

Udio proteina i prolina u uzorcima cvjetnog i livadnog meda

Petek, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:980818>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2022.

Petra Petek

**UDIO PROTEINA I PROLINA U
UZORCIMA CVJETNOG I
LIVADNOG MEDA**

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 mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Marković te uz pomoć tehničke suradnice Valentine Hohnjec.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Kseniji Marković na ukazanoj prilici za izradu ovog Diplomskog rada, na razumijevanju, strpljenju i pomoći koju mi je pružila.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su me uvelike ohrabivali, podržavali, dizali i uveseljavali tijekom cijelog studija.

Posebno hvala mojim roditeljima, Jadranki i Dragutinu, sestri Moniki i sestri Karli kojima i posvećujem ovaj Diplomski rad. Hvala Vam što ste mi omogućili studiranje i što ste sve ove godine bili uz mene, podržavali me, imali razumijevanja i vjerovali u mene čak i kada ja sama to nisam. Hvala Vam na beskonačnom strpljenju i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

UDIO PROTEINA I PROLINA U UZORCIMA CVJETNOG I LIVADNOG MEDA

Petra Petek, univ. bacc. nutr.
0058210364

Sažetak: Med je prirodna slatka tvar koju proizvode pčele medarice (*Apis mellifera*). Zbog čestih slučajeva patvorenja, med je kemijski dobro okarakteriziran. Unatoč niskom udjelu u medu, proteini se sve više istražuju te se koriste kao biljezi autentičnosti i pokazatelji kvalitete meda. Prolin se smatra pokazateljem zrelosti meda, a može poslužiti i kao indikator kvalitete i patvorenja. Tijekom ovog istraživanja analizirani su uzorci cvjetnog i livadnog meda podrijetlom iz Republike Hrvatske. Metodom po Kjeldahl-u određen je udio ukupnih proteina, a udio prolina metodom predloženom od strane *International Honey Commission*. Rezultati su pokazali da se udio ukupnih proteina kretao u rasponu od 0,24 do 0,60 % za cvjetni te od 0,21 % do 0,87 % za livadni med. Udio prolina kretao se u rasponu od 81,78 do 2157,60 mg/kg za cvjetni te od 153,40 do 2512,14 mg/kg za livadni med. Dobiveni analitički podaci mogu predstavljati doprinos u procjeni kvalitete i autentičnosti analiziranih uzoraka meda.

Gljučne riječi: *udio proteina, udio prolina, cvjetni med, livadni med, kvaliteta meda*

Rad sadrži: 43 stranica, 5 slika, 5 tablica, 55 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Marković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Nada Vahčić (predsjednik)
2. Prof.dr.sc. Ksenija Marković (mentor)
3. Prof.dr.sc. Draženka Komes (član)
4. Prof.dr.sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjenski član)

Datum obrane: 28. listopada 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

PROTEIN AND PROLINE CONTENT IN FLOWER AND MEADOW HONEY SAMPLES

Petra Petek, univ. bacc. nutr.
0058210364

Abstract: Honey is a natural sweet substance produced by honey bees (*Apis mellifera*). Due to frequent cases of adulteration, honey is chemically well characterized. Despite the low content in honey, proteins are increasingly being researched and used as markers of authenticity and indicators of honey quality. Proline is considered as an indicator of honey maturity, and also as an indicator of quality and adulteration. During this research, samples of flower and meadow honey were analysed. The content of total proteins was determined using the Kjeldahl method, and the content of proline was determined using the method suggested by the *International Honey Commission*. The results showed that the content of total proteins ranged from 0.24 to 0.60 % for flower honey and from 0.21 % to 0.87 % for meadow honey. The content of proline ranged from 81.78 to 2157.60 mg/kg for flower honey and from 153.40 to 2512.14 mg/kg for meadow honey. The obtained analytical data can represent a contribution to the assessment of the quality and authenticity of the analysed honey samples.

Keywords: protein content, proline content, flower honey, meadow honey, honey quality

Thesis contains: 43 pages, 5 figures, 5 tables, 55 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ksenija Marković, PhD, Full professor

Reviewers:

1. Nada Vahčić, PhD, Full professor (president)
2. Ksenija Marković, PhD, Full professor (mentor)
3. Draženka Komes, PhD, Full professor (member)
4. Ines Panjkota Krbavčić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: 28th October 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DEFINICIJA I VRSTE MEDA	2
2.1.1. Cvjetni ili nektarni med	3
2.1.2. Medljikovac ili medun	6
2.2. KEMIJSKI SASTAV MEDA	7
2.2.1. Ugljikohidrati	8
2.2.2. Voda.....	8
2.2.3. Proteini i prolin	9
2.2.4. Vitaminski i mineralne tvari	10
2.2.5. Organske kiseline.....	10
2.2.6. Fenolni spojevi.....	11
2.2.7. Hidroksimetilfurfural	11
2.3. FIZIKALNO-KEMIJSKA I SENZORSKA SVOJSTVA MEDA	12
2.3.1. Viskoznost.....	12
2.3.2. Kristalizacija	12
2.3.3. Higroskopnost	12
2.3.4. Optička svojstva.....	13
2.3.5. Indeks refrakcije.....	13
2.3.6. Električna vodljivost	13
2.3.7. Specifična masa	13
2.4. PATVORENJE MEDA	14
2.5. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA PROTEINA U HRANI	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Uzorci.....	17

3.2. METODE	17
3.2.1. Određivanje udjela ukupnih proteina Kjeldahlovim postupkom	17
3.2.2. Određivanje prolina.....	20
3.2.3. Obrada podataka.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. UDIO UKUPNIH PROTEINA U MEDU	23
4.2. UDIO PROLINA U MEDU	30
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

1. UVOD

Med je prirodna slatka tvar koju proizvode pčele medarice (*Apis mellifera*) te se, bez obzira na napredak industrije, ne može industrijski sintetizirati. Visoko je konzumiran prirodni proizvod, ne samo zbog svog posebnog okusa i nutritivne vrijednosti, već i zbog povoljnog utjecaja na zdravlje. Zbog svojstava koja su bitno ili isključivo vezana za određenu regiju ili pojedinost lokalnog okoliša i flore, med se može klasificirati kao vrhunski proizvod koji se općenito percipira kao visokokvalitetan i cijenjen. Med i ostali pčelinji proizvodi zbog svoje relativno visoke cijene često su podložni patvorenju. Osim ekonomskih, patvorenje meda podrazumijeva i nutritivne te senzorske nedostatke za potrošača (Soares i sur., 2017).

Zbog čestih slučajeva patvorenja, med je kemijski dobro okarakteriziran. Unatoč niskom udjelu u medu, proteini se sve više istražuju te se koriste kao biljezi autentičnosti i pokazatelji kvalitete meda. Razlike u proteinskom sastavu meda mogu biti posljedica različitog podrijetla pčela i cvjetova, odnosno nektara kojeg pčele koriste tj. samog geografskog i botaničkog podrijetla meda (Bocian i sur., 2019). Prolin se smatra pokazateljem zrelosti meda, a može poslužiti i kao indikator kvalitete meda kao i patvorenja. Udio prolina nije zakonski obavezan parametar kvalitete meda, ali se u nekim laboratorijima koristi za kontrolu autentičnosti meda (Machado i sur., 2017).

Istraživanje proteina i prolina predstavljaju izazov zbog njihovog niskog i promjenjivog udjela u medu, a podaci o proteinima meda su u većini istraživanja korišteni za razlikovanje prirodnog i umjetnog meda (Chua i sur., 2013). U ovom istraživanju metodom po Kjeldahl-u, indirektno preko dušika, određen je udio ukupnih proteina u 57 uzoraka. Metoda određivanja udjela prolina predložena je od strane *International Honey Commission*, a definira se kao boja koja se razvije pomoću ninhidrina, uspoređuje se sa standardnom otopinom prolina te se izražava kao proporcija u masi meda (mg/kg).

Cilj ovog istraživanja bio je laboratorijskim analizama odrediti udio ukupnih proteina i prolina u uzorcima cvjetnog ($n = 40$) i livadnog ($n = 17$) meda te dobivene analitičke rezultate usporediti s vrijednostima udjela ukupnih proteina i udjela prolina navedenim u okviru dostupnih znanstvenih istraživanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA I VRSTE MEDA

Prema Pravilniku o medu (Pravilnik, 2015) med se definira kao prirodno sladak proizvod kojeg proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) 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. Med sadrži šećere, prije svega glukozu i fruktozu te saharozu, maltozu i druge polisaharide, uključujući i dekstrine, bjelančevine, aminokiseline, enzime, organske kiseline, pelud, mineralne i druge tvari. Boja meda može varirati od vrlo svijetlih do tamnijih nijansi, od gotovo bezbojne do tamnosmeđe boje. Med može biti tekuće ili viskozne konzistencije, djelomično ili potpuno kristaliziran. Aroma meda može varirati, ali mora potjecati od izvornog bilja. Med je savršen proizvod prirode. Također, boja, okus, aroma i tekstura meda ovise o cvjetnom nektaru iz kojeg je dobiven (bagrem, lipa, kesten, vriješak, lavanda, suncokret i brojne druge vrste). Uz utjecaj ostalih biljaka koje cvatu u vrijeme glavne paše, boja i okus variraju od godine do godine čak i na istom području. Med nije jednoličan proizvod, sastav mu se mijenja s obzirom na sastav sirovina od kojih pčela proizvodi med te ovisno o godišnjem dobu (Bocian i sur., 2019; Bogadanov i sur., 2008).

Prema *Codex Alimentarius* med se definira kao prirodna slatka tvar koju od nektara biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka, odnosno izlučevina kukaca koji sišu sokove na živim dijelovima biljaka, proizvode pčele medarice (*Apis mellifera*), na način da iste skupljaju, preinačuju ih dodajući im vlastite specifične tvari, odlažu, isušuju, pohranjuju i ostavljaju u saću da dozrije (Codex Alimentarius Commission, 2001).

Osnovne vrste meda su:

1. Prema podrijetlu:

- **cvjetni ili nektarni med:** med dobiven od nektara biljaka
- **medljikovac ili medun:** med dobiven uglavnom od medne rose (izlučevina kukaca (Hemiptera) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka).

2. Prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja:

- **med u saću:** med koji skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u

poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća

- **med sa saćem ili med s dijelovima saća:** med koji sadrži jedan ili više proizvoda iz prethodno definiranog meda u saću
- **cijedeni med:** med koji se dobiva ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla
- **prešani med:** med dobiven prešanjem saća bez legla, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45° C
- **vrcani med:** med dobiven vrcanjem, odnosno centrifugiranjem otvorenog saća bez legla
- **filtrirani med:** med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi (Pravilnik, 2015).

2.1.1. Cvjetni ili nektarni med

Cvjetni ili nektarni med je med koji proizvode pčele od nektara medonosnih biljaka različitih vrsta. Nektar je slatka tekućina koju izlučuju biljne žlijezde nektarije, a sastoji se uglavnom od vode i različitih vrsta šećera od kojih su najzastupljeniji saharoza, glukoza i fruktoza. U sastavu nektara mogu se naći i oligosaharidi poput rafinoze, melebioze itd., dušikovi i fosfori spojevi, vitamini (naročito vitamin C), organske kiseline, pigmenti, aromatski spojevi, mineralne tvari, aminokiseline i enzimi. Medonosne pčele pomoću enzima složene šećere u sakupljenom nektaru pretvaraju u jednostavne šećere. Pčele enzimima koje proizvode njihove žlijezde slinovnice potiču razgradnju saharoze na glukozu i fruktozu djelovanjem enzima invertaze, a djelovanjem enzima amilaze saharoza se razgrađuje na glukozu. Jednostavniji šećeri tako med čine slađim od konzumnog šećera radi većeg udjela fruktoze, a time i lakše probavljivijim. Nektar prenose u košnice te ga prerađuju, odlažu u ćelije košnice i dehidriraju do udjela vode između 17 do 18 % (Riddle, 2016). Količina i kvaliteta nektara (volumen i kemijski sastav) mogu uvelike varirati ovisno o čimbenicima okoliša, posjetima oprašivača i mikrobnj kontaminaciji (Nicolson, 2022).

Nektarni med može biti monoflorni i poliflorni. Monoflorni med je onaj koji u netopljivom sedimentu sadrži najmanje 45 % peludnih zrnaca iste biljne vrste s izuzecima pitomog kestena (*Castanea sativa*) gdje udjel peludnih zrnaca u netopivom sedimentu iznosi najmanje 85 %, lucerne (*Medicago sp.*) 30 %, ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) 30 %, lipe (*Tilia sp.*) 25 %, kadulje (*Salvia sp.*) 20 %, bagrema (*Robinia pseudacacia*) 20% i lavande (*Lavandula sp.*) 20 %. Poliflorni med je mješavina meda različitih vrsta. Postoji i tzv. miješani med koji je

mješavina nektarnog meda i medljikovca (Vahčić i Matković, 2009).

Različite vrste meda dobile su ime po biljkama s kojih pčele skupljaju nektar (npr. bagrem, kadulja, lipa, kesten), a ako pčele sakupljaju nektar s različitih biljaka dobivamo livadni med, voćni med i dr. (poliflorni med). Navedene su najznačajnije vrste cvjetnog meda i medonosnog bilja u Republici Hrvatskoj.

Bagrem (*Robinia pseudoacacia L.*) je trajna biljka, porijeklom iz sjeverne Amerike, a najveće bagremove šume u Hrvatskoj nalaze se u Baranji, Podravini i na Moslavačkoj gori. Bagrem cvjeta u drugoj polovici svibnja i početkom lipnja, 10 do 12 dana. Čisti bagremov med bez primjesa vrlo je svijetao, staklasto je proziran, gotovo bezbojan te je slabog mirisa. Zbog svojih specifičnih svojstava ubraja se u najcjenjenije vrste meda. Mjesecima ostaje u tekućem stanju i jedan je od vrsta meda koji vrlo sporo kristalizira zato što u sastavu sadrži više fruktoze od glukoze. Bagremov med je prvorazredna stolna vrsta meda (Šimić, 1980).

Kesten (*Castanea sativa Mill.*) je jednodomna biljka visokog i razgranatog stabla i raste u samoniklim šumama od kojih su najveće u okolini Petrinje, Hrvatske Kostajnice, Dvora na Uni, Zagreba (Medvednica) i u Istri. Kesten je najmedonosnija voćna vrsta (zbog vrijednih plodova kesten se ubraja u voćke) i jedina koja spada u biljke glavne pčelinje paše. Cvatnja kestena počinje u drugoj polovici lipnja i traje oko 10 dana, ali kako sva stabla ne procvatu odjednom cvatnja potraje i 20 dana (Vahčić i Matković, 2009). Kestenov med je tamnosmeđe boje, vrlo jakog i oštrog mirisa po samoj biljci. Karakterističan je po svojoj trpkosti, zbog čega ga mnogi potrošači ne voli, no idealan je za one koji ne vole slatke vrste meda. Med od kestena ima ljekovita svojstva koja mogu pomoći kod različitih zdravstvenih stanja te za jačanje imuniteta. Sadrži brojne minerale i vitamine, među kojima su vitamin C, B, kalij, mangan, željezo itd. Pripisuje mu se antibakterijsko i protuupalno djelovanje te pomaže u liječenju bolesti jetre i želučanih oboljenja, stoga je dosta tražena vrsta. Ostaje tekuć do mjesec dana te kristalizira u srednje krupne kristale (Šimić, 1980).

Lipa (*Tilia L.*) spada među najmedonosnije biljke. Najzastupljenije vrste su sitnolisna lipa (*Tilia parvifolia Ehrh.*), krupnolisna lipa (*Tilia grandifolia Ehrh.*) i srebrnolisna lipa (*Tilia argentea Desf.*). Lipa cvjeta od kraja lipnja, a u Hrvatskoj je najrasprostranjenija na području Bilogore. Lipov med je svijetložut do blago zelenkast, ugodnog, malo gorkastog okusa s blagim mirisom po cvijetu lipe. Sporo kristalizira (Vahčić i Matković, 1980). Zbog blagog okusa i mirisa preporučuje se maloj djeci te starijim osobama koje imaju problema s osjetljivim želucom ili crijevima.

Kadulja (*Salvia officinalis L.*) je biljna bogata eteričnim uljima koja daju veoma kvalitetan i ljekovit med. Kaduljin med je svijetložute do zelenkaste boje. U Hrvatskoj je široko rasprostranjena na područjima primorskog i dalmatinskog krša te u nekim predjelima Istre. Kadulja počinje cvasti krajem travnja ili početkom svibnja i to najprije bliže moru, a zatim u unutrašnjosti i u višim predjelima gdje cvatnja završava oko polovice lipnja. Najbolje medi kad je toplo vrijeme s dosta vlage u zraku, a šteti joj promjenjivo, kišno i hladno, kao i presuho i vjetrovito vrijeme (Vahčić i Matković, 1980). Okus meda kadulje je blag i ugodan, a karakteristična je i blaga gorčina. Kadulja cvijeta krajem travnja i početkom svibnja, a područja u kojem je u Hrvatskoj rasprostranjena su područje Istre te na primorskom području. Dugo ostaje u tekućem stanju te kristalizira nakon tri do četiri mjeseca u srednje krupne kristale. S obzirom da je kadulja ljekovita biljka, med od kadulje pomaže u liječenju bolesti dišnih organa, što kaduljin med čini vrijednim proizvodom (Šimić, 1980).

Lavanda (*Lavandula officinalis L.*) je višegodišnji gust grm s uskim, svijetlim listovima i ljubičasto-modrim cvjetovima skupljenim pri vrhu grančica. U našu zemlju prenesena je iz Francuske, a najviše je raširena na otoku Hvaru. Lavanda cvate u lipnju i srpnju, oko 30 dana. Veoma je bogat izvor nektara i daje visoke prinose meda po košnici. Med lavande je svijetložute boje, bistar i proziran, jakog mirisa po biljci i oštrog okusa zbog čega mnogim potrošačima nije omiljen.

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis L.*) je zimzeleni samonikli grm s vrlo niskim zadebljanim listovima i modrim cvjetovima smještenim u pršljenovima između listova. Kod nas raste na dalmatinskim otocima, najviše je rasprostranjen na otocima Šolti, Hvaru, Visu, Korčuli, Lastovu i Dugom otoku. Ružmarin je vrlo medonosna biljka, ali daje malo peluda. Cvjeta veći dio godine, od rujna do svibnja, a u proljeće cvatnja može trajati preko 40 dana. Med ružmarina je svijetao i proziran poput ulja. Bez mirisa je, ugodnog i blagog okusa i brzo kristalizira u fine sitne kristale. U čvrstom je stanju potpuno bijel (Vahčić i Matković, 2009; Šimić, 1980).

Metvica (*Mentha longifolia*) je višegodišnja zeljasta biljka, ugodnog i vrlo aromatičnog mirisa. Med od metvice je tamnocrvenkaste boje. Vrlo je jakog mirisa po mentolu i oštrog slatko-kiselkastog okusa. Poslije vrcanja brzo se kristalizira i promijeni boju u tamnožutu (Šimić, 1980).

Suncokret (*Helianthus annuus L.*) je jednogodišnja biljka koja se prvenstveno uzgaja zbog proizvodnje ulja. Suncokret cvjeta početkom srpnja i medenju pogoduje stabilno vrijeme s dosta

vlage u zraku, a najrasprostranjeniji je u području Slavonije. Med od suncokreta je jantarnožut, slabog mirisa po biljci, slatkog do malo trpkog okusa. Poslije vrcanja brzo kristalizira (Vahčić i Matković, 2009)

Amorfa (*Amorpha fruticosa L.*) je grmolika biljka, visine do 2 metra. Cvjetovi rastu na vrhovima grančica i tamnocrvene su do ljubičaste boje, odakle potiče i tamnocrvena boja meda. Amorfin med je blagog mirisa i okusa. Amorfa se još zove i kineski bagrem ili bagremac. Cvjeta početkom lipnja, oko 15 dana, odmah poslije bagrema. U Hrvatskoj najviše amorfe raste u šumama pored rijeke Odre, Novske i Okučana, a također i po šumama u slavonskoj Posavini (Šimić, 1980).

Vrijesak (*Calluna vulgaris L.*) je višegodišnja biljka. Med od vrijeska varira od žute do tamnožute boje, a miris i okus su blagi.

Livadni med je med od različitog livadnog cvijeća i drugih biljaka. U njemu se može manje ili više naći i medljike, lipe, unosa s raznih korova ili čega drugoga što cvate u isto vrijeme. Boja livadnog meda varira od svijetle do tamnožute, a kristalizacija se odvija brže ili sporije, također ovisno o tome s kojih biljaka je sabran. Upravo zbog toga što je sakupljan s mnogih biljnih vrsta, u sebi nosi sve osobine dobrog i vrijednog meda (Šimić, 1980).

2.1.2. Medljikovac ili medun

Medljikovac je med što ga pčele proizvode od medne rose. Medljika (medna rosa, medun) je slatki sok koji se javlja na površini listova bjelogorice ili iglicama četinjača te na mnogim travama i žitaricama. Medun proizvode biljne uši (štitaraste i lisne) i ispuštaju ga na listove, iglice ili koru drveća, a pčele i drugi kukci tu slatku masu ližu. Pčele ju donose u košnicu, kao i nektar. Od nje proizvode med i hrane leglo. Medljike ima najviše u hrastovim šumama u Slavoniji, Turopolju i okolici Siska te na jelama Gorskog Kotara i Like. U usporedbi s nektarnim medom, medljikovac ima intenzivniju boju i veći udio mineralnih tvari. Medljikovac sadrži složeniju mješavinu šećera od nektara, a med od medljikovca ima osjetno veću redukciju disaharida i više šećera od cvjetnog meda. Trisaharid melizitoza, kojeg nema u cvjetnom medu, često je prisutan u količinama većim od 10% u medljikovcu (Doner, 1977).

U Hrvatskoj su najznačajnije vrste medljikovca:

- Jelov medljikovac je tamnosive do smeđe-zelene boje, a karakterizira ga miris srednjeg

intenziteta koji podsjeća na smolu crnogorice. Lisne uši iz roda *Cinara* luče medljiku u razdoblju od sredine lipnja do početka zime ovisno o geografskom položaju, klimi te vremenskim uvjetima u pojedinoj godini. U Hrvatskoj je jelov medljikovac najrašireniji u području Gorskog Kotra i na području Male i Velike Kapele. Jelov medljikovac spada u najcjenjenije medove Europe.

- Hrastov medljikovac je karakterističan po svojoj tamnocrvenoj boji, kao i po niskointenzivnom mirisu na hrast. Hrastov medljikovac je oporog okusa, a konzistencija mu je gusta i rastezljiva što otežava vrcanje iz saća. Manje je cijenjen, iako sadrži više željeza i drugih mineralnih tvari nego cvjetni med. Hrastov medun proizvode i lisnate i štitaste uši, a područja najrasprostranjenija šumama hrastom u Hrvatskoj su područje Siska, Jasenovca i Turopolja te Slavonije.
- Smrekov medljikovac je tamno jantarne boje s crvenkastom nijansom, intenzivnog mirisa po smoli, podsjeća na sirup i biljne bombone. Mednu rosu skupljaju štitaste uši iz roda *Physokermes*, a najveće smrekove šume nalaze se u Gorskom Kotaru (Šimić, 1980).
- Medljikovac od medljike medećeg cvrčka je mutne tamnosmeđe boje, slabo izražene slatkoće te okusom podsjeća na melasu i suho voće. U Hrvatskoj je rasprostranjen na području Istre (Persano Oddo i Pirro, 2004).

Medljikovac u Hrvatskoj smatra manje vrijednim od nektarnog meda, ali se zato dosta izvozi i postiže se dobra cijena budući da je u npr. Austriji, Njemačkoj i Švicarskoj medljikovac najcjenjenija vrsta meda (Vahčić i Matković, 2009).

2.2. KEMIJSKI SASTAV MEDA

Med je namirnica vrlo složenog kemijskog sastava vrlo cijenjena zbog njegove nutritivne vrijednosti. Ugljikohidrati su najzastupljeniji sastojak meda koji čine oko 95% od suhe tvari ovisno o vrsti, od kojih najviše ima invertnog šećera, glukoze i fruktoze. Zatim slijedi voda s udjelom između 15 do 23 %, a u manjim količinama med sadrži mnoštvo različitih sastojaka kao što su bjelančevine (uključujući enzime i slobodne aminokiseline) vitamine, mineralne tvari, organske kiseline, antioksidanse, eterična ulja, polifenole i arome (Bogdanov i sur., 2008). Na sastav meda utječu razni parametri kao što su vrste i udjeli biljaka od kojih med potječe, klimatski uvjeti, pasmina pčela kao i stručnost pčelara, način dorade i skladištenje meda. Razlike u svojstvima i sastavu među pojedinim vrstama meda također ovise o sastavu nektara i količini peluda s medonosne biljke te se može reći kako ne postoje dva uzorka meda koja su

identična.

Med je zbog prisutnosti peludi potencijalan alergen, međutim, istraživanja pokazuju da su alergije na med relativno rijetke u odnosu na druge alergije na hranu.

2.2.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su glavni sastojak meda i njihov udjel iznosi 73-83 %, što med čini prezasićenom otopinom šećera. Najzastupljeniji monosaharid je fruktoza s prosječno 39,1 % i glukoza s udjelom 30,3 %. Omjer tih šećera ovisi o izvoru, odnosno cvjetnoj paši, a donekle i o enzimu invertazi koji razgrađuje šećere u voću. Glukoza i fruktoza čine prosječno 88-95% ukupnih ugljikohidrata, daju medu slatkoću, energetska vrijednost te najviše utječu na njegova fizikalna svojstva kao što su viskoznost, gustoća, ljepljivost, sklonost kristalizaciji, higroskopnost te mikrobiološka aktivnost. Med je u prosjeku 1,5 puta slađi od konzumnog šećera jer je količinski najzastupljeniji šećer u medu fruktoza. Približno 95 % šećera prisutnih u medu je fermentabilno, što je važno u proizvodnji medovine i pekarskih proizvoda. Med s udjelom šećera višim od 83 % i udjelom vode ispod 17,1 % nije sklon fermentaciji ukoliko se pravilno skladišti (Vahčić i Matković, 2009). Omjer fruktoze i glukoze te omjer glukoze i vode u medu su vrlo bitni jer se pomoću njih može odrediti i predvidjeti tendencija kristalizacije meda. Taj omjer je karakterističan za pojedine vrste meda i u većini je slučajeva veći od 1,0 (Krell, 1996).

Osim fruktoze i glukoze, neki od najzastupljenijih šećera su maltoza, izomaltoza, nigerioza, kobioza, laminariboza, turanoza, gentiobioza i izomaltuloza melibioza, a od oligosaharida se ističu erloza, melecitoza, maltotrioza, panoza, izopanoza i rafinoza (Sanz i sur., 2004). Trehaloza, melecitoza i rafinoza su ugljikohidrati karakteristični za medljikovac, a erloza je karakteristična za neke vrste uniflornog meda - lavandin, ružmarinov, bagremov, a također i medljikov med. Ukupni reducirajući šećeri manje su zastupljeni u medljikovcu nego u nektarnom medu.

2.2.2. Voda

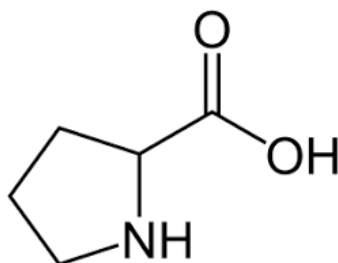
Voda je nakon ugljikohidrata drugi najzastupljeniji sastojak meda i njezin se udjel u kreće između 15 i 23 %. Udjel vode značajno utječe na određena fizikalna svojstva meda kao što su kristalizacija i viskoznost. Udjel vode najvažniji je parametar kakvoće meda budući da određuje stabilnost meda i otpornost na mikrobiološko kvarenje tijekom čuvanja (Bogdanov i sur., 1999a). Međunarodno je priznato da kvalitetan med treba prerađivati s manje od 20% udjela

vode. Poželjan je nizak udio vode jer med može početi fermentirati i izgubiti svježiu kvalitetu ako je udio vode u medu veći od 20%. Nepasterizirani med fermentira jer sadrži divlji kvasac. Međutim, zbog visoke koncentracije šećera u medu, manje je vjerojatno da će ti kvasci uzrokovati fermentaciju u medu s niskim udjelom vode (Tafere, 2021). Prema Pravilniku o medu (2015) med koji se stavlja na tržište ne smije imati udjel vode veći od 20 %.

2.2.3. Proteini i prolin

Proteini u medu dolaze iz nektara, peludi i žlijezda pčela kao sastavnih dijelova biljaka. Proteini u medu mogu biti vrlo složene strukture ili u obliku jednostavnih spojeva, tj. aminokiselina. Udio aminokiselina i proteina je relativno nizak, a iznosi najviše oko 1,7 %. Neki znanstvenici smatraju da glavne količine proteina dopijevaju u med iz žlijezda slinovnica pčela prilikom prerade nektara i medljike, dok drugi tvrde da je najveći izvor proteina pelud, koja je prilično bogata proteinima (10-35 %). Udjel proteina u medu kreće se od 0 do 1,7 % pri čemu su neki u veznom obliku, a neki kao slobodne aminokiseline. Medljikovac sadrži više proteina od nektarnog meda (White, 1978). Med sadrži gotovo sve fiziološki važne aminokiseline, a glavna i najzastupljenija aminokiselina je prolin čiji se udio kreće od 80 do 90 % (Batinić i Palinić, 2014).

Prolin je najzastupljenija aminokiselina u medu te se koristi kao standard za kvantificiranje ukupnog udjela aminokiselina u medu. Prolin se smatra pokazateljem zrelosti meda, a može poslužiti i kao indikator kvalitete meda kao i patvorenja. Udio prolina u medu trebao bi biti viši od 200 mg/kg. Vrijednosti prolina ispod 180 mg/kg znače da je med vjerojatno patvoren dodatkom šećera (Meda i sur., 2005; Tafere, 2021). Mali dio proteina prisutnih u medu su enzimi. Osnovne enzime u medu predstavljaju: dijastaza, invertaza, glukoza oksidaza i katalaza. Dijastaza i invertaza imaju važnu ulogu u određivanju kvalitete meda i mogu se koristiti kao indikatori svježine meda (Krell, 1996).



Slika 1. Kemijska struktura prolina (Panasik i sur., 2009)

2.2.4. Vitamini i mineralne tvari

Vitamini su u medu prisutni u vrlo niskim udjelima tako da med ne možemo smatrati bogatim izvorom ovih nutrijenata. U medu se uglavnom nalaze vitamini B skupine kao što su riboflavin, pantotenska kiselina, piridoksin, biotin, nikotinska kiselina i tiamin. Osim toga prisutan je i vitamin C, no njega u većem udjelu ima u medu u saću i gubi se prilikom proizvodnje. Također, komercijalni proces filtracije i oksidacija vodikovim peroksidom, koji je prirodno prisutan u medu, mogu pridonijeti gubitku vitamina C u medu (Seraglui i sur., 2019). U nekim vrstama meda u malim se udjelima mogu naći i provitamin A, vitamin E i vitamin K. Udio vitamina u medu ovisi o biljci s koje je pčela skupljala nektar, o zrelosti meda, o peludi u medu i o načinu na koji se postupa s medom prilikom njegovog čuvanja. Ipak, pelud je glavni izvor vitamina za pčele pa će tako udio i vrsta vitamina u medu ovisiti prvenstveno o vrsti peluda kojeg su pčele skupile.

Med sadrži različite mineralne tvari. Glavni element koji se nalazi u medu je kalij, s prosječno oko jedne trećine ukupnog udjela, uz mnoge druge minerale kao što su kalcij, natrij, fosfor, magnezij, silicij, željezo, klor, sumpor, mangan i bakar. Udio elemenata u tragovima u medu uglavnom ovisi o botaničkom podrijetlu meda. Minerala ima oko 3,68 %. Iako ih nema u velikom udjelu, minerali u medu podižu nutritivnu vrijednost meda prehranu pri čemu su tamne vrste meda su bogatije mineralnim tvarima od svijetlih (Tafere, 2021).

2.2.5. Organske kiseline

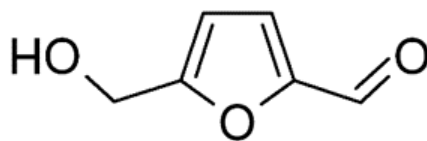
Med zbog visokog udjela šećera prikriva kiselost okusa. Prosječni pH meda je 3,9. Prvotno se mislilo da su mravlja i limunska kiselina dominantne kiseline u medu, no otkriveno je da glukonska kiselina (2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanska kiselina) prevladava u medu. Proizvodi ga glukoza oksidaza iz pčelinjih izlučevina koje djeluju na glukozu. Koncentracija glukonske kiseline uz koncentraciju limunske kiseline koristi se kao jedan od parametara razlikovanja medljikovca i nektarnog meda. Druge kiseline koje su identificirane u medu su octena, maslačna, limunska, mravlja, mliječna, maleinska, jabučna, oksalna i jantarna kiselina (Ball, 2007). Udio slobodnih kiselina je jedan od parametara koji je određen Pravilnikom o medu (Pravilnik, 2015), a propisano je da med koji se stavlja na tržište (s izuzetkom pekarskog meda) smije imati najviše 50 mEq slobodnih kiselina na 1000 grama meda.

2.2.6. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju antioksidacijski učinak, odnosno sprječavaju oksidaciju drugih tvari koja je posljedica djelovanja slobodnih radikala. U medu potiču iz nektara, propolisa ili voska, a maseni udio flavonoida u medu se kreće u rasponu od 60 do 460 µg/100g meda. Najzastupljeniji flavonoidi u medu su apigenin, galangin, pinocembrin, kamferol, kvarcetin, krizin, pinobanksin, luteolin i hesperitin, a najzastupljenije fenolne kiseline su galna, kumarinska, ferulinska kiselina (Mujić i sur., 2014).

2.2.7. Hidroksimetilfurfural

Hidroksimetilfurfural (HMF) je heterociklički organski spoj sa šest atoma ugljika koji sadrži i aldehidnu i alkoholnu funkcionalnu skupinu. HMF je kruta, žuta tvar koja ima nisko talište, ali je visoko topljiva u vodi. HMF je produkt razgradnje fruktoze, jednog od glavnih šećera u medu, koji se stvara polako i prirodno tijekom skladištenja meda, i još brže kad se med zagrije. Količina HMF-a prisutnog u medu je referenca koja se koristi kao smjernica za količinu zagrijavanja koja se dogodila: što je veća vrijednost HMF-a, smatra se da je kvaliteta meda niža. Neke zemlje postavljaju ograničenje HMF-a za uvezeni med (ponekad 40 miligrama po kilogramu), a med s vrijednošću HMF-a višom od te granice neće biti prihvaćen (Tafere, 2021). Pravilnikom o medu (2015) u Hrvatskoj je utvrđeno da maseni udio HMF-a u medu ne smije prelaziti 40 mg/kg, a iznimka je med koji potiče iz regija s tropskom klimom i kod takvih vrsta meda je gornja granica 80 mg/kg.



Slika 2. Kemijska struktura hidroksimetilfurfurala (Yang i sur., 2019)

2.3. FIZIKALNO-KEMIJSKA I SENZORSKA SVOJSTVA MEDA

U fizikalna svojstva meda ubrajaju se kristalizacija, viskoznost, higroskopnost, električna vodljivost, optička svojstva, indeks refrakcije te specifična masa i usko su povezana sa kemijskim sastavom meda.

2.3.1. Viskoznost

Viskoznost je fizikalno svojstvo meda koje predstavlja stupanj otpora tekućine prema tečenju te je u korelaciji s drugim fizikalno-kemijskim i senzorskim svojstvima. Viskoznost meda, kao i mnoga druga fizikalna svojstva, ovisi o mnogim čimbenicima uključujući udio vode i temperaturu (Gomez-Diaz i sur., 2009). Med s malim udjelom vode teče polako, no med koji ima 15 % više vode fluidniji je do tri puta. Povećanjem temperature smanjuje se viskoznost meda (Mujić i sur., 2014)

2.3.2. Kristalizacija

Kristalizacija je prirodan i spontan proces koji se odvija u medu. Sklonost meda da kristalizira ovisi o stupnju koncentracije šećera u medu, odnosno o omjeru fruktoze i glukoze te je poželjno da fruktoze bude više jer je proces kristalizacije tada sporiji. Do kristalizacije dolazi kad glukoza iz tekućeg stanja prelazi u male kristalne nakupine. Kristalizacija ovisi i o temperaturi, kristalizacija je sporija pri višim temperaturama, a ovisi i o drugim čimbenicima kao što su vlažnost zraka i vrijeme skladištenja. Iako med kristalizacijom ne gubi svoju vrijednost i kvalitetu, moguće su jedino promjene boje i u nekim slučajevima okusa te zbog odbojnosti potrošača prema kristaliziranom medu ona se nastoji izbjeći (Hamdan, 2010; Vahčić i Matković, 2009).

2.3.3. Higroskopnost

Higroskopnost je fizikalno svojstvo meda koje tekućim i čvrstim tvarima omogućuje upijanje i zadržavanje vode iz okoline. Ovo svojstvo meda ovisi o udjelu šećera i vode u medu te se pri skladištenju mora obratiti pozornost na relativnu vlažnost zraka kako ne bi došlo do fermentacije i kvarenja meda. Zbog velike viskoznosti meda gibanje apsorbirane vode s površinskih slojeva u unutrašnjost meda vrlo je sporo, tako da se promjene koje nastaju zbog higroskopnosti očituju uglavnom na površini meda (Vahčić i Matković, 2009).

2.3.4. Optička svojstva

Optička aktivnost je sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti, a povezana je sa sastavom i udjelom pojedinih šećera. Fruktaza zakreće ravninu polarizirane svjetlosti u lijevo, dok glukoza, disaharidi i ostali oligosaharidi u desno, pa se zbog toga optička aktivnost meda koristi kao jedan od parametara za razlikovanje nektarnog meda i medljikovca, obzirom da medljikovac zakreće ravninu polarizirane svjetlosti u desno, a nektarni med u lijevo (Mujić i sur., 2014; Vahčić i Matković, 2009).

2.3.5. Indeks refrakcije

Indeks refrakcije je fizikalna veličina koja se definira kao omjer brzine svjetlosti u vakuumu i brzine svjetlosti u nekoj tvari. Određuje se pomoću refraktometra pri konstantnoj temperaturi od 20 °C jer je indeks loma ovisi o temperaturi, a radi na principu loma svjetlosti kada ona prolazi kroz otopinu meda. Mjerenje indeksa loma se provodi kako bi se utvrdio udio vode ili topljive suhe tvari u medu (Vahčić i Matković, 2009).

2.3.6. Električna vodljivost

Električna vodljivost je fizikalno svojstvo koje ovisi o udjelu mineralnih tvari i kiselina u medu; što je on veći, veća je i električna vodljivost meda. Parametar služi za procjenu kvalitete, a također služi i kao kriterij za raspoznavanje botaničkog podrijetla meda, odnosno za razlikovanje cvjetnog meda od medljikovca. S obzirom na to da se medljikov med odlikuje puno većim udjelom mineralnih tvari, njegova električna vodljivost prema hrvatskoj i europskoj regulativi mora biti veća od 0,8 mS/cm.

2.3.7. Specifična masa

Specifična masa meda predstavlja omjer mase meda prema masi iste količine vode i ovisi prvenstveno o udjelu vode u medu. Specifična masa kvalitetnih vrsta meda veća je od 1,42. Na specifičnu masu meda može utjecati medonosno bilje od kojeg potječe nektar (Katalinić, 1985).

2.4. PATVORENJE MEDA

Med je visoko konzumiran prirodni proizvod, ne samo zbog svog okusa i nutritivne vrijednosti, već i zbog povoljnog utjecaja na zdravlje. Zbog svojstava koja su bitno ili isključivo vezana za određenu regiju ili pojedinost lokalnog okoliša i flore, med se može klasificirati kao vrhunski proizvod koji se općenito percipira kao visokokvalitetan i cijenjen proizvod zbog svog poželjnog okusa i svojstava. Med i ostali pčelinji proizvodi zbog svoje relativno visoke cijene često su podložni patvorenju. Med se ubraja među najčešće patvorene namirnice, uz maslinovo ulje, mlijeko, šafran, sok od naranče, sok od jabuke i kavu, pri čemu se zamjenjuju sastojci ili dodaju manje kvalitetni i jeftiniji sastojci ili se izdvajaju visoko cijenjeni sastojci u svrhu prodaje istih kao zaseban proizvod. Razlog patvorenja je gotovo uvijek ekonomska isplativost (Jaafar i sur., 2020). Osim ekonomskih, patvorenje meda podrazumijeva i nutritivne te senzorske nedostatke za potrošača.

Za patvorenje meda danas se koriste različita sredstva, a najčešće se koristi invertni šećer, škrobni sirupi, saharoza, melasa, zbog sličnosti nekim svojstvima, dostupnosti i cijeni. Osim toga, na tržištu se pojavljuje i na druge načine patvoren med, što predstavlja problem kako kupcima tako i proizvođačima meda. Provjera autentičnosti meda obuhvaća 2 glavna aspekta: proizvodnja, s glavnim pitanjima koja se odnose na dodavanje šećernog sirupa, filtraciju, toplinsku obradu i udio vode; i označeno podrijetlo (zemljopisno i/ili botaničko) i „organsko” podrijetlo (Soares i sur., 2017).

Sastav meda uglavnom ovisi o njegovom cvjetnom izvoru kao i enzimskim i drugim komponentama koje pčele dodaju u med pri transformaciji nektara. Makrosastojci meda su po svom kemijskom sastavu vrlo bliski invertnom šećeru, saharozi, melasi, ali mikrosastojci meda definiraju njegovo porijeklo. Prema definiciji od strane *Codex Alimentarius* u med se ne smije dodati nijedan sastojak hrane niti bilo koji njegov posebni sastojak ukloniti. Danas su u cilju otkrivanja patvorenja meda, razvijene brojne metode (Šubarić i Jašić, 2017).

Najjednostavniji i najstariji način patvorenja meda je otapanje konzumnog šećera u vodi kako bi se dobio gusti sirup koji se onda miješa s prirodnim medom. Umjesto otopine običnog šećera koristiti se i gusti sirup od glukoze. Ovako patvoreni med se može jednostavno detektirati polarimetrijski. Naime, u prirodnom pčelinjem medu dominira invertni šećer koji je optički lijevo aktivan, dok je otopina saharoze optički desno aktivna. Međutim, ukoliko se med patvori

dodavanjem otopine invertnog šećera koja se dobije kuhanjem običnog šećera u vodi uz dodatak kiseline, utvrđivanje patvorenja je kompleksnije. Tu se najčešće koristi anilinski klorid koji patvoreni med oboji u crveno, dok prirodni med ne mijenja boju. Taj način ipak nije uvijek pouzdan tako da se često koristi u kombinaciji s analizom određenih fizikalno-kemijskih parametara kao što su udio mineralnih tvari, prisutnost peludi, fitokemikalija, organskih kiselina i sl. (Belčić i sur., 1979). Bertelli i suradnici (2010) objavili su učinkovitu metodu za detekciju patvorenog meda pomoću šećernih sirupa koja uključuje jednodimenzionalno (1D) i dvodimenzionalno (2D) nuklearnu magnetsku rezonancu (engl. *Nuclear magnetic resonance*, NMR)u kombinaciji s multivarijantnim statističkim analizama.

Drugi način patvorenja meda je hranjenje pčela šećernim sirupom. Pčele saharozu iz tog sirupa razgrađuju i tako nastaje invertni šećer kojeg odlažu u saće. Vrcanjem saća se dobije med. Detekcija ovakvih patvorina nije jednostavna jer danas postoji niz različitih sirupa čiji je sastav prilagođen sastavu nektara. Ti sirupi sadrže otprilike iste ugljikohidrate u istim omjerima kao i prirodni med, a dodaju im se i ostali karakteristični sastojci poput mineralnih tvari, vitamina, aminokiselina i slično (Cordela i sur., 2005).

Ruiz-Matute i suradnici (2010) proučavali su sastav šećera visokofruktoznog kukuruznog sirupa korištenjem plinske kromatografije spojene s masenom spektrometrijom (GC-MS). Saharozni sirupi analizirani su paralelno kao kontrola. Pokazalo se da kukuruzni sirup sadrži fruktozil-fruktozu i druge šećere. Med proizveden korištenjem sirupa za prihranu pčela je također analiziran kako bi se otkrio učinak ovih sirupa na sastav šećera. Fruktozilfruktoza je otkrivena u medu proizvedenom od strane pčela hranjenih HFCS-om (engl. *High-fructose corn syrup*).

Detekcija patvorenja meda uključuje primjenu različitih instrumentalnih tehnika. Vrsta primijenjene tehnike zasniva se na procijenjenoj vrsti patvorenja. Jedan od načina sprječavanja patvorenja je uspostava kontrole i monitoringa cjelokupnog lanca proizvodnje, od ispaše pčela do deklariranja i označavanja proizvoda te u tom pogledu stvaranja posebnih robnih marki. Također je potrebno razviti nove metode i standarde koji mogu detektirati prisutnost i stupanj neizravnog patvorenja meda (Šubarić i Jašić, 2017; Zábrodská i Vorlová, 2014).

2.5. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA PROTEINA U HRANI

Proteini su iznimno značajne makromolekule za brojne funkcije metabolizma, a udio proteina u prehrambenim proizvodima pokazatelj je njihove nutritivne vrijednosti. Određivanje udjela ukupnih proteina indirektno određivanjem dušika značajno je u analitici i kontroli kvalitete hrane. Razvijene su brojne analitičke metode koje omogućuju određivanje udjela proteina u hrani, a većina tih metoda temelji se na određivanju udjela dušika. Metode po Dumasu, Meulen-Heslingu, Will-Varentroppu i Kjeldahlu pripadaju grupi metoda kojima se udio proteina određuje indirektno preko dušika (Marković i sur., 2017).

Metoda po Kjeldahl-u razvijena je 1883. godine i sastojala se od tri glavna koraka: spaljivanje sa sumpornom kiselinom (uz dodatak kalijeva permanganata), neutralizacija otopine amonijeva sulfata, destilacija u poznati volumen kiseline poznate koncentracije te titracija. U okviru metoda određivanja bjelančevina indirektno preko dušika, metoda po Kjeldahl-u ima najširu primjena u praksi. Princip metode sastoji se u vlažnom spaljivanju namirnice koncentriranom sumpornom kiselinom i redukciji dušika do amonijaka. Kjeldahl metoda koristi sumpornu kiselinu, razne katalizatore i soli za pretvorbu organski vezanog dušika u uzorcima u amonijak uz njegovo naknadno mjerenje. Nekoliko značajnih modifikacija poboljšalo je izvornu metodu s ciljem skraćivanja vremena spaljivanja dodavanjem raznih katalizatora ili raznih soli koje povišuju temperaturu vrenja sumporne kiseline. Najčešće primjenjivani katalizatori su bakar u obliku bakrovog sulfata, živa elementarna ili kao živin oksid, selen kao elementarni ili u obliku oksiklorida. Kao najbolji katalizator se pokazao selen. Bakar i titanov oksid također se koriste kao katalizatori u nekim referentnim AOAC metodama. Kalijev sulfat se upotrebljava za povišenje vrelišta kiseline kako bi se ubrzalo spaljivanje. Unatoč nekim nedostacima (metoda je opasna zbog rukovanja sumpornom kiselinom, dugotrajna je i radno intenzivna), metoda po Kjeldahl-u i njezine varijante s instrumentalnim završetkom ostaju točne i pouzdane metode te metoda po Kjeldahl-u i dalje ostaje referentna metoda za određivanje udjela ukupnih proteina (Marković i sur., 2017; Sáez-Plaza et al., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom radu provedene su laboratorijske analize određivanja udjela ukupnih proteina i prolina u uzorcima (n=57) različitih vrsta meda koji su predstavljali dio uzoraka analiziranih u okviru 17. Međunarodnog natjecanja pčelara u kvaliteti meda - Zzzagimed 2021.

3.1.1. Uzorci

Analizirani uzorci meda poznatog su podrijetla s područja Republike Hrvatske iz sezone 2020. Analizirani uzorci uključivali su: - 17 uzoraka livadnog meda - 40 uzoraka cvjetnog meda.



Slika 3. Uzorci meda (vlastita fotografija)

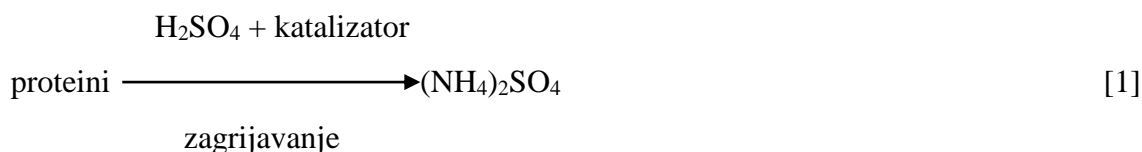
3.2. METODE

3.2.1. Određivanje udjela ukupnih proteina Kjeldahlovim postupkom

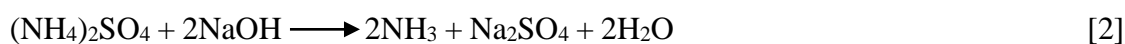
Metoda po Kjeldahl-u jedan je od najčešće primjenjivanih postupaka određivanja udjela ukupnih proteina. Za izvedbu metode koristi se Kjeltac sustav pomoću kojeg se određuje ukupni dušik prisutan u analiziranim uzorcima. Postupak određivanja udjela ukupnih proteina se zasniva na Kjeldahlovom principu određivanja dušika prisutnog u uzorku te se sastoji od tri

faze: vlažnog spaljivanja s kiselinom/oksidacije, destilacije i titracije s klorovodičnom kiselinom (AOAC, 1995; Vahčić i sur., 2008). Pri tome se odvijaju sljedeće reakcije:

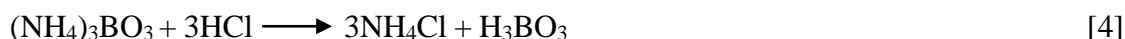
- 1) Postupkom spaljivanja nastaje amonijev sulfat



- 2) Postupkom destilacije dodatkom NaOH oslobađa se amonijak koji se u sljedećoj reakciji predestilira u bornu kiselinu pri čemu nastaje amonijev borat



- 3) Postupkom titracije s klorovodičnom kiselinom nastaje amonijev klorid i borna kiselina



Princip:

Organske tvari iz analiziranih uzoraka razore se zagrijavanjem sa sumpornom kiselinom uz katalizatore $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i K_2SO_4 koji povisuju vrelište te kiselini uz oslobađanje proteinskog i neproteinskog dušika koji zaostaje u obliku amonijevih soli, odnosno kao amonijev sulfat. Iz amonijeva sulfata dodatkom natrijeva hidroksida oslobađa se amonijak koji se predestilira u bornu kiselinu, a nastali se amonijev borat titrira klorovodičnom kiselinom.

Reagensi:

- Katalizator – Kjeldahl-ove tablete ($\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4$, Merck KGaA Njemačka)
- Koncentrirana sumporna kiselina (H_2SO_4 96 %, $\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$, Gram-Mol d.o.o. Hrvatska)
- 40 % -tni natrijev hidroksid (NaOH , Gram-Mol d.o.o. Hrvatska)
- 4 % -tna borna kiselina (H_3BO_3 , Carlo Erba reagens, Francuska)
- Klorovodična kiselina (HCl , 0,1 M, Carlo Erba reagens, Francuska)
- Obojeni indikator; metil crveno, bromkrezol zeleno (Kemika d.d. Hrvatska).

Laboratorijski uređaji i pribor:

- Analitička vaga (SHIMADZU AX 200)
- Aluminijska folija
- Blok za spaljivanje (Tecator Digestion System 6, 1007 Digester, Foss, UK)
- Uređaj za destilaciju (KjeltecTM2100, Foss Tecator AB, Švedska)
- Kivete za Kjeltec sustav (500 mL)
- Menzura, 100 mL
- Erlenmeyerova tikvica, 250 mL
- Pipeta, 25 mL
- Trbušasta pipeta, 25 mL
- Bireta, 50 mL
- Laboratorijske čaše.

Postupak:

U lađicu napravljenu od aluminijske folije odvagane se 5 g uzorka te se pažljivo prebaci u kivetu od 500 ml tako da grlo kivete ostane čisto. Uzorak se zatim prelije s 25 ml koncentrirane sumporne kiseline te se doda Kjeldahl-ova tableta ($K_2SO_4 + CuSO_4$) od 5 g. Sadržaj u kiveti lagano se protrese te se stavi na zagrijavanje u blok za spaljivanje. Zagrijavanje se provodi postepeno. Spaljivanje uzorka završeno je kad zaostane mutna tekućina bez crnih neizgorelih komadića uzorka te kad poprimi plavo-zelenu boju. Nakon što se sadržaj u kiveti ohladi na sobnoj temperaturi sljedi postupak destilacije u destilacijskoj jedinici Kjeltec sustava. Erlenmeyerova tikvica sa 25 ml borne kiseline postavi se na odgovarajuće postolje destilacijske jedinice na način da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu borne kiseline. Uzorci se automatski destiliraju tako da se u kivetu dozira 50 ml 40 %-tne NaOH. Postupak destilacije traje 5 minuta. Nakon završene destilacije destilat u Erlenmeyerovoj tikvici je zelene boje što ukazuje na prisutnost amonijaka te se titrira sa standardiziranom klorovodičnom kiselinom (0,1 M HCl) do prelaska boje u ružičastu što što označava kraj titracije.

Udio dušika (N) izračunava se prema jednadžbi:

$$\% \text{ ukupnog N} = \frac{(T-B) * N * 14,007 * 100}{m(\text{uzorka})} \quad [5]$$

gdje je:

T – volumen 0,2 M otopine HCl utrošen za titraciju uzorka (mL)

B – volumen 0,2 M otopine HCl utrošen za titraciju slijepe probe (mL)

N- molaritet kiseline (c(HCl) 0,1 mol/L)

m – masa uzorka (mg)

Iz dobivenog postotka dušika množenjem faktorom pretvorbe od 6,25 dobiva se vrijednost udjela ukupnih proteina u uzorku:

$$\% \text{ proteina} = \% \text{ N} * 6,25$$

3.2.2. Određivanje prolina

Metoda (IHC, 2009) se može primijeniti na sve uzorke meda. Količina prolina u medu je indikator kvalitete meda i indikator patvorenja kada količina prolina padne ispod određene vrijednosti. Metoda je predložena od strane *International Honey Commission* te se temelji na originalnoj metodi po Oughu (Bogdanov i sur., 2008).

Princip:

Prolin i ninhidrin stvaraju obojani kompleks. Nakon dodavanja 2-propanola mjeri se apsorbancija otopine uzorka kao i apsorbancija slijepe probe pri maksimalnoj valnoj duljini. Udio prolina određuje se iz omjera. Udio prolina definira se kao boja koja se razvije pomoću ninhidrina, uspoređuje se sa standardnom otopinom prolina te se izražava kao proporcija u masi meda (mg/kg).

Reagensi:

- 3 %- tna otopina ninhidrina (Merck KGaA, Njemačka) u etilenglikol monometileteru (Fisher Scientific, Belgija)
- 98-100 %-tna mravlja kiselina (HCOOH, T.T.T. d.o.o. Hrvatska)
- 50 %-tna otopina 2-propanola (C₃H₈O, Lach-Ner s.r.o, Češka)
- Standardna otopina prolina (Merck KGaA, Njemačka).

Laboratorijski uređaji i pribor:

- Kivete, 1 cm

- Epruvete od 20 mL i gumeni čepovi
- Odmjerne tikvica od 100 mL
- Vodena kupelj, Inko Zagreb
- Tresilica
- Laboratorijske čaše
- Spektrofotometar, UV-1280, Shimadzu (Kyoto, Japan)
- Analitička vaga, osjetljivost $\pm 0,0001$ g, tip Shimadzu AX200 (Kyoto, Japan)
- Plastične čašice
- Stakleni štapić.

Postupak:

Odvaže se 5 g uzorka u plastičnu čašicu, otopi se u 50 ml destilirane vode, pomoću staklenog štapića kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml, nadopuni destiliranom vodom do oznake i dobro se protrese. U epruvetu se otpipetira 0,5 ml otopine uzorka, a potom se dodaje 1 ml mravlje kiseline i 1 ml otopine ninhidrina. Paralelno se priprema slijepa proba u koju se umjesto uzorka dodaje 0,5 ml destilirane vode i tri standardne otopine prolina u koje se umjesto uzorka dodaje 0,5 ml prethodno pripremljene standardne otopine prolina. Standardna otopina prolina priprema se na način da se prvo pripremi temeljna otopina prolina tako da se odvaže 40 mg prolina i otopi u 50 ml destilirane vode. Zatim se otpipetira 1 ml temeljne otopine i razrijedi destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 25 ml te se na taj način dobiva otopina koja sadrži 0,8 mg prolina u 25 ml destilirane vode. Epruvete se dobro začepe gumenim čepovima i stave u tresilicu na 15 minuta, nakon čega se stave u kipuću vodenu kupelj 15 minuta, a potom 10 minuta pri 70 °C. Nakon toga se dodaje 5 ml vodene otopine 2-propanola u svaku epruvetu, epruvete se ponovno začepe gumenim čepovima, dobro se protresu i ostave hladiti na sobnoj temperaturi 45 minuta. Nakon točno 45 minuta očitava se apsorbancija svih pripremljenih otopina pri 510 nm pri čemu se koriste kivete od 1 cm.

Udio prolina u medu izračunava se prema jednadžbi (IHC, 2009):

$$\text{Prolin (mg/kg)} = \left(\frac{E_s}{E_a}\right) * \left(\frac{E_1}{E_2}\right) * 80$$

gdje je:

E_s – apsorbancija otopine uzorka meda

Ea – apsorbancija standardne otopine prolina (prosjeak triju očitavanja)

E1 – mg prolina uzetih za standardnu otopinu

E2 – masa meda u gramima

80 – faktor razrjeđenja

Tablica 1. Vrijednosti ponovljivosti (r) i reproducibilnost (R) dobivene u ispitivanjima prema DIN-normi (*Deutsches Institut für Normung*) (IHC, 2009)

Prolin (prosječno) mg/kg	r	R
171	6.6	16.3
289	12.7	18.4
762	24.4	58.4

3.2.3. Obrada podataka

Dobiveni rezultati su analizirani pomoću Microsoft Excel programa metodama deskriptivne statistike.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju metodom po Kjeldahl-u određen je udio ukupnih proteina u 57 uzoraka cvjetnog i livadnog meda. Udio prolina određen je metodom predloženom od strane *International Honey Commission* koja se temelji na originalnoj metodi po Oughu. Dobiveni analitički rezultati uspoređeni su s dostupnim literaturnim podacima te prikazani u Tablicama 2.-5.

4.1. UDIO UKUPNIH PROTEINA U MEDU

Tablica 2. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima (n = 40) cvjetnog meda

Uzorak	Oznaka uzorka	Udio dušika (%)	Udio proteina (%)
1.	Uzorak 4	0,08	0,52
2.	Uzorak 9	0,05	0,29
3.	Uzorak 11	0,07	0,42
4.	Uzorak 19	0,06	0,38
5.	Uzorak 20	0,07	0,44
6.	Uzorak 21	0,10	0,60
7.	Uzorak 26	0,07	0,43
8.	Uzorak 27	0,10	0,60
9.	Uzorak 30	0,05	0,33
10.	Uzorak 32	0,05	0,34
11.	Uzorak 33	0,05	0,33
12.	Uzorak 34	0,06	0,37
13.	Uzorak 35	0,05	0,31
14.	Uzorak 40	0,05	0,34
15.	Uzorak 48	0,07	0,42
16.	Uzorak 56	0,06	0,40
17.	Uzorak 57	0,06	0,40
18.	Uzorak 66	0,09	0,58
19.	Uzorak 67	0,05	0,33
20.	Uzorak 74	0,04	0,24
21.	Uzorak 76	0,04	0,27

Tablica 2. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima (n = 40) cvjetnog meda-nastavak

Uzorak	Oznaka uzorka	Udio dušika (%)	Udio proteina (%)
22.	Uzorak 77	0,07	0,42
23.	Uzorak 78	0,08	0,47
24.	Uzorak 79	0,07	0,46
25.	Uzorak 84	0,06	0,39
26.	Uzorak 88	0,06	0,40
27.	Uzorak 90	0,08	0,51
28.	Uzorak 91	0,05	0,34
29.	Uzorak 98	0,06	0,37
30.	Uzorak 100	0,06	0,34
31.	Uzorak 102	0,07	0,44
32.	Uzorak 104	0,07	0,44
33.	Uzorak 105	0,07	0,42
34.	Uzorak 106	0,04	0,25
35.	Uzorak 107	0,07	0,46
36.	Uzorak 109	0,07	0,45
37.	Uzorak 113	0,08	0,48
38.	Uzorak 116	0,07	0,41
39.	Uzorak 117	0,08	0,49
40.	Uzorak 119	0,07	0,46
Raspon		0,04 - 0,10	0,24 - 0,60

Tablica 3. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima (n = 17) livadnog meda

Uzorak	Oznaka uzorka	Udio dušika (%)	Udio proteina (%)
1.	Uzorak 3	0,05	0,34
2.	Uzorak 6	0,06	0,39
3.	Uzorak 7	0,07	0,43
4.	Uzorak 12	0,07	0,42
5.	Uzorak 13	0,06	0,34
6.	Uzorak 18	0,07	0,41
7.	Uzorak 24	0,14	0,87
8.	Uzorak 44	0,07	0,46
9.	Uzorak 49	0,07	0,45
10.	Uzorak 51	0,05	0,30
11.	Uzorak 59	0,11	0,70
12.	Uzorak 61	0,07	0,42
13.	Uzorak 70	0,09	0,55
14.	Uzorak 71	0,07	0,45
15.	Uzorak 94	0,03	0,21
16.	Uzorak 95	0,06	0,36
17.	Uzorak 120	0,07	0,47
Raspon		0,03 – 0,14	0,21 – 0,87

Rezultati određivanja udjela ukupnih proteina u uzorcima meda dobiveni su metodom po Kjeldahl-u indirektno određivanjem udjela dušika te množenjem dobivene vrijednosti s faktorom preračunavanja 6,25.

Iz rezultata prikazanih u Tablici 2. vidljivo je da je analizirano ukupno 40 uzoraka cvjetnog meda, a ukupni udio proteina u tim uzorcima kretao se u rasponu od 0,24 do 0,60 % pri čemu srednja vrijednost udjela proteina iznosi 0,40 % (Slika 4). Najniži udio proteina u cvjetnom medu određen je u uzorku 74 (0,24 %), dok je najviši udio proteina određen u uzorcima 21 i 27 (0,60 %).

Podaci iz Tablice 3. prikazuju rezultate analiza 17 uzoraka livadnog meda pri čemu se udio proteina kretao u rasponu od 0,21 do 0,87 % što čini srednju vrijednost od 0,44 % (Slika 4). Najniži udio proteina u livadnom medu određen je u uzorku 94 (0,21 %), dok je najviši udio proteina određen u uzorku 24 (0,87 %). Vidljivo je kako je udio ukupnih proteina nešto viši u analiziranim uzorcima livadnog meda u odnosu na cvjetni med.

Unatoč niskom udjelu u medu, proteini se sve više istražuju te se koriste kao biljezi autentičnosti i pokazatelji kvalitete meda. Od interesa su proteini pčelinjeg podrijetla, koji se izlučuju iz slinovnice i hipofaringealne žlijezde. Najzastupljeniji među njima je glavni protein matične mliječi, apalbumin1 (apa1) te su prisutni i enzimi kao što su α - i β -glukozidaza (invertaza), α - i β -amilaza (dijastaza), glukoza oksidaza i drugi. Također, med sadrži 26 različitih aminokiselina od kojih je prolin najdominantniji, zatim slijede fenilalanin i glutaminska kiselina. Budući da je većina aminokiselina prisutna u tragovima, samo je udio prolina uključen u propise Europske unije o parametrima za određivanje kvalitete meda, a njegov udio može se koristiti kao mjera za ukupni udio aminokiselina (Chua i sur., 2013).

Apalbumin1, ostali proteini matične mliječi i peptidi odgovorni su za imunostimulatorna svojstva i antibiotsko djelovanje meda. Korištenjem poliklonalnog anti-apalbumin 1 protutijela razvijen je imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) za kvantifikaciju apalbumina 1 (Bilikova i sur., 2015). Metoda je prikladna za utvrđivanje izvornosti meda te je korisna i za detekciju meda, peludi i matične mliječi u medicinskim, farmaceutskim, kozmetičkim i prehrambenim proizvodima na kojima je naznačena prisutnost pčelinjih proizvoda. Na temelju istraživanja Bilikove i suradnika (2015), koji pokazuju da su proteini matične mliječi uobičajene i fiziološki aktivne komponente meda, predložena je i izmjena definicije meda: „Med je prirodna slatka tvar koju pčele proizvode od nektara ili izlučevina biljaka ili izlučevina insekata koji sišu biljke. Nju pčele skupljaju, pretvaraju kombinacijom glavnih proteina matične mliječi i ostalih vlastitih specifičnih tvari, polažu, dehidriraju, pohranjuju i ostavljaju u saću da sazrije.“

Ovaj protein predlaže se kao biljeg autentičnosti i kvalitete meda, međutim još je uvijek nedovoljno istražen, uglavnom zbog niske količine proteina u medu (0,1 – 0,5 %) (Bocian i sur., 2019). To je razlog zašto su analize proteina u medu zahtjevne pa je stoga poželjna učinkovita metoda ekstrakcije. Savršena metoda pripreme uzoraka ne bi trebala biti samo najučinkovitija, nego treba biti kompatibilna i s daljnjom elektroforezom i instrumentalnim tehnikama određivanja (Bocian i sur., 2019).

Kontrola kvalitete meda važna je jer je med relativno skup prehrambeni proizvod stoga je predmet brojnih načina patvorenja. Kontrola kvalitete meda temelji se na smjernicama *Codex Alimentarius* koje opisuju zahtjeve koji standardiziraju preradu proizvoda, objedinjuju uvjete i punu transparentnost u razvoju i marketingu. Fizikalno-kemijski parametri prirodnog meda, kao što su pH, vlaga, sastav šećera, udio hidroksimetilfurfurala, boja, kiselost i specifična vodljivost, strogo su definirani i predstavljaju pokazatelje kvalitete koji karakteriziraju svaku pojedinu vrstu meda. Međutim, od nedavno se također udio i varijabilnost proteina smatra još jednim parametrom za kvalitetu, podrijetlo i autentičnost meda (Bocian i sur., 2019).

Četiri najzastupljenije vrste meda koje se proizvode u Hrvatskoj (med bagrema, kadulje, kestena i medljike) karakterizirane su prema udjelu proteina i prolina te aktivnosti enzima u istraživanju Flanjak i suradnika (2016). Prosječni proteinski udio svih analiziranih uzoraka meda iznosio je 0,66 %. Najveći udio proteina pokazao je kestenov med (9,48 mg/g), zatim slijedi med od kadulje (7,92 mg/g), medljikovac (5,94 mg/g) te bagremov med s najnižim udjelom ukupnih proteina (3,04 mg/g). Udjeli proteina za bagremov med i medljikovac usklađeni su s rezultatima za iste vrste meda iz Rumunjske čiji se udio proteina kretao u rasponu između 2,37 i 3,66 mg/g za bagrem i između 3,71 i 7,63 mg/g za medljikovac. Svi analizirani uzorci meda bili su u skladu s propisima (Codex Standard, 2001; Vijeće Direktiva, 2002.; Pravilnik o medu, 2009.a) te ukazuju na činjenicu da su uzorci bili svježiji i pravilno rukovani. Dobiveni rezultati su pokazali da udjeli proteina i prolina variraju ovisno o botaničkom podrijetlu meda. Dobiveni rezultati su također pokazali da su tamnije vrste meda općenito imale više proteina, te ujedno i prolina kao i višu aktivnost enzima (Flanjak i sur., 2016).

Med od maline pokazao je visok udio ukupnih proteina (0,36 %) te je prema Juszczaču i suradnicima (2009) med od maline, zbog svojih specifičnih senzorskih svojstava (boje, mirisa i okusa), izvrsna dopuna asortimanu pčelinjih proizvoda.

Boussaid i suradnici (2018) proveli su istraživanje na šest vrsta meda iz Tunisa; med od ružmarina sadržavao je najmanji udio proteina (0,13 %), zatim je slijedio med od eukaliptusa, timijana i naranče (0,14 %), med od biljke marulje (*Marrubium vulgare*) (0,16 %), dok je najviši udio proteina sadržavao med od mente (0,16 %). Ukupni udio proteina utvrđen je korištenjem Kjeldahl metode.

Monoflorni med proizveden od pčela bez žalca u Brazilskoj polusušnoj regiji analiziran je s obzirom na njegove fizikalno-kemijske karakteristike te su se srednje vrijednosti proteina u medu kretale od 0,2 do 0,5 mg/g meda pri čemu nije bilo razlike u ovom parametru između uzoraka meda istog cvjetnog izvora, unatoč tome što ga proizvode pčele različitih vrsta. Proteinski udio je određen Kjeldahlovom metodom, na temelju sadržaja dušika prisutnog u uzorku, koristeći 6,25 kao faktor pretvorbe (Sousa i sur., 2016).

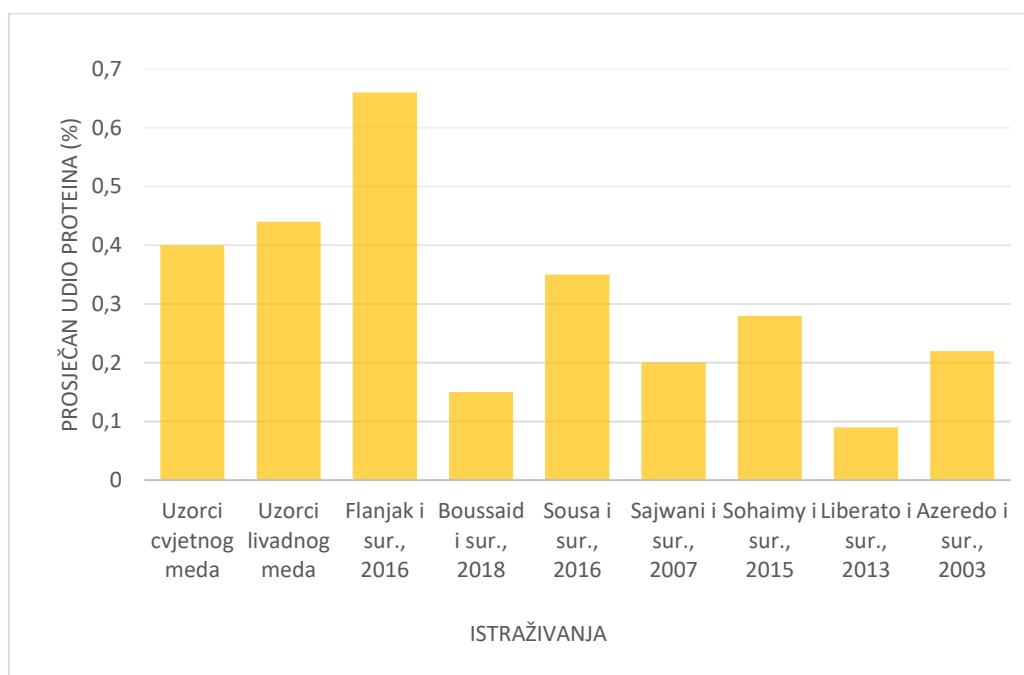
Analiziran je 51 uzorak meda podrijetlom iz Omana, monoflorni (32 uzorka) i poliflorni med (19). Udio proteina bio je vrlo varijabilan. Prosječni udio proteina iznosio je oko 2 mg/g \pm 1 mg/g pri čemu je maksimalna vrijednost 5,18 mg/g, a minimalna vrijednost 0,75 mg/g. Najviša prosječna vrijednost proteina zabilježena je kod svijetlog jantarnog meda, dok je najniža prosječna vrijednost proteina zabilježena u gotovo bezbojnom medu. Tamni jantarni med sadržavao je umjerenu količinu proteina (2,39 mg/g) (Sajwani i sur., 2007).

Istraživanje koje su proveli Sohaimy i suradnici (2015) pokazuje značajne razlike između vrsta meda po pitanju udjela proteina s obzirom na podrijetlo. Med podrijetlom iz Kašmira pokazao je najveći udio proteina ($4,67 \pm 0,171$ mg/g), zatim med podrijetlom iz Jemena ($2,64 \pm 0,045$ mg/g) i Saudijske Arabije ($2,42 \pm 0,172$ mg/g), dok je najniža vrijednost proteina zabilježena u medu podrijetlom iz Egipta ($1,69 \pm 0,015$ mg/g). Varijabilnost udjela proteina u različitim vrstama meda pripisuje se podrijetlu meda i vrsti peludi te načinu hranidbe pčela. Ukupni udio proteina određen je Kjeldahl metodom (AOAC, 2005).

Kod određivanja ukupnih proteina u medu istraživači, osim Kjeldahl metode, često koriste i metodu po Bradford-u. Metoda po Bradford-u predstavlja jednostavnu i brzu metodu osjetljivu na proteine pri čemu se stvara stabilan kompleks protein-boja te je stoga često metoda izbora od strane istraživača (Chua i sur., 2013).

Liberato i suradnici (2013) u svom su istraživanju analizirali fizikalno-kemijska svojstva te udio proteina u uzorcima meda iz države Ceará, sjeveroistočni Brazil, jedan od najvećih izvoznika meda u zemlji. Udio proteina određen je Bradfordovom metodom. Udio proteina analiziran u indijskom orahu (*Anacardium occidentale*) bio je najviši (1,121 mg/g), a zatim slijedi uzorak meda *Myracrodruon urundeuva*, drva koje se često koristi u pčelarstvu (0,8458 mg/g). Općenito, rezultati su unutar raspona utvrđenog korištenim službenim metodama u Brazilu.

Azeredo i suadnici (2003) istraživali su udio proteina u uzorcima meda različitog podrijetla, komercijaliziran u nekoliko država u Brazilu, koristeći Bradford metodu te su utvrdili da je kolorimetrijsko određivanje udjela proteina u uzorcima meda ovom metodom bilo učinkovito. Najviša vrijednost udjela proteina utvrđena je u dva uzorka meda iz Piauíja monoflornog podrijetla (*Borreria verticillata*) gdje je udio proteina iznosio 2,236 mg/g i 2,212 mg/g.



Slika 4. Grafički prikaz prosječne vrijednosti udjela proteina (%) u uzorcima meda analiziranim u ovom istraživanju u usporedbi s podacima iz drugih istraživanja

Uspoređujući rezultate udjela proteina u uzorcima cvjetnog i livadnog meda dobivene ovim istraživanjem s istraživanjima drugih autora, uočene su više vrijednosti u udjelu ukupnih

proteina u odnosu na ostala istraživanja, osim udjela proteina uzoraka meda podrijetlom iz Republike Hrvatske analiziranih u istraživanju Flanjak i suradnika (2016) (Slika 4). Rezultati analiza meda podrijetlom iz Tunisa (Boussaid i sur., 2018), Omana (Sajwani i sur., 2007) , Kašmira, Jemena, Saudijske Arabije (Sohaimy i sur., 2015) i Brazila (Azeredo i sur., 2003) pokazuju daleko niži udio ukupnih proteina. Razlike u proteinskom sastavu meda mogu biti posljedica različitog podrijetla pčela i cvjetova, odnosno nektara kojeg pčele koriste (Bocian i sur., 2019), odnosno samog geografskog i botaničkog podrijetla meda.

4.2. UDIO PROLINA U MEDU

Tablica 4. Udio prolina u uzorcima (n = 40) cvjetnog meda

Uzorak	Oznaka uzorka	Es (srednja vrijednost)	Prolin (mg/kg)
1.	Uzorak 4	0,521	921,61
2.	Uzorak 9	0,292	922,58
3.	Uzorak 11	0,281	893,15
4.	Uzorak 19	0,403	1287,69
5.	Uzorak 20	0,332	1036,89
6.	Uzorak 21	0,066	207,08
7.	Uzorak 26	0,126	400,40
8.	Uzorak 27	0,331	1026,45
9.	Uzorak 30	0,472	1294,88
10.	Uzorak 32	0,238	681,50
11.	Uzorak 33	0,241	667,01
12.	Uzorak 34	0,31	857,96
13.	Uzorak 35	0,307	884,77
14.	Uzorak 40	0,504	1453,79
15.	Uzorak 48	0,512	2157,60
16.	Uzorak 56	0,325	1355,62
17.	Uzorak 57	0,198	806,05
18.	Uzorak 66	0,42	1748,80
19.	Uzorak 67	0,422	1758,69

Tablica 4. Udio prolina u uzorcima (n = 40) cvjetnog meda-nastavak

Uzorak	Oznaka uzorka	Es (srednja vrijednost)	Prolin (mg/kg)
20.	Uzorak 74	0,02	81,78
21.	Uzorak 76	0,225	640,13
22.	Uzorak 77	0,229	645,66
23.	Uzorak 78	0,349	983,75
24.	Uzorak 79	0,574	1638,65
25.	Uzorak 84	0,436	1208,31
26.	Uzorak 88	0,204	585,19
27.	Uzorak 90	0,275	770,83
28.	Uzorak 91	0,247	685,65
29.	Uzorak 98	0,238	853,43
30.	Uzorak 100	0,247	888,41
31.	Uzorak 102	0,231	819,08
32.	Uzorak 104	0,271	915,99
33.	Uzorak 105	0,242	874,96
34.	Uzorak 106	0,256	865,39
35.	Uzorak 107	0,215	771,10
36.	Uzorak 109	0,223	773,41
37.	Uzorak 113	0,123	432,27
38.	Uzorak 116	0,212	751,57
39.	Uzorak 117	0,23	839,20
40.	Uzorak 119	0,231	814,26
Raspon		81,78 - 2157,60	

Tablica 5. Udio prolina u uzorcima (n = 17) livadnog meda

Uzorak	Oznaka uzorka	Es (srednja vrijednost)	Prolin (mg/kg)
1.	Uzorak 3	0,372	667,25
2.	Uzorak 6	0,619	1100,04
3.	Uzorak 7	0,52	954,36
4.	Uzorak 12	0,503	1583,34
5.	Uzorak 13	0,15	469,18
6.	Uzorak 18	0,262	839,19
7.	Uzorak 24	0,341	1090,67
8.	Uzorak 44	0,266	739,69
9.	Uzorak 49	0,418	1709,77
10.	Uzorak 51	0,381	1634,42
11.	Uzorak 59	0,596	2512,14
12.	Uzorak 61	0,251	1020,51
13.	Uzorak 70	0,234	967,58
14.	Uzorak 71	0,293	1186,55
15.	Uzorak 94	0,054	153,40
16.	Uzorak 95	0,216	609,78
17.	Uzorak 120	0,182	658,83
Raspon		153,40 - 2512,14	

Iz rezultata prikazanih u Tablici 4. vidljivo je da su analizirana ukupno 40 uzorka cvjetnog meda, a ukupni udio prolina u tim uzorcima kretao se u rasponu od 81,78 do 2157,60 mg/kg meda pri čemu je srednja vrijednost udjela prolina iznosila 930 mg/kg meda (Slika 5). Najniži udio prolina u cvjetnom medu određen je u uzorku 74 (81,78 mg/kg), dok je najviši udio prolina određen u uzorku 48 (2157,60 mg/kg).

Podaci iz Tablice 5. prikazuju rezultate analize 17 uzoraka livadnog meda pri čemu se udio prolina kretao u rasponu od 153,40 do 2512,14 mg/kg meda što čini srednju vrijednost od 1052,70 mg/kg meda (Slika 5). Najniži udio prolina u livadnom medu određen je u uzorku 94 (153,40 mg/kg), dok je najviši udio prolina određen u uzorku 59 (2512,14 mg/kg).

Vidljivo je kako je udio prolina nešto viši u analiziranim uzorcima livadnog meda u odnosu na cvjetni med.

Prosječne vrijednosti prolina svih uzoraka meda su iznad granice koju je odredio IHC (*International Honey Commission*) tj. iznad 180 mg/kg, osim jednog uzorka cvjetnog meda (uzorak 74) čiji udio prolina iznosi 81,78161mg/kg (Tablica 4) i jednog uzorka livadnog meda (uzorak 94) s udjelom prolina 153,4004 mg/kg (Tablica 5) meda .

Tijekom vremena korištene su mnoge spektrofotometrijske metode za određivanje udjela prolina u medu. Do sada se analitičke metode za određivanje prolina u medu objavljene u literaturi odnose na službene metode Međunarodne komisije za med, IHC (*International Honey Commission*) i Udruge službenih analitičkih kemičara (AOAC) (Bogdanov i sur., 2008). Ove metode su temeljene na originalnoj Ough metodi (1969) u kojoj je udio prolina mjeren spektrofotometrijski pri čemu se boja s ninhidrinom razvija na valnoj duljini od 510 nm. IHC metoda uvodi neke značajne promjene koje produljuju vrijeme analize, od kojih najvažnije uključuju korištenje vodene kupelji na 70° C u trajanju od 10 minuta nakon čega slijedi kipuća kupelj. AOAC metoda slijedi izvorni postupak, ali uključuje oduzimanje smetnje zbog boje meda prilikom mjerenja apsorbancije analizirane otopine (Truzzi i sur., 2014).

U medu, prolin zauzima ukupno 50 - 85 % svih aminokiselina što ju čini najzastupljenijom aminokiselinom. Uglavnom dolazi iz izlučevina pčela u procesu pretvorbe nektara ili medne rose u med. Količina prolina mogla bi se koristiti kao pokazatelj ukupnog udjela aminokiselina. Prilikom usporedbe rezultata s medom proizvedenim od kolonija pčela hranjenih šećerom, dokazano je da prolin koji se nalazi u medu u med dopijeva preko pčela te bi se posljedično profil aminokiselina mogao koristiti za određivanje geografskog, odnosno botaničkog podrijetla meda. U nekim slučajevima, sastav aminokiselina važan je prekursor arome i okusa prehrambenih proizvoda (Chua i sur., 2013).

Prolin se također smatra dobrim pokazateljem sadržaja enzima, konkretno invertaze, budući da su obje komponente povezane s procesom pretvorbe nektara u med. Udio prolina kriterij je za procjenu kvalitete meda te u nekim slučajevima služi i kao kriterij za procjenu zrelosti meda, kao i pokazatelj otkrivanja šećernog patvorenja određivanjem specifičnog kuta zakretanja svjetlosti. Specifičnim kutem zakretanja određuje se patvorenje meda jer otopina meda postaje optički desno aktivna s obzirom da su otopina šećera i glukoze optički desno aktivni za razliku od prirodnog cvjetnog meda koji je optički lijevo aktivan. Udio prolina nije

zakonski obavezan parametar kvalitete meda, ali se u nekim laboratorijima koristi za kontrolu autentičnosti meda. Smatra se da udio prolina u zreloom, autentičnom medu mora biti viši od 180 mg/kg (Bogdanov i sur.; 1999b; Machado i sur., 2017).

U istraživanju hrvatskih znanstvenika Flanjak i suradnika (2016) analiziran je sastav prolina u četiri najzastupljenije vrste meda koje se proizvode u Hrvatskoj. Kestenov med pokazao je najviši udio prolina od 699 mg/kg, nakon čega slijede medljikovac s 493 mg/kg, med od kadulje s 346 mg/kg te u konačnici bagremov med s 157 mg/kg prolina u medu. Med od bagrema ima prirodno nizak udio prolina što je također potvrđeno u ovom istraživanju, gdje je samo jedan uzorak imao udio prolina viši od 180 mg/kg. Udio prolina u drugim analiziranim vrstama meda je u skladu su s prethodno objavljenim rezultatima za med od kadulje i medljike kao i s udjelom prolina u za istu vrstu meda iz različitih geografskih regija, jedino su vrijednosti prolina za med od bagrema bile nešto niže u usporedbi s uzorcima europskog meda bagrema (112 – 337 mg/kg) (Flanjak i sur., 2016).

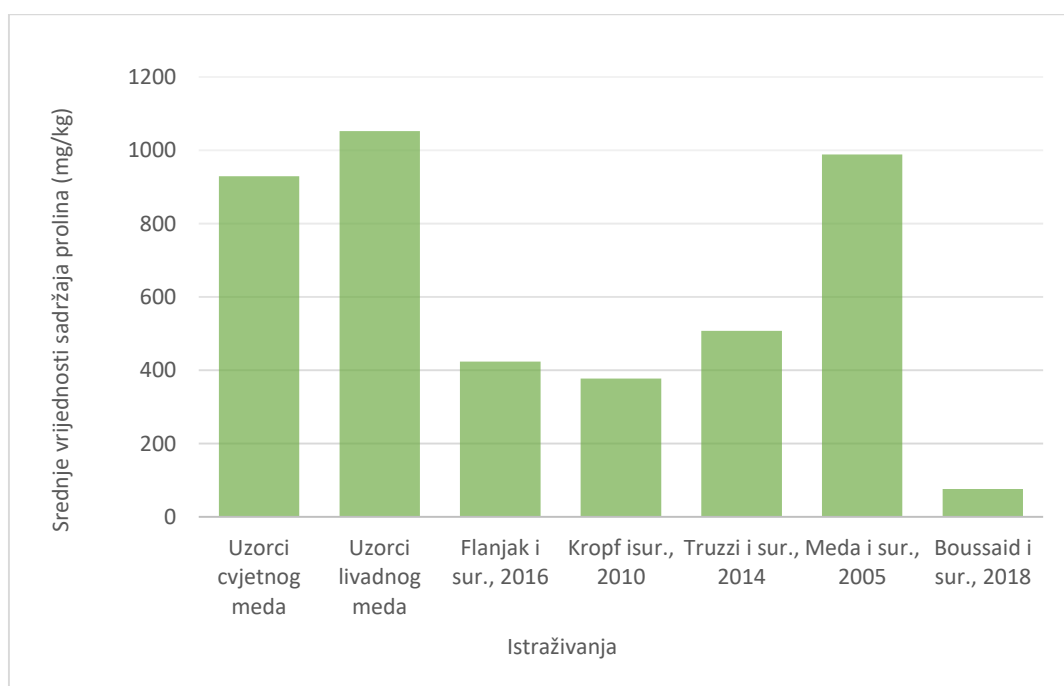
Zemljopisno podrijetlo triju slovenskih monofloernih vrsta meda (bagrem, lipa i kesten) ispitivano je analizom određenih fizikalno-kemijskih parametara u istraživanju Kropf i suradnika (2010) od kojih je za ovaj rad važan udio prolina. Od domaćih pčelara prikupljena su 122 uzorka slovenskog meda od bagrema, lipe i kestena koje čine 55 uzoraka bagrema (*R. pseudoacacia*), 30 uzoraka lipe (*Tilia spp.*) i 37 uzoraka kestenovog meda (*C. sativa Mill.*). Slovenija je mala zemlja po površini, ali je klimatski prilično raznolika, stoga nudi zanimljive mogućnosti za proučavanje geografskih utjecaja na udio proteina i prolina u medu. Tri vrste meda dobivene su iz tri od četiri makroregije u Sloveniji (alpsko, panonsko, mediteransko i dinarsko područje). Prosječni udio prolina varirao je od 265 mg/kg u bagremovom medu do 552 mg/kg u kestenovom medu. Med bagrema različitog podrijetla razlikovao se u udjelu prolina (322 mg/kg u medu dinarskog bagrema, 222 mg/kg u medu od bagrema iz panonskog područja i 291 mg/kg u mediteranskom bagremovom medu) i u udjelu ostalih slobodnih kiselina. Lipin med dinarskog podrijetla sadržavao je 341 mg/kg prolina, dinarski med od lipe sadržavao je 321 mg/kg prolina, a med od lipe iz alpskog područja sadržavao je 258 mg/kg prolina. Kestenov med sadržavao je najviše prolina i to 599 mg/kg u medu iz alpskog područja, 486 mg/kg u medu iz dinarskog područja te 563 mg/kg u medu iz panonskog područja. Analizirani parametri omogućili su razlikovanje pojedinih vrsta meda prema geografskom podrijetlu te su rezultati ovog istraživanja pokazali da se geografsko podrijetlo meda može odrediti na temelju odabranih fizikalno-kemijskih parametara što je vrlo važno za zaštitu i provjeru zemljopisnog podrijetla autentičnog meda.

Četrdeset i tri različita uzorka monoflornog meda iz regije Marche u Italiji analizirali su Truzzi i suradnici (2014) od kojih su uzorci meda uključivali 21 uzorak od bagrema, 6 od kestena, 3 od korijandera (*Coriandrum sativum*), 2 od limete (*Tilia spp.*) i 9 od suncokreta (*Helianthus annuus*) te dva uzorla medljike Metcalfa. Dobivene prosječne vrijednosti za pojedinu vrstu meda kretale su se od 229 mg/kg meda bagrema, 388 mg/kg meda od limete, 531 mg/kg meda od korijandera, 614 mg/kg medljikovca, 619 mg/kg kestenovog meda do 665 mg/kg prolina u suncokretovom medu. Mogu se primijetiti neke razlike u udjelu prolina između uzoraka različitog podrijetla, konkretno, uzorci bagrema pokazuju udio prolina koji je znatno niži od ostalih vrsta kako je spomenuto i u hrvatskom istraživanju Flanjak i suradnika (2016).

Terrab i suradnici (2002) proveli su istraživanje gdje je analiziran udio prolina u 98 uzoraka meda različitog botaničkog podrijetla pri čemu su se dobivene prosječne vrijednosti za pojedinu vrstu kretale između 25,0 i 227,0 mg/kg. Isto tako, skupina španjolskih znanstvenika (Hermosin i sur., 2003) je određivala aminokiselinski sastav u 31 uzorku meda različitih vrsta pri čemu su se prosječne vrijednosti udjela prolina kretale u rasponu od 28 do 55,6 mg/kg. U istraživanju Sousa i suradnika (2016) razina prolina u medu podrijetlom iz Brazila kretala se od 4,6 mg/kg do 20,5 mg/kg pri čemu su uzorci od istog cvjetnog izvora pokazali sličan udio prolina. Udio prolina određen je mjerenjem apsorbancije na 510 nm. Usporedbom tih rezultata s rezultatima ovog istraživanja može se uočiti da su uzorci meda podrijetlom iz Maroka, Španjolske i Brazila imali daleko niži prosječni udio prolina.

Istraživanje Meda i suradnika (2005) na 27 uzoraka meda iz afričke države Burkina Faso pokazalo je udio prolina koji je varirao od 437,8 mg/kg do 2169,4 mg/kg s prosjekom od $989,5 \pm 407,4$ mg/kg pri čemu je najviši udio prolina uočen u medu *Vitellaria* biljne vrste (Shea drvo). Udio prolina određen je primjenom Oughove metode.

Boussaid i suradnici (2018) proveli su istraživanje na šest vrsta meda iz Tunisa pri čemu se dobiveni sljedeći rezultati za udio prolina. Najviši udio prolina zabilježen je kod meda od eukalptusa (102,6 mg/kg) i mente (102,22 mg/kg), slijedi med od biljke marulje (85,94 mg/kg), med od timijana (68,7 mg/kg), med od naranče (59,12 mg/kg), dok je najmanje prolina određeno u medu od ružmarina (39,62 mg/kg). Uspoređujući navedene rezultate s rezultatima ovog rada može se uočiti kako je prosječni udio prolina u medu iz Tunisa različitih vrsta daleko niži.



Slika 5. Grafički prikaz prosječne vrijednosti udjela prolina (mg/kg) u uzorcima meda analiziranim u ovom istraživanju u usporedbi s podacima iz drugih istraživanja

Uspoređujući rezultate udjela prolina u uzorcima cvjetnog (930 mg/kg) i livadnog (1052,7 mg/kg) meda dobivene ovim istraživanjem s istraživanjima drugih autora, uočene su više vrijednosti u udjelu prolina u odnosu na ostala istraživanja, osim udjela prolina u istraživanju Meda i suradnika (2005) gdje je prosječan udio prolina u analiziranim uzorcima meda podrijetlom iz Afrike iznosio $989,5 \pm 407,4$ mg/kg (Slika 5). Prosječan udio prolina u analiziranim uzorcima meda podrijetlom iz Republike Hrvatske (Flanjak i sur., 2016), Slovenije (Kropf i sur., 2010), Italije (Truzzi i sur., 2014) i Španjolske (Terrab i sur., 2002; Hermosin i sur., 2003), kao i medu iz Tunisa (Boussaid i sur., 2018), daleko je niži u usporedbi s vrijednostima udjela prolina dobivenim ovim istraživanjem.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenih analiza i rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Ukupni udio proteina u analiziranim uzorcima (n= 40) cvjetnog meda kretao se u rasponu od 0,24 do 0,60 % pri čemu je srednja vrijednost udjela proteina iznosila 0,40 %.
2. Ukupni udio proteina u analiziranim uzorcima (n=17) livadnog meda kretao se u rasponu od 0,21 do 0,87 % te je prosječno iznosio 0,44 %.
3. Udio prolina u analiziranim uzorcima (n=40) cvjetnog meda kretao se u rasponu od 81,78 do 2157,60 mg/kg meda pri čemu je srednja vrijednost udjela prolina iznosila 930 mg/kg meda.
4. Udio prolina u analiziranim uzorcima (n= 17) livadnog meda kretao se u rasponu od 153,40 do 2512,14 mg/kg meda te je prosječno iznosio 1052,70 mg/kg meda.
5. Rezultati pokazuju da je udio ukupnih proteina i udio prolina viši u analiziranim uzorcima livadnog meda u odnosu na cvjetni med.
6. Prosječne vrijednosti udjela prolina svih uzoraka meda su iznad granice koju je odredio IHC (engl. *International Honey Commission*), odnosno iznad 180 mg/kg, osim 2 uzorka koji ne zadovoljavaju ovaj kriterij (1 uzorak cvjetnog meda, 1 uzorak livadnog meda).
7. Rezultati analiza u skladu su s rezultatima istraživanja drugih autora te mogu predstavljati doprinos u procjeni kvalitete i autentičnosti analiziranih uzoraka meda.

6. LITERATURA

AOAC (1995) Official Methods of Analysis of AOAC International, Association of Official Analytical Chemists, 16th ed., Vol. 2. Arlington, Sesc. 33.2.11.

Azeredo LC, Areredo MAA, de Souza SR, Dutra VML (2003) Protein contents and Physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chem* **80**, 249-254. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00261-3](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00261-3)

Ball DW (2007) The Chemical Composition of Honey. *J Chem Educ* **84**(10), 1643-1646. <http://doi.org/10.1021/ed084p1643>

Batinić K, Palinić D (2014) Priručnik o medu, Agronomski i Prehrambeno – tehnološki fakultet, Mostar

Belčić J, Katalinić J, Loc D, Lončarević S, Peradin L, Šimunić F, Tomašec F (1979) *Pčelarstvo*, 4. izd., Nakladni zavod Znanje, Zagreb.

Bertelli D, Lolli M, Papotti G, Bortolotti L, Serra G, Plessi M (2010) Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *J Agric Food Chem* **58**(15), 8495–8501. <https://doi.org/10.1021/jf101460t>

Bilikova K, Kristof Krakova T, Yamaguchi K, Yamaguchi Y (2015) Glavni proteini matične mliječi kao markeri izvornosti i kakvoće meda. *Arh Hig Rada Toksikol* **66**(4), 259-267. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2653>

Bocian A, Buczkowicz J, Jaromin M, Hus KK, Legáth J (2019) An Effective Method of Isolating Honey Proteins. *Molecules*, **24**(13), 2399. <https://doi.org/10.3390/24132399>

Bogdanov S, Lüllmnn C, Martin P (1999a) Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Commission. *Mitt Lebensm Hyg* **90**, 108-125. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099428>

Bogdanov S, Martin P, von der Ohe W, Russmann H, Vorwohl G, Persano Oddo L, Sabatini A, Marcazzan GL, Piro R, Flamini C, Morlot M, Lhéritier J, Borneck R, Marioleas P, Tsigouri A, Kerkvliet J, Ortiz A, Ivanov T, D'Arcy B, Mossel B, Vit P (1999b) Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission. *Bee World*,

80(2), 61–69. <https://doi.org/10.1080/0005772x.1999.11099428>

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P (2008) Honey for Nutrition and Health: A Review. *J Am Coll Nutr* **27**(6), 677-689. <http://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>

Codex Alimentarius Commission (2001) Revised Codex Standard for Honey, Codex STAN 12-1981.

Boussaid A, Chouaibi M, Rezig L, Hellal R, Donsi` F, Ferrari G, Hamdi S (2018) Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. *Arab J Chem* **11**(2), 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.08.011>

Chua LS, Lee JY, Chan GF (2013) Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **405**(10), 3063–3074. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6630-2>

Cordella C, Militão JSLT, Clément MC, Drajnudel P, Cabrol-Bass D (2005) Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. *Anal Chem Acta* **531**, 239-248. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.018>

Doner LW (1977) The sugars of honey—A review. *J Sci Food Agric* **28**(5), 443-456. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2740280508>

Flanjak I, Strelec I, Kenjeric D, Primorac L (2016) Croatian produced unifloral honey characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. *J Apic Sci* **60**, 39-48. <https://doi.org/10.1515/jas-2016-0005>

Gómez-Díaz D, Navaza JM, Quintáns-Riveiro CL (2009) Effect of Temperature on the Viscosity of Honey. *Int J Food Prop* **12**(2), 396-404. <https://doi.org/10.1080/10942910701813925>

Hamdan, K. (2010) Crystallization of Honey. *Bee World* **87**(4), 71–74. <https://doi.org/10.1080/0005772x.2010.11417371>

Harmonised Methods of the International Honey Commission (IHC) (2009) International Honey Commission, Bern, Švicarska.

Hermosín I, Chicón RM, Cabezudeo MD (2003) Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chem* **83**, 263-268. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00089-X)

Jaafar M, Othman M, Yaacob M, Talip B, Ilyas M, Ngajikin N, Fauzi N (2020) A Review on Honey Adulteration and the Available Detection Approaches. *Int J Integr Eng* **12**, 125–131.

Jung S, Rickert DA, Deak NA, Aldin ED, Recknor J, Johnson LA, Murphy PA (2003) Comparison of Kjeldahl and Dumas Methods for Determining Protein Contents of Soybean Products. *JAOCS* **80** (12). <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0837-3>

Juszczak L, Socha R, Rożnowski J, Fortuna T, Nalepka K (2009). Physicochemical properties and quality parameters of herbhoney. *Food Chem*, **113**(2), 538–542. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.098>

Katalinić, J. (1985) Pčelarstvo, Nakladni zavod znanje, Zagreb.

Krell, R. (1996) Value-added products from beekeeping. Ch. 2. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124.

Kropf U, Korošec M, Bertonec J, Ogrinc N, Nečemer M, Kump P, Golob T (2010) Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey. *Food Chem* **121**(3), 839–846. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.094>

Liberato M da CTC, Morais SM de, Magalhães CE de C, Magalhães IL, Cavalcanti DB, Silva MM de O (2013). Physicochemical properties and mineral and protein content of honey samples from Ceará state, Northeastern Brazil. *Food Sci Technol* **33**(1), 38–46. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612013005000028>

Machado De-Melo AA, Bicudo de Almeida-Muradian L, Sancho MT, Pascual-Maté A (2017) Composition and properties of *Apis mellifera* honey. *J Apic Res* **57**(13), 1-33. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>

Marković K, Vahčić, Hruškar M (2017) Analitika prehrambenih proizvoda. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

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 Chem* **91**(3), 571–

577. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>

Mujić I, Alibabić V, Travljanin D (2014) Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda, Veleučilište u Rijeci, Rijeka.

Nicolson SW (2022) Sweet solutions: nectar chemistry and quality. *Phil Trans R. Soc B* 377, 20210163-20210167. <http://doi.org/10.1098/rstb.2021.0163>

Panasik N, Eberhardt ES, Edison AS, Powell DR, Raines RT (2009) Inductive effects on the structure of proline residues. *Int. J. Pept. Protein Res.* **44**(3), 262–269. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1994.tb00169>

Persano Oddo L, Piro R (2004) Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* **35**, 38-81 <https://doi.org/10.1051/apido:2004049>

Pravilnik o medu (2015) Narodne novine **53** (NN 53/2015).

Riddle S (2016) The Chemistry of Honey, < <https://www.beeeculture.com/the-chemistry-ofhoney/> >. Pristupljeno 23. lipnja 2022.

Ruiz-Matute, A. I., Weiss, M., Sammataro, D., Finely, J., & Sanz, M. L. (2010) Carbohydrate Composition of High-Fructose Corn Syrups (HFCS) Used for Bee Feeding: Effect on Honey Composition. *J Agric Food Chem* **58**(12), 7317–7322. <http://doi.org/10.1021/jf100758x>

Tafere DA (2021) Chemical composition and uses of Honey: A Review. *J Food Sci Nutr Res* **4**, 194-201. <http://doi.org/10.26502/jfsnr.2642-11000072>

Terrab A, Díez MJ, Heredia FJ (2002) Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem* **79**, 373-379 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00189-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00189-9)

Truzzi C, Annibaldi A, Illuminati S, Finale C, Scarponi G (2014) Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chem* **150**, 477–481. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.003>

Vahčić N, Hruškar M, Marković K (2008) Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane, Praktikum. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Vahčić N, Matković D (2009) Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda, <<https://dokumen.tips/documents/kemijske-fizikalne-i-senzorske-karakteristike-meda.html>>. Pristupljeno 18. lipnja 2022.

Sáez-Plaza P, Navas MJ, Wybraniec S, Michałowski T, Asuero AG (2013) An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality Control. *Crit. Rev Anal Chem* **43**, 224-272. <https://doi.org/10.1080/10408347.2012.751787>

Sajwani AM, Eltayeb EA, Farook SA, Patzelt A (2007) Sugar and Protein Profiles of Omani Honey from Muscat and Batinah Regions of Oman. *Int J Food Prop* **10**(4), 675–690. <https://doi.org/10.1080/10942910601118904>

Sanz ML, Sanz, J, Martínez-Castro I (2004) Gas chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. *J of Chrom A*, 143-148.

Seraglio SKT, Silva B, Bergamo G, Brugnerotto P, Gonzaga LV, Fett R, Costa ACO (2019) An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Res Int* **119**, 44-66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.028>.

Soares S, Amaral JS, Oliveira MBPP, Mafra I (2017) A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **16**(5), 1072–1100. doi:10.1111/1541-4337.12278

Sohaimy SA, Masry SHD, Shehata MG (2015) Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Ann Agric Sci* **60**(2), 279-287. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.10.015>

Sousa JMB de, Souza EL de, Marques G, Benassi M de T, Gullón B, Pintado MM, Magnani M (2016) Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT - Food Sci Technol* **65**, 645–651. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.058>

Šimić F (1980) Naše medonosno bilje, Znanje, Zagreb.

Šubarić D, Jašić M (2017) Patvorenje meda. Zbornik radova i sažetaka sa drugog kongresa o pčelarstvu i pčelinjim proizvodima "PČELARSTVO I PČELINJI PROIZVODI" . Gradačac.

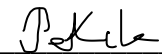
White, J.W. (1978) Honey composition and properties, *Honey Adv Food Res* **24**, 287-374. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60160-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60160-3)

Yang W, Zhang C, Li C (2019) Pathway of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde formation in honey. *J Food Sci Technol* **56**, 2417–2425. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03708-7>

Zábrowská B, Vorlová L (2014) Adulteration of honey and available methods for detection – a review. *Acta vet* **83**, 85–S102. <http://doi.org/10.2754/avb201483S10S85>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Petra Petek, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis