

Kvaliteta bagremovog meda Krapinsko-zagorske županije

Špoljar, Danica

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:536304>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
Karlovac University of Applied Sciences

Repository / Repozitorij:

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE
USMJERENJE PRERADA MLIJEKA

Danica Špoljar

**KVALITETA BAGREMOVOG MEDA KRAPINSKO-
ZAGORSKE ŽUPANIJE**

Završni rad

Karlovac, rujan, 2015.

VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE
USMJERENJE PRERADA MLIJEKA

**KVALITETA BAGREMOVOG MEDA KRAPINSKO-
ZAGORSKE ŽUPANIJE**

Završni rad

Mentor:
dr. sc. Marijana Blažić, v. pred.

Danica Špoljar
0314613087

Karlovac, rujan, 2015.

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, pod vanjskim mentorstvom dr. sc. Nade Vahčić, red. prof. i mentorstvom dr. sc. Marijane Blažić, v. pred. Veleučilišta u Karlovcu.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Marijani Blažić, v. pred. i vanjskoj mentorici dr. sc. Nadi Vahčić, red. prof. na uputama, pruženoj pomoći i savjetima tijekom pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem Renati Petrović, ing. i Valentini Hohnjec, ing. na pomoći prilikom izvedbe diplomskog rada u laboratoriju i na uvijek veseloj atmosferi.

Puno hvala roditeljima na bezrezervnoj podršci, strpljenju i ljubavi na svakom koraku tijekom školovanja.

Hvala Siniši i mojim prijateljima na druženjima, pomoći i potpori.

KVALITETA BAGREMOVOG MEDA KRAPINSKO-ZAGORSKE ŽUPANIJE

Sažetak:

Med je sladak, gust i viskoznan proizvod karakterističnog okusa i mirisa. Proizvode ga medonosne pčele iz nektara i medljike. Na kvalitetu meda utječu botaničko i geografsko podrijetlo, okolišni uvjeti, podrijetlo pčela, način prerade i uvjeti skladištenja. Pomoću navedenih parametara može se ustanoviti zrelost i svježina meda, duljina termičke obrade, duljina skladištenja, te je li med patvoren. U istraživanju provedenom na 28 uzoraka bagremovog meda određivani su neki od fizikalno-kemijskih parametara koji daju uvid u kvalitetu meda: udio prolina i 5-hidroksimetilfurfuraldehida (HMF) te aktivnost invertaze. Udio prolina kretao se u rasponu od 44,6 do 427,2 mg/kg, udio HMF-a od 0,8 do 17,9 mg/kg i aktivnost invertaze od 2,1 do 16,3 IN. Količina prolina je u 16 od 28 uzoraka manja od količine utvrđene zahtjevima Codex Alimentarius-a što ukazuje kako je riječ o vrsti meda s prirodno niskim udjelom prolina. Pošto su količine HMF-a i aktivnosti invertaze u skladu sa zahtjevima Pravilnika i CAC-a, može se zaključiti kako je med bio dobre kakvoće, svježine i nije bio dugo skladišten.

Ključne riječi: bagrem, HMF, invertaza, med, prolin

QUALITY OF ACACIA HONEY IN KRAPINA-ZAGORJE COUNTY

Abstract:

Honey is sweet, highly concentrated and viscous product with characteristic flavour and aroma. It is produced by honeybees from the nectar and the honeydew. Botanical and geographical origin, environmental conditions, the origin of bees, the method of processing and storage conditions influence the honey quality. Using this parameters maturity as honey freshness, heat treatment length, storage length and honey adulteration can be determined. In this study, on 28 samples of acacia honey, some physical-chemical parameters that affect the quality of honey (the amount of proline, the proportion of 5-hydroxymethylfurfuraldehyde (HMF) and invertase activity) were determined. The amount of proline ranged from 44,6 to 427,2 mg/kg, HMF share from 0,8 to 17,9 mg/kg and the activity of invertase from 2,1 to 16,3 IN. The amount of proline in 16 of 28 samples is less than the amount specified in requirements of the Codex Alimentarius Commission what indicates that it is a type of honey with a naturally low proline. Since the activity of invertase and HMF are in accordance with the requirements of the Ordinance and the CAC, it can be concluded that honey had good quality, freshness and has not been long stored.

Keywords: acacia, HMF, invertase, honey, proline

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. Definicija meda	5
2.2. Pčele	7
2.3. Vrste meda.....	8
2.3.1. Nektarni ili cvjetni med.....	9
2.3.2. Medljikovac.....	11
2.4. Kemijski sastav meda.....	13
2.4.1. Voda	14
2.4.2. Ugljikohidrati	15
2.4.3. Proteini	17
2.4.4. Enzimi	18
2.4.5. Kiseline.....	20
2.4.6. Mineralne tvari	20
2.4.7. Vitamini.....	21
2.5. Fizikalna svojstva.....	22
2.5.1. Higroskopnost	22
2.5.2. Kristalizacija.....	22
2.5.3. Električna provodnost	22
2.5.4. Specifična kutna rotacija	23
2.5.5. Viskoznost.....	23
2.5.6. Specifična masa.....	23
2.5.7. Indeks refrakcije	24
2.6. Senzorska svojstva	24
2.7. Prehrambena vrijednost meda	24
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	25
3.1. Materijali	26
3.1.1. Kemikalije	26
3.1.2. Laboratorijsko posuđe i pribor	26
3.1.3. Laboratorijski uređaji (oprema).....	27
3.2. Metode rada.....	27
3.2.1. Priprema uzoraka za analizu	27
3.2.2. Određivanje količine prolina.....	28
3.2.3. Određivanje udjela hidrosimetilfurfurala	29
3.2.4. Određivanje aktivnosti invertaze.....	30
4. REZULTATI.....	33
5. RASPRAVA.....	42
6. ZAKLJUČCI.....	47
7. LITERATURA.....	49
POPIS SLIKA I TABLICA.....	50

1. UVOD

Med je sladak, gust i viskoznan proizvod karakterističnog okusa i mirisa. Proizvode ga medonosne pčele preradom nektara i medljike u mednom mješuru te im dodaju brojne vrijedne supstancije, a potom pohranjuju u saće gdje med zrije. Proizvode ga kao hranu za dugo zimsko razdoblje na isti način milijunima godina. Namirnica je to od davnina poznata čovjeku, vrlo cijenjena zbog hranjivih i ljekovitih svojstava. Med su upotrebljavali i stari Egipćani i dr. narodi (Bauer i sur., 1999; Relić, 2006; Obućina, 2012).

Med je, kao prirodni sirup, koji sadrži prvenstveno fruktozu (38,4%) i glukozu (30,3%) zadnjih godina interesantan kao zaslađivač u proizvodnji hrane (Varga, 2005). Med poboljšava rad svih organa, povećava imunitet, a istovremeno djeluje detoksicirajuće izbacujući suvišne i potencijalno štetne tvari. Budući da je lako probavljiv, ne opterećuje probavu (Vranešić Bender, 2011).

Pčelarski proizvodi, osim meda, su: vosak, pelud, propolis, matična mliječ i pčelinji otrov. Vosak je pročišćeni pčelinji proizvod dobiven topljenjem saća pčela radilica, a primjenjuje se u kozmetici, medicini i industriji. Pelud su muške spolne stanice biljaka te za pčele hrana i time važan činitelj u njihovu rastu i razvoju. Propolis je izlučevina tkiva pupoljaka ili kore drveća, mješavina je smolastih čestica biljaka i izlučevina iz pčelinjih čeljusnih žlijezda, a pčelama služi za dezinfekciju košnice i za zatvaranje pukotina. Matična mliječ je izlučevina posebnih žlijezda mladih pčela radilica, koja predstavlja hranu za maticu i ličinke. Pčelinji otrov sadrži veću količinu mineralnih tvari (posebno bakra i magnezija), histamina, tvari koje imaju sposobnost zgrušavanja krvi, a u pučkoj medicini se kao lijek upotrebljava od davnina (Bauer i sur., 1999; Relić, 2006; Fanuko, 2009).

Med posjeduje antibakterijsko, antivirusno i antimikotičko djelovanje. Bogat je antioksidansima, posebice fenolima i flavonoidima pa se može koristiti kao konzervans. Ti antioksidansi štite i brojne tjelesne strukture, a znanstvenim studijama dokazani su kemopreventivni i antikancerogeni učinci meda. Posebno je zanimljiva kafeinska kiselina i njeni metaboliti, a tim je spojevima dokazan preventivni učinak na karcinom debelog crijeva (Vranešić Bender, 2011). Grčki znanstvenici su pokazali inhibitorno djelovanje meda od timijana na stanice raka prostate (Kassia i sur., 2014).

Cilj ovog rada bit će odrediti udio prolina i HMF-a, te invertaznu aktivnost u 28 uzoraka bagremovog meda iz Krapinsko-zagorske županije. Dobivene vrijednosti će se usporediti s

vrijednostima zadanim u Pravilniku o medu i zahtjevima Codex Alimentarius Commission – CAC-a (Pravilnik o medu, 2015; Bogdanov i sur., 2001) te sličnim istraživanjima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Definicija meda

Prema Pravilniku med jest prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja (Pravilnik o medu, 2015).

Med je složen proizvod koji sadrži puno elemenata odgovornih za biološku harmoniju organizma. Med predstavlja «živu tvar» – što znači da je izvor mikroelemenata, vitamina i mineralnih tvari. Usprkos kompleksnog sadržaja, sastav meda je relativno dobro poznat. Kvantitativni sastav meda ovisi o vegetaciji, prirodi terena, meteorološkim uvjetima, vrsti pčela, fiziološkom sastavu kolonija (Bauer i sur., 1999).



Slika 1. Med (Izvor slike: <http://os-skolara-hercegovac.skola.hr>, 2011)

Med je pčelinji proizvod koji su preradile iz nektara. On predstavlja vrlo slatku, ljepljivu i mirisnu tekućinu sa svojevrsnim okusom i mirisom, različite boje – od prozračne svijetle ili malo žućkaste do sjajno žućkaste, smeđe, tamnosmeđe i tamne. Boja meda uglavnom ovisi od vrste biljaka sa kojih su pčele sakupile nektar i preradile ga (Taranov, 2006).

Med pripremaju pčele od prikupljenog nektara iz nektarija biljaka, koje se nalaze u cvjetovima ili drugim dijelovima biljaka, iz sokova plodova voća i od slatkog soka koje izlučuju lisne uši i dr. insekti. Međutim, nektar cvjetova, sokovi plodova i slatki sokovi koje izlučuju insekti sami po sebi nisu med. Oni to postaju tek pošto ih pčele prerade, dodajući im enzim invertazu, pod čijim se utjecajem složeni šećer saharoza razgrađuje u jednostavne

šećere, glukozu i fruktozu. Samim dodavanjem invertaze nije završen proces prerade slatkih tvari u med. Nektar u sebi sadrži 28 do 79% vode i sve dok se, uz razgradnju složenog šećera u jednostavne, sadržaj vode u njemu ne smanji na oko 20%, to nije pravi, zreo med. Tek kada višak vode ispari med je zreo i pčele ga poklapaju u stanicama saća (Relić, 2006).

Med je prirodni zaslađivač, prirodni sirup koji sadrži prvenstveno fruktozu i glukozu, te je interesantan za dodavanje u razne namirnice u proizvodnji i preradi hrane (Varga, 2005).

Med je kompleksna mješavina šećera, enzima, voska i lipida sa različitim drugim spojevima u tragovima kao što su: mineralne tvari, aminokiseline, organske kiseline, vitamini, pepeo, pelud i propolis (Subramanian i sur., 2003; Romero i sur., 2011).

Med je prirodni proizvod, visoko koncentrirana otopina kompleksne mješavine ugljikohidrata, a sadrži male količine raznih komponenti kao što su: mineralne tvari, proteini, vitamini, organske kiseline, flavonoidi, fenolne kiseline, enzimi i druge fitokemikalije (Bertoncelj i sur., 2007).

Med je slatka, viskozna i prirodna, kompleksna tekuća namirnica poželjnog okusa koju proizvode pčele iz cvjetnog nektara (Guo i sur., 2010).

Med je važan u proizvodnji namirnica većinom baziranih na žitaricama, a koristi se za zaslađivanje, boju, okus, karamelizaciju i viskoznost (Rashed i Soltan, 2004).

Med sadrži glukozu, fruktozu, maltozu, saharozu te vitamine i minerale u tragovima. To je invertni šećer koji nastaje, djelovanjem enzima, iz nektara koji sakupljaju pčele. Ne preporučuje se osobama sa šećernom bolešću jer sadrži visoki udio ugljikohidrata (100 g meda ima 82 g ugljikohidrata) i visoku kalorijsku vrijednost (100 g = 303 kcal) (Svetić, 2011). Glikemijski indeks za med iznosi 90 (Musić, 2009).

Ako se govori o upotrebi meda kod osoba oboljelih od šećerne bolesti, može se reći da sve sastavnice meda obogaćuju metabolizam važnim tvarima. Glukoza iz meda odličan je detoksikator i aktivator jetre. Dijabetičarima se stoga preporuča do 50 g meda na dan, što iznosi oko 160 kcal ili 660 kJ. Med je bolje otopiti u ustima pa potom progutati jer enzimi sline razgrađuju šećere u medu (Obućina, 2012).

Med se danas ne preporučuje djeci mlađoj od jedne godine jer može sadržavati spore bakterije *Clostridium botulinum* koja luči toksine – uzročnike smrtonosne bolesti botulizma. Med je izvrsna zamjena za šećer, s obzirom da je slađi od šećera, treba koristiti pola ili tri četvrtine žlice meda umjesto jedne žlice šećera. Med se, osim za razne slastice, najčešće konzumira s tekućinom, rastopljen u čaju, soku ili vodi. Ako se dodaje toploj tekućini, temperatura ne bi smjela biti toplija od 45°C jer se u protivnom uništavaju najvrjedniji sastojci meda (Vranešić Bender, 2011).

2.2. Pčele

Apikultura, tj. držanje pčela za proizvodnju meda, datira iz 2400. g. pr. Kr. Med se stoljećima smatrao svetom hranom zbog svojih izvanrednih slatkih svojstava i zbog toga što je bio rijedak. Koristio se u religiozne svrhe kod štovanja bogova, za balzamiranje preminulih, kao i u razne medicinske i kozmetičke svrhe. Dugo u povijesti upotrebljavao ga je isključivo bogati sloj društva jer je bio skup. Prestiž meda trajao je do otkrića rafiniranog šećera koji se dobiva iz šećerne repe ili trske (Relić, 2006; Obućina, 2012).

Pčele žive u zajednicama koje se sastoje od više tisuća jedinki. U zoologijskoj sistematizaciji pripada najbrojnijem kolu životinjskog svijeta – člankonošcima (*Arthropoda*). Mjesta obitavanja pčela su veliki predjeli prirode, prvenstveno šume, oranice, voćnjaci, vinogradi i ost. gdje nalaze potrebne elemente za život i reprodukciju (hranu i vodu). Pčele su prilagođene usko specijaliziranoj hrani. Uporabljaju dva osnovna vida hrane – nektar i pelud, koje sakupljaju sa cvjetova biljaka. Pčele prerađuju nektar u med i pohranjuju (konzerviraju) pelud, stvarajući uvjete za dobru očuvanost zaliha koncentrirane hrane. Izuzetno su važne za oplodnju raznih biljnih vrsta (voćke, heljda, suncokret, repica, djetelina i dr.) (Tucak, 2005). Pelud je pčeli potreban za pripravljanje mliječi za odgajanje legla. Pelud sadrži bjelančevine, masti, ugljikohidrate, razne mineralne tvari (natrij, magnezij, aluminij, silicij, fosfor i niz drugih), kao i enzime (invertazu, katalazu, dijastazu i druge) (Relić, 2006).



Slika 2. Pčela na cvijetu (Izvor slike: <http://jatrgovac.com>, 2011)

Voda je također važna u pčelinjoj zajednici posebno tijekom vrućih dana za razrjeđivanje skladištenog meda, za prehranjivanje legla pčela i proizvodnju mliječi. Neke pčele u zajednici su specijalizirane za skupljanje i donošenje vode. Fleksibilna termalna strategija omogućuje pčelama sakupljanje vode kod različitih okolišnih uvjeta. Pčele mogu kompenzirati ekstremni gubitak topline kad je hladno i spriječiti pregrijavanje u vedrim sunčanim danima kod visoke temperature okoliša (Kovac i sur., 2010).

Bolesti koje mogu ugroziti pčelinju zajednicu su: nozemoza (uzročnik praživotinja *Nosema apis*) koja napada probavni sustav pčela tako da smanjuje sposobnost pčela da probavljaju hranu, varooza (uzročnik parazit *Varroa jacobsoni*) i europska gnjiloća legla (uzročnik bakterija *Melissococcus pluton*) (Malone i Gatehouse, 1998; Relić, 2006; Flottum, 2006).

Tijekom sakupljanja, pčele posjete 50 do 100 cvjetova. Dva su izvora slatkih sokova iz kojih pčele proizvode med: nektar i medljika (medna rosa). Nektar je slatki sok koji izlučuje medonosno bilje iz posebnih žlijezda – nektarija. Med proizveden od nektara naziva se cvjetni med. Medljika (medna rosa) je slatki sok koji izlučuju razne vrste lisnih uši. Med proizveden od medljike naziva se med medljikovac (Bauer i sur., 1999; Taranov, 2006).

2.3. Vrste meda

Osnovne vrste meda: prema podrijetlu: cvjetni ili nektarni med i medljikovac ili medun. Te prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja: med u saću, med sa saćem ili med s dijelovima saća, cijedeni med, vrcani med, prešani med i filtrirani med (Pravilnik o medu, 2015).

Osim osnovnih vrsta, razlikujemo i pekarski med koji se koristi u industriji ili kao sastojak hrane koja se prerađuje. Može imati strani okus ili miris, biti u stanju vrenja ili prevrio, te može biti pregrijan (Pravilnik o medu, 2015).

Naziv «med» se može upotrebljavati za sve vrste osim za filtrirani med, med u saću, med sa saćem ili med s dijelovima saća i pekarski med. Kod pekarskog meda se navodi u blizini naziva proizvoda uputa «samo za kuhanje i pečenje» (Pravilnik o medu, 2015). Razlikuju se uniflorni i poliflorni med. Uniflorni med se može označiti prema određenoj biljnoj vrsti ako u netopljivom sedimentu sadrži najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste. Poliflorni med jest mješavina meda različitih biljnih vrsta (Pravilnik o izmjeni pravilnika o kakvoći uniflornog meda, 2013). Vrste uniflornih medova: pitomi kesten, uljana repica, facelija, lipa, bagrem, metvica, vriješak, vrisak, maslačak, ružmarin, kadulja, planika, agrumi, lavanda (Pravilnik o izmjeni pravilnika o kakvoći uniflornog meda, 2013).

2.3.1. Nektarni ili cvjetni med

Nektarni ili cvjetni med jest proizvod što ga pčele proizvode od nektara medonosnih biljaka različitih vrsta (lipa, bagrem, kadulja, livadno bilje i dr.), a može biti monoflorni ili poliflorni (Pravilnik o medu, 2015).

Nektar je slatka tekućina sa primjesom organskih i mineralnih tvari koje stvaraju cvjetne i druge žljezdane stanice biljaka. Nektar izlučuju oko tisuću vrsta raslinja (biljaka), koje se zajednički nazivaju medonosnim. Nektar luče posebne stanice sakupljene u strukturnim tkivima – nektarije, koje su pokrivene zajedničkim omotačem. Kod raznih vrsta biljaka nektarije imaju najrazličitije oblike: ravne, ispupčene, loptaste itd. U omotaču nektarija nalazi se mnoštvo otvora, kroz koje nektar izlazi van i sakuplja se u obliku prozirnih kapljica (Taranov, 2006).

Sladak okus nektara dolazi od šećera koje on sadrži (trščani, voćni i groždani šećer). Sadržaj šećera u nektaru nije isti kod svih biljaka i kreće se u granicama od 5 do 70%, a vode od 30 do 95%. Sadržaj šećera u nektaru ovisi o vrsti biljaka, o tlu i o klimatskim uvjetima gdje biljka raste (Relić, 2006).

Bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.) je rod listopadnog drveća i grmlja iz porodice *Leguminosae* koji sadrži 20 vrsta iz Sjeverne Amerike i Meksika. U Europu je prenesen 1600. godine. Bagrem može narasti u visinu do 20 m, deblo može imati u promjeru i do 1 m. Bagremu više odgovaraju predjeli s toplijom klimom, uglavnom gdje uspijeva hrast i vinova loza, jer je dosta osjetljiv prema jakim mrazovima. U našoj zemlji bagrem raste samoniklo po rubnim dijelovima svjetlijih šuma, ali se njime često pošumljavaju ogoljeli tereni odnosno mjesta kojim prijeti erozija tla. Sadnice bagrema rastu vrlo brzo, a korijen bagrema dobro učvršćuje tlo (Bauer i sur., 1999).

Bagrem spada u red najmedonosnijeg drveća u našoj zemlji. Vrijeme cvjetanja bagrema nije uvijek isto i ovisi o temperaturi, te sunčanim danima tijekom pozne zime i ranog proljeća. Ako su temperature zraka više i ako bude više sunčanih dana, bagrem će prije procvjetati. Na sunčanim mjestima, kraj velikih vodenih površina, bagrem prije procvjeta nego na sjenovitim mjestima ili dalje od velikih vodenih površina. Na vrijeme cvjetanja utječe i geografski položaj mjesta gdje se bagrem nalazi (Relić, 2006).

Prosječni prinosi meda po jednoj košnici na bagremovoj paši kod nas se kreću oko 20 kg, ali dobro pripremljena društva, u košnicama većeg volumena, mogu donijeti i više (Relić, 2006).



Slika 3. Bagrem stablo (Izvor slike: <http://opg.mturic.net>, 2012)



Slika 4. Pčela skuplja pelud bagrema (Izvor slike: <http://trailovic.com>, 2011)

Bagremov med ima svijetlu prozirnu boju, a u mladom djevičanskom saću, ako je bez drugih primjesa, skoro je bezbojan. Dugo ne kristalizira, pa je zbog toga i vrlo ugodnog okusa (Relić, 2006). Kristalizira se u sitno-zrnatu masu od bijele do zlatno-žućkaste boje. Karakterizira se odličnim okusom i nježnim finim mirisom (Taranov, 2006).

Preporučuje se kod nesаницe, za umirenje prenadraženog živčanog sustava (vrtoglavice, loš san, klimakterične smetnje, itd.). Naročito se preporučuje sa čajem od kamilice, matičnjaka ili gospine trave, jer se tako pojačava djelovanje djelotvornih tvari iz čaja i onih koje sadrži sam med (Bauer i sur., 1999; Flottum, 2006).

2.3.2. Medljikovac

Medljikovac ili medun jest med što ga proizvode pčele od medne rose (crnogorice ili bjelogorice). Medljikovac se od nektarnog meda razlučuje metodom električne vodljivosti koja mora biti veća od 0,8 mS/cm (mili Simensa po centimetru) (Pravilnik o medu, 2015).

Znači pored nektara, kojeg luče cvjetne i vancvjetne nektarije, pčele, u određenim uvjetima, sakupljaju i donose u košnicu slatku tekućinu, koja se pojavljuje na lišću nekih vrsta biljaka. Ponekad nju izlučuju sitni insekti (lisne uši, lisni savijači), koji parazitiraju na biljkama, a ponekad same biljke bez sudjelovanja insekata. Tekućina se u prvom slučaju naziva medljika, a u drugom medna rosa (Taranov, 2006).

Glavni tvorci medljike su lisne uši – sitni insekti, 3-6 mm dugi, koji se nalaze u većem broju sa donje strane listova. Postoji više od 600 vrsta lisnih uši, prilagođenih životu i

razmnožavanju na široko rasprostranjenom drveću i grmlju. Najčešće i u najvećoj mjeri medljika se stvara na bagremu, brezi, glogu, johi crvenoj, brijestu, grabu, hrastu, vrbi, divljem kestenu, pasjaku, lipi, jasiki, lješnjaku, divljoj ruži, oskoruši, boru, trnjini, topoli, divljoj trešnji. Ponekada se medljika stvara i na voćnom drveću (višnja, kruška, šljiva, jabuka) i na nekim travama (Taranov, 2006).

Medljiku izlučuju i lisni savijač. Od svih insekata najveći značaj za pčele imaju: kruškin i jabukin lisni savijač. Vrlo su pokretljivi i brzo se raseljuju po drveću (Taranov, 2006).

Medna rosa je slatkasta tekućina, koju luče biljke bez sudjelovanja insekata. Razlikuje se od medljike po tome što ne sadrži produkte raspadanja bjelančevina i drugih tvari životinjskog podrijetla (Taranov, 2006).

Med od medljike ili šumski med je svijetlosmeđe, smeđe i tamne boje. Svijetao med od medljike rijetko se susreće: takav med pčele sakupljaju samo u proljeće i u prvoj polovici ljeta. Ponekad med od medljike može biti tamnozeleno boje (npr. od lisnih uši sa hrasta) (Taranov, 2006).

Specifično obilježje meda od medljike je njegova ljepljivost, rastezljivost i odsutstvo mirisa meda, iako je med vrlo sladak, ali bez specifičnog okusa nektarnog meda. Neki medovi odlikuju se svojevrsnim okusom, koji podsjeća na slad (Taranov, 2006).

Medljikovac ili medun se kristalizira u sitno-zrnastu sapunastu masu, ponekad s većim talogom tekuće frakcije. Odlikuje se većom hidroskopnošću nego nektarni, i brže se ukiseli, osobito poslije vrcanja iz nepoklopljenih stanica (Taranov, 2006).

Ima izrazita ljekovita svojstva i koristi se u liječenju slabokrvnosti jer sadrži željezo i minerale (Fanuko, 2009) koji pomažu njegovoj apsorpciji i djelovanju propisanih lijekova (bakar, kobalt, mangan, folna kiselina i dr.). Preporučuje se trudnicama, rekonvalescentima nakon operacija, dojiljama, te kod iscrpljenosti i umora (Bauer i sur., 1999; Flottum, 2006).

Kemijski sastav meda od medljike je vrlo raznovrstan i ovisi o vrsti insekata koji izlučuju medljiku, o vrsti biljaka, o vremenu sakupljanja medljike od strane pčela, meteoroloških uvjeta i o mikroflori, koja se razvija u medljici do njenog skupljanja od strane pčela. Med od

medljike ima manje invertiranih šećera (monosaharida), znatno više disaharida (šećera, koji pčele nisu preradile) i organskih kiselina. U njemu je tri puta više dekstrina, puno mineralnih tvari, osobito alkalnih metala – soli kalija i natrija (Taranov, 2006).

2.4. Kemijski sastav meda

Med kao prirodan proizvod je visoko koncentrirana otopina složenog sastava uglavnom od ugljikohidrata te malih količina komponenti kao što su: minerali, proteini, vitamini, organske kiseline, flavonoidi, fenolna kiselina, enzimi i fitokemikalije. Mnogi autori pokazuju da med kao izvor prirodnih antioksidanasa djeluje pozitivno na smanjenje rizika od srčanih bolesti, raka, pada imunološkog sustava, katarakta, različitih upalnih procesa i dr. (Bertoncelj i sur., 2007).

Osnovnu masu meda čine u vodi topljivi šećeri – glukoza (groždani šećer) i fruktoza (voćni šećer). Topivost ovih šećera kreće se od 16 do 22% (u prosjeku 19%) težine meda. Ako se izdvoji voda, šećer onda čini oko 95% suhe tvari. Na udio ostalih tvari, a njih je pronađeno više od 50, dolazi oko 5% (Taranov, 2006).

Vode u medu ima 16-20%, dok šećeri čine 78-80%. Sadržaj monosaharida je: fruktoza 38%, glukoza 31%, dok disaharida ima: maltoze 7%, saharoze 1-2%, a ostalih šećera 1-2%. Lipidi u medu su identificirani kao gliceridi masnih kiselina (palmitinske, oleinske i linolenske). Dušikovi spojevi čine 1%, slobodne organske kiseline 0,3%, mineralni elementi 0,2%, od kojih su prisutni: natrij, kalcij, magnezij, kobalt, nikel, cink, fosfati, sulfati i dr. Vitamini prisutni u medu su: tiamin, riboflavin, vitamin B3, pantotenska kiselina, vitamin B6, vitamin C, vitamin A, folna kiselina, vitamin D, vitamin K, biotin. Enzimi u medu su: amilaze α i β , glukoinvertaze i glukooksidaze. Ostale supstance koje se nalaze u medu su: bakteriostatske tvari (antibiotici), hormonalni čimbenici (na principu estrogena), aromatične tvari koje na specifičan način određuju botaničku i geografsku vrstu meda, pigmenti koji daju boju (Tablica 1) (Bauer i sur., 1999; National Honey Board, 2006).

Tablica 1.: Prosječni kemijski sastav meda (National Honey Board, 2006)

SASTOJAK	JEDNA ČAJNA ŽLICA MEDA (21 g)	VRIJEDNOST NA 100 g
UKUPNI UGLJIKOHIDRATI	17,300 g	82,400 g
fruktoza	8,100 g	38,500 g
glukoza	6,500 g	31,000 g
maltoza	1,500 g	7,200 g
VITAMINI		
tiamin B1	< 0,002 mg	< 0,010 mg
riboflavin B2	< 0,060 mg	< 0,300 mg
niacin B3	< 0,060 mg	< 0,300 mg
pantotenska kiselina B5	< 0,050 mg	< 0,250 mg
vitamin C	0,100 mg	0,500 mg
vitamin A	0	0
vitamin D	0	0
vitamin E	0	0
MINERALNE TVARI		
kalij	11,000 mg	50,000 mg
fosfor	1,000 mg	5,000 mg
kalcij	1,000 mg	4,800 mg
natrij	0,600 mg	2,850 mg
magnezij	0,400 mg	2,000 mg
željezo	0,050 mg	0,250 mg
cink	0,030 mg	0,150 mg
mangan	0,030 mg	0,150 mg
bakar	0,010 mg	0,050 mg
krom	0,005 mg	0,020 mg
selen	0,002 mg	0,010 mg
OSTALO		
voda	3,600 g	17,100 g
ukupne masti	0	0
proteini	0,150 mg	0,700 mg
dijetalna vlakna	0	0
kolesterol	0	0
pepeo	0,040 g	0,200 g

2.4.1. Voda

Sadržaj vode ima važnu ulogu kod ocjenjivanja kvalitete meda. Sadržaj vode ovisi o botaničkom podrijetlu meda, atmosferskim uvjetima, sezoni proizvodnje, ljudskom rukovanju i uvjetima skladištenja. Zreo med sadrži 14 do 21% vode. Ako se u medu nalazi više vode, to znači da prerada nektara u med nije završena, te da nektar nije držan u pčelinjem gnijezdu do

kraja zrenja. Nezreo med lako se kvari zbog spontanog vrenja, a njegova antimikrobna svojstva su slabije izražena. U krivotvorenju meda, voda je najčešći sastojak. Voda je najvažniji sastojak koji utječe na dielektrična svojstva materijala (Guo i sur., 2010; Taranov, 2006).

Kvaliteta meda ovisi o prisutnoj količini vode, a svojstva meda ovise o: gustoći, viskoznosti, koeficijentu loma svjetlosti i toplinskoj provodnosti (Abramović i sur., 2008; Guo i sur., 2010; Zamora i sur., 2006).

U industriji meda je pokazano da je voda ključni faktor u kvarenju. Zapravo aktivitet vode (a_w) je pokazatelj u hrani koji kontrolira rast mikroorganizama. Granični aktivitet vode za rast osmotolerantnih kvasaca (prirodno nađenih u medu) je $a_w=0,61/0,62$ (Zamora i sur, 2006).

Prema Pravilniku u medu može biti najviše 20% vode. Med od vrijeska (*Calluna vulgaris*) i pekarski med općenito mogu imati najviše 23% vode, dok pekarski med od vrijeska (*Calluna vulgaris*) može imati najviše 25% vode (Pravilnik o medu, 2015).

2.4.2. Ugljikohidrati

Med se uglavnom sastoji od različitih šećera, pretežno fruktoze i glukoze, kao i drugih tvari kao što su organske kiseline, enzimi i krute čestice koje dospijevaju u med tijekom njegova nastajanja. Boja meda može varirati od gotovo bezbojne do tamnosmeđe. Med može biti tekuće ili viskozne konzistencije, djelomično ili potpuno kristaliziran. Aroma može varirati, ali mora potjecati od izvornog bilja (Pravilnik o medu, 2015).

Med se većinom sastoji od monosaharida: glukoze i fruktoze. Stvarni omjer glukoze i fruktoze u pojedinim vrstama meda većinom ovisi o izvoru nektara. Prosječan omjer fruktoze prema glukozi je 1,2:1. Saharoza čini oko 1% suhe tvari meda, to se može povećati ako pčelari hrane pčele sa šećerom tijekom proljeća. Osim glavnih monosaharida (glukoze i fruktoze) u medu je nađeno 25 oligosaharida (disaharidi, trisaharidi, tertasaharidi). Med je izrazito varijabilna i kompleksna mješavina ugljikohidrata i drugih komponenti (Anklam, 1998).

Glukoza čini 31-38% šećera u medu. Ona se brže kristalizira nego ostali šećeri. Na fruktozu dolazi 38-43% svih šećera meda. Fruktoza se, za razliku od glukoze, sporo kristalizira i više je hidroskopna, nego ostali šećeri. U malim količinama med sadrži i maltozu, rafinozu i melibozu. Med sadrži i do 2% saharoze. Ovaj šećer spada u grupu disaharida. On se pod utjecajem enzima invertaze razgrađuje na jednake dijelove glukoze i fruktoze. Saharozu u medu – to su ostaci nerazgrađenog šećera nektara. Tek sakupljeni, još nepoklopljeni med u stanicama, tj. do kraja neprerađeni nektar, može imati do 6% saharoze. Ali u poklopljenim stanicama proces inverzije se produžava i zbog toga saharoze u zreloom medu praktički i nema. U sastav meda ulaze i složeni ugljikohidrati – dekstrin – produkti nepotpunog razlaganja škroba. Njihova ukupna količina najčešće doseže 1-4%, no u pojedinim slučajevima može doseći i 12%. Dekstrini su topljivi u vodi i sprečavaju kristalizaciju meda. Oni su otkriveni i u hrani koju su pčele pripremile od čistog šećera kojim su prihranjivane, što ukazuje na sposobnost pčela da sintetiziraju dekstrin pod djelovanjem enzima prednjeg dijela probavnog trakta (Taranov, 2006).

Hidroksimetilfurfural (HMF) je ciklički aldehid koji nastaje razgradnjom ugljikohidrata. Prisutnost jednostavnih ugljikohidrata (glukoze i fruktoze) i puno kiselina u medu pogoduju nastanku ovog spoja. HMF i istovrsni spojevi spontano nastaju Maillardovim reakcijama (neenzimsko posmeđivanje) u hrani bogatoj ugljikohidratima ili kiselinskom dehidracijom heksoza. HMF-a nema u svježoj hrani, a nastaje ili toplinskom obradom hrane ili tijekom dugog skladištenja hrane. Nekoliko faktora utječe na nastanak HMF-a u medu koji je skladišten: upotreba metalnih kontejnera i fizikalno-kemijski sastav samog meda. Komisija Codex Alimentarius (CAC) je odredila da koncentracija HMF-a u medu nakon prerade i miješanja ne smije biti viša od 80 mg/kg. Prema EU Direktivi, limit je 40 mg/kg s izuzecima od 80 mg/kg za med iz tropskih krajeva, te 15 mg/kg za med s niskom razinom enzima. Međunarodna komisija za med propisuje tri metode za određivanje HMF-a. Dvije metode su spektrofotometrijske i temelje se na protokolima određenim prema Winkleru i Whiteu, te se koriste u rutinskim analizama. Treća metoda je kromatografska (HPLC) (Ajloune, 2010). HMF je indikator svježine i pregrijavanja meda (Bogdanov i sur., 2001; Escriche i sur., 2009). Znači, HMF-a, općenito, osim pekarskog meda može biti najviše 40 mg/kg. Dok medovi s označenim podrijetlom iz regija tropske klime i mješavine takvih medova, mogu imati najviše 80 mg/kg HMF-a (Pravilnik o medu, 2015).

Istraživanje sastava ugljikohidrata u uniflornom medu u Španjolskoj raznim statističkim metodama pokušali su naći vezu između cvjetnog izvora i šećernog sastava; nekoliko

ugljikohidrata je nađeno koji bi mogli biti karakteristični za najvažnije vrste meda, iako njihova koncentracija ne omogućuje jasnu klasifikaciju glavnih uniflornih izvora (Castro i sur., 2011).

Prema Pravilniku zbroj glukoze i fruktoze u cvjetnom medu mora biti najmanje 60 g/100 g meda, a u medljikovcu najmanje 45 g/100 g. Općenito, saharoze u medu može biti najviše 5%. Bagrem (*Robinia pseudoacacia*), lucerna (*Medicago sativa*), *Banksia menziesii*, slatkovina (*Hedysarum* spp.), eukaliptus (*Eucalyptus camadulensis*), *Eucryphia lucida*, *Eucryphia milligani*« agrumi (*Citrus* spp.) najviše 10%, a lavanda (*Lavandula* spp.) i boražina (*Borago officinalis*) mogu imati najviše 15 g saharoze na 100 g meda (Pravilnik o medu, 2015).

2.4.3. Proteini

Bjelančevinastih tvari (koje sadrže dušik) u medu je malo, od 0,1 do 1,5% (u prosjeku 0,4-0,6%), ali sve one spadaju u bjelančevine lako topljive u vodi i lako se upijaju u crijevima. Njihov postanak je dvojak: dio dopijeva iz nektara i spada u biljne bjelančevine, drugi dio dopijeva zajedno sa sekretom žlijezda prednjeg dijela crijeva i spada u životinjske bjelančevine. Pored toga, med sadrži još i dušične nebjelančevinaste tvari (amide) i neke aminokiseline (Taranov, 2006).

Proteini i aminokiseline u medu su također i animalnog i biljnog podrijetla. Aminokiseline čine 1%, a prolin kao glavni predstavnik zauzima 50-85% ukupnih aminokiselina. Osim prolina nađeno je 26 aminokiselina u medu čija količina ovisi o porijeklu meda (nektar ili medljika). Kako je pelud glavni izvor aminokiselina u medu, sastav aminokiselina u medu može biti karakterističan s obzirom na botanički izvor (Hermosín i sur., 2003).

Dokazano je istraživanjima u Južnoj Africi da neke aminokiseline također sadrže antioksidacijska svojstva. Udio prolina varira kod različitih vrsta meda, također je mjera razine ukupno prisutnih aminokiselina. Može također poslužiti kao dodatni pokazatelj kvalitete i u nekim slučajevima i kriterij za zrelost meda kao i da li je krivotvoren (Meda i sur., 2005).

Dušični sastav meda je nizak i varira, iznosi 0,04% (40 mg u 100 g meda sa visokom standardnom devijacijom). Oko 33-55% može se izgubiti ultrafiltracijom. Prolin je aminokiselina koja dominira u medu. Med sadrži oko 0,2% proteina koji potječu od pčela i biljaka. To uključuje pčelinju α -amilazu i druge enzime (Anklam, 1998).

U 31 uzorku meda u Španjolskoj različitog porijekla (eukaliptus, lavanda, ružmarin, cvijet naranče, majčina dušica) pronađene su aminokiseline: prolin, fenilalanin, tirozin i lizin, zatim arginin, glutaminska kiselina, histidin i valin (Hermosín i sur., 2003).

Prolina u medu mora biti minimalno 180 mg/kg meda prema zahtjevima standarda propisanog od strane CAC-a (Bogdanov i sur., 2001).

Udio proteina u medu je općenito manji od 0,5%. Malu frakciju proteina čine enzimi: invertaza, dijastaza, glukoza-oksidaža i katalaza (Anklam, 1998; Rhee i sur., 2008).

2.4.4. Enzimi

Med sadrži malu količinu enzima od kojih su najvažniji dijastaza (α -amilaza), invertaza (α -glukozidaža), glukoza-oksidaža, katalaza i kisela fosfataza (Tablica 2) (National Honey Board, 2006).

Dijastaza razgrađuje škrob na dekstrine i maltozu. Invertaza razgrađuje saharozu na glukozu i fruktozu. Enzimi, kao jedan od sastojaka hrane su dosta istraživani tijekom godina. Primarno mogu poslužiti kao sredstvo razlikovanja između prirodnog i krivotvorenog meda. Dijastaza i invertaza su pokazatelji svježine meda. Njihova vrijednost pada u starim ili termičkim tretiranim medovima (Anklam, 1998; Rhee i sur., 2008).

Aktivnost dijastaze se određuje po dijastaznom broju, tj. količini mililitara 1%-tne otopine škroba, razgrađenog za 1 sat dijastazom u 1 g meda. Veličina dijastaznog broja ovisi o sastavu i vrsti biljke iz čijeg je nektara dobiven med, zemljišnim i klimatskim uvjetima, vremenu, intenzivnosti lučenja nektara, snazi zajednice i dr. (Taranov, 2006). Aktivnost dijastaze je povezana sa zagrijavanjem. Ova aktivnost je samo indikator da li su uzorci meda podvrgnuti zagrijavanju, a ne može se njome detektirati da li je krivotvoren sastav meda (Anklam, 1998).

Ispitivanjem meda pokazalo se da korištenjem MF i UF membrana u Indiji može dobiti med obogaćen enzimima (Subramanian i sur., 2003).

U manjim količinama med sadrži: proteazu, lipazu, glukogenazu, kiselu fosfatazu, peroksidazu, reduktazu, askorbinotoksidazu, fosfolipazu, inulazu, bjelančevine, masti, a također razne prijelazne tvari, koje se formiraju u stanicama tijela (Taranov, 2006).

Ispitivanja u medovima u Koreji koji su proizvele pčele *Apis cerana* i *Apis mellifera* dobiveni su proteini koji se razlikuju po površinskoj strukturi. Također su važna ispitivanja na enzimima i to na α -amilazi i α -glukozidazi, koje su izvorno iz izlučevina žlijezda slinovnica pčela. Mnoge studije su fokusirane na različite enzime prisutne u medu kao i na utjecaj temperature na enzimsku aktivnost (Rhee i sur., 2009).

Tablica 2. Pregled enzima u medu (National Honey Board, 2006)

TRIVIJALAN NAZIV ENZIMA	KEMIJSKI NAZIV ENZIMA	REAKCIJA KOJU ENZIM KATALIZIRA
dijastaza, amilaza	α - i β -amilaza	razgrađuje škrob na jednostavnije ugljikohidrate (dekstrine, oligo-, di- i monosaharide)
invertaza, saharaza	α -glukozidaza	razgrađuje saharozu na glukozu i fruktozu (invertni šećer)
glukoza–oksidaza	spada u grupu peroksidaza	razgrađuje glukozu u glukonolakton
katalaza	spada u grupu oksidoreduktaza	razgrađuje peroksid na vodu i kisik
kisela fosfataza		uklanja fosfatnu skupinu iz organskih fosfata
proteaze	podskupina protein hidrolaza	hidroliziraju proteine i polipeptide na manje peptide
esteraza	spada u grupu hidrolaza	razgrađuje estersku vezu
β -glukozidaza		prevodi β -glukane u oligosaharide i glukozu

Aktivnost invertaze u medu mora biti veća od 4,0 IN prema zahtjevima standarda od strane CAC-a (1981) (Bogdanov i sur., 2001).

2.4.5. Kiseline

U medu se nalaze kiseline (do 0,43%), dosta različite po sastavu. Najviše je organskih kiselina, među njima je osnovna glukonska kiselina. U medu su otkrivene: mliječna, vinska, oksalna, jabučna, limunska, octena, mravlja, a također glutaminska i asparaginska kiselina (posljednju smatraju antikristalizatorom šećera). U medu se od neorganskih kiselina nalaze fosforna i solna kiselina (Taranov, 2006).

Glukonska kiselina dobiva se razgradnjom glukoze, a reakciju katalizira glukoza-oksidaza. Organske kiseline su značajne jer su u interakciji s drugim okusima meda. Glukonska kiselina pojačava okus meda. U medu se nalaze još alifatske i aromatske kiseline. Aromatske kiseline utječu na okus meda, a njihov sastav nam pokazuje botaničko porijeklo meda (National Honey Board, 2006).

Vrijednost pH meda je oko 3,9 (u rasponu od 3,4 do 6,1). Nizak pH meda sprječava prisutnost i rast mikroorganizama. Nizak pH med čini kompatibilnim s mnogim prehrambenim proizvodima (u pogledu kiselina i pH vrijednosti). U uniflornim medovima, kiseline utječu na okus i aromu (National Honey Board, 2006).

2.4.6. Mineralne tvari

Udio mineralnih tvari varira od 0,04% kod svijetlih medova do 0,2% kod tamnih medova. Ovisi o tlu gdje je rasla biljka s koje su pčele skupljale nektar i pelud. Mineralni sastav u uzorcima meda može biti pokazatelj zagađenja okoliša, ali i geografskog podrijetla meda. Mineralne tvari nađene u medu u istraživanju u Španjolskoj su: natrij, kalij, kalcij, magnezij, bakar, željezo, mangan, fosfor (fosfati), sumpor (sulfati) (Anklam, 1998).

Mineralne tvari meda su vrlo raznovrsne (otkriveno je 37 elemenata: mnogo kalija, natrija, kalcija, magnezija, željeza, fosfora), mada čine samo 0,27% suhe tvari. Od osnovnih

mikroelemenata jedan gram meda sadrži 9,7 µg željeza, 4,2 µg mangana, 0,8 µg bakra, 0,15 µg kobalta. Količina ovih supstanci jako varira u ovisnosti o vrsti biljaka, s kojih je nektar sakupljen. Zanimljivo je, da je mineralni sastav meda vrlo sličan mineralnom sastavu čovječje krvi (Taranov, 2006).

Kemijski sastav meda varira ovisno o okolišu koji ga okružuje (većinom zagađenje biljaka i tla), što se onda reflektira na nutritivnu vrijednost meda. U Egiptu su ispitivanja različitih vrsta medova pokazala da je u tim medovima povećan udio kadmija, klora, kobalta, željeza, kalija, magnezija, mangana, natrija i olova, tako da med kao bioindikator može pokazati postoji li zagađenje određenim toksičnim metalima (Rashed i Soltan, 2004).

Istraživanje u 14 grčkih regija je pokušalo dokazati autentičnost meda od bora, timijana, jele i narančinog cvijeta i fizikalnokemijskim i kemometrijskim analizama (Karabagias i sur., 2014).

2.4.7. Vitamini

Vitamina u medu nema puno, ali se oni nalaze u kombinaciji s drugim, za organizam važnim tvarima, i ovo povećava njihovu vrijednost. U 1 g meda je 30 µg limunske kiseline, 10 µg tokoferola, 4-pantotenske kiseline, 3,8 µg biotina, 3,1 µg niacina, 3 µg piridoksina i dr. (Taranov, 2006).

Starenje, uvjeti tijekom skladištenja i prerada hrane uzrokuju gubitak vitamina. Količina izgubljenih vitamina ovisi o vrsti hrane i nekoliko specifičnih parametara (temperaturi, kisiku, svjetlosti, vlazi i pH vrijednosti). Kod meda se smanjuje količina vitamina jer se filtracijom (u komercijalne svrhe) uklanja gotovo sva pelud. Čimbenik koji također uzrokuje gubitak vitamina u medu je oksidacija askorbinske kiseline do koje dolazi zbog prisutstva vodikovog peroksida u reakciji koju katalizira glukoza-oksidaza. Za određivanje vitamina u medu koriste se ili mikrobiološke metode, ili se koriste pojedinačne metode za otkrivanje nekog određenog vitamina. Na primjer: koncentracija askorbinske kiseline određuje se kromatografskim i titrimetrijskim metodama, a riboflavin se određuje pomoću tekućinske kromatografije (Subramanian i sur., 2003; Beuchat i sur., 2001).

2.5. Fizikalna svojstva

U fizikalna svojstva meda spadaju higroskopnost, kristalizacija, električna provodnost, specifična kutna rotacija, viskoznost, specifična masa i indeks refrakcije. Fizikalna svojstva meda ovise o njegovom kemijskom sastavu.

2.5.1. Higroskopnost

Higroskopnost je od velikog značenja i za pčelare i za potrošače meda. Čuvanjem meda u vlažnim prostorijama dolazi do povećanja količine vode u medu, a kao posljedica med postaje podložan fermentaciji pod utjecajem kvasaca. U prisutstvu zraka, med privlači ili otpušta vlagu. Ako je relativna vlažnost zraka 58%, u medu se nalazi oko 17,4% vode. Time je uspostavljena ravnoteža između vlage u zraku i količine vode u medu. Prema tome, čim se vlažnost zraka poveća, povećat će se i postotak vode u medu, i to prvo u površinskom dijelu posude u kojoj je med smješten. Obrnuto, ukoliko je vlažnost zraka manja, med će otpuštati vlagu. To znači da postoji uvijek težnja uspostavljanja ravnoteže (Kulinčević, 2008).

2.5.2. Kristalizacija

Kristalizacija ovisi o kemijskom sastavu meda. Med koji u svom sastavu sadrži glukozu prije će kristalizirati od meda u kojem prevladava fruktoza. Znači, što je veći postotak glukoze u medu, prije će doći do kristalizacije. Na kristalizaciju utječe i temperatura. Med se na temperaturi između 10 i 20°C najbrže kristalizira, dok se na temperaturi preko 27°C teško kristalizira, a neki se općenito ne kristalizira. Kristalizaciju ubrzava postojanje čestica kristala u medu (Relić, 2006).

2.5.3. Električna provodnost

Električna provodnost meda je vrlo mala, a povećava se porastom udjela vode i mineralnih tvari u medu. Električnu struju u medu provode disocirane kiseline i minerali u ionskom obliku. Znači električna provodnost ovisi o mineralnim tvarima, organskim kiselinama i

količini proteina u medu. Mineralne tvari se unose u med prvenstveno pomoću peludi, pa njihov sastav ovisi o dominantnoj peludi. Stoga se, provodnost često koristi kao parametar za rutinsku kontrolu kvalitete meda i smatra valjanim kriterijem u određivanju botaničkog podrijetla meda. Provodnost se koristi i kao parametar za razlikovanje nektarnog meda od medljikovca (Lazarević i sur., 2012).

2.5.4. Specifična kutna rotacija

Specifična kutna rotacija ovisi o vrsti i udjelima šećera u medu. Zbog većeg masenog udjela fruktoze, cvjetni med zakreće ravninu polarizirane svjetlosti ulijevo i ima negativnu rotaciju. Oligosaharidi (uglavnom melezitoza i erloza) zakreću ravninu polarizirane svjetlosti udesno i imaju pozitivnu rotaciju. Mjerenje rotacije se koristi za razlikovanje medljikovca od nektarnog meda. Polarizirana svjetlost kod nektarnog meda skreće ulijevo, a kod medljikovca udesno. To je pouzdan način da se otkrije prisutstvo medljike u nektarnom medu (Kulinčević, 2008).

2.5.5. Viskoznost

Viskoznost je mjera za trenje fluida. Ovisi o temperaturi, sadržaju vlage i cvjetnom podrijetlu. Viskozitet naglo pada porastom temperature meda. Vlaga od 1% ima isti učinak na viskoznost kao i porast temperature od 3,5°C (Kulinčević, 2008; National Honey Board, 2006).

2.5.6. Specifična masa

Specifična masa je masa meda u određenoj jedinici volumena. Ovisi o temperaturi i količini vode. Hidrometar služi za mjerenje specifične mase. Medove različitog podrijetla ili iz različitih šarža treba dobro promiješati kako bi se izbjeglo raslojavanje (Kulinčević, 2008; National Honey Board, 2006).

2.5.7. Indeks refrakcije

Indeks refrakcije je postotak vode u medu određen pomoću refraktometra. Služi za određivanje vlažnosti ili udjela topljive suhe tvari (Kulinčević, 2008).

2.6. Senzorska svojstva

U senzorska svojstva meda se ubrajaju boja, okus i miris.

Boja je rezultat sposobnosti meda da apsorbira svjetlost različite svjetlosne duljine. Ta je osobina značajna u prodaji meda jer su potrošači u određenim regijama naviknuti na određenu vrstu meda sa specifičnom bojom, pa nju i traže. U velikim proizvođačkim i potrošačkim zemljama, ako što su SAD i neke druge, med se obavezno tipizira da bi se dobila ustaljena i željena boja. Med može biti skoro bezbojan, pa do zatvoreno crvene i potpuno tamne boje (Kulinčević, 2008). Obojene tvari daju medu boju: od jantarno zlatne do smeđe ili tamne (Taranov, 2006).

Miris biljaka s kojih je sakupljen nektar prenosi se na med. U sastavu raznih medova otkriveno je 120 tvari koje stvaraju njegov miris: hlapljive tvari kao što su karbonilni spojevi (aldehidi i ketoni), alkoholi i esteri (Taranov, 2006).

Okus medu daju kisele i gorke note okusa. Med je 1-1,5 puta slađi od konzumnog šećera (saharoze) zato što fruktoza dominira u medu (Taranov, 2006). Fitokemikalije se smatraju vrlo važnim parametrom u okusu meda i organoleptičke kvalitete. Osim tih komponenti, također i ugljikohidrati, aromatski aldehidi, aromatske karboksilne kiseline i esteri te karotenoidi u različitim cvjetnim medovima su u korelaciji sa kvalitetom okusa i botaničkog porijekla (Jiang i sur., 2004).

2.7. Prehrambena vrijednost meda

Kap meda sadrži više od sto važnih sastojaka za organizam. Med je bogat prirodnim jednostavnim šećerima, a sadrži i tragove mineralnih tvari, vitamina B skupine,

aminokiseline, te aromatične prirodne supstancije, dragocjene enzime i granule peluda (Vranešić Bender, 2011).

Antimikrobna i antivirusna aktivnost meda dokazana je znanstvenim istraživanjima, a smatra se da su za nju zaslužne brojne tvari koje ovise o botaničkom porijeklu meda. Također, niska aktivnost vode inhibira rast bakterija što dodatno pridonosi antibakterijskom učinku (Zamora i sur., 2006).

Pronađena je značajna korelacija između antioksidativne aktivnosti i udjela polifenola u medu. Dokazano je i antimutageno i antitumorsko djelovanje meda, a protuupalni učinci meda dokazani su u studijama na ljudima pri korištenoj dozi od 70 g dnevno. Također tamniji medovi imaju veću količinu antioksidanasa nego svjetliji medovi. Antimikrobna aktivnost meda je povezana sa vodikovim peroksidom, dobivenim u reakciji koju katalizira glukoza-oksidaza, i fenolnim komponentama, iako inhibicija mikroorganizama uz pomoć navedenih komponenti varira ovisno o botaničkom porijeklu nektara. U studiji u Americi su dobiveni rezultati da je inhibicija rasta *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* u 25% uzoraka otopine meda reducirana tretiranjem s katalazom, te da je vodikov peroksid pridonosi antimikrobnoj aktivnosti (Beuchat i sur., 2001).

Mnogi autori pokazuju da med služi kao izvor prirodnih antioksidanasa koji pozitivno djeluju na smanjenje rizika od srčanih bolesti, raka, opadanja imunološkog sustava, katarakta, raznih upalnih procesa i dr. Komponente meda odgovorne za antioksidativnu aktivnost su: flavonoidi (krizin, pinocembrin, pinobanksin, kvercetin, kampferol, luteolin, galangin, apigenin, hesperetin, miricetin), fenolne kiseline (kafeinska, kumarinska, ferulinska, elaginska, klorogenska), askorbinska kiselina, katalaza, peroksidaza, karotenoidi i produkti Maillardovih reakcija (Bertoncelj i sur., 2007).

Med se preporučuje u prehrani trudnica i dojilja jer djeluje antianemično, za djecu u razvoju je bitan jer djeluje antirahitično, a kod odraslih zato što sadrži vrijedne sastojke za život. Kod upale sluznice usta, zubnog mesa i grla, med ima blagotvorno djelovanje, jer zbog svoga sastava olakšava upalne procese na sluznici. Med djeluje i blago laksativno, poboljšava probavu, te uz prisutnost organskih kiselina djeluje povoljno na crijevnu floru (Bauer i sur., 1999).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Ispitivanja su provedena na 28 uzoraka bagremovog meda (*Robinia Pseudoacacia* L.) s područja Republike Hrvatske, točnije iz Krapinsko-zagorske županije iz 2008. godine.

Na svim uzorcima su određivani sljedeći fizikalno-kemijski parametri: količina prolina, udio 5-hidroksimetilfurfurala (HMF-a) i aktivnost invertaze.

3.1.1. Kemikalije

Prilikom određivanja navedenih fizikalno-kemijskih parametara meda korišteni su sljedeći reagensi: mravlja kiselina (HCOOH, 98-100%-tna, Scharlau Chemie, S.A., Španjolska), ninhidrin (C₃H₆O₄, Sigma-Aldrich, Njemačka), etilen-glikol-monometil-eter (CH₃OCH₂OH, Merck KGaA, Njemačka), prolin (C₅H₉NO₂, Sigma-Aldrich, Njemačka), propan-2-ol (C₃H₈O, Panreac, Španjolska), p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (Sigma-Aldrich, Njemačka), kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄, Kemika, Hrvatska), natrijev hidrogenfosfat dihidrat, (Na₂HPO₄×2H₂O, Gram-mol d.o.o., Hrvatska), (2-Amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol) ((HOCH₂)₂C(NH₂)CH₃, Kemika, Hrvatska), p-toluidin (NC₁=CC=C(C)C=C₁, Across organics, Belgija), ledena octena kiselina (CH₃COOH, Alkaloid Skopje, Makedonija), barbiturna kiselina (C₄H₄N₂O₃, Kemika, Hrvatska), kalij-heksacijanoferat(II)-3-hidrat (K₄Fe(CN)₆×3H₂O, Kemika, Hrvatska), cinkov acetat (Zn(CH₃COO)×2H₂O, Kemika, Hrvatska), etanol (C₂H₆O, Gram-mol d.o.o., Hrvatska).

Sve kemikalije korištene u ovom radu bile su p.a., a za pripravu otopina korištena je destilirana voda.

3.1.2. Laboratorijsko posuđe i pribor

Laboratorijsko posuđe korišteno u analizi mora biti čisto, dobro oprano i sterilizirano (suha sterilizacija). Nečisto posuđe može utjecati na krajnju analizu što može rezultirati pogrešnim

rezultatom. Prilikom istraživanja korišteno je sljedeće posuđe i pribor: epruvete (180 × 16 mm), Erlenmeyerove tikvice od 25, 50 i 100 mL, staklene pipete od 5 i 10 mL.

3.1.3. Laboratorijski uređaji (oprema)

U istraživanju su korišteni ovi uređaji: plamenik (Bunsen, TLOS, Zagreb), spektrofotometar (SP6-500 UV, Pye Unicomb, Zagreb), sušionik sa ventilatorom (Instrumentaria, Zagreb), hladnjak (Gorenje tip HDVS 153), vodena kupelj (INKO, Zagreb), tehnička vaga (JK 180, Mikrotehna, Zagreb).

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema uzoraka za analizu

Ovisno o konzistenciji meda, uzorci za analizu pripremaju se na razne načine. Ako je med u tekućem stanju, prije početka analize polako se izmiješa štapićem ili se protrese. Ako je med granuliran, zatvorena posuda s uzorkom stavi se u vodenu kupelj i zagrijava 30 minuta na temperaturi od 60°C, a prema potrebi i na temperaturi od 65°C. U toku zagrijavanja može se promiješati štapićem ili kružno protresti, a zatim brzo prohladiti. Ako se određuje dijastaza ili hidrosimetilfurfural, med se ne zagrijava. Ako med sadržava strane tvari, ako što su vosak, dijelovi pčela ili dijelovi saća, uzorak se zagrijava u vodenoj kupelji na temperaturi od 40°C, a zatim procijedi kroz tkaninu, koja se stavlja na ljepilo zagrijavano toplom vodom. Ako je med u saću, saće se otvori, procijedi kroz žičano sito s kvadratnim otvorima promjera 0,5 mm x 0,5 mm. Ako dio saća i voska prođe kroz sito, uzorak se zagrijava u vodenoj kupelji na temperaturi od 60°C, a prema potrebi zagrijava se 30 minuta i na temperaturi od 65°C. Za vrijeme zagrijavanja promiješa se štapićem ili protrese kružnim pokretima, a zatim brzo prohladi. Ako je med u saću granuliran, zagrijava se da bi se vosak otopio, promiješa se i ohladi. Nakon hlađenja vosak se odstrani (IHC, 2009).

3.2.2. Određivanje količine prolina

Ova metoda se može koristiti za sve uzorke meda. Količina prolina je indikator kvalitete meda, ali i pogoršanja kvalitete ukoliko padne ispod određene vrijednosti.

Količina prolina se definira kao boja koja se razvije dodatkom ninhidrina, a uspoređuje se sa standardnom otopinom prolina i izražava kao masena proporcija meda u mg/kg.

Prolin i ninhidrin stvaraju obojeni kompleks. Nakon dodavanja 2-propanola mjeri se apsorbancija otopine uzoraka i referentne otopine pri maksimalnoj valnoj duljini. Količina prolina se određuje iz omjera. Ova metoda se bazira na Oughovoj metodi.

Reagensi su: destilirana voda, mravlja kiselina ((HCOOH), 98-100%-tna), otopina ninhidrina u etilenglikol-monometil-eteru (3%-tna), standardna otopina prolina, temeljna otopina prolina u vodi 40 mg / 50 mL vode i 50%-tna otopina propan-2-ola u vodi.

Postupak se izvodi tako da se prvo odvaži 5,0 g uzorka (meda od bagrema) u plastičnu čašu. Dodaje se 50 mL destilirane vode, te se na taj način med otopi. Dobivena otopina meda, mliječno bijele boje, se preko lijevka prenese u tikvicu od 100 mL. Tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake na samoj tikvici. Tikvica se dobro protrese. Uslijed protresanja, boja otopine meda promijenila se u smečkastu. Pipetom se iz tikvice uzima 0,5 mL uzorka, te se prenese u epruvetu I. Zatim se u tu istu epruvetu dodaje 1 mL mravlje kiseline koja je bezbojna i 1 mL otopine ninhidrina. Otopina ninhidrina je limun žute boje. Epruveta II služi kao slijepa proba. U nju se otpipetira 0,5 mL destilirane vode, te 1 mL mravlje kiseline i 1 mL otopine ninhidrina. U sljedeće tri epruvete otpipetira se po 0,5 mL standardne otopine prolina koji je bezbojan. Epruvete se začepu gumenim čepovima i stave u tresilicu na 15 minuta. Po isteku vremena, epruvete se stave u kipuću vodenu kupelj na 100°C, gdje stoje 15 minuta. Razina vode u vodenoj kupelji je bila iznad tekućine u epruvetama. Boja otopine se stajanjem u vrućoj vodi promijenila u crvenkasto-smeđu. Nakon 15 minuta, temperatura kupelji se spusti na 70°C. Epruvete na toj temperaturi ostaju 10 minuta. Potom se epruvete vade iz kupelji i u svaku doda po 5 mL otopine propan-2-ola koja je bezbojna. Epruvete se začepu, protresu rukama i ostave hladiti na sobnoj temperaturi tijekom 45 minuta. Iz ohlađenih se epruveta otpipetiraju uzorci koji se prenese u kivete. Kivete se stave u spektrofotometar u kojem se mjeri apsorbancija za po 10 uzoraka. Za jednu

seriju od po 5 uzoraka, određuje se apsorbancija prolina. To se učini na način da se izmjere apsorbancije triju uzoraka prolina i odredi njihova srednja vrijednost.

Količina prolina u medu s izračunava prema jednadžbi 1:

$$prolin \left(\frac{mg}{kg} \right) = \left(\frac{E_s}{E_a} \right) \times \left(\frac{E_1}{E_2} \right) \times 80 \quad [1]$$

gdje su:

E_s – apsorbancija otopine uzorka meda

E_a – apsorbancija standardne otopine prolina (prosjeak od 2 očitavanja)

E_1 – mg prolina uzetih za standardnu otopinu

E_2 – masa meda u gramima

80 – faktor razrjeđenja (IHC, 2009).

3.2.3. Određivanje udjela hidroksimetilfurfurala

Metoda po Winkleru se može koristiti za sve uzorke meda.

Metoda određuje koncentraciju hidroksimetilfurfurala (HMF) koji je definiran kao sastojak meda koji, pod određenim uvjetima, može ući u reakciju sa barbiturnom kiselinom i *p*-toluidinom.

Metoda opisuje određivanje hidroksimetilfurfurala u medu i temelji se na originalnoj metodi po Winkleru. Alikvoti otopine meda, otopine *p*-toluidina i barbiturne kiseline se pomiješaju, a boja koja pri tom nastaje se mjeri u odnosu na slijepu probu u kivetama promjera 1 cm na valnoj duljini od 550 nm.

Priprema otopine uzorka: 10,0 g uzorka (meda od bagrema) odvaži se na tehničkoj vazi u plastičnu posudu. Uzorak se otopi u destiliranoj vodi. Dobivena otopina prenese se preko lijevka u odmjernu tikvicu od 50 mL. U tikvicu s otopinom meda, otpipetira se 1 mL otopine Carrez I i dobro promiješa. Potom se dodaje 1 mL otopine Carrez II i dobro promiješa. Otopina u tikvici poprima mliječno žutu boju. Kako bi se spriječilo pjenjenje, u otopinu se dodaje kap etanola. Tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake i promiješa. Otopina

se profiltrira kroz filter papir. Dobiveni filtrat je bezbojan. Prvih 10 mL filtrata se baci, a ostatak se koristi odmah za daljnju analizu.

Određivanje: po 2 mL otopine uzorka se otpipetira u po 2 epruvete. U svaku od epruveta otpipetira se po 5 mL otopine *p*-toluidina. Jedna od epruveta služi kao slijepa proba i u nju se otpipetira 1 mL destilirane vode. U drugu epruvetu se otpipetira 1 mL barbiturne kiseline i lagano promiješa. Dodavanje reagenasa (*p*-toluidina i barbiturne kiseline) mora biti gotovo za 1-2 minute. Nakon što epruvete odstoje na sobnoj temperaturi (25°C) 4 minute, boja slijepa probe ostaje nepromijenjena, dok se boja uzorka promijeni iz žuto-zelene u crvenkastu. U periodu od 4 minute odstojanja, boja u epruvetama poprima svoj maksimum. Uzorci se prenesu u kivete od 1 cm, te im se očita apsorbancija u spektrofotometru na 550 nm.

Udio HMF-a izračunava se prema sljedećoj formuli (jednadžba 2):

$$HMF = \frac{192 \times A \times 10}{m} \quad [2]$$

gdje su:

A – apsorbancija

192 – faktor razrjeđivanja i koeficijent apsorbancije

m – masa meda u gramima (g)

Udio HMF-a se izračunava u mg/kg (IHC, 2009).

3.2.4. Određivanje aktivnosti invertaze

Metoda se može primijeniti za sve uzorke meda.

Aktivnost invertaze je izražena u jedinicama pri čemu je jedna jedinica definirana kao broj mikromola supstrata uništenih u minuti i izražena po kilogramu meda. Aktivnost se može, također, izraziti i kao invertazni broj.

p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (pNPG) se koristi kao supstrat za određivanje saharoznog broja u medu. α -glukozidaza (invertaza, saharaza) pocijepa pNPG na glukozu i *p*-nitrofenol. Namještanjem pH vrijednost na 9,5, u isto vrijeme, zaustavlja se enzimatska reakcija i

nitrofenol se pretvara u nitrofenolatni anion. Količina nitrofenolatnog aniona odgovara količini pretvorenog supstrata i određuje se fotometrijski na 400 nm.

Reagensi su: puferna otopina (0,1 M; pH = 6,0) , otopina supstrata pNPG (0,02 M) i otopina za prekid reakcije (3 M; pH = 9,5).

Priprema otopine meda: na tehničkoj vazi, u plastičnu posudu, odvažuje se 5,0 g meda. 5 mL bezbojnog pufera dodaje se u čašu u kojoj se nalazi med. Dobivena se otopina preko lijevka prenese u odmjernu tikvicu od 25 mL. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni s puferom. Tikvica se protrese. Otopina u njoj promijeni boju u žućkastu. Tako pripremljena otopina može se čuvati u hladnjaku 1 dan.

Priprema otopine uzorka: 5,0 mL supstrata otpipetira se u epruvetu. Epruveta se stavi u vodenu kupelj na 40°C tijekom 5 minuta. Broj epruveta sa supstratom ovisi o broju uzoraka meda. Nakon tog vremena, u epruvetu se otpipetira 0,5 mL otopine meda. Trenutak kada se zadnji uzorak meda doda u za to pripremljenu epruvetu, računa se kao početno vrijeme. Epruveta se ostavi stajati na sobnoj temperaturi 20 minuta. Potom se u nju otpipetira 0,5 mL bezbojnog stopera. Epruveta se izvorteksira. Otopina se ostavi stajati na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta kako bi se otopina u njoj ohladila na sobnu temperaturu. Uz glavnu probu, istovremeno, radi se i slijepa proba.

Priprema slijepa probe: za slijepu probu otpipetira se 5,0 mL supstrata u epruvetu. Epruveta se stavi na 5 minuta u vruću kupelj na 40°C. Nakon 5 minuta, u epruvetu se otpipetira 0,50 mL stopera, izvorteksira, i dodaje 0,5 mL otopine meda. Otopina se ostavi stajati na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta kako bi se otopina u njoj ohladila na sobnu temperaturu.

Određivanje: 0,5 mL uzorka otpipetira se u kivetu. Mjeri se apsorbancija otopine uzoraka meda, kao i slijepih proba. Kiveta se stavi u spektrofotometar, te se mjeri apsorbancija na 400 nm. Mjerenja se trebaju izvršiti najranije 15 minuta nakon hlađenja, ali ne kasnije od 1 sata. Vrijednost apsorbancije slijepa probe oduzima se od vrijednosti apsorbancije otopine uzorka meda.

Količina *p*-nitrofenola u μmol dobivena tijekom pokusa odgovara količini iskorištenog supstrata μmol . Aktivnost invertaze se može izračunati iz apsorbancije izmjerene na 400 nm, a izražava se u jedinicama po kilogramu (U/kg), jednadžbe 3 i 4.

Invertazna aktivnost se računa prema jednadžbi:

$$1 \text{ U/kg} = \frac{1 \mu\text{mol } p\text{NPG}}{\text{min} \times \text{kg meda}} \quad [3]$$

$$\text{INVERTAZA u U/kg} = 6 \times 0.05 \times 0.05298 \times 10^4 \times \Delta A_{400} = 158.94 \times \Delta A_{400} \quad [4]$$

gdje su:

U = 1 internacionalna jedinica određenog iskorištenja 1 μmol po minuti

6 = faktor pretvorbe za mL utrošene otopine uzorka

0,05 = pretvara vrijeme reakcije iz 20 min u 1 min

10^4 = pretvara količinu uzetog meda (0,1 g u 0,5 mL) u 1 kg

0,05298 = 7,37 / 139,11; faktor pretvorbe μg u $\mu\text{mol/mL}$

7,37 = faktor pretvorbe *p*-nitrofenola iz odgovarajućeg grafa

139,11 = molekularna masa *p*-nitrofenola

Aktivnost invertaze se izražava kao invertazni broj (jednadžba 5):

$$IN = 21.64 \times \Delta A_{400} \quad [5]$$

IN izražava količinu saharoze u g koju je enzim hidrolizirao tijekom 1 sata u 100 g meda u eksperimentalnim uvjetima (IHC, 2009).

4. REZULTATI

Cilj ovog rada bio je odrediti udio prolina i HMF-a u medu, te invertaznu aktivnost na 28 uzoraka bagremovog meda iz Krapinsko-zagorske županije. Svi uzorci meda čuvani su na sobnoj temperaturi do trenutka analize.

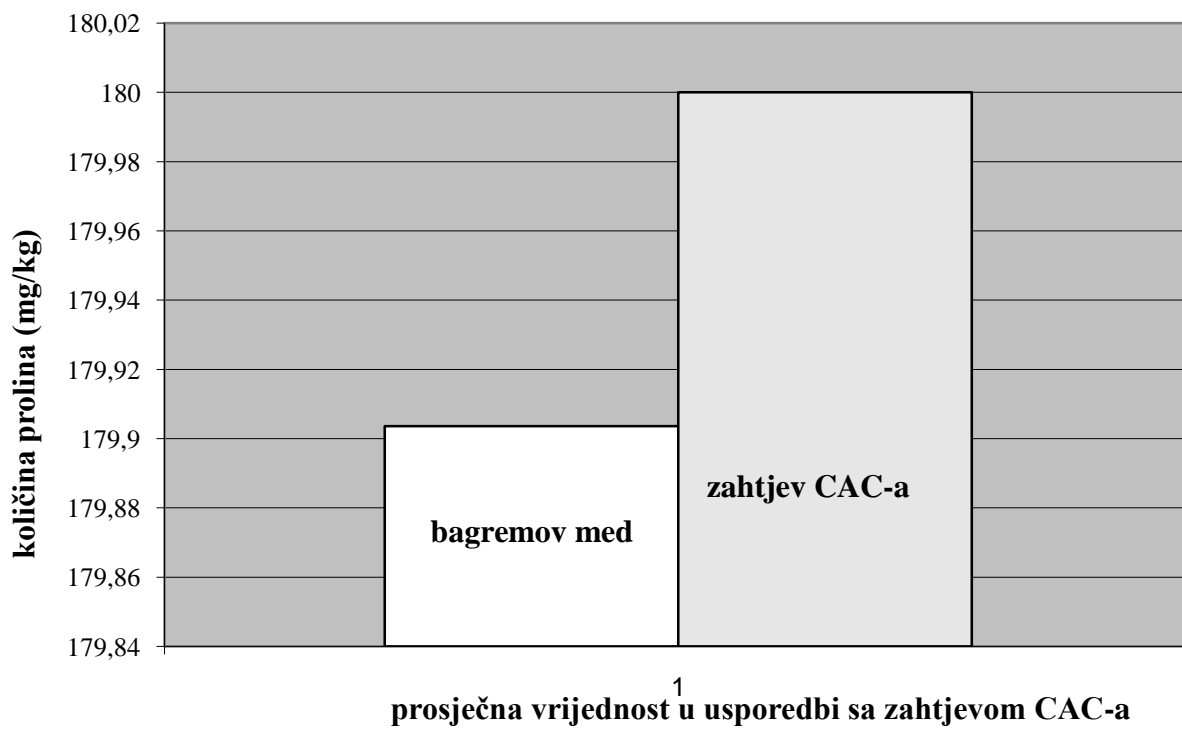
Određivanjem udjela prolina u medu može se ustanoviti zrelost meda, te je li med krivotvoren, dok se određivanjem aktivnosti invertaze može ustanoviti svježina meda. Određivanje udjela HMF-a služi kao indikator kvalitete meda. Udjeli prolina i HMF-a izražavaju se u miligramima po kilogramu meda (mg/kg). Dobivene vrijednosti prolina uspoređivane su sa zahtjevima međunarodnog standarda Codex Alimentarius Commission (CAC-a) prema kojemu prolina mora minimalno biti 180 mg/kg meda (Bogdanov i sur., 2001). Dobivene vrijednosti HMF-a uspoređivane su sa zahtjevima Pravilnika o medu (<40 mg/kg) kako bi se vidjelo zadovoljavaju li analizirani medovi propisane kriterije kakvoće (Pravilnik o medu, 2015). Aktivnost invertaze izražava se invertaznim brojem (IN). Med koji se stavlja na tržište mora imati invertazni broj veći od 4,0 prema zahtjevima međunarodnog standarda CAC-a (Bogdanov i sur., 2001).

U tablici 3 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije meda i prolina, te količine prolina. U tablici 4 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije meda i količina HMF-a u medu. U tablici 5 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancija meda i slijepe probe, ΔA_{400} , U/kg (jedinice invertaze po kilogramu meda), te izračunati invertazni broj.

Određivani su i sljedeći statistički parametri: prosječna vrijednost, raspon, medijan, standardna devijacija, varijanca i koeficijent varijabilnosti (Tablica 6).

Tablica 3. Određivanje prolina u uzorcima bagremovog meda

UZORCI MEDA	APSORBANCIJA MEDA (510 nm)	APSORBANCIJA PROLINA (510 nm)	mg PROLINA/kg meda
48	0,092	0,366	160,9
49	0,069	0,366	120,7
50	0,124	0,345	230
53	0,103	0,373	176,7
54	0,067	0,345	124,3
55	0,135	0,345	252,3
56	0,106	0,373	181,9
58	0,124	0,345	230
61	0,137	0,373	235,1
62	0,12	0,366	209,8
65	0,084	0,366	146,9
68	0,187	0,366	327
70	0,086	0,373	147,6
73	0,118	0,345	218,9
74	0,249	0,373	427,2
78	0,097	0,366	169,6
83	0,093	0,373	159,6
84	0,115	0,366	201,1
86	0,043	0,345	79,8
88	0,09	0,345	167
91	0,046	0,373	78,9
92	0,102	0,366	178,4
93	0,165	0,345	306,1
95	0,026	0,373	44,6
96	0,038	0,373	65,2
98	0,035	0,373	60,1
99	0,098	0,345	181,8
101	0,084	0,345	155,8



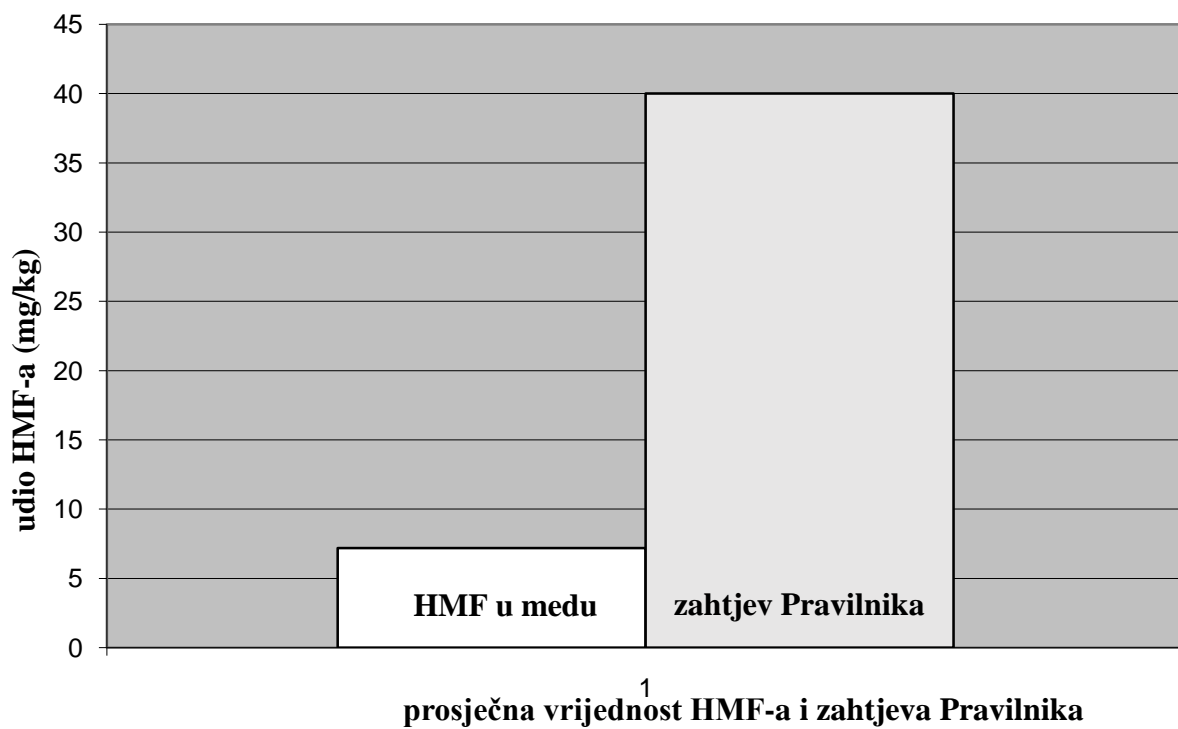
Graf 1. Usporedba prosječne vrijednosti količine prolina u ispitivanim uzorcima bagremovog meda i zahtjeva CAC-a



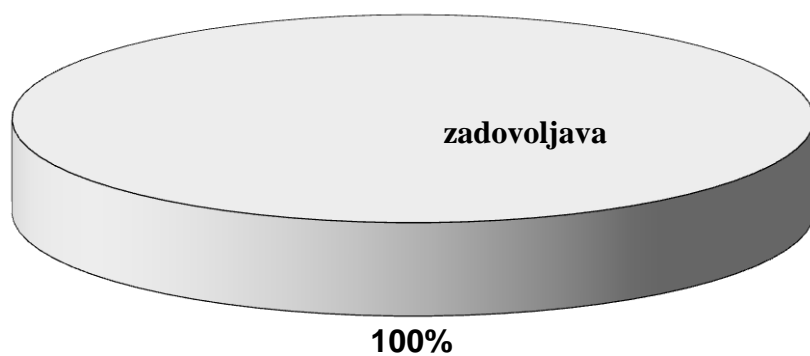
Graf 2. Ispitivani uzorci bagremovog meda koji (ne) zadovoljavaju zahtjev CAC-a prema udjelu prolina

Tablica 4. Određivanje udjela HMF-a u uzorcima bagremovog meda

UZORCI MEDA	A (550 nm) MEDA	HMF (mg/kg meda)
48	0,081	15,6
49	0,028	5,4
50	0,019	3,7
53	0,04	7,7
54	0,037	7,1
55	0,018	3,5
56	0,031	6
58	0,048	9,2
61	0,026	5
62	0,028	5,4
65	0,06	11,5
68	0,032	6,1
70	0,006	1,2
73	0,006	1,2
74	0,009	1,7
78	0,03	5,8
83	0,087	16,7
84	0,049	9,4
86	0,007	1,3
88	0,037	7,1
91	0,043	8,3
92	0,004	0,8
93	0,086	16,5
95	0,078	15
96	0,012	2,3
98	0,093	17,9
99	0,026	5
101	0,026	5



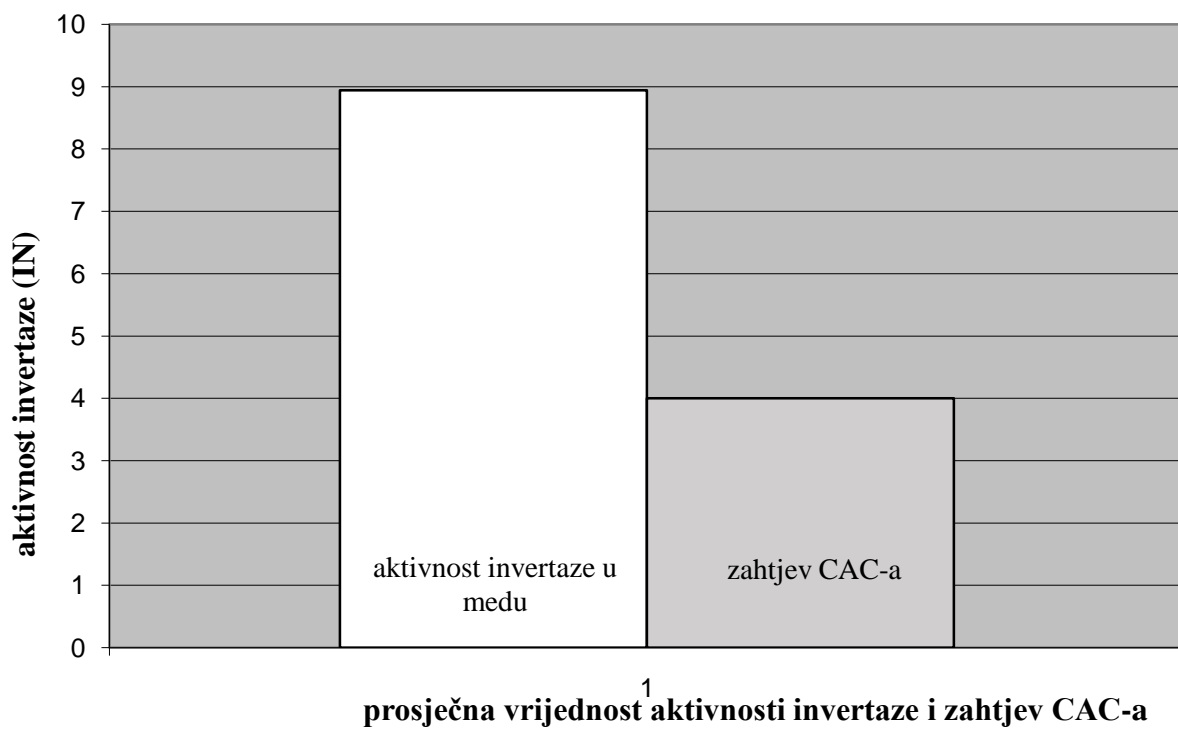
Graf 3. Usporedba prosječne vrijednosti količine HMF-a u ispitivanim uzorcima bagremovog meda i zahtjeva Pravilnika



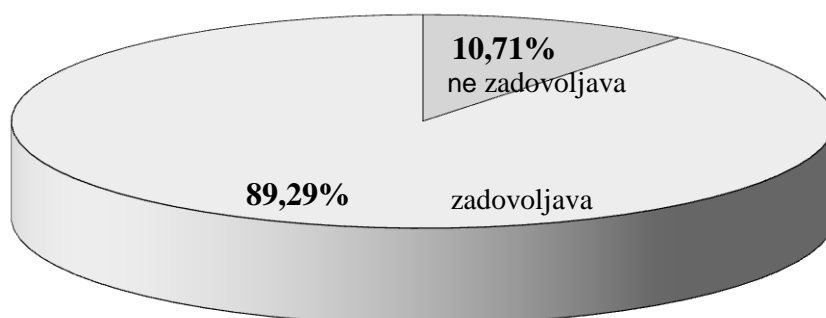
Graf 4. Ispitivani uzorci meda koji odgovaraju zahtjevima Pravilnika s obzirom na udio HMF-a

Tablica 5. Određivanje aktivnosti invertaze u uzorcima bagremovog meda

UZORCI MEDA	APSORBANCIJA MEDA A (400 nm)	APSORBANCIJA SLIJEPE PROBE	A (400 nm) MEDA	U/kg	IN
48	0,895	0,798	0,097	15,4	2,1
49	1,301	0,564	0,737	117,1	16
50	1,125	0,635	0,49	77,9	10,6
53	0,875	0,607	0,268	42,6	5,8
54	1,103	0,648	0,455	72,3	9,9
55	1,275	0,623	0,652	103,6	14,1
56	0,921	0,632	0,289	45,9	6,3
58	1,37	0,615	0,755	120	16,3
61	0,969	0,635	0,333	52,9	7,2
62	1,014	0,619	0,395	62,8	8,6
65	0,794	0,617	0,177	28,1	3,8
68	1,165	0,77	0,395	62,8	8,6
70	0,864	0,611	0,253	40,2	5,5
73	1,327	0,64	0,687	109,2	14,9
74	1,12	0,706	0,414	65,8	9
78	0,881	0,588	0,293	46,6	6,3
83	1,009	0,545	0,464	73,8	10
84	1,201	0,664	0,537	85,4	11,6
86	0,904	0,6	0,304	48,3	6,6
88	0,943	0,712	0,231	36,7	5
91	0,829	0,615	0,214	34	4,6
92	1,269	0,618	0,651	103,5	14,1
93	0,905	0,756	0,149	23,7	3,2
95	1,225	0,582	0,643	102,2	13,9
96	1,074	0,664	0,41	65,2	8,9
98	1,013	0,626	0,387	61,5	8,4
99	0,961	0,668	0,293	46,6	6,3
101	1,207	0,624	0,583	92,7	12,6



Graf 5. Usporedba prosječne vrijednosti aktivnosti invertaze u ispitivanim uzorcima bagremovog meda i zahtjeva CAC-a



Graf 6. Ispitivani uzorci bagremovog meda koji (ne) zadovoljavaju zahtjeve CAC-a prema invertaznom broju

Tablica 6. Statistički pokazatelji ispitivanih uzoraka bagremovog meda po pojedinim fizikalno-kemijskim parametrima

STATISTIČKI POKAZATELJI	Prolin (mg/kg)	HMF (mg/kg)	Invertaza (IN)
Prosječna vrijednost	179,9	7,19	8,94
Raspon	44,6-427,2	0,8-17,9	2,1-16,3
Medijan	173,15	5,9	8,6
Standardna devijacija	84,18	5,11	4,01
Varijanca	7085,39	26,11	16,01
Koeficijent varijabilnosti (%)	46,79	71,07	44,86
Kriterij CAC-a	> 180	<40	>4,0
Zahtjev Pravilnika	nema	<40	nema

5. RASPRAVA

U eksperimentalnom dijelu ovog istraživanja određivani su parametri potrebni za procjenu kvalitete meda: udio prolina i hidroksimetilfurfurala (HMF-a), te aktivnost invertaze. Ispitivanje je provedeno na 28 uzoraka bagremovog meda iz Krapinsko-zagorske županije, a dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 3, 4 i 5. Statistički parametri istih prikazani su u tablici 6. Udio prolina i HMF-a izraženi su u mg/kg dok je aktivnost invertaze prikazana kao invertazni broj (IN).

Pokazatelji varijacija su varijanca i standardna devijacija koje izražavamo u jedinicama mjerenja i predstavljaju apsolutnu mjeru. Koeficijent varijabilnosti je relativni pokazatelj varijacija i izražava se u postotku. Varijanca je mjera prosječnog kvadriranog odstupanja pojedinih jedinica od njihove aritmetičke sredine, odnosno vrijednosti svojstva u statističkom nizu. Koeficijent varijabilnosti se primjenjuje pri uspoređivanju istog obilježja mjenog u različitim skupovima. Dobiva se tako što se standardna devijacija podijeli s aritmetičkom sredinom. Dobiveni količnik pomnoži se sa 100. Ukazuje na homogenost svojstva ukoliko ne prelazi 30%. Veći postotak koeficijenta varijabilnosti pokazuje velika odstupanja među podacima (Vranić, 1971).

U tablici 6 navedeni su i zahtjevi Pravilnika o medu i dodatni kriteriji CAC-a. Pravilnik propisuje da udio HMF-a ne smije biti veći od 40 mg/kg. Prema kriteriju CAC-a udio prolina mora biti veći od 180 mg/kg, udio HMF-a ne smije biti veći od 40 mg/kg, a aktivnost invertaze ne smije biti niža od 4,0 (Bogdanov i sur., 2001).

Dobivene vrijednosti za **udio prolina** u ispitivanim uzorcima kreću se od 44,6 do 427,2 mg/kg (Tablica 3), a prosječna vrijednost iznosi 179,9 mg/kg (Tablica 6). Kriterij CAC-a propisuje da vrijednost za udio prolina moraju biti veće od 180 mg/kg (Bogdanov i sur., 2001). Taj uvjet zadovoljava 12 uzoraka.

U određivanju količine prolina dobivene vrijednosti koeficijenta varijabilnosti iznosile su 46,79%. Dobivene vrijednosti ukazuju na veliku raspršenost podataka, odnosno velika odstupanja među podacima.

Graf 1 prikazuje usporedbu kriterija CAC-a i prosječne vrijednosti količine prolina u bagremovom medu dobivenog ovim istraživanjem. Vidljivo je kako prosječna vrijednost (179,9 mg/kg) nije u skladu s kriterijem CAC-a (Bogdanov i sur., 2001), iako je jako blizu

granične vrijednosti (180 mg/kg) ipak nije veća od te vrijednosti pa ne zadovoljava kriterij CAC-a.

Hermosín i suradnici su proveli istraživanje na španjolskim medovima od ružmarina, eukaliptusa, lavande, timijana i naranče, te su dobivene različite vrijednosti za koeficijent varijabilnosti. Slične koeficijente varijabilnosti imali su: med od eukaliptusa (54,36%), med od lavande (53,41%) i med od ružmarina (52,86%). Med od timijana imao je najniži koeficijent varijabilnosti od 21,87%, a med od naranče 33,43%. Rezultati dobiveni u provedenom istraživanju odgovaraju rezultatima Hermosína i suradnika (Hermosín i sur., 2003).

Na grafičkom prikazu 2 vidljivo je da ukupno 57,14% uzoraka ne zadovoljava propisane kriterije od strane CAC-a, odnosno sadrže manje od 180 mg/kg prolina u medu. U ovu grupu ulazi 5 uzoraka čije se vrijednosti kreću od 44,6 do 79,8 mg/kg dok se 11 uzoraka kreće u rasponu od 120,7 do 178,4 mg/kg. Prolin u medu, uglavnom, potječe od pčela tijekom prerade nektar u med. Količina prolina koristi se kao indikator zrelosti meda. Ovako niske vrijednosti uobičajene su za med od bagrema, a općenito niske vrijednosti prolina mogle bi ukazivati i na mogućnost da je med krivotvoren (Hermosín i sur., 2003).

Vrijednosti za **udio HMF-a** u ispitivanim uzorcima meda kreću se od 0,8 do 17,9 mg/kg (Tablica 4), a prosječna vrijednost iznosi 7,19 mg/kg (Tablica 6). Svi ispitivani uzorci odgovaraju zahtjevima Pravilnika (Pravilnik o medu, 2015) (Graf 4).

CAC (Bogdanov i sur., 2001) daje smjernice koje propisuju limit od 15 mg/kg HMF-a u medu ukoliko je aktivnost dijastaze ispod 8. U provedenom istraživanju 82,1% uzoraka ima manje od 15 mg/kg HMF-a, što pokazuje kako med nije dugo skladišten ili zagrijavan.

U istraživanju koje su proveli Ajlouni i Sujirapinyokul na australskim medovima pokazalo se kako je u svježim medovima (vrste *Grey box* i *Banksia*) udio HMF-a bio nizak i kretao se u rasponu od 1,12 do 1,35 mg/kg. S obzirom da je 23 uzoraka ispitivanih u ovome istraživanju (Tablica 4) imalo HMF ispod 15 mg/kg (Graf 3), u skladu je s istraživanjem koje su proveli Ajlouni i Sujirapinyokul (Ajlouni i Sujirapinyokul, 2010).

Ajlouni i Sujirapinyokul su došli do zaključaka kako zagrijavanje nije jedini faktor koji utječe na nastajanje HMF-a. Njemu pridonose i fizikalno-kemijski sastav meda, pH meda i cvjetna vrsta. Istraživanje je pokazalo da je limit od 40 mg/kg HMF-a previsok za neke vrste medova dok je za neke prenizak (Ajlouni i Sujirapinyokul, 2010). Isto se pokazalo i u provedenom istraživanju.

HMF je najvažniji i najpouzdaniji pokazatelj zagrijavanja meda zato što nije prisutan u svježem medu. Tijekom zagrijavanja meda dolazi do porasta količine HMF-a. Karabournioti i suradnici su istraživanjem došli do rezultata koji pokazuju kako zagrijavanje meda na 55°C i održavanjem te temperature tijekom 24 sata ne dolazi do značajnog porasta količine HMF-a. Pri 65°C su medovi od naranče i bora imali nisku količinu HMF-a dok su medovi od pamuka, suncokreta i timijana imali količinu od 40 mg/kg. Na 75°C HMF je bio jako visok u svim vrstama meda, osim bora koji je tek na toj temperaturi dosegno 40 mg/kg (Karabournioti i Zervalaki, 2001).

Vrijednosti za **aktivnost invertaze** su u rasponu od 2,1 do 16,3 IN (Tablica 6). Prosječna vrijednost iznosi 8,94 IN i u skladu je s kriterijem CAC-a koji zahtjeva da aktivnost invertaze bude veća od 4,0 IN (Graf 5). Iz toga proizlazi kako je med korišten u ovom istraživanju svjež.

Varijanca određena za aktivnost invertaze iznosi 16,01 IN dok koeficijent varijabilnosti iznosi 44,86%. Navedeni parametri pokazuju na veliku raspršenost podataka, odnosno odstupanja među podacima su velika (Tablica 6).

Istraživanje koje su proveli Oddo i suradnici na različitim vrstama talijanskih medova pokazalo je da su se koeficijenti varijabilnosti kretali od 18,20% za med od suncokreta do 69,15% za vrstu *Arbutus*. Za bagremov med koeficijent varijabilnosti je bio 59,33%. Rezultati dobiveni u provedenom istraživanju u skladu su sa rezultatima koje su dobili Oddo i suradnici (Oddo i sur., 1999).

Iz grafičkog prikaza 6 vidljivo je kako 89,29% zadovoljava zadane kriterije. Uzorci 48, 65 i 93 ne zadovoljavaju dodatni kriterij IHC-a. Vrijednosti za aktivnost invertaze za med od bagrema, u istraživanju Odda i suradnika, kretale su se u rasponu od 0,46 do 7,73 IN dok su se za med od suncokreta vrijednosti kretale od 9,01 do 16,34 IN. Navedeno istraživanje nam

pokazuje kako je širok raspon aktivnosti invertaze za različite vrste medova (Oddo i sur., 1999).

Aktivnost invertaze je pokazatelj svježine meda i najosjetljiviji je na termičku obradu od svih enzima prisutnih u medu. Navedeni parametar je prikladniji za procjenu posebno označenih visoko kvalitetnih medova. Aktivnost invertaze pada u starim ili zagrijavanim medovima. Kada se aktivnost invertaze izmjeri u uzorcima meda, teško je interpretirati rezultate u vidu svježine meda. Ako se ne zna inicijalna vrijednost, nemoguće je procijeniti eventualni učinak pregrijavanja ili starenja (Anklam, 1998; Oddo i sur., 1999; Rhee i sur., 2008).

Karabournioti i suradnici su istraživali kako zagrijavanje meda utječe na aktivnost invertaze. Utvrdili su kako aktivnost invertaze počinje padati već pri 35°C dok je pri 75°C invertaza gotovo potpuno uništena (Karabournioti i Zervalaki, 2001; Karabagias i sur., 2014).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja provedenog na 28 uzoraka bagremovog meda iz Krapinsko-zagorske županije, nakon obrade podataka može se zaključiti sljedeće:

1. Količina prolina u većini uzoraka je niža od propisane. Točnije, 16 od 28 uzoraka ima količinu prolina ispod 180 mg/kg, odnosno ne zadovoljavaju zahtjeve CAC-a. S obzirom da je riječ o bagremovom medu, odnosno o vrsti meda s prirodno niskim udjelom prolina, rezultati su u skladu sa udjelima u medu s prirodno niskim udjelom prolina.
2. Količina HMF-a je u svim uzorcima ispod 40 mg/kg što u potpunosti zadovoljava zahtjeve Pravilnika i CAC-a. To je pokazatelj kako med nije dugo skladišten.
3. Aktivnost invertaze odgovara zahtjevima CAC-a jer 25 od 28 uzoraka ima aktivnost veću od 4,0. Prema tome se može zaključiti da je med odgovarajuće svježine.
4. Pošto su količina HMF-a i aktivnost invertaze u skladu sa zahtjevima Pravilnika i CAC-a, može se zaključiti kako je med dobre kakvoće, svježine i nije bio dugo skladišten.

7. LITERATURA

Knjige i članci

1. BAUER, LJ., BIŠKUPIĆ, I., BRKAN, B., DEKANOVIĆ, I., DOLENEC DRAVSKI, M., DOMAĆINOVIĆ, V., KVOČIĆ, K., MATIJAŠKO, N., MATKOVIĆ MIKULČIĆ, K., MILKOVIĆ, B., PAVLEK MOĆAN, M., OLIĆ, R., SULIMANOVIĆ, Đ., ZEBA, LJ. (1999.): Med, pčelarenje i običaji, (Obad, Ž., ured.) Pučko otvoreno učilište, Zagreb, str. 91-132.
2. FLOTTUM, K. (2006.): Cjelovit i jednostavan vodič za pčelarstvo, Veble commerce, Zagreb.
3. KULINČEVIĆ, J. (2008.): Pčelarstvo, 6. izd. , Partenon, Beograd.
4. LAKTIĆ, Z., BRAČIĆ, I., BODAKOŠ, D., TUCAK, Z. (2005.): Pčelarski priručnik, Grafika, Osijek.
5. RELIĆ, B. (2006.): Pčelarstvo, 4.izd., Neron, Bjelovar.
6. TARANOV, G.F. (2006.): Hrana i ishrana pčela, 4. izd. , Neron, Bjelovar.
7. VRANIĆ, V. (1971.): Vjerojatnost i statistika, 3. izd. , Tehnička knjiga, Zagreb.
8. Pravilnik o medu (2015) *Narodne novine* **53**, Zagreb.
9. Pravilnik o kakvoći uniflornog meda (2009) *Narodne novine* **122**, Zagreb.
10. Pravilnik o izmjeni pravilnika o kakvoći uniflornog meda (2013) *Narodne novine* **141**, Zagreb
11. Codex Alimentarius Commission – CAC (1981) **2**, 1.izd., Codex Stan.12.
12. Council Directive 2001/110 EC from 20/12/2001 relating to honey – EU Direktiva /110/2001 od 20/12 2001 (L 10/47).

13. ABRAMOVIČ, H., JAMNIK, M., BURKAN, L., KAČ, M. (2008.): Water activity and water content in Slovenian honeys. *Food Control*, **19**, 1086-1090.
14. AJLOUNI, S., SUJIRAPINYOKUL, P. (2010.): Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey, *Food Chemistry*, **119**, 1000-1005.
15. ANKLAM, E. (1998.): A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, Vol. 63, No. 4, 549–562.
16. BERTONCELJ, J., DOBERŠEK, U., JAMNIK, M., GOLOB, T. (2007.): Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, **105**, 822–828.
17. BEUCHAT, L.R., TAORMINA, P.J., NIEMIRA, B.A. (2001.): Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power, *International Journal of Food Microbiology*, **69**, 217–225.
18. DÍAZ ROMERO, C., BENTABOL MANZANARES, A., HERNÁNDEZ GARCÍA, Z., RODRÍGUEZ GALDÓN, B., RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, E. (2011.): Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry*, **126**, 664–672.
19. ESCRICHE, I., VISQUERT, M., JUAN-BORRÁS, M., FITO, P. (2009.): Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, **112**, 329–338.
20. DE LA FUENTE, E., RUIZ-MATUTE, A.I., VALENCIA-BARRERA, R.M., SANZ, J., MARTÍNEZ CASTRO, I. (2011.): Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*, **121**, 1–7.
21. GUO, W., ZHU, X., LIU, Y., ZHUANG, H. (2010.): Sugar and water contents of honey with dielectric property sensing. *Journal of Food Engineering*, **97**, 275–281.

22. HERMOSÍN, I., CHICÓN, R.M., DOLORES CABEZUDO, M. (2003.): Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, **83**, 263–268.
23. JIANG , Y., YAO, L., SINGANUSONG, R., D'ARCY, B., DATTA, N., CAFFIN, N., RAYMONT, K. (2004.): Flavonoids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, **37**, 166–174.
24. JIANG , Y., YAO, L., SINGANUSONG, R., DATTA, N., RAYMONT, K. (2004.): Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, **86**, 169–177.
25. KARABAGIAS, I.K., BADEKA, A.V., KONTAKOS, S., KARABOURNIOTI, S., KONTOMINAS, M.G. (2014.): Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physicochemical and chemometric analyses. *Food Chemistry*, **165**, 181–190.
26. KARABAGIAS, I.K., BADEKA, A.V., KONTAKOS, S., KARABOURNIOTI, S., KONTOMINAS, M.G. (2014.): Characterization and classification of *Tymus capitatus* (L.) honey according to geographical origin based on volatile compounds, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Research International*, **55**, 363–372.
27. KARABOURNIOTI, S., ZERVALAKI, P. (2001.): The effect of heating on honey HMF and invertase. *Apiacta*, **36**, 177–181.
28. KASSIA, E., CHINOUB, I., SPILLOTIA, E., TSIAPARA, A., GRAIKOUB, K., KARABOURNIOTI, S., MANOUSSAKIS, M., MOUITSATSOU, P. (2014.): A monoterpene, unique component of thyme honeys, induces apoptosis in prostate cancer cells via inhibition of NF-Kb activity and IL-6 secretion. *Phytomedicine*, **21**, 1483–1489.
29. KOVAC, H., STABENTHEINER, A., SCHMARANZER, S. (2010.): Thermoregulation of water foraging honeybees – Balancing of endothermic activity with radiative heat gain and functional requirements. *Journal of Insect Physiology*, **56**, 1834–1845.

30. LAZAREVIĆ, K.B., ANDRIĆ, F., TRIFKOVIĆ, J., TEŠIĆ, Ž., MILOJKOVIĆ-OPSENICA, D. (2012.): Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. *Food Chemistry*, **132**, 2060–2064.
31. MALONE, L.A., GATEHOUSE, H.S. (1998.): Effects of *Nosema apis* Infection on Honey Bee (*Apis mellifera*) Digestive Proteolytic Enzyme Activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, **71**, 169–174.
32. MEDA, A., LAMIEN, C.E., ROMITO, M., MILLOGO, J., NACOULMA, O.G. (2005.): Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, **91**, 571–577.
33. ODDO, L.P., PIAZZA, M.G., PULCINI, P. (1999.): Invertase activity in honey. *Apidologie* **30**, 57–65.
34. RASHED, M.N., SOLTAN, M.E. (2004.): Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**, 725–735.
35. RHEE, H.-I., WON, S.-R., LEE, D.-C., KO, S.H., KIM, J.-W. (2008.): Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, **41**, 952–956.
36. RHEE, H.-I., WON, S.-R., LI, C.-Y., KIM, J.-W. (2009.): Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry*, **113**, 1334–1338.
37. SUBRAMANIAN, R., BARHATE, R.S., NANDINI, K.E., UMESH HEBBAR, H. (2003.): Processing of honey using polymeric microfiltration and ultrafiltration membranes. *Journal of Food Engineering*, **60**, 49–54.
38. SULAIMAN, S.A., KHALIL, M.I., GAN, S.H. (2010.): High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2388–2392.

39. VARGA, L. (2006.): *Effect of acacia (Robinia pseudo-acacia L.) honey on the characteristic microflora of yogurt during refrigerated storage. International Journal of Food Microbiology*, **108**, 272–275.
40. ZAMORA, M.C., CHIRIFE, J., ROLDÁN, D. (2006.): On the nature of the relationship between water activity and % moisture in honey. *Food Control*, **17**, 642–647.
41. FANUKO, M. (2008.): Čudesna riznica zdravlja, Vaše zdravlje br. 63, 60–61.
42. FANUKO, M. (2009.): Čudesna riznica zdravlja 2, Vaše zdravlje br. 64, 68–69.
43. MUSIĆ MILANOVIĆ, S. (2009.): «Dobri» i «loši» ugljikohidrati, *Dijabetes* **1**, 28.
44. OBUĆINA, V. (2012.): Bogovi su ga obožavali, *Dijabetes* **3**, 30–32.
45. SVETIĆ ČIŠIĆ, R. (2011.): Tri bijela otrova: šećer, mast i sol, *Dijabetes* **1**, 21–24.
46. VRANEŠIĆ BENDER, D. (2011.): Pčele i priroda izvor zdravlja i ljepote, *Pyrus*[®], 4–7

Izvori s interneta

1. BOGDANOV, S. (2009): Harmonised methods of the International Honey Commission, http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/IHCPapers/IHC-methods_2009.pdf, pristupljeno (16.7.2012.)
2. BOGDANOV, S., LÜLLMANN, C., MARTIN, P., OHE, W., RUSSMANN, H., VORWOHL, G., PERSANO ODDO, L., SABATINI, A.G., MARCAZZAN, G.L., PIRO, R., FLAMINI, C., MORLOT, M., LHÉRITIER, J., BORNECK, R., MARIOLEAS, P., TSIGOURI, A., KERKVLIT, J., ORITZ, A., IVANOV, T., D'ARCY, B., MOSSEL, B., VIT, P. (2001.): Honey Quality and International Regulatory Standards Review by the International Honey Commission, http://www.beekeeping.com/articles/us/honey_quality.htm, pristupljeno (16.7.2012.)

3. Hrvatski pčelarski savez, <http://www.pcelarstvo.hr>, pristupljeno (27.6.2012.)
4. OŠ Hercegovac, <http://os-skolara-hercegovac.skola.hr>, pristupljeno (11.7.2012.)
5. Ja trgovac, <http://jatrgovac.com>, pristupljeno (14.7.2012.)
6. OPG Turić, <http://opg.mturic.net>, pristupljeno (27.6.2012.)
7. Trailović, <http://trailovic.com>, pristupljeno (11.7.2012.)

POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. (Med), 5.

Slika 2. (Pčela na cvijetu), 8.

Slika 3. (Bagrem stablo), 10.

Slika 4. (Pčela skuplja pelud bagrema), 11.

Graf 1. (Usporedba prosječne vrijednosti količine prolina u ispitivanim uzorcima bagremovog meda i zahtjeva CAC-a), 36.

Graf 2. (Ispitivani uzorci bagremovog meda koji (ne) zadovoljavaju zahtjev CAC-a prema udjelu prolina), 36.

Graf 3. (Usporedba prosječne vrijednosti količine HMF-a u ispitivanim uzorcima bagremovog meda i zahtjevima Pravilnika), 38.

Graf 4. (Ispitivani uzorci meda koji odgovaraju zahtjevima Pravilnika s obzirom na udio HMF-a), 38.

Graf 5. (Usporedba prosječne vrijednosti aktivnosti invertaze u ispitivanim uzorcima bagremovog meda i zahtjeva CAC-a), 40.

Graf 6. (Ispitivani uzorci bagremovog meda koji (ne) zadovoljavaju zahtjeve CAC-a prema invertaznom broju), 40.

Tablica 1. (Prosječni kemijski sastav meda), 14.

Tablica 2. (Pregled enzima u medu), 19.

Tablica 3. (Određivanje prolina u uzorcima bagremovog meda), 35.

Tablica 4. (Određivanje udjela HMF-a u uzorcima bagremovog meda), 37.

Tablica 5. (Određivanje aktivnosti invertaze u uzorcima bagremovog meda), 39.

Tablica 6. (Statistički pokazatelji ispitivanih uzoraka bagremovog meda po pojedinim fizikalno-kemijskim parametrima), 41.