

VPLIV KRMLJENJA ČEBELJIH DRUŽIN NA NJIHOVO ŽIVALNOST IN PRISTNOST MEDU

Andreja KANDOLF BOROVSŠAK¹, Nives OGRINC², Nataša LILEK¹, Boštjan NOČ¹, Janko BOŽIČ³, Mojca KOROŠEC³

Delo je prispelo 11. maja 2015, sprejeto 30. junija 2015.
Received May 11, 2015; accepted June 30, 2015.

Vpliv krmljenja čebeljih družin na njihovo živalnost in pristnost medu

Čebelja družina potrebuje za svoj razvoj ustrezno prehrano. Pomanjkanje medu v brezpašnem obdobju lahko nadomestimo s krmljenjem družin s sladkornimi pogačami ali sladkorno raztopino. Krmljenje družin v brezpašnem obdobju spodbuja vzrejo zalege in pašno aktivnost družin, bolj živahna družina pa proizvede tudi več medu. Če je dodana prevelika količina krme, pa to lahko vpliva na pristnost medu, posebej ob tehniki prevešanja satja z venci krme iz plodišča v medišče. Preverjanje pristnosti medu je zelo kompleksno, na voljo ni ene same metode, na podlagi katere bi lahko zanesljivo potrdili potvorjenost medu. Cilj raziskave je bil ugotoviti, ali spomladansko krmljenje družin vpliva na njihovo živalnost in zalogo medu v plodišču ter na pristnost medu, prav tako pa tudi, ali obstaja kaka preprosta metoda za ugotavljanje pristnosti medu. Družine smo krmili s pogačami, katerim smo kot označevalnik (marker) za ugotavljanje potvorjenosti medu dodali kvasovke in modro barvilo za živila. Spremljali smo živalnost družin in količino medu v plodišču. Rezultate vsebnosti stabilnih izotopov ogljika v medu in aktivnosti tujih encimov v njem smo primerjali z rezultati vsebnosti kvasovk in barve medu (absorbanca medu, določanje vrednosti L*, a*, b* s kromometrom Minolta). Pojav kvasovk v medu in obarvan med sta očitno dober pokazatelj potvorjenosti medu, kar pa mora biti še dodatno raziskano.

Ključne besede: čebelarstvo / čebelje družine / krmljenje / živalnost / med / pristnost / barva / kvasovke

Influence of feeding bee colonies on colony strength and honey authenticity

For the natural development of bee colonies, there is the need for appropriate nutrition. Lack of natural honey flow must be supplemented by feeding bee colonies with sugar syrups or candy paste. This supplementary feeding encourages brood breeding and forage activity, whereby stronger colonies collect more honey. Sugar syrups can cause honey adulteration, which is more frequent with the reversing of the brood combs with the bee food, with the combs moved from the brood chamber to the upper chamber. Authentication of honey from the standpoint of the presence of sugar syrup is very complex, because there is no single method by which honey adulteration can be reliably confirmed. Feeding the colonies in spring should result in stronger colonies and hence the collection of more honey in the brood chambers. The objective of the present study was to determine whether this has effects also on honey authenticity, and to discover a simple method for detection of honey adulteration. The colonies were fed with candy paste that had added yeast and blue dye, to provide markers for detection of honey adulteration. The strength of the colonies and quantity of honey in the brood chambers were monitored. The results of the analysis of stable isotope and activity of foreign enzymes were compared with the results of yeast quantity and colour of the honey (absorbance, L*, a*, b* parameters). Detection of yeast in the honey samples and presence of colour as a consequence of added dye appear to be appropriate methods to follow honey adulteration, and further studies are ongoing.

Key words: apiculture / bee colonies / feeding / colony strength / honey authenticity / colour of honey / yeast

¹ Čebelarstva zveza Slovenije, Brdo pri Lukovici 8, SI-1225 Lukovica, Slovenija, e-naslov: andreja.kandolf@czs.si

² Institut Jožef Stefan, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

³ Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Jamnikarjeva ulica 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

1 UVOD

Čebelja družina potrebuje za svoj razvoj ustrezno prehrano. Ker se okolje, v katerem čebelarimo, stalno spreminja, v kmetijstvu pa prevladujejo monokulture, obstaja verjetnost, da čebele v naravi ne morejo v celoti zadovoljiti svojih potreb po hrani (Naug, 2009).

Čebele živijo v družini, zato je treba vplive prehrane spremljati na ravni družine, tj. na ravni zalege in odraslih čebel, saj so vsi njeni člani odvisni eden od drugega. Odrasle čebele imajo velike potrebe po ogljikovih hidratih in brez zaloga hrane ne preživijo dolgo, saj v svojem telesu nimajo velikih zaloga ogljikovih hidratov, beljakovin in maščob (Hrassnigg in Crailsheim, 2005). Ogljikove hidrate potrebujejo tudi ličinke. Dejavnosti odraslih čebel, kot so nabiranje medicinske/mane in cvetnega prahu ter vzreja ličink, se prilagajajo potrebam ter donosu ogljikovih hidratov in beljakovin (Schmickl in Crailsheim, 2004).

Spomladi ali kadar koli v brezpašnem obdobju je treba čebele krmiti, da preživijo, oz. da ostanejo živalne ali postanejo bolj živalne in produktivnejše (Standifer, 1980). Krmljenje čebel v brezpašnem obdobju spodbuja vzrejo zalege in pašno aktivnost (Crane, 1950), bolj živalna družina proizvede več medu (Farrar, 1937).

Pri dodajanju čebelje krme pa je vendarle treba paziti, da je družinam dodamo toliko, da ta ne bo vplivala na kakovost čebeljih pridelkov. Čebelja krma namreč nikakor ne sme vplivati na pristnost medu. Med seveda ne sme vsebovati predelane sladkorne raztopine.

Ena izmed zelo uporabnih metod za ugotavljanje pristnosti medu je analiza razmerja stabilnih izotopov ogljika $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (White in Winters, 1989), imenovana SCIRA (ang. Stable Carbon Isotope Ratio Analysis). Metoda temelji na dejstvu, da imajo rastline, ki fotosintetizirajo po različnem ciklu, različno razmerje stabilnih izotopov ogljika (Anklam, 1998; Padovan in sod., 2003). Metoda je uporabnejša za dokazovanje vsebnosti sladkorjev rastlin C4 (trs) kot rastlin C3 (pesa) v medu (Elflein, Raetzke, 2008). Pri dokazovanju ponaredekov s sladkorji rastlin C3 namreč ni učinkovita, ker je vrednost $\delta^{13}\text{C}$ podobna tako v sladkornih sirupih kot v medu in dosega od -25 do -26 ‰ (Cordella in sod., 2005). Razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini izražamo z vrednostjo δ , ki ponazarja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca glede na izbrani standard. Pozitivne vrednosti pomenijo, da vsebuje vzorec več težkega izotopa kot standard, negativne pa, da ga vsebuje manj (Craig, 1957). Kot dopolnilna metoda se je uveljavila metoda interne standarda, ki temelji na primerjavi razmerja izotopov ogljika v proteinih in v sladkorju v medu, razmerji pa se ne smeta razlikovati, če med izvira iz istega vira. Velja pravilo, da med ni pristen, kadar je razlika med $\delta^{13}\text{C}$

medu in $\delta^{13}\text{C}$ proteinov v medu večja od 1 ‰. Metoda se imenuje ISCIRA (ang. Internal Standard Isotope Carbon Ratio Analysis, White in Winters, 1989). Kot dopolnitev te metode izvajajo tudi metode, ki ugotavljajo razmerje stabilnih izotopov ogljika v sladkornih frakcijah medu (Elflein, 2008) in vsebnost tujih encimov v medu (Valkov in sod., 2010).

Preverjanje pristnosti medu glede na vsebnost sladkornih sirupov je zelo kompleksno, saj potvorjenosti vzorca ni mogoče zanesljivo potrditi z eno samo metodo. Za določanje pristnosti medu je zato treba analizirati več parametrov, zbrane vrednosti analiziranega vzorca pa primerjati z vrednostmi vzorcev iz podatkovne baze o sestavi pristnega medu, značilnih za določeno vrsto medu, in pri tem uporabiti multivariatne statistične metode (Korošec, 2012).

Ker je težko oceniti, kolikšna je zadostna količina hrane, ki jo čebele nujno potrebujejo za svoje življenje in ki hkrati ne ogroža pristnosti medu, smo v raziskavi skušali ugotoviti, ali obstajajo preprostejše metode za določanje nepristnega medu. Tako smo v krmo za družine dodali barvilo in kvasovke ter ugotavljali pojav kvasovk v iztočenem medu in njegovo obarvanost.

Cilj raziskave je bil ugotoviti, ali spomladansko krmljenje čebeljih družin vpliva na njihovo živalnost in zalogo medu v plodišču ter ob tehniki prevešanja satja iz plodišča v medišče na pristnost medu, prav tako pa tudi, ali obstaja kaka preprosta metoda za ugotavljanje pristnosti medu.

2 MATERIAL IN METODE DELA

Raziskavo smo leta 2013 in 2014 opravljali v 30 družinah, naseljenih v AŽ-panjih v čebelnjaku v bližini golf igrišča na Bledu.

Družine smo pregledovali vsak teden, da smo se prepričali, ali se razvijajo v skladu s sezono. Za preprečevanje rojenja smo sate z zalego in venci hrane iz plodišča prevešali v medišče. V povprečju smo prevešali dvakrat, prvič v obdobju od 5. 5. do 21. 5. in drugič v obdobju od 4. 6. do 11. 6. Družinam smo po potrebi dodajali satnice. Jeseni smo družine nakrmili s 15 kg sladkorja, ki smo ga v razmerju 1 : 1 raztopili v vodi. Jeseni leta 2013 smo družine za zimsko krmljenje nakrmili s trsnim sladkorjem. Glede na naravo poskusa smo družine razdelili na pet skupin (pregl. 1), v vsaki skupini je bilo šest družin.

2.1 PRIPRAVA POGAČE

Spomladi leta 2013 smo družine krmili s komercialnimi pogačami Stimulans. Leta 2014 smo pogače pripra-

Preglednica 1: Načrt izvajanja poskusa**Table 1:** Plan of the experimental layout for each year

Oznaka skupine	Leto	Število družin (n)	Krmljenje	Količina dodane krme spomladi
31	2013	6	brez krmljenja	0
41	2014	6		0
32	2013	6	ostanek zimske krme v medišču (pribl. 3 kg)	0
42	2014	6		0
331	2013	6	spomladansko krmljenje (komercialna pogača ^a)	0,15 kg
431	2014	6	spomladansko krmljenje (pogača, ki smo jo pripravili sami ^b)	0,15 kg
332	2013	6	spomladansko krmljenje (komercialna pogača ^a)	0,33 kg
432	2014	6	spomladansko krmljenje (pogača, ki smo jo pripravili sami ^b)	0,33 kg
333	2013	6	spomladansko krmljenje (komercialna pogača ^a)	0,50 kg
433	2014	6	spomladansko krmljenje (pogača, ki smo jo pripravili sami ^b)	0,50 kg

^a Komercialna pogača Stimulans: krmljenje je potekalo od 18. 4. do 15. 5. 2013.

^b Pogača, ki smo jo pripravili sami: krmljenje je potekalo od 2. 4. do 7. 6. 2014

vljali sami: 14 kg pesnega sladkorja smo dodali 6 l vode, nato pa smo raztopini ob stalnem mešanju dodali še 750 g kvasa in pet kapljic modrega barvila za živila Blue (flow paste) proizvajalca Kopykake iz ZDA, s čimer smo želeli slediti prehodu krme v družini. Vlogo označevalnika (markerja) za ugotavljanje pristnosti medu je imel tudi dodan kvas.

2.2 SPREMLJANJE DRUŽIN

V družinah smo od začetka oz. sredine aprila do konca julija spremljali živalnost in količino medu v plodišču.

Živalnost smo določali na podlagi ocenjevanja glede na povprečje družin, vključenih v poskus, in sicer z ocenami od 1 do 4 (ocena 1 in 2: pod povprečjem, ocena 3 in 4: nad povprečjem). Zalogo medu v plodišču smo ocenjevali z ocenami od 1 do 5 (ocena 1: skoraj brez hrane, ocena 2: majhna količina hrane, ocena 3: zadovoljivo velika količina hrane, ocena 4: velika količina hrane, ocena 5: izjemno velika količina hrane v plodišču). Ocenjeval je vedno isti ocenjevalec.

2.3 VZORČENJE MEDU

Leta 2013 smo med vzorčili 11. junija, leta 2014 pa 7. julija. Med iz vsakega panja smo vzorčili posebej. V skupini, kjer čebel nismo krmili, smo tako leta 2013 kot tudi 2014 vzorčili samo 4 vzorce, v dveh družinah medu ni bilo. Satje iz vsakega panja smo stehali tako pred točenjem kot tudi po njem ter na ta način ugotovili donos

medu na panj. Analize vsakega posameznega parametra smo izvedli v roku treh dni.

2.4 ANALIZE MEDU

2.4.1 RAZMERJE STABILNIH IZOTOPOV

Razmerja vsebnosti stabilnih izotopov ogljika ¹³C in ¹²C v medu ter razmerja vsebnosti stabilnih izotopov ogljika ¹³C in ¹²C v proteinih medu smo določili po metodi masne spektrometrije za določanje izotopskega razmerja lahkih elementov IRMS (ang. Isotope Ratio Mass Spectrometry – IRMS; AOAC 998.12, 1999, ter Padovan in sod., 2003).

2.4.2 TUJI ENCIMI V MEDU

Analizo aktivnosti encimov β-fruktofuranozidaze (BFF) in β/γ-amilaze so izvedli v laboratoriju Intertek Food Service GmbH (Nemčija). Laboratorij je znan po tem, da tako kvalitativno kot tudi kvantitativno ovrednoti vsebnost teh encimov.

2.4.3 DOLOČANJE KVASOVK V MEDU

10 g medu smo raztopili v 10 ml destilirane vode. Raztopino smo potem 10 minut centrifugirali pri 10000 g. Supernatant smo odlili, sediment pa razredčili z 1 ml destilirane vode. S to raztopino smo napolnili hemoci-

tometer Thoma (0,1 mm; 0,0025 mm²). V vseh 16 kvadratih smo prešteli kvasovke in jih izračunali po formuli:

$$\mathit{ŠC}[\text{proml}] = \frac{\text{vsota vseh celic v 16 velikih kvadratih}}{16} * \text{TRF}$$

$$\mathit{ŠC}[\text{progedu}] = \frac{\mathit{ŠC}(\text{ML})}{10G} * R$$

ŠC – število celic

TRF – razredčitveni faktor hemocitometra Thoma (250000)

R – razredčitveni faktor vzorca (1 ml, ker smo sediment raztopili v 1 ml)

2.4.4 MERJENJE OBARVANOSTI MEDU S KROMOMETROM MINOLTA

Prozorne plastične petrijevke smo napolnili z medom in jih previdno pokrili s pokrovom, da smo se izognili nastanku zračnih mehurčkov. Na vsako petrijevko

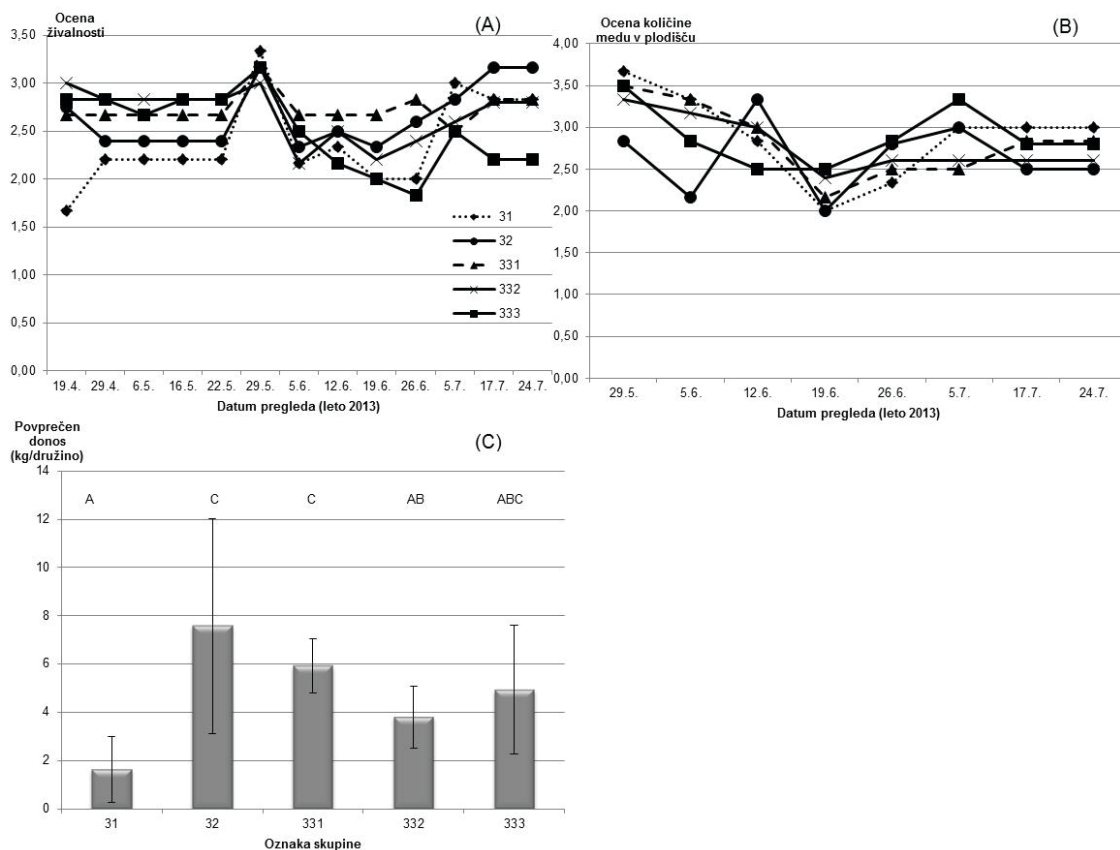
smo nastavili merilno glavo kromometra Minolta CR-400 in za posamezne vzorce odčitali vrednosti L*, a* in b*. Pri vsakem vzorcu medu smo meritev ponovili štirikrat in izračunali povprečen rezultat.

2.4.5 SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE OBARVANOSTI

Pripravili smo 50-odstotno raztopino medu (w/v) in jo pet minut centrifugirali pri 10000 g. Med smo raztopili v bidestilirani vodi. Supernatantu smo zmerili absorbenco pri 450 in 720 nm valovne dolžine. Vrednosti izračunanih razlik absorbance smo množili s tisoč (Beretta in sod., 2005).

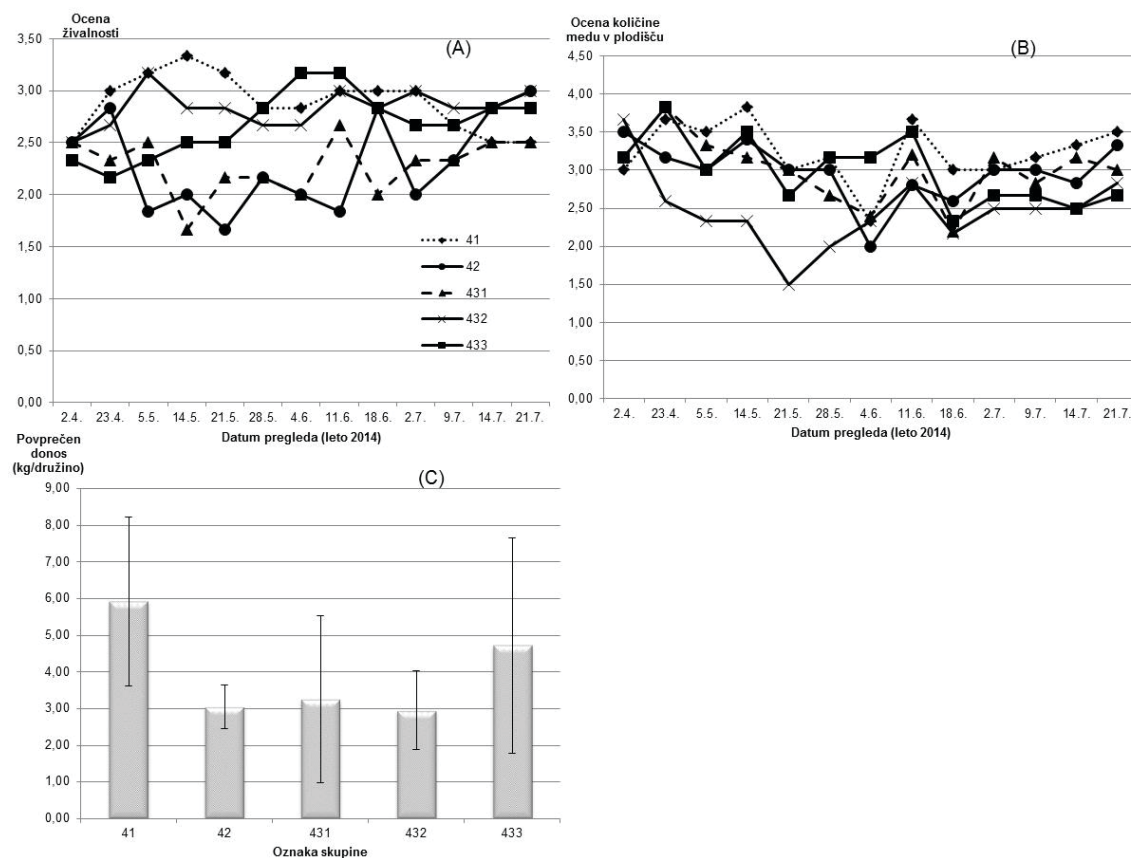
2.5 STATISTIČNA ANALIZA

Statistične analize smo izvedli s programom SPSS, različica 21.0 (IBM). Izračunali smo osnovno opisno sta-



Slika 1: Živalnost (slika A) in količina medu v plodišču (slika B) in donos medu ob točenju (11. 6. 2013, slika C). Vrednosti, označene z različnimi velikimi črkami, se statistično značilno razlikujejo glede na neparametrični test ($p < 0,05$).

Figure 1: Colony strength (A) and quantity of honey in the brood chamber (B) and honey yield assessments at honey harvesting (June 11, 2013). Different superscript capital letters indicate significant differences according to nonparametric tests ($P < 0.05$).



Slika 2: Živalnost (slika A) in količina medu v plodišču (slika B) in donos medu ob točenju (7. 7. 2014, slika C)

Figure 2: Colony strength (A) and quantity of honey in the brood chamber (B) and honey yield assessments at honey harvesting (July 7, 2014)

tistiko, izvedli smo metodo analize variance, uporabili smo Dunconov post hoc test. V primeru nehomogenosti varianc v vzorcih smo uporabili neparametrične teste. Za ugotavljanje porazdelitve vzorcev med skupinami smo uporabili metodo linearne diskriminantne analize, za namene ugotavljanja najbolj primernih metod za razlikovanje med vzorci pa metodo glavnih komponent. Rezultate kemičnih analiz, s katerimi smo preverjali pristnost medu, smo primerjali z rezultati vsebnosti kvasovk in barve medu.

3 UGOTOVITVE IN RAZPRAVA

3.1 ŽIVALNOST ČEBELJIH DRUŽIN

Leta 2013 se živalnost med skupinami ni razlikovala, družine so bile zelo izenačene. Od 29. maja naprej smo spremljali tudi količino medu v plodiščih čebeljih družin. Razlik v količini medu v plodiščih ni bilo. Ob točenju je bil donos medu največji v družinah v skupini 32, to pa je lahko posledica neizpraznjenih medišč pred pašno sezo-

no. Najmanj medu so proizvedle družine v skupini 31. Po pričakovanjih naj bi bil donos največji v družinah v skupinah 333 in 332, vendar je bil poleg družin v skupini 32 donos večji tudi v družinah v skupini 331. To kaže, da je bila paša tudi v naravi in da se družine po donosu med seboj zelo razlikujejo (slika 1).

Čebelarstvo sezono 2014 so zaznamovale slabe pašne razmere in pomanjkanje hrane v čebeljih družinah. Donos medu na kontrolnih tehtnicah je bil tako rekoč celotno sezono negativen, razen v obdobjih od 2. 4. do 23. 4., od 5. 6. do 11. 6. in od 19. 6. do 2. 7., ko so tehtnice pokazale manjši donos. Zaradi slabih pašnih razmer in stanja v čebeljih družinah smo jim 4. junija dodali približno 1 kg sladkorja v obliki sladkorne raztopine, da smo zagotovili zadostno minimalno prehranjenost družin.

Skupine družin so niso razlikovale po živalnosti. Ob spremljanju posameznih skupin čebeljih družin smo ugotovili, da se je živalnost na začetku sezone (izjema so bile le družine v skupini 42) povečevala, pozneje pa se je to dogajalo samo pri družinah v skupini 433, torej pri tistih, ki so prejemale največ krme, pri preostalih družinah pa smo opazili nihanje živalnosti. Zmanjšanje živalnosti

družin v skupini 433 smo ugotovili po 11. juniju, torej po prenehanju krmljenja.

Glede na krmljenje družin bi pričakovali, da bi imele največ zaloge medu v plodiščih družine v skupinah 433 in 432, tem pa naj bi sledile družine v skupini 431. Najmanj medu v plodiščih naj bi imele družine v skupinah 41 in 42. Izkazalo se je, da količina medu v plodišču statistično ni bila značilno različna, prav tako pa tudi ne donos medu na družino ob točenju.

Ob točenju je bil donos medu najmanjši v družinah v skupini 432, prav tako pa je bila najmanjša tudi količina medu v plodiščih. Glede na to, da sta se živalnost in količina skupne zalege v teh družinah v brezpašnem obdobju zmanjšali najmanj, bi lahko sklepali, da so dodano hrano porabile za vzdrževanje živalnosti. Zanimivo je, da je bil ob točenju donos medu največji v družinah v skupini 41, vendar je to verjetno posledica prevešanja, saj je bila tudi pri teh družinah dokazana potvorjenost medu (slika 2).

3.2 PRISTNOST MEDU

Med vzorci, pridobljenimi iz družin z različnim krmljenjem, v analiziranih parametrih nismo našli statistično značilnih razlik. Rezultati so prikazani v preglednici 2. Z metodo linearne diskriminantne analize smo ugotovili, da je na podlagi analiziranih parametrov v svojo dejansko skupino pravilno uvrščenih 78,6 % vzorcev.

Da bi pridobili natančnejše podatke o pristnosti medu, so analize razmerja stabilnih izotopov vzorcev iz leta 2014 izvedli v laboratoriju Intertek GmbH v Nemčiji. Njihova metoda omogoča določanje $\delta^{13}\text{C}$, tudi posameznih sladkorjev v medu, in sicer glukoze, fruktoze, disaharidov, trisaharidov in oligosaharidov. V skladu z njihovo analizo je med potvorjen, kadar je $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$ večja od ± 1 ‰ ali $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ oz. večja od $\pm 2,1$ ‰, kadar je

vsebnost C4 sladkorjev večja od 7 % ter kadar so zaznani oligosaharidi.

Analize razmerja izotopov in vsebnosti tujih encimov so pokazale, da so bili v skupini 41 štirje vzorci nepristni, dva pa povsem na meji; v skupini 42 je bil nepristen en vzorec in eden na meji; v skupini 431 je bilo samo pet vzorcev, od tega je bil eden nepristen, preostali pa so bili povsem na meji; v skupini 432 je bil en vzorec pristen vsi preostali pa nepristni, v skupini 433 pa so bili nepristni štirje vzorci. Vsi vzorci medu iz družin, ki smo jih krmili, so bili obarvani zelenkasto, vendar je bila barva vzorcev v skupinah 432 in 433 intenzivnejša.

Statistično značilne razlike med skupinami smo ugotovili v $\delta^{13}\text{C}_{\text{glu}}$, $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$, $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$, v vsebnosti sladkorjev C4, aktivnosti beta fruktofuranozidaze, količini kvasov, absorbcanci in parametrih L^* , a^* , b^* , merjenih s kromometrom.

Najbolj negativne vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{glu}}$ smo ugotovili v vzorcih medu iz skupin 431, 42 in 432, najmanj negativne pa v vzorcu iz skupine 41. Razlika v $\delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$ ($\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$) je bila najmanjša v vzorcih medu iz skupine 41, največja pa v vzorcih iz skupin 433, 431 in 432. V skupinah 433, 432 in 431 (krmljene družine) je bila ta razlika povprečno večja od 1, ki je meja za pristen med. Povprečno je bila razlika v $\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ ($\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$) večja od 2 – kar kaže na nepristen med – v vzorcih medu iz vseh skupin čebeljih družin, razen v vzorcih medu iz skupine 42. Največja je bila v vzorcih medu iz skupin 41 in 432. Tako $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$ kot $\Delta \delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ sta bili največji v vzorcih medu iz skupine 432, to pa se ujema tudi z dejstvom, da je bila potvorjenost medu dokazana pri skoraj vseh vzorcih iz te skupine.

Največjo vsebnost sladkorjev C4 (več kot 7 %), ki kaže na potvorjenost medu s trsnim sladkorjem, smo ugotovili v vzorcih medu iz skupine 41. Glede na to, da smo jeseni 2013 družine krmili s trsnim sladkorjem, je ta pojav posledica prevešanja zimske krme iz plodišča v

Preglednica 2: Izmerjeni parametri vzorcev medu iz različnih skupin čebeljih družin glede na krmljenje

Table 2: Measured parameters for the honey samples according to the different groups of bee colonies

Parameter	Oznaka skupine (n)				
	31 (4)	32 (6)	331 (6)	332 (6)	333 (6)
$\delta^{13}\text{C}$ (med) (‰)	$-25,09 \pm 0,17$	$-24,83 \pm 0,4$	$-24,87 \pm 0,45$	$-24,80 \pm 0,64$	$-25,06 \pm 0,43$
$\delta^{13}\text{C}$ (proteini) (‰)	$-25,09 \pm 0,39$	$-25,17 \pm 0,34$	$-25,05 \pm 0,35$	$-25,19 \pm 0,41$	$-25,15 \pm 0,22$
$\Delta \delta^{13}\text{C}$ (razlika) (‰)	$0,20 \pm 0,15$	$0,40 \pm 0,33$	$0,25 \pm 0,21$	$0,38 \pm 0,29$	$0,25 \pm 0,29$
beta/gama amilaza (enot/kg)	$1,65 \pm 0,06$	$1,37 \pm 0,15$	$1,33 \pm 0,73$	$1,52 \pm 0,25$	$1,37 \pm 0,33$
beta fruktofuranozidaza (enot/kg)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	$3,53 \pm 8,65$	0 ± 0
absorbanca (mAU)	$595,00 \pm 103,73$	$554,42 \pm 74,08$	$465,17 \pm 53,12$	$516,83 \pm 139,88$	$451,67 \pm 93,87$
L^*	$44,84 \pm 2,37$	$44,45 \pm 2,33$	$48,96 \pm 2,04$	$44,59 \pm 5,67$	$47,60 \pm 2,8$
a^*	$7,45 \pm 2,38$	$8,49 \pm 2,07$	$4,66 \pm 1,57$	$7,97 \pm 4,3$	$5,55 \pm 3,56$
b^*	$32,01 \pm 0,72$	$33,37 \pm 2,63$	$35,68 \pm 2,41$	$32,74 \pm 4,59$	$34,26 \pm 1,65$

Preglednica 3: Izmerjeni parametri vzorcev medu v različnih skupinah čebeljih družin glede na krmljenje v letu 2014**Table 3:** Measured parameters for the honey samples according to the different groups of bee colonies

Parameter	Oznaka skupine (n)				
	41 (4)	42 (6)	431 (6)	432 (6)	433 (6)
$\delta^{13}\text{C}$ (proteini) (‰)	$-24,57 \pm 0,14$	$-24,33 \pm 0,14$	$-24,40 \pm 0,14$	$-24,42 \pm 0,26$	$-24,53 \pm 0,27$
$\delta^{13}\text{C}$ (med) (‰)	$-23,50 \pm 0,15$	$-23,90 \pm 0,37$	$-23,74 \pm 0,19$	$-23,82 \pm 0,34$	$-23,67 \pm 0,24$
$\delta^{13}\text{C}$ (fru) (‰)	$-23,70 \pm 0,14$	$-24,10 \pm 0,39$	$-23,94 \pm 0,2$	$-24,04 \pm 0,29$	$-23,83 \pm 0,23$
$\delta^{13}\text{C}$ (glu) (‰)	$-23,73 \pm 0,2^a$	$-24,17 \pm 0,3^b$	$-24,08 \pm 0,12^b$	$-24,23 \pm 0,29^b$	$-23,94 \pm 0,22^{ab}$
$\delta^{13}\text{C}$ (disaharidi) (‰)	$-24,03 \pm 0,29$	$-22,46 \pm 0,22$	$-22,77 \pm 0,26$	$-22,29 \pm 0,26$	$-22,14 \pm 0,51$
$\delta^{13}\text{C}$ (trisaharidi) (‰)	$-22,40 \pm 0,18$	$-22,84 \pm 0,34$	$-22,53 \pm 0,24$	$-22,71 \pm 0,37$	$-22,76 \pm 0,32$
$\delta^{13}\text{C}$ (oligosaharidi) (‰)	0 ± 0	$4,02 \pm 9,83$	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (razlika fru-glu) (‰)	$0,01 \pm 0,01^A$	$0,10 \pm 0,07^B$	$0,18 \pm 0,08^B$	$0,19 \pm 0,11^B$	$0,12 \pm 0,07^B$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (razlika max) (‰)	$2,19 \pm 0,14^b$	$1,65 \pm 0,28^a$	$2,11 \pm 0,27^{ab}$	$2,33 \pm 0,59^b$	$2,03 \pm 0,41^{ab}$
Vsebnost C4 (%)	$7,20 \pm 0,7^b$	$3,32 \pm 2,31^a$	$4,46 \pm 1,91^a$	$4,05 \pm 2,9^a$	$5,82 \pm 0,79^{ab}$
Razmerje fru/glu	$1,15 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,02$
Odstotek disaharidov (%)	$12,73 \pm 0,99$	$12,59 \pm 2,7$	$12,83 \pm 1,38$	$12,83 \pm 2,17$	$12,42 \pm 1,25$
Odstotek trisaharidov (%)	$4,03 \pm 0,43$	$4,59 \pm 2,13$	$3,91 \pm 0,81$	$3,55 \pm 0,89$	$4,22 \pm 0,64$
Odstotek oligosaharidov (%)	0 ± 0	$0,26 \pm 0,62$	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Beta/gama amilaza (enot/kg)	$1,83 \pm 0,19$	$2,38 \pm 0,84$	$1,80 \pm 0,33$	$1,72 \pm 0,33$	$2,12 \pm 0,78$
Beta fruktofuranozidaza (enot/kg)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	$7,72 \pm 12,28$	$14,23 \pm 11,41$
Absorbanca (mAU)	$368,33 \pm 28,38^a$	$454,17 \pm 58,81^b$	$373,70 \pm 43,11^a$	$375,83 \pm 49,81^a$	$432,50 \pm 22,53^b$
L^*	$54,46 \pm 2,04^b$	$50,60 \pm 3,56^{ab}$	$50,49 \pm 3,78^{ab}$	$49,52 \pm 4,53^a$	$46,50 \pm 1,33^a$
a^*	$-1,64 \pm 0,34^B$	$1,94 \pm 2,97^C$	$-2,07 \pm 1,22^B$	$-4,41 \pm 1,78^{AB}$	$-6,12 \pm 1,85^A$
b^*	$32,52 \pm 1,12^b$	$33,96 \pm 2,5^b$	$28,88 \pm 2,44^a$	$28,11 \pm 2,7^a$	$28,23 \pm 1,95^a$

Vrednosti, označene z različnimi malimi črkami, se glede na Duncanov test razlikujejo statistično značilno ($p < 0,05$), vrednosti, označene z velikimi črkami, pa glede na neparametrične teste.

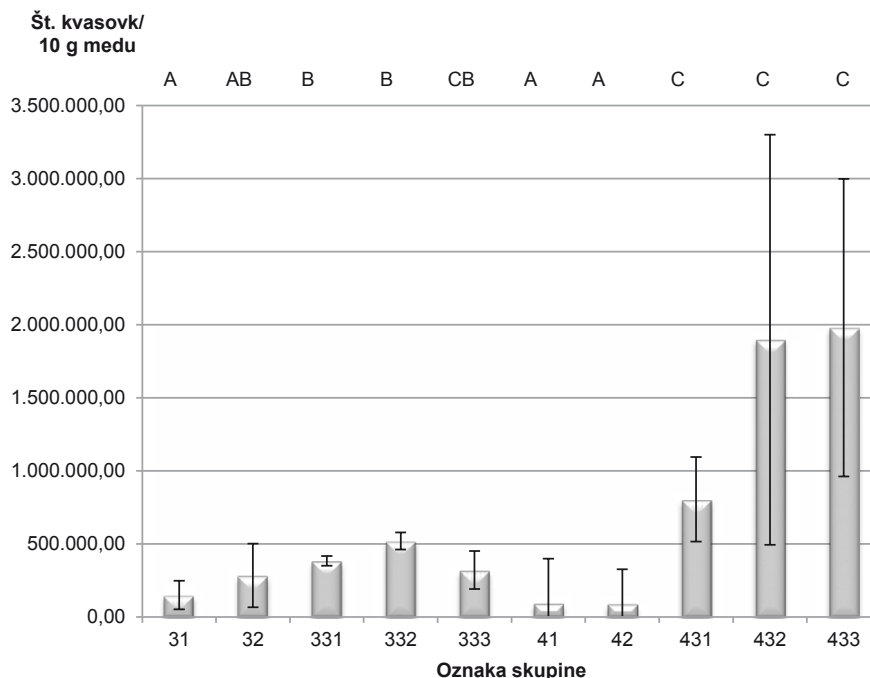
medišče. Povprečne vrednosti rezultatov analiz so prikazane v preglednici 3.

Aktivnost encima beta fruktofuranozidaze (BFF), ki je znak za nepristen med, smo zaznali samo v vzorcih medu iz skupin 432 in 433. V teh vzorcih je bilo tudi največ kvasovk. Med aktivnostjo BFF in količino kvasovk obstaja pozitivna korelacija, zato so kvasovke dober pokazatelj potvorjenosti medu. Metoda določanja kvasovk v medu je preprosta, zato bi jo lahko uporabili tudi kot hitro metodo za odkrivanje potvorb medu. Večjo količino kvasovk so vsebovali tudi vzorci iz skupine 431. Če bi količino kvasovk označevali z oznakami, uvedenimi v melisopalinološki metodi (Russmann, 1998), bi se izkazalo, da je bila količina kvasovk v skupinah 41 in 42 majhna, v skupini 431 velika, v skupinah 432 in 433 pa zelo velika. Če je v 10 g medu več kot 100.000 kvasovk, to že zbuja sum potvorbe s krmo, če jih je v 10 g medu več kot 1.000.000, pa je sum potvorbe upravičen (slika 3). Tudi v vzorcih iz leta 2013 se količina kvasovk povečuje v skladu s številko skupine, izjema so le vzorci iz skupine

333, v katerih je bilo manj kvasovk kot v skupinah 331 in 332. Ker ne vemo, kolikšna količina kvasovk je bila v pogačah, saj teh nismo pripravljali sami, tega parametra v vzorcih iz leta 2013 ne moremo vzeti za merilo.

Absorbanca vzorcev medu iz skupin 41, 431, 432, 433 se povečuje; največjo absorbanco pa smo izmerili v vzorcih iz skupin 42. V družinah iz skupine 42 je bil tudi neiztočen med oz. zimska krma prejšnje sezone, kar lahko pojasni, zakaj je bila absorbanca večja. Visoka absorbanca v vzorcih iz skupine 433 je posledica obarvane krme za čebele, ki je zašla v med. V vzorcih medu iz skupine 431 s prostim očesom opazimo rahel odtenek zelene barve; ta je nekoliko bolj izrazita v vzorcih medu iz skupine 432, najbolj intenzivna pa je v vzorcih iz skupine 433 (slika 4).

Intenzivneje zeleno obarvani vzorci medu iz skupin 432 in 433 imajo večjo absorbanco in so manj svetli, kar je pokazal parameter L^* , izmerjen s krometrom Minolta CR 200B. Parameter a^* , ki v negativnem delu kaže na vsebnost zelene barve v medu, je največji v vzorcih



Slika 3: Količina kvasovk v vzorcih medu iz leta 2014. Vrednosti, označene z različnimi velikimi črkami, se glede na neparametrični test razlikujejo statistično značilno ($p < 0,05$).

Figure 3: Yeast levels in the honey samples. Different superscript capital letters indicate significant differences according to nonparametric tests ($P < 0.05$).

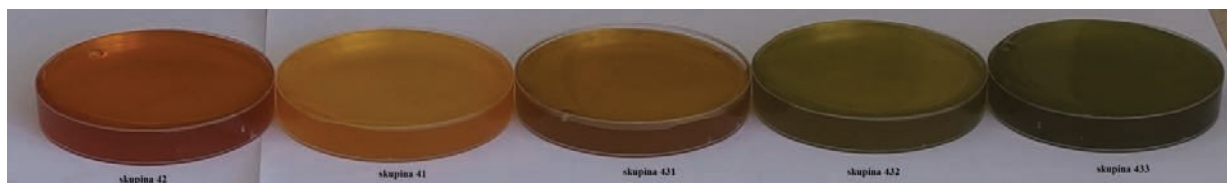
medu iz skupine 433, nasprotno pa je v vzorcih iz skupine 42 (torej v medu iz skupine družin, katerih medišča niso bila izpraznjena) ta parameter pozitiven in kaže na vsebnost rdeče barve. To je znak, da je med teh družin drugega izvora, oziroma da vsebuje tudi med oz. krmo prejšnje sezone. V parametru b^* , ki v pozitivnem delu kaže na vsebnost rumene barve, se družine, ki so bile krmjene, razlikujejo od družin iz skupin 41 in 42. Rumena barva je že s prostim očesom opazna v vzorcih medu iz skupin 41 in 42.

Z metodo linearne diskriminantne analize smo ugotovili, da so po analiziranih parametrih vsi vzorci (100-odstotno ujemanje) uvrščeni v skupino, ki ji tudi v resnici pripadajo. Z metodo glavnih komponent smo ugotovili, da so za razlikovanje vzorcev med skupinami čebeljih družin, ki so bile krmjene, najprimernejše metode določanja $\delta^{13}C_{\text{fru}}$, $\delta^{13}C_{\text{bulk}}$, $\delta^{13}C_{\text{disaharidi}}$, določanja

vsebnosti sladkorjev C4 ter vsebnosti kvasovk in encima beta fruktofuranozidaza.

4 SKLEPI

Metode dokazovanja pristnosti medu so precej drage in težko dostopne, saj ustrezne analize izvajajo le nekateri laboratoriji. Za čebelarstvo bi bilo zato zelo koristno, če bi lahko utemeljen sum nepristnega medu preverili s preprosto in hitro metodo, kot je npr. določitev količine kvasovk v medu. Ta metoda se je namreč v raziskavi izkazala kot dober pokazatelj potvorjenosti medu. Poleg dodajanja kvasa v krmo za čebele je dober pokazatelj potvorjenosti tudi dodajanje barve v krmo, saj je ta opazna že s prostim očesom, dokažemo pa jo lahko tudi z laboratorijskimi analizami. Parameter a^* , določen s kro-



Slika 4: Barva vzorcev medu iz skupin 41, 431, 432, 433

Figure 4: Colours of the honey samples from experimental groups 41, 431, 432, and 433

metrom Minolta, in količina kvasovk sta v negativni korelaciji – kolikor bolj je med zelen, toliko več kvasovk vsebuje. To je tudi v skladu z zastavitvijo poskusa, kajti v družinah, ki so prejemale več krme, je bilo več kvasovk in tudi med je bil bolj zeleno obarvan.

Čebelarji morajo biti pri svojem delu izjemno previdni, saj so spomladansko krmljenje, neizpraznjena medišča in tehnika prevešanja v AŽ-panjih lahko vzroki za pridelavo nepristnega medu. Med družinami so sicer velike razlike, ki so odvisne tudi od sezone. Vsekakor morajo čebelje družine imeti v plodišču na voljo zadostno količino hrane. Kot je videti, krmljenje ob zadostni količini hrane v družinah ne zagotavlja njihove večje živalnosti, brez dvoma pa s tem postavljamo na kocko pristnost medu.

5 ZAHVALA

Rezultati naloge so bili delno pridobljeni v okviru Programa javne svetovalne službe v čebelarstvu in v okviru Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2011–2013 ter v letih 2014–2016, delno pa v okviru doktorskega študija na Biotehniški fakulteti.

6 VIRI

- Anklam E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63, 4: 549–562. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00057-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00057-0)
- Association of Official Analytical Chemists 988.12. C4 plant sugars in honey: Internal standard stable carbone isotope ration method, 1999. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. Vol. 2. Cunniff, P. (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 27–30
- Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Maffei Facino R. 2005. Standardization of ontioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytical Chimica Acta*, 5333, 2: 185–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>
- Cordella C., Militão J.S.L.T., Clément M.-C., Drajnudel P., Cabrol-Bass D. 2005. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. *Analycta Chimica Acta*, 531, 2: 239–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.018>
- Craig H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12: 133–149. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-7037\(57\)90024-8](http://dx.doi.org/10.1016/0016-7037(57)90024-8)
- Crane E. 1950. The effect of spring feeding on the development of honey bee colonies. *Bee World*, 31: 65–72. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.1950.11094644>
- Elflein L., Raezke K.P. 2008. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between ¹³C/¹²C stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography – isotope ratio mass spectrometry (^δ13CEA/LC-IRMS). *Apidologie*, 39, 5: 574–587. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2008042>
- Farrar C.L. 1937. The influence of colony populations on honess production. *J. Agric. Res.*, 54: 945–954
- Hrassnigg N., Crailsheim K. 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 36: 255–277. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2005015>
- Korošec M. 2012. Določitev fizikalnih in kemijskih parametrov za ugotavljanje pristnosti medu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151 str.
- Naug D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol. Conserv.*, 142: 2369–2372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.04.007>
- Padovan G.J., De Jong D., Rodrigues L.P., Marchini J.S. 2003. Detection of adulteration of commercial honey samples by the ¹³C/¹²C isotopic ratio. *Food Chemistry*, 82: 633–636. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00504-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00504-6)
- Russman H. 1998. Hefen und Glycerin in Blütenenhonigen-Nachweis einer Garung ode einer Abgestoppten Garung. *Lebensmiltedchemie*, 52: 116–117
- Schmickl T., Crailsheim K. 2004. Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. *Apidologie*, 35: 249–263. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004019>
- Standifer L.N. 1980. Honey bee nutrition and supplemental feeding. *Agricultural handbook*, 335: 39–45
- Valkov V., Elflein L., Raezke K.P. 2010. Determination of foreign enzymes in honey to detect adulterations with sugar syrups. Bremen, Intertek Food Service, GmbH: 1–5
- White J.W., Winters K. 1989. Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey. *Journal of AOAC International*, 72: 907–911