



Polüfenoolide, flavonoidide ja vabade hapete üldsisaldus ning happesus metes

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Iris-Gertrud Jussila

Üliõpilaskood: 213016LATB

Juhendaja: Piia Jõul, teadur, keemia ja biotehnoloogia instituut

Õppekava: toidu- ja biotehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Iris-Gertrud Jussila

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Piia Jõul, PhD

[allkiri ja kuupäev]

SISUKORD

LÜHENDITE JA MÕISTETE SÕNASTIK	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Mesi ja selle koostis.....	6
1.2. Mee säilitamine ja hoiustamine	7
1.3. Mee füüsikalised-keemilised omadused	9
1.3.1. Polüfenoolid ja flavonoidid	10
1.3.2. Happesus ja vabad happed	12
1.4. Värvusanalüüsid	13
1.5. Spektrofotomeetria.....	13
1.6. Tiitrimine ja elektrood.....	14
2. TÖÖ EESMÄRGID	16
3. EKSPERIMENTAALNE OSA	17
3.1. Kasutatav aparatuur.....	17
3.2. Kasutatavad ained ja materjalid.....	17
3.2.1. Standardlahuste valmistamine.....	18
3.3. Kasutatavad proovid	18
3.3.1. Proovide ettevalmistamine	19
3.4. Katsete läbiviimise meetodika	19
3.4.1. Polüfenoolide sisalduse määramine metes UV-Vis spektrofotomeetrit kasutades	20
3.4.2. Flavonoidide sisalduse määramine metes UV-Vis spektrofotomeetrit kasutades	20
3.4.3. pH ja vabade hapete määramine metes tiitrimist kasutades	20
3.4.4. Suhkrute mõju mõõtmine üldfenoolide ja flavonoidide sisalduse määramisele metes....	21
4. TULEMUSED JA ARUTELU	22
4.1. Üldfenoolide sisaldus uuritavates meeproovides ja võrdlus kirjanduse andmetega	22
4.2. Flavonoidide sisaldus uuritavates meeproovides ja võrdlus kirjanduse andmetega.....	24
4.3. Vabade hapete sisaldus ja pH uuritavates meeproovides ja võrdlus kirjanduse andmetega	25
4.4. Suhkrute mõju üldfenoolide ja flavonoidide sisalduse määramisele metes.....	27
4.5. Mete omavaheline võrdlus	29
KOKKUVÕTE.....	30
TÄNUAVALDUSED.....	31
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	32
ANNOTATSIOON.....	37
ABSTRACT.....	38

LÜHENDITE JA MÕISTETE SÕNASTIK

Lühend	Eesti keeles	Inglise keeles
DHA	Dihüdroksüatsetoon	<i>Dihydroxyacetone</i>
F-C	Folin-Ciocalteu	<i>Folin-Ciocalteu</i>
GAE	Gallushappe ekvivalent	<i>Gallic acid equivalent</i>
HMF	Hüdroksümetüülfurfuraal	<i>Hydroxymethylfurfural</i>
MeOH	Metanool	<i>Methanol</i>
QE	Kvertsetiini ekvivalent	<i>Quercetin equivalent</i>
TalTech	Tallinna Tehnikaülikool	<i>Tallinn University of Technology</i>
TFTAK	Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskus	<i>Center of Food and Fermentation Technologies</i>
UV-Vis	Ultraviolet-nähtav	<i>Ultraviolet-visible</i>

SISSEJUHATUS

Mesi on meemesilaste poolt taimenektarist valmistatud populaarne viskoosne magusaine, mida inimesed on juba aastatuhandeid kasutanud nii selle maitse kui raviomaduste tõttu. Peamiselt koosneb mesi suhkrutest, kuid sisaldab ka vett, valke, ensüüme, happeid, mineraalaineid, vitamiine, fenoolseid ühendeid ja karotenoide. Need koostisosad annavadki meele tema kasulikud – antibakteriaalsed, -mikroobsed ja -oksüdantsed omadused.

Viimasel ajal on levinud pettuste tõttu aina aktuaalsem teema mee kvaliteedi hindamine ning selle puhtus ja koostis, samuti on läbi viidud mitmeid uuringuid just fenoolsete ühendite sisalduse kohta mees, sest need on peamised mees leiduvad bioaktiivsed antioksidantsed ühendid.

Fenoolseid ühendeid, mille hulka kuuluvad ka flavonoidid, leidub erinevates toiduainetes, lisaks meele veel näiteks veinis, šokolaadis, kohvis, tees, puuviljades, marjades ja köögiviljades. Kõrgema üldfenoolse koostisega meed on ühtlasi kõrgema vabade hapete sisaldusega, mis on samuti kvaliteedinäitajad – mee seismisel ja käärimisel nende kontsentratsioon kasvab. Teatud koguses on happed mees siiski vajalikud, sest tänu õrnale happesusele on meel antimikroobsed omadused.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on määrata üheksa mee polüfenoolide, flavonoidide ja vabade hapete sisaldus ning nende mete happesus, kasutades selleks Folin-Ciocalteu reaktsiooni ja alumiiniumkloriidi reaktsiooni ning spektrofotomeetrilist analüüsi ja potentsiomeetrilist tiitrimist; võrrelda saadud tulemuste kokkulangevust omavahel ning võrrelda neid varem avaldatud uurimustega. Üheksast meeproovist kaheksa pärinevad Eestist ning üks Uus-Meremaalt. Käesoleva töö tulemusi ja selle käigus valmistatud ekstrakte kasutatakse edasi *Borrelia* bakteri aktiivsuse uuringus, mistõttu osutusid valituks just (eeldatava) kõrge antibakteriaalse/-oksüdantse toimega meed.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Mesi ja selle koostis

Mesi on keerulise koostisega looduslik viskoosne magusaine, mida on kasutatud nii toiduainena kui ka ravieesmärkidel juba aastatuhandeid. Tegemist on ainukese magusainega, mida saab säilitada ja tarbida täpselt sellisel kujul nagu teda looduses esineb (vaja pole rafineerimist/töötlemist). [1], [2]

Mee tootmiseks koguvad mesilased taimedelt nektarit (või elusate taimeosade või neist toituvate putukate eritisi), lisavad sellele oma organismi poolt toodetud fermente ning lagundavad selles sisalduvad disahhariidid organismis leiduvate ensüümide abil monosahhariidideks (peamiselt glükoosiks ja fruktoosiks). Seejärel aurustavad mesilased nektarist osa niiskust välja, ventileerides taru kärjekannudes üleliigse vee, ja kui veesisaldus on väiksem kui 20%, siis jäetakse mesi kargedesse küpsema ja valmima. [3], [4], [5]

Loodusliku päritolu põhjal liigitatakse mett kaheks suureks rühmaks – õie- ja lehemeeks, millest esimest omakorda liigitatakse mono- ja polüfloorseks ehk ühe- ja mitmetaimemeeks ning teist loomse päritoluga lehemeeks (valgu-, mineraalainete ja dekstriinirikas taimemahlast toituvate putukate väljaheide) ja taimse päritoluga lehemeeks (taimede eritatud süsivesikurikas vedelik) [4].

Monofloorseks peetakse mett siis, kui vähemalt pool sellest pärineb ühest taimeliigist, polüfloorse mee puhul on üht liiki taimede õietolmusisaldus aga väiksem [4]. Eestis korjatud mesi on enamasti polüfloorne, seda seetõttu, et monofloorse mee tootmine on Eesti lühikeste suvede, muutlike ilmastikutingimuste ning mitmekesise taimestiku tõttu keeruline [6]. Seetõttu on lihtsam eristada Eesti mete päritolu nektari korjeala, mitte spetsiifilise taime järgi [2].

Eestis on levinumateks taimedeks, millelt nektarit ja õietolmu kogutakse, raps, valge ristik, kollane mesikas, vaarikas, paju ning kanarbik, millest viimane on üks hinnatumaid [7].

Mee koostist on uuritud mitmetes teadustöodes ning on leitud, et mesi sisaldab umbes 400 erinevat ühendit [3]. Mee värvus, maitse, niiskus- ja suhkruisaldus, happesus, antioksüdatiivsed toimed ning üldine koostis võib palju varieeruda ning see sõltub enim nektari päritolust ehk taimesordist, kust nektarit korjati. Samuti võivad koostist mõjutada geograafia, sh aastaajad, keskkond, pinnas ja ilmastikuolud, mesilasliik, mee töötlemine ja ka hoiustamine [8], [9].

Üldiselt on aga leitud, et kõige suurema osa ehk ligi 75–80% [10], [11] mee koostisest moodustavad suhkrud – just seetõttu on mett peamiselt kasutatud magustajana ning enne 1800ndaid, kui tootma hakati tööstuslikku suhkrut, oligi mesi ainuke laialdaselt kättesaadav magusaine. [1]

Meest 35–39% moodustab fruktoos, 32–38% glükoos ja 10% muud suhkrutüübid [10], [11]. Seda kinnitavad ka Eestis läbi viidud uuringud: 2021. aastal Tallinna Tehnikaülikoolis ehk TalTechis läbi viidud Eesti mee süvauuring leidis, et meed sisaldasid fruktoosi keskmiselt 40,0 g ja glükoosi keskmiselt 32,88 g 100 grammi kohta [12] ning teine 2020. aastal TalTechi ja Toidu- ja

Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskuse ehk TFTAKi koostöös läbi viidud uurimus sai tulemuseks vastavalt 39,4 g ja 34,8 g [6].

Ligikaudu 16–18% meest moodustab vesi [11] ja 3% on mees muid ühendeid [10]. Just selle 3% hulka jäävad valgud, ensüümid, orgaanilised happed, sh vabad aminohapped ja askorbiinhape, mineraalained, vitamiinid, aroomiühendid, fenoolsed üendid, sh flavonoidid ja fenoolsed happed, ja karotenoidid [8], [6], [13]. Need üendid on põhjuseks, miks mett on kasutatud ravieesmärkidel – nimelt on meel tänu bioaktiivsetele ühenditele antioksidantsed [14], antimikroobsed [15], kasvaja- [16], põletiku- [17] ning haavandivastased [18] omadused. Samuti saab mee antibakteriaalseid omadusi ära kasutada olukorras, kus bakteritel on tekkinud antibiootikumiresistentsus, näiteks haiglates põletuste, lamatiste või muude operatsioonijärgsete haavade ravimisel [13].

Mineraalainetest sisaldab mesi enamasti kaaliumit, vähesemal määral magneesiumit, naatriumit, kaltsiumit, fosforit, rauda, mangaani, koobaltit ja vaske; ensüümidest invertaasi, amülaasi, katalaasi ja glükoosi oksüdaasi, millest viimane toodab vesinikperoksiidi, mis annab mee antimikroobseid omadusi, ja glükoonhapet, mis aitab omastada kaltsiumit [19]; aminohapetest pea poole moodustab proliin, mida on kinnitanud ka 2021. aasta Eesti mee süvauuring, kus see oli peamiseks aminohappeliseks koostisosaks [6]. Veel leidub mees alkaloide, sidrun-, glükoon-, õun-, fool-, piim-, merevaik-, või-, etaan- ja metaanhapet; vitamiinidest vähesel määral A-, B2-, C- ja B6-vitamiine [13] ning antibakteriaalseid ühendeid nagu dihüdroksüatsetoon ja metüülglüoksaal, millest esimene on teise eelühend. Dihüdroksüatsetoon ehk DHA pärineb nektarist ning koos metüülglüoksaaliga on nad mõlemad stabiilsed üendid, mida leidub eriti palju Manuka mees (meesort, mida toodetakse ainult Uus-Meremaal ja Austraalias kasvava teepõõsa *Leptospermum* nektarist), kus nad ongi peamiseks antibakteriaalseteks ühenditeks, erinevalt teistest metest, kus seda rolli täidab vesinikperoksiid. [12]

Enamik mee mõju uuringutest keskenduvadki bioaktiivsete ühendite aktiivsusele inimorganismis, eriti fenoolsetele ühendite, millest kõige tähtsamad on looduses laialdaselt levinud fenoolhapped ja flavonoidid [10].

1.2. Mee säilitamine ja hoiustamine

Meel on hea vastupanu mikroobidele ja seetõttu kergesti ei rikne. Öeldakse, et mesi ei rikne kunagi [20] või vähemalt säilib see aastaid. Sellel on mitu põhjust: kuna mee veeaktiivsus on madal, ligikaudu 0,56–0,62, siis see pole bakteritele sobilik keskkond, sest enamik neist vajavad kõrgemat, 0,94–0,99 vahemikku jäävat veeaktiivsust. Samuti on meel happeline pH, keskmiselt 3,9, mis on piisavalt madal, et mitte toetada mikroobide kasvu [19]. Nektarist mee tootmine toimub tänu ensüümile glükoosi oksüdaas, mis toodab vesinikperoksiidi, mis aitab mee küpsemise käigus sel säilida. Lisaks on mees leiduvatel flavonoididel ning vesinikperoksiidil antibakteriaalne toime, mis aitab ka mikroobide vastu võidelda. [19]

Et mesi hästi säiliks, tuleb seda aga säilitada õigetel tingimustel ning hoida ära välist saastust – soovituslik on mett hoiustada hermeetilises klaasanumas (sobivad ka plast, roostevaba teras või email [4]), sest metallanum kiirendaks aeroobseid protsesse ja soodustaks riknemist [20]. Samuti

tuleks mett säilitada jahedas ja pimedas, et ei häviks ensüümid, vitamiinid ega antibakteriaalsed ained; ning niiskuset ruumis, et hügrokoopne mesi ei imaks ümbritsevast keskkonnast niiskust endasse ja ei läheks käärima [4].

Mesi, mille veesisaldus on normist kõrgem, st üle 20%, võib minna säilitamisel käärima. Seetõttu on oluline, et üleliigne vesi on enne säilitusnõusse panemist aurustunud ja biokeemilised protsessid lõppenud [4].

Aja möödudes mee vabade hapete sisaldus ja pH veidi tõusevad ning pärast pikka hoiustamist võib mee värv tumeneda [21]. Samuti toimub aja jooksul mee kristalliseerumine, mis on loomulik mee küpsemise osa. Olenevalt päritolust ja säilitustemperatuurist toimub see 2–8 nädala jooksul. [4] Enamuse mees sisalduvatest suhkrutest moodustavad fruktoos ja glükoos, mistõttu sõltub ka mee kristalliseerumine nende omavahelisest suhtest. Mesi, mis sisaldab rohkem fruktoosi, on kauem vedel, kui suurema osa suhkrutest moodustab aga glükoos, siis kristalliseerub mesi kiiremini. [2]

Tarbija eelistab aga kristallideta mett, mistõttu kuumutavad tootjad mett kõrgete temperatuuride juures, et mett vedeldada. Kõrge temperatuur omakorda halvendab mee kvaliteeti, sest hüdroksümetüülfurfuraali ehk HMFi sisaldus tõuseb ja ensüümiaktiivsus langeb. Seetõttu tohib Eesti veterinaar- ja toiduameti reeglite järgi mett kuumutada kuni 45°C, mille juures mee ensüümid veel ei lagune ega oluliselt inaktiveeru [22].

Mee värskust ja kvaliteeti hinnatakse peamiselt diastaasi, invertaasi ja HMFi koguste järgi, diastaas ehk amülaas on kuumusele suhteliselt resistentne, invertaasi hulk aga väheneb pikaajalises mee kuumutamisel. HMFi on värskes mees väga väikses koguses, kuid aja ja kuumutamisega selle kogus kasvab. Euroopa standardite järgi võib maksimaalne HMFi kogus mees olla 40 mg/kg, kuid mõne riigi mesinikud on nõustunud, et selleks, et lugeda mett kvaliteetseks, peaks HMFi kogus selles jääma alla 15 mg/kg. [23]

On leitud, et 20°C juures oli mee diastaasi aktiivsus langenud 50% pärast 4 aastat ning invertaasi aktiivsus pärast 2 aastat. Aeg, mis kulus 40 mg/kg HMFi tekkeks oli samuti 2–4 aastat. 2009. aasta uurimus näitas, et toatemperatuuril hoitud meed säilisid enamasti 15–20 kuud. [24]

Üldiselt on mee „parim enne“ enamasti umbes 2 aasta juures, kuid optimaalsetel tingimustel ehk 10–16°C juures ja keskkonnas, kus niiskussisaldus madalam kui 65%, võib see säilida veel kauemgi [25].

Veterinaar- ja toiduameti mee märgistuse ja muul viisil antava teabe juhendi kohaselt tuleb mee märgistusel esitada täpselt, selgelt ja tarbijale lihtsasti arusaadavalt, silmatorkavas kohas ja kirjas, kulumiskindlal taustal mee nimetus, netokogus, minimaalne säilimisaeg, päritoluriik, tootja või pakendaja või müüja nimi ja aadress ning vajadusel säilitamisjuhend ja toidupartii tähistus. [22]

Minimaalne säilimisaja tähtpäev ehk „parim enne“ tähtpäev esitatakse kujul kuupäev-kuu-aasta ning see tähistab aega, mille jooksul on mesi nõuetekohane, eeldades, et seda on hoiustatud korrektsetel säilitamistingimustel, mis on määratud mee valmistaja või pakendaja poolt, põhinedes kestvuskatsetel või standarditel. [22]

Eestis lähtutakse mee puhul meestandardist EVS 738:1997, mida järgides saab tootja tagada mee vastavuse nõuetele 2 aasta jooksul, kui seda transporditakse toiduainete veoks määratud transpordivahendiga; see on nii transportimisel kui säilitusruumis kaitstud sademete, otsese päikese- ja soojuskiirguse eest; ning seda hoiustatakse ruumides, kus pole tugeva lõhnaga aineid, temperatuur on alla 25°C ja õhu suhteline niiskus madalam kui 65%. Mee säilitamise alguseks loetakse mee kogumise hetke ehk mee vurritamist, kui mesi säilitusnõusse pannakse. [22]

Kui tootja tahab meelega anda pikemat säilimisaega, kui standardis esitatud 2 aastat, siis peab ta tegema kestvuskatsed vastavalt Eestis kehtivale Toiduseadusele ehk kontrollima meeproovi organoleptilisi, füüsikalisi, keemilisi, mikrobioloogilisi jms näitajaid, kasutades katsemeetodeid, mis vastavad Eesti või rahvusvahelistele standarditele [26].

1.3. Mee füüsikalised-keemilised omadused

Mee füüsikalised-keemilised omadused sõltuvad mee päritolust ja koostisest. Viimasel ajal on nende analüüsimine saanud rohkem tähelepanu, sest nii-öelda võltsmee tootmine ehk puhtale meelega suhkru või muude ainete lisamine on kasvanud [27]. Toiduvõltsimise all ei kannata ainult tarbijad, vaid see mõjutab ebavõrdse konkurentsi tõttu ka piirkondade ja riikide majandust ning turuhinda [28], [29]. Selleks, et mett meena müüa, ei tohi sellele aga olla lisatud mitte ühtegi lisainet ega muid koostisosi, toode peab olema 100% mesi. See ei tohi omada kõrvalmaitseid ega -lõhnu ning sel ei tohi olla käärimestunnuseid. Muuta ei tohi ka happesust ning mett ei tohi liialt kuumutada, sest muidu väheneb selles bioaktiivsete ühendite sisaldus või kaotavad need oma toime. [5] Seetõttu uuritakse erinevate mete füüsikalised-keemilisi omadusi, nende normidele vastavust ning seega ka mee puhtust paljudes erinevates riikides [29]. Pettuste vähendamiseks ning mee kvaliteedi tagamiseks töötasid 2024. aastal Eesti Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuse teadlased välja ka mee DNA-testi, mis võimaldab määrata mee bioloogilist koostist, selle korjekohta, mesilastega seonduvaid patogeene ja tuvastada võltsinguid. [30]

Polüfloorsete mete omavaheline koostiseline varieeruvus on suur, sest nende valmistamiseks kulunud nektari kogumiskohad on erinevad ja seetõttu varieerub ka nektari taimne päritolu, mis omakorda põhjustab füüsikalised-keemiliste parameetrite erinevusi [12]. Mete koostised võivad teineteisest oma tiheduse, värvi ja antibakteriaalsete omaduste poolest erineda suisa 100-kordselt. [15]

Seetõttu ongi sarnaseid uuringuid läbi viidud paljudes eri riikides, kuid taimestiku ning kliima suurte erinevuste tõttu on kõige täpsemad tulemused, millega antud bakalaureusetööd võrrelda, siiski pärit Eestist. Näiteks 2021. aastal läbi viidud Eesti mee süvauuringu raames koguti 30 meeproovi erinevatest Eesti piirkondadest ning määrati neis antibakteriaalsete, bioaktiivsete ning vesi- ja rasvlahustuvate antioksüdantsete ühendite sisaldus (sealhulgas ka polüfenoolide kogusisaldus ning flavonoidide sisaldus), niiskuse-, HMF-i, vabade hapete, diastaasi ja suhkrute sisaldus ning mee värvus ja elektrijuhtivus [12]. 2020. aastal läbiviidud Eesti mete uuringus koguti samuti 30 proovi erinevatest Eesti piirkondadest ning neis määrati lisaks eelnimetatud parameetritele ka invertaasi aktiivsus ning mee sensoorsed omadused, kasutades selleks professionaalseid sensoorseid assessoreid TFTAki [6]. 2014. ja 2011. aastal TalTechi ja TFTAki koostöös läbi viidud mete uuringud

mõõtsid lisaks 2021. Eesti mete süvauuringus mõõdetud parameetritele ka meeproovide õietolmu allikat ning mineraalainelist koostist, seda vastavalt 18 ja 14 eri piirkonnast korjatud Eesti metes [31], [32].

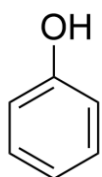
Veel on varasemalt Eestis uuritud pestitsiidide jääke mees [33], [34], õietolmu ja mee taimelist päritolu [35], mee aminohapete sisaldust [36] ning mee kristalliseerumist [37].

TalTechi teadlased uurivad hetkel ka erinevate Eesti mete *Borrelia* bakteri vastast toimet, et selgitada välja, kas mõned mee fütokeemilistest antioksidantsetest osadest võiksid aidata kroonilist puukborrelioosi põdevaid inimesi. Seetõttu on oluline teada, kas ja kui palju mingid meesordid antioksidantsete toimetega ühendeid (peamiselt just polüfenoole ja flavonoide) sisaldavad. [38]

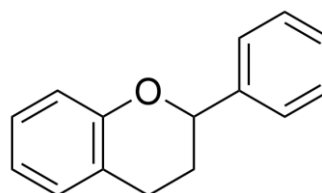
Mee füüsikalise-keemiliste omaduste piirmäärad/kriteeriumid on sätestatud nii Euroopa Ühenduse suunistes 2001/110 [5] kui Eesti Vabariigi põllumajandusministri määrusega 104 (20.11.2014) [39]. Käesolevas töös keskendutakse mee omadustest polüfenoolide ja flavonoidide sisaldusele, happesusele ja vabade hapete sisaldusele.

1.3.1. Polüfenoolid ja flavonoidid

Fenoolid on taimsed ühendid, millel on vähemalt üks aromaadne tuum, mis on omakorda seotud vähemalt ühe hüdroksüülrühmaga (joonis 1) [40]. Neid ühendeid on rohkem kui 8000, kusjuures kõigil on veidi erinev struktuur ja omadused. Aromaatse tuuma tõttu on hüdroksüülrühma vesinik ebapüsiv, mistõttu on fenoolid nõrgad happed. Polüfenoolid on ühendid, millel on rohkem kui üks hüdroksüülrühm, mis on seotud ühe või enama aromaatses tuumaga [41]. Fenoolsed ühendid jagunevad struktuuri põhjal väiksemateks alamgruppideks nagu fenoolsed happed, flavonoidid, stilbeenid ja lignaanid, kuid vahel jagatakse nad ka lihtsalt kahte suurde rühma – flavonoidid ja mitteflavonoidid. Flavonoidid on kõige levinumad taimefenoolid. Nad on ühendid struktuuriga C6-C3-C6, kus kaks aromaatses tuuma on omavahel seotud kolme süsinikuga, mis moodustavad heterotsükliilise ringi (joonis 2). [40], [41]



Joonis 1. Näidis fenoolist



Joonis 2. Flavonoidi struktuur

Polüfenoole leidub puu- ja juurviljades, samuti pähklites ja seemnetes ning erinevates taimedest toodetud produktides nagu kohvis, tees ja mees. Enamikul polüfenoolidel on antibakteriaalsed, antioksidantsed, antifungaalsed, põletiku- ja kasvavastased omadused ning nad suurendavad toidu toiteväärtust, aeglustades rasvade oksüdeerumist, mistõttu aitavad toiduainel ka kauem säilida. Seetõttu kasutatakse fenoolseid ühendeid ka toidulisanditena. [40]

Meditiinilise kasutusega taimi uurides on leitud, et nende tervist edendavad omadused ja raviomadused tulenevad just nende polüfenoolide ja ka iridoidide sisaldusest. Polüfenoolid aitavad haigusi ära hoida ja ravida, näiteks on neil roll nii südame-veresoonkonna ja neurodegeneratiivsete haiguste kui ka vähi ärahoidmisel. Taimedes leiduvad neist peamiselt fenoolsed happed, flavonoidid, tanniinid, stilbeenid ja lignaanid. Fenoolsetest hapetest sisaldavad taimed enim bensoehappe derivaati gallushapet ning kaneelhappe derivaate kumaarhapet, kofeiinhapet ja feruulhapet. Inimeste toidulaual leidub polüfenoolidest enim flavonoide, neist tuntuimad kvartsetiin, katehiin, naringeniin, kaempferool ja rutiin. [38]

Flavonoidid ja polüfenoolid on mees põhilised bioaktiivsed molekulid [42]. Erinevaid polüfenoolseid ühendeid on mees üle 150 [43]. Tumedamates, näiteks tatra-, kanarbiku- ja lehemetes leidub polüfenoolide rohkem kui heledamates rapsi- ja pärnaõiemetes [12].

Polüfenoolide ja flavonoidide kogusisaldust saab toiduainetes määrata mitmel eri viisil. Neist levinuimad on ka käesolevas bakalaureusetöös kasutatud Folin-Ciocalteu värvusanalüüs, kus polüfenoolide sisaldust esitatakse kujul „milligrammi gallushappe ekvivalenti 100 grammi mee kohta“ (mg GAE / 100 g mees), ja $AlCl_3$ värvusanalüüs, kus flavonoidide sisaldust esitatakse kujul „milligrammi kvartsetiini ekvivalenti 100 grammi mee kohta“ (mg QE / 100 g mees). Teiseks variandiks on täpsemalt konkreetsete polüfenoolide ja flavonoidide sisalduse määramine kasutades näiteks kõrgsurvevedelikkromatograafiat ja massispektromeetria, kus esmalt proov homogeniseeritakse, seejärel eraldatakse tahke ja vedel osa, kasutades tahkefaasilist ekstraheerimist, ning seejärel mõõdetakse kromatograafiliselt vastavad sisaldused. Sarnaselt võib kasutada ka kapillaarelektroforeesi või gaaskromatograafiat. [44], [45], [46] Veel on polüfenoolide üldsisalduse määramiseks kasutatud kaaliumpermanganaadiga tiitrimist, mille puhul mõjutavad proovis sisalduvad suhkrud tugevalt tulemust; kolorimeetria rauasooladega, mille tulemused ei ole samuti nii täpsed kui F-C meetodiga, kuid mida kasutatakse vähese suhkrumõju tõttu siiski tihti õlleproovides; ning ultravioletabsorptsiooni, mis ei ole hea meetod nii teiste koostisosade segava mõju kui fenoolide omavahel väga erinevate absorbeeruvuste tõttu. Seetõttu on siiski populaarseim polüfenoolide määramise meetod Folin-Ciocalteu ehk F-C. [47]

2021. aasta Eesti mete süvauuringus [12] kasutati polüfenoolide sisalduse määramiseks Folin-Ciocalteu spektrofotomeetrilist värvusanalüüsimeetodit, standardaineiks gallushape; flavonoidide sisaldus määrati samuti värvusanalüüsil – kasutades $AlCl_3$ meetodit, standardaineiks kvartsetiin. Leiti, et kõikide mete polüfenoolide sisaldus jäi vahemikku 39,14–178,36 mg GAE / 100 g, keskmine sisaldus oli 85,62 mg GAE / 100 g, kõige rohkem polüfenoolide oli tumedamates tatra- ja kanarbikumetes. Flavonoidide sisaldus jäi vahemikku 0,71–7,74 mg QE / 100 g ja keskmine sisaldus oli 2,57 mg QE / 100 g, kõige rohkem flavonoide oli tatrastes.

2020. aasta Eesti meeuuring, kus kasutati samu meetodeid [6], leidis, et polüfenoolide keskmine kogusisaldus oli 41,9 mg GAE / 100 g ja keskmine flavonoidide kogusisaldus oli 3,5 mg QE / 100 g.

2014. aastal leiti Poolas, Gdynia ülikoolis samu meetodeid kasutades, et 82 uuritud Poola mee üldfenoolide sisaldused jäid vahemikku 40,5–177 mg GAE / 100 g mee kohta, kusjuures madalamad sisaldused olid rapsimees, kõrgemad tumedamates kanarbiku- ja tatrastes [48]. 2010. aastal Tšehhis 40 erinevat kohalikku päritolu mett uurides saadi aga madalamad tulemused: polüfenoolide

üldsisaldus oli keskmiselt 11,02 mg GAE / 100 g ja flavonoidide sisaldus 0,66 mg QE / 100 g [14]. 2013. aasta Hispaania uuring, mis keskendus 187 Atlandi-Euroopa piirkonnast pärit meele, andis tulemusteks vastavalt 112,8 mg GAE / 100 g ja 6,1 mg QE / 100 g [49]. Brasiilias, Rio Grande do Sulis uuriti samu meetodeid kasutades 24 kohalikku päritolu meesorti ja nende koostist. Leiti, et fenoolsete ühendite kogusisaldus on 11,37–54,01 mg GAE / 100 g, flavonoidide sisaldus 2,97–10,46 mg QE / 100 g, fenoolsete hapete sisaldus 0–65,47 mg CAE / 100 g [10].

2020. aasta Poola uuringus võrreldi kohalikke meesorte kahe Manuka meega, mil peaks olema eriti kõrge polüfenoolide ja flavonoidide sisaldus ja antioksidantne aktiivsus. Leiti, et kohalike mete üldfenoolide sisaldus jäi vahemikku $133,1 \pm 5,4$ kuni $211,0 \pm 11,4$ mg GAE / 100 g mees, kusjuures kõrgeimaid näite andis tatramesi; Manuka mee fenoolide sisaldus oli aga veel kõrgem, andes tulemusi $203,5 \pm 16,8$ ja $217,0 \pm 20,3$ mg GAE / 100 g mees. [50]

Samas 2018. aasta Hiina uurimus leidis, et uuritava tatramee üldfenoolide sisaldus oli kõrgem ($149,8 \pm 3,7$ mg GAE / 100 g) kui Manuka mee oma ($56,1 \pm 0,3$ mg GAE / 100 g). [51]

1.3.2. Happesus ja vabad happed

Mee happesus tuleneb peamiselt selles sisalduvatest orgaanilistest hapetest, mida leidub mees umbes 0,5% [52]. Mee pH on suhteliselt madal, jäädes enamasti vahemikku 3,4–6,1, keskmine pH on 3,9 [19]. Vabad happed annavad meele küll antibakteriaalsed toimed [19], kuid nende kontsentratsiooni suurenemine suhkru käärimisel halvendab mee kvaliteeti [12]. Mee käärimist soodustab kristalliseerumine: lisaks tekstuuri halvenemisele on mee peale tekkiv vedel madala suhkrisaldusega kiht hea keskkond käärimiseks [52]. Ka mee maitse on seotud mee happesusega. Enamasti lisatakse orgaanilised happed mette mesilaste poolt [1]. Põhiline hape mees on glükoonhape, kuid see esineb seal laktooni kujul, seega ei panusta vabade hapete sisaldusse [23]. Selle hüdrolüüsil vabade hapete sisaldus aga kasvab [53]. Veel sisaldab mesi sidrun-, glükoon-, õun-fool-, viin-, piim-, merevaik-, või-, etaan-, maleiin-, oksaal-, püroglutamiin- ja metaanhapet [13], [23], [54]. Vabade hapete sisaldusel on ka seos polüfenoolidega – kõrgem hapete sisaldus on polüfenoolirikamatel metel [6]. Vabade hapete sisaldust määratakse NaOH-ga tiitrides ning pH mõõdetakse pH-meetriga [55]. pH on lahuses olevate vesinikioonide kontsentratsiooni miinuslogaritmi [56]. Mõned uuringud on leidnud, et pH ja vabade hapete sisalduse vahel võib olla korrelatsioon: mida rohkem tekib mette vabasid happeid, seda rohkem on lahuses vesinikioone ja seda madalam on pH [52].

Mee happesust esitatakse kujul „milliekvivalenti kilogrammi mee kohta“ (meq/kg) või „millimooli kilogrammi mee kohta“ (mmol/kg). Eesti Vabariigi määruste järgi peab mee vabade hapete sisaldus jääma alla 50 milliekvivalenti 1000 g kohta [39], 2021. aasta Eesti mete süvauuringus jäid tulemused vahemikku 8,0–44,0 mmol/kg [12]; teine Eesti meeuuring aastast 2020 näitas tulemusi vahemikus 12,0–43,0 mmol/kg [6]; 2014. aasta Eesti uuringus saadi tulemuseks vahemik 14–54 mmol/kg [31]; 2011. aasta Eesti uurimus andis tulemuseks keskmiselt 20,4 mmol/kg. [32]

1.4. Värvusanalüüsid

Värvusreaktsioonid on lihtsasti ja kiiresti teostatavad ning polüfenoolide ja flavonoidide sisalduse määramisel laialdaselt kasutatud. Nad põhinevad kolorimeetrial ehk nähtava valguse spektrofotomeetrial ehk kindlal lainepikkusel oleva valguse neelduvusel tekkinud värvilistes ühendites.

Üks selline värvusreaktsioon on Folin-Ciocalteu meetod, mida kasutatakse polüfenoolide üldsisalduse määramiseks. See arendati välja 1927. aastal türosiini ja trüptofaani sisalduse määramiseks valkudes [57] ning on nüüdseks kujunenud standardmeetodiks üldfenoolse sisalduse leidmiseks. Selle meetodiga on uuritud lisaks metele ka näiteks veine, šokolaadi, mahlasid, oliiviõli ning erinevaid maitseühendeid [47]. F-C reagent sisaldab fosfomolübdeen- ja fosfovolframhapet ning käitub reaktsioonis fenoolsete ühenditega oksüdeerijana: fenoolne ühend on elektronidoonor ning F-C reagent liidab endaga elektroni. Fosfomolübdeen- ja fosfovolframhapest derivaatide redutseerumine muudab proovi kollasest sinakas-roheliseks [58]. See muudab proovi 765 nm juures spektrofotomeetriselt analüüsitavaks. Tekkinud sinine värvus on proportsionaalne proovis leiduvate polüfenoolide sisaldusega ehk kõrgema polüfenoolide sisaldusega proovide värvus on tumedam [59]. Fenoolid reageerivad reagentiga ainult aluselistes tingimustes, mistõttu lisatakse reaktsioonisegule ka Na_2CO_3 . Tekkiv kompleks on kõrgematel temperatuuridel ebastabiilne, mistõttu viiakse reaktsiooni läbi toatemperatuuril. [58] Samuti on reaktsioon valgustundlik, mistõttu tuleb seda läbi viies hoida pimedas [60]. Standardina kasutatakse gallushapet ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) seetõttu, et see on mees loomulikult esinev fenoolne hape. Antud meetodi puhul on segajateks muud redutseerijad, näiteks askorbiinhape, aminohapped ja mee puhul eriti suhkrud, mis võivad tulemuse tegelikkusest kõrgemaks teha, kuid toatemperatuuril ei ole nende mõju väga kõrge. Näiteks üldfenoolide sisalduse määramisel veinides ei ole parandustegur suurem kui 20%. [47]

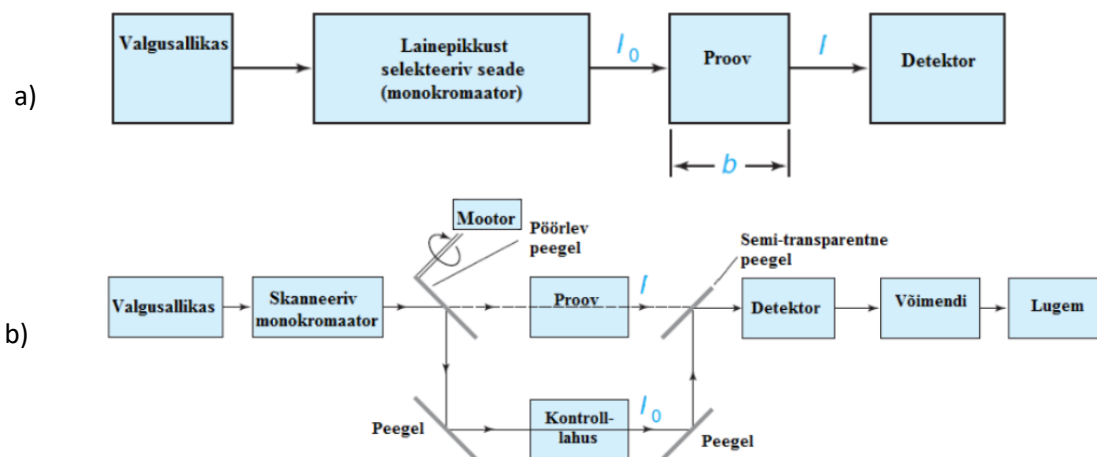
Flavonoidide sisalduse määramiseks kasutatakse värvusreaktsiooni alumiiniumkloriidiga, kus standardiks on enamasti kvartsetiin. Tegemist on levinud meetodiga, mis arendati välja juba 60ndatel [61], et määrata flavonoidide sisaldus taimses materjalis, ning mida on kasutatud sarnaselt eelmisele meetodile nii veinide, mahlade, puuviljade kui mee flavonoidse sisalduse määramisel. [62] Kvartsetiin on flavonoid, mida leidub mees suures koguses, seega kasutataksegi seda võrdlusstandardina. Tänu oma okso- ja hüdroksüülrühmadele tõmbuvad flavonoidid AlCl_3 poole ning moodustavad kollaseid komplekse, mida nimetatakse kelaatideks. Kollane värvus tähendab, et proov omab neelduvust 415 nm juures. [63] Värvus on seotud flavonoidide kontsentratsiooniga ehk on kõrgema flavonoidide sisaldustega proovides tumedam. Ka see reaktsioon on valgus- ja temperatuuritundlik ning seda viiakse sarnaselt F-C meetodile läbi toatemperatuuril ning pimedas [64]. Erinevalt aga F-C meetodist, ei ole flavonoidide määramisel suhkru mõju analüüsitulemustele täheldatud.

1.5. Spektrofotomeetria

Spektrofotomeetria on meetod, mis kasutab valgust, et mõõta aine keemilist kontsentratsiooni. Igal looduses esineval ühendil on võime kindlatel lainepikkustel valgust neelata, läbi lasta või seda peegeldada [65]. Selleks, et ühendit saaks spektrofotomeetriselt analüüsida, peab see valgust

neelama ning selle spetsiifilise ühendi neelduvus peaks olema erinev teiste lahuses esinevate ühendite neelduvusest. Erinevad spektrofotomeetrid kasutavad nii infrapunakiirgust, nähtavat kui ultravioletvalgust. Nähtava valguse neeldumisel põhinevat protseduuri kutsutakse ka kolorimeetriaks. [66]

UV-Vis spektrofotomeeter kasutab ultraviolet- (lainepikkused 180-390 nm) ja nähtavat valgust (lainepikkused 390-780 nm). Spektrofotomeetri põhilised osad on kujutatud joonisel 3. [66]



Joonis 3. a) Ühe- ja b) kahekiirelise spektrofotomeetri tööpõhimõtte [66], joonise eestikeelne tõlge instrumentaalanalüüsi spektrofotomeetria praktikumi tööjuhendist [67]

Uuritava aine kontsentratsioon on valguse neelduvusega otseses seoses ning seda saab leida, kasutades Lambert-Beeri seadust [66]:

$$A = \epsilon bc, \text{ kus}$$

A – lahuse optiline tihedus ehk absorptsioon ehk neelduvus (ühikuta);

ϵ – molaarne absorptsioonikoefitsient ehk neeldumiskoefitsient (ühik $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

b – valguskiire teekond ehk küveti paksus (ühik cm);

c – lahuse kontsentratsioon (ühik mol L^{-1}).

Seega saab tänu spektrofotomeetria le määrata kvantitatiivselt aine kontsentratsiooni, kasutades standardlahuseid ja nende põhjal koostatud kalibratsioonigraafikut.

1.6. Tiitrimine ja elektrood

Tiitrimine on analüütilises keemias kindla kontsentratsiooniga lahuse ehk reaktiivi kvantitatiivne lisamine tundmatu kontsentratsiooniga lahusele, kuni reaktsioon nende vahel on lõppenud. Kulunud reaktiivi mahu ja kontsentratsiooni põhjal saab välja arvutada teise lahuse ehk analüüdi kontsentratsiooni. Tiitrimisreaktsioonid peavad olema parajalt kiired ja toimuma vastavalt reageerivate ainete reaktsioonivõrrandile. Toimuda ei tohi kõrvalreaktsioone ning ekvivalentpunkt ehk stöhhiomeetriapunkt peab olema hästi määratav, mille täpsus omakorda sõltub lahuste valmistamisest ja selle käigus sooritatud mõõtmiste korrektsusest. [68]

Ekvivalentpunkt määratakse happesusindikaatorite abil, milleks on näiteks lakmuspaber, mis on happelises keskkonnas punane ja leeliselises sinine; fenoolftaleiin, mis on aluselises lahuses roosakaspunane, muul ajal aga värvusetu; ning metüüloranž, mille värv muutub happelises lahuses punaseks, muus keskkonnas on kollane. [68]

Selleks, et saada aga veel täpsemat tulemust, kasutatakse pH-meetrit, mille täpsus on vähemalt 0,01 pH ühikut ning mille kasutamisel pole vaja värve hinnata. pH-meetri näol on tegemist potentsiomeetriga, mis mõõdab lahuses olevate vesinikioonide kontsentratsiooni, mille miinuslogaritm ongi lahuse pH. [56]

pH-meeter koosneb voltmeetrist, mis on ühendatud pH-tundliku indikaatorelektroodi ja referentselektroodiga. pH-meetritel asetsevad mõlemad elektrodid ühes kehas ehk tegemist on kombineeritud elektroodiga. pH-tundlik elektrod on klaasist ning koosneb torust ja kuulist, mis on täidetud kindla kontsentratsiooni ja püsiva vesinikioonide aktiivsusega standardlahusega, milleks on enamasti HCl, millesse on sukeldatud hõbekloriidiga kaetud hõbetaat. Võrdluselektrod on tavaliselt hõbe-hõbekloriid elektrod, mis on sukeldatud küllastatud KCl lahusesse ning mis omab püsivat potentsiaali. See küllastatud lahus on läbi poorse friti kontaktis uuritava lahusega. [69]

Lahuses käituvad elektrodid justkui aku, mis tekitab otseselt vesinikioonide aktiivsusest sõltuva elektromotoorjõu – indikaatorelektroodi potentsiaal sõltub ainult vesinikioonide kontsentratsioonist lahuses, sest elektroodi klaaskuulike on õhuke ning ühel ja teisel pool kuuliseina olev pH erinevus tekitab potentsiaalide erinevuse. Referents- ehk võrdluselektroodi potentsiaal aga vesinikioonidest ei sõltu ning on konstantne, mistõttu tekib klaasist indikaatorelektroodi ja võrdluselektroodi vahel potentsiaalide erinevus. Seda potentsiaalide erinevust mõõdab voltmeeter. [69]

2. TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgid on:

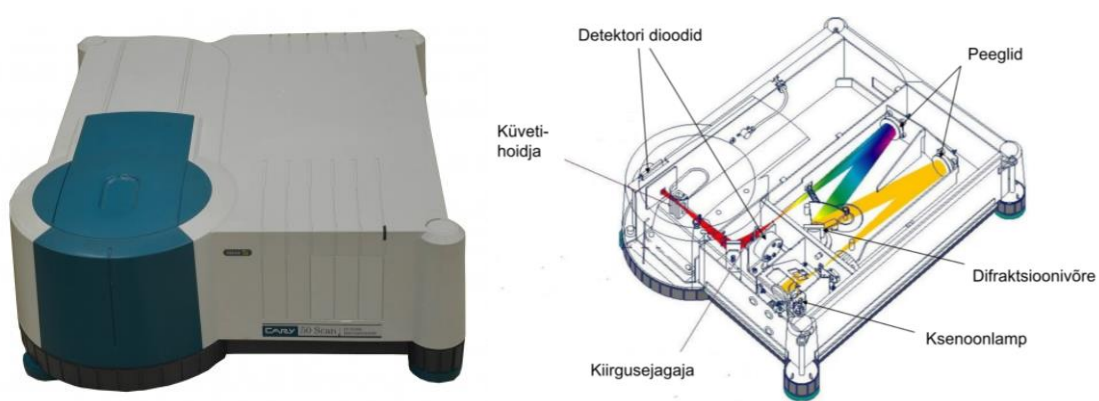
- Määrata üheksa erineva mee polüfenoolide, flavonoidide ja vabade hapete sisaldus ning happesus, kasutades selleks Folin-Ciocalteu reaktsiooni ja alumiiniumkloriidi reaktsiooni ning spektrofotomeetrilist analüüsi ja potentsiomeetrilist tiitrimist.
- Võrrelda tulemuste kokkulangevust teineteise ning varasemate uuringutega.

Seejuures valmistada kõik meeproovide ekstraktid selliselt, et oleks võimalik ka nende edasine kasutamine *Borrelia* bakteri uuringutes.

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1. Kasutatav aparatuur

Katsete läbiviimisel kasutati TalTechi Keemia ja biotehnoloogia instituudi Instrumentaalanalüüsi teaduslabori seadmeid. Proovide ettevalmistamisel kasutati kaalumiseks Mettler Toledo analüütilist kaalu AB204-S (Šveits), segamiseks loksuteid Mikrowstrzasarka typ ML-1 (Poola) ja ELMi Ltd. DOS-20M (Läti), ning üldfenoolide ja flavonoidide sisalduse määramisel kasutati proovide neelduvuse mõõtmiseks Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotomeetrit (Agilent Technologies, Santa Clara, CO, USA; joonis 4). Mee pH ning vabade hapete mõõtmisel kasutati Metrohmi 744 pH-meetrit (Šveits) ja Velp Scientifica HSC magnetsegajat (Itaalia).



Joonis 4. Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotomeeter [70] ja selle osad [71]

Varian Cary 50 Bio WinUV UV-Vis spektrofotomeetri ksenoonlambi lainepikkusvahemik on 190–1100 nm, seade kasutab kaht ränidiod-detektorit. [72] Meeproovide neelduvuse määramisel kasutati plastikust 1,5 mL semi-mikro UV-küvette (NovaNatura, Itaalia) ning tulemused salvestati arvutis tarkvaraga Cary WinUV.

3.2. Kasutatavad ained ja materjalid

Üldfenoolide sisalduse määramisel kasutati 2 M Folin-Ciocalteu reagenti (Sigma-Aldrich, Šveits) ja veevaba Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich, Saksamaa). F-C reagent on värvuselt kollane fosfovolframhappe ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ja fosfomolübdeenhappe ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) vedel segu, mida hoiustatakse fooliumisse pakitult (valguse eest kaitstult) külmkapis temperatuuril 4°C . Lisaks kasutati standardlahuste valmistamiseks gallushappe monohüdraati (Sigma-Aldrich, Hiina), keemilise koostisega $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ja $\geq 99,9\%$ metanooli (Honeywell, Charlotte, NC, USA).

Flavonoidide sisalduse määramisel kasutati alumiiniumkloriidi (Fluka, Šveits), standardlahuste valmistamiseks $\geq 99,0\%$ kvartsetiini (Lachema/Chemapol), keemilise koostisega $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, ning $\geq 99,9\%$ metanooli (Honeywell, Charlotte, NC, USA).

Tiitrides mee vabade hapete sisalduse määramiseks valmistati 0,1 M NaOH (Sigma-Aldrich, Saksamaa) vesilahus.

Selleks, et mõõta suhkru mõju polüfenoolide määramisele, kasutati veevaba D-glükoosi (Fisher Chemical, Suurbritannia), sahharoosi (Fisher Chemical, Suurbritannia), D-fruktoosi (Fisher Chemical, Suurbritannia), (D+)-maltoosi monohüdraati ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja (D+)-rafinoosi pentahüdraati ($C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 5H_2O$, Acros Organics, Hiina).

Meeproovide ja lahjenduste valmistamiseks ning nullproovide tegemiseks kasutati ultrapuhast (≥ 18 M Ω cm) MilliQ vett (MilliQ veepuhastussüsteemist; Merck KGaA, Darmstadt, Saksamaa).

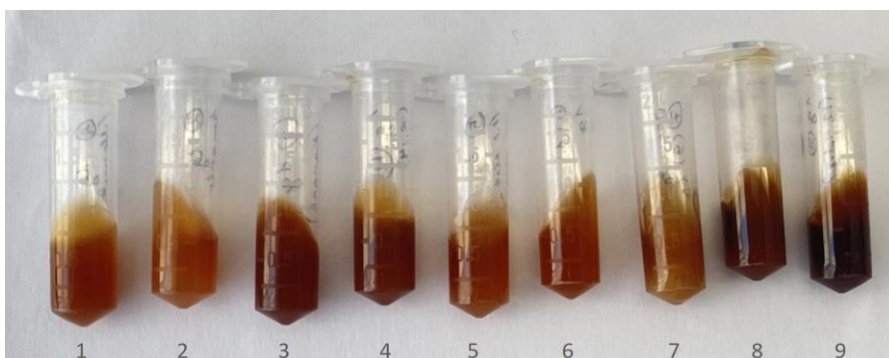
3.2.1. Standardlahuste valmistamine

Üldfenoolide sisalduse määramisel kasutati standardlahustena erinevate kontsentratsioonidega gallushappe lahuseid. Nende valmistamiseks kaaluti analüütilise kaaluga mõõtekolbi õige kogus gallushappe monohüdraadi pulbrit ning lisati metanooli lahust, mille tulemusel saadi 5 mg/mL ehk 5000 μ g/mL kontsentratsiooniga gallushappe lahus, mida lahjendati omakorda veel 10 korda, et saada 500 μ g/mL kontsentratsiooniga alglahus. Seejärel valmistati sellest alglahusest kalibratsiooniks vajalike kontsentratsioonidega lahjendused ehk 10, 25, 50 ja 100 μ g/mL kontsentratsioonidega gallushappe lahused ehk standardlahused, lisades alglahusele piisaval hulgal MilliQ vett. Standardlahuseid säilitati külmkapis 4°C juures.

Flavonoidide sisalduse määramisel kasutati standardlahustena erinevate kontsentratsioonidega kvartsetiini lahuseid. Nende valmistamiseks kaaluti analüütilise kaaluga mõõtekolbi õige kogus kvartsetiini pulbrit ning lisati metanooli, mille tulemusel saadi 2 g/L ehk 2000 mg/L kontsentratsiooniga kvartsetiini lahus, mida lahjendati omakorda veel 10 korda, et saada 200 mg/L kontsentratsiooniga alglahus. Seejärel valmistati sellest alglahusest kalibratsiooniks vajalike kontsentratsioonidega lahjendused ehk 2, 5, 10, 20 ja 30 mg/L kontsentratsioonidega kvartsetiini lahused ehk standardlahused, lisades alglahusele piisavalt hulgal MeOH \cdot H₂O (50% metanooli). Standardlahuseid säilitati külmkapis 4°C juures.

3.3. Kasutatavad proovid

Uuritavad proovid olid kaheksa erinevat mett erinevatest Eesti piirkondadest, millest kolm olid kanarbikumeed, üks metsamesi, üks segumesi, üks soometsa mesi ja kaks tatramett, ning üks Manuka mesi Uus-Meremaalt.



Joonis 5. Uuritavad meed

Tabel 1. Uuritavad meed

Mesi	Tootja ja päritolu
1. Manuka mesi, 2023	Uus-Meremaa, Ashburton
2. Muhe kanarbikumesi, 2023	OÜ Iktos, Lääne-Virumaa
3. Kanarbikumesi, 2023	OÜ Jõumeeste, Pärnumaa
4. Kanarbikumesi, 2022	OÜ Asteni Mesindus, Pärnumaa
5. Metsamesi, 2022	OÜ Asteni Mesindus, Pärnumaa
6. Segumesi, 2022	OÜ Trepimäe, Harjumaa
7. Soometsa mesi, 2022	Taali mesila, Lääne-Virumaa
8. Tatramesi, 2022	OÜ Asteni Mesindus, Pärnumaa
9. Tatramesi, 2023	Jõeääre mesindustalu, Võrumaa

Meed 4–8 ehk OÜ Asteni Mesindus kanarbiku-, metsa- ja tatrameed, OÜ Trepimäe segumesi ning Taali mesila soometsa mesi osutusid valituks nende kõrge DHA sisalduse tõttu, mis selgus 2021. aastal läbi viidud Eesti mete süvauuringus, kui uuriti samade tootjate vastavaid meeproove. Kõrge DHA sisaldusega (ehk kõrge antibakteriaalse toimega) meed valiti selleks, et uurida edaspidi borrelioosi uuringus mete *Borrelia* bakteri vastast toimet. Ülejäänud meed valiti nende eeldatava võimaliku kõrge antibakteriaalsete ja -oksüdantsete omaduste tõttu, põhinedes Eesti mete süvauuringu tulemustel ja kirjandusel (Manuka mee puhul). Samuti pöörati tähelepanu, et valim oleks lai ning uuritavad meed oleksid eri taimedest ja nektar kogutud eri kohtadest.

Kõigi meeproovide puhul oli mee säilivusaeg analüüsimise hetkel kehtiv ning need olid säilitatud vastavalt metele soovitatavatele säilitustingimustele. Meed 1, 2, 3 ja 9 pärinesid samast aastast, mil analüüsid tehti (2023), ning ülejäänud meed olid aasta vanemad (2022).

3.3.1. Proovide ettevalmistamine

Üldfenoolide ja flavonoidide sisalduse määramiseks kaaluti analüütilisel kaalul 1 g mett ja lahjendati mahuni 5 mL vastava solvendiga, milleks oli F-C reagentiga polüfenoolide määramisel vesi ning alumiiniumkloriidiga flavonoidide määramisel 50% metanool. Üldfenoolide sisalduse määramiseks tehti veega lahjendatud meest veel kolmekordne lahjendus: selleks võeti 400 µL proovi ja lisati sellele 800 µL vett. Flavonoidide sisalduse määramiseks tehtud metanooliga lahjendatud meeproove edasi enam ei lahjendatud.

Vabade hapete ja pH määramiseks mõõdeti keeduklaasi 5 g mett, millele lisati 37,5 mL MilliQ vett.

3.4. Katsete läbiviimise meetodika

Kõigis üheksas meeproovis analüüsiti polüfenoolide üldsisaldust, flavonoidide sisaldust, pH-d ning vabade hapete sisaldust. Polüfenoolide sisalduse määramisel tehti igast meest 6 paralleelkatset ning

flavonoidide sisalduse määramisel igast meest 4 paralleelkatset. Nii vabasid happeid kui pH-d mõõtes tehti igast meest 3 paralleeli. Samuti mõõdeti suhkrute mõju üldfenoolide ja flavonoidide sisalduse määramisele metes vastavalt F-C reaktiiviga ja AlCl_3 -ga.

3.4.1. Polüfenoolide sisalduse määramine metes UV-Vis spektrofotomeetrit kasutades

Polüfenoolide üldsisalduse määramine metes F-C reaktiiviga põhines Singletoni meetodil (1999) [47], mis oli kohandatud mee analüüsiks 2021. aasta Eesti mete süvauuringu raames [12]. Selleks valmistati F-C reagenti kümnekordne lahendus MilliQ veega ning 10% Na_2CO_3 vesilahus. Värvusanalüüsi läbiviimiseks segati kokku 1 mL saadud F-C reagenti ja 200 μL lahjendatud meeproovi, mis jäeti omavahel 8 minutiks pimedasse (fooliumi alla) reageerima, aeg-ajalt neid loksutades. Seejärel lisati 800 μL 10% Na_2CO_3 ja jäeti proovid tunniks ajaks toatemperatuuril pimedasse seisma. Tulemusi mõõdeti UV-Vis spektrofotomeetriga lainepikkusel 765 nm ja saadud absorptsioonide põhjal konstrueeriti Microsoft Excelis kalibratsioonigraafik ning arvutati proovis sisalduv üldfenoolide kogus, mida väljendati kui milligrammi gallushappe ekvivalenti 100 grammi mee kohta (mg GAE / 100 g mees) [73].

3.4.2. Flavonoidide sisalduse määramine metes UV-Vis spektrofotomeetrit kasutades

Flavonoidide sisalduse määramine metes alumiiniumkloriidiga põhines Bueno-Costa meetodil (2016) [10], mida kasutati ka 2021. aasta Eesti mete süvauuringu raames [12]. Selleks valmistati 2% AlCl_3 lahus MeOH -s, millele lisati ka 0,5 mL MilliQ vett, et lahus poleks hägune. Värvusanalüüsi läbiviimiseks segati kokku 600 μL AlCl_3 lahust ja sama palju meeproovi. Nende kokkusegamise hetkest lasti neil 30 minutit reageerida, hoides proove fooliumi all pimedas, neid aeg-ajalt loksutades. Tulemusi mõõdeti UV-Vis spektrofotomeetriga lainepikkusel 415 nm ja saadud absorptsioonide põhjal konstrueeriti Microsoft Excelis kalibratsioonigraafik ning arvutati proovis sisalduv flavonoidide kogus, mida väljendati kui milligrammi kvartsetiini ekvivalenti 100 grammi mee kohta (mg QE / 100 g mees) [63].

3.4.3. pH ja vabade hapete määramine metes tiitrimist kasutades

pH ja vabade hapete määramiseks kasutati Rahvusvahelise Meekomisjoni ühtlustatud meetodeid, kus pH-d mõõdeti pH-meetriga ning vabade hapete kogusisaldus mõõdeti meeproovi 0,1 M NaOH-ga tiitrides, kuni lahuse pH oli 8,30. Vabade hapete sisaldust väljendati milliekvivalentides kilogrammi mee kohta (meq/kg). [55] Mete pH ja vabade hapete mõõtmiseks kasutati pH-meetrit. pH mõõdeti enne NaOH lisamist ning kogu tiitrimise jooksul.

3.4.4. Suhkrute mõju mõõtmine üldfenoolide ja flavonoidide sisalduse määramisele metes

Selgitamaks mees leiduvate suhkrute mõju F-C meetodil üldfenoolide sisalduse määramisele ja alumiiniumkloriidi meetodil flavonoidide sisalduse määramisele metes, sooritati katsed suhkruisrupiga, mis valmistati vastavalt mees leiduvate suhkrute sisaldusele (varasemalt Instrumentaalanalüüsi teaduslaboris määratud keskmine suhkrute sisaldus Eesti metes). Suhkrute kogused on toodud allolevas tabelis 2.

Tabel 2. Suhkruisrupi retsept

Aine	Kogus (grammides)
MilliQ vesi	5,95
Fruktoos	2
Glükoos	1,55
Maltoos	0,3
Rafinoos	0,125
Sahharoos	0,075

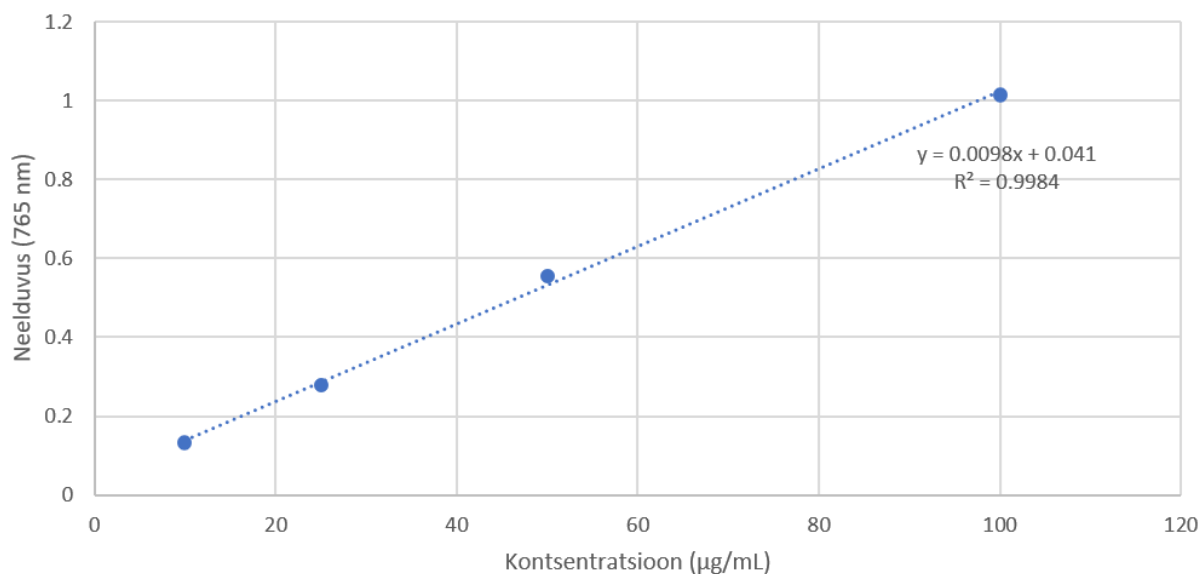
Sellise suhkruisrupi näol on tegemist mee 50% lahjendusega: tegelikult oleks mees 0,95 g vett, kuid kuna nii väheses vees oleks raske kõiki suhkruid lahustada, siis lisati seda 5 g rohkem. Edasi lahjendati suhkruisrupit nii palju, et kokkuvõttes oleks see sama lahjendusega nagu analüüsitud meeproovid, mille ettevalmistamist on kirjeldatud punktis 3.3.1.

Proove mõõdeti vastavalt Folin-Ciocalteu meetodile, kus F-C reagenti, proovi ja Na_2CO_3 lisati samas vahekorras nagu meeproovide puhul punktis 3.4.1, ning vastavalt alumiiniumkloriidi meetodile, kus AlCl_3 ja proovi lisati samas vahekorras nagu punktis 3.4.2. Standarditeks olid ikka gallushape, mille valmistamisel alustati 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gallushapest ja tehti sellest lahjemad lahused kontsentratsioonidega 0, 10, 25, 50 ja 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kusjuures ühel juhul oli lahjendamisel maatriksiks vesi ja teisel juhul just valmistatud suhkruisrupi lahjendus; ning kvartsetiin, mille valmistamisel alustati 2 g/L kvartsetiinist ja tehti sellest lahjemad lahused kontsentratsioonidega 2, 5, 10, 20 ja 30 mg/L, kusjuures ühel juhul oli lahjendamisel maatriksiks metanool-vesi ja teisel juhul just valmistatud suhkruisrupi lahjendus. Tulemusi mõõdeti UV-Vis spektrofotomeetriga lainepikkustel 765 ja 415 nm ja saadud absorptsioonide põhjal konstrueeriti Microsoft Excelis kalibratsioonigraafikud ning hinnati suhkru mõju polüfenoolide ja flavonoidide määramisele metes.

4. TULEMUSED JA ARUTELU

4.1. Üldfenoolide sisaldus uuritavates meeproovides ja võrdlus kirjanduse andmetega

Kasutades gallushappe standardlahuste kontsentratsioone ja nende vastavaid neelduvusi, mis saadi spektrofotomeetriga mõõtmisel 765 nm juures, konstrueeriti Microsoft Excelis kalibratsioonigraafik, mille x-teljel on gallushappe kontsentratsioon ($\mu\text{g GAE} / \text{mL}$) ja y-teljel UV-Vis spektrofotomeetri mõõtmistulemusena saadud neelduvus ehk absorptsioon (joonis 6).



Joonis 6. Spektrofotomeetrilise analüüsi kalibratsioonigraafik gallushappe standarditest

Kalibratsioonigraafiku regressioonijoone võrrandit ja spektrofotomeetrilisel mõõtmisel saadud neelduvusi kasutades ning proovi ettevalmistuse protseduuri arvestades arvutati meeproovi üldfenoolide sisaldus gallushappe ekvivalentides ($\mu\text{g GAE} / \text{mL}$).

Üldfenoolide sisaldus meeproovides jäi vahemikku 33,14 ja 100,91 mg GAE / 100 g mee kohta, keskmine tulemus oli 56,11 mg GAE / 100 g mees. Kõigi 9 mee üldfenoolide sisaldused on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Üldfenoolide sisaldus meeproovides

Meeproov	Üldfenoolide sisaldus mg GAE / 100 g mees ± SH, n = 6
1. Manuka mesi, 2023	48,44 ± 2,05
2. Muhe kanarbikumesi, 2023	38,82 ± 1,08
3. Kanarbikumesi, 2023	70,26 ± 2,00
4. Kanarbikumesi, 2022	53,58 ± 0,08
5. Metsamesi, 2022	35,77 ± 0,57
6. Segumesi, 2022	35,26 ± 1,14
7. Soometsa mesi, 2022	33,14 ± 0,67
8. Tatramesi, 2022	88,79 ± 1,12
9. Tatramesi, 2023	100,91 ± 1,94

Tulemustest on näha, et kõige kõrgem on polüfenoolide sisaldus tatrametes, millele järgnevad kanarbikumeed, v.a. Muhe kanarbikumesi, mille üldfenoolide sisaldus oli pigem madal. Tatra- ja kanarbikumeed on ka värvuselt kõige tumedamad, mis kinnitab, et tumedama värviga mete fenoolne sisaldus on kõrgem kui heledamatel metel [74], [75]. Just kanarbiku- ja tatramete polüfenoolirikust kinnitasid ka 2021. aasta Eesti mete süvauuring [12] ja 2014. aasta Poola Gdynia ülikooli uuring [48], kusjuures tatramesi andis pea kõigis uurimustes kõige kõrgemaid tulemusi. Pigem keskmise tulemuse andis Manuka mesi, millel peaks kirjanduse põhjal olema küll suhteliselt kõrge fenoolne sisaldus. Samas on ka varasemad uuringud leidnud, et tatramee fenoolne sisaldus võib olla kõrgem kui Manuka meel [51].

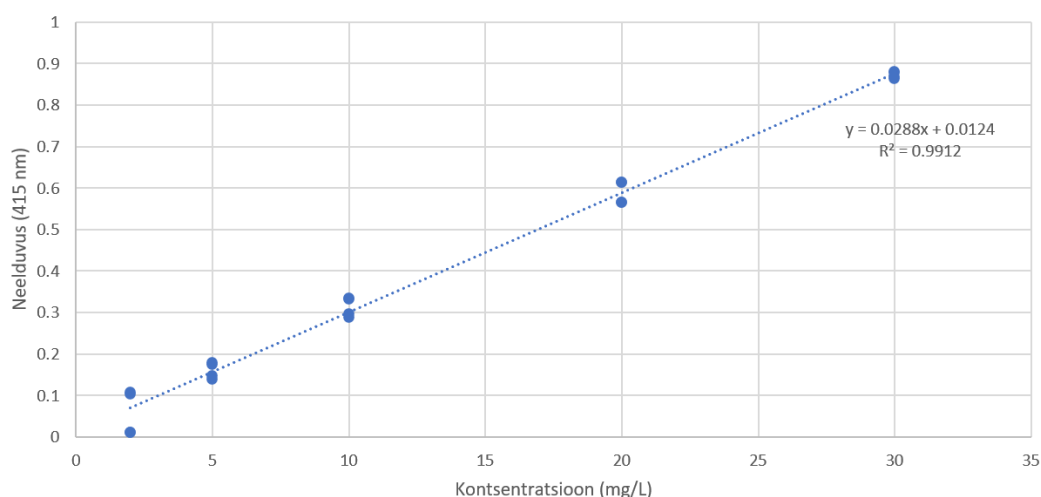
Saadud tulemused on kooskõlas kirjandusega ning jäid suhteliselt samasse vahemikku kui varasemad Eesti meeuuringute tulemused. Üldfenoolide sisaldus võib päris tugevalt varieeruda ning sõltub palju mee täpsest taimsest koostisest ja korjepiirkonnast, mistõttu on erinevates uuringutes saadud tulemused väga mitmekesised, nagu näha tabelist 4.

Tabel 4. Üldfenoolide sisaldused meeproovides käesolevas ja varasemates uuringutes

Uuring	Tulemus mg GAE / 100 g mees
Käesolev bakalaureusetöö	33,14–100,91, keskmine 56,11
2021. Eesti mete süvauuring [12]	39,14–178,36, keskmine 85,62
2020. Eesti meeuuring [6]	26,2–88,7, keskmine 41,9
2014. Poola uuring [48]	40,5–177
2010. Tšehhi uuring [14]	keskmine 11,02
2013. Hispaania uuring [49]	keskmine 112,8
2015. Brasiilia uuring [10]	11,37–54,01

4.2. Flavonoidide sisaldus uuritavates meeproovides ja võrdlus kirjanduse andmetega

Kasutades kvartsetiini standardlahuste kontsentratsioone ja nendele vastavaid neelduvusi, mis saadi spektrofotomeetriga mõõtmisel 415 nm juures, konstrueeriti Microsoft Excelis kalibratsioonigraafik, mille x-teljel on kvartsetiini kontsentratsioon ($\mu\text{g QE / mL}$) ja y-teljel UV-Vis spektrofotomeetri mõõtmistulemusena saadud neelduvus ehk absorptsioon (joonis 7).



Joonis 7. Spektrofotomeetrilise analüüsi kalibratsioonigraafik kvartsetiini standarditest

Kalibratsioonigraafiku regressioonijoone võrrandit ja spektrofotomeetrilisel mõõtmisel saadud neelduvusi kasutades ning proovi ettevalmistuse protseduuri arvestades arvutati meeproovis sisalduv üldfenoolide sisaldus kvartsetiini ekvivalentides ($\mu\text{g QE / mL}$).

Flavonoidide sisaldus meeproovides jäi vahemikku 2,17 ja 8,59 mg QE / 100 g mee kohta, keskmine tulemus oli 4,86 mg QE / 100 g mees. Kõigi 9 mee flavonoidide sisaldused on toodud tabelis 5.

Tabel 5. Flavonoidide sisaldus meeproovides

Meeproov	Flavonoidide sisaldus mg QE / 100 g mees \pm SH, n = 4
1. Manuka mesi, 2023	5,18 \pm 0,21
2. Muhe kanarbikumesi, 2023	2,28 \pm 0,30
3. Kanarbikumesi, 2023	6,70 \pm 0,52
4. Kanarbikumesi, 2022	4,58 \pm 1,11
5. Metsamesi, 2022	2,17 \pm 0,85
6. Segumesi, 2022	3,93 \pm 0,95
7. Soometsa mesi, 2022	4,00 \pm 1,43
8. Tatramesi, 2022	6,33 \pm 1,22
9. Tatramesi, 2023	8,59 \pm 1,31

Tulemustest on näha, et kõige kõrgem on flavonoidide sisaldus tatrametes, millele järgnevad kanarbikumeed, v.a. Muhe kanarbikumesi, mille flavonoidide sisaldus on üks madalamaid. Seega on flavonoidide sisaldus otseses seoses üldfenoolide kogusisaldusega ja seega ka mee värvusega: tumedamas mees on rohkem flavonoide kui heledamates. Manuka mesi andis samuti pigem kõrge tulemuse, kuid siiski madalama kui tatrameed. Ka 2021. aasta Eesti mete süvauuring leidis, et just tatramesi on kõige flavonoidirikam [12], 2020. aasta TalTechi ja TFTAKi koostöös uuring aga, et kanarbikumesi.

Saadud tulemused on kooskõlas kirjandusega ning jäid samasse vahemikku kui varasemad Eesti meeuuringute tulemused. Nagu näha tabelist 6, siis ka teiste riikide uuringute tulemused on suhteliselt sarnased, seega võib öelda, et flavonoidide sisalduse varieeruvus on väiksem kui üldfenoolide.

Tabel 6. Flavonoidide sisaldused meeproovides käesolevas ja varasemates uuringutes

Uuring	Tulemus mg QE / 100 g mees
Käesolev bakalaureusetöö	2,17–8,59, keskmine 4,86
2021. Eesti mete süvauuring [12]	0,71–7,74, keskmine 2,57
2020. Eesti meeuuring [6]	1,9–6,4, keskmine 3,5
2010. Tšehhi uuring [14]	keskmine 0,66
2013. Hispaania uuring [49]	keskmine 6,1
2015. Brasiilia uuring [10]	2,97–10,46

4.3. Vabade hapete sisaldus ja pH uuritavates meeproovides ja võrdlus kirjanduse andmetega

Mete mõõdetud vabade hapete sisaldused ja pH-d on toodud all tabelis 7.

Vabade hapete sisaldus metes leiti järgneva valemi abil [55]:

$$x \cdot 0,1 : y \cdot 1000 = z, \text{ kus}$$

x – kulunud 0,1 M NaOH hulk milliliitrites

0,1 – NaOH molaarsus

y – meeproovi mass grammides

1000 – selleks, et saada tulemus kilogrammi mee kohta

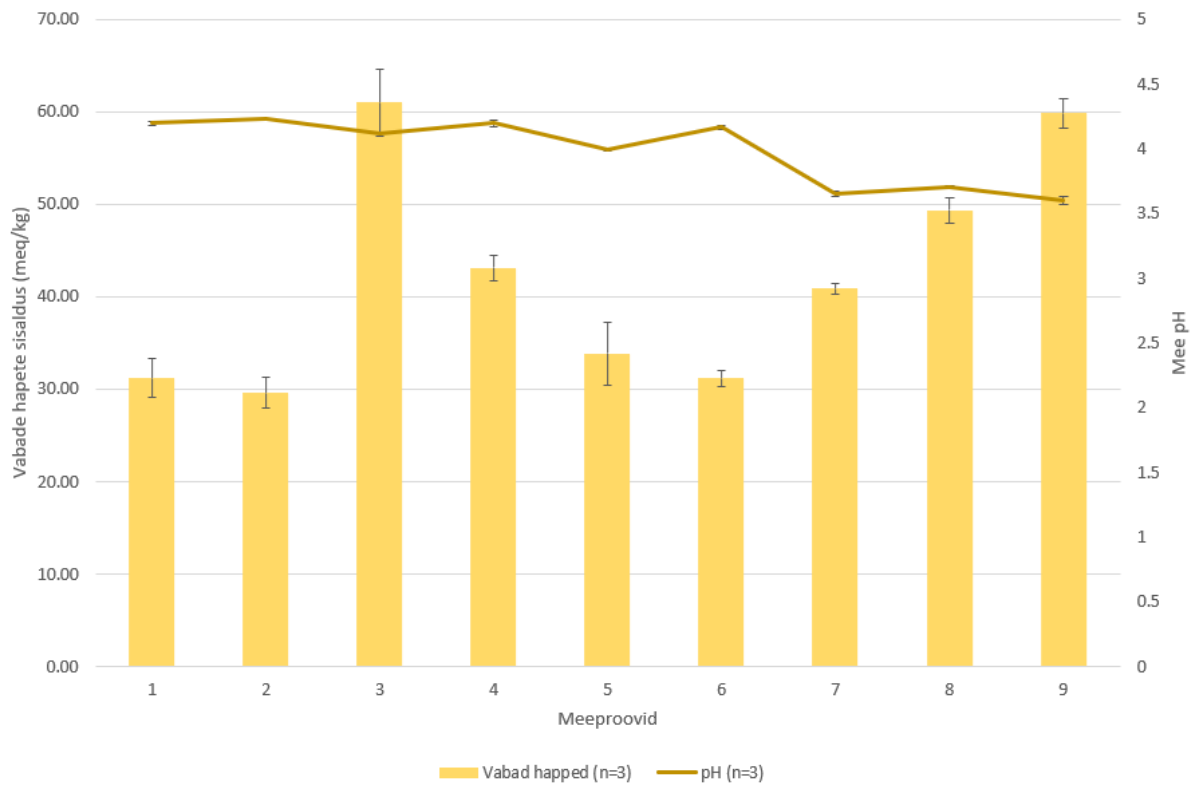
z – vabade hapete sisaldus milliekvivalentides kilogrammi mee kohta (meq/kg mees)

Tabel 7. Mete vabade hapete sisaldus (meq/kg) ja nende pH-d

Meeproov	Vabade hapete sisaldus (meq/kg mees) ± SH, n = 3	Mee pH ± SH, n = 3
1. Manuka mesi, 2023	28,80 ± 2,11	4,18 ± 0,02
2. Muhe kanarbikumesi, 2023	27,82 ± 1,69	4,23 ± 0,00
3. Kanarbikumesi, 2023	59,36 ± 3,58	4,12 ± 0,01
4. Kanarbikumesi, 2022	41,62 ± 1,33	4,17 ± 0,02
5. Metsamesi, 2022	37,74 ± 3,38	3,98 ± 0,01
6. Segumesi, 2022	30,08 ± 0,93	4,15 ± 0,02
7. Soometsa mesi, 2022	40,26 ± 0,53	3,63 ± 0,02
8. Tatrimesi, 2022	47,81 ± 1,39	3,70 ± 0,01
9. Tatrimesi, 2023	58,06 ± 1,61	3,57 ± 0,03

Tulemused näitavad, et pea kõikide mete vabade hapete sisaldused jäävad Eesti Vabariigi määruste piiresse ehk on alla 50 meq/kg [39], v.a. tatrimesi (9) ja kanarbikumesi (3), millede vabade hapete sisaldus on veidi kõrgem. Varasemates Eesti uuringutes on vabade hapete sisaldused jäänud vahemikku 8,0–44,0 mmol/kg (keskmine 22,67) [12]; 12,0–43,0 mmol/kg (keskmine 24,3) [6]; 14–54 mmol/kg (keskmine 25) [31]; ja ühes uuringus oli keskmine tulemus 20,4 mmol/kg [32]. Antud bakalaureusetöös olid tulemused vahemikus 27,82–59,36 meq/kg mees ning keskmine tulemus oli 41,29 meq/kg. Tulemused olid varasematele suhteliselt sarnased, kuid pigem kõrged, samuti oli võrreldes varasemate tulemustega kõrge ka keskmine väärtus. Seda seetõttu, et vabade hapete kontsentratsioon suureneb suhkru käärimisel [12]. Kuigi kõik need olid hästi säilitatud, siis seistes võivad siiski vabade hapete sisaldused tõusta, mistõttu olidki tulemused proovides veidi kõrged.

Nagu näha jooniselt 8, siis mete happesuse ja vabade hapete sisalduse vahel korrelatsiooni märgata polnud, kuigi kirjanduse põhjal on seda varem tuvastatud [52]. Samuti ei saa öelda, et eksisteeriks korrelatsioon mete vanuse ning happesuse vahel, sest kõik analüüsitavad need olid proovide mõõtmise hetkel säilivusaja piirdes ning hoiustatud sobival tingimustel. Kuigi need 1, 2, 3 ja 9 olid aasta võrra värskemad ülejäänutest, ei olnud nende vabade hapete sisaldused teistest madalamad. Kõikide mete pH-d jäid vahemikku 3,57–4,23, keskmine tulemus oli 3,99, seega tulemused ei varieerunud väga palju.

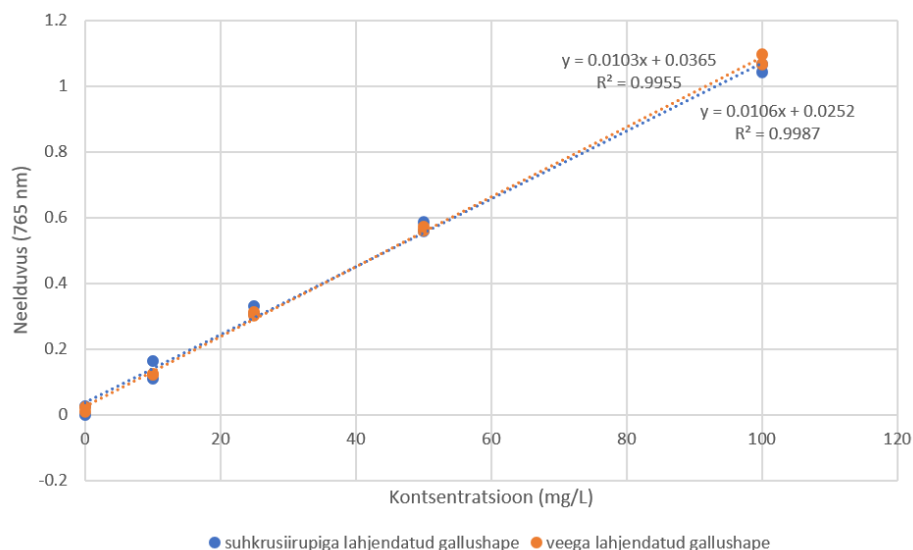


Joonis 8. Meeproovide vabade hapete sisaldus (meq/kg; n = 3) ja pH (n = 3)

Tulemused kinnitasid, et vabade hapete sisaldusel on seos polüfenoolidega ja seega ka mee värvusega – kõrgem hapete sisaldus on polüfenoolirikamatel ja tumedamatel metel [6], sest just tatra- ja kanarbikumetel olid kõige kõrgemad vabade hapete sisaldused, v.a. Muhe kanarbikumesi, mille üldfenoolide ja flavonoidide sisaldus oli miskipärast samuti madal.

4.4. Suhkrute mõju üldfenoolide ja flavonoidide sisalduse määramisele metes

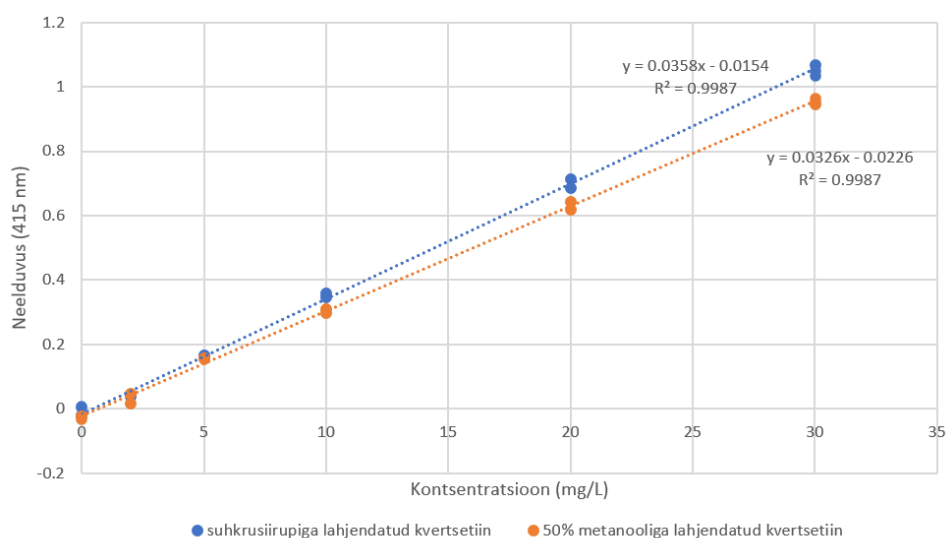
Kasutades gallushappe standardlahuste kontsentratsioone ja nende vastavaid neelduvusi, mis saadi spektrofotomeetriga mõõtmisel 765 nm juures, konstrueeriti Microsoft Excelis kalibratsioonigraafik, mille x-teljel on (suhkrusiirupi või veega lahjendatud) gallushappe kontsentratsioon (mg/L) ja y-teljel UV-Vis spektrofotomeetri mõõtmistulemusena saadud neelduvus ehk absorptsioon (joonis 9).



Joonis 9. Suhkruisurupi neelduvus 765 nm juures

Joonis 9 näitab, et käesolevas töös ei avaldanud suhkrud Folin-Ciocalteu reaktsioonile mõju, kuigi kirjanduses on öeldud, et suhkrute tõttu võib see reaktsioon üldfenoolide sisaldust tegelikult kõrgemaks hinnata [47].

Seejärel otsustati sarnast katset korrata flavonoididega, et näha, kas suhkrud võiksid mõju avaldada alumiiniumkloriidi reaktsiooniga flavonoidide sisaldus määramas, kuigi kirjandusest selle kohta tõestust ei leitud. Kasutades kvartsetiini standardlahuste kontsentratsioone ja nende vastavaid neelduvusi, mis saadi spektrofotomeetriga mõõtmisel 415 nm juures, konstrueeriti Microsoft Excelis kalibratsioonigraafik, mille x-teljel on (suhkruisurupi või veega lahjendatud) kvartsetiini kontsentratsioon (mg/L) ja y-teljel UV-Vis spektrofotomeetri mõõtmistulemusena saadud neelduvus ehk absorptsioon (joonis 10).



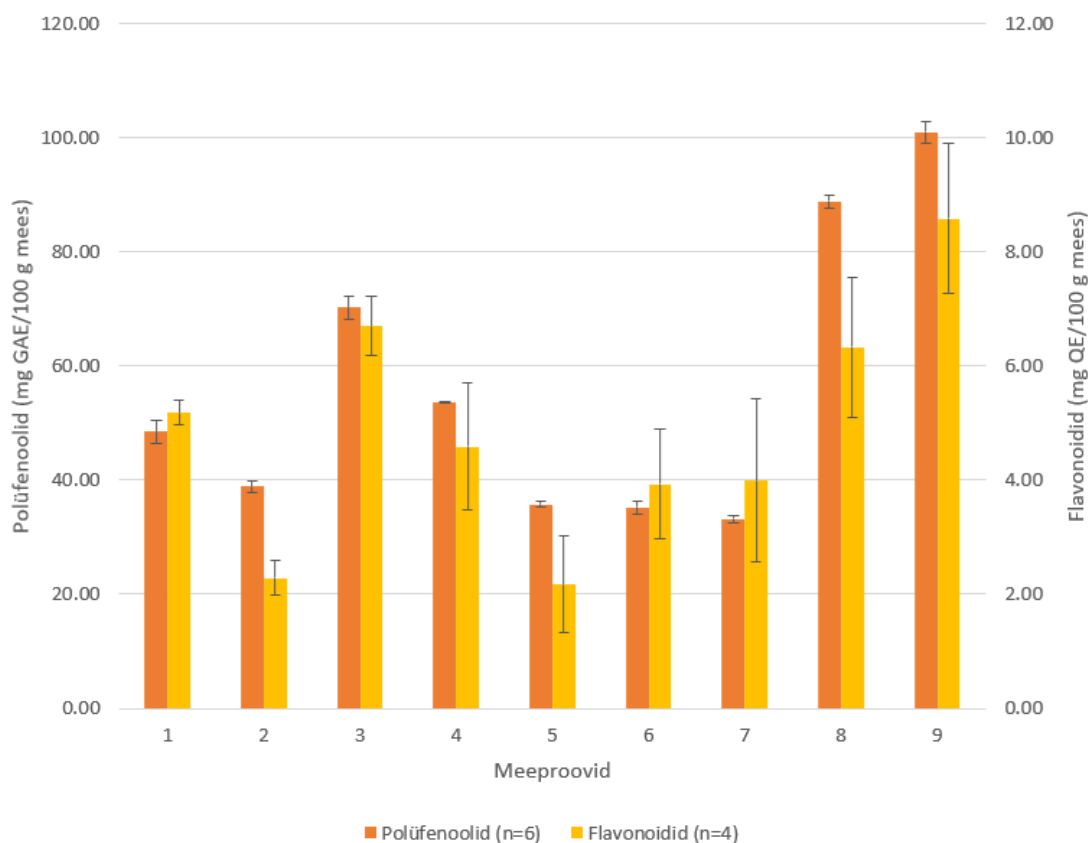
Joonis 10. Suhkruisurupi neelduvus 415 nm juures

Joonis 10 näitab, et käesolevas töös tõepoolest leiti, et suhkrud avaldavad alumiiniumkloriidiga flavonoidide sisalduse määramisele kõrgemate kontsentratsioonide juures tulemustele mõju. See tähendab, et tulevikus peaks mõju minimeerimiseks näiteks proove rohkem lahjendama.

4.5. Mete omavaheline võrdlus

Uuritud üheksat erinevat meesorti omavahel joonisel 11 võrreldes on näha, et kõrgema polüfenoolse koostisega meed on ka kõrgema flavonoidide sisaldusega. Võrreldes neid tulemusi punktis 4.3. olevas tabelis 7 esitatuga, on selgelt näha, et kõrgema polüfenoolide sisaldusega meed on ka kõrgema vabade hapete sisaldusega.

Kolm kõige polüfenoolirikkamat mett on ka kolm kõige flavonoidirikkamat mett ja nendeks on tatra- ja kanarbikumeed. Manuka mesi on kõikide tulemuste järgi pigem keskmine.



Joonis 11. Üldfenoolide sisaldus (mg GAE / 100 g; n = 6) ja flavonoidide sisaldus (mg QE / 100 g; n = 4) metes

Analüüsimise hetkel olid kõikide meeproovide säilivusaegad kehtivad, kuid meed 2, 3 ja 9 olid aasta võrra värskemad kui ülejäänud. Siiski ei olnud meeproovide puhul märgata korrelatsiooni nende vanuse ja vabade hapete sisalduse või pH vahel.

Kõrvutades joonist 5 saadud tulemustega, võib visuaalse värvuse hinnangu põhjal öelda, et peamine seos on polüfenoolide, flavonoidide ja vabade hapete rikkuse ning värvuse vahel, sest tumedad meed on kõikide mõõdetud omaduste sisalduse poolest kõrgemad.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli määrata üheksa mee polüfenoolide, flavonoidide ja vabade hapete sisaldus ning nende mete happesus, kasutades selleks Folin-Ciocalteu reaktsiooni, standardlahuseks gallushape, ja alumiiniumkloriidi reaktsiooni, standardlahuseks kvartsetiin, ning spektrofotomeetrilist analüüsi ja potentsiomeetrilist tiitrimist. Eesmärk oli võrrelda saadud tulemuste kokkulangevust teineteise ning varem avaldatud uurimustega. Üheksast meest kaheksa olid pärit Eestist: nende seas kolm kanarbiku-, üks metsa-, üks segu-, üks soometsa ja kaks tatramett; ning üks Manuka mesi Uus-Meremaalt.

Uuritud meeproovide üldfenoolide sisaldused, mida mõõdeti Folin-Ciocalteu meetodiga, jäid vahemikku 33,14–100,91 mg GAE / 100 g, keskmine tulemus 56,11 mg GAE / 100 g; flavonoidide sisaldused, mida mõõdeti alumiiniumkloriidi meetodiga, jäid vahemikku 2,17–8,59 mg QE / 100 g, keskmine tulemus 4,86 mg QE / 100 g; vabade hapete sisaldused jäid vahemikku 27,82–59,36 meq/kg mees, keskmine tulemus 41,29 meq/kg; ning pH-d jäid vahemikku 3,57–4,23, keskmine tulemus 3,99. Suhteline standardhälve jäi kõikide katsete puhul alla 20%.

Ka varasemalt värvusanalüüside ning spektrofotomeetrilise mõõtmisega läbiviidud katsetes, samu reagente ja standardeid kasutades, on määratud sarnased üldfenoolide ja flavonoidide sisaldused. Lisaks on antud töös leitud vabade hapete sisaldused ja pH-d sarnased varasemalt publitseeritule. See kinnitab antud töö tulemuste usaldusväarsust.

Saadud tulemused kinnitasid kirjandusest leitud, et tumedamate mete polüfenoolide ja seega ka flavonoidide sisaldus on kõrgem, ning polüfenoolirikamad meed on ka vabade hapete sisalduse poolest kõrgemad. Suurima üldfenoolide ja flavonoidide sisaldusega olid tatra- ja kanarbikumeed, mis olid värvuselt tumedamad ja mille vabade hapete sisaldused olid samuti kõrgeimad.

Korrelatsiooni mete vanuse ja vabade hapete sisalduse ega pH ja vabade hapete sisalduse vahel ei leitud, kuigi kirjanduse andmetel võiks vanematel metel olla kõrgem vabade hapete sisaldus, mis omakorda võiks tähendada madalamat pH-d. Samuti ei tuvastatud suhkru mõju Folin-Ciocalteu meetodil polüfenoolide sisalduse määramisele. See-eest leiti aga, et kõrgete kontsentratsioonide juures võivad suhkrud avaldada mõju flavonoidide sisalduse määramisele alumiiniumkloriidi meetodiga.

Käesoleva töö tulemusi ja selle käigus valmistatud ekstrakte kasutatakse edasi *Borrelia* bakteri aktiivsuse hindamiseks borrelioosi uuringus.

TÄNUAVALDUSED

Töö autor avaldab tänu töö juhendajale Dr. Piia Jõulile, Keemia ja biotehnoloogia instituudi Instrumentaalanalüüsi teaduslaborile, Eesti mee süvauuringule ning Tallinna Tehnikaülikooli toidu- ja biotehnoloogia õppekavale.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- [1] J. J. W. White, „Honey,” *Advances in Food Research*, kd. 24, p. 378, 1978.
- [2] Tervise Arengu Instituut, „Mesi,” Tervise Arengu Instituut, 2023. [Võrgumaterjal]. Available: <https://toitumine.ee/kuidas-tervislikult-toituda/toidusoovitused/magusad-ja-soolased-naksid/suhkur-ja-magusained/kas-koik-susivesikud-on-suhkrud/lisatud-suhkrud/mesi>. [Kasutatud 29. märts 2024].
- [3] M. L. Hossain, L. Y. Lim, K. Hammer, D. Hettiarachchi ja C. Locher, „Monitoring the Release of Methylglyoxal (MGO) from Honey and Honey-Based Formulations,” *Molecules*, kd. 28, nr 6, p. 2858, 2023.
- [4] Akadeemiline Põllumajanduse Selts, „Mesindusleksikon,” Mesinikeliit, 2016.
- [5] Euroopa Liidu Nõukogu, „EUR-Lex,” 23. juuni 2014. [Võrgumaterjal]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/ALL/?uri=CELEX%3A32001L0110>. [Kasutatud 27. veebruar 2024].
- [6] E. Kivima, K. Tanilas, K. Martverk, S. Rosenthal, L. Timberg ja K. Laos, „The Composition, Physicochemical Properties, Antioxidant Activity, and Sensory Properties of Estonian Honeys,” *Foods*, kd. 10, nr 3, p. 511, 2021.
- [7] T. Tammet, Eesti meeraamat, Tallinn: Forma Media, 2007.
- [8] J. M. Alvarez-Suarez, S. Tulipani, D. Diaz, Y. Estevez, S. Romandini, F. Giampieri, E. Damiani, P. Astolfi, S. Bompadre ja M. Battino, „Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds,” *Food and Chemical Toxicology*, kd. 48, nr 8-9, pp. 2490-2499, 2010.
- [9] V. Kaskoniene ja P. R. Venskutonis, „Floral Markers in Honey of Various Botanical,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, kd. 9, nr 6, pp. 620-634, 2010.
- [10] F. M. Bueno-Costa, R. C. Zambiasi, B. W. Bohmer, F. C. d. S. W. P. Chaves, J. T. Zanusso ja I. Dutra, „Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio,” *LWT - Food Science and Technology*, kd. 65, pp. 333-340, 2016.
- [11] V. Lutsar ja A. Tamla, Mee kood. Mesindussaaduste käitlemine, Tallinn: Maaelu Edendamise Sihtasutus, 2022.
- [12] M. Vaher, P. Saar-Reismaa, P. Jõul ja A. Viitak, „Eesti mee süvauuring,” Tallinna Tehnikaülikooli Keemia- ja biotehnoloogia instituut, Tallinn, 2021.
- [13] P. Saranraj, S. Sivasakthi ja G. D. Feliciano, „Pharmacology of Honey: A Review,” *Advances in Biological Research*, kd. 10, nr 4, pp. 271-289, 2016.
- [14] J. Lachman, A. Hejtmánková, J. Sýkora, J. Karban, M. Orsák ja B. Rygerová, „Contents of Major Phenolic and Flavonoid Antioxidants in Selected Czech Honey,” *Czech Journal of Food Sciences*, kd. 28, nr 5, pp. 412-426, 2010.
- [15] S. H. Mody, *The Antimicrobial Properties of Honey and Their Effects on Pathogenic Bacteria*, Brigham: Brigham Young University, 2018.
- [16] S. K. Jaganathan, A. Mazumdar, D. Mondhe ja M. Mandal, „Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines,” *Cell Biology International*, kd. 35, nr 6, pp. 607-615, 2011.
- [17] P. C. Molan, „Re-introducing Honey in the Management of Wounds and Ulcers - Theory and Practice,” *Ostomy/Wound Management*, kd. 48, nr 11, pp. 28-40, 2002.

- [18] L. Vandamme, A. Heyneman, H. Hoeksema, J. Verbelen ja S. Monstrey, „Honey in modern wound care: A systematic review,” *Burns*, kd. 39, pp. 1514-1525, 2013.
- [19] V. Bansal, B. Medhi ja P. Pandhi, „Honey - a remedy rediscovered and its therapeutic utility,” *Kathmandu University Medical Journal*, kd. 3, nr 3, pp. 305-309, 2004.
- [20] M. A. Al-Ghazali, M. AbuKhader, R. A. Attia, M. A. Al-Tahan ja M. S. Aqrawi, „Knowledge and Awareness of the Therapeutic Benefits and Precautions of Natural Honey Consumption among students,” *Research J. Pharm. and Tech.*, kd. 16, nr 10, 2023.
- [21] K. T. Vijayakumar, N. S. Bhat, T. Neethu, T. Nayimabanu ja H. L. Nithin Kumar, „Periodical changes in quality parameters of honey during storage and processing,” *International Journal of Chemical Studies*, kd. 9, nr 2, pp. 19-24, 2021.
- [22] Veterinaar- ja Toiduamet, Toiduosakond, „Juhend mee märgistusel ja muul viisil antava teabe kohta,” 2017.
- [23] S. Bogdanov, „Honey Composition,” %1 *The Honey Book*, 2011.
- [24] B. Fallico, E. Arena ja M. Zappala, „Prediction of honey shelf life,” *Journal of Food Quality*, kd. 32, nr 3, pp. 352-368, 2009.
- [25] P. Parvanov ja D. Hristov Dinkov, „More insight into organic bee honey processing, storage and shelf life,” *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, kd. 15, nr 3, pp. 206-210, 2012.
- [26] Põllumajandusminister, „Riigi Teataja,” 1. aprill 2021. [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.riigiteataja.ee/akt/125112014025>. [Kasutatud 4. märts 2024].
- [27] K. Kahraman, O. Göcenler ja Ç. Dağ, „Characterization of Turkish Pine honey and differentiation from floral honeys by NMR spectroscopy and chemometric analysis,” *Journal of Food Composition and Analysis*, kd. 127, 2024.
- [28] H. Kaygusuz, F. Tezcan, F. B. Erim, O. Yildiz, H. Sahin, Z. Can ja S. Kolayli, „Characterization of Anatolian honeys based on minerals, bioactive components and principal component analysis,” *LWT - Food Science and Technology*, kd. 68, nr 7, pp. 273-279, 2016.
- [29] E. Majewska, B. Druzynska ja R. Wołosiak, „Determination of the botanical origin of honeybee honeys based on the analysis of their selected physicochemical parameters coupled with chemometric assays,” *Food Science and Biotechnology*, kd. 28, nr 5, pp. 1307-1314, 2019.
- [30] O. M. Punamäe, „ERR,” ERR, 17. aprill 2024. [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.err.ee/1609316385/mesinikud-loodavad-mee-dna-testiga-pektureid-ohjeldada>. [Kasutatud 19. aprill 2024].
- [31] E. Kivima, A. Seiman, R. Pall, E. Sarapuu, K. Martverk ja K. Laos, „Characterization of Estonian honeys by botanical origin,” *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, kd. 63, nr 2, pp. 183-192, 2014.
- [32] E. Kirs, R. Pall, K. Martverk ja K. Laos, „Physicochemical and melissopalynological characterization of Estonian summer honeys,” *Procedia Food Science*, kd. 1, pp. 616-624, 2011.
- [33] R. Karise, R. Raimets, V. Bartkevics, I. Pugajeva, P. Pihlik, I. Keres, I. H. Williams, H. Viinalass ja M. Mänd, „Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments?,” *Chemosphere*, kd. 188, pp. 389-396, 2017.
- [34] A. Laaniste, I. Leito, R. Rebane, R. Lõhmus, A. Lõhmus, F. Punga ja A. Kruve, „Determination of neonicotinoids in Estonian honey by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry,” *Journal of Environmental Science and Health*, kd. 51, nr 7, pp. 455-464, 2016.

- [35] L. Puusepp ja T. Koff, „Pollen analysis of honey from the Baltic region, Estonia,” *Grana*, kd. 53, nr 1, pp. 54-61, 2014.
- [36] R. Rebane ja K. Herodes, „Evaluation of the Botanical Origin of Estonian Uni- and Polyfloral Honeys by Amino Acid Content,” *Agricultural and Food Chemistry*, kd. 56, nr 22, p. 10716–10720, 2008.
- [37] K. Laos, E. Kirs, R. Pall ja K. Martverk, „The crystallization behaviour of Estonian honeys,” *Agronomy Research*, kd. 9, nr 2, pp. 427-432, 2011.
- [38] P.-R. Laanet, P. Saar-Reismaa, P. Jõul, O. Bragina ja M. Vaher, „Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Selected Estonian Galium Species,” *Molecules*, kd. 28, nr 6, p. 2867, 2023.
- [39] Põllumajandusminister, „Riigi Teataja,” 13. detsember 2014. [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.riigiteataja.ee/akt/125112014015>. [Kasutatud 4. märts 2024].
- [40] P. Ebrahimi ja A. Lante, „Polyphenols: A Comprehensive Review of their Nutritional Properties,” *The Open Biotechnology Journal*, kd. 15, nr 1, pp. 164-172, 2021.
- [41] W. Vermerris ja R. Nicholson, *Phenolic Compound Biochemistry*, Dordrecht: Springer Science + Business Media, 2008.
- [42] S. Samarghandian, t. Farkhondeh ja F. Samini, „Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research,” *Pharmacognosy Research*, kd. 9, nr 2, p. 121–127, 2017.
- [43] I. C. Ferreira, E. Aires, J. C. Barreira ja L. M. Estevinho, „Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract,” *Food Chemistry*, kd. 114, nr 4, pp. 1438-1443, 2009.
- [44] K. Pyrzyńska ja M. Biesaga, „Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey,” *Trends in Analytical Chemistry*, kd. 28, nr 7, pp. 893-902, 2009.
- [45] J. Rusko, P. Vainovska, B. Vilne ja V. Bartkevics, „Phenolic profiles of raw mono- and polyfloral honeys from Latvia,” *Journal of Food Composition and Analysis*, kd. 98, 2021.
- [46] P. Andrade, F. Ferreres, M. I. Gil ja F. A. Tomás-Barberán, „Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis,” *Food Chemistry*, kd. 60, nr 1, pp. 79-84, 1997.
- [47] V. L. Singleton, R. Orthofer ja R. M. Lamuela-Raventós, „Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent,” *Methods in Enzymology*, kd. 299, pp. 152-178, 1999.
- [48] A. Wilczynska, „Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolics of honey,” *LWT - Food Science and Technology*, kd. 57, pp. 767-774, 2014.
- [49] O. Escuredo, M. Míguez, M. Fernández-González ja M. C. Seijo, „Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area,” *Food Chemistry*, kd. 138, nr 2-3, pp. 851-856., 2013.
- [50] M. Gośliński, D. Nowak ja L. Kłębukowska, „Antioxidant properties and antimicrobial activity of manuka honey versus Polish honeys,” *Journal of Food Science and Technology*, kd. 57, nr 4, p. 1269–1277, 2020.
- [51] J. Deng, R. Liu, Q. Lu, P. Hao, A. Xu, J. Zhang ja J. Tan, „Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to manuka honey,” *Food Chemistry*, kd. 252, pp. 243-249, 2018.

- [52] M. M. Cavia, M. A. Fernandez-Muino, S. R. Alonso-Torre, J. F. Huidobro ja M. T. Sancho, „Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation,” *Food Chemistry*, kd. 100, p. 1728–1733, 2007.
- [53] J. W. J. White, J. Petty ja R. B. Hager, „The composition of honey. II. Lactone Content,” *AOAC International*, kd. 41, nr 1, p. 194–197, 1958.
- [54] M. Ž. Baloš, N. Popov, S. Vidaković, D. Ljubojević Pelić, M. Pelić, Ž. Mihaljev ja S. Jakšić, „Electrical Conductivity and Acidity of Honey,” *Arhiv veterinarske medicine*, kd. 11, nr 1, pp. 91-101, 2018.
- [55] International Honey Commission, „Harmonised Methods of the International Honey Commission,” International Honey Commission, 2009.
- [56] P. A. Jennings, C. A. Mullen ja M. Roy, „Titration and pH Measurement,” %1 *Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester, John Wiley & Sons, Ltd, 2010.
- [57] O. Folin ja V. Ciocalteu, „On Tyrosine and Tryptophane Determinations,” *Journal of Biological Chemistry*, kd. 73, nr 2, pp. 627-650, 1927.
- [58] M. Pérez, I. Dominguez-López ja R. M. Lamuela-Raventós, „The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, kd. 71, nr 46, p. 17543–17553, 2023.
- [59] S. Galili ja R. Hovav, „Chapter 16 - Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Dry Seeds,” %1 *Polyphenols in Plants. Isolation, Purification and Extract Preparation*, Cambridge, Academic Press, 2014, pp. 305-323.
- [60] A. Blainski, G. C. Lopes ja J. C. P. de Mello, „Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L.,” *Molecules*, kd. 18, nr 6, p. 6852–6865, 2013.
- [61] B. Dr. Christ ja K. H. Müller, „Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen,” *ArchPharm*, kd. 293, nr 12, pp. 1033-1042, 1960.
- [62] A. Pełkal ja K. Pyrzyńska, „Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay,” *Food Analytical Methods*, kd. 7, p. 1776–1782, 2014.
- [63] A. M. Shraim, T. A. Ahmed, M. M. Rahman ja Y. M. Hijji, „Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation,” *LWT - Food Science and Technology*, kd. 150, 2021.
- [64] A. P. Sari, N. L. Amanah, A. Wardatullathifa ja A. Nugroho, „Comparison of Maseration and Sonication Method on Flavonoid Extraction from Mango Leaves: Effect of Solvent Ratio,” *ASEAN Journal of Chemical Engineering*, kd. 22, nr 2, pp. 274-283, 2022.
- [65] M. Dadi ja M. Yasir, „Spectroscopy and Spectrophotometry: Principles and Applications for Colorimetric and Related Other Analysis,” *Colorimetry*, p. 220, 2022.
- [66] D. C. Harris, „Fundamentals of Spectrophotometry,” %1 *Quantitative Chemical Analysis. Eighth Edition*, New York, W. H. Freeman and Company, 2010, pp. 393-418.
- [67] Instrumentaalanalüüsi praktikum, *Spektrofotomeetria tööjuhend*, Tallinn: TalTech, 2023.
- [68] A. Lust, „Tartu Ülikooli Teaduskool,” 2019. [Võrgumaterjal]. Available: https://teaduskool.ut.ee/sites/default/files/teaduskool/oppetoo/tiitrimetria_2018_2019_i.pdf. [Kasutatud 24. aprill 2024].

- [69] V. Past, J. Raudsepp ja A. Koorits, „pH potentsiomeetriline määramine. loonselektiivsed elektroodid,“ %1 *ELEKTROODIPROTSESSID. Füüsikalise keemia praktikum*, Tartu, TRÜ trükikoda, ENSV, 1981, pp. 35-37.
- [70] Hamilton Instrument, Artist, *Varian Cary 50 Scan UV/Vis Spectrophotometer*. [Art]. Hamilton Instrument.
- [71] S. Komilian, Artist, *Cary 50 Uv-Vis spectrophotometer*. [Art]. ResearchGate, 2019.
- [72] SpectraLab Scientific Inc., *Varian Cary 50 Bio UV-Vis Spectrophotometer*, Markham: SpectraLab Scientific Inc., 2019.
- [73] M. Vaher, M. Borissova, A. Seiman, T. Aid, H. Kolde, J. Kazarjan ja M. Kaljurand, „Automatic spot preparation and image processing of paper microzone-based assays for analysis of bioactive compounds in plant extracts,“ *Food Chemistry*, kd. 143, p. 465–471, 2014.
- [74] M. M. Özcan ja Ç. Ölmez, „Some qualitative properties of different monofloral honeys,“ *Food Chemistry*, kd. 163, pp. 212-218, 2014.
- [75] S. Frankel, G. E. Robinson ja M. R. Berenbaum, „Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys,“ *Journal of Apicultural Research*, kd. 37, nr 1, pp. 27-31, 1998.

ANNOTATSIOON

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli määrata üheksa mee polüfenoolide, flavonoidide ja vabade hapete sisaldus ning nende mete happesus, kasutades selleks Folin-Ciocalteu reaktsiooni, standardlahuseks gallushape, ja alumiiniumkloriidi reaktsiooni, standardlahuseks kvartsetiin, ning spektrofotomeetrilist analüüsi ja potentsiomeetrilist tiitrimist. Eesmärk oli võrrelda saadud tulemuste kokkulangevust teineteise ning varem avaldatud uurimustega. Üheksast meest kaheksa olid pärit Eestist: nende seas kolm kanarbiku-, üks metsa-, üks segu-, üks soometsa ja kaks tatrasetti; ning üks Manuka mesi Uus-Meremaalt.

Uuritud meeproovide üldfenoolide sisaldused, mida mõõdeti Folin-Ciocalteu meetodiga, jäid vahemikku 33,14–100,91 mg GAE / 100 g, keskmine tulemus 56,11 mg GAE / 100 g; flavonoidide sisaldused, mida mõõdeti alumiiniumkloriidi meetodiga, jäid vahemikku 2,17–8,59 mg QE / 100 g, keskmine tulemus 4,86 mg QE / 100 g; vabade hapete sisaldused jäid vahemikku 27,82–59,36 meq/kg mees, keskmine tulemus 41,29 meq/kg; ning pH-d jäid vahemikku 3,57–4,23, keskmine tulemus 3,99.

Tumedamate mete polüfenoolide ja seega ka flavonoidide sisaldus on kõrgem, ning polüfenoolirikamad meed on ka vabade hapete sisalduse poolest kõrgemad. Suurima üldfenoolide ja flavonoidide sisaldusega olid tatra- ja kanarbikumeed, mis olid värvuselt tumedamad ja mille vabade hapete sisaldused olid samuti kõrgeimad.

ABSTRACT

The aim of this bachelor's thesis was to determine the content of polyphenols, flavonoids and free acids in nine different honey samples, as well as the acidity of these honeys, using the Folin-Ciocalteu reaction, with gallic acid as the standard solution, and the aluminum chloride reaction, with quercetin as the standard solution, as well as spectrophotometric analysis and potentiometric titration. The aim was to compare the obtained results with each other and with previously published studies. Eight of the nine honeys were from Estonia, among them three heather, one forest, one mixed, one bog forest and two buckwheat honeys; and one Manuka honey from New Zealand.

The total phenolic contents of the examined honey samples, measured with the Folin-Ciocalteu method, ranged from 33.14 to 100.91 mg GAE / 100 g, the average being 56.11 mg GAE / 100 g; the flavonoid contents were measured with the aluminum chloride method and they ranged from 2.17 to 8.59 mg QE / 100 g, with an average result of 4.86 mg QE / 100 g; free acid contents ranged from 27.82 to 59.36 meq/kg male, the average being 41.29 meq/kg; and pHs ranged from 3.57 to 4.23, the average result being 3.99.

The total content of polyphenols and thus also flavonoids is higher in darker honeys, and honeys richer in polyphenols also have a higher content of free acids. Buckwheat and heather honeys had the highest content of total phenols and flavonoids, the darkest colour and the highest content of free acids.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Iris-Gertrud Jussila

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Polüfenoolide, flavonoidide ja vabade hapete üldsisaldus ning happesus metes“,

mille juhendaja on Piia Jõul,

1.1. reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

1.3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

31.05.2024

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtjaja jooksul ei kehti.