



Trajnostni projekt – Za medeno prihodnost

Poročilo o raziskovalnem delu v čebelnjaku HOFER za leto 2016



Lukovica, december 2016



Trajnostni projekt – Za medeno prihodnost

Naslov: Poročilo o raziskovalnem delu v čebelnjaku HOFER za leto 2016

Naročnik: HOFER trgovina d.o.o.

Kranjska cesta 1

1225 Lukovica

Oznaka pogodbe: POGODBA med HOFER trgovino D.O.O. IN ČZS iz dne 01.04.2014

Izvajalec: Čebelarska zveza Slovenije

Brdo pri Lukovici 8

1225 Lukovica

Podizvajalci: ERICo d.o.o., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in varno hrano.

Vodja strokovnega dela: Nataša Lilek (ČZS)

Skrbnica pogodbe: Nataša Lilek (ČZS)

V projektu so sodelovali: Boštjan Noč (ČZS)

Andreja Kandolf Borovšak (ČZS)

Maja Lončar (ČZS)

in zunanji sodelavci

Katarina Šimunović (BF)

Avtorji poročila: Nataša Lilek, Boštjan Noč

Rezultati so nastali v letu 2016 v okviru trajnostnega projekta - Za medeno prihodnost podjetja HOFER trgovine d.o.o.

Lukovica, 30. 12. 2016

Boštjan Noč, predsednik ČZS

Nataša Lilek, univ.dipl.ing.živ.tehnol.



KAZALO VSEBINE

UVOD	5
<i>CILJ RAZISKAVE</i>	5
PREGLED OBJAV	6
<i>Nastanek in pomen cvetnega prahu</i>	6
<i>Pomen cvetnega prahu za čebeljo družino</i>	6
<i>Cvetni prah glede na način pridobivanja</i>	8
Osmukanec	8
Izkopanec	9
<i>Sestava cvetnega prahu</i>	9
<i>Vsebnost beljakovin in aminokislin</i>	10
<i>Vsebnost vode</i>	14
<i>Vsebnost maščob</i>	14
<i>Vsebnost mineralnih snovi</i>	15
<i>Vsebnost ogljikovih hidratov</i>	15
<i>Pregled možnih onesnaževalcev cvetnega prahu</i>	16
FIZIKALNO ONESNAŽENJE	16
KEMIJSKO ONESNAŽENJE – vpliv zunanjega okolja	16
Težke kovine	16
Radioaktivni elementi	17
Organska onesnažila	17
Pesticidi iz kmetijstva	17
Gensko spremenjene rastline	18
KEMIJSKO ONESNAŽENJE – vpliv čebelarstva	18
MIKROBIOLOŠKO ONESNAŽENJE	19
MATERIAL IN METODE	20
<i>Določanje vsebnosti beljakovin v cvetnem prahu</i>	20
<i>Določanje vsebnosti maščob v cvetnem prahu</i>	20
<i>Določanje vsebnosti vode v cvetnem prahu</i>	21
<i>Določanje vsebnosti pepela v cvetnem prahu</i>	21
<i>Določanje vsebnosti prehranske vlaknine</i>	21
<i>Določanje vsebnosti ogljikovih hidratov v cvetnem prahu</i>	24
<i>Določanje aminokislinske sestave cvetnega prahu</i>	24
<i>Določanje energijske vrednosti</i>	24
<i>Mikroskopska identifikacija cvetnega prahu</i>	24
	3



Trajnostni projekt – Za medeno prihodnost

<i>Mikrobiološka analiza cvetnega prahu</i>	24
<i>Statistična analiza</i>	25
REZULTATI	25
<i>Opis lokacije vzorčenja</i>	25
<i>Kemijska sestava cvetnega prahu</i>	26
<i>Težke kovine v cvetnem prahu</i>	31
<i>Mikrobiološka analiza cvetnega prahu</i>	34
<i>Vsebnost aminokislin v cvetnem prahu</i>	38
<i>Mikroskopska analiza cvetnega prahu</i>	39
SKLEPI	42
ZAHVALA	43
REFERENCE	44



UVOD

Čebelarstvo je v Sloveniji tradicionalna dejavnost, saj Slovenija po svetu slovi kot dežela avtohtone čebelje rase kranjske sivke (*Apis mellifera carnica*). Čebele in njihovi pridelki pa slovijo kot indikatorji čistosti okolja in v primeru propadanja čebeljih družin lahko takoj posumimo, da je nekaj v našem okolju hudo narobe. Seveda si čebelarji prizadevajo, da ohranjajo čebele, še posebej zaradi tega, ker so čebele glavne opraševalke različnega sadnega drevja, vrtnin in tudi nekaterih gospodarsko pomembnih kulturnih rastlin. S svojo dejavnostjo v naravi skrbijo za ohranjanje botanične raznovrstnosti.

Ob vsem tem pa nam čebele dajejo tudi čebelje pridelke, ki jih pogosto potrošniki poimenujejo zakladi čebeljega panja. Gre za edinstvena živila, ki ne bi smela manjkati na nobeni domači mizi, saj gre za popolnoma naravna živila, brez dodanih konzervansov, barvil in emulgatorjev, kar je v današnjem času prej izjema kot pa pravilo.

Sicer za enkrat najbolj prepoznaven čebelji pridelek ostaja med, vse bolj pa se v zadnjem času povečuje med potrošniki tudi zanimanje za ostale čebelje pridelke, še posebej za cvetni prah. Zaradi slednjega je nujno potrebno raziskati značilnosti in lastnosti tega pridelka z namenom, da se potrošnikom zagotovi zdrava in varna hrana. Cvetni prah je tudi dober indikator onesnaženosti v okolju, zaradi česar je izredno zanimiv proizvod. S pomočjo čebeljih družin, ki prebivajo v HOFERJEVEM raziskovalnem čebelnjaku, ki je postavljen v upravno-logističnem centru podjetja, smo v letu 2014, 2015 in 2016 pozornost namenili proučevanju cvetnega prahu. Čebelarska letina je bila v letu 2016 povprečna od čebeljih družin pa smo pridobili okoli 80 kg gozdnega medu.

CILJ RAZISKAVE

V letu 2016 smo s pomočjo vzorčenja cvetnega prahu nadaljevali s pregledom stanja in vpliva okolja na cvetni prah, izvedene so bile kemijske analize sestave cvetnega prahu po različnih mesecih pridobivanja, opravili smo mikrobiološke analize cvetnega prahu po različnem času skladiščenja. Poleg naštetega smo raziskovalni čebelnjak uporabljali za izobraževalne namene (tečaji za čebelarje začetnike, seminarji o pridobivanju medu in cvetnega prahu). Na podlagi dosedanjih rezultatov raziskav pa smo s strokovnim prispevkom sodelovali na 2 znanstvenem posvetovanju Poklukarjevi dnevi v Ljubljani, kjer smo predstavili prototipa osmukalnika, ki sta bila testirana na Hoferjevih čebelah. Z naštetim smo prispevali k delni realizaciji naših dolgoročnih ciljev, ki so:

- preveriti vpliv okolja na čebelje pridelke;
- ustvariti bazo mikroskopskih in kemijskih lastnosti cvetnega prahu;
- na podlagi izsledkov oblikovati nasvete glede uživanja čebeljih pridelkov, predvsem cvetnega prahu.



PREGLED OBJAV

Nastanek in pomen cvetnega prahu

Cvetni prah ali pelod je značilen za vsako posamezno cvetočo rastlinsko vrsto in je nekakšen prstni odtis vsake rastline, zaradi česar je edinstven in je osnova spolnega razmnoževanja rastlin (Kandolf, 2008).

Pelod vsebuje moške oplojevalne celice rastlin (Bogdanov, 2012). 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 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).

Palinologija je veda, ki preučuje cvetni prah fosilnih in današnjih rastlin. S pomočjo pelodne analize lahko ugotovimo vegetacijo okolja v preteklosti, saj se lahko pelodna stena zaradi svoje odpornosti ohrani milijone let. Z določanjem sedimentov v medu - cvetnega prahu lahko določimo tudi botanično in geografsko poreklo medu (Kandolf, 2008).

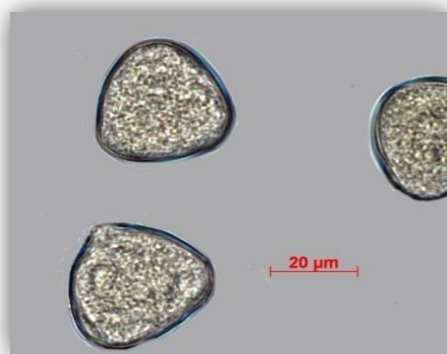
Pomen cvetnega prahu za čebeljo družino

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 mednega 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).

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. Nekatero 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), lahko pa skupek cvetnega prahu vsebuje tudi pelod različnih rastlin. 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 oprашitev 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), verjetno pa je potrebno upoštevati prisotnost še kakšnih drugih sestavin cvetnega prahu.



Slika 1 Zrno cvetnega prahu pod mikroskopom;



Slika 2 Čebele so vse bolj podvržene pomanjkanju kakovostnega cvetnega prahu v naravi.



Cvetni prah glede na način pridobivanja

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.

Osmukanec

Čebele prinašajo cvetni prah v koških svojih nožic v panj. Za pridobivanje osmukanca so čebelarji izdelali posebne naprave, ki se imenujejo smukalniki. Smukalnik se namesti na vhod čebeljega panja in je sestavljen 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 nožic v leseni ali plastični predalček smukalnika. Tako pridobljenemu cvetnemu prahu pravimo tudi obnožina.

Cvetni prah osmukanec je tudi predmet naše raziskave.

V naši nalogi smo kakovost cvetnega prahu določali na cvetnem prahu osmukancu, ki ga čebele ne uživajo neposredno, saj za svojo prehrano uporabljajo cvetni prah shranjen v celicah satja, v katerem poteče tudi fermentacija in naj bi bil glede na hranilno vrednost boljši. Različni strokovni viri navajajo majhne razlike v prehranski sestavi cvetnega prahu osmukanca in izkopenca.

Herbert in Shimanuki (1979) sta v raziskavi ugotovila, da je hranilna vrednost cvetnega prahu, tako cvetnega prahu osmukanca kot tudi cvetnega prahu izkopenca, identična vsaj pri *Apis mellifera*. Tudi Fernandes-da-Silva in sod. (2000) so dokazali, da način shranjevanja cvetnega prahu ne vpliva na spremembo njegove hranilne vrednosti, kar je potrdilo prej omenjena dejstva Herberta in Shimanukija (1979). Fernandes-da-Silva in sod. (2000) navajajo, da so potrebne še dodatne raziskave, ki bi potrdile njihove hipoteze o hranilni vrednosti cvetnega prahu predvsem na račun prisotnih združb mikroorganizmov.

Kljub navedbam zgoraj pa je splošno znano, da je hranilna vrednost cvetnega prahu - izkopenca za čebeljo družino višja od hranilne vrednosti osmukanca, posledično tudi za ljudi. Za večjo hranilno vrednost so odgovorni mikroorganizmi, ki izvirajo iz prebavil čebel ter pripadajo rodu *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, ki naj bi bili vključeni pri procesu fermentacije cvetnega prahu v celicah satja in tako prispevajo k povečanju hranilne vrednosti s proizvodnjo vitaminov (Brodschneider in Crailsheim, 2010).

Razlike med osmukancem in izkopancem so zelo slabo raziskane. Tudi vloga mikroorganizmov v izkopancu ni jasno definirana.

Izkopanec

Cvetni prah pa lahko čebele prinesejo tudi v panj, odložijo v celice satja, ki jih napolnijo do dveh tretjin s cvetnim prahom, 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 kruhek, saj predstavlja edino beljakovinsko hrano čebelam. Iz celic satja ga čebelarji pridobivajo tako, da ga izkopljejo, zato mu pravimo tudi izkopanec.



Slika 3 Čebela spravlja cvetni prah v celico satja



Slika 4 Čebele s koški cvetnega prahu na nožicah

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).

Tabela 1 Kemijska sestava cvetnega prahu (Campos in sod., 2008).

Glavne komponente	Vsebnost g/ 100 g suhe teže (min – max)
Beljakovine	10-40
Maščobe	1-13
Skupni ogljikovi hidrati	13-55
Vlaknine, Pektin	0,3-20
Pepel	2-6
Ostalo	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

Vsebnost beljakovin in aminokislin

Beljakovine so nujno potrebna hranila za človeški organizem. So eden izmed gradnikov telesnega tkiva, lahko pa so tudi vir energije. Beljakovine vsebujejo 4 kcal/g, podobno kot ogljikovi hidrati, vendar manj kot maščobe (9 kcal/g). Beljakovine sestavljajo polimerne verige aminokislin, povezanih med seboj s peptidnimi vezmi. Med človeško prebavo se beljakovine razcepijo v želodcu na krajše polipeptidne verige s pomočjo klorovodikove kisline in proteaznega delovanja. To je pomembno za sintezo esencialnih aminokislin, ki jih naše telo ne more sintetizirati.

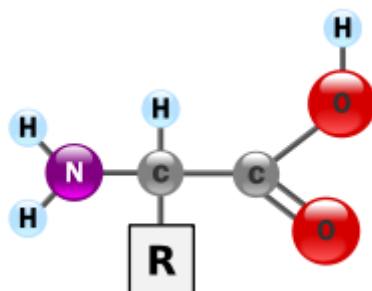
Vsebnost beljakovin v cvetnem prahu se po ugotovitvah več avtorjev giblje med 10 in 40 g/100 g suhe snovi (SS) (Herbert in Shimanuki, 1978; Solberg in Remedios, 1980; Bell in sod., 1983; Talpay, 1984;



Szczesna in sod., 1995; Szczesna in Rybak-Chmielewska, 1998; Almeida-Muradian in sod., 2005; Soares de Arruda in sod., 2013) in je odvisna od botaničnega izvora (Campos in sod., 2008). Vsebnost beljakovin v cvetnem prahu se obravnava kot direktna zanesljiva meritev njegove prehranske vrednosti (Pernal in Currie, 2000; Cook in sod., 2003). Roulston in sod. (2000) so oblikovali bazo vsebnosti surovih beljakovin v ročno nabranem cvetnem prahu 377 rastlinskih vrst. Ugotovili so, da cvetni prah vetrocvetk ni beljakovinsko slabši od cvetnega prahu žužkocvetk. Čebele nabirajo cvetni prah, v katerem se vsebnost beljakovin giblje med 12 in 61 g/100 g SS. Human in Nicolson (2006) poročata o vsebnosti beljakovin v cvetnem prahu *Aloe greatheadii* var. *davyana*, ki je bila v povprečju 31,4 g/100 g SS. Leta 2013 pa sta poročala o vsebnosti beljakovin v cvetnem prahu sončnice (*Helianthus annuus* L., Asteraceae), ki je znašala 14,21 g/100 g SS. Carpes in sod. (2009) so ugotovili, da ima cvetni prah iz Braziliije vsebnost beljakovin med 15,04 in 27,69 g/100 g SS. Vsebnost beljakovin v portugalskem delno posušenem cvetnem prahu pa je bila med 24,23 in 34,18 g/100 g SS (Estevinho in sod., 2012). Feas in sod. (2012) poročajo o vsebnosti beljakovin v mešanici cvetnega prahu iz Portugalske, ki je bila v povprečju med 19,1 in 27,1 g/100 g SS. Iz Kitajske Yang in sod. (2013) poročajo, da se vsebnost beljakovin v cvetnem prahu giblje med 14,25 in 28,95 g/100 g SS. Ugotovili so, da je bila vsebnost beljakovin v vzorcih cvetnega prahu nabranega v drugi polovici leta za 20 % večja kot v prvi polovici leta.

Aminokislina je vsaka molekula, ki vsebuje aminske (-NH₂) kot karboksilno (-COOH) funkcionalno skupino skupaj s stransko verigo, specifično za vsako aminokislino. Ključni sestavni elementi aminokislin so ogljik, vodik, kisik in dušik skupaj z ostalimi elementi, ki se nahajajo na stranskih verigah posameznih aminokislin. Poznamo okoli 500 aminokislin, ki jih lahko klasificiramo v različne skupine. Lahko jih razdelimo v skupine glede na pozicijo funkcionalne skupine na α , β , γ in δ aminokislina, ostale skupine pa se navezujejo na polarnost, pH vrednost in tip stranske verige (alifatske, aciklične, aromatske, itd).

Polimerno verigo aminokislinskih ostankov (kar ostane od aminokislina, ko se odcepi molekula vode pri nastanku peptidne vezi), povezanih s peptidno vezjo, imenujemo polipeptid oziroma beljakovina (protein), če gre za daljšo verigo. Proces nastanka beljakovin v organizmu poteka s prevajanjem informacijske RNA (mRNA). mRNA služi kot matrica za nastanek polipeptidne verige. Poznamo 20 standardnih aminokislin, nekatere med njimi imenujemo esencialne aminokislina. Ker jih naše telo ne more sintetizirati samo, jih moramo nujno vnašati v telo s hrano.



Slika 5 Aminokisliline so osnovni gradniki beljakovin

Vsebnost aminokislin definira hranilno vrednost cvetnega prahu bolj podrobno kot vsebnost skupnih beljakovin, saj je hranilna vrednost cvetnega prahu manjša, če so prisotne majhne količine esencialnih aminokislin (de Groot, 1953). V večini cvetni prah vsebuje vse esencialne aminokisliline, vendar se količina le-teh razlikuje med vrstami cvetnega prahu (Roulston in sod., 2000). Kakovost beljakovin cvetnega prahu je odvisna od količine esencialnih aminokislin v odvisnosti od prehranskih potreb čebel (de Groot, 1953). Aminokisliline prolin, glutaminska in asparaginska kislina, lizin in levcin so prevladujoče, saj predstavljajo približno 55 % skupnih aminokislin (Campos in sod., 2008). Tudi Yang in sod. (2013) poročajo, da so prolin, glutaminska in asparaginska kislina prevladujoče aminokisliline v cvetnem prahu. Vsebnost skupnih esencialnih aminokislin v kitajskem cvetnem prahu se je gibala med 4,62 in 11,60 g/100 g SS (Yang in sod., 2013).

Večina cvetnih prahov vsebuje vse aminokisliline, vendar nekatere vrste cvetnega prahu ne vsebujejo naslednjih aminokislin: fenilalanina, triptofana, prolina, tirozina in aminobutirične kisline. Triptofan in fenilalanin sta edini esencialni aminokislilini, ki nista vedno prisotni v cvetnem prahu. Aminokisliline v cvetnem prahu, katere niso prisotne v prostem stanju, po navadi niso prisotne tudi kot vezane na proteinih (Stanley in Linskens, 1974). Solberg in Remedios (1948) sta ugotovila, da predstavljajo naslednje aminokisliline 60 % vsebnosti proteinov v pelodnem zrnцу: asparaginska kislina, glutaminska kislina, prolin, levcin, lizin in arginin. Med prostimi aminokislilinami največkrat manjka prolin, ki lahko predstavlja 1-2 % skupne mase beljakovin v zrnцу cvetnega prahu (Stanley in Linkens, 1974).

Dandanes so izrednega pomena v živilih viri triptofana, ki zmanjšuje depresijo in anksioznost. Cvetni prah je vir triptofana, kar se bi lahko izkoristilo v prid večje prepoznavnosti in pomembnosti cvetnega prahu kot živila. Enako velja za aminokislino fenilalanin (Campos in sod., 2008).

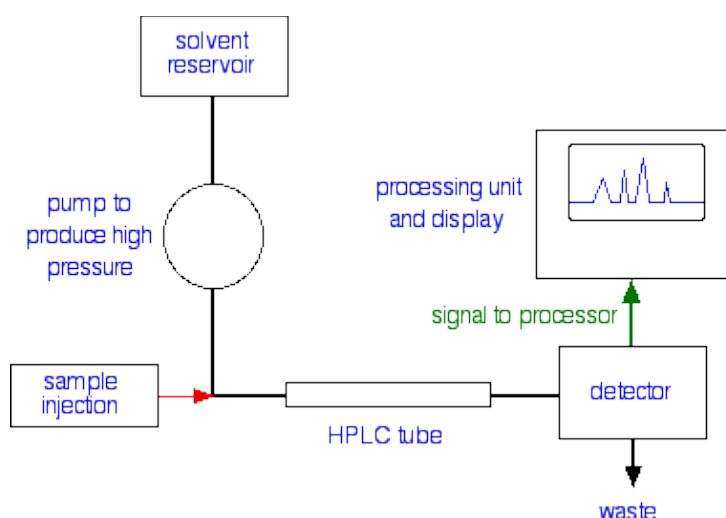
Za določanje vsebnosti beljakovin večina avtorjev uporablja Kjedahlovo metodo. Z omenjeno metodo lahko v cvetnem prahu pa tudi drugih živilih izmerimo skupni dušik v analiziranemu vzorcu. Proteini in aminokisliline v hrani so v veliki večini viri dušika (ogljikovi hidrati, maščobe, prehranska vlaknina dušika ne vsebujejo). Če določeno vsebnost dušika določenega v analiziranem vzorcu pomnožimo z ustreznim faktorjem glede na pričakovano vsebnost proteinov v določenem živilu, lahko tako dobimo vsebnost surovih beljakovin. V večini primerov se za preračun uporablja faktor 6,25, saj je povprečna vsebnost dušika v proteinih 16 % (1/0,16).

Uporaba Kjedahlove metode za preračun skupnega dušika v surove beljakovine je široko uporabna v analitiki hrane in pijač, katero priporoča tudi komisija AOAC, zato je postala uporabna za določanje surovih beljakovin v vrsti različnih živil. Poleg Kjedahlove metode se za določanje vsebnosti beljakovin lahko uporablja tudi Dumasova metoda. Tudi v analitiki cvetnega prahu večina avtorjev uporablja za preračun skupnega dušika v surove beljakovine faktor $N * 6,25$ (Campos in sod., 2008, Bogdanov, 2012). Čeprav nekateri avtorji navajajo tudi uporabo faktorja $N * 5,6$ (Rabie, 1983), ki naj bi bil bolj primeren za cvetni prah. Metoda po Kjedahlu zazna ves celokupen proteinski dušik v analiziranemu

vzorcu živila. Ne zazna pa ne proteinskega dušika, ki je zelo variabilen in se nahaja na prostih aminokislinah, nukleotidih, kreatinu in holinu ... Ne proteinski dušik v živilih predstavljata tudi urea in amonijev nitrat, ki nimata nobene hranilne vrednosti za ljudi. FAO (*Food and Agricultural Organization of United Nations*) priporoča, da se lahko le na podlagi vsebnosti aminokislin v živilih določa mera za vsebnost beljakovin. Hkrati pa navaja, da kadar informacije o vsebnosti aminokislin v določenem živilu niso znane, se za določitev vsebnosti surovih beljakovin šteje za sprejemljivo metoda po Kjedadlu. Študije vsebnosti beljakovin v cvetnem prahu kažejo zelo različne rezultate in metodološke težave zaradi različne količine dodanega nektarja s strani čebel pri izdelovanju zrnca cvetnega prahu (Roulston in Cane, 2000) in tudi zaradi različnega botaničnega izvora cvetnega prahu.

Metode za določanje aminokislin po navadi temeljijo na kromatografskem ločevanju aminokislin prisotnih v analiziranemu vzorcu. Aparatura za detekcijo aminokislin je lahko visoko ali nizko tlačni tekočinski kromatograf, ki je sposoben s pomočjo mobilne faze ločevanja aminokislin na kromatografski koloni. Aparatura mora imeti možnost po kolonske ali pred kolonske derivatizacije. Po navadi se uporablja ultravijolični ali fluorescentni detektor, kar je odvisno od uporabljene metode derivatizacije. Analogni signal aparature se s pomočjo snemalne naprave zabeleži v obliki kromatograma, ki se uporablja za kvantifikacijo določene aminokislinae.

V tujih raziskavah se avtorji poslužujejo določanja aminokislin v cvetnem prahu s pomočjo ionsko izmenjevalne kromatografije (Vanderplanck in sod., 2013; Weiner in sod., 2010), aminokislinskih analizatorjev (Waters HPLC amino acid analyser) (Human in Nicolson, 2006; Yang in sod., 2013), tekočinske kromatografije s fluorescenčnim detektorjem (Gonzales Paramas in sod., 2006; Zhang in sod., 2009).



Slika 6 Shematski prikaz pretoka HPLC

Triptofan (Trp) je ena izmed 20 standardnih aminokislin, ki je tudi esencialna aminokislina v človeški prehrani. Ima pomembno vlogo pri proteinski biosintezi, deluje pa tudi kot perkurzor za nekatere



pomembne fiziološko aktivne substance (serotonin). Detekcija brez derivatizacije je možna zaradi strukturnih lastnosti. Trp je esencialna aminokislina in je prekursor serotonina. Podobne lastnosti pa ima tudi aminokislina tirozin (Tyr), ki je prekursor melanina in adrenalina ter ščitničnih hormonov.

Vsebnost vode

Voda je v cvetnem prahu naravno prisotna. V svežem cvetnem prahu je njena količina odvisna od rastline, vremena in načina pridobivanja cvetnega prahu (Božnar, 2011). V svežem cvetnem prahu je med 20 in 30 % vode, zato je zelo pomembno shranjevanje takšnega cvetnega prahu. To mora potekati v zamrzovalniku, da se izognemo pojavu bakterij in plesni (Campos in sod., 2008).

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, M. A. in sod., 2011). Če je vsebnost vode v cvetnem prahu večja kot 10 %, je nevarnost, da bo pričel fermentirati (Bogdanov, 2012).

Po drugi strani pa lahko prekomerno zmanjšanje vsebnosti vode vpliva na hiter pojav žarkosti. Tveganje pri uživanju visoko hranilne hrane, kot je cvetni prah, ki vsebuje veliko vsebnost vode in ga hranimo na sobni temperaturi, je kontaminacija z glivami, ki lahko proizvajajo kancerogene mikotoksine. Zato je potrebno cvetni prah pred skladiščenjem sušiti, da mu zmanjšamo vsebnost vode. Sušenje moramo izvesti pod kontroliranimi pogoji, da ne uničimo občutljivih sestavin. Omogočiti moramo integriteto njegovih sestavnih delov kot tudi njegove biološke lastnosti (Morgano, M.A. in sod., 2011).

Določanje vode je zelo težavno, saj se pri sušenju cvetnega prahu zaradi visoke temperature razgrajujejo organske sestavine, na katere je vezana voda, zaradi tega se tudi izgubljajo aromatične snovi (Gergen, I. in sod., 2006). Pri ocenjevanju senzoričnih lastnosti cvetnega prahu v Švici so ugotovili, da cvetni prah, ki vsebuje manj kot 6 % vode, postane preveč suh in je manj sprejemljiv iz senzoričnega vidika (Bogdanov, 2012).

Vsebnost vode v cvetnem prahu določamo ali s sušenjem do konstantne teže v sušilni omari ali infrardeči pečici ali s Karl-Fischerjevo metodo (Campos in sod., 2008). 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 vode (Campos in sod., 2008).

Vsebnost maščob



Obstajajo velike razlike glede maščobne sestave cvetnega prahu 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 plinske kromatografije 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).

Objavljenih je bilo že nekaj študij o vsebnosti lipidov v cvetnem prahu. Ena študija poroča, da predstavljajo proste maščobne kisline 3 % skupnih lipidov, in sicer je približno polovica nenasičenih maščobnih kislin, kot so oleinska, linolna in linolenska kislina. V študiji, ki je zajela cvetni prah iz različnih geografskih območij, je bilo ugotovljeno, da je vsebnost nenasičenih maščobnih kislin od 50 do 60 %. Prevladujejo predvsem oleinska, linolna in α -linolenska kislina, preostanek predstavljajo nasičene maščobne kisline, v glavnem palmitinska kislina. Ostale fiziološko pomembne komponente pa so steroli (Bogdanov, 2012).

Vsebnost maščob v cvetnem prahu se določi s pomočjo ekstrakcije s petroletrom (Bogdanov, 2012).

Vsebnost mineralnih snovi

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. Vsebuje številne sestavine, ki ugodno vplivajo na njegovo prehransko in zdravilno vrednost (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).

Vsebnost ogljikovih hidratov

V večini so v cvetnem prahu prisotni polisaharidi, kot so: škrob in različne sestavine celičnih sten. Izračunana vsebnost ogljikovih hidratov je ponavadi višja kot tista, ki jo določamo z analitičnimi metodami (tekočinska in plinska kromatografija). Do tega pride, ker se ponavadi z analitičnimi metodami ne da določiti v celoti prehranske vlaknine in sestavin celičnih sten. Lahko pa računsko podamo njuno skupno vrednost. Od celote odštejemo vsebnost vode, maščob, beljakovin in vsebnost pepela. Med nižje molekularnimi sladkorji predstavljajo fruktoza, glukoza in saharoza okoli 90 % vseh enostavnih sladkorjev, delež pa je odvisen tudi od vrste rastline. Razmerje med F/G je med 1,0 in 2,5 (Campos in sod., 2008).



Prehranska vlaknina

Prehranska vlaknina je sestavljena iz škroba in netopnih polisaharidov, kot sta celuloza in sporopolenin itd. Vrednosti vsebnosti prehranske vlaknine so zelo različne, kar je posledica uporabe različnih metod določanja in specifične sestave peloda različnih rastlin (Bogdanov, 2012).

Na splošno je vsebnost ogljikovih hidratov v cvetnem prahu določljiva s kalkulacijo, saj je skupna vsebnost ogljikovih hidratov težko določljiva (Bogdanov, 2012).

Pregled možnih onesnaževalcev cvetnega prahu

FIZIKALNO ONESNAŽENJE

Cvetni prah, ki je namenjen za prehrano, ne sme vsebovati nečistoč, kot so delci čebel, mrtvice ali voska, delci rastlin ali insekti, delci poapnele zalege in druga mehanska nesnaga. Prav tako cvetnega prahu ne pridobivamo iz družin, katere so oslabiljene. Cvetni prah je tudi idealna hrana za voščeno večjo (voščenega molja), zato lahko v njem najdemo tudi delce večje, ličinke in jajčeca. Vse fizikalne nečistoče je potrebno iz cvetnega prahu odstraniti. To storimo z ročnim prebiranjem ali z zračnimi čistilci. Končno pa je vsak cvetni prah zaželeno kontrolirati tudi s povečevalnim steklom in čiščenje dokončati z ročnim prebiranjem.

KEMIJSKO ONESNAŽENJE – vpliv zunanjega okolja

Onesnaževalci v okolju izvirajo iz zraka, vode, prsti in se lahko preko čebel prenesejo v različne čebelje pridelke.

Težke kovine

Industrija in promet sta glavna vira pojava težkih kovin v zraku in prsti. Svinec in kadmij sta najpogostejši težki kovini, saj prvi izvira v glavnem iz prometa, vir kadmija pa je kovinska industrija in sežigalne peči. Kadmij se nalaga v tleh in zaradi tega lahko pride po rastlini v nektar ali mano ali se kopiči v telesu čebel (Bogdanov, 2006 in Pryzbylowaki, 2003), medtem ko je svinec v glavnem prisoten v zraku in lahko onesnaži nektar, mano in cvetni prah. Težke kovine so stalno prisotne v naravi in se ne razgrajujejo, zaradi česar se lahko nabirajo tudi na dlačicah čebeljih teles in se na takšen način prenesejo preko nektarja, mane, vode in cvetnega prahu v čebelji panj (Bortolotti in sod., 2003). Bogdanov (2006) poroča o vsebnosti svinca v cvetnem prahu v koncentraciji 0,02-3,9 mg/kg in o vsebnosti kadmija v količini 0,05-2,3 mg/kg. Kljub možnemu pojavu le-teh v cvetnem prahu in ostalih čebeljih pridelkih pa vsebnost težkih kovin v čebeljih pridelkih ni predpisana (Bogdanov, 2006).



Radioaktivni elementi

Bogdanov (2006) poroča, da prisotnost radioaktivnih elementov v čebeljih pridelkih ni problem, razen ob morebitnih nesrečah. V čebeljih pridelkih se potencialno lahko pojavita ^{40}K in ^{137}Cs . Prvi je v naravi naravno prisoten, medtem ko je prisotnost drugega posledica jedrske nesreče v Černobilu. Radioaktivnost izražamo v Becquerel (Bq) na kg. Najvišja dovoljena vrednost prisotnosti radioaktivnih elementov v živilih je 600 Bq/kg.

V cvetnem prahu iz Ukrajine so med leti 1986 in 1989 zaznali radioaktivni ^{137}Cs v količinah 11070 Bq/kg, v Franciji 283 Bq/kg, v Italiji 1000-2500 Bq/kg in na Hrvaškem 20-32,3 Bq/kg (1990) (Bogdanov, 2006).

Organska onesnažila

Vir le-teh so motorna olja, ohlajevalna sredstva in maziva, ki so bila proizvedena pred letom 1980. Govorimo o PCB oz. polikloridnih bifenilih. Te substance so še vedno prisotne v našem okolju in lahko onesnažijo rastline, čebele in čebelje pridelke (Bogdanov, 2006). Policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH-i) so pomembna okoljska onesnažila, ki nastanejo in se sproščajo pri nepopolnem izgorevanju ali s pirolizo organske snovi, med industrijskim procesom ali drugimi človeškimi aktivnostmi (Šešerko, 2008).

Pesticidi iz kmetijstva

Pesticide iz kmetijstva delimo na insekticide, herbicide, baktericide in fungicide (Bogdanov, 2006). V zadnjem času je velika pozornost namenjena prav imidaclopridu, ki je sistemski insekticid (Bogdanov, 2006) in se uporablja za obdelavo semen koruze. Bogdanov (2006) ugotavlja, da je prisotnost imidacloprida mogoče zaznati v nektarju, medu in cvetnem prahu v zelo nizkih koncentracijah od 0,001 do 0,005 mg/kg. Po drugi strani pa Chauzat in sod. (2006) poročajo o prisotnosti imidacloprida v 49 % vzorcev analiziranega cvetnega prahu. Poleg imidacloprida pa so zaznali tudi vsebnosti tao-fluvalinata in kumafosa, ki se lahko uporabljata tudi v čebelarstvu.

Za čebelje pridelke ni maksimalno dovoljene vsebnosti pesticidov. Švicarji imajo postavljene meje tolerance glede prisotnosti imidacloprida v koruzi, in sicer do 0,01 mg/kg in v sadju do 0,05 mg/kg. Do sedaj ostanki imidacloprida, ugotovljeni v medu in cvetnem prahu, naj ne bi predstavljali težav za zdravje ljudi, medtem ko je vpliv imidacloprida na čebele večji problem (Bogdanov, 2006). V Sloveniji je uporaba koruznih semen tretiranih z imidaclopridom prepovedana.



V cvetnem prahu pa se lahko najdejo tudi fungicidi, ki se uporabljajo za zatiranje škodljivcev na sadnem drevju in poljščinah. Fungicidi so tudi največkrat prisotni v cvetnem prahu. Tudi herbicidi prizadenejo v veliki meri čebele in cvetni prah, redkeje pa so prisotni v medu.

Proti bakterijskim boleznim sadja pa se uporabljajo tudi antibiotiki, predvsem streptomycin, ki se uporablja za zdravljenje peškastega sadja. Njegovo prisotnost so kot pogosto ugotovili v 21 % vzorcev iz Nemčije. Prav zaradi tveganja prisotnosti tega antibiotika v čebeljih pridelkih v večini držav ES ni dovoljen za uporabo (Bogdanov, 2006).

Čebele so s svojo prisotnostjo v naravi biološki indikatorji čistosti določene geografske regije. Imajo pa tudi vlogo filtra, saj lahko začetno koncentracijo pesticidov v nektarju v času pretvorbe v med zmanjšajo za faktor 1000. Moderni pesticidi pa so v večini tudi nestabilni in hitro razpadejo. Najvišja dovoljena meja vsebnosti pesticidov v čebeljih pridelkih še ni postavljena, je pa vsebnost pesticidov v čebeljih pridelkih primerljiva s prisotnostjo pesticidov v drugih živilih in prisotnost le-teh naj ne bi predstavljal problemov za zdravje ljudi. Da zmanjšamo pojav pesticidov v čebeljih pridelkih se le-teh naj ne uporablja v času cvetenja rastlin ali med pašno aktivnostjo čebel. Čebelnjaki naj bodo od intenzivnih kmetijskih površin, kjer se uporabljajo pesticidi, oddaljeni vsaj 3 km (Bogdanov, 2006). Če se zaradi varstva rastlin teh le poslužujemo, uporabljajmo le-takšne, ki so čebelam neškodljivi, in izvajajmo škropljenja zvečer, v brezvetrju, ko so čebele v panjih in se lahko aplicirano sredstvo do jutra posuši. Z medsebojnim sodelovanjem kmetov in čebelarjev lahko zelo zmanjšamo vplive le-teh tako na čebele kot tudi na čebelje pridelke.

Gensko spremenjene rastline

V zadnjih nekaj letih se pojavlja vse več gensko spremenjenih rastlin in tudi cvetnega prahu. V literaturi pa nisem zasledila, da bi bila opravljena kakšna študija o vplivu gensko spremenjenega cvetnega prahu na humano prehrano. Potrošniki se moramo zavedati tega problema. V EU je predpis o označevanju izdelkov, ki vsebujejo gensko spremenjene organizme, saj če se ti pojavijo v koncentraciji večji kot 0,9 %, mora biti takšen izdelek tudi označen, da vsebuje gensko spremenjene organizme (Campos in sod., 2008).

V Sloveniji zaenkrat gojenje GSO ni dovoljeno. S tem pridobivamo na konkurenčnosti v primerjavi z državami, kjer je gojenje GSO dovoljeno in se ti pojavljajo v različnih živilih. Kot že omenjeno, pa zaenkrat ni znanega vpliva prisotnosti GSO v hrani na zdravje ljudi.

KEMIJSKO ONESNAŽENJE – vpliv čebelarstva

V čebelarstvu se zaradi ohranitve čebel pred parazitom *Varroa destructor* uporabljajo akaricidi, ki so lahko sintetični ali naravni. Cvetni prah osmukanec je čebelji pridelek, ki je najmanj podvržen vplivom

čebelarjenja, saj se pridobiva pred vhomom v čebelji panj (Bogdanov, 2012). Ostali čebelji pridelki, predvsem vosek in med, so lahko veliko bolj obremenjeni z ostanki akaricidov v primerjavi s cvetnim prahom, v kolikor se v čebelarstvu uporabljajo.

MIKROBIOLOŠKO ONESNAŽENJE

Čebelarji so začeli cvetni prah intenzivneje pridobivati šele v drugi polovici 20. stoletja, zato govorimo o relativno mladem proizvodu, kateri je na splošno med potrošniki premalo poznan.

Svež cvetni prah – osmukanec vsebuje med 20 in 30 % vode, zaradi česar je idealno gojišče za mikroorganizme, kot so npr. bakterije in kvasovke. Svež cvetni prah pa je tudi privlačna hrana za različne majhne živalce (Božnar, 2011). Zrnca cvetnega prahu čebele med seboj vlažijo in s tem se v cvetnem prahu – osmukancu znajdejo tudi določeni mikroorganizmi, ki izvirajo iz prebavil čebel kot so plesni, kvasovke in bakterije.

Z namenom preprečevanja kvarjenja cvetnega prahu – osmukanca in ohranjanja njegove kakovosti zahteva pridelava le-tega visoke higienske standarde in vestno delo pri njegovem pridobivanju. Da se prepreči kvarjenje, je potrebno pobirati cvetni prah vsak dan in ga takoj zamrzniti z namenom, da se zavre rast škodljivcev. Po odvzemu iz zamrzovalnika ga je potrebno čim prej predelati. To storimo bodisi tako, da ga posušimo ali ga dodamo v med. Kljub mikrobiološki občutljivosti pa ima svež cvetni prah ohranjene vse naravne sestavine in visoko hranilno vrednost ter je za človeka bolj prebavljiv kot posušen (Božnar, 2011).

Otrokom do 1. leta starosti cvetnega prahu ne dajemo. Razlog je enak kot pri medu – cvetni prah je surova hrana in lahko vsebuje spore bakterije *Clostridium botulinum* (Božnar, 2011), v primeru nehiigienskega pridobivanja pa je lahko cvetni prah vir okužb tudi z drugimi patogenimi bakterijami.

Tabela 2 Mikrobiološki in ostali onesnaževalci cvetnega prahu (Campos in sod., 2008).

Mikrobiološke analize	Vrednosti
<i>Salmonella</i>	brez/10 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	brez/1 g
<i>Enterobacteriaceae</i>	max. 100/g
<i>Escherichia coli</i>	brez/ g
Skupne aerobne bakterije	< 100.000/g
Plesni in kvasovke	< 50.000/g
Alfatoksin B1	max 2 lg/kg
Alfatoksin B1+B2+G1+G2	max. 4 lg/kg
Ostale analize	Vrednosti
Pesticidi	< MRL *
Piretroidi	< MRL
Kloramfenikol	brez
Metaboliti nitrofurana	brez



Sulfonamidi	brez
Težke kovine Pb	max. 0,5 mg/kg
Težke kovine Hg	max. 0,01 mg/kg
Težke kovine Cd	max 0,03 mg/kg
Radioaktivnost (Cs-134 in Cs-137)	< 600 Bq/kg

*Morajo biti manjše od vrednosti, ki so določene za med.

Trenutno ni nobenih specifičnih omejitev glede onesnaževalcev cvetnega prahu. Tako kot pri medu tudi v cvetnem prahu ni dovoljena prisotnost nobenih antibiotikov. Na splošno pa se kaže, da je bakterijsko onesnaženje večji problem kot onesnaženje s pesticidi, antibiotiki in težkimi kovinami (Campos in sod., 2008). V objavi Camposove in sod. (2008) so sicer navedene omejitvene vrednosti vsebnosti nekaterih težkih kovin v cvetnem prahu, vendar v nam poznani zakonodaji omejitve vsebnosti težkih kovin za cvetni prah niso predpisane.

MATERIAL IN METODE

V času od maja do septembra smo na lokaciji čebelnjaka HOFER odvzemali vzorce cvetnega prahu. Cvetni prah smo odvezemali s pomočjo zunanjih in notranjih smukalnikov cvetnega prahu. Za potrebe analiz smo odvzete vzorce cvetnega prahu po odvzemu zamrznili do izvedbe analiz.

Določanje vsebnosti beljakovin v cvetnem prahu

Mnogi avtorji navajajo, da se hranilna vrednost cvetnega prahu ocenjuje glede na vsebnost beljakovin v cvetnem prahu. V vzorcih smo določili vsebnost celotnega dušika (t.j. Kjeldahlov dušik), ki smo jo množili s faktorjem 6.25 ($C_N \times 6.25 = C_{\text{beljakovin}}$).

Zatehto vzorca (približno 0,2 g) smo kuhali v mešanici žveplene kisline, salicilne kisline in katalizatorja) minimalno 2 uri pod refluksom, 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 refluksom 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 vode v cvetnem prahu

Vsebnost suhe snovi (oz. vlage) smo določili gravimetrično ob sušenju na 105 °C do konstantne teže v laboratorijskem sušilniku (običajno > 6 ur). (Metoda povzeta SIST EN 14346: 2007).

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 prehranske vlaknine z metodo AOAC 991.43 (AOAC Official Method 991.43, 1995)

Priprava celita in filtrirnih lončkov

Prežarimo več gramov celita na 525 °C 3 ure. Po ohlajanju v eksikatorju ga po 1 g natehtamo v filtrirne lončke, ki so bili predhodno 1 uro sušeni v sušilniku na 105 °C. Filtrirne lončke s celitom sušimo 1 uro na 105 °C.

Razmaščevanje vzorca

Vzorci, ki vsebujejo več kot 5 g maščob na 100 g, je potrebno predhodno razmastiti s petroletrom. Pred postopkom odstranjevanja maščobe pripravimo tulce tako, da na dno tulca damo vato in vanj zatehtamo okoli 8 g vzorca, v tulce z zatehtanim vzorcem damo še dodaten kos vate in nanje namestimo magnet. Hkrati pripravimo ekstrakcijske lončke z vrelnimi kroglicami in petroletrom. Vklapimo ekstrakcijsko enoto, na katero z magneti namestimo pripravljene tulce in stojalo s pripravljenimi ekstrakcijskimi lončki, nato ekstrahiramo 1 uro. Po končani ekstrakciji postavimo tulce v sušilnik na 60 °C za 1 uro oz. dokler ne preostali petroleter popolnoma izhlapi. Tulce z razmaščenim vzorcem ponovno stehtamo, razmaščen vzorec pa shranimo do uporabe.

Encimska razgradnja

Delo izvajamo v štirih vzporednih določitvah, po filtraciji dve paralelki vzorca uporabimo za določanje vsebnosti beljakovin in dve za določanje vsebnosti pepela v ostanku. Vzoredno pripravimo dva slepa vzorca. V 250 mL erlenmajerice natehtamo 1 g vzorca in pazimo, da med paralelkama ni odstopanja za več kot 20 mg, nato dodamo 40 mL pufru MES/TRIS z vrednostjo pH 8,3. V erlenmajerice dodamo 50 µL termostabilne α-amilaze, dobro premešamo, pokrijemo z alufolijo in inkubiramo v vodni kopeli (95–100 °C) 30 minut, z občasnim mešanjem. Odštevanje časa začnemo, ko raztopina v erlenmajerici doseže 95 °C. Raztopino nato v ledeni kopeli ohladimo na 60 °C in z dodamo 50 µL proteaze, dobro



premešamo, pokrijemo z alufolijo in v stresalni kopeli inkubiramo 30 minut pri 60 °C. Po 30 minutah dodamo 5 mL 0,56 M HCl in s 5 % raztopinama NaOH oz. HCl uravnamo vrednost pH na vrednost 4,0–4,7. Dodamo 150 µL amiloglukozidaze, dobro premešamo, pokrijemo z alufolijo in v stresalni kopeli inkubiramo 30 minut pri 60 °C. Čas inkubacije začnemo meriti, ko raztopina v erlenmajerici doseže 60 °C.

Filtracija in obarjanje

Pred začetkom filtracije pripravimo vakuumsko črpalko, na katero pritrdimo presesalne buče. Še vroč vzorec iz erlenmajerice prefiltriramo skozi stehšan filtrirni lonček s celitom, ki je postavljen na presesalno bučo. Po končani filtraciji filtrirni lonček dvakrat speremo z 10 mL destilirane vode s temperaturo 70 °C. Po filtraciji prelijemo filtrat v 500 mL erlenmajerico, nato z ogretim (60 °C) 95 % EtOH speremo še presesalno bučo. Filtratu dodamo štirikratno maso 95 % EtOH (glede na maso filtrata), ogretega na 60 °C. Erlenmajerice pokrijemo s pokrovom in obarjamo 1 uro na sobni temperaturi.

100 mL erlenmajerico, v kateri je bil vzorec, speremo še trikrat s 15 mL 78 % EtOH, dvakrat z 10 mL 95 % EtOH in trikrat z 10 mL acetona. Filtrirne lončke 5 ur sušimo v sušilniku na 105 °C, nato jih v eksikatorju ohladimo in tehtamo. Ostanek netopne prehranske vlaknine dobimo tako, da od mase filtrirnega lončka z ostankom vlaknine odštejemo maso filtrirnega lončka s celitom. Nato moramo ostanek netopne prehranske vlaknine korigirati še na vsebnost pepela in na vsebnost beljakovin v ostanku ter slepe vzorce.

Ostanek topne prehranske vlaknine dobimo tako, da vsebino 500 mL erlenmajerice po 1 uri obarjanja prefiltriramo skozi nov stehšan filtrirni lonček s celitom. Erlenmajerico speremo trikrat s 15 mL 78 % EtOH, dvakrat z 10 mL 95 % EtOH in trikrat z 10 mL acetona. Po končani filtraciji filtrirne lončke sušimo 5 ur na 105 °C. Po sušenju jih ohladimo v eksikatorju in tehtamo. Če od te mase odštejemo maso praznega filtrirnega lončka s celitom, dobimo maso ostanka topne vlaknine, ki jo korigiramo še na vsebnost pepela, vsebnost beljakovin in slepe vzorce.

Izračun vsebnosti netopne (NPV) in topne prehranske vlaknine (TPV):

$$\text{Vsebnost NPV (g/100 g)} = \frac{m_{On} - m_{Pn} - m_{Bn} - m_{SVn}}{m_v} \times 100$$

m_v = masa vzorca (g)

m_{On} = masa ostanka netopne vlaknine (g)

m_{Pn} = masa pepela v ostanku netopne vlaknine (g) (enačba 20)



m_{Bn} = masa beljakovin v ostanku netopne vlaknine (g) (enačba 21)

m_{SVn} = masa ostanka v slepem vzorcu (g)

$$\text{Vsebnost TPV (g/100 g)} = \frac{m_{Ot} - m_{Pt} - m_{Bt} - m_{SVt}}{m_v} \times 100$$

m_v = masa vzorca (g)

m_{Ot} = masa ostanka topne vlaknine (g)

m_{Pt} = masa pepela v ostanku topne vlaknine (g) (enačba 20)

m_{Bt} = masa beljakovin v ostanku topne vlaknine (g) (enačba 21)

m_{SVt} = masa ostanka v slepem vzorcu (g)

Skupna prehranska vlaknina v svežem vzorcu je vsota netopne prehranske vlaknine in topne prehranske vlaknine:

$$\text{Vsebnost SPV v svežem vzorcu (g/100 g)} = NPV + TPV$$

NPV = netopna prehranska vlaknina (g/100 g)

TPV = topna prehranska vlaknina (g/100 g)

Določanje vsebnosti pepela v ostanku prehranske vlaknine:

Izračun:

$$m_{Pn/t} (g) = m_{\check{z}} - m_L - m_C$$

$m_{Pn/t}$ = masa pepela v netopnem oz. topnem ostanku prehranske vlaknine (g)

$m_{\check{z}}$ = masa vzorca po žarjenju (g)

m_L = masa praznega lončka (g)

m_C = masa celita (g)

Določanje vsebnosti beljakovin v ostanku prehranske vlaknine:

$$B_{n/t} (mg) = \frac{V_{HCl} \times M_N \times 10^{-1} \times 6,25}{1000}$$

$B_{n/t}$ = vsebnost beljakovin v ostanku netopne oz. topne prehranske vlaknine (mg)



V_{HCl} = poraba 0,1 M HCl za vzorec (mL) – poraba 0,1 M HCl za slepi poskus (mL)

M_N = molska masa dušika (14 g/mol)

6,25 = empirični faktor za preračunavanje dušika v beljakovine

Določanje vsebnosti ogljikovih hidratov v cvetnem prahu

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

Skupni ogljikovi hidrati = 100 - (g beljakovin + g maščob + g pepela + g vode)

Določanje aminokislinske sestave cvetnega prahu

Analize vsebnosti aminokislin v cvetnem prahu je izvedel laboratorij Neutron iz Italije.

Določanje energijske vrednosti

Energijska vrednost cvetnega prahu je bila določena računsko na podlagi naslednje enačbe. kcal smo pretvorili v kJ.

Energijska vrednost (kcal) = 4 x (g beljakovin + g ogljikovih hidratov) + 9 x (g maščob)

Za preračun v kJ smo uporabili pretvorbeni faktor 4,2.

Mikroskopska identifikacija cvetnega prahu

Za identifikacijo cvetnega prahu se je uporabila harmonizirana melisopalinološka metoda, ki se uporablja za določanje cvetnega prahu v medu (von der Ohe in sod., 2004). Reprezentativni vzorec mešanic za identifikacijo sta predstavljala 2 g takšnega vzorca (približno 300 pelodnih zrn), ki sta bila identificirana na prisotnost posameznih botaničnih vrst (Barth in sod., 2010).

Mikrobiološka analiza cvetnega prahu

Vse poskuse smo delali v 3 bioloških ponovitvah, vse analize pa v 2 tehničnih ponovitvah.

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 pri 30 °C 3 – 5 dni.

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 skupnega števila mlečnokislinskih bakterij

Za določanje skupnega števila mlečnokislinskih bakterij smo uporabili agar MRS z dodatkom cikloheksimida, selektivno gojišče za mlečnokislinske bakterije. Plošče smo inkubirali pri 30 °C v anaerobnih pogojih 7 dni.

Določanje skupnega števila očetnokislinskih bakterij

Za določanje skupnega števila očetnokislinskih bakterij smo uporabili gojišče Freuters, selektivno gojišče za očetnokislinske bakterije. Plošče smo inkubirali pri 30 °C 7 dni.

Statistična analiza

Rezultati so prikazani v povprečnih vrednostih \pm standardna deviacija (SD). Razlike med vzorci so bile testirane s testom variance ANOVA- enosmerna, kateri je sledil Duncanov test s statistično značilno vrednostjo $\alpha=0,05$. Uporabljen je bil statistični program SPSS.

REZULTATI

Opis lokacije vzorčenja

Lokacija vzorčenja se ni spreminjala.

Raziskovalni čebelnjak v upravno-logističnem centru podjetja HOFER v premeru 3 km, kar je tudi povprečen let čebel, obdaja 28 % travniških površin. Sem sodijo površine porasle s travo, deteljami in drugimi krmnimi zelmi, ki se jih redno kosi oziroma pase. Takšna površina ni v kolobarju in se ne orje. Kot trajni travnik se šteje tudi površina, porasla s posameznimi drevesi, kjer gostota dreves ne presega 50 dreves. 36 % površin predstavlja gozd, 12 % predstavljajo ostala nekmetijska zemljišča. To so

površine, na kateri so zgradbe, ceste, ki vodijo do naselij ali hiš, parkirni prostori, rudniki, kamnolomi in druga infrastruktura, ki služi za opravljanje človeških dejavnosti. 19 % predstavljajo njive in vrtovi. To je površina, ki jo orjemo ali drugače obdelujemo in obračališča, namenjena obdelavi te površine (širine do 2 m). Na tej površini pridelujemo enoletne in nekatere večletne kmetijske rastline (žita, krompir, krmne rastline, oljnice, predivnice, sladkorna pesa). 1 % površine predstavljajo trajni nasadi. To so predvsem sadovnjaki, ki niso primerni za intenzivno pridelavo. To je običajno nasad visokodebelnih sadnih dreves, vzgojenih na bujni podlagi ali iz semena, z gostoto več kot 50 dreves na hektar. 1 % predstavljajo prav tako trajni nasadi, in sicer površina, zasajena s sadnimi vrstami, pri obdelavi katere se uporabljajo sodobne intenzivne tehnologije. Intenzivni sadovnjak zajema površino nasada skupaj z obračališči in potmi ter brežinami, če je nasad zasajen v terasah. 1 % predstavlja površina porasla z drevesi in grmičevjem. Sem uvrščamo tudi obvodno zarast, če so obrečni pasovi porasli z drevjem oziroma grmovjem, ter mejice iz gozdnih dreves oziroma grmičevja. 1 % predstavljajo ostala nekmetijska zemljišča in jih predstavljajo vode. Gre za površino, pokrito s površinskimi vodami, kot so jezera, reke, potoki in jarki, v katerih se nahaja voda.

V 3km območju preverjanja ni zajeto nobeno registrirano komunalno oz. industrijsko odlagališče. Se pa lokacija vzorčenja nahaja 3,4 km SZ od komunalnega odlagališča JKP PRODNİK d.o.o.

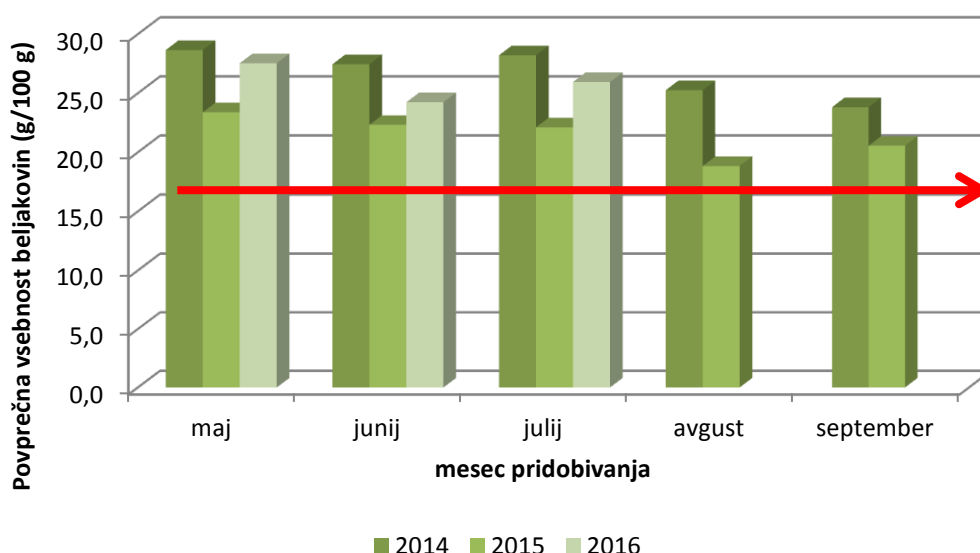
Kemijska sestava cvetnega prahu

Tabela 3 Kemijska sestava cvetnega prahu v letu 2016 pridobljenega v Hoferjevem čebelnjaku. V obrazložitvah so predstavljene vrednosti na suho težo cvetnega prahu.

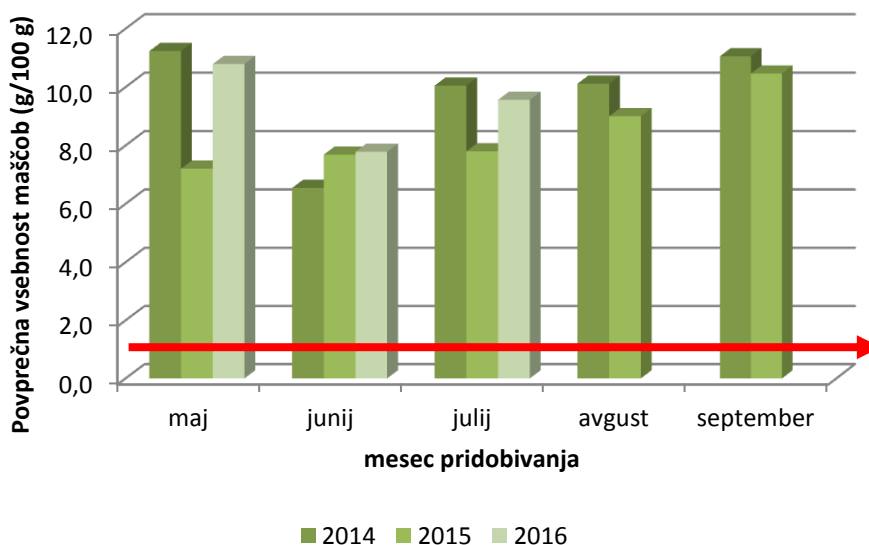
Parameter	n	Sveža teža				Suha teža			
		Povprečje	Min	Max	SD (±)	Povprečje	Min	Max	SD (±)
Vsebnost vode g/100 g	12	25,82	21,60	30,00	2,76	-	-	-	-
Vsebnost beljakovin g/100 g	12	19,07	14,90	21,90	2,65	25,76	19,40	31,29	3,90
vsebnost maščob g/100 g	12	6,83	4,00	8,30	1,49	9,23	5,49	11,46	2,07
Vsebnost pepela g/100 g	12	2,26	1,72	2,69	0,26	3,05	2,24	3,72	0,37
Vsebnost ogljikovih hidratov g/100 g	12	46,02	37,93	51,58	4,18	61,96	54,19	57,25	4,03
Energijska vrednost kJ/100 g	12	1351,77	1272,77	1440,35	54,03	1822,48	1745,91	1862,52	41,58

Skupna vsebnost surovih beljakovin v cvetnem prahu, se je gibala med vrednostmi 19,40 in 31,29 g/100 g, s povprečno vrednostjo 25,76 g/100 g. Glede na predlog mednarodne standardizacije kakovosti za posušen cvetni prah, podan na predlog Camposove in sod. (2008), naj bi posušen cvetni prah za uporabo v človeški prehrani vseboval vsaj 15,0 g/100 g surovih beljakovin. Analizirani vzorci cvetnega prahu so temu kriteriju zadostili. V grafu (slika 7) prikazujemo povprečno vsebnost beljakovin v cvetnem prahu po mesecih pridobivanja in med več leti spremljanja. Rdeča črta ponazarja predlagan normativ za vsebnost beljakovin v cvetnem prahu, ki se uporablja v prehrani ljudi.

Zaradi neugodnih vremenskih razmer, stanja čebeljih družin, ki smo jim odvzemali cvetni prah v določenih obdobjih spremljanja vzorcev cvetnega prahu nismo mogli pridobiti.

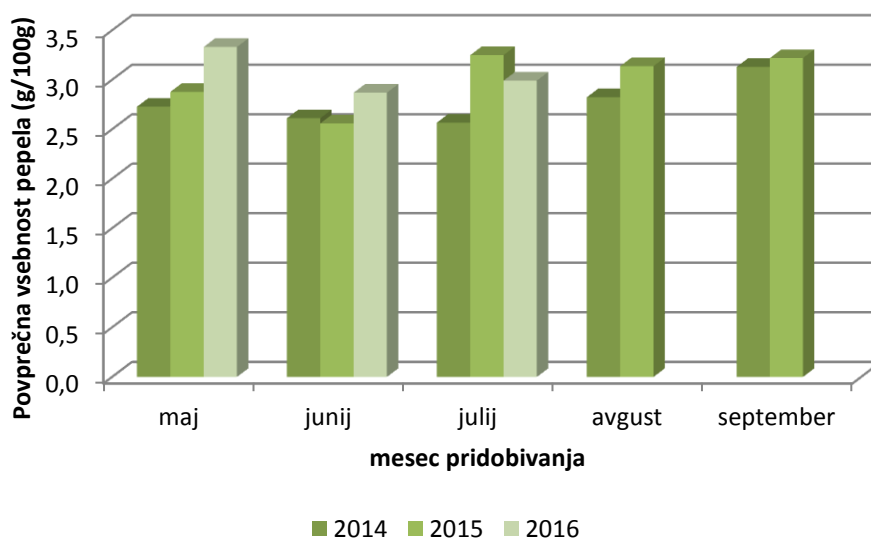


Slika 7 Povprečna vsebnost beljakovin v cvetnem prahu po različnih mesecih in letih pridobivanja.



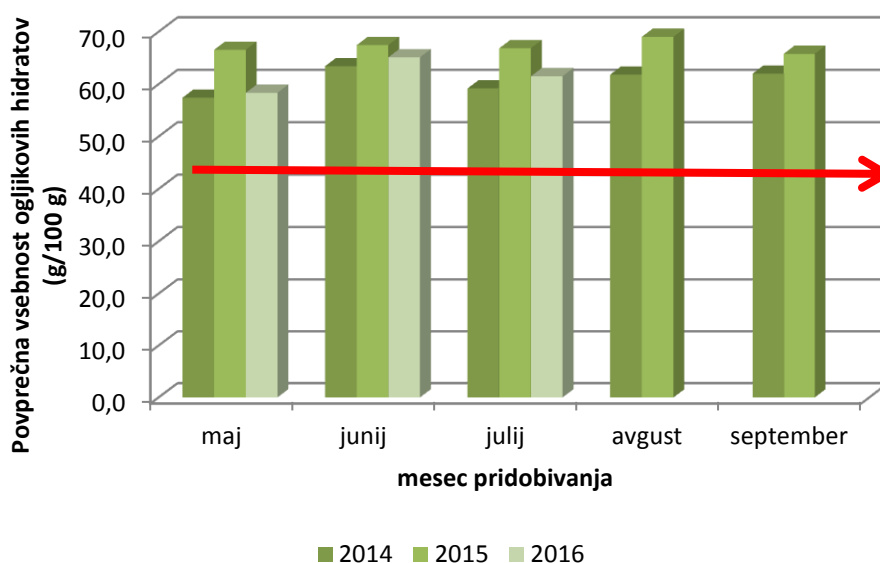
Slika 8 Povprečna vsebnost maščob v cvetnem prahu po različnih mesecih in letih pridobivanja.

Vsebnost maščob v cvetnem prahu je bila v letu 2016 povprečju 9,23 g/100 g. Sicer pa so se vrednosti gibale med 5,49 in 11,46 g/100 g. Glede na predlog mednarodne standardizacije za kakovost posušenega cvetnega prahu le-ta naj ne bi vseboval manj kot 1,5 g/100 g maščob. Vrednosti v analiziranem cvetnem prahu so bile znatno višje od tega predloga, zaradi česar je cvetni prah predlogu standardizacije kakovosti tudi ustrezal. V mesecih avgust in september smo v prejšnjih letih beležili višanje vsebnosti maščob v cvetnem prahu. Omenjeno nakazuje na to, da se v zadnjih mesecih čebelarke sezone razvijajo dolgožive čebele, ki za svoj obstoj potrebujejo vire hrane, ki jim omogoča nastanek maščobnih teles in s tem pripravo na prihajajoče obdobje mirovanja (slika 8).



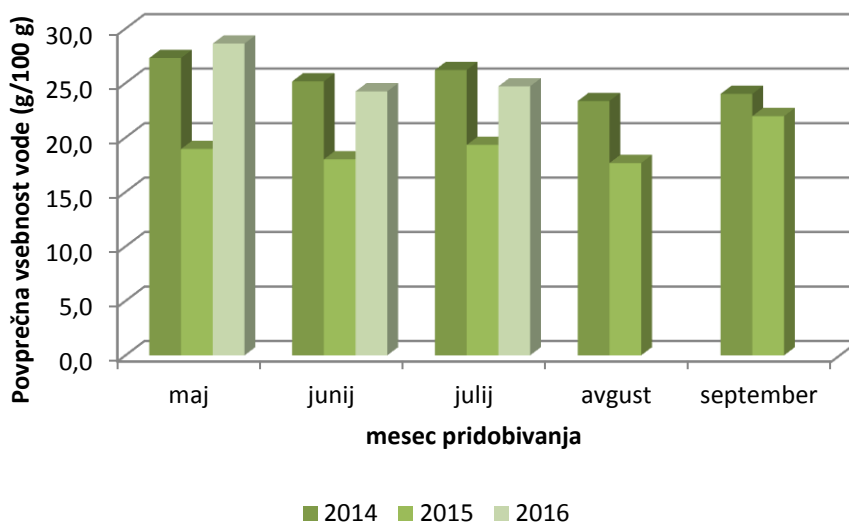
Slika 9 Povprečna vsebnost pepela v cvetnem prahu po različnih mesecih in letih pridobivanja.

Vsebnost pepela, po mednarodnem predlogu standardizacije za posušen cvetni prah naj ne bi bila višja od 6 g/100 g. V analiziranih vzorcih cvetnega prahu nobeden vzorec te predlagane vrednosti ni presegel. V povprečju so vzorci cvetnega prahu vsebovali 3,05 g/100 g pepela (slika 9). Najnižje in najvišje vrednosti vsebnosti pepela v cvetnem prahu so se gibale med 2,24 do 3,72 g/ 100 g.



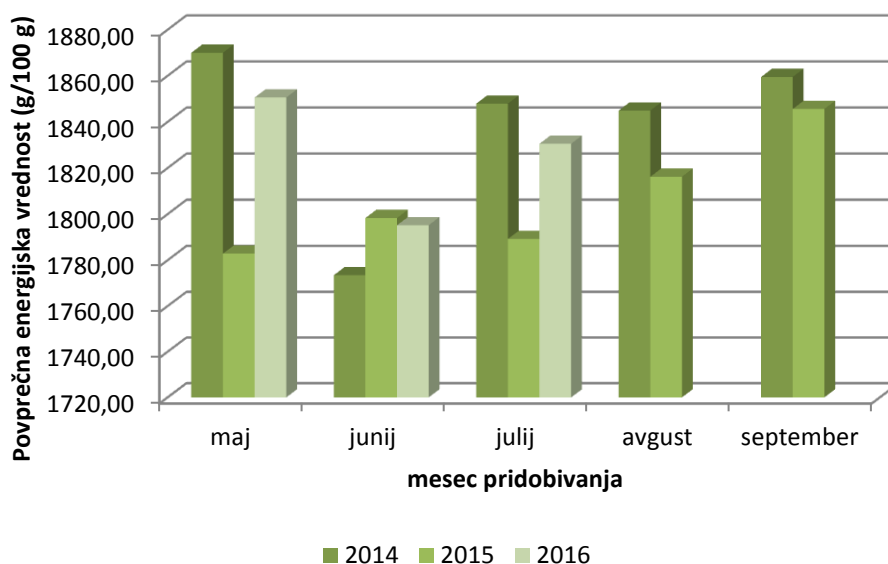
Slika 10 Povprečna vsebnost ogljikovih hidratov v cvetnem prahu po različnih mesecih in letih pridobivanja.

Vsebnost ogljikovih hidratov je bila v cvetnem prahu v povprečju 61,96 g/100 g. Vrednosti v vseh analiziranih vzorcih pa so se gibale med 54,19,1 in 67,25 g/100 g. Glede na predlagan mednarodni kriterij za standardizacijo kakovosti posušenega cvetnega prahu v človeški prehrani naj le-ta ne bi vseboval manj kot 40 g/100 g ogljikovih hidratov. Prikaz vrednosti vsebnosti ogljikovih hidratov je predstavljen na sliki 10.



Slika 11 Povprečna vsebnost vode v svežem cvetnem prahu po različnih mesecih in letih pridobivanja.

Vsebnost vode se je v svežem cvetnem prahu gibala med 21,60 in 30,00 g/100 g, s povprečno vrednostjo 25,82 g/100 g. Svež cvetni prah je mikrobiološko zelo občutljivo živilo, zato ga je potrebno po odvzemu takoj shraniti v zamrzovalnik oz. ustrezno obdelati (sušenje). Vrednosti vsebnosti vode v cvetnem prahu so prikazane na sliki 11.



Slika 12 Povprečna energijska vrednost cvetnega prahu po različnih mesecih in letih pridobivanja.

Energijska vrednost cvetnega prahu je bila v povprečju 1822,48 kJ/100 g. Energijska vrednost cvetnega prahu se je gibala med 1745,91 in 1862,52 kJ/100 g.



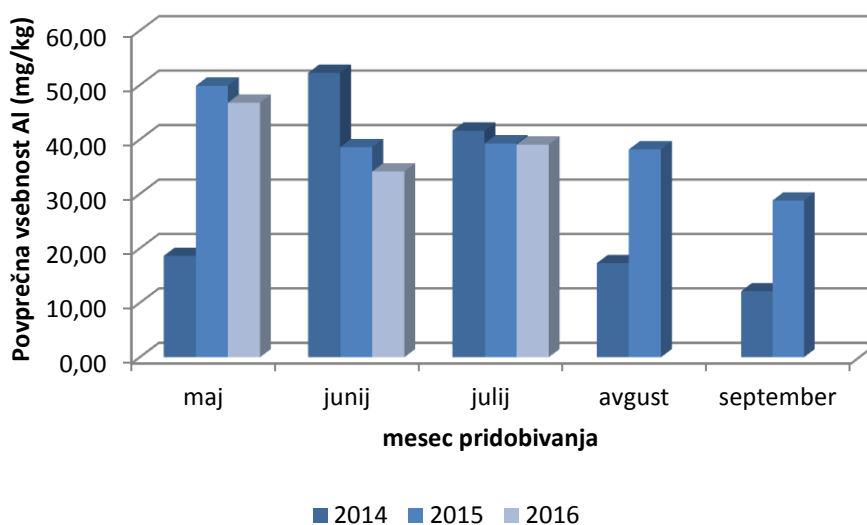
Vsebnost beljakovin v cvetnem prahu v letu 2016 se je statistično značilno razlikovala od vsebnosti beljakovin v cvetnem prahu pridobljenem v letu 2014 in bila primerljiva z letom 2015. Vsebnosti vode in pepela so se v cvetnem prahu v letu 2014 in 2016 statistično značilno razlikovale od vsebnosti vode v letu 2015. Vsebnost ogljikovih hidratov in energijska vrednost sta bila v letih 2014 in 2016 primerljivi in sta se statistično značilno razlikovali od leta 2015.

Prehranska vlaknina je sestavljena iz škroba in netopnih polisaharidov, kot sta celuloza in sporopolenin itd. Vrednosti vsebnosti prehranske vlaknine so zelo različne, kar je posledica uporabe različnih metod določanja in specifične sestave peloda različnih rastlin (Bogdanov, 2012). Ločimo topno in netopno prehransko vlaknino. V vzorcih cvetnega prahu smo v povprečju določili vsebnost prehranske vlaknine od minimalno 15,43 do maksimalno 20,60 g/100 g SS cvetnega prahu. Priporočena dnevna količina zaužite prehranske vlaknine je 30 g (DACH). Po objavah tujih avtorjev naj bi cvetni prah vseboval od 0,3 do 20 g prehranske vlaknine na 100 g SS. Za cvetni prah lahko rečemo, da je dober vir prehranske vlaknine.

Težke kovine v cvetnem prahu

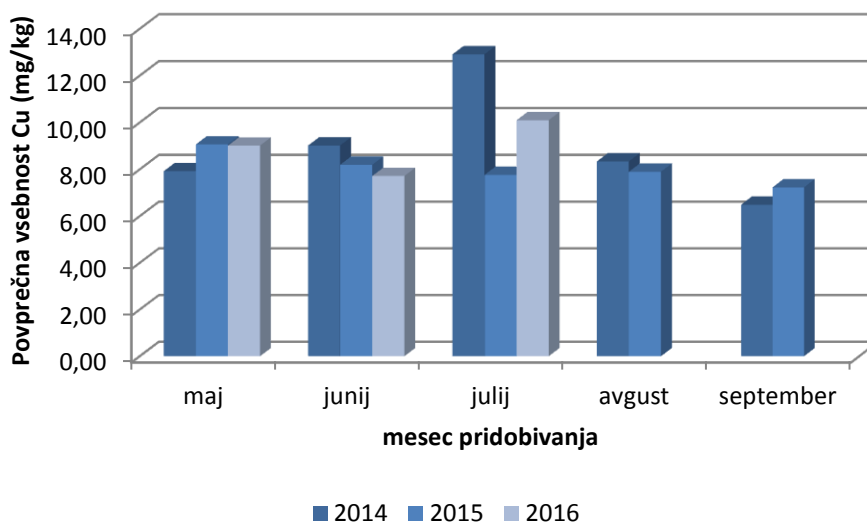
Tabela 4 Vsebnost težkih kovin v cvetnem prahu (sveža teža).

	aluminij - Al	baker - Cu	cink - Zn	svinec - Pb	železo - Fe
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
povprečje	39,58	8,75	32,10	0,07	74,66
min	7,90	7,14	26,00	0,03	39,00
max	151,00	12,20	42,60	0,14	120,00
SD ±	37,87	1,57	5,02	0,03	24,96



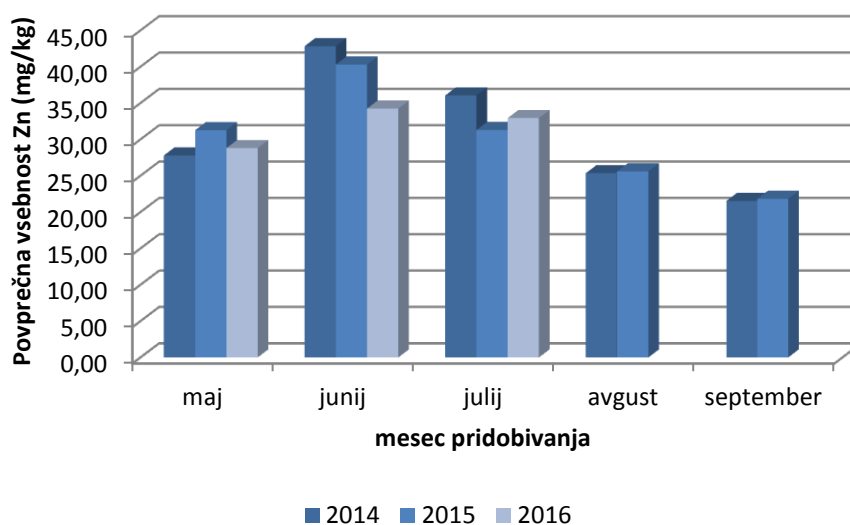
Slika 13 Povprečna vsebnost Al po različnih mesecih in letih pridobivanja.

Vsebnost aluminija (Al) (slika 13) se je gibala v mesecih pridobivanja med 7,90 in 151,00 mg/kg. najvišja vsebnost Al je bila zaznana v mesecu maju, ravno tako je bilo v letu poprej.



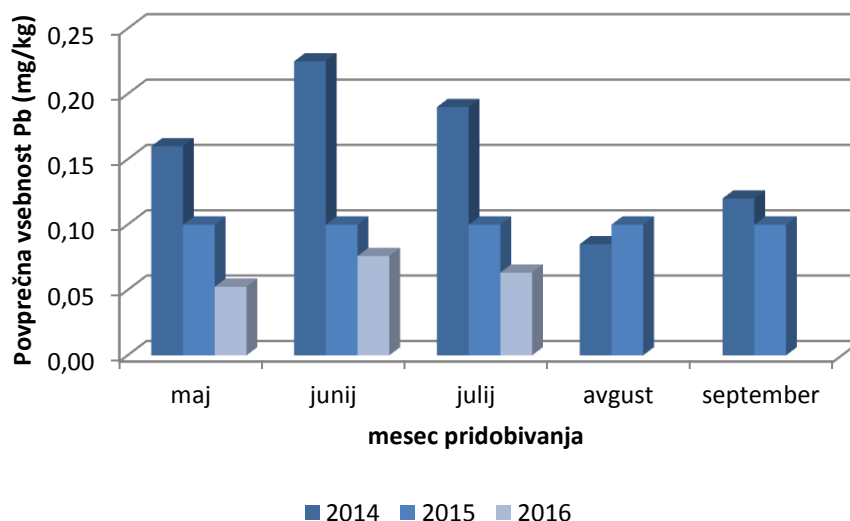
Slika 14 Povprečna vsebnost Cu po različnih mesecih in letih pridobivanja.

Vsebnosti bakra (Cu) se je gibala v razponu od 7,14 do 12,20 mg/kg s povprečno vrednostjo 8,75 mg/kg. Najvišja vrednost je bila zaznana v mesecu juliju (slika 14).



Slika 15 Povprečna vsebnost Zn po različnih mesecih in letih pridobivanja.

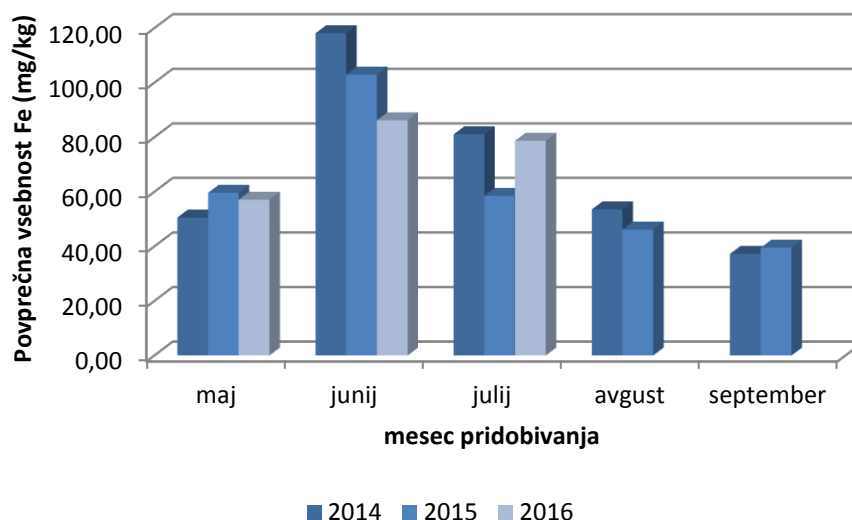
Vsebnosti cinka (Zn) so se gibale med vrednostmi 26,00 in 42,60 mg/kg, slednja najvišja vsebnost je bila zaznana v mesecu juniju (slika 15). V raziskavi iz leta 2008 (Šešerko, 2008) je bila v cvetnem prahu – izkopancu iz bližnje okolice trenutnega stojišča čebelnjaka zaznana vsebnost Zn v povprečju 37,9 mg/kg, kar je primerljivo tudi s povprečno vsebnostjo Zn v letu 2016 (32,10 mg/kg).



Slika 16 Povprečna vsebnost Pb po različnih mesecih in letih pridobivanja.

Onesnaženje s svincem (Pb) izvira iz prometa, tako cestnega kot tudi letalskega. Pb se na rastline odloži z zračnim depozitom, saj je v rastlini na splošno slabo mobilan. Koncentracije Pb so se po uvedbi

avtomobilskih katalizatorjev precej zmanjšale (Šešerko, 2008). Vsebnost Pb je bila v vzorcih cvetnega prahu med 0,03 in 0,14 mg/kg in je v povprečju znašala 0,07 mg/kg (slika 16). Najvišja vrednost vsebnosti Pb je zaznana v mesecu juniju. Šešerko (2008) ravno tako poroča o vsebnosti Pb v cvetnem prahu – izkopancu, ki je bila 0,14 mg/kg. V primerjavi z ostalimi leti spremljanja se je vsebnost Pb v letu 2014 statistično značilno razlikovala od vsebnosti Pb v letu 2015 in 2016.



Slika 17 Povprečna vsebnost Fe po različnih mesecih in letih pridobivanja.

Vsebnost Fe v cvetnem prahu se giblje med 39,00 in 120,00 mg/kg s povprečno vrednostjo 74,66 mg/kg. (slika 17). Omejitve glede vsebnosti težkih kovin v cvetnem prahu za enkrat še ni. Kot orientacija nam lahko služi Uredba Komisije (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih. Letno pridobljeni podatki služijo kot monitoring vpliva okolja na čebelje pridelke.

Mikrobiološka analiza cvetnega prahu

Izkopanec

Vzorci izkopanca smo pridobili iz enega sata. Sat smo razdelili na kvadrante in v 3 kvadrantih vzorčili. Tako smo pridobili 3 vzorce izkopanca.

Tabela 5. Rezultati mikrobiološke analize izkopenca. Rezultati so prikazani v CFU/g vzorca. Oznake I1, 2 in 3 označujejo zaporedno številko vzorca, a in b pa ponovitev.

Vzorec	Koliformne bakterije	Mezofilni aerobni mikroorganizmi	Plesni	Kvasovke	Mlečnokislinske bakterije	Ocetnokislinske bakterije
I1 a	0	1,00X10 ³	2,60X10 ³	3,70X10 ³	7,65X10 ⁴	0,00
I1 b	0	2,00X10 ³	3,90X10 ³	1,50X10 ³	3,51X10 ⁴	0,00
I2 a	7,90X10 ³	1,10X10 ³	1,59X10 ⁴	1,30X10 ³	1,11X10 ⁵	0,00
I2 b	5,90X10 ³	2,10X10 ³	1,02X10 ⁴	3,80X10 ³	5,43X10 ⁴	0,00
I3 a	0	1,20X10 ³	5,40X10 ³	1,10X10 ³	6,90X10 ⁴	0,00
I3 b	0	7,00X10 ²	6,10X10 ³	2,00X10 ³	4,80X10 ³	0,00

Iz rezultatov je razvidno, da je cvetni prah lahko raznolik tudi znotraj enega sata. Koliformni mikroorganizmi so se pojavili samo v enem od treh vzorcev (I2). Iz tega sklepamo, da koliformni mikroorganizmi, ki jih čebele prinesejo v sat, ne okužijo celega sata, ampak ostanejo lokalizirani na zrnih, v katerih so prineseni. Ocetnokislinskih bakterij nismo izolirali iz nobenega preiskovanega vzorca izkopenca.

Kvasovke in mlečnokislinske bakterije smo morfološko razdelili v skupine in čiste kulture shranili pri -80 °C za nadaljnje analize.

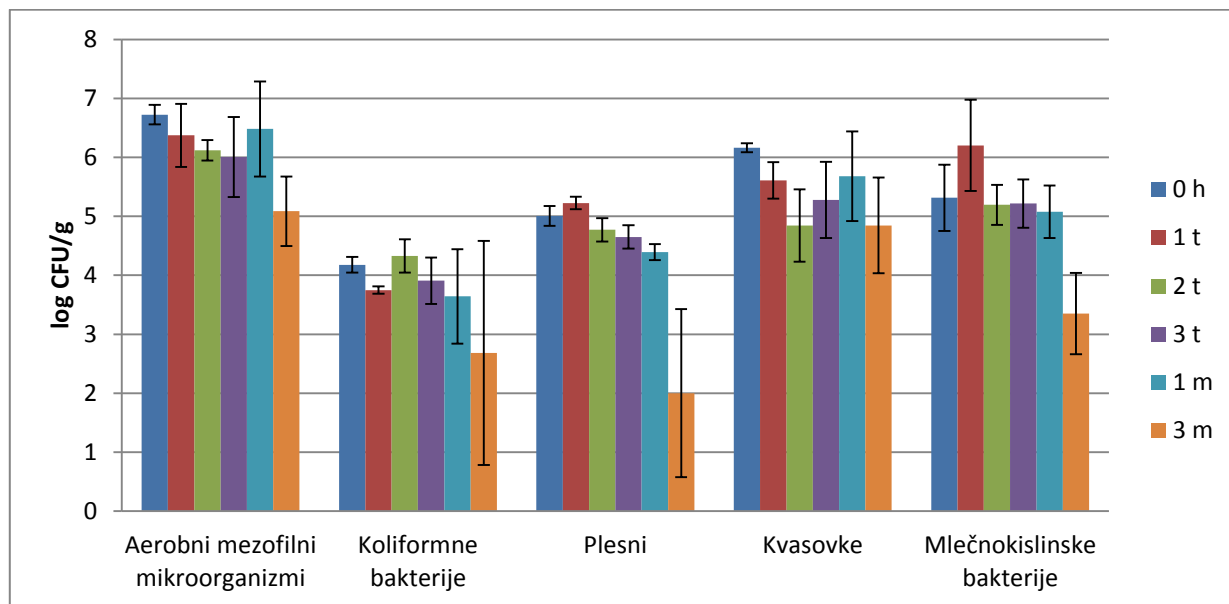
Shranjevanje cvetnega prahu v hladilniku

Tri vrečke svežega cvetnega prahu smo shranili v hladilniku za obdobje 1 leta. Spremljali smo spremembo v mikrobiološki sestavi vzorcev tako, da smo vzorčili v različnih obdobjih in opravili mikrobiološko preiskavo. Prav tako smo spremljali spremembo pH vzorcev. Cvetni prah je prispel v laboratorij 21.7.2016. Vzorec smo takoj vzorčili (t0) in shranili v hladilnik pri 4 °C.

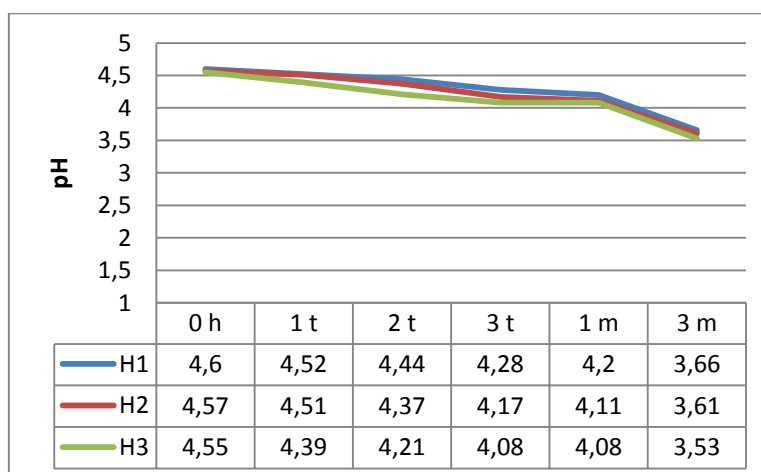
Tabela 6. Shema vzorčenja cvetnega prahu, shranjenega v hladilniku.

Zaporedno število	Datum	Čas shranjevanja
1.	21.7.2016	0 ur
2.	28.7.2016	1 teden
3.	4.8.2016	2 tedna
4.	11.8.2016	3 tedne
5.	18.8.2016	1 mesec
6.	20.10.2016	3 mesece
7.	19.1.2017	6 mesecev

8.	20.7.2017	1 leto
----	-----------	--------



Slika 28. Rezultati mikrobiološke analize cvetnega prahu, shranjenega v hladilniku.



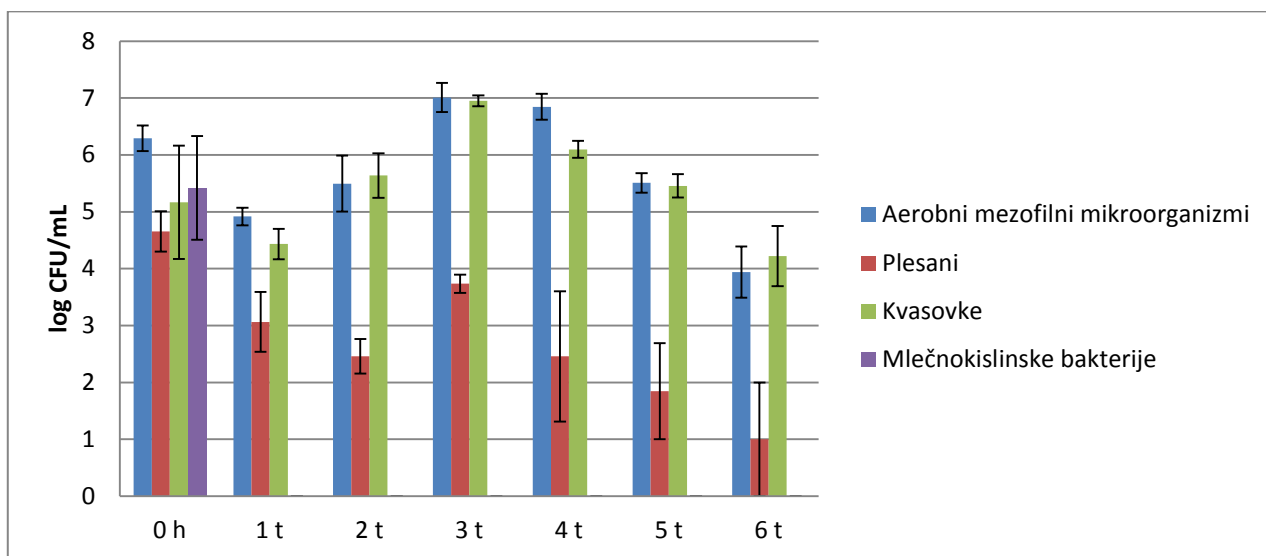
Slika 19. Sprememba pH cvetnega prahu shranjenega v hladilniku. H1, 2 in 3 označuje zaporedno številko vzorca.

V mikrobiološki sestavi vzorcev cvetnega prahu med shranjevanjem v hladilniku do 3 meseca ni prišlo do večjih sprememb. Število vseh mikroorganizmov se v vzorcih, shranjenih 3 mesece, bistveno razlikuje od ostalih vzorčenj. Najmanjša sprememba je vidna v številu kvasovk. Na spremembe v vzorcu kažejo tudi rezultati meritve pH, kjer vidimo, da je prišlo do spremembe vrednosti pH.

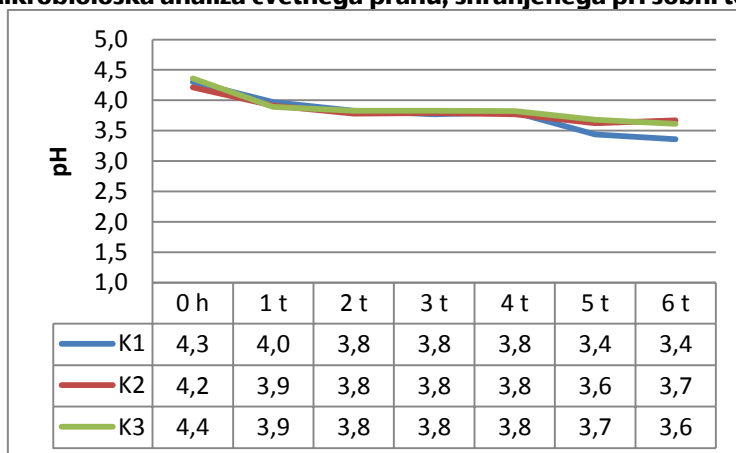
*Opomba: Že po 3 tednih shranjevanja v hladilniku je prišlo do manjših sprememb cvetnega prahu, barva je postala temnejša, zrnca pa so postala bolj lepljiva in sprijeta.

Shranjevanje cvetnega prahu pri sobni temperaturi

Tri vrečke svežega cvetnega prahu smo pridobili 27.7.2016. Vrečke smo shranili v hladilniku čez noč in prvo vzorčenje opravili naslednje jutro (28.7.2016). Vzorce smo shranili v zatemnjeni škatli pri sobni temperaturi. Vzorčili smo vsakih 7 dni, 6 tednov.



Slika 20. Mikrobiološka analiza cvetnega prahu, shranjenega pri sobni temperaturi.



Slika 21. Sprememba vrednosti pH cvetnega prahu, shranjenega pri sobni temperaturi. (K1, 2 in 3 označuje zaporedno številko vzorca).

Do velikih sprememb je prišlo že po prvem vzorčenju, enake spremembe pa so se nadaljevale vse do zadnjega vzorčenja. Že po 1 tednu pri sobni temperaturi se je barva cvetnega prahu spremenila, zrnca so postala temnejša in lepljiva. Število kvasovk je prevladovalo tekom celega procesa kvarjenja,

mlečnokislinskih bakterij po prvem vzorčenju več nismo zaznali in tudi število plesni se je znatno zmanjšalo. Prišlo je do manjše spremembe vrednosti pH tekom 6 tednov shranjevanja cvetnega prahu pri sobni temperaturi. Ocetnokislinskih bakterij že pri prvem vzorčenju nismo zaznali. Posamezne izolate kvasovk smo shranili za nadaljnje analize.

Vsebnost aminokislin v cvetnem prahu

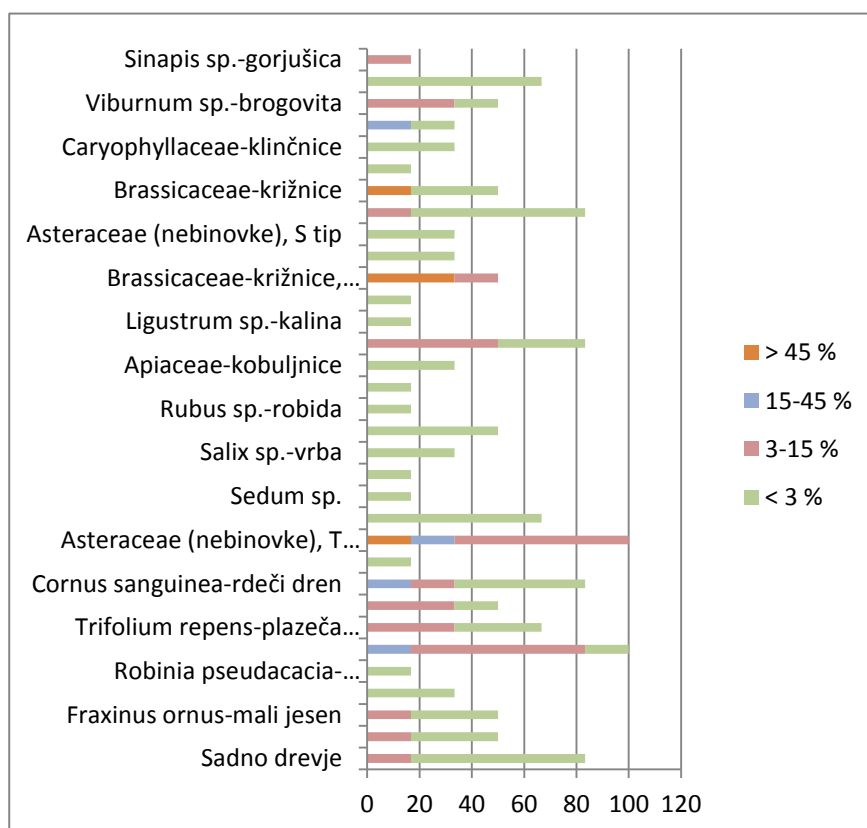
Tabela 7: Vsebnost aminokislin v cvetnem prahu

Vezane aminokisliline	min (g/100 g)	max (g/100 g)	povprečje (g/100 g)	SD ±	Proste aminokisliline	min (g/100 g)	max (g/100 g)	povprečje (g/100 g)	SD ±	VSOTA (g/100 g)
Aspartic acid	1,60	1,92	1,75	0,12	Aspartic acid	0,03	0,07	0,02	0,02	1,77
Total Glutamic acid, including Glutamine	1,63	2,12	1,88	0,18	Total Glutamic acid, including Glutamine	0,01	0,12	0,04	0,04	1,93
Alanine	0,92	1,03	0,97	0,04	Alanine	0,07	0,10	0,02	0,02	0,99
Arginine	0,72	0,98	0,82	0,10	Arginine	0,02	0,17	0,07	0,07	0,89
Fenilalanine	0,71	0,80	0,74	0,04	Fenilalanine	0,02	0,05	0,01	0,01	0,75
Glycine	0,75	0,86	0,80	0,04	Glycine	0,01	0,02	0,00	0,00	0,80
Hydroxyproline	0,11	0,45	0,24	0,14	Hydroxyproline	0,01	0,05	0,01	0,01	0,25
Isoleucine	0,56	0,74	0,68	0,08	Isoleucine	0,01	0,03	0,01	0,01	0,69
Hystidine	0,39	0,47	0,44	0,04	Hystidine	0,04	0,11	0,03	0,03	0,47
Leucine	1,16	1,26	1,21	0,04	Leucine	0,02	0,04	0,01	0,01	1,22
Lysine	1,15	1,44	1,26	0,11	Lysine	0,03	0,06	0,01	0,01	1,27
Proline	1,05	2,29	1,79	0,49	Proline	0,46	1,66	0,48	0,48	2,26
Serine	0,86	0,99	0,93	0,05	Serine	0,04	0,09	0,02	0,02	0,96
Tyrosine	0,54	0,61	0,57	0,02	Tyrosine	0,02	0,05	0,01	0,01	0,59
Threonine	0,74	0,84	0,77	0,04	Threonine	0,02	0,04	0,01	0,01	0,78
Valine	0,67	0,86	0,80	0,08	Valine	0,02	0,05	0,01	0,01	0,82
					Methionine	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01

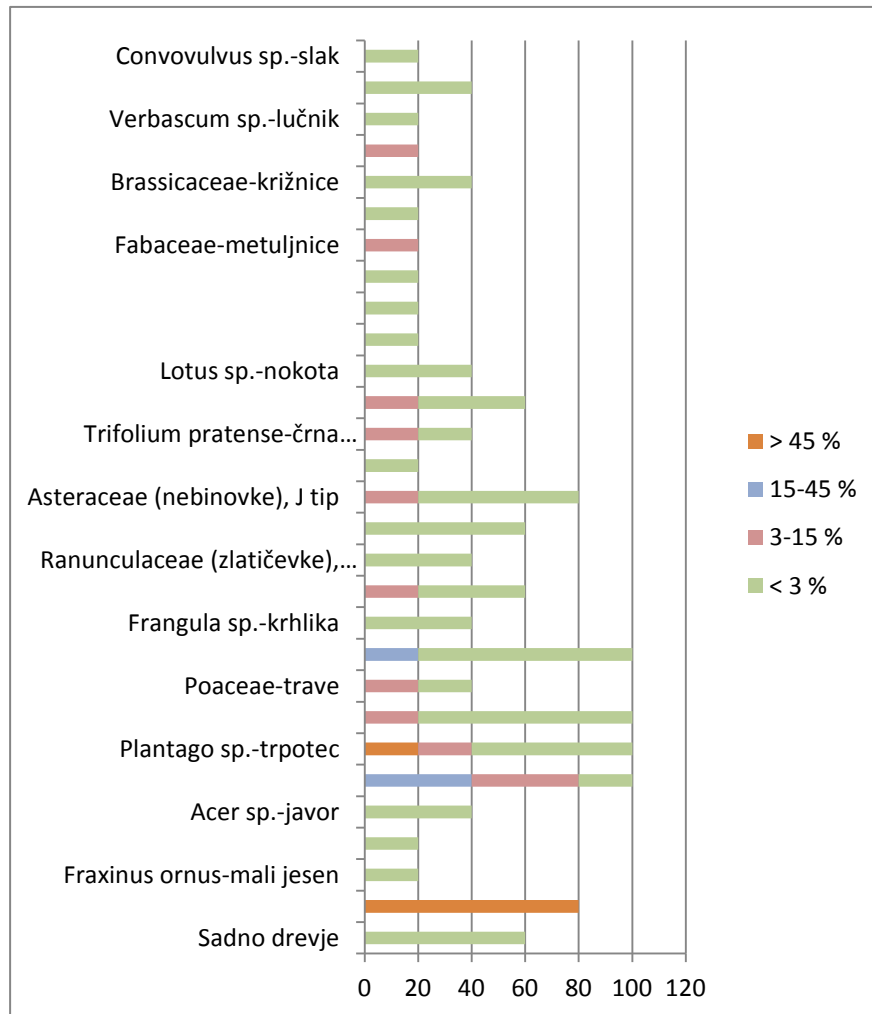
V mešanicah cvetnega prahu je v največji meri prisotna aminokislina prolin, sledita ji aminokislini glutaminska in asparaginska kislina. Navedene aminokisliline niso esencialne. Med esencialnimi aminokisljinami se v največji količini nahajata aminokislini lizin (1,28 g/100 g) in leucin (1,22 g/100 g).

Mikroskopska analiza cvetnega prahu

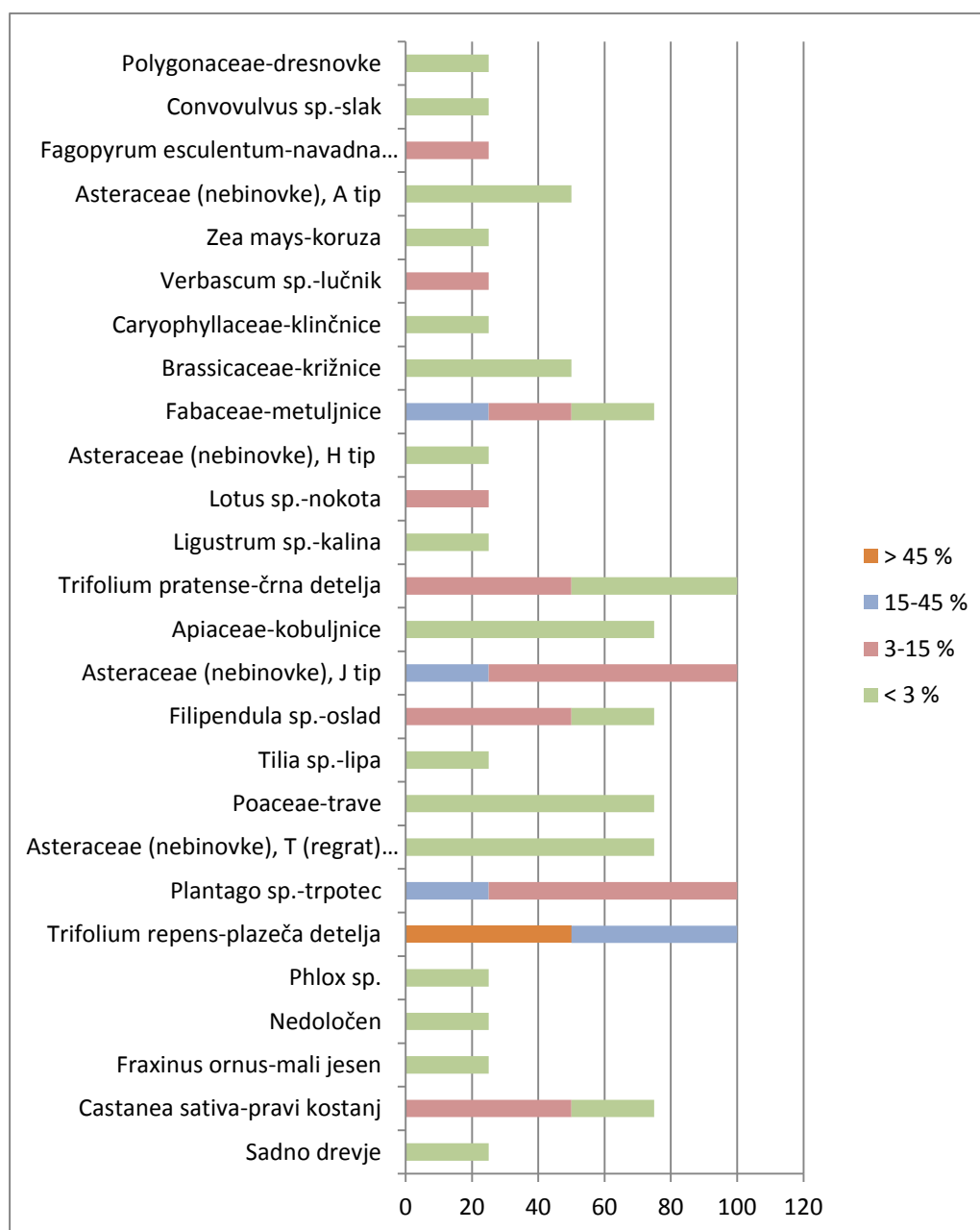
Slika22 Zastopanost peloda v cvetnem prahu pridobljenem v mesecu maju



Slika23 Zastopanost peloda v cvetnem prahu pridobljenem v mesecu juniju



Slika24 Zastopanost peloda v cvetnem prahu pridobljenem v mesecu juliju





SKLEPI

Vsi vzorci cvetnega prahu so ustrezali predlaganemu kriteriju za kakovost posušenega cvetnega prahu, ki se uporablja v prehrani ljudi. V povprečju smo v letu 2016 v cvetnem prahu določili 25,76 g beljakovin, 9,23 g maščob, 30,5 g pepela in 61,96 g ogljikovih hidratov na 100 g ter energijsko vrednost 1822,48 KJ/100 g. Vsebnost prehranske vlaknine v vzorcih cvetnega prahu je bila v povprečju 18,11 g/100 g SS.

Omejitve glede vsebnosti težkih kovin v cvetnem prahu za enkrat še ni. Kot orientacija nam lahko služi Uredba Komisije (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih. Letno pridobljeni podatki služijo kot monitoring vpliva okolja na čebelje pridelke.

Na podlagi opravljenih mikrobioloških raziskav smo potrdili, da je svež cvetni prah mikrobiološko občutljivo živilo in v kolikor ni skladiščen v ustreznih pogojih začne spreminjati vizualno podobo, poleg tega se tudi zmanjšuje njegova pH vrednost.

V cvetnem prahu so v večjih deležih prisotne vezane aminokislina. Med vezanimi in prostimi največji delež zavzema aminokislina prolin, sledita ji glutaminska in asparaginska kislina. Največji delež v prosti obliki prav tako vsebuje aminokislina prolin.



Trajnostni projekt – Za medeno prihodnost

ZAHVALA

Zahvala podjetju HOFER trgovina d.o.o. za finančno podporo pri izvedbi analiz, saj s tem kaže prizadevnost za ohranjanje okolja in čebelarske dejavnosti ter stremi k izboljšanju in napredku na področju ohranjanja čebel in raziskav čebeljih pridelkov.



8 REFERENCE

- Kandolf, A. in sod. 2008. Cvetni prah. V: O cvetnem prahu. Kandolf, A. (ur.). Čebelarstva Zveza Slovenije: 5-11
- Bogdanov, S. 2012. The Bee Pollen Book. Chapter 1. www.bee-hexagon.net 1-13
- Campos, M. in sod. 2008. Pollen composition and standardization of analytical methods. Journal of Apicultural Research and Bee World (47) 2: 156-163
- Brodtschneider, R., Crailsheim, K. 2010. Nutrition and health in honey bees. Apidologie 41 (2010) : 278-294
- Herbert, E. W, Shimaniku, H. 1978. Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee stored pollen. Apidologie 9 (1): 33-40
- Fernandes da Silva, P., Serrao, J.E. 2000. Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Apidologie 31: 39-45
- Uredbe komisije (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih.
- Solberg, Y., Remedios, G. 1980. Chemical composition of pure and bee-collected pollen. Scientific reports Agriculture University, Norway, 59, 18: 2-12
- Bell, R.R., Thornber, E.J., Seet, J.L.L., Grovec, M.T., Ho, N.P., Bell, D.T. 1983. Composition and protein quality of honey-bee-collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*. Journal of Nutrition, 113, 12: 2479-2484
- Talpay, B. M. 1984. Der pollen. Versuch einer Standortbestimmung. Institut für Honigforschung Bremen: 1-84
- Szczesna, T., Rybak-Chmielewska, H., Skowronek, W. 1995. Alterations in the chemical composition of the pollen loads stored under various conditions. I. Sugars, fat and ash. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, 40: 145-156
- Szczesna, T., Rybak-Chmielewska, H. 1998. Some properties of honey bee collected pollen. In Polnisch-Deutsches Symposium *Salus Apis mellifera*, new demands for honey bee breeding in the 21 st century. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, 42, 2: 79-80
- Almeida-Muradian, L.B., Pamplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. Journal of Food Composition and Analysis, 18, 1: 105-111



- Soares de Arruda, V.A., Santos Pereira, A.A., Silva de Freitas, A., Marth, M.O., Almeida-Muradian, L.B. 2013. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29: 100-105
- Pernal, S.F., Currie, R.W. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31: 387-409
- Cook, S.M., Awmack, C.S., Murray, D.A., Williams, I.H. 2003. Are honeybees foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology*, 28: 622-627
- Roulstone, T. H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* 222, 1-4: 187-209
- Roulston, T.H., Cane, J.H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 187-209
- Human, H., Nicolson, S.W. 2006. Nutritional content of fresh bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, 67: 1486-1492
- Carpes, S.T., Mourao, G.B., de Alencar, S.M., Masson, M. L. 2009. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Food Tehnology*, 12, 3: 220-229
- Feas, X., Pilar Vazquez-Tato, M., Estevinho, L., Seijas, J.A., Iglesias, A. 2012. Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17: 8359-8377
- Estevinho, L.M., Rodrigues, S., Pereira, A.P., Feas, X. 2012. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, 47: 429-435
- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., Sun, P. 2013. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 708-718
- De Grot, A.P. 1953. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Comparative Physiology Oecologica*, 3: 1-83
- Stanley, R.G., Linskens, H.F. 1974. *Pollen: Biology, Biochemistry, Management*. Springer, New York
- Vanderplanck, M., Leroy, B., Wathélet, B., Wattiez, R., Michez, D. 2013. Standardized protocol to evaluate pollen polypeptides as bee food source. *Apidology*, INRA, DIB and Springer-Verlag France, 2013, Published online 02 October 2013



- Weiner, CN., Hilpert, A., Werner, M., Linsenmair, KE, Blüthgen, N. 2010. Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie* 41 (2010): 478-487
- Gonzales Paramas, AM., Gomez Barez, JA., Cardon Marcos, C., Garcia-Villanova, RJ., Sanchez, JS. 2006. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry* 95 (2006): 148-156
- Zang, J., Xue, X., Zhou, J, Chen, F., Wu, L., Li, Y, Zhao, J. 2009. Determination of tryptophan in bee pollen and royal jelly by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed. Chromatography* 2009; 23: 994-998
- Božnar, M. in sod. 2011. Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje. V: *Cvetni prah*. Zdešar, P. (ur.). Čebelarstva Zveza Slovenije: 324 -333
- Morgano, M. A., Milani, 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
- Gergen, I., Radu, F., Bordean, D., Isengard, H.D. 2006. Determination of water content in bee pollen samples by Karl Fischer titration. *Food Control* 17, 3: 176-179
- Bogdanov, S. 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1-18.
- Pryzbylowski, P. 2003. The accumulation of trace metals and pesticides in honey. *Proceedings of the XXXVIII Congress Apimondia, Ljubljana 2003*.
- Bortolotti, L., Sabatini, A. G., Girotti, S., Ghini, S., Grillenzoni, F., Gattavecchia, E., Celli, G., Porrini, C., Medrzycki, P. 2003. Honey bees as bioindicators of the environmental pollution. *Proceedings of the XXXVIII Congress Apimondia, Ljubljana 2003*.
- Chauzat, M. P., Faucon, J. P., Martel, A. C., Lachaize, J. Cougoule, N., Aubert, M. 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bee in France. *J. Econ. Entomol.* 99 (2): 253-262.
- Šešerko, M. in sod. (2008). *Raziskave polutantov v čebeljih pridelkih*. Agencija RS za kmetijske trge in razvoj podeželja.
- Lilek, N., Noč, B. 2014. Poročilo o raziskovalnem delu v čebelnjaku HOFER za leto 2014.
- Lilek, N., Noč, B. 2015. Poročilo o raziskovalnem delu v čebelnjaku HOFER za leto 2015.
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje.(DACH).



Trajnostni projekt – Za medeno prihodnost