

# Udio proteina u uzorcima uniflornog meda iz sezone 2022.

---

**Telebar, Ivana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*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:159:750646>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Ivana Telebar  
0058217339**

**UDIO PROTEINA U UZORCIMA UNIFLORNOG  
MEDA IZ SEZONE 2022.**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Analitika prehrambenih proizvoda

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

**Zagreb, 2023.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Prijediplomski 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 UNIFLORNOG MEDA IZ SEZONE 2022.

Ivana Telebar, 0058217339

**Sažetak:** Med je jedinstveni proizvod prirode koji proizvode pčele medarice (*Apis mellifera*). Određivanje proteina u medu često predstavlja izazov zbog njihova niskog udjela, no sve više im se pridaje pozornost zbog mogućih primjena u kontroli autentičnosti i procjeni kvalitete meda. Tijekom ovog istraživanja metodom po Kjeldahl-u određen je udio ukupnih proteina u uzorcima meda bagrema (n=6), kestena (n=6) i lipe (n=6) iz sezone 2022. Dobiveni rezultati pokazali su da se udio ukupnih proteina kretao u rasponu od 0,10 % do 0,34 %. Prosječno najviši udio ukupnih proteina od 0,34 % sadržavali su uzorci meda kestena, dok su uzorci meda bagrema prosječno sadržavali 0,16 % i uzorci meda lipe 0,18 %. Dobiveni analitički podaci mogu predstavljati doprinos u kontroli kvalitete analiziranih vrsta uniflornog meda.

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

**Rad sadrži:** 26 stranica, 1 sliku, 4 tablice, 32 literaturna 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:** 15. lipnja 2023.

## 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 UNIFLORAL HONEY SAMPLES FROM THE 2022 SEASON

Ivana Telebar, 0058217339

**Abstract:** Honey is a unique product of nature produced by honeybees (*Apis mellifera*). Due to their low content, determining proteins in honey often presents a challenge. However, more and more attention is paid to the proteins in honey because of possible applications in the authenticity control and assessment of honey quality. By using the Kjeldahl method, the proportion of total proteins in samples of acacia (n=6), chestnut (n=6), and linden (n=6) honey from the 2022 season was determined during this research. According to the data, the proportion of total proteins varied between 0.10 % and 0.34 %. On average, the highest proportion of total proteins contained chestnut honey with 0.34 %, acacia honey samples contained an average of 0.16 % of total protein, and linden honey samples contained 0.18 % of total protein. The obtained analytical data can represent a contribution to the quality control of the analyzed types of unifloral honey.

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

**Thesis contains:** 26 pages, 1 figure, 4 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:** June 15<sup>th</sup> 2023

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. VRSTE MEDA I UTJECAJ MEDA NA ZDRAVLJE</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. Cvjetni ili nektarni med.....	2
2.1.2. Medun ili med medljikovac .....	3
2.1.3. Antikancerogeno djelovanje meda .....	4
2.1.4. Antioksidacijsko djelovanje meda.....	4
2.1.5. Antimikrobno djelovanje meda .....	5
2.1.6. Protuupalno djelovanje meda.....	5
<b>2.2. FIZIKALNA SVOJSTVA I KEMIJSKI SASTAV MEDA</b> .....	<b>5</b>
2.2.1. Ugljikohidrati .....	7
2.2.2. Voda .....	8
2.2.3. Organske kiseline.....	8
2.2.4. Vitamini i mineralne tvari .....	8
2.2.5. Fenolni spojevi.....	9
2.2.6. Hidroksimetilfurfural (HMF).....	9
2.2.7. Proteini i aminokiseline .....	10
2.2.8. Enzimi .....	10
<b>2.3. ZNAČAJ PROTEINA U MEDU I METODE ODREĐIVANJA</b> .....	<b>11</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>14</b>
3.1.1. Uzorci.....	14
3.1.2. Laboratorijsko posuđe i uređaji.....	15
3.1.3. Reagensi.....	15
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>15</b>
3.2.1. Princip metode po Kjeldahl-u .....	15
3.2.2. Postupak određivanja .....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>18</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>22</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>23</b>

## 1. UVOD

Med je viskozan i sladak proizvod prirode koji je obzirom na svoj kemijski sastav i svojstva iznimno koristan za prehranu i zdravlje ljudi. Njegova važnost poznata je već tisućama godina te se sadržaj bioaktivnih sastojaka poput flavonoida i fenolnih kiselina povezuje sa značajnim učincima na ljudsko zdravlje (Wissam i sur., 2022). Važna je energetska namirnica koja je povezana s pozitivnim zdravstvenim svojstvima, odnosno protuupalnim, antikancerogenim, antimikrobnim, antioksidacijskim i svojstvima zacjeljivanja rana (Sánchez-Martín i sur., 2022). Koristi se kao prirodni zaslađivač i sastojak je brojnih proizvedenih namirnica, osobito proizvoda na bazi žitarica (Wissam i sur., 2022).

Sastav meda je promjenjiv, ovisno o doprinosu biljke, klimi, okolišnim uvjetima i sposobnosti pčelara. Sastoji se uglavnom od šećera, no sadrži i pelud, proteine, slobodne aminokiseline i mineralne tvari (Bocian i sur., 2019). Obzirom da med sadrži niske udjele proteina (0,1-0,5 %) njihova ekstrakcija i analiza često predstavljaju izazov, no sve više im se pridaje pozornost zbog njihove moguće farmaceutske primjene i uporabe u kontroli autentičnosti meda (Erban i sur., 2019).

Cilj ovog istraživanja je bio odrediti udio ukupnih proteina u uzorcima uniflornih vrsta meda bagrema (n=6), kestena (n=6) i lipe (n=6) iz sezone 2022. te dobivene analitičke podatke usporediti s vrijednostima udjela ukupnih proteina dostupnim unutar znanstvene literature.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. VRSTE MEDA I UTJECAJ MEDA NA ZDRAVLJE

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

Osnovna podjela meda je prema podrijetlu. Podrijetlo meda može biti biljno ili životinjsko, stoga proizlazi podjela na cvjetni ili nektarni med koji je dobiven od nektara biljaka i medljikovac ili medun koji se uglavnom dobiva od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka.

#### 2.1.1. Cvjetni ili nektarni med

Nektarni med pčele proizvode od nektara medonosnih biljaka različitih vrsta koji luče nektarne žlijezde u čaški cvijeta. Nektar je obnovljivi cvjetni resurs koji se izlučuje svakodnevno ili se obnavlja nakon uklanjanja. Po kemijskoj strukturi je vodena otopina šećera od kojih su najzastupljeniji saharoza, glukoza i fruktoza dok se ostali šećeri pojavljuju u zanemarivim količinama u usporedbi s navedenim. Osim šećera, nektar u niskim koncentracijama sadrži i aminokiseline, lipide, organske kiseline, mineralne tvari, proteine, vitamin C (askorbinska kiselina), anorganske ione i sekundarne metabolite (alkaloidi, flavonoidi, terpenoidi i fenoli). Svojstva nektara variraju ovisno o čimbenicima okoliša, posjetima oprašivača i mikrobnj kontaminaciji (Nicolson, 2022). Medonosne pčele skupljaju nektar i prerađuju ga u med uz pomoć enzima koje proizvode njihove žlijezde slinovnice. Pri preradbi šećer saharozu sadržan u nektaru pomoću enzima invertaze razlažu na jednostavnije šećere glukozu i fruktozu koji med čine slađim i lakše probavljivijim u odnosu na nektar. Pčele zatim medu dodaju još enzima, amilazu, glukoza oksidazu i katalazu čime nastaju produkti koji stabiliziraju pH meda i održava se nizak sadržaj vodikovog peroksida. Naposljetku, med spremaju u saće i dehidriraju do udjela vode 17 do 18 % (Huang, 2010). Svojstva nastalog meda prvenstveno ovise o botaničkom podrijetlu nektara (Muresan i sur., 2022).

Med može nastati prikupljanjem nektara većinom jedne vrste biljaka te se takav naziva

monoflorni, dok poliflorni nastaje prikupljanjem nektara više vrsta medonosnih biljaka. Monoflorni med se može označiti prema određenoj biljnoj vrsti ukoliko u netopljivom sedimentu sadrži najmanje 45 % peludnih zrnaca iste biljne vrste, izuzev nekih biljnih vrsta gdje se taj postotak može razlikovati. Pitomi kesten (*Castanea sativa Mill.*) u netopljivom sedimentu treba sadržavati najmanje 85 % peludnih zrnaca iste biljne vrste, bagrem (*Robinia pseudoacacia L.*) 20 % i lipa (*Tilia spp.*) 25 % (Pravilnik, 2009). Neovisno o vrsti meda, nijedan uzorak nije 100 % monoflorni već, osim dominantne biljne vrste, sadrži i peludna zrnca neke druge vrste (Vahčić i Matković, 2009).

Med bagrema svijetle je boje, tekuće konzistencije, slabog mirisa te slatkog i cvjetnog okusa po biljci. Sporo kristalizira. Smatra se da ima umirujuće i ljekovito djelovanje kod gastritisa i čira, povoljni utjecaj na živčani sustav te da pridonosi cjelokupnom imunitetu organizma. Jedna je od najcjenjenijih vrsta meda zbog svojih svojstava i diskrecije okusa. Drvo bagrema (*Robinia pseudoacacia*) cvjeta u drugoj polovici svibnja i početkom lipnja te ukoliko su vremenski uvjeti povoljni vrijeme cvatnje iznosi oko 12-14 dana. Karakterizira ga otpornost na sušu i obilna cvatnja (Niculina i sur., 2012).

Med kestena tamne je boje i oštrog biljnog mirisa. Karakterizira ga aromatičan i gorak okus, jedinstven za ovu vrstu meda zbog čega je cijenjen od onih koji ne vole slađe vrste meda. Sadrži visok udio peludi (Daž i sur., 2017). Kesten (*Castanea sativa Mill.*) cvate drugom polovicom lipnja i cvatnja obično traje 10-20 dana. Najmedonosnija je voćna vrsta te ujedno i jedina koja se ubraja u biljke glavne pčelinje paše. Od svih medonosnih biljaka, kesten se smatra najbogatijim izvorom peluda (Vahčić i Matković, 2009).

Med lipe ugodnog je i pomalo gorkog okusa s mirisom po cvijetu lipe. Boja mu varira od svijetložute do blago zelene te ga karakterizira spora kristalizacija. Lipa (*Tilia L.*) se ubraja među najmedonosnije biljke, no nije od velikog značaja za pčelarstvo u odnosu na bagrem. Izvor je nektara samo ukoliko raste na području zaštićenom od vjetra i s dovoljno vlage u tlu (Vahčić i Matković, 2009).

#### 2.1.2. Medun ili med medljikovac

Med medljikovac specifična je vrsta meda koja potječe od izlučevina živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sisaju biljke (Muresan i sur., 2022). U usporedbi s nektarnim medom, karakteriziraju ga tamnija boja, više vrijednosti pH, električne vodljivosti i apsorbancije te veći sadržaj pepela i oligosaharida. Također, sadrži i veći udio fenolnih spojeva, proteina i



aminokiselina u odnosu na nektarni, zbog čega mu se pridaju potencijalna funkcionalna svojstva poput antimikrobnih, protuupalnih i antioksidacijskih. Zbog navedenog je povećan interes za ovu vrstu meda kao funkcionalnog proizvoda od strane potrošača i prehrambene industrije, no unatoč tome, smatra se još uvijek premalo proučenim te samim time i podcijenjenim (Seraglio i sur., 2019).

### 2.1.3. Antikancerogeno djelovanje meda

U današnje vrijeme rak predstavlja veliko zdravstveno opterećenje i česti je uzrok smrti. Sve veći je interes u potrazi za kemoterapijskim sredstvima dobivenim iz hrane ili prirodnih proizvoda, a med je jedan od najpopularnijih čiji se antikancerogeni učinak ispituje. Pokazalo se da sirovi med potiče djelovanje kemoterapijskih lijekova poput 5-fluoroacila i ciklofosfamid. Najvažniji sastojci meda s poznatim antikancerogenim djelovanjem su flavonoidi i fenolne kiseline (Waheed i sur., 2019). Smatra se da med inducira apoptozu u stanicama raka depolarizacijom mitohondrijske membrane, zaustavlja stanični ciklus i inhibira staničnu proliferaciju. Također, pokazalo se da proteini u medu induciraju otpuštanje faktora tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) čime se potiče imunološki odgovor za uništavanje kancerogenih stanica (Zammit Young i Blundell, 2023).

### 2.1.4. Antioksidacijsko djelovanje meda

Iako još nije potvrđeno kliničkim ispitivanjima, in vivo istraživanja pokazala su da med ublažava oksidativni stres kod različitih organskih sustava. Brojni sastojci meda poput flavonoida, glukoza-oksidade, katalaze, fenolne kiseline, askorbinske kiseline i karotenoida imaju antioksidacijsko djelovanje te mnogi od njih pokazuju sinergistički učinak. Rukovanje i obrada meda mogu utjecati na antioksidacijsku aktivnost, no najvažniji čimbenici koji imaju utjecaj su botaničko i zemljopisno podrijetlo meda (Zammit Young i Blundell, 2023). Antioksidacijska aktivnost meda doprinosi prevenciji nekoliko akutnih i kroničnih poremećaja kao što su dijabetes, upalni poremećaji, kardiovaskularne bolesti i rak (Ahmed i Othman, 2013).

### 2.1.5. Antimikrobno djelovanje meda

Za antimikrobna svojstva meda odgovorni su visoki udio šećera, niska vrijednost pH te prisutnost vodikovog peroksida i polifenolnih spojeva. Dosadašnjim istraživanjima dokazano je antibakterijsko djelovanje meda na aerobne, anaerobne, gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Potencijalna upotreba meda vidi se kod liječenja pacijenata koji imaju meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) zbog pozitivnih rezultata u osjetljivosti MRSA na med. Osim antibakterijskih, dokazana su i antifungalna svojstva meda djelovanjem na *Candida* i *Rhodotorulu*, kao i potencijalno antivirusno djelovanje (Zammit Young i Blundell, 2023).

### 2.1.6. Protuupalno djelovanje meda

Protuupalni učinak meda dokazan je primjenom na staničnim kulturama i životinjama te tijekom različitih kliničkih ispitivanja. Smatra se da se njegovo protuupalno djelovanje očituje kroz nekoliko mehanizama: inhibicija stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), supresija enzima ciklooksigenaze-2 (COX-2) i supresija inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS), te med kroz ove procese pokazuje inhibicijski učinak na kronične upale. Za protuupalne učinke meda prvenstveno su odgovorni fenolni spojevi (Ahmed i Othman, 2013).

Iako med pokazuje potencijalne zdravstvene prednosti, potrebno je još istraživanja i kliničkih ispitivanja kako bi se procijenila njegova uporaba u medicinske svrhe (Zammit Young i Blundell, 2023).

## 2.2. FIZIKALNA SVOJSTVA I KEMIJSKI SASTAV MEDA

U fizikalna svojstva meda ubrajaju se kristalizacija, viskoznost, higroskopnost, električna vodljivost, optička svojstva, indeks refrakcije i specifična masa te na njih utječe kemijski sastav meda (Pavlova i sur., 2018).

Na viskoznost meda najveći utjecaj imaju sadržaj vode i temperatura. Med s većim sadržajem vode teče brže od onog s nižim sadržajem vode. Isto tako, temperatura uvelike utječe na viskoznost te se s povećanjem temperature ono smanjuje. Na 30 °C fluidnost većine meda je dovoljno visoka za učinkovito rukovanje. Neke vrste meda pokazuju drugačija svojstva obzirom na viskoznost, te su tako primjerice med vrijeska i manuke opisani kao tiksotropni

(Bogdanov, 2011).

Kako je med prezasićena otopina glukoze, spontano nastoji postići stanje ravnoteže kristalizirajući višak glukoze u otopini. Time glukoza gubi vodu i prelazi u kristalni oblik dok voda postaje slobodna čime med postaje sklon fermentaciji i kvarenju. Fruktosa ostaje u tekućem obliku i formira tanki sloj oko kristala glukoze. Posljedično med mijenja boju, postaje svjetliji, više nije proziran, mijenja mu se i okus. Glukoza se vrlo lako i brzo kristalizira, dok je kod fruktoze to teže te je posljedica nepotpuno kristaliziran med. Med bagrema sadrži veći udio fruktoze pa kristalizira tek nakon dužeg skladištenja. Brzina kristalizacije meda ne ovisi samo o sastavu, već i o prisutnosti katalizatora poput kristala sjemenki, peludnih zrnaca i komadića pčelinjeg voska u medu (Pavlova i sur., 2018).

Med je higroskopan, odnosno u dodiru sa zrakom upija vodu, a sadržaj apsorbirane vode ovisi o relativnoj vlažnosti zraka. Higroskopnost meda uvjetovana je velikom količinom šećera te ovaj proces može povećati količinu vode u površinskom sloju meda što može utjecati na njegovu kvalitetu prilikom skladištenja (Pavlova i sur., 2018). Normalan med s udjelom vode od 18,3 % ili manjim, upijati će vlagu iz zraka pri relativnoj vlažnosti iznad 60 % (Bogdanov, 2011).

Električna vodljivost ovisi o sadržaju mineralnih tvari i organskih kiselina u medu te se s povećanjem njihova sadržaja povećava i njezina vrijednost (Pavlova i sur., 2018). Zbog relativno jeftine instrumentacije sve se više provodi mjerenje električne vodljivosti umjesto određivanja sadržaja pepela. Prema zakonskoj regulativi nektarni med mora imati električnu vodljivost manju od 0,8 mS/cm, a medljikovac i med kestena veću od navedenog (Bogdanov, 2011).

Kao najzastupljeniji sastojci meda, ugljikohidrati zakreću ravninu polarizirane svjetlosti čime je posljedično i med optički aktivan. Fruktosa pokazuje negativnu optičku rotaciju (zakreće kut polarizirane svjetlosti ulijevo) dok glukoza, svi disaharidi, trisaharidi i viši oligosaharidi pokazuju pozitivnu optičku rotaciju (zakreću kut polarizirane svjetlosti udesno) (Pavlova i sur., 2018). Nektarni med karakteriziraju negativne vrijednosti optičke rotacije, a medljikovac uglavnom pozitivne (Bogdanov, 2011).

Mjerenje indeksa refrakcije provodi se kako bi se u medu odredio udio vode, a za provedbu se koristi refraktometar. Određivanje se temelji na principu loma svjetlosti u medu i najčešće se provodi na 20 °C (Bogdanov, 2011).

Specifična masa meda ovisi o sadržaju vode i predstavlja omjer mase meda prema masi iste količine vode. Kvalitetne vrste meda imaju vrijednost specifične mase veću od 1,42 (Vahčić i Matković, 2009).

Med predstavlja složenu mješavinu s više od 180 komponenti koja još, unatoč znanstvenom napretku, nije u potpunosti razjašnjena te se ne može industrijski proizvesti. Većinu kemijskog sastava čine ugljikohidrati i voda te manja količina ostalih sastojaka kao što su organske kiseline, proteini, mineralne tvari, vitamini, pigmenti, flavonoidi i spojevi arome (Tafere, 2021). Sastav meda je osobito varijabilan te ovisi o botaničkom i geografskom podrijetlu, a na sastav i kvalitetu također utječu i čimbenici okoliša poput vremena, vlažnosti unutar košnice, stanje nektara te rukovanje medom tijekom vađenja i skladištenja. Sastav meda varira i ovisno o prehrani pčela (Wissam i sur. 2022).

### 2.2.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su glavni sastojci i čine oko 95 % suhe tvari meda. Najzastupljeniji su monosaharidi glukoza i fruktoza, s udjelom oko 75 %. U gotovo svim vrstama meda prevladava fruktoza, osim rijetkih kao što su med uljane repice (*Brassica napus*) i maslačka (*Taraxacum officinale*) gdje udio glukoze može biti viši od udjela fruktoze pa posljedično ove vrste meda pokazuju brzu kristalizaciju (da Silva i sur., 2016). Med bagrema i kestena ističu se kao bogati fruktozom (Vahčić i Matković, 2009). Udio glukoze i fruktoze u svakom pojedinom medu ovisi o izvoru nektara, a njihov omjer koristan je pokazatelj kod klasifikacije uniflornih vrsta meda te kod predviđanja tendencije kristalizacije. Osim navedenih šećera, u malim količinama ističu se i disaharidi saharoza, maltoza, turanoza, izomaltoza i kobioza, a od oligosaharida su zastupljeni maltotriosa, melecitoza, erloza, panoza, izopanoza i rafinoza. U usporedbi s nektarnim, med medljikovac sadrži veći udio melecitoze, rafinoze i trehaloze. Slatkoću medu daju fruktoza, glukoza, saharoza i maltoza, no kako je fruktoza otprilike dva puta slađa od saharoze i količinski najzastupljeniji šećer u medu, proizlazi kako fruktoza najviše pridonosi slatkoći meda. Prema nekim istraživanjima, udio saharoze koristan je pokazatelj kod utvrđivanja patvorenja meda, hranjenja pčela šećerom ili dodavanja šećernog sirupa u med (Kolayli i sur., 2012). Osim slatkoće, šećeri prisutni u medu odgovorni su za svojstva poput energetske vrijednosti, visko-

znosti, higroskopnosti i kristalizacije. Sastav šećera uglavnom ovisi o botaničkom i geografskom podrijetlu meda, a na njega imaju utjecaj i klima, prerada i skladištenje (da Silva i sur., 2016).

### 2.2.2. Voda

Udio vode u medu iznosi 15-20 % i drugi je najzastupljeniji sastojak meda (Bogdanov, 2011). Sadržaj vode ima utjecaj na fizikalna svojstva meda, odnosno na viskoznost, gustoću i kristalizaciju te će med s većim udjelom vode sporije kristalizirati i biti manje viskozan. Kako je med higroskopan, količina vode tijekom čuvanja se mijenja u ovisnosti o vlažnosti zraka, a ovisi i o botaničkom podrijetlu, atmosferskim uvjetima i uvjetima tijekom prerade i skladištenja (Vahčić i Matković, 2009). Sadržaj vode u medu jedan je od aspekata kvalitete koji ukazuje na stabilnost meda i otpornost na kvarenje fermentacijom kvasca. Stoga, što je niži udio vode, veća je percipirana vrijednost meda, jer ukoliko je udio vode u medu veći od 20 % može doći do fermentacije i gubitka okusa (Tafere, 2021).

### 2.2.3. Organske kiseline

U medu ne dolazi do izražaja okus kiselosti jer sadrži tek oko 0,57 % organskih kiselina. Kiseline su povezane s bojom, okusom i kemijskim svojstvima meda kao što su kiselost, pH i električna vodljivost te se one koriste za razlikovanje meda prema botaničkom ili zemljopisnom podrijetlu. Najzastupljenija je glukonska kiselina, produkt oksidacije glukoze djelovanjem enzima glukoza-oksidade. Koncentracija glukonske kiseline se, uz koncentraciju limunske kiseline, koristi kao pouzdan parametar za razlikovanje nektarnog meda od medljike (da Silva i sur., 2016). pH nektarnog meda nalazi se između 3,3 i 4,6, uz izuzetak meda kestena s pH vrijednošću 5 do 6, dok je pH vrijednost meda medljikovca malo viša i kreće se od 4,5 do 6,5. U manjim količinama detektirane su i sljedeće kiseline: mravlja, octena, limunska, mliječna, maleinska, jabučna, oksalna, piroglutaminska i jantarna (Bogdanov, 2011).

### 2.2.4. Vitamini i mineralne tvari

Izvor vitamina su uglavnom pelud i nektar te se med ne smatra značajnim izvorom zbog njihova malog udjela. Najzastupljeniji su vitamini B skupine (tiamin, riboflavin, nikotinska

kiselina, pantotenska kiselina, piridoksin, biotin i folna kiselina) (da Silva i sur., 2016), C vitamin i u tragovima prisutni vitamini A, D, E i K (Wissam i sur. 2022). Vitamin C, odnosno askorbinska kiselina, je važan zbog antioksidacijskog djelovanja i nalazi se u gotovo svim vrstama meda. Proces filtracije meda, kao i oksidacija vodikovim peroksidom mogu uzrokovati smanjenje sadržaja vitamina (da Silva i sur., 2016).

Udio mineralnih tvari u cvjetnom medu kreće se između 0,1 i 0,3 %, dok med medljikovac može sadržavati do 1 % (Bogdanov, 2011). Sam sadržaj mineralnih tvari prisutnih u nektaru i medu ovisi o sastavu tla na kojem se nalazi medonosna biljka i može ukazivati na botaničko podrijetlo određenog meda. Najzastupljeniji element je kalij, koji čini jednu trećinu ukupnog mineralnog sadržaja, uz manje količine ostalih mineralnih tvari poput natrija, željeza, bakra, silicija, mangana, kalcija i magnezija (da Silva i sur., 2016). Iako ne čine značajan udio, mineralne tvari povećavaju nutritivnu vrijednost meda, te su tamnije vrste meda bogatije mineralnim tvarima od svjetlijih (Tafere, 2021).

#### 2.2.5. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljnog podrijetla, te su u medu to uglavnom flavonoidi, fenolne kiseline i njihovi derivati, koji posjeduju antioksidacijska svojstva (Zammit Young i Blundell, 2023). Sastav i sadržaj fenolnih spojeva razlikuju se ovisno o unifloornim vrstama meda, pri čemu tamnije vrste meda sadrže više derivata fenolne kiseline, ali manje flavonoida u odnosu na svjetlije (Tafere, 2021). Najčešći flavonoidi u medu su kvercetin, kamferol i miricetin, dok se od fenolnih kiselina ističu galna, kumarinska i ferulinska (Becerril-sánchez i sur., 2021).

#### 2.2.6. Hidroksimetilfurfural (HMF)

Hidroksimetilfurfural (HMF) je ciklički aldehid koji nastaje razgradnjom fruktoze ili Maillard-ovim reakcijama te je u medu prisutan samo u tragovima, dok mu koncentracija raste skladištenjem i duljim zagrijavanjem meda (da Silva i sur., 2016). Koncentracija HMF-a koristi se kao pokazatelj zagrijavanja meda (Tafere, 2021), međutim, udio HMF-a ovisi i o vrsti meda, vrsti šećera, prisutnosti organskih kiselina, pH vrijednosti i udjelu vlage. Osim toga, HMF može nastati i na niskim temperaturama reakcijom dehidratacije šećera u kiselom mediju

(da Silva i sur., 2016). Prema Codex Alimentarius i standardima EU-a, maksimalna vrijednost za HMF je 40 mg/kg za mješavinu ili prerađeni med, odnosno 80 mg/kg za med tropskog podrijetla (Wissam i sur. 2022).

#### 2.2.7. Proteini i aminokiseline

Udio proteina u medu varira ovisno o vrsti medonosnih pčela i čimbenicima okoliša pa tako med *Apis cerana* sadrži 0,1–3,3 % proteina, dok med *Apis mellifera* sadrži između 0,2-1,6 % proteina. Izvor proteina u medu može biti biljni ili životinjski, odnosno proteini koji dopijevaju u med iz žlijezda slinovnica i hipofaringealnih žlijezda pčele prilikom prerade nektara ili medljike su životinjskog podrijetla, dok su oni biljnog podrijetla iz peludi, koja je i sama prilično bogata proteinima (da Silva i sur., 2016).

Osim aminokiselina vezanih u proteine, u medu se nalaze i slobodne aminokiseline te njihov udio iznosi oko 1 %, a ovisi o podrijetlu meda (nektar ili medljika). Najzastupljenija slobodna aminokiselina je prolin koji čini 80-90 % ukupnih aminokiselina, s izuzetkom meda lavande, timijana i ružmarina gdje je najzastupljenija aminokiselina fenilalanin (Flanjak i sur., 2016). Prolin je životinjskog podrijetla i uglavnom potječe od pčela tijekom prerade nektara u med, a njegov udio se koristi kao kriterij za ocjenu sazrijevanja meda i patvorenja sa šećerom. Ukoliko je vrijednost prolina za svježi, izvorni med manja od 180 mg/kg, med je vjerojatno patvoren dodatkom šećera (da Silva i sur., 2016). Osim prolina, u medu je identificirano 26 aminokiselina, a ističu se još fenilalanin i glutaminska kiselina (Chua i sur., 2013).

#### 2.2.8. Enzimi

Enzimi imaju ulogu pokretanja i ubrzavanja brojnih kemijskih reakcija u organizmu. Većina proteina u medu su enzimi, a najvažniji su dijastaza ( $\alpha$ -amilaza), invertaza ( $\alpha$ -glukozidaza), glukoza-oksidaza, katalaza i kisela fosfataza. Izvor enzima prisutnih u medu mogu biti nektar, pelud i pčele koje ih dodaju u med tijekom prerade nektara, a mogu potjecati i od bakterija i kvasaca prisutnih u medu. Različite vrste meda pokazuju različite aktivnosti enzima te se sadržaj i aktivnost enzima u medu općenito koriste kao parametri kvalitete te indikatori prerade i skladištenja (Flanjak i sur., 2016). Dijastaza je u medu uglavnom prisutna kao  $\alpha$ -amilaza koja razgrađuje škrob u jednostavnije dekstrine, no med ne sadrži značajne

količine škroba i njegova uloga još nije jasno utvrđena. Invertaza katalizira razgradnju saharoze na glukozu i fruktozu, isto kao i razgradnju drugih ugljikohidrata prisutnih u medu. Glukoza-oksidadaza i katalaza reguliraju nastanak vodikova peroksida i time izravno utječu na mikrobiološku stabilnost meda. Naime, glukoza-oksidadaza katalizira oksidaciju glukoze u glukonsku kiselinu pri čemu nastaje vodikov peroksid, dok katalaza razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik. Aktivnost kisele fosfataze povezana je s procesima fermentacije meda (Bogdanov, 2011).

### 2.3. ZNAČAJ PROTEINA U MEDU I METODE ODREĐIVANJA

Proteinski sastav meda može se razlikovati kao posljedica različitog podrijetla pčela, kao i nektara koji koriste (Bocian, 2019). Proteini često smanjuju površinsku napetost meda te time utječu na svojstva stvaranja pjene i mjehurića zraka (Chua i sur., 2013). U medu su najzastupljeniji proteini takozvane obitelji glavnih proteina matične mliječi (eng. *Major Royal Jelly family*) koja se sastoji od devet homolognih članova (MRJP1-9) koje izlučuju hipofaringealne žlijezde pčela koje brinu o leglu u košnici. Glavni protein matične mliječi je MRJP1. Ostali proteini meda koji potiču od pčela su specifični enzimi (Muresan i sur., 2022). Unatoč niskom udjelu, proteini prisutni u medu sve se više proučavaju i koriste kao pokazatelji autentičnosti i kvalitete meda te poznavanje njihova sastava može stvoriti nove mogućnosti za medicinsku i farmaceutsku primjenu meda (Erban, 2019). Službena metoda za otkrivanje patvorenja meda dodatkom šećernog sirupa iz kukuruza i šećerne trske temelji se na usporedbi omjera ugljikovih izotopa u medu te omjera ugljikovih izotopa u proteinima izdvojenim iz meda. Omjeri izotopa ugljika u izoliranim proteinima meda i medu bi trebali biti jednaki i njihovom se analizom može otkriti radi li se o krivotvorenju meda dodatkom šećera (Chua i sur., 2013).

Proteini, kao velika skupina strukturno kompleksnih spojeva, imaju glavnu ulogu u rastu i održavanju ljudskog tijela, a osim toga imaju i širok raspon djelovanja poput enzimske aktivnosti te transporta hranjivih tvari i drugih biokemijskih spojeva kroz stanične membrane (Mæhre i sur., 2018). Obzirom da predstavljaju grupu sličnih spojeva, kompleksne građe sa različitim svojstvima, određivanje proteina u hrani nije uvijek jednostavno (Marković i sur., 2017), a osim toga njihovu dostupnost dodatno mogu otežati sastav i struktura hrane te interakcije između različitih sastojaka. Njihov udio može se odrediti različitim analitičkim



metodama; izravno na temelju analize aminokiselinskih ostataka, neizravno iz udjela dušika ili nakon kemijskih reakcija s funkcionalnim skupinama unutar proteina (Mæhre i sur., 2018). Obično je tijekom određivanja važan podatak o ukupnoj količini proteina dok se rijetko određuju pojedini. Najčešću primjenu imaju metode kojima se udio proteina određuje indirektno iz udjela dušika pri čemu se razlikuju metode po Dumas-u, metoda po Will-Varentropp-u, metoda po Meulen-Hesling-u, metoda po Kjeldahl-u (Marković i sur., 2017).

Valverde i suradnici (2022) navode pregled najčešće korištenih analitičkih metoda za određivanje sastojaka meda tijekom razdoblja od šest godina (2015.-2021.) te ističu da su različiti autori u svojim istraživanjima ukupan sadržaj proteina određivali koristeći tri različita pristupa: Kjeldahl-ov, Bradford-ov i IRMS (*eng. Isotope Ratio Mass Spectroscopy*).

Metoda po Kjeldahl-u koristi se već više od sto godina za određivanje udjela proteina u širokom rasponu uzoraka. U osnovi, metoda se može podijeliti na tri faze: digestiju ili mineralizaciju, destilaciju i titraciju (Valverde i sur., 2022). Količina proteina izračunava se iz udjela dušika u uzorku pomoću faktora pretvorbe koji se temelji na pretpostavci da je opći sadržaj dušika u proteinima hrane 16%. Međutim, relativni sadržaj dušika varira između aminokiselina, a njihov sastav između proteina hrane (Mæhre i sur., 2018). Metoda po Kjeldahl-u priznata je kao službena metoda za određivanje proteina od strane AOAC International (*eng. Association of Official Analytical Chemists*) (AOAC, 1995) te se smatra standardnom metodom na globalnoj razini. Nedostaci ove metode su moguća opasnost kod rukovanja koncentriranom sumpornom kiselinom na visokim temperaturama i kod uporabe nekih od mogućih katalizatora, kao i dugotrajnost izvođenja (Mihaljev i sur., 2015).

Kolorimetrijska metoda po Bradford-u ima brojne prednosti poput veće osjetljivosti na proteine, brzine reakcije i stabilnijeg kompleksa protein-boja za spektrofotometrijska mjerenja, a osim toga lako se primjenjuje i pouzdana je za niz matrica uzorka. Određivanje proteina ovom metodom temelji se na vezanju boje Coomassie blue G-250 na protein čime nastaju stabilni kompleksi protein-boja kojima se mjeri apsorbancija na 595 nm. Pritom se obično koristi goveđi serumski albumin (BSA; *eng. Bovine Serum Albumin*) kao vanjski standard, iako je primijećeno da nije uvijek pogodan (Chua i sur., 2013).

Analiza stabilnih izotopa ugljika međunarodno je prihvaćena kao metoda za identifikaciju patvorenja meda C4 šećerima, a temelji se na usporedbi  $\delta^{13}\text{C}$  u medu i proteinima čija se analiza provodi IRMS spektroskopijom s elementarnim analizatorom (EA) ili tekućinskim kromatografom (LC). Razlika između vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  proteina i meda ne smije biti veća od

1% (Valverde i sur., 2022).

Osim navedenih, pojedina istraživanja (Chua i sur., 2013; Sajwani i sur., 2007) navode i određivanje sadržaja proteina kolorimetrijskom metodom po Lowry-u. Lowry-eva metoda temelji se na kombinaciji biuret reakcije, gdje ioni  $\text{Cu}^{2+}$  reagiraju s peptidnim vezama unutar proteina, s reakcijom Folin-Ciocalteu reagensa i strukture prstena tirozina i triptofana. Intenzitet nastalog plavog obojenja može se očitavati na 650-750 nm (Mæhre i sur., 2018). Iako je prednost ove metode osjetljivost na proteine, često se navode i njezini nedostaci poput relativno spore brzine reakcije, nelinearnosti u pripremi standardne krivulje te nedostatka specifičnosti i stabilnosti nekih reagensa (Chua i sur., 2013).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci

Tijekom izrade ovog rada laboratorijskim je analizama određeni ukupni udio proteina u 18 uzoraka meda koji su izdvojeni od ukupnog broja uzoraka meda analiziranih i ocijenjenih na 18. Međunarodnom natjecanju pčelara u kvaliteti meda – Zzzagimed 2022. Analizirani uzorci su obuhvaćali uniflorne vrste meda bagrema (n=6), kestena (n=6) i lipe (n=6) te su u Tablici 1 prikazane njihove oznake.

**Tablica 1.** Analizirani uzorci uniflornog meda iz sezone 2022.

Vrsta meda	Oznaka uzorka
bagrem	128, 209, 189, 22, 25, 198
kesten	2, 8, 134, 38, 215, 18
lipa	129, 122, 205, 211, 146, 20



**Slika 1.** Uzorci uniflornih vrsta meda (a) bagrema (b) kestena (c) lipe iz sezone 2022. (vlastita fotografija)

### 3.1.2. Laboratorijsko posuđe i uređaji

- aluminijska ladica
- analitička vaga (SHIMADZU AX 200)
- kivete za Kjelttec sustav (500 mL)
- blok za spaljivanje (Tecator Digestion system 6, 1007 Digester)
- destilacijska jedinica Kjelttec sustava (Kjelttec<sup>TM</sup> 8100, Tecator<sup>TM</sup> Line, Foss)
- Erlenmeyerova tikvica (300 mL)
- trbušasta pipeta (25 mL)
- bireta
- staklena čaša (100 mL)
- menzura (25 mL).

### 3.1.3. Reagensi

- koncentrirana 96%-tna sumporna kiselina ( $H_2SO_4$ , Lach-Ner s.r.o., Češka)
- Kjeldahl-ove tablete ( $K_2SO_4 + CuSO_4$ , Merck KGaA, Njemačka)
- 4%-tna borna kiselina ( $BH_3O_3$ , Fisher BioReagents, Kina)
- 40%-tni natrijev hidroksid (NaOH)
- obojeni indikator; metil crveno, bromkrezol zeleno (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)
- klorovodična kiselina (HCl, 0,1 mol/L, Kemika, Hrvatska).

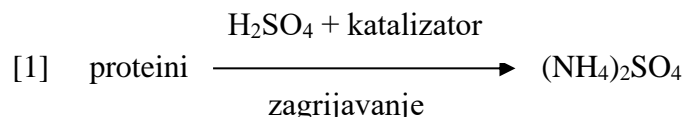
## 3.2. METODE

Određivanje udjela dušika i ukupnih proteina u navedenim uzorcima meda provedeno je metodom po Kjeldahl-u (AOAC, 1995; Kropf i sur., 2010).

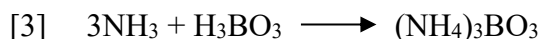
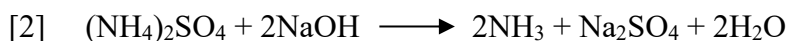
### 3.2.1. Princip metode po Kjeldahl-u

Kako bi se u uzorku odredili ukupni proteini najčešće se primjenjuje metoda po Kjeldahl-u kojom se udio proteina određuje indirektno preko udjela dušika uz korištenje Kjelttec sustava,

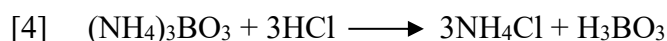
kroz postupke spaljivanja, destilacije i titracije. Ovom metodom se prvenstveno određuje udio dušika koji se nalazi u sastavu -NH grupa prisutnih u analiziranom uzorku. Postotak ukupnih proteina dobije se množenjem udjela dušika s odgovarajućim faktorom pretvorbe F koji je definiran za određene namirnice ili skupine namirnica. Provedba metode počinje postupkom spaljivanja uzorka sa sumpornom kiselinom kako bi se razorile organske tvari uz korištenje  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  kao katalizatora i  $\text{K}_2\text{SO}_4$  koji povisuje vrelište kiseline pri čemu se oslobađa proteinski i neproteinski dušik koji zaostaje u obliku amonijeva sulfata (Vahčić i sur., 2008).



Dodatkom natrijeva hidroksida tijekom postupka destilacije dolazi do oslobađanja amonijaka koji se zatim predestilira u bornu kiselinu te nastaje amonijev borat.



Amonijev borat titrira se klorovodičnom kiselinom pri čemu nastaje amonijev klorid i borna kiselina.



### 3.2.2. Postupak određivanja

Na analitičkoj vagi se u prethodno pripremljenu aluminijsku lađicu odvagne 5,0 g (s točnošću  $\pm 0,0001$ ) uzorka meda te se lađica s uzorkom pažljivo prebaci u kivetu od 500 mL pazeći da grlo kivete ostane čisto. Zatim se u kivetu s uzorkom doda 1 Kjeldahl-ova tableta ( $\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4$ ) i 20 mL koncentrirane sumporne kiseline. Kiveta se stavi u već zagrijani blok za spaljivanje koji se nalazi u digestoru. Tijekom postupka spaljivanja sadržaj se počinje pjeniti te je potrebno paziti da pjena ne prijeđe polovicu volumena kivete kako ne bi došlo do izlijevanja sadržaja. Ovisno o svakom pojedinom uzorku, spaljivanje se provodi nekoliko sati, odnosno, završeno je kada sadržaj poprimi plavo-zelenu boju bez neizgorelih crnih komadića. Nakon hlađenja sadržaja u kiveti slijedi postupak destilacije. Kiveta se postavi u destilacijsku

jedinicu Kjeltec uređaja koji je prethodno zagrijan te se dobro učvrsti. Na predviđeno postolje postavi se Erlenmeyerova tikvica sa 25 mL borne kiseline i pripadajućim indikatorima tako da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu borne kiseline. Destilacija se provodi automatski, na način da se u kivetu dozira 50 mL 40% NaOH. Trajanje destilacije je 6 minuta pri čemu je amonijak predestilirani u bornu kiselinu što je vidljivo promjenom boje destilata iz ružičaste u plavo-zelenu. Na kraju se plavo-zelena otopina u Erlenmeyerovoj tikvici titrira klorovodičnom kiselinom do prelaska boje u blijedoružičastu.

Račun za udio ukupnog dušika (N):

$$[5] \quad \% \text{ ukupnog } N = \frac{V \times N \times 14,007 \times 100}{m}$$

Račun za udio ukupnih proteina:

$$[6] \quad \% \text{ proteina} = \%N \times F$$

gdje je:

V – volumen HCl utrošene za titraciju uzorka (mL)

N – molaritet kiseline (0,1M)

m – masa uzorka (mg)

F – faktor za preračunavanje % dušika u proteine (za med F=6,25).

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U 18 uzoraka uniflornih vrsta meda kestena, bagrema i lipe iz sezone 2022. određen je ukupni udio proteina metodom po Kjeldahl-u. Analitički podaci dobiveni laboratorijskim analizama pregledno su prikazani u Tablicama 2, 3 i 4 te su uspoređeni s podacima dostupnim u znanstvenoj literaturi.

**Tablica 2.** Udio ukupnih proteina u uzorcima meda bagrema (n=6)

Vrsta meda	Oznaka uzorka	Udio dušika (%)	Udio proteina (%)
bagrem	128	0,02	0,10
	209	0,02	0,11
	189	0,03	0,16
	22	0,02	0,12
	25	0,04	0,26
	198	0,03	0,19
<b>Raspon</b>		<b>0,02-0,04</b>	<b>0,10-0,26</b>

Udio proteina u medu određen je metodom po Kjeldahl-u indirektno iz udjela dušika. Dobivene vrijednosti za postotak dušika množene su s faktorom pretvorbe 6,25.

Prema podacima prikazanim u Tablici 2 vidljivo je da se raspon udjela ukupnih proteina u analiziranim uzorcima meda bagrema (n=6) kretao od 0,10 % do 0,26 %.

**Tablica 3.** Udio ukupnih proteina u uzorcima meda kestena (n=6)

Vrsta meda	Oznaka uzorka	Udio dušika (%)	Udio proteina (%)
kesten	2	0,04	0,25
	8	0,02	0,14
	134	0,05	0,33
	38	0,07	0,45
	215	0,08	0,51
	18	0,05	0,33
<b>Raspon</b>		<b>0,02-0,08</b>	<b>0,14-0,51</b>

U Tablici 3 prikazane su vrijednosti za udio ukupnih proteina u uzorcima meda kestena (n=6) i najmanja dobivena vrijednost iznosi 0,14 %, odnosno najviša 0,51 %.

**Tablica 4.** Udio ukupnih proteina u uzorcima meda lipe (n=6)

Vrsta meda	Oznaka uzorka	Udio dušika (%)	Udio proteina (%)
lipa	129	0,04	0,23
	122	0,04	0,23
	205	0,02	0,11
	211	0,02	0,12
	146	0,04	0,25
	20	0,02	0,14
<b>Raspon</b>		<b>0,02-0,04</b>	<b>0,11-0,25</b>

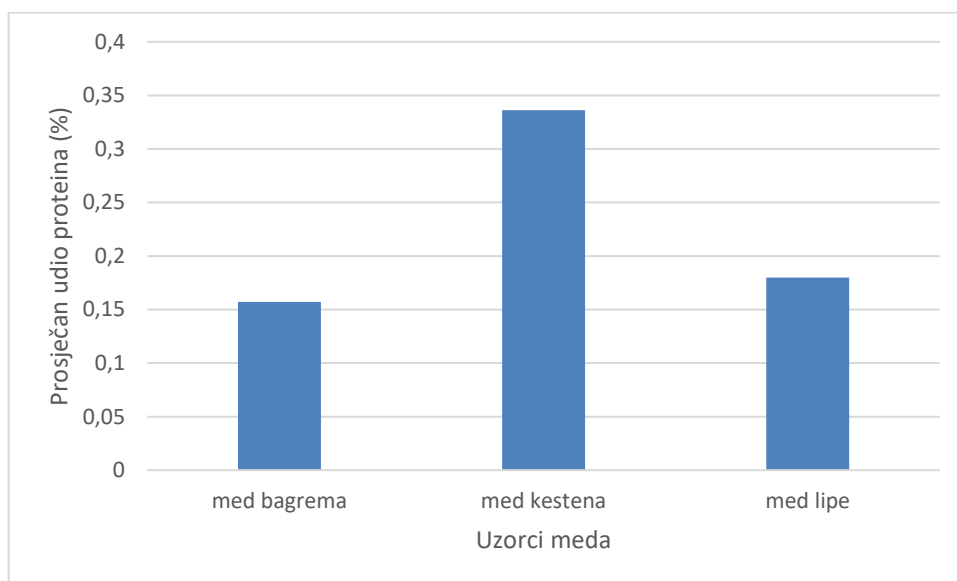
Uzorci meda lipe (n=6) sadržavali su između 0,11 % - 0,25 % ukupnih proteina (Tablica 4).

Vrijednosti za ukupan udio proteina u svim uzorcima meda nalaze se između 0,10 % i 0,51 %. U prosjeku, najviši udio ukupnih proteina od 0,34 % sadržavali su uzorci meda kestena dok su kod uzoraka meda bagrema i lipe prosječne vrijednosti malo niže i iznose 0,16 % i 0,18 % (Slika 2).

Kropf i suradnici (2010) u svojem su radu istražili zemljopisno podrijetlo uzoraka meda bagrema, kestena i lipe koji su prikupljeni od pčelara iz četiri različite slovenske regije (alpska, dinarska, panonska i mediteranska). Proveli su analizu fizikalno-kemijskih parametara u ukupno 122 uzorka meda između kojih su odredili i udio ukupnih proteina metodom po Kjeldahl-u. Udio proteina određen u uzorcima meda bagrema iznosio je 0,144-0,156 %, dok je med lipe sadržavao 0,154-0,156 % te med kestena 0,338-0,352 %. U odnosu na navedeno, malo viši postotak proteina određen metodom po Kjeldahl-u, odnosno  $0,61 \pm 0,01$  % sadržavala su tri uzorka meda kestena analizirana u radu Sánchez-Martín i suradnika (2022) koji su pratili učinak dodatka matične mliječi i propolisa na ukupni sadržaj fenola i antioksidacijski kapacitet meda španjolske majčine dušice i kestena. Nadalje, Lim i suradnici (2019) proveli su istraživanje s ciljem procjene nutritivnog sastava šest uzoraka meda proizvedenog od pčela bez žalca (med bagrema, kokosa, zvjezdastog voća, mangrove, voćni i multiflorni) različitog botaničkog podrijetla prikupljenih u južnom dijelu Malezije. U spomenutom istraživanju (Lim i sur., 2019) udio ukupnih proteina određen je metodom po Kjeldahl-u i za med bagrema



iznosio je 0,50 %, te je od strane autora zaključeno da je udio ukupnih proteina sličan onom u medu *A. mellifera*, te da sastav meda uvelike ovisi o botaničkom podrijetlu meda.



**Slika 2.** Prosječan udio ukupnih proteina (%) u uzorcima uniflornih vrsta meda bagrema, kestena i lipe iz sezone 2022.

U istraživanjima autora koji su ukupan udio proteina određivali brzom i jednostavnom kolorimetrijskom metodom po Bradford-u (Erban i sur., 2019; Flanjak i sur., 2016), dobiveni rezultati za udio ukupnih proteina u uzorcima meda bagrema, kestena i lipe niži su u odnosu na rezultate dobivene u ovom radu. Tako su Flanjak i suradnici (2016) tijekom karakterizacije četiri najzastupljenije vrste meda u Hrvatskoj (med bagrema, kadulje, kestena i med medljikovac) prema sadržaju proteina, prolina i aktivnosti enzima odredili prosječne vrijednosti za ukupan udio proteina u 15 uzoraka meda od kestena ( $94,8 \pm 134$  mg/100g) i po 10 uzoraka od ostalih navedenih vrsta meda, odnosno bagrema ( $30,4 \pm 7,9$  mg/100g), kadulje ( $79,2 \pm 13,9$  mg/100g) i meda medljikovca ( $59,4 \pm 21,8$  mg/100g). Cilj istraživanja bio je utvrditi specifičnosti i doprinjeti karakterizaciji uniflornih vrsta meda u Republici Hrvatskoj. Isto tako, metodom po Bradford-u, Erban i suradnici (2019) su tijekom proučavanja proteinskog sastava ukupno 13 uzoraka meda utvrdili da su u prosjeku 0,01 % ukupnih proteina sadržavali uzorci meda bagrema ( $n=2$ ) i 0,03 % ukupnih proteina uzorci meda lipe ( $n=3$ ).

Uspoređujući vrijednosti udjela ukupnih proteina dobivene ovim istraživanjem sa vrijednostima udjela ukupnih proteina dobivenih tijekom istraživanja drugih autora koji su također udio ukupnih proteina odredili metodom po Kjeldahl-u, vidljivo je da su prosječne

vrijednosti dobivene tijekom ovog istraživanja nešto niže u odnosu na rezultate istraživanja za udio ukupnih proteina u medu kestena (0,61 %) prema Sánchez-Martín i suradnicima (2022) kao i rezultate za udio ukupnih proteina u medu bagrema (0,50 %) prema Lim i suradnicima (2019). Međutim, prosječan udio ukupnih proteina određen metodom po Kjeldahl-u u uzorcima uniflornih vrsta meda bagrema (0,16 %), kestena (0,34 %) i lipe (0,18 %), analiziranih tijekom ovog istraživanja (Slika 2), u skladu je sa vrijednostima dobivenim istraživanjem Kropf i suradnika (2010), tijekom kojeg su također analizirani med bagrema, kestena i lipe prikupljeni od pčelara iz četiri slovenske regije.

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima meda bagrema (n=6) kretao se u rasponu od 0,10 % do 0,26 %, te je prosječno iznosio 0,16 %.
2. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima meda kestena (n=6) kretao se u rasponu od 0,14 % do 0,51 %, te je prosječno iznosio 0,34 %.
3. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima meda lipe (n=6) kretao se u rasponu od 0,11 % do 0,25 %, te je prosječno iznosio 0,18 %.
4. Najviši prosječan udio ukupnih proteina metodom po Kjeldahl-u je određen u uzorcima meda kestena, a slijede lipa i bagrem. Rezultati analiza u skladu su s rezultatima istraživanja drugih autora koji su ukupni udio proteina određivali metodom po Kjeldahl-u, te mogu predstavljati doprinos u procjeni kvalitete analiziranih vrsta uniflornog meda.

## 6. POPIS LITERATURE

Ahmed S, Othman NH (2013) Honey as a potential natural anticancer agent: A review of its mechanisms. *eCAM*. <https://doi.org/10.1155/2013/829070>

AOAC (1995) Official Methods of Analysis of AOAC International, 16. izd., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.

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)

Becerril-sánchez AL, Quintero-salazar B, Dublán-garcía O, Escalona-buendía HB (2021) Phenolic compounds in honey and their relationship with antioxidant activity, botanical origin, and color. *AOs* **10(11)**. <https://doi.org/10.3390/antiox10111700>

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/molecules24132399>

Bogdanov S (2011) Honey Composition. In *The Honey Book*. Bee Product Science. , [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net) Pristupljeno 21. travnja 2023.

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>

da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R (2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem* **196**, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>

Dağ B, Sirali R, Tarakçi Z, Doç Y, Karadeniz T, Üretilen B, Bazı KB, Araştırılması Ö (2017) Investigation Of Some Properties Of Chestnut Honey Produced In Black Sea Region Of Turkey. *J Life Sci*, **7(2)**, 118-123.

Erbán 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, Kenjerić 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>

Huang Z (2010) Honey Bee Nutrition. <http://articles.extension.org/pages/28844/honey-bee-nutrition>

Kolayli S, Boukraa L, Sahin H, Abdellah F (2012) Sugars in Honey. V. R. Preedy (ured.), Dietary Sugars: Chemistry, Analysis, Function and Effects, 3 izd., The Royal Society of Chemistry. [https://books.google.hr/books?id=YHMoDwAAQBAJ&dq=sugars+in+honey&lr=&hl=hr&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.hr/books?id=YHMoDwAAQBAJ&dq=sugars+in+honey&lr=&hl=hr&source=gbs_navlinks_s). Pristupljeno 21.travnja 2023.

Kropf U, Korošec M, Bertoncej 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.2009.12.09>

Lim DCC, Abu Bakar MF, Majid M (2019) IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. **269**. doi:10.1088/1755-1315/269/1/012025

Mæhre HK, Dalheim L, Edvinsen GK, Elvevoll EO, Jensen IJ (2018) Protein determination—method matters. *Foods*, **7(1)**. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>

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

Mihaljev ŽA, Jakšić SM, Prica NB, Čupić ŽN, Živkov-Baloš MM (2015) Comparison of the Kjeldahl method, Dumas method and NIR method for total nitrogen determination in meat and meat products. *J Agroaliment Process Technol* **21(4)**, 365-370. [https://www.journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/7256757\\_L12\\_Manuscript\\_submission\\_365-370.pdf](https://www.journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/7256757_L12_Manuscript_submission_365-370.pdf)

Mureșan CI, Cornea-Cipcigan M, Suharoschi R, Erler S, Mărgăoan R (2022) Honey botanical origin and honey-specific protein pattern: Characterization of some European honeys. *LWT*, **154**. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112883>

Nicolson SW (2022) Sweet solutions: nectar chemistry and quality. *Phil Trans R. Soc B377*, 20210163-20210167. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0163>

Pavlova T, Stamatovska V, Kalevska T, Dimov I, Nakov G (2018) Quality characteristic of honey: A review. U: Proceedings of University of Ruse 2018, University of Ruse and Union of Scientists, Ruse, **57**, str. 31-37. <https://portal.issn.org/>.

- Niculina M, al Marghitas L, Dezmiorean D (2012) Black locust (*Robinia pseudoacacia*): The most valuable source for monofloral honey in Romania. *Agricultura*, **3- 4(83-84)**, 162-168. [http://apiardeal.ro/romikele/Apicultura\\_pentru\\_toti](http://apiardeal.ro/romikele/Apicultura_pentru_toti)
- Pravilnik (2009) Pravilnik o kakvoći uniflornog meda. Narodne novine 122. Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009\\_10\\_122\\_3018.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_10_122_3018.html). Pristupljeno 19. travnja 2023.
- Pravilnik (2015) 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 17. travnja 2023.
- 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>
- Sánchez-Martín V, Morales P, González-Porto AV, Iriundo-DeHond A, López-Parra MB, Del Castillo MD, Hospital XF, Fernández M, Hierro E, Haza AI (2022) Enhancement of the Antioxidant Capacity of Thyme and Chestnut Honey by Addition of Bee Products. *Foods*, **11**, 3118. <https://doi.org/10.3390/foods11193118>
- 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>
- 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 17. travnja 2023.
- Valverde S, Ares AM, Stephen Elmore J, Bernal J (2022) Recent trends in the analysis of honey constituents. *Food Chem* **387** <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132920>
- Waheed M, Hussain M, Javed A, Mushtaq Z, Hassan S, Shariati MA, Khan MU, Majeed M, Nigam M, Mishra AP, Heydari M (2019) Honey and cancer: A mechanistic review, *Clin Nutr*, **38(6)**, 2499-2503. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.019>.

Zammit Young GW, Blundell R (2023) A review on the phytochemical composition and health applications of honey. *Heliyon* **9(2)**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12507>

## Izjava o izvornosti

Ja Ivana Telebar izjavljujem daje 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.

Ivana Telebar

Vlastoručni potpis