 %). Žohar (2018), ki je v okviru diplomskega dela vse vzorce matičnega mlečka 5 do 6 mesecev skladiščila v hladilniku in v zmrzovalniku, navaja, da so bile spremembe večinoma večje pri matičnem mlečku, shranjenem v hladilniku, kot pri matičnem mlečku, shranjenem v zamrzovalniku. V okviru diplomskega dela je vrednotila tudi spremembe barve med 6-mesečnim skladiščenjem, le-ta je postala temnejša. Kromogena reakcija je dodatno pokazala, da se barva svežega matičnega mlečka razlikuje od barve matičnega mlečka, shranjenega na sobni temperaturi. Ta reakcija je uporabna za hitro oceno svežosti matičnega mlečka (Žohar, 2018).

Tudi če pogledamo rezultate analiz vzorcev matičnega mlečka, ki so bili analizirani v programskem letu 2017, pridobljeni pa v letu 2016, kar pomeni, da so bili v času analiz stari približno eno leto (Kandolf in sod., 2017), so bile vrednosti znotraj mej, ki smo jih določili v svežih vzorcih programskega leta 2018 (pred skladiščenjem) oz. vrednosti, ki so bile v programskem letu 2017 določene v svežih vzorcih.

Razmerja sladkorjev v matičnem mlečku so se po skladiščenju nekoliko spremenila (preglednica 28), predvsem v vsebnosti fruktoze in saharoze. Rezultate je sicer težko med sabo primerjati, saj analize niso bile opravljene istočasno (v istih pogojih), bomo pa število analiz

vsebnosti sladkorjev v matičnem mlečku v naslednjem programskem letu povečali, da bomo lahko podali bolj jasne zaključke.

Preglednica 28: Vsebnost sladkorjev v slovenskem matičnem mlečku po skladiščenju

Oznaka vzorca	Vsebnost sladkorjev (g/100 g)							
	Fru	Glu	Sah	Mal	Er	Mel	Fru+Glu+Sah	Skupni sladkorji
K. MLEČEK 2018-3-Z	4,5	5,9	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	11,1	11,1
K. MLEČEK 2018-7-Z	4,7	4,3	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	10,1	10,1
K. MLEČEK 2018-9-H	3,6	5,0	4,0	n.d.	n.d.	n.d.	12,6	12,6
K. MLEČEK 2018-11-H	4,1	4,7	1,2	n.d.	n.d.	n.d.	10,0	10,0

Fru: fruktoza; Glu: glukoza; Sah: saharoza, Mal: maltoza; Er: erloza; Mel: melecitoza
n.d.: pod mejo detekcije (< 0,5 g/100 g)

10 ZAKLJUČEK

V drugem letu aplikativne raziskave Karakterizacija čebeljih pridelkov ter vpliv postopkov obdelave in shranjevanja cvetnega prahu na njegovo kemijsko in mikrobiološko sestavo smo analizirali 12 vzorcev slovenskega matičnega mlečka. Zbranim vzorcem smo določili vsebnost vode, pepela, beljakovin, maščob, 10-hidroksi-2-decenojske kisline (10-HDA), sladkorjev, vrednost pH, kislost, maščobnokislinsko sestavo ter opravili pelodno analizo. Ugotavljali smo tudi ali se kakovostni parametri (vsebnost vode, beljakovin, maščob, 10-HDA in sladkorjev, pH vrednost ter kislost) v matičnem mlečku po shranjevanju v hladilniku ali zmrzovalniku spremenijo glede na svež matični mleček.

Dobljeni rezultati so večinoma v okviru vrednosti, ki jih navaja ISO standard, pri enem vzorcu matičnega mlečka odstopa samo vsebnost saharoze, nekateri vzorci pa odstopajo v vsebnosti fruktoze in saharoze glede na predlog Sabatini in sod. (2009), tako da je raziskava podala pomembne rezultate, ki bodo lahko pomagali pri pripravi ustrezne zakonodaje s tega področja.

Rezultati so dobro primerljivi z rezultati analiz matičnega mlečka v programskem letu 2017 ter z do sedaj objavljenimi rezultati za navedene parametre v okviru tujih raziskav. Podrobna primerjava z rezultati tujih raziskav bo predstavljena v končnem poročilu. Prav tako bodo v končnem poročilu prikazani statistično obdelani podatki analiz celotnega obdobja raziskave.

Vsi, razen prej omenjene saharoze, analizirani parametri matičnega mlečka, ki smo ga skladiščili določeno obdobje v hladilniku oz. zmrzovalniku, so še vedno ustrezali kriterijem kakovosti mednarodnega standarda ISO in predlagane standardne sestave. Med skladiščenjem je postala barva matičnega mlečka temnejša. Spremembe barve so bile večje pri matičnem mlečku, shranjenem v hladilniku. Prav tako je med skladiščenjem prišlo do manjših sprememb v sestavi matičnega mlečka, ki so bile večinoma manj izražene pri matičnem mlečku, shranjenem v zmrzovalniku (Žohar, 2018). Razlike med svežim in skladiščenim matičnim mlečkom so bile

majhne (manj kot 10 %, v nekaterih primerih tudi manj kot 0,5 % za posamezne vzorce), nekoliko večje so bile le pri vsebnosti sladkorjev, zato bomo število analiz vsebnosti sladkorjev v naslednjem letu povečali, število analiz nekaterih ostalih parametrov pa zmanjšali.

11 VIRI

APIFRESH (Developing European standards for bee pollen and royal jelly: quality, safety and authenticity). Final Report Summary

http://cordis.europa.eu/result/rcn/144275_en.html (junij 2017)

<http://www.inspiralia.com/apifresh> (junij 2017)

Antinelli J.F., Zeggane S., Davico R., Rognone C., Faucon J.P., Lizzani L. 2003. Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly. *Food Chemistry*, 80, 1: 85-89

Antinelli J.F., Davico R., Rognone C., Faucon J.P., Lizzani-Cuvelier L. 2002. Application of solid/liquid extraction for the gravimetric determination of lipids in royal jelly. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 8: 2227-2230

Bărnuțiu I.L., Mărghitaș Al.L., Dezmirean S.D., Mihai M.C., Bobiș O. 2011. Chemical composition and microbial activity of royal jelly – review. *Animal Science and Biotechnologies*, 44, 2: 67-72

Bogdanov S. 2011. The royal jelly book: Royal jelly and bee bread: harvest, composition, quality. V: *The royal jelly book*, 1: 1-13

<http://www.bee-hexagon.net/royal-jelly/> (junij 2017)

Bogdanov S. 2009. Harmonised methods of the International Honey Commission. Bern, Swiss Bee Research Center, International Honey Commission, World Network of Honey Science: 46-48

<http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf> (junij 2017)

Boselli E., Caboni M.F., Lercker G., Marcazzan G.L., Sabatini A.G., Baggio A., Prandin L. 2002. Valutazione di produzioni apistiche: gelatina reale e cera. V: *Atti del convegno finale del Progetto Finalizzato AMA "Il ruolo della ricerca in apicoltura"*: 321-329

Božnar A. 2011. Matični mleček. V: *Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje*. Zdešar P. (ur.). Lukovica, Čebelarška zveza Slovenije: 335-362

Chen C., Chen S. 1995. Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food Chemistry*, 54, 2: 195-200

- Daniele G., Casabianca H., 2012. Sugar composition of French royal jelly for comparison with commercial and artificial sugar samples. *Food Chemistry*, 134: 1025-1029
- Feroli F., Marcazzan L.G., Caboni F.M. 2007. Determination of (E)-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly: A comparison between a new CZE method and HPLC. *Journal of Separation Science*, 30: 1061-1069
- Feroli F., Armaforte E., Caboni M.F. 2014. Comparison of the lipid content, fatty acid profile and sterol composition in local Italian and commercial royal jelly samples. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 6: 875–884
- Fratini F., Cilia G., Mancini S., Felicioli A. 2016. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological Research*, 192: 130-141
- Garcia-Amoedo L.H., Almeida-Muradian L.B. 2007. Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. *Quimica Nova*, 30, 2: 257-259
- Genç M., Aslan A. 1999. Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 839, 1-2: 265-268
- Hu F. L., Bilikova K., Casabianca H., Daniele G., Espindola F. S., Feng M., Guan C., Han B. Krakova T. K., Li J. K., Li X. A., Šimuth J., Wu L. M., Wu Y. Q., Xue X. F., Xue Y. B., Yamaguchi K., Zeng T. J., ZHeng H. Q., Zhou J. H. 2017. Standard methods for *Apis mellifera* royal jelly research. *Journal of Apicultural Research*, 1-68
- Isidorov V.A., Bakierb S., Grzech I. 2012. Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of volatile and extractable compounds of crude royal jelly. *Journal of Chromatography B*, 885–886: 109-116
- ISO 12824. Royal jelly – Specifications. 2016: 35 str.
- Kandolf Borovšak A. 2011. Pelodna sestava medu iz različnih fitogeografskih območij Slovenije. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 190 str
- Kandolf B. A., Lilek, N., Bertoncej, J., Korošec, M., Klemenčič Štrukelj, N. (2017): Letno poročilo aplikativne raziskave Karakterizacija čebeljih pridelkov ter vpliv postopkov obdelave in shranjevanja cvetnega prahu na njegovo kemijsko in mikrobiološko sestavo. Lukovica: Čebelarska zveza Slovenije, str. 51-81.

- Kanelis D., Tananaki C., Liolios V., Dimou M., Goras G., Rodopoulou M. A., Karazafiris E., Thrasyvoulou A. 2015. A suggestion for royal jelly specifications. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66: 275-284
- Kim K.J., Son H.J., Kim H.K. 1989. A survey of analyzing in gradient of royal jelly in Korea on majoring 10-HDA. *Korean Journal of Apiculture*, 4: 34-40
- Marconi E., Fiorenza Caboni M., Messia C.M., Panfili G. 2002. Furosine: a suitable marker for assessing the freshness of royal jelly. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2825-2829
- Mărghitas Al.L., Morar O., Bobiș O., Bonta V., Dezmirean D., Tofalvi M. 2010. Evaluation of fresh royal jelly in different larvae stage. *Bulletin Animal Science and Biotechnologies*, 67, 1-2: 29-35
- Morgado L. N., Barth O. M. 2011. The detection of pollen in royal jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 3, 3: 137-139
- Piana M. L., Belligoli P., Persano Oddo L., Piperno S. 2006. Pollen analysis of royal jelly: Contribution to analytical methods and characterization. *Apiacta*, 41: 28-43
- Plestenjak A., Golob T 2003. *Analiza kakovosti živil*. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 96-98
- Popescu O., Mărghitas Al.L., Dezmirean S.D., Mureșan O.L, Laslo L., Tofalvi M. 2008. A characterization about physical-chemical composition of royal jelly. *Bulletin Animal Science and Biotechnologies*, 67, 1- 2: 244-248
- Ramadan F.M., Al-Ghamdi A. 2012. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4, 1: 39-52
- Sabatini G.A., Marcazzan L.G., Caboni F.M., Bogdanov S., Bicudo de Almeida-Muradian L. 2009. Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 1: 16-21
- Schmitzova J., Klaudivy J., Albert S., Schroder W., Schreckengost W., Hanes J. 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54: 1020-1030

- Sesta G., Lusco L. 2008. Refractometric determination of water content in royal jelly. *Apidologie*, 39: 225-232
- Sesta G. 2006. Sviluppo di metodologie analitiche per la determinazione di residue e la caratterizzazione applicate alla gelatina reale. Università degli studi la Sapienza. Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali Dipartimento di Chimica: 3-7; 105-106
- Stocker A., Rossmann A., Kettrup A., Bengsch E. 2006. Detection of royal jelly adulteration using carbon and nitrogen stable isotope ratio analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2: 181-184
- Šimúth J. 2001. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 32, 1: 69-80
- Šimúth J., Bíliková K., Kováčová E. 2003. Royal jelly proteins as a tool for development of functional ingredients for health. Standing Commission of Apitherapy: 5 str.
<http://www.fiitea.org/foundation/files/312.pdf> (julij 2017)
- Winston M. L., 1987. *The Biology of the honey bee*. London, Harvard University Press: 1-224
- Wongchai V., Ratanavalachai T. 2002. Seasonal variation of chemical composition of royal jelly produced in Thailand. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 7, 2: 1-8
- Zheng H.Q., Hu F.L., Dietemann V. 2010. Changes in composition of royal jelly harvested at different times: consequences for quality standards. *Apidologie*, 41: 1-9
- Zhou J., Zhao J., Yuan H., Meng Y., Li Y., Wu L., Xue X. 2007. Comparison of UPLC and HPLC for determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in royal jelly by ultrasound-assisted extraction with internal standard. *Chromatographia*, 66, 3-4: 185-190
- Žohar T. 2018. Vpliv skladiščenja na nekatere parametre matičnega mlečka. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23 str.
<https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=112064&lang=slv>

12 PREGLED OBJAV O PROPOLISU

Propolis je lepljiva, smolnata snov, grenkega okusa in močnega, prijetnega vonja po rastlinskih popkih, medu, vosku. Že v antiki so mu namenjali posebno pozornost. Čebelarji so opazovali čebele, kako so pred vhodom v svoje panje gradile steno iz propolisa. Beseda propolis izvira iz dveh besed »pro« pomeni pred, »polis« pa mesto (Burdock, 1998). Latinska beseda propolis pa pomeni zamazati, zgladiti. Beseda propolis je prepoznavna celemu svetu, v vseh jezikih, zgodovinska odkritja pa kažejo, da so ga v medicini uporabljali tako stari Egipčani, Babilonci, Arabci, stari Grki, Rimljani, Kitajci in tudi drugi stari narodi našega planeta. Propolisu pravimo tudi zadelavina.

Glavna funkcija propolisa v panju je ohranjanje sterilnega okolja v njem in preprečevanje nastanka bolezni v čebelji družini. Je gradbeni in dezinfekcijski material v panju, saj je naravni antibiotik s širokim spektrom delovanja. Deluje protimikrobno, protivnetno, proti tumorjem, ulcerjem in drugim povzročiteljem bolezni, je dober antioksidant (Huang in sod., 2014).

Izdelki iz propolisa se prodajajo kot prehransko dopolnilo, uporabni so v medicini in kozmetiki (Medić Šarić in sod., 2013). V različnih državah imajo različen status. V Nemčiji, Veliki Britaniji, Švici veljajo za zdravilo, v Avstriji, ZDA, Braziliji in na Japonskem pa kot prehransko dopolnilo. Glede statusa so različne zahteve (Jedlovčnik, 2011). Obstajajo prizadevanja za grobo standardizacijo osnovnih količin nekaterih sestavin v propolisu, kar pa je zelo težavno, saj so med njimi ogromne razlike, kljub vsemu pa vsi kažejo podobno mikrobiološko aktivnost (Medić Šarić in sod., 2013), ki je lahko posledica sinergističnega delovanja sestavin propolisa (Huang in sod., 2014).



Slika 14: Propolis pridobljen na namensko vstavljenih pripomočkih.

12.1 NASTANEK IN NALOGA PROPOLISA

Naloga smole na popkih je, da jih zaščiti pred zmrzaljo. Nabiranje smol je naloga posameznih čebel v glavnem po paši, v času paše dajejo prednost nektarju, mani in cvetnemu prahu.

Nabiralni nagon po nabiranju je odvisen od potreb in moči čebelje družine. Močnejša kot je čebelja družina, večje so njene potrebe po propolisu, zato je intenzivnejše tudi iskanje surovin za propolis. Večje količine propolisa lahko pričakujemo v močnejših čebeljih družinah, zato je pomembno, da imamo v času pridobivanja namenskega propolisa močne čebelje družine.

Smole nabirajo vsaj 15 dni stare čebele. Za čebele se uporabno zmeščajo pri okoli 20 °C. Pri tej toploti so čebele na delu med 10. in 16. uro dneva. Čez dan tovor odlagajo na stične točke delov v panju, najraje v reže, in propolizirajo šele po 16. uri (Jedlovčnik, 2011). Nabranim smolam čebele dodajo še izloček žlez slinavk ter vosek, da snov postane bolj lepljiva (Burdock, 1998).

Največ smol naberejo čebele na iglastem drevju, topolih, brezi, vrbah, jelšah, divjem kostanju, brestu in na koščičastih sadnih drevesih (Burdock, 1998) in to v avgustu, septembru in oktobru. Letni pridelek je odvisen od geografske in klimatske lege čebelnjaka, od primernega rastlinstva v okolici čebelnjaka, od čebelarjeve tehnologije zbiranja, od vrste/rase čebel, od moči čebelje družine in od vrste panja. Letni donos znaša od 20 do 400 g na čebeljo družino, kavkaška čebelja družina pa lahko zbere tudi od 250 do 1000 g propolisa na leto.

Čebele s propolisom razkužijo notranje panjske površine in vse dele panja, zamašijo reže in odprtine v panjskih delih, v krajih z zelo nizkimi temperaturami včasih celo zožijo žrela. Najbolj propolizirajo prostore tik ob žrelu. Čebele z njim razkužijo celice, ki jih bo matica zalegla, pritrjujejo premične dele v panju in ga dodajajo pri izdelavi satja. S propolisom premažejo tudi vse vsiljivce, ki so jih ubile v panju, s čimer preprečijo razpad teh organizmov in razmnoževanje klic v razpadajočem telesu vsiljivcev in okužbo družine (Jedlovčnik, 2011).

12.2 SESTAVA PROPOLISA

Sestava propolisa je raznolika, odvisna je od rastlin, na katerih so čebele nabirale surovine zanj, od klimatskih razmer v času nabiranja pa tudi od načina pridobivanja in vrste čebel, ki imajo močno preferenco do posameznega tipa rastlin (Bankova in sod., 2000). V grobem propolis sestavljajo smole (fenolne spojine) in rastlinski balzami (50 %), vosek (30 %), eterična olja in aromatične spojine (10 %), cvetni prah (5 %) ter druge sestavine, kot so amino kisline, vitamini, minerali in netopne snovi (Burdock, 1998; Sforcin, 2007; Coneac in sod., 2008).

Doslej so v propolisu identificirali več sto različnih sestavin. Glavne so fenolne spojine: flavonoidi (flavoni, flavonoli in flavanoni) ter fenolne kisline in njihovi estri, ki so odgovorni za antivirusno in protivnetno delovanje propolisa. Naravni fenoli delujejo tudi kot antioksidanti.

Najbolj značilne fenolne spojine propolisa so: pinocembrin, pinobanksin, fenetilni ester kavne kisline (CAPE), artepilin C, cimetna, kumarna, kavna, ferulna in izoferulna kislina, ter krizin, galangin, kamferol in kvercetin (Huang in sod., 2014).

12.2.1 Flavonoidi

Največ je v propolisu flavonoidov, ki tudi prispevajo največ k njegovi farmakološki aktivnosti in se uporabljajo za ocenjevanje kakovosti propolisa, pridelanega v zmernem klimatskem pasu (Kosalec in sod., 2004). Delijo se v flavone, flavonole, flavanone, itd. V propolisu zmernega klimatskega pasu so od flavonoidov najbolj zastopani: krizin, galangin, pinocembrin in pinobanksin. Propolis, ki ga pridelata *Apis mellifera carnica*, ima manjšo protibakterijsko učinkovitost kot propolis *A. m. anatolica* in *caucasica*. Čeprav različne vrste čebel preferirajo različne rastline, pa sestava propolisa posamezne vrste čebele ni vedno enaka (Huang in sod., 2014).

12.2.2 Fenolne spojine

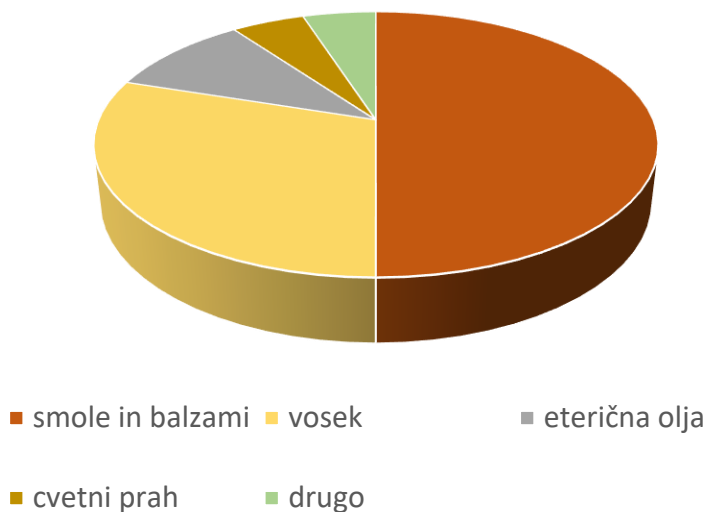
Najbolj značilne fenolne spojine v propolisu so cimetna, kumarna, kavna, ferulna kislina in njihovi derivati. Fenetilni ester kavne kisline (CAPE) je glavna sestavina propolisa zmernega pasu in ima široko biološko vlogo (Bankova, 2009). Vsebnost fenolov v propolisu je zelo različna in je odvisna od rastlinja, kjer so čebele nabrale smole ter sezone nabiranja (Medić-Šarič in sod., 2013) in vrste čebel (Huang in sod., 2014).

12.2.3 Terpenoidi

Propolis vsebuje le 10 % hlapnih sestavin, vendar kljub temu prispevajo značilen vonj in farmakološko aktivnost propolisa. Imajo glavno vlogo pri razlikovanju pravega propolisa od potvorjenega in delujejo antioksidativno ter antimikrobno (Huang in sod., 2014). V večji meri so prisotni v propolisu mediteranskega območja (Falcão in sod., 2012).

12.2.4 Druge snovi

Propolis vsebuje tudi cvetni prah, minerale, kot so Ca, K, Mg, Na, Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Ni, Sr in Zn, pa tudi Cd, Hg, Pb, pa tudi vosek, ki je proizvod čebel, in ne izvira iz rastlin (Huang in sod., 2014). Znano je, da je vsebnost voska v propolisu mnogo večja, kadar ga pridobivamo iz medišča (Jedlovčnik, 2011).



Slika 15: Povprečna sestava propolisa

12.3 VRSTE PROPOLISA

Material, iz katerega čebele proizvajajo propolis, je izloček rastlin pa tudi snovi, ki se izločajo na ranah rastlin: lipofilne snovi na listih in popkih, smole, sluzi, ... Sestava izvorne snovi določa kemijsko sestavo propolisa, saj jo čebele ne spreminjajo (Bankova, 2005). Čebele smolo prežvečijo, dodajo encime slinske žleze, zmešajo z voskom in uporabijo v panju (Burdock, 1998). Propolis tako sestavljajo snovi z rastlin, izločki čebel in snovi, ki se dodajo v propolis med njegovo uporabo (Marcucci, 1995).

Propolis se deli v več vrst. Za Evropo, Severno Ameriko in netropske predele Azije je značilen *topol tip propolisa*, ki je v glavnem sestavljen iz aktivnih snovi, kot so flavoni, flavanoni ter cimetna kislina in njeni estri. V Rusiji prevladuje *tip breze*, ki prav tako vsebuje flavone in flavonole, vendar drug tip. Za Brazilijo je značilen *zeleni propolis*, poznamo pa še *rdeči propolis* (Kuba, Venezuela), s pacifiškega območja je *pacifiški propolis*, s Kanarskih otokov pa *kanarski*, za katere so značilne druge snovi (Bankova, 2005).

Najbolj je raziskan topol tip propolisa. Topoli so značilni za Evropo in tako se navadno tudi imenuje evropski propolis »propolis topol tipa«, ki je bogat s flavonoidi in fenil propanoidi ter fenoli in njihovimi estri. Omenjeni tip propolisa je najbolj razširjen, predvsem v zmerno toplem klimatskem pasu (Hunag in sod., 2014). Za karakterizacijo topol tipa propolisa je potrebno določiti skupne flavone, flavonole, flavanone in dihidroflavonole ter skupno vsebnost fenolov, pri čemer tipičen topol tip propolisa vsebuje 8 ± 4 % flavonov/flavonolov, 6 ± 2 % flavanonov/dihidroflavonolov, 28 ± 9 % skupnih fenolov (Bankova, 2005) in najmanj 45 % balzamov (Popova in sod., 2007). Od flavonoidov propolis tipa topola vsebuje predvsem pinocembrin, pinobanksin, krizin in galangin ter fenolne kisline in njihove estre (Bankova in

sod., 2000), vsebnost skupnih flavonoidov v evropskem propolisu je navadno od 20 do 30 %, (Medić Šarić in sod., 2013).

V 16 vzorcih propolisa zbranih v programskem letu 2017 smo določili od 1,64 do 12,45 %, v povprečju 4,53 % fenolnih spojin. Največ fenolnih spojin je vseboval vzorec številka 21 iz osrednje Slovenije, ki je bil tudi po senzoričnih lastnosti med najbolj aromatičnimi, najmanj pa vzorec številka ena, prav tako iz osrednje Slovenije. Tudi sicer so imeli največjo vsebnost fenolnih spojin vzorci iz osrednje ter jugovzhodne Slovenije. Vsi vzorci propolisa so vsebovali *p*-kumarno kislino v območju od 0,58 do 2,38 %, v povprečju 1,5 % in ferulno kislino v območju od 0,25 do 3,1 % v povprečju 1,23 % (Kandolf in sod., 2017).

12.4 LASTNOSTI PROPOLISA

Barva svežega propolisa je od zeleno rumene do temno rjave, odvisno od izvora rastlin in tudi starosti (Marcucci, 1995). Breza daje propolis temnejših odtenkov, jelša rumenega, divji kostanj rdečega. Ščasoma posamezne barve potemnjajo. Star propolis je črne barve, odvisno od začetne barve. Nekatere vrste propolisa so namreč izredno svetle barve (Jedlovčnik, 2011).

Pri višjih temperaturah je lepljiv, pri nizkih pa krhek ter se ob lomljenju drobi. Po shranjevanju v zmrzovalniku ga lahko zmeljemo v fin prah. Ima aromatičen vonj in grenek do rahlo sladek okus (Medić Šarić in sod., 2013).

S segrevanjem propolis spremeni svojo strukturo:

- pri 0–15 °C je trd in grudast,
- nad 30 °C postane gnetljiv in se da oblikovati,
- do 60 °C je lepljiv,
- od 60–80 °C je tekoč,
- nad 80 °C je hlapen (Jedlovčnik, 2011).

Propolisove sestavine topijo različna topila do določenih deležev (%). Nobeno topilo ne topi vseh sestavin. Toplota topljenje pospešuje (Jedlovčnik, 2011).

Topnost propolisa je odvisna od:

- dolžine ekstrakcije,
- temperature in vrste topila,
- velikosti propolisovih delcev (prah).

Topila:

- etanol ga topi od 50 do 65 %,
- eter, segret na 34 °C, do 68 %,
- aceton do 40 %,

- vroča voda do 10 %,
- propilenglikol, polietilenglikol, ricinusovo olje z dodatkom benzilalkohola,
- najbolje se topi v mešanicah eter-etanol (Jedlovčnik, 2011).

12.5 PRIDOBIVANJE PROPOLISA

Propolis lahko zbiramo priložnostno ali načrtno. **Priložnostno** zbiramo pridelek, ki so ga čebele odložile v panjih, med vratci, na mreži, na podložnih palicah, na matični rešetki. To delo opravljamo v hladnejših jesenskih dneh, ko propolis ni več lepljiv. Glede na postopek ima takšen propolis več ali manj primesi, od ostankov lesa, barve, jajčec vešče, dele odmrlih čebel, veliko voska, morebitne ostanke papirja in druge nečistoče. Čebelar takšne nečistoče ne sme uporabljati za izdelavo izdelkov na osnovi propolisa.

Posebej pomembno je, da čebelja družina v panju, v katerem čebelar pridobiva propolis, ni bila zdravljena s kemičnimi sredstvi, ki se sicer kopičijo predvsem v propolisu in vosku. Propolis, ki vsebuje ostanke zdravil, lahko uporabljamo le za tehnične namene, za premaze, zaščito lesa, nikakor pa ne za uporabo v prehrani, zdravilstvu in kozmetiki.

Pri **načrtnem** zbiranju propolisa načrtujemo postopke in sredstva, s katerimi bomo zagotovili neoporečni pridelek. Pri zbiranju uporabljamo izključno materiale, ki so primerni za uporabo v živilstvu. Tehnike načrtnega zbiranja propolisa so odvisne od tipa panja in od izbranih pripomočkov.

Propolis lahko pridelujemo v vsakem tipu panja, vsak tip panja ima svoje dobre in slabe lastnosti. Za pridobivanje propolisa je tako primeren vsak tip panja, v katerega lahko vstavimo namenske pripomočke nad plodišče oziroma tik ob gnezdu, torej na mesta kamor čebele najraje odlagajo propolis (Jedlovčnik, 2011).

13 MATERIAL IN METODE

13.1 NAČRT ZBIRANJA VZORCEV

V raziskavo smo vključili 10 vzorcev propolisa slovenskega porekla, pridelanega v letu 2017, iz sedmih statističnih regij Slovenije. Podatki o analiziranih vzorcih (št. vzorca, statistična regija in letnik pridelave) so zbrani v preglednici 29.

Preglednica 29: Seznam vzorcev propolisa

Oznaka	Statistična regija	Letnik pridelave
PR2018-1	Savinjska	2017
PR2018-2	Jugovzhodna Slovenija	2017
PR2018-3	Podravska	2017
PR2018-4	Podravska	2017
PR2018-5	Podravska	2017
PR2018-6	Gorenjska	2017
PR2018-7	Gorenjska	2017
PR2018-8	Koroška	2017
PR2018-9	Jugovzhodna Slovenija	2017
PR2018-10	Obalno-kraška	2017

Vzorci propolisa smo pregledali in odstranili fizikalne nečistoče (delčki čebel,...), nato smo vzorce stehtali in pripravili za analizo.



Slika 16: Vzorci propolisa

13.2 ANALIZA PROPOLISA

V propolisu so najbolj zastopane spojine: pinocembrin, pinobanksin, krizin, galangin, kamferol in kvercetin fenetilni ester kavne kisline (CAPE), artepilin C, cimetna, kumarna, kavna, ferulna in izoferulna kislina (Huang in sod., 2014), ki so bile razen izoferulne kisline in pinobanksina določene tudi v naših vzorcih. Analize je opravilo podjetje Intertek GmbH iz Bremna, Nemčija. Uporabljena je bila metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem (HPLC-UV) (Popova in sod., 2007).

Pred analizo smo vzorce tudi senzorično ocenili pri čemer smo ocenili videz, barvo in vonj.

14 REZULTATI IN RAZPRAVA

14.1 SENZORIČNA OCENA IN IZVOR OSNOVNE SUROVINE

Barva propolisa je bila od svetlo rjave do temne rjave. Vzorci so bili v obliki finega prahu, drobnih do srednje velikih zrn. Vzorci so bili suhi. Večina vzorcev je bila srednje aromatična, dva vzorca manj aromatična, dva pa bolj aromatična. Najbolj aromatična vzorca sta prihajala iz dolenske in primorske regije, najmanj aromatična vzorca propolisa sta prihajala iz gorenjske in jugo vzhodne Slovenije (preglednica 30). Med barvo in aromatičnostjo nismo ugotovili povezav. V zmerno klimatskem pasu je najbolj poznam propolis tip topola, saj čebele največ smol naberejo prav na topolu.

Preglednica 30: Rezultati senzorične ocene posameznih vzorcev

Številka vzorca	Videz	Barva	Vonj
PR2018-1	fina do srednje velika zrnca	svetlečaa, temno rjava	srednje aromatičen
PR2018-2	fina do srednje velika zrnca	svetlo rjava	močno aromatičen
PR2018-3	fina do srednje velika zrnca	svetlečaa, temno rjava	srednje aromatičen
PR2018-4	fina do srednje velika zrnca	svetleča, temno rjava	srednje aromatičen
PR2018-5	v prahu, zrnat	svetlo rjava, svetleč	srednje aromatičen
PR2018-6	fin prah, večja zrna	svetlo rjava	malo aromatičen
PR2018-7	fina do srednje velika zrnca	svetleča, temno rjava	srednje aromatičen
PR2018-8	drobna zrnca	rjava, svetleča	srednje aromatičen
PR2018-9	drobna zrnca	svetlo rjava	malo aromatičen
PR2018-10	fina do srednje velika zrnca	svetlo rjava, oker	močno aromatičen

14.2 VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN

Sestava propolisa je raznolika, odvisna je od rastlin, na katerih so čebele nabirale surovine zanj, od klimatskih razmer v času nabiranja pa tudi od načina pridobivanja in vrste čebel, ki imajo močno preferenco do posameznega tipa rastlin (Bankova in sod., 2000).

V propolisu so dosedaj identificirali več sto različnih sestavin. Glavne so fenolne spojine: flavonoidi (flavoni (apigenin), flavonoli (kamferol, galangin, kvercetin) in flavanoni (naringenin, pinocembrin)) ter fenolne kisline in njihovi estri (kumarna, ferulna, cimetna, kavna kislina, CAPE).

Od flavonoidov propolis tipa topola vsebuje predvsem pinocembrin, pinobanksin, krizin in galangin ter fenolne kisline in njihove estre od teh sta najbolj pogosta cimetna kislina in CAPE (Bankova in sod., 2000).

Vsota analiziranih fenolnih spojin v vzorcih je bila v območju od 0,81 do 5,53 %, v povprečju 3,38 %. Največ fenolnih spojin je vseboval vzorec številka PR2018-2 iz dolenske regije, ki je bil tudi po senzoričnih lastnosti med bolj aromatičnimi. (preglednica 31).

Vsi vzorci propolisa so vsebovali **p-kumarno kislino** v območju od 0,18 do 1,44 %, v povprečju 1,03 %. Prav tako so vsi vzorci propolisa vsebovali **ferulno kislino** v območju od 0,16 do 1,26 %, v povprečju 0,87 %, **pinocembrin** v območju od 0,11 do 1,52 %, v povprečju 0,50 % in **CAPE** v območju od 0,14 do 0,42 %, v povprečju 0,27 %.

Kavno kislino, v območju od 0,11 do 0,26 %, v povprečju 0,16 %, je vsebovalo devet od desetih vzorcev. **Galangin** je vsebovalo osem vzorcev v območju od 0,14 do 0,63 %, v povprečju 0,26 %. **Krizin** je bil prisoten v sedmih vzorcih propolisa v območju od 0,17 do 0,60 %, v povprečju 0,42 %. **Cimetno kislino** sta vsebovala dva vzorca propolisa v območju od 0,16 do 0,19 %, v povprečju 0,18 %. **Kamferol** je vseboval en vzorec propolisa iz primorske regije, in sicer 0,12 %. **Apigenin** je vseboval en vzorec propolisa iz primorske regije, in sicer 0,10 %. **Naringenin** je bil tudi prisoten samo v enem vzorcu propolisa iz primorske regije, in sicer 0,11 % (preglednica 31).

15 ZAKLJUČEK

Fenolne spojine so zelo značilne za propolis. V sklopu aplikativne raziskave smo v analiziranih vzorcih slovenskega propolisa določili razmeroma nizke koncentracije fenolnih spojin. Pridobljene rezultate je težko primerjati z rezultati drugih študij, saj vključujejo vzorce propolisa različnega geografskega porekla. Standardne metode za določanje fenolnih spojin v propolisu ni, uporabljajo pa se različni načini ekstrakcije fenolnih spojin. Večletni rezultati bodo dali bolj jasno sliko o sestavi propolisa na slovenskih tleh.

Preglednica 31: Vsebnost posameznih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih propolisa.

Fenolna spojina (%)	Oznaka vzorcev										povprečje	SD	min	maks	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
<i>m</i> -kumarna kislina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
naringenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,11	n.d.		n.d.	0,11
rutin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
apigenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,1	n.d.		n.d.	0,10
kamferol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,12	n.d.		n.d.	0,12
krizin	n.d.	0,55	n.d.	n.d.	0,6	0,17	0,41	0,4	0,31	0,47			n.d.	0,55	
galangin	n.d.	0,63	0,14	0,17	0,21	n.d.	0,23	0,17	0,16	0,37	0,26	0,17	n.d.	0,63	
kavna kislina	0,11	0,26	0,13	0,13	0,18	n.d.	0,18	0,12	0,16	0,16	0,16	0,05	n.d.	0,26	
<i>p</i> -kumarna kislina	1,12	1,13	0,81	0,98	0,95	0,18	1,44	1,07	1,42	1,2	1,03	0,36	0,18	1,44	
ferulna kislina	0,96	0,89	0,99	0,82	0,77	0,16	1,01	0,85	1,26	1,02	0,87	0,29	0,16	1,26	
cimetna kislina	n.d.	0,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,19			n.d.	0,19	
pinocembrin	0,11	1,52	0,31	0,37	0,68	0,16	0,72	0,3	0,25	0,54	0,50	0,41	0,11	1,52	
CAPE	0,18	0,39	0,28	0,25	0,42	0,14	0,33	0,23	0,21	0,28	0,27	0,09	0,14	0,42	
kvercetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.				
artepilin C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.				
genistein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.				
vsota skupnih fenolnih spojin (%)	2,48	5,53	2,66	2,72	3,81	0,81	4,32	3,14	3,77	4,56					

n.d.: pod mejo detekcije

16 VIRI

Bankova V., Popova M., Bogdanov S., Sabatini A. G. 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57, 5-6: 530-3

Bankova V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 114-117

Bankova V. 2009. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 2: 23-28

Burdock G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 39: 347-363

Coneac G., Gafițanu E., Hădăruga D. I., Hădăruga N. G., Pînzaru I. A., Bandur G., Urșica L., Păunescu V., Gruia A. 2008. Flavonoid contents of propolis from west side of Romania and correlation with antioxidant activity. *Chemical Bulletin »POLITEHNICA« University*, 53, 67: 56-60

Falcão S. I., Vale N., Gomes P., Domingues M. R. M., Freire C., Cardoso S. M., Vilas-Boas M. 2012. Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochemical analysis*, 24:309-318

Huang S., Zhang C. P., Wai K., Li G. Q., Hu F. H. 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis, *Molecules*, 19: 19610-19632

Kandolf Borovšak, A., Lilek, N., Bertoncej, J., Korošec, M., Klemenčič Štrukelj, N. 2017. Letno poročilo aplikativne raziskave Karakterizacija čebeljih pridelkov ter vpliv postopkov obdelave in shranjevanja cvetnega prahu na njegovo kemijsko in mikrobiološko sestavo za leto 2017, 97 str.

Kosalec, I., Bakmaz M., Pepelnjak S., Vladimir-Knežević, S. 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica*, 54: 65-72

Medić-Šarić M., Bojić M., Rastija V., Cvek J. 2013. Polyphenolic profiling of Croatian propolis and wine. *Food Technology and Biotechnology*, 512: 159-170

Marcucci MC. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26: 83-99

Popova M. P., Bankova V. S., Bogdanov S., Tsvetkova I., Naydenski C., Marcazzan G. L., Sabatini A. G. 2007. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographical origin. *Apidologie*, 38: 306-311

Sforcin J. M. 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 13, 1:1-14