

# Udio proteina u uzorcima meda

---

Jukić, Iva

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:345855>

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  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Iva Jukić  
0058215126**

# **UDIO PROTEINA U UZORCIMA MEDA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Analitika prehrambenih proizvoda**

**Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Marković**

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda  
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## UDIO PROTEINA U UZORCIMA MEDA

Iva Jukić, 0058215126

**Sažetak:** Određivanje specifičnih sastojaka meda kao što su proteini svoju primjenu pronalazi u svrhu kontrole njihove kvalitete, te utvrđivanja autentičnosti. Tijekom ovog istraživanja primijenjena je metoda određivanja ukupnih proteina po Kjeldahl-u, indirektno preko dušika, s ciljem određivanja udjela proteina u uzorcima ( $n = 15$ ) različitih vrsta meda (kadulja, suncokret, cvjetni, amorfa, uljana repica, mandarina, heljda, kesten, lipa, bagrem, zlatošipka). Rezultati su pokazali kako se udio ukupnih proteina kretao u rasponu od 0,13 % do 0,69 %, pri čemu je najviši udio određen u medu heljde, a najniži u medu bagrema. Dobiveni analitički podaci mogu predstavljati doprinos u procjeni kvalitete analiziranih proizvoda.

**Ključne riječi:** med, metoda po Kjeldahl-u, udio proteina

**Rad sadrži:** 23 stranica, 1 sliku, 3 tablice, 32 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Ksenija Marković

**Pomoć pri izradi:** teh. sur. Valentina Hohnjec

**Datum obrane:** 8. srpnja 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Quality Control  
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### PROTEIN CONTENT IN HONEY SAMPLES

Iva Jukić, 0058215126

**Abstract:** Determination of specific ingredients of honey, such as proteins, finds its application in their quality control and determination of their authenticity. During this research, the Kjeldahl method was used in determination of total proteins, indirectly via nitrogen, with the aim of determination of the protein content in samples ( $n = 15$ ) of different types of honey (sage, sunflower, floral, amorphous, rapeseed, mandarin, buckwheat, chestnut, linden, acacia, goldenrod). The results showed that the content of total proteins ranged from 0,13 % to 0,69 %, with the highest content determined in buckwheat honey and the lowest in acacia honey. The obtained analytical data can represent a contribution to the assessment of the quality of the analysed products.

**Keywords:** honey, Kjeldahl method, protein content

**Thesis contains:** 23 pages, 1 figure, 3 tables, 32 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Ksenija Marković, PhD, Full Professor

**Technical support and assistance:** Valentina Hohnjec, technical assistant

**Thesis defended:** July 8, 2022

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. PODJELA MEDA I VRSTE MEDA</b> .....	2
<b>2.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA I SENZORSKA SVOJSTVA MEDA</b> .....	6
2.2.1. Kemijski sastav meda.....	6
2.2.2. Fizikalna svojstva meda .....	8
2.2.3. Senzorska svojstva meda.....	8
<b>2.3. PROTEINI U MEDU</b> .....	8
<b>2.4. METODE ODREĐIVANJA UDJELA UKUPNIH PROTEINA U MEDU</b> .....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	12
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	12
3.1.1. Uzorci.....	12
3.1.2. Laboratorijsko posuđe i uređaji.....	12
3.1.3. Reagensi.....	13
<b>3.2. METODE</b> .....	13
3.2.1. Princip metode određivanja.....	13
3.2.2. Postupak određivanja .....	14
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	16
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	19
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	20

## 1. UVOD

Med kao jedan od prirodnih zaslađivača dobiven je aktivnošću medonosnih pčela (lat. *Apis mellifera Linnaeus*). U mnogim kulturama pčelarstvo je postalo i dio kulturnog nasljeđa (Erban i sur., 2019). Med se konzumira bez ikakve obrade još od drevnih civilizacija. Karakterizira ga složeni kemijski sastav koji ovisi o vrsti pčela, geografskoj regiji, raspoloživom cvjetnom izvoru te uvjetima skladištenja (de Sousa i sur., 2016).

Također, med je prepoznat kao vrijedan izvor energije kojeg odlikuju antimikrobna i antioksidacijska svojstva. Za med se može reći kako je složena koncentrirana vodena otopina invertnog šećera koja sadrži i druge ugljikohidrate, aminokiseline, organske kiseline, mineralne tvari, pigmente, voskove te peludna zrnca (Boussaid i sur., 2018).

Zbog čestih slučajeva patvorenja, med je kemijski dobro okarakteriziran. Unatoč tome, relativno malo pozornosti posvećeno je sadržaju proteina zbog njihovog niskog i promjenjivog udjela koji varira između 0,1 % i 0,5 % (Chua i sur., 2013). Smatra se kako se sadržaj proteina u medu može povezati s peludi, nektarom i matičnom mliječi (Sajwani i sur., 2007). Istraživanje proteina predstavlja izazov, a podaci o proteinima meda su u većini istraživanja korišteni za razlikovanje prirodnog i umjetnog meda (Chua i sur., 2013).

Stoga, cilj ovog istraživanja bio je laboratorijskim analizama odrediti udio ukupnih proteina u uzorcima ( $n = 15$ ) različitih vrsta meda (kadulja, suncokret, cvjetni, amorfa, uljana repica, mandarina, heljda, kesten, lipa, bagrem, zlatošipka) te dobivene analitičke rezultate usporediti s vrijednostima udjela ukupnih proteina navedenim u okviru dostupnih znanstvenih istraživanja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PODJELA MEDA I VRSTE MEDA

Med je prirodno sladak proizvod koji proizvode medonosne pčele 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, 2015). Med pokazuje raznolike pozitivne učinke na zdravlje, uključujući antimikrobno djelovanje. Terapijski potencijal meda očituje se kod bolesti gornjih dišnih puteva, a dodatne potencijalne primjene meda uključuju liječenje opekline i rana, stomatološku njegu i uporabu kao prirodno antitumorsko sredstvo (Erban i sur., 2019). Pčelinji proizvodi također danas privlače pozornost, pri čemu se zbog svoje iznimne biološke aktivnosti posebno ističe matična mliječ koja svoju primjenu pronalazi kako u prehrambenoj industriji tako i u farmaceutskoj te kozmetičkoj industriji (Pavel i sur., 2013).

Med se prema podrijetlu može podijeliti na:

- a) cvjetni ili nektarni med je med dobiven od nektara biljaka
- b) medljikovac ili medun je med dobiven uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka (Pravilnik, 2015).

Prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja, med se može podijeliti na:

- a) med u saću - med kojeg skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska
- b) med sa saćem ili med s dijelovima saća - med koji sadrži jedan ili više proizvoda iz podtočke 1. ove točke iz Pravilnika (2015)
- c) cijedeći med - med koji se dobiva ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla
- d) vrcani med - med dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla
- e) prešani med - med dobiven prešanjem saća bez legla, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45 °C
- f) filtrirani med - med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi
- g) pekarski med – med koji se koristi u industriji ili kao sastojak hrane koja se potom

prerađuje i može imati strani okus ili miris ili biti u stanju vrenja ili prevrilo ili biti pregrijan (Pravilnik, 2015).

U današnje vrijeme na tržištu su prisutne različite vrste meda:

- Kadulja (*Salvia officinalis*) je nakon bagrema najprivlačnija pčelinja paša. U Hrvatskoj je široko raširena na područjima primorskog i dalmatinskog krša te u nekim predjelima Istre (Vahčić i Matković, 2009).

**Med kadulje** poprima svijetložutu do zelenkastu boju. Boja varira zbog prisutnosti peludi s vinove loze. Finog je do malo gorkastog okusa te ima karakterističan miris po cvijetu biljke. Izrazito je tražen zbog spore kristalizacije i vjerovanja da pomaže u liječenju bolesti dišnih organa (Šimić, 1980).

- Suncokret (*Helianthus annuus* L.) je biljka koja se primarno uzgaja zbog proizvodnje ulja te je najraširenija u Slavoniji (Vahčić i Matković, 2009).

**Med suncokreta** je jantarnožute boje, slatkog do trpkog okusa te relativno slabog mirisa po biljci. Poslije vrcanja odmah se kristalizira u čvrste kristale. Prodaju otežava struktura koju poprima dužim stajanjem u kristaliziranom stanju, odnosno postaje tvrdi od svakog drugog meda (Šimić, 1980).

- **Cvjetnim ili livadnim medom** zovemo sav onaj med koji pčele skupe s raznovrsnog cvijeća, kao što su razne vrste djetelina, dunjice, smiljke, graholike i mnoge druge biljke. U njemu se može, više ili manje, naći medljike, lipe, unosa s raznih korova te bilo čega drugoga što cvate u isto vrijeme. Po boji cvjetni med varira od svijetle do tamnožute, a kristalizira brže ili sporije ovisno o biljkama s kojih je skupljen. Upravo zbog toga što je sakupljen s mnogih vrsta biljaka, nosi u sebi sve osobine dobrog i vrijednog meda (Šimić, 1980).

- Amorfa (*Amorpha fruticosa* L.) naziva se još kineski bagrem ili bagremac. U Hrvatskoj je rasprostranjena u šumama pored rijeke Odre, zatim između Novske i Okučana, po šumama u slavonskoj posavini, naročito između Jasenovca i Stare



Gradiške (Vahčić i Matković, 2009).

**Med amorfe** je tamnocrvene boje, blagog mirisa i okusa. (Vahčić i Matković, 2009)

- Uljana repica (*Brassica napus*) je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka uspravne stabljike i sivozelenih listova te žutih cvjetova. Poput suncokreta, primarno se uzgaja zbog proizvodnje ulja (Cikoš, 2015).

**Med uljane repice** je svijetložute boje te ga karakterizira brza kristalizacija što je posljedica visokog udjela glukoze. Može se koristiti kao "starter za kristalizaciju" koji dodan u druge vrste meda potiče bolju i lakšu kristalizaciju (Cikoš, 2015).

Zbog karakterističnog okusa po repičinom ulju smatra se lošijom mednom vrstom (Šimić, 1980).

- Mandarina (*Citrus reticulata*) je zimzelena biljna vrsta čiji nagli prestanak medenja uzrokuju vrući, suhi vjetrovi ili prejako djelovanje sunca na same cvatove. Ukoliko se vrijeme cvatnje odvija u povoljnim klimatskim uvjetima, prinos meda po pčelinjoj zajednici može iznositi i do 30 kilograma. U povoljnim godinama, mandarina izlučuje velike količine nektara, pa se ubraja među najmedonosnije biljne vrste. Zbog svojih senzorskih svojstava, med od mandarine vrlo je tražen (Kovač, 2017).

**Čisti med mandarine**, bez udjela nektara drugih biljnih vrsta, u tekućem stanju je svijetložute do narančastosmeđe boje, intenzivnog mirisa (Kovač, 2017).

- Heljda (*Fagopyrum esculentum*) se uzgaja radi zrna koje se koristi u prehrani ljudi, dok žetveni ostaci služe kao stočna hrana ili prostirka, a iz nadzemnog dijela se ekstrahira rutin. Osim zrna i brašna, kao prehrambeni proizvod cijenjen je i med od heljde (Popović i sur., 2015).

**Med heljde** je bojom i okusom intenzivniji u odnosu na ostale vrste meda (Vrtar, 2018).

- Kesten (*Castanea sativa*) raste u samoniklim šumama od kojih su najveće u okolici Petrinje, Hrvatske Kostajnice, Dvora na Uni, Zagreba (Medvednica) te u Istri. Najmedonosnija je voćna vrsta (zbog vrijednih plodova kesten se ubraja u voćke) i jedina koja se ubraja u biljke glavne pčelinje paše. Za dobar prinos meda potrebno je toplo vrijeme, bez vjetra, s dovoljno vlage u zraku (Vahčić i Matković, 2009).

**Med kesten** je tamnožut, vrlo jakog i oštrog mirisa po samoj biljci. Slatkog je trpkogorkog okusa, zbog kojeg ga mnogi potrošači ne vole. Tvrdi se da pomaže u liječenju bolesti jetre i želučanih oboljenja. Ne kristalizira odmah nego može ostati u tekućem stanju do mjesec dana (Šimić, 1980).

- Lipa (*Tilia L.*) se ubraja među najmedonosnije biljke. Lipa može biti izvor nektara samo ako raste zaštićena od vjetra i s dovoljno vlage u tlu. Ipak, za pčelarstvo je mnogo manje značajna od bagrema i smatra se manje pouzdanom pčelinjom pašom. U Hrvatskoj se veće površine pod lipom nalaze na području Bilogore (Vahčić i Matković, 2009).

**Med lipe** je iz nepoklopljenog saća oštrog, a iz poklopljenog blagog, mirisa po lipi. Svijetložut je do zelenkast, slabo gorkog okusa. Smatra se da povoljno utječe na zdravlje. Nakon dva-tri mjeseca kristalizira u srednje čvrste kristale te poprima žutu do sivkastu boju. Lipin med dolazi u red finih stolnih vrsta (Šimić, 1980).

- Bagrem (*Robinia pseudoacacia*) je kratkotrajna, ali najpovoljnija paša u kontinentalnim dijelovima Hrvatske. U Hrvatskoj se najveće bagremove šume nalaze u Baranji, Podravini i na Moslavačkoj gori (Vahčić i Matković, 2009).

**Čisti med bagrema**, bez drugih primjesa, vrlo je svijetao, staklasto proziran, gotovo bezbojan. Slabog je mirisa, a okusom podsjeća na sok bagrema. Vrlo je blag i ugodan. Zreo bagremov med je gust te pri niskoj temperaturi postaje ljepljiv. Sadrži više fruktoze nego glukoze, pa dugo ostaje u tekućem stanju. Bagremov med se smatra prvorazrednom stolnom vrstom (Šimić, 1980).

- Zlatošipka (*Solidago canadensis*) je rasprostranjena po cijeloj kontinentalnoj Hrvatskoj prvenstveno uz rijeke, a ponegdje i u jadranskoj regiji (Mastelić-Ivić, 2021).

**Med zlatošipke** žute je boje te ugodnog mirisa i okusa (Karlović, 2007).

## 2.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA I SENZORSKA SVOJSTVA MEDA

Med se uglavnom sastoji od različitih šećera, pretežno fruktoze i glukoze te drugih sastojaka kao što su organske kiseline, enzimi i čvrste čestice dobivene prikupljanjem meda. Boja meda varira od gotovo bezbojne do tamno smeđe. Konzistencija može biti tekuća, viskozna ili djelomično do potpuno kristalizirana. Okus i miris variraju obzirom na biljno podrijetlo (Codex Alimentarius, 2001).

Poznato je da su fizikalno-kemijski parametri prirodnog meda, kao što su pH, vlažnost, sastav šećera i sadržaj hidrosimetilfurfurala (HMF), boja, kiselost i specifična vodljivost, strogo definirani i predstavljaju pokazatelje kvalitete koji karakteriziraju svaku pojedinačnu vrstu meda (Boussaid i sur., 2018). Kontrola kvalitete meda važna je iz dva glavna razloga. Prvo, mogu se uočiti promjene u sastavu meda tijekom faze skladištenja. One su rezultat kemijskih reakcija fermentacije, oksidacije i termičke obrade. Drugo, med je relativno skup prehrambeni proizvod zbog čega je predmet brojnih patvorenja. Zbog toga određivanje parametara kvalitete meda može biti korisno za otkrivanje mogućih patvorenja, kao i za potvrđivanje odgovarajućih uvjeta za manipulaciju i skladištenje meda. Kontrola kvalitete meda temelji se na Codex Alimentarius smjernicama koje opisuju zahtjeve vezane uz standardizaciju obrade proizvoda, jedinstvene uvjete i punu transparentnost u njegovom razvoju i marketingu. Ovi propisi opisuju najznačajnije parametre kvalitete meda, kojima se od nedavno smatra također i udio i varijabilnost udjela proteina, a koji može ukazivati i na botaničko podrijetlo te autentičnost meda (Bocian i sur., 2019).

### 2.2.1. Kemijski sastav meda

- Ugljikohidrati su glavni sastojci meda te čine 95-99% suhe tvari (ovisno o vrsti meda). Različitim metodama utvrđeno je da šećere u medu čine monosaharidi, disaharidi i oligosaharidi te njihov udio iznosi od 73% do 83% meda, zbog čega med možemo nazvati prezasićenom otopinom šećera (Vahčić i Matković, 2009).

- Voda je drugi najznačajniji sastojak meda. Ovisno o vrsti meda udio vode varira, a u prosjeku iznosi 15-20% ukupne mase meda. Količina vode koja je prisutna u medu utječe na njegovu viskoznost, masu i sklonost kristalizaciji. Zbog svoje higroskopnosti, med ne sadrži vodu u stalnom udjelu (Vahčić i Matković, 2009).
- Organske kiseline prosječno su zastupljene oko 0,57%. Na okus i miris meda veliki utjecaj imaju esteri u medu. pH meda varira između 3,2 i 6,5 (Vahčić i Matković, 2009).
- Proteini u medu se mogu nalaziti u obliku prave otopine aminokiselina ili u obliku koloida koji utječu na neka svojstva meda poput stvaranja pjene, zračnih mjehurića, tamnjenja, zamućenja ili kristalizacije meda (Vahčić i Matković, 2009).
- Enzimi su vrlo značajni sastojci meda jer je njihova aktivnost pokazatelj kvalitete, stupnja zagrijavanja i roka trajanja. Doprinosu onim svojstvima meda koja se ne mogu proizvesti niti nadomjestiti umjetnim putem. U medu je prisutna invertaza, amilaza, glukoza oksidaza, katalaza, kiselna fosfataza, peroksidaza, polifenol oksidaza, esteraza, inulaza te proteolitički enzimi. Podrijetlo enzima može biti povezano direktno sa pčelama koje ih dodaju u med prilikom prerade nektara, dok ostali potječu od peludi, nektara ili kvasaca i bakterija prisutnih u medu (Vahčić i Matković, 2009).
- Iako med sadrži vitamine, zbog malih udjela ne smatra se značajnim izvorom vitamina za ljudski organizam. Pelud je glavni izvor vitamina u medu, a zastupljenost pojedinog vitamina ovisi o botaničkom podrijetlu meda. U višim udjelima prisutni su vitamini C i K te vitamini B skupine (Vahčić i Matković, 2009).
- Mineralne tvari se u medu nalaze u niskim udjelima, a povećan udio pepela može biti znak patvorenja meda šećernom melasom (Vahčić i Matković, 2009).

Udio pepela, proteina i ukupnih fenola u medu iz starih saća znatno su viši od onih novijih, što može biti posljedica nakupljanja propolisa i peludi (El-Kazafy i sur., 2007).

### 2.2.2. Fizikalna svojstva meda

U fizikalna svojstva meda ubrajaju se stupanj kristalizacije, viskoznost, higroskopnost, električna vodljivost, optička svojstva, indeks refrakcije te specifična masa, a navedena svojstva su usko povezana s kemijskim sastavom meda. Zbog razlika u sastavu meda, vrijednosti ovih parametara kod pojedinih vrsta meda su specifične i različite (Vahčić i Matković, 2009).

### 2.2.3. Senzorska svojstva meda

Boja, okus i miris najvažnija su senzorska svojstva meda koja ponajviše ovise o botaničkom podrijetlu meda te o uvjetima prerade i čuvanja, a njihova analiza ima značajnu ulogu u definiranju ukupnih svojstava meda. Boja meda je, ovisno o botaničkom podrijetlu, svijetložuta, žuta, smeđa do tamnosmeđa. Nakon kristalizacije med posvijetli, no potamni tijekom čuvanja (Vahčić i Matković, 2009). Boji meda doprinose sastojci kao što su klorofil, ksantofili, antocijani, tanini, karotenoidi i mineralne tvari. Tamni med sadrži više mineralnih tvari od svjetlijeg. Prozirnost ili bistrina meda ovisi o količini suspendiranog materijala kao što je pelud (Sajwani i sur., 2007). Miris meda, u većini slučajeva, ovisi o biljci od koje je dobiven. Aroma meda potječe od esencijalnih ulja, terpena, aromatičnih aldehida, diacetila, metilacetilkarbamata, hlapljivih i nehlapljivih kiselina. Svježi med je aromatičniji (Vahčić i Matković, 2009).

## 2.3. PROTEINI U MEDU

Proteini uz ugljikohidrate i lipide imaju glavnu ulogu u rastu i održavanju ljudskog organizma. Obuhvaćaju široki spektar djelovanja kao što su enzimska aktivnost, transport hranjivih tvari i drugih sastojaka kroz stanične membrane. Zbog značaja u prehrani, potrebno je poznavati sadržaj proteina u hrani. Analitičke metode određivanja proteina omogućuju njihovo direktno ili indirektno određivanje, odnosno izračunavanjem temeljem analiza aminokiselinskih ostataka, određivanjem sadržaja dušika, ili određivanjem nakon kemijskih reakcija s funkcionalnim skupinama unutar proteina (Mæhre i sur., 2018). Određivanje udjela proteina je važan postupak koji se koristi u mnogim istraživanjima ili kontroli hrane u laboratorijima, što je bitno za osiguranje kvalitete i autentičnost hrane. Ukupni udio proteina određuje se često indirektno određivanjem dušika ili pak spektrofotometrijskim metodama

(Pavel i sur., 2013).

Med sadrži 9 esencijalnih i 9 neesencijalnih aminokiselina od kojih je najzastupljeniji prolin koji čini 80-90 % svih aminokiselina. Njegov udio je predložen kao jedan od indikatora zrelosti i patvorenja meda (Mitrić, 2017). Budući da je većina aminokiselina prisutna u tragovima, samo je sadržaj prolina uključen u propise Europske unije vezane uz parametre kvalitete meda. Udio prolina može ukazivati na ukupni sadržaj aminokiselina. U nekim slučajevima, aminokiselinski sastav utječe na aromu i okus prehrambenih proizvoda (Chua i sur., 2013). Utvrđeno je kako se udio aminokiselina smanjuje tijekom vremena skladištenja što ukazuje na odvijanje enzimske aktivnosti (Mohammed i Azim, 2012). Prilikom dugog skladištenja ili zagrijavanja meda može doći do pojave Maillardovih reakcija koja uključuju kondenzaciju aminokiselina i šećera, a čija je posljedica tamnjenje meda (Mitrić, 2017).

Razlike u sastavu proteina meda posljedica su različitog entomološkog i botaničkog podrijetla. Proteini podrijetlom od pčela se izlučuju iz žlijezda slinovnica i hipofaringealnih žlijezda. Najzastupljeniji među proteinima su proteini matične mliječi (Bocian i sur., 2019). Obzirom na botaničko podrijetlo, ukupan udio proteina različitih vrsta meda može varirati (Nazarian i sur., 2009). Značajne proteine pčelinjeg podrijetla u medu predstavljaju takozvani glavni proteini matične mliječi (engl. *Major Royal Jelly Proteins*; MRJPs), koji čine sastavni dio matične mliječi te su u većem dijelu topljivi u vodi. Određivanje specifičnih sastojaka meda kao što su proteini svoju primjenu pronalazi u provođenju različitih vrsta analiza u svrhu kontrole njihove kvalitete, te utvrđivanja autentičnosti. Pri tome se ističu i imunoenzimske ili ELISA metode (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Bocian i sur., 2019). Matična mliječ također sadrži niz drugih sastojaka koji mogu biti detektirani i u medu (Erban i sur., 2019).

Sakupljanje peludi obavljaju pčele hraniteljice koje uzimaju pelud iz prašnika, te je spremaju zajedno sa slinom i nektarom na stražnje noge i donose u košnicu. U košnici se pelud pohranjuje u stanice saća i tako pohranjena pelud se naziva pčelinji kruh. Pelud je vrlo bogata proteinima, koji služe kao materijal za rast i regeneraciju tkiva. Ovisno o biljnoj vrsti, količina proteina peludi varira. Smatra se kako uzgoj jedne ličinke zahtijeva 25 do 37,5 mg proteina, što odgovara 125 do 187,5 mg peludi (Anđelković i sur., 2014). Prisutnost peludi može utjecati na povećanje udjela proteina u medu, te se zbog toga med centrifugira kako bi se uklonila pelud prije ekstrakcije proteina. Brojne dostupne metode ekstrakcije proteina mogu se podijeliti na fizikalne i kemijske metode. Do danas, tehnike ekstrakcije proteina ostaju izazov tijekom analitičkog određivanja proteina zbog prisutnosti primjesa koje mogu utjecati na izvedbu elektroforetskih tehnika ili instrumentalnih tehnika određivanja masenom spektrometrijom

(Chua i sur., 2013).

## 2.4. METODE ODREĐIVANJA UDJELA UKUPNIH PROTEINA U MEDU

Pri određivanju ukupnog udjela proteina u medu, vrlo specifičnih sastojaka koji su u medu prisutni u relativno niskom udjelu, većina istraživanja navodi primjenu kolorimetrijskih metoda po Bradford-u i Lowry-u te indirektnu metodu određivanja proteina putem određivanja dušika po Kjeldahl-u. Svaka od navedenih metoda ima svoje prednosti i nedostatke (Tablica 1) (Simonne i sur., 1996; Olson i Markwell., 2007; Chua i sur., 2013; Pavel i sur., 2013).

**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci pojedinih metoda određivanja udjela ukupnih proteina

<b>METODA</b>	<b>Metoda po Bradford-u</b>	<b>Metoda po Lowry-u</b>	<b>Metoda po Kjeldahl-u</b>
<b>PREDNOSTI</b>	a) osjetljivija na proteine b) brza metoda c) stabilniji kompleks protein-boja (Chua i sur., 2013)	a) osjetljiva na niske koncentracije proteina (Pavel i sur., 2013)	a) široka primjena u određivanju ukupnih proteina (Simonne i sur., 1996) b) prihvaćena kao referentna metoda (Pavel i sur., 2013)
<b>NEDOSTACI</b>	a) izbor standarda nije uvijek jednostavan (Olson i Markwell., 2007)	a) relativno spora brzina reakcije b) nelinearnost u pripremi standardne krivulje c) nespecifičnost i nestabilnost nekih reagensa (Chua i sur., 2013) d) uski raspon pH vrijednosti unutar kojeg pokazuje prihvatljivu točnost (Pavel i sur., 2013)	a) dugotrajna metoda b) rukovanje sumpornom kiselinom i teškim metalima (Simonne i sur., 1996)

Određivanje udjela ukupnih proteina indirektno određivanjem dušika je još uvijek vrlo značajno u analitici hrane i kontroli kvalitete. U tu svrhu često se koristi metoda po Kjeldahl-u koja svoju primjenu pronalazi od 1883. godine. Metoda obuhvaća analitičko određivanje dušika, te izračun gdje se vrijednost dušika pretvara u udio proteina specifične kategorije namirnica pomoću faktora konverzije dušika u proteine (Yasuhura i Nokihara, 2001; Simonne i sur., 1996). Metoda po Kjeldahl-u uključuje korak digestije ili spaljivanja koncentriranom sumpornom kiselinom tijekom kojeg se N prisutan u sastojcima analiziranog uzorka prevodi u  $\text{NH}_4^+$ , te korak destilacije i konačnu kvantifikaciju  $\text{NH}_4^+$  titracijski, kolorimetrijski ili korištenjem ionske specifične elektrode. Ova metoda pretpostavlja da je N dobiven tijekom spaljivanja uglavnom amino dušik iz proteina (ukupni organski N) te da je doprinos anorganskog dušika (nitrat, nitrit, amonij) ili ostali organski dušik (nukleotidi, nukleinske kiseline) zanemariv (Simonne i sur., 1996).

Unatoč svim eksperimentalnim istraživanjima sadržaja dušika u različitim vrstama uzoraka i primjenom različitih metoda, metoda po Kjeldahl-u i dalje ostaje referentna metoda za određivanje udjela ukupnih proteina (Sáez-Plaza i sur., 2013).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

U ovom radu provedene su laboratorijske analize određivanja udjela ukupnih proteina u uzorcima (n=15) različitih vrsta meda (Tablica 2) koji su predstavljali dio uzoraka analiziranih u okviru 16. Međunarodnog natjecanja pčelara u kvaliteti meda - Zzzagimed 2020.

##### 3.1.1. Uzorci

Analizirani uzorci meda bili su poznatog podrijetla s područja Republike Hrvatske iz sezone 2020. Popis uzoraka prikazan je u Tablici 2.

**Tablica 2.** Analizirani uzorci

Vrsta meda	Broj analiziranih uzoraka	Oznaka uzorka
kadulja	4	1, 43, 99, 118
suncokret	2	17, 41
cvjetni	1	5
amorfa	1	15
uljana repica	1	22
mandarina	1	23
heljda	1	55
kesten	1	64
lipa	1	68
bagrem	1	86
zlatošipka	1	101

##### 3.1.2. Laboratorijsko posuđe i uređaji

Tijekom analitičkog određivanja korišteni su:

- analitička vaga (SHIMADZU AX 200)
- kivete za Kjeltex sustav (500 mL)
- Kjeltex sustav (Kjeltex™ 8100, Tecator™ Line, FOSS)
- blok za spaljivanje (Digestion system 6, 1007 Digester)
- Erlenmeyerova tikvica (250 mL)

- trbušasta pipeta (25 mL)
- bireta
- aluminijska lađica
- staklena čaša
- menzura (25 mL).

### 3.1.3. Reagensi

Prilikom analitičkog određivanja korišteni su:

- koncentrirana 96% sumporna kiselina ( $H_2SO_4$ , Gram-Mol d.o.o. Hrvatska)
- Kjeldahlove tablete ( $K_2SO_4 + CuSO_4$ , bez udjela žive i selena, Merck KGaA Njemačka)
- klorovodična kiselina ( $HCl$ , 0,1 mol/L, F=1,0000)
- 4% borna kiselina ( $BH_3O_3$ , Carlo Erba reagens, Francuska)
- obojeni indikator; metil crveno, bromkrezol zeleno
- 40%-tni natrijev hidroksid ( $NaOH$ ).

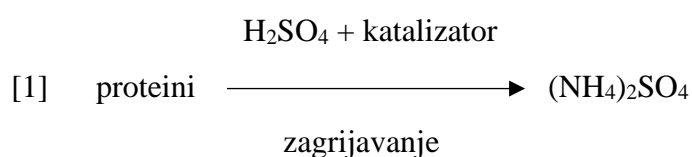
## 3.2. METODE

Kako bi se odredili ukupni proteini u medu bilo je potrebno provesti postupke vaganja, spaljivanja, destilacije i titracije. Analize su provedene po principu metode određivanja ukupnih proteina po Kjeldahl-u (Kropf i sur., 2010, AOAC 962.18).

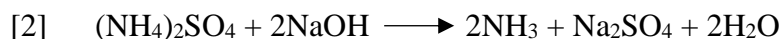
### 3.2.1. Princip metode određivanja

Metoda po Kjeldahl-u jedan je od najčešće primjenjivanih postupaka određivanja udjela ukupnih proteina. Za izvedbu metode koristi se Kjeltex sustav pomoću kojeg se određuje ukupni dušik prisutan u analiziranim uzorcima. Udio ukupnih proteina dobiva se množenjem postotka dušika s odgovarajućim faktorom pretvorbe koji se određuje iz omjera  $100/X$  gdje  $X$  predstavlja postotak dušika u proteinima određenih namirnica ili skupine namirnica (Vahčić i sur., 2008). Metoda se sastoji od postupaka spaljivanja, destilacije i titracije. 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



### 3.2.2. Postupak određivanja

U prethodno pripremljenu aluminijsku lađicu izvagano je 5,0000 g (s točnošću  $\pm 0,0001$  g) uzorka meda te je lađica s uzorkom pomoću pincete prebačena u kivetu za Kjeltec sustav (500 mL), pri tome pazeći da grlo kivete ostane čisto.

#### 1) Spaljivanje

Postupak spaljivanja nužno je provoditi u digestoru. U kivetu od 500 mL s uzorkom dodana je 1 Kjeldahl tableta ( $\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4$ ) i 25 mL koncentrirane sumporne kiseline. Kiveta je postavljena u blok za spaljivanje te lagano zagrijavana. Kada je reakcija u kiveti smirena, temperatura je u bloku za spaljivanje postepeno povećavana, pazeći da sadržaj kivete ne prelazi polovicu volumena kivete kako ne bi došlo do nepoželjnog izlivanja sadržaja. Spaljivanje je završeno nakon nekoliko sati ovisno o svakom pojedinom uzorku, a kada je u kiveti zaostala tekućina bez crnih neizgorelih komadića. Nakon hlađenja sadržaja kivete na sobnu temperaturu, slijedio je postupak destilacije.

#### 2) Destilacija i titracija

U destilacijsku jedinicu prethodno zagrijanog Kjeltec uređaja je postavljena kiveta s uzorkom za destilaciju. Na postolje namijenjeno za Erlenmayerovu tikvicu je postavljena Erlenmayerova tikvica s 25 mL borne kiseline i pripadajućim indikatorima. Kiveta mora biti dobro učvršćena, a destilacijska cjevčica uronjena u otopinu borne kiseline. Destilacija je provedena 5 minuta nakon što je u kivetu dozirano 50 mL 40 % NaOH. Nakon završene destilacije prvotna ružičasta boja otopine borne kiseline prelazi u plavo-zelenu. Takva otopina titrirana je klorovodičnom kiselinom do promjene boje ponovno u ružičastu.

Račun:

$$\% \text{ ukupnog N} = \frac{V \times N \times 14,007 \times 100}{m}$$

$$\% \text{ proteina} = \% \text{ N} \times F$$

V (mL) – volumen HCl-a utrošenog za titraciju uzorka

N (mol/L)– molaritet kiseline

m (mg) – masa uzorka

F – faktor pretvorbe % N u proteine (za med F=6,25).

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju metodom po Kjeldahl-u određen je udio ukupnih proteina u petnaest uzoraka različitih vrsta meda (kadulja, suncokret, cvjetni, amorfa, uljana repica, mandarina, heljda, kesten, lipa, bagrem, zlatošipka). Dobiveni analitički rezultati uspoređeni su s dostupnim literaturnim podacima te prikazani u Tablici 3. i na Slici 1.

**Tablica 3.** Udio ukupnih proteina (%) u uzorcima meda (n=15)

Uzorak	Oznaka uzorka	Vrsta meda	Udio dušika (%)	Udio proteina (%)
1	1	kadulja	0,07	0,43
2	43		0,07	0,43
3	99		0,07	0,43
4	118		0,06	0,38
5	17	suncokret	0,06	0,38
6	41		0,07	0,43
7	5	cvjetni	0,08	0,50
8	15	amorfa	0,05	0,31
9	22	uljana repica	0,05	0,31
10	23	mandarina	0,04	0,25
11	55	heljda	0,11	0,69
12	64	kesten	0,07	0,43
13	68	lipa	0,05	0,31
14	86	bagrem	0,02	0,13
15	101	zlatošipka	0,06	0,38
<b>Raspon</b>			0,02-0,11	0,13-0,69

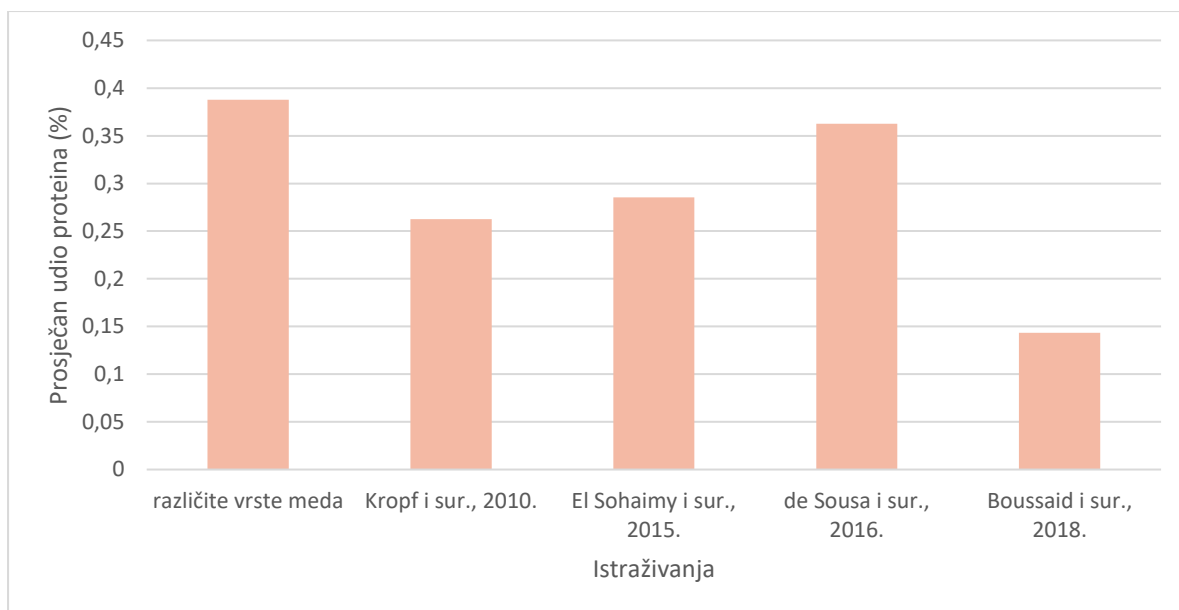
Rezultati određivanja udjela ukupnih proteina u uzorcima meda dobiveni su metodom po Kjeldahl-u indirektno određivanjem udjela dušika te množenjem dobivene vrijednosti s faktorom preračunavanja 6,25.

Kao što je ranije navedeno, proteini su vrlo značajni za ljudsku prehranu te je ključno poznavati njihov sadržaj u hrani (Mæhre i sur., 2018). Iako je u propise vezane uz parametre kvalitete meda uključen isključivo sadržaj prolina, istraživači su prepoznali i značaj određivanja udjela ukupnih proteina (Chua i sur., 2013). Spoznaja o udjelu ukupnih proteina dovodi do podataka o različitosti vrsta meda prema botaničkom i zemljopisnom podrijetlu, kao i o autentičnosti proizvoda zbog čestih slučajeva patvorenja (Bocian i sur., 2019).

Iz rezultata prikazanih u Tablici 3 vidljivo je da su analizirana ukupno 4 uzorka meda kadulje, a ukupni udio proteina u tim uzorcima kretao se u rasponu 0,38-0,43 %. Udio proteina u medu suncokreta određen je u dva uzorka te je iznosio 0,38 % i 0,43 % (Tablica 3), dok je ukupni udio proteina u analiziranom uzorku cvjetnog meda iznosio 0,50 % (Tablica 3). Udio ukupnih proteina meda amorfe, uljane repice i mandarine iznosio je redom 0,31 %, 0,31 % i 0,25 % (Tablica 3). Nadalje, udio ukupnih proteina određen u uzorku meda heljde iznosio je 0,69 % (Tablica 3), dok su dobivene vrijednosti za med kestena, lipe, bagrema i zlatošipke iznosile 0,43 %, 0,31 %, 0,13 %, odnosno 0,38 % (Tablica 3). Iz Tablice 3 je također vidljivo kako je najviši ukupan udio proteina određen u medu heljde (0,69 %), a slijede cvjetni med (0,50 %) i med kadulje (0,40 %), dok je najniži udio proteina određen u uzorcima meda amorfe (0,31 %), mandarine (0,25 %) i bagrema (0,13 %).

U dostupnoj znanstvenoj literaturi pronađeni su podaci o udjelu ukupnih proteina u različitim vrstama meda kao što su med kadulje (Flanjak i sur., 2016), med heljde (Erban i sur., 2019), kestena (Kropf i sur., 2010; Flanjak i sur., 2016), lipe (Kropf i sur., Erban i sur. 2016) i bagrema (Erban i sur., 2016; Hao i sur., 2022). Podaci o udjelu ukupnih proteina u medu amorfe, uljane repice, mandarine i zlatošipke nisu zabilježeni u dostupnoj znanstvenoj literaturi.

Uspoređujući rezultate dobivene ovim istraživanjem s istraživanjima drugih autora, uočene su više vrijednosti u udjelu ukupnih proteina u odnosu na istraživanja tijekom kojih je udio ukupnih proteina određen kolorimetrijskom metodom po Bradford-u (Flanjak i sur., 2016; Erban i sur., 2019; Hao i sur., 2022). Kao što je ranije navedeno, metoda po Bradford-u predstavlja jednostavnu i brzu metodu te je stoga često metoda izbora od strane istraživača. Osim različitog odabira metode, na same rezultate može utjecati botaničko i zemljopisno podrijetlo meda kao i vrsta pčele medarice.



**Slika 1.** Grafički prikaz prosječnog udjela proteina (%) u uzorcima meda analiziranim u ovom istraživanju te prema podacima iz drugih istraživanja.

Rezultati određivanja udjela ukupnih proteina u uzorcima različitih vrsta meda dobiveni ovim istraživanjem u skladu s rezultatima istraživanja autora koji su također udio ukupnih proteina u uzorcima meda određivali metodom po Kjeldahl-u (Slika 1) (Kropf i sur., 2010; El-Sohaimy i sur. 2015; de Sousa i sur. 2016; Boussaid i sur. 2018). Između navedenih istraživanja, Kropf i suradnici (2010) određivali su udio ukupnih proteina u medu kestena i lipe, vrstama meda koje su analizirane i tijekom ovog istraživanja. Kropf i suradnici (2010) pratili su udio ukupnih proteina uz primjenu metode po Kjeldahl-u u uzorcima meda kestena i lipe podrijetlom iz četiri geografske regije na području Republike Slovenije (alpska, mediteranska, dinarska i panonska). Udjeli ukupnih proteina u medu kestena i lipe određeni tijekom ovog istraživanja (0,43 %, odnosno 0,31 %) (Tablica 3) u skladu su s rezultatima određivanja udjela ukupnih proteina u medu kestena (0,34 %) i lipe (0,29 %) dobivenih tijekom istraživanja Kropf i suradnika (2010).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju prikazanih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima (n=15) različitih vrsta meda (kadulja, suncokret, cvjetni, amorfa, uljana repica, mandarina, heljda, kesten, lipa, bagrem, zlatošipka) kretao se u rasponu od 0,13 % do 0,69 %, te je prosječno iznosio 0,39 %.

2. Najviši ukupan udio proteina određen je u medu heljde, a najniži u medu bagrema.

3. Rezultati određivanja u skladu s rezultatima istraživanja autora koji su također udio ukupnih proteina u uzorcima meda određivali metodom po Kjeldahl-u, te mogu predstavljati doprinos u procjeni kvalitete analiziranih proizvoda.



## 6. POPIS LITERATURE

Anđelković B, Jevtić G, Marković J, Mladenović M, Peševa V (2014) Quality of honey bee bread collected in spring. U: Proceedings of the International Symposium on Animal Science 2014, International Symposium on Animal Science, Belgrade, Serbia, str. 450-454.

AOAC (1995) Official methods of analysis, 16. izd., Association of official analytical chemists, Washington DC, USA.

Bocian A, Buczkowicz J, Jaromin M, Hus KK, Legáth J (2019) An Effective Method of Isolating Honey Proteins. *MOLEFW* **24**, 2399. <https://doi.org/10.3390/molecules24132399>

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**, 3063-3074. doi: 10.1007/s00216-012-6630-2

Cikoš A (2015) Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od uljane repice (*Brassica* sp.) (završni rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek

Codex Alimentarius Commission (2001). Revised Codex Standard for Honey, Codex STAN 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2 (2001).

de Sousa JMB, de Souza EL, Marques G, de Toledo Benassi M, 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*, 645-651. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.058>

El 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>

Erban T, Shcherbachenko E, Talacko P, Harant K (2019) The unique protein composition of honey revealed by comprehensive proteomic analysis: Allergens, venom-like proteins, antibacterial properties, royal jelly proteins, serine proteases, and their inhibitors. *J Nat Prod* **82(5)**, 1217-1226. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00968>

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 Res* **60(1)**, 39-48. <https://doi.org/10.1515/jas-2016-0005>

Hao S, Yuan J, Cui J, Yuan W, Zhang H, Xuan H (2022) The rapid detection of acacia honey adulteration by alternating current impedance spectroscopy combined with <sup>1</sup>H NMR profile. *LWT* **161**, 113377. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113377>

Karlović A (2007) Medonosno bilje: Zlatošipka – [Pčelarstvo.hr](https://pcelarstvo.hr). <https://pcelarstvo.hr/medonosno-bilje/zlatosipka/> Pristupljeno 07. svibanj, 2022.

Kovač A (2017) Antimikrobni potencijal meda iz Republike Hrvatske (diplomski rad), Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

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>

Mæhre AK, Dalheim L, Edvinsen GK, Elvevoll EO, Jensen IJ (2018) Protein Determination-Method Matters. *Foods* **7(5)**. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>

Mastelić-Ivić S (2021) Zlatošipka – Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za stručnu podršku razvoju poljoprivrede. <https://www.savjetodavna.hr/2021/10/14/zlatosipka/>. Pristupljeno 07. svibanj, 2022.

Mitrić L (2017) Fizikalno-kemijska analiza meda (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Mohammed SEA, Azim MK (2012) Characterisation of natural honey proteins: implications for the floral and geographical origin of honey. *Int J Food Sci* **47(2)**, 362-368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02847.x>

Nazarian H, Taghavizad R, Majd A (2010) Origin of honey proteins and method for its quality control. *Pak J Bot* **42(5)**, 3221-3228.

Olson BJSC, Markwell J (2007) Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci* **38(4)**, A-3A. <https://doi.org/10.1002/0471141755.pha03as38>

Pavel CI, Mărghițaș L A, Bonta V, Mihai CM, Tomoș LI (2013) Determination of total protein content in royal jelly: a comparison of the kjeldahl, the bradford and the lowry methods. *Lucrări Științifice-Seria Zootehnie* **59**, 209-212.

Popović V, Sikora V, Adamović D, Glamočlija Đ, Ikanović J, Rajčić V (2013) Uticaj folijarne prihrane na prinos i kvalitet heljde u organskom sistemu gajenja. *Bilten za alternativne biljne vrste* **45(86)**, 55-59.

Pravilnik (2015a) Pravilnik o medu. Narodne novine 53, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015\\_05\\_53\\_1029.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_53_1029.html) Pristupljeno 20. travnja 2022.

Sáez-Plaza P, Michałowski T, Navas MJ, Asuero AG, Wybraniec S (2013) An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. *Crit Rev Anal Chem* **43(4)**, 178-223. <https://doi.org/10.1080/10408347.2012.751786>

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>

Simonne AH, Simonne EH, Eitenmiller RR, Mills HA, Cresman III CP (1997) Could the Dumas method replace the Kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods?. *J Sci Food Agric* **73(1)**, 39-45. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199701\)73:1<39::AID-JSFA717>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199701)73:1<39::AID-JSFA717>3.0.CO;2-4)

Šimić F (1980) Naše medonosno bilje. <https://www.tehnologijahrane.com/knjiga/nase-medonosno-bilje> Pristupljeno 07. svibanj 2022.

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://pdfcoffee.com/kemijske-fizikalne-i-senzorske-karakteristike-meda-pdf-free.html> Pristupljeno 07. svibanj 2022.

Vrtar A (2018) Mogućnosti uzgoja heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench) kao postrne kulture (završni rad), Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek

Yasuhara T, Nokihara (2001) High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. *J Agric Food Chem* **49(10)**, 4581-4583. <https://doi.org/10.1021/jf010448z>

## Izjava o izvornosti

Ja Iva Jukić izjavljujem da je ovaj završni 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