

# Udio proteina u različitim vrstama meda iz sezone 2022.

---

**Matijašević, Lucija**

**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:159:334960>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Lucija Matijašević  
0058214961**

**UDIO PROTEINA U RAZLIČITIM VRSTAMA 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  
Sveučilišni prijediplomski 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 različitim vrstama meda iz sezone 2022.**

**Lucija Matijašević, 0058214961**

**Sažetak:** Određivanje pojedinih sastojaka meda te analize njegovih svojstava često pronalaze svoju primjenu u svrhu utvrđivanja njegove autentičnosti, zbog čestih slučajeva patvorenja. Uprkos niskom udjelu u medu, određivanje udjela proteina sve se češće primjenjuje u svrhu utvrđivanja autentičnosti i kontrole kvalitete meda. Tijekom ovog istraživanja, primijenjena je metoda po Kjeldahl-u s ciljem određivanja udjela ukupnih proteina u 18 uzoraka različitih vrsta meda. Rezultati su pokazali da se udio ukupnih proteina kretao u rasponu od 0,09 % do 0,65 %, pri čemu je najviši udio ukupnih proteina određen u medu heljde (0,65 %), a najniži u medu lipe (0,09 %). Dobiveni rezultati istraživanja u skladu su s rezultatima istraživanja autora koji su također koristili metodu po Kjeldahl-u za određivanje udjela ukupnih proteina.

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

**Rad sadrži:** 28 stranica, 2 slike, 2 tablice, 36 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:** 14.7.2023.

## 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 different honey types from the 2022 season**

**Lucija Matijašević, 0058214961**

**Abstract:** Determination of individual components of honey and analysing its properties are often used to determine its authenticity, due to frequent cases of adulteration. Despite the low content in honey, determination of protein content is increasingly being used to determine the authenticity and quality control of honey. During this research, the Kjeldahl method was applied, with the aim of determination the total protein content in 18 samples of different types of honey. The results showed that the content of total proteins ranged from 0,09 % to 0,65 %, with buckwheat honey having the highest total protein content (0,65 %) and linden honey having the lowest (0,09 %). The obtained research results are in accordance with the research results of the authors who also used the Kjeldahl method determination of the total protein content in honey.

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

**Thesis contains:** 28 pages, 2 figures, 2 tables, 36 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 14, 2023

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. DEFINICIJA I PODJELA MEDA.....	2
2.2. MEDONOSNO BILJE .....	3
2.3. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA MEDA.....	6
2.3.1. KEMIJSKI SASTAV MEDA .....	6
2.3.2. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA .....	8
2.4. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA.....	10
2.5. PROTEINI U MEDU .....	11
2.6. METODE ODREĐIVANJA UKUPNIH PROTEINA.....	13
2.6.1. METODA PO KJELDAHL-U .....	14
2.6.2. METODA PO BRADFORD-U .....	14
2.6.3. METODA PO LOWRY-U .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>16</b>
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. UZORCI.....	16
3.1.2. LABORATORIJSKO POSUĐE I UREĐAJI .....	16
3.1.3. REAGENSI .....	17
3.2. METODE RADA .....	17
3.2.1. PRINCIP METODE ODREĐIVANJA .....	17
3.2.2. POSTUPAK ODREĐIVANJA .....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>20</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>23</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>24</b>

## 1. UVOD

Med predstavlja prirodnu slatku tvar koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) iz nektara ili drugih biljnih sekreta. Prvenstveno se koristi kao zaslađivač zbog svojeg visokog udjela šećera, ali se također konzumira zbog svojih zdravstvenih dobrobiti još od drevnih vremena (Murešan i sur., 2022). Med je jedna od najsloženijih prirodnih namirnica, te njegov sastav, kao i njegova fizikalna i senzorska svojstva, ovise o biljnom i geografskom podrijetlu, vrsti pčela, klimatskim uvjetima te procesima prerade i skladištenju (Valverde i sur., 2022).

Zbog čestih slučajeva patvorenja, jedan od glavnih razloga za analizu meda i njegovog sastava jest dokazivanje njegove autentičnosti. Relativno malo pozornosti posvećeno je analizi proteina u medu zbog njihovog niskog udjela i promjenjivog udjela. Ipak, u današnje vrijeme analiza proteina u medu sve češće nalazi primjenu u dokazivanju autentičnosti i kvalitete meda (Chua i sur., 2013).

Cilj ovog istraživanja bio je laboratorijskim analizama odrediti udio ukupnih proteina u uzorcima (n=18) različitih vrsta meda (amorfa, suncokret, kadulja, drača, mandarina, uljana repica, heljda, lipa, kesten) te dobivene rezultate usporediti s vrijednostima udjela ukupnih proteina navedenim u okviru dostupnih znanstvenih istraživanja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. DEFINICIJA I PODJELA MEDA

Prema Pravilniku u medu (2015), med je prirodno sladak proizvod kojeg proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) od nektara medonosnih biljaka, sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka. Medonosne pčele sakupljaju navedene sirovine i dodaju vlastite specifične tvari, izdvajaju vodu te ih pohranjuju i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.

Med se sastoji od različitih šećera, organskih kiselina, enzima te krutih čestica koje dopijevaju u med tijekom njegova nastajanja. Medu se ne smiju dodavati nikakvi sastojci, uključujući i prehrambene aditive, niti bilo kakvi drugi dodaci. Također, med ne smije apsorbirati strane čestice, okus, aromu i boju iz stranih tvari tijekom proizvodnje i skladištenja. Pelud i sastavni dijelovi karakteristični za med ne smiju se uklanjati, osim ako je to neizbježno pri uklanjanju stranih anorganskih ili organskih tvari (Codex Alimentarius Commission, 2001).

Osim meda za industrijsku uporabu, med ne smije imati strani okus i miris, biti u stanju vrenja, imati umjetno izmjenjenu kiselost ili biti zagrijavan u svrhu uništenja ili inaktivacije prirodno prisutnih enzima u medu (Pravilnik, 2015).

Osnovne vrste meda mogu se podijeliti ovisno o podrijetlu i načinu proizvodnje.

Prema podrijetlu, med se djeli na:

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

Nektar je slatka tekućina koju luče nektarije, specijalne žlijezde u cvjetovima ili na drugim dijelovima biljke. Prema kemijskom sastavu, nektar je vodena otopina različitih šećera, dok se ostale tvari poput aminokiselina, mineralnih tvari, vitamina, organskih kiselina i esencijalnih ulja nalaze u malim količinama. Sastav nektara ovisi o vrsti biljke te se razlikuje od cvijeta do cvijeta (Bučar, 2008).

Medljiku i mednu rosu predstavljaju sirovine od kojih medonosne pčele proizvode med medljikovac ili medun. Medljika je slatki sok koji proizvode lisne štitaste uši iz porodica *Lachinae*, *Aphididae* i *Coccididae*. Štitaste uši sišu sokove te na lišću ostavljaju slatke izlučevine; medljiku, koju zatim medonosne pčele skupljaju i pretvaraju u med. Medljika sadrži

više oligosaharida u odnosu na nektar, a također sadrži šećerne alkohole i prirodne antibiotike. Medna rosa je slatkasti sok koji nastaje na lišću nekih vrsta drveća (Bučar, 2008).

Prema načinu proizvodnje, med se dijeli na:

- a) med u saću – med kojeg pčele skladište u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća
- b) med sa saćem ili med s dijelovima saća – med koji sadrži jedan ili više proizvoda iz prethodno definiranog meda u saću
- c) cijedeni med – med dobiven 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, uz mogućnost korištenja umjerene temperature do 45 °C
- f) filtrirani med – med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih i organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi (Pravilnik, 2015).

Uz navedene osnovne vrste meda, postoji još i med za industrijsku uporabu, prethodno zvan i pekarski med. Koristi se u industriji ili kao sastojak hrane koja ide na daljnju obradu, stoga takav med može imati strani okus ili miris, biti u stanju vrenja ili prevrio te biti pregrijan (Pravilnik, 2015).

## 2.2. MEDONOSNO BILJE

Navedene su vrste medonosnog bilja podrijetlom kojih je med analiziran u ovom istraživanju, ujedno značajnijih vrsta u Hrvatskoj.

- **Amorfa** (*Amorpha fruticosa* L.), također poznata pod nazivom bagremac, listopadni je grm koji primarno raste na područjima sjeverozapadne i istočne Hrvatske. Može narasti u visinu do 2 metra, a njeni cvjetovi grade karakteristične, uspravne, guste, tamnoljubičaste metlice. Amorfa cvate od travnja do lipnja te cvjetanje traje 15-20 dana (Nikolić i sur., 2014).

Amorfin med je crvenkaste boje, blagog mirisa i finog okusa, te je veoma dobar za prezimljavanje pčela (Bučar, 2008).



- **Suncokret** (*Helianthus annuus* L.) jednogodišnja je biljka prvenstveno uzgajana u svrhu proizvodnje ulja, a cvjeta početkom srpnja. Najviše se uzgaja na području Slavonije, Baranje i zapadnog Srijema (Vahčić i Matković, 2009).

Suncokretov med jantarnožute je boje, blagog mirisa te blagog do trpkog okusa. Nakon vrcanja odmah kristalizira u čvrste kristale, a nakon dužeg stajanja u kristaliziranom stanju postaje jako tvrd (Šimić, 1980).
- **Kadulja** (*Salvia officinalis* L.) je višegodišnji drvenasti grm koji je poslije bagrema najvrijednija pčelinja paša (Vahčić i Matković, 2009). Raste na područjima primorskog i dalmatinskog krša te u nekim predjelima Istre. Kadulja može narasti do 50 centimetara u visinu, a karakteriziraju ju ružičastoljubičasti cvjetovi skupljeni u cvatove nalik na klas. Cvatnja kadulje započinje u svibnju i završava u srpnju (Kovačić i sur., 2008).

Kaduljin med je svijetložute, pomalo zelenkaste boje čiji intenzitet ovisi o prisutnosti peludi vinove loze koja istodobno cvate. Ima karakterističan miris po cvijetu biljke te je ugodnog do blago gorkog okusa. Kaduljin med sporo kristalizira, ali u kristaliziranom obliku nije pretvrd (Šimić, 1980).
- **Drača** (*Paliurus spina-christi* Mill.) je razgranati listopadni grm koji raste na području obale Jadranskog mora, a također ju pronalazimo u krševitim krajevima kontinentalne Hrvatske. Prepoznatljiva je prema parovima jakih smeđih trnova, od kojih je jedan savijen poput kukice, te malim zelenožutim cvjetovima. Drača cvate od svibnja do kolovoza (Kovačić i sur., 2008).

Med od drače žute je boje, blagog okusa te nema miris. Brza kristalizacija meda od drače koristi se kao indikator njegove autentičnosti (Medved, 2020).
- **Mandarina** (*Citrus reticulata* Tanaka) zimzeleno je stablo koje se u Hrvatskoj najviše uzgaja u dolini rijeke Neretve. Raste do 3 metra u visinu te ju karakteriziraju tamnozeleni listovi i bijeli mirisni cvjetovi (Šimić, 2022). Cvatnja mandarine započinje početkom svibnja. U povoljnim uvjetima, mandarina izlučuje velike količine nektara te se stoga ubraja u najmedonosnije biljne vrste (Kovač, 2017).

Med mandarine je svijetložute do narančastosmeđe boje, intenzivnog mirisa i ugodnog slatkastog i voćnog okusa (Šimić, 2022).

- **Uljana repica** (*Brassica napus* L.) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka koja se u Hrvatskoj prvenstveno uzgaja zbog proizvodnje ulja. Uzgaja se na velikim površinama u Slavoniji, Moslavini, Posavini i Podravini. Karakteriziraju je uspravna stabljika visoka 50-150 centimetara, plavkastozeleni listovi te žuti cvjetovi. Cvatnja uljane repice započinje u travnju kada drugih pčelinjih paša gotovo nema, te traje oko 20 dana. Zbog rane cvatnje ima značajnu ulogu u izgradnji saća i razvoju pčela (Bučar, 2008).

Med uljane repice svijetložute je boje te ima okus po repičinom ulju, stoga se smatra medom lošije kvalitete. Brzo kristalizira (Šimić, 1980).

- **Heljda** (*Fagopyrum esculentum* Moench) je jednogodišnja biljka podrijetlom iz Azije koja se uzgaja zbog prehrane ljudi, proizvodnje stočne hrane ili ekstrakcije rutina (Popović i sur., 2015). U Hrvatskoj se heljda uglavnom uzgaja u Međimurju, Zagorju i u istočnoj Hrvatskoj. Cvjetovi heljde nalaze se na cvjetnim grančicama i obično su bijele boje. Cvatnja heljde započinje u lipnju i traje oko 30 dana (Vrtar, 2018).

Heljdin med jako je kvalitetan te ga karakterizira intenzivna boja i okus u odnosu na ostale vrste meda (Vrtar, 2018).

- **Lipa** (*Tillia* L.) je rod listopadnih stabala od kojih su u Hrvatskoj najznačajnije vrste velelisna lipa (*Tillia platyphyllos* Scop.), sitolisna lipa (*Tillia cordata* Mill.) i srebrna lipa (*Tillia tomentosa* Moench.) Najviše rastu u području Bilogore. Lipa može narasti do 25 metara u visinu s velikom gustom krošnjom. Karakteriziraju ju nazubljeni sroliki listovi te mirisni žuti cvjetovi (Bučar, 2008). Malolisne i velikolisne lipe cvjetaju krajem lipnja te s njih pčele skupljaju samo cvjetni prah, jer uslijed djelovanja vjetra i sunca dolazi do isušivanja nektara. Za razliku od njih, srebrna lipa cvjeta kasnije, zaštićena od vjetra te s dovoljnom količinom vlage u tlu, pa se smatra obilnim izvorom nektara (Vahčić i Matković, 2009).

Lipin med svijetložute je do zelenkaste boje, ukusan i pomalo gorak. Med iz nepoklopljenog saća oštrog je mirisa, a iz poklopljenog saća blagog je mirisa po lipi. Sporo kristalizira (Šimić, 1980).

- **Pitomi kesten** (*Castanea sativa* Mill.) jednodomna je biljka koja raste u samoniklim šumama na području Sisačko-moslavačke županije, u okolici Zagreba te u gorju

sjeverozapadne Hrvatske. Stablo kestena može narasti do 25 metara u visinu, s bujnim i velikim krošnjama. Muški cvjetovi skupljeni su u klupčaste cvatove, a ženski cvjetovi obavijeni su zelenim ovojem te se nalaze pri dnu resa ili u pazušcima listova. Cvatnja kestena započinje u lipnju poslije listanja i traje oko 10-20 dana. Kesten je najmedonosnija voćna vrsta (Bučar, 2008.).

Med kestena tamnožute je do svijetlosmeđe boje, intenzivnog i oštrog mirisa po kestenu. Okus je slatkast do trpkog-gorkast (Šimić, 1980).

### **2.3. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA MEDA**

Med predstavlja složenu namirnicu sastavljenu od velikog broja različitih komponenata, od kojih neke u med dodaju pčele tijekom njegove proizvodnje, neke su podrijetlom iz peludi ili nektara te neke nastaju tijekom zrenja meda u saću. Sastav meda i njegova fizikalna svojstva ovise o pojedinim vrstama meda, biljnom i geografskom podrijetlu, klimatskim uvjetima te o njegovom skladištenju (Vahčić i Matković, 2009).

#### **2.3.1. Kemijski sastav meda**

Pravilnikom o medu (2015) propisane su količine pojedinih sastojaka kojima med stavljen na tržište ili med upotrebljen u proizvodu namijenjenom za konzumaciju mora udovoljavati.

- Glavni sastojak meda čine ugljikohidrati, čiji udio u medu iznosi 73-83 %. Visok udio ugljikohidrata čini med prezasićenom otopinom šećera (Vahčić i Matković, 2009). Najzastupljeniji ugljikohidrati su fruktoza i glukoza, čija ukupna količina prema Pravilniku o medu (2015) mora iznositi najmanje 60 g/100 g za cvjetni med, odnosno najmanje 45 g/100 g za med medljikovac te mješavinu meda medljikovca i cvjetnog meda. Fruktoza i glukoza zaslužni su za slatkoću i energetske vrijednosti meda te imaju važan utjecaj na njegova fizikalna svojstva. U medu se također nalazi i saharoza, ali u znatno manjim količinama, što je posljedica djelovanja enzima invertaze; invertaza katalizira reakciju cijepanja disaharida saharoze na monosaharide glukozu i fruktozu. Dozvoljena količina saharoze u medu prema Pravilniku o medu (2015) iznosi najviše 5 g/100 g, uz određene iznimke za koje je ta granica nešto viša. Prisutnost saharoze u visokim udjelima povezana je s biljnim podrijetlom, nezrelosti meda, visokim protokom nektara te nadohranjivanjem pčela šećerima ili sokovima (Machado De-Melo i sur., 2017). Saharoza također ima važnu ulogu u razotkrivanju autentičnosti meda;

visoki udio saharoze u medu ukazuje na postojanje mogućnosti da je med patvoren (Sajwani i sur., 2007).

- Prema Pravilniku o medu (2015), količina vode u medu može iznositi najviše 20 %, uz izuzetak meda od vrijeska i meda za industrijsku uporabu, za koje je dozvoljena količina vode najviše 23 %. Količina vode u medu jedan je od najvažnijih parametara kakvoće jer određuje njegovu stabilnost i mikrobiološko kvarenje, a također utječe i na fizikalna svojstva meda. Količina vode u medu obično iznosi 15-23 %, iako nije stalna zbog svojstva higroskopnosti (Vahčić i Matković, 2009).
- Proteini i aminokiseline u medu zastupljeni su u vrlo malim količinama, obično oko 0,1-1,7 %. Mogu biti životinjskog ili biljnog podrijetla. Usprkos niskoj količini, proteini su važna komponenta meda. Prisutstvo enzima u medu čini ga drugačijim od ostalih sladila, te enzimska aktivnost pridonosi kakvoći i trajnosti meda. Enzimi medu daju svojstva koja se umjetnim putem ne mogu proizvesti niti nadomjestiti, što med čini namirnicom koju je nemoguće umjetno proizvesti (Vahčić i Matković, 2009).
- Kao i proteini, lipidi su također slabo zastupljeni u medu, obično oko 0,04 %. Lipidi u med dospjevaju iz biljaka ili iz ostataka voska. Od lipida u medu nalazimo gliceride, sterole, fosfolipide, terpene i terpenoide (Machado De-Melo i sur., 2017). Terpeni i terpenoidi imaju značajnu ulogu u medu jer su odgovorni za njegova senzorska svojstva; daju mu okus i aromu po biljkama od čijeg je nektara med napravljen. Također, imaju dobar utjecaj na ljudsko zdravlje, poput antibakterijskog i antioksidativnog djelovanja (Valverde i sur., 2022).
- Med sadrži i male količine vitamina, stoga se ne smatra značajnim izvorom vitamina za ljudski organizam. Glavni izvor vitamina u medu je pelud, a najzastupljeniji su vitamin C i vitamini B skupine. Zbog niskog udjela lipida u medu, vitamini A, D, E i K pronađeni su u iznimno malim količinama (Machado De-Melo i sur., 2017).
- Udio mineralnih tvari u medu je nizak te obično iznosi 0,02-0,3 %. Najzastupljenije mineralne tvari su kalij, natrij, kalcij i magnezij. Od ukupne količine mineralnih tvari,

kalij čini gotovo 80 %, kao posljedica brzog izlučivanja iz nektara (Machado De-Melo i sur., 2017). Povećan udio pepela u medu može biti znak patvorenja meda šećernom melasom (Vahčić i Matković, 2009).

- Jedan od posebnijih sastojaka meda je hidroksimetilfurfural (HMF), ciklički aldehid koji nastaje razgradnjom heksoza u kiselom mediju ili Maillardovim reakcijama. Tijekom skladištenja nastaje prirodno i sporo, ali zagrijavanjem meda reakcija nastanka HMF-a se ubrzava. Koncentracija HMF-a također raste i patvorenjem meda dodavanjem šećera, stoga se njegov udio koristio kao indikator patvorenja. Međutim, istraživanja su pokazala da i prirodno zagrijavani med ima veći udio HMF-a, npr. med iz područja tropske klime. Na količinu HMF-a također utječe korištenje metalnih spremnika za med, pH, biljno podrijetlo te vrsta pčela. Nastajanje HMF-a ubrzavaju visoka kiselost, udio vode, fruktoze te nekih aminokiselina i mineralnih tvari. HMF služi kao indikator svježine meda, budući da je njegova količina u svježem medu vrlo niska (Machado De-Melo i sur., 2017). Prema Pravilniku (2015) dozvoljena količina HMF-a za med iznosi najviše 40 mg/kg, uz iznimku meda koji je podrijetlom iz regija tropske klime i mješavina takvog meda, za koje dozvoljena količina iznosi najviše 80 mg/kg.

### 2.3.2. Fizikalna svojstva meda

U fizikalna svojstva meda ubrajaju se viskoznost, kristalizacija, aktivitet vode, higroskopnost, električna vodljivost i optička aktivnost.

Jedno od najvažnijih fizikalnih svojstava meda je viskoznost, stupanj otpora tekućine prema tečenju. Na viskoznost utječu udio vode, temperatura, omjer glukoze i fruktoze te biljno podrijetlo. Što je veći udio vode, viskoznost meda je manja. Dodatan utjecaj na viskoznost imaju i dekstrini, proteini te druge koloidne čestice; one dovode do povećanja viskoznosti. Viskoznost utječe na postupanje s medom tijekom obrade i skladištenja. Zbog visoke viskoznosti može doći sprječavanja homogenizacije meda tijekom proizvodnje, što ograničava njegovu primjenu u prehrambenoj industriji. Kao rješenje, u prehrambenoj industriji sve se češće koristi med u prahu (Machado De-Melo i sur., 2017).

Kristalizacija je spontani proces koji se odvija u medu i direktno ovisi o udjelu pojedinih šećera.

Omjer fruktoze i glukoze pokazuje tendenciju meda da kristalizira. Zbog svoje netopljivosti u medu, glukoza kristalizira, te med s višim udjelima glukoze, npr. med od drače ili uljane repice, prije će kristalizirati u odnosu na med s višim udjelom fruktoze, npr. med od kadulje ili lipe (Sajwani i sur., 2007). Kristalizacijom dolazi do promjene boje i teksture te gubitka prozirnosti. Na kristalizaciju meda također utječu viskoznost, temperatura i udio vode. Visoki udio vode u medu usporava proces kristalizacije, dok visoki udio glukoze ubrzava proces kristalizacije (Machado De-Melo i sur., 2017). Zbog odbojnosti potrošača prema kristaliziranom medu, kristalizacija se nastoji izbjeći (Vahčić i Matković, 2009).

Aktivitet vode ( $a_w$ ) predstavlja dostupnu količinu vode za rast i razvoj mikroorganizama. U medu, vrijednosti aktiviteta vode iznose 0,49-0,65. Budući da je za rast i razvoj mikroorganizama potreban  $a_w$  oko 0,7-0,9, vrijednosti  $a_w$  meda inhibiraju njihov rast, a samim time i mogućnost kvarenja i fermentacije. Aktivitet vode ovisi o pH, temperaturi, koncentraciji kisika i ugljikovog dioksida te o omjeru glukoze i fruktoze. Aktivitet vode kristaliziranog meda viši je od aktiviteta vode nekristaliziranog meda, kao posljedica otpuštanja vode od glukoze tijekom procesa kristalizacije (Machado De-Melo i sur., 2017).

Higroskopnost predstavlja fizikalno svojstvo meda koje omogućuje upijanje ili otpuštanje vode, ovisno o relativnoj vlažnosti zraka i udjelu vode u medu. Što je viši udio fruktoze, med je higroskopniji (Vahčić i Matković, 2009). Higroskopnost je važno svojstvo meda zbog kojeg se mora jako pripaziti na pakiranje i uvjete njegovog skladištenja. Ukoliko se med skladišti u vlažnim prostorima, dolazi do povećanja udjela vode u medu, a posljedično dolazi i do porasta mogućnosti fermentacije i kvarenja. U industriji, higroskopnost meda se pokazala kao važno svojstvo jer sprječava isušivanje te zadržava mekoću proizvoda u koje se med dodaje, npr. pekarski proizvodi (Machado De-Melo i sur., 2017).

Električna vodljivost je fizikalno svojstvo meda koje prvenstveno ovisi o udjelu mineralnih tvari u medu; viši udio mineralnih tvari uzrokuje veću električnu vodljivost (El Sohaimy i sur., 2015). Električna vodljivost meda također se koristi za određivanje čistoće meda, uz analizu mineralnih tvari i krutih netopljivih čestica u medu (Galhardo i sur., 2021).

Med također pokazuje optičku aktivnost, odnosno sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti. Optička aktivnost meda povezana je s količinom pojedinih ugljikohidrata.

Istraživanja su pokazala da med koji sadrži viši udio fruktoze pokazuje negativnu specifičnu rotaciju, dok med koji sadrži viši udio glukoze i saharoze pokazuje pozitivnu specifičnu rotaciju (Juszczak i sur., 2009). Nektarni med zbog većeg sadržaja fruktoze zakreće svjetlost u lijevo, dok med medljikovac zakreće svjetlost u desno (Nanda i sur., 2003).

#### **2.4. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA**

Najvažnija senzorska svojstva meda su boja, okus i miris, a najviše ovise o kemijskom sastavu, biljnom podrijetlu te uvjetima prerade i skladištenja. U pravilu, med istog biljnog podrijetla ima slična senzorska svojstva (de Sousa i sur., 2016).

Boja meda varira od gotovo bezbojne i svjetložute do tamnosmeđe, a prvenstveno ovisi o kemijskom sastavu meda, tj. o udjelima određenih pigmentata: polifenola, karotenoida, flavonoida, klorofila, antocijana i tanina (Juszczak i sur., 2009). Boja meda je također povezana s udjelima mineralnih tvari, šećera i aminokiselina te s načinom proizvodnje i skladištenjem. Kristalizacijom med postaje svjetliji, dok dužim skladištenjem med postaje tamniji. Također, tamniji med sadrži više mineralnih tvari (Machado De-Melo i sur., 2017; Vahčić i Matković, 2009). Vrijeme sakupljanja meda također može imati utjecaj na njegovu boju. Prema istraživanjima, boja meda varira ovisno o cvjetanju drugog bilja u okolici košnice, npr. zbog cvjetanja grožđa, med je svjetliji, dok je zbog cvjetanja eukaliptusa med tamniji (Galhardo i sur., 2021). Potrošači općenito preferiraju med svjetlije boje (Machado De-Melo i sur., 2017).

Miris i okus meda prvenstveno ovise o biljnom podrijetlu. Određene vrste meda imaju specifičan miris po medonosnoj biljci, dok su drugi bez mirisa. Okus meda varira od slatkog do gorkog ili trpkog, a ovisi o udjelu hlapljivih tvari, pojedinih šećera, aminokiselina, organskih kiselina i eteričnih ulja. Tvari arome obično su lakohlapljive, stoga dugim skladištenjem ili zagrijavanjem aroma meda može oslabiti ili nestati (Vahčić i Matković, 2009). Hlapljivi sastojci arome meda pokazali su se učinkovitima za određivanje biljnog i geografskog podrijetla meda, uz mogućnost detekcije patvorenja (Machado De-Melo i sur., 2017).

Senzorska analiza meda ima značajnu ulogu u definiranju svojstava meda, stoga je neizostavna u procjeni kvalitete meda. Senzorska analiza također se koristi za razotkrivanje patvorenja meda, npr. patvorenja dodatkom šećera, dobivanja meda od pčela hranjenih šećerom te neodgovarajućeg deklariranja prema biljnom podrijetlu. Moguće je utvrditi i kontaminaciju

stranim tvarima (Vahčić i Matković, 2009).

## 2.5. PROTEINI U MEDU

Kao što je prethodno navedeno, proteini su u medu zastupljeni u vrlo niskom udjelu. U dostupnoj literaturi, udio proteina obično se kretao u rasponu 0,1-1,7 %. Med medljikovac sadrži više proteina u odnosu na nektarni med (Vahčić i Matković, 2009). Određivanje proteina u medu postaje sve značajnije jer se njihov udio u medu, kao i identifikacija pojedinih vrsta proteina, može koristiti kao parametar kvalitete, autentičnosti te kao parametar biljnog ili geografskog podrijetla. Porast interesa u proteine meda dovodi do poboljšanja metodologije njihove analize (Bocian i sur., 2019). S tehnološkog stajališta, prisustvo proteina u medu može biti nepoželjno jer proteini smanjuju površinsku napetost meda, što posljedično uzrokuje sklonost pjenjenju, odnosno inkorporiranje mjehurića zraka u med (Machado De-Melo i sur., 2017). Proteini u medu mogu biti biljnog ili životinjskog podrijetla. Proteini biljnog podrijetla u medu prvenstveno potječu iz peludi, ali također mogu potjecati iz nektara i medljikovca, dok proteini životinjskog podrijetla potječu iz određenih žlijezda medonosnih pčela (Flanjak i sur., 2016).

Proteini biljnog podrijetla, zajedno s nektarnim ugljikohidratima, služe kao primarni izvor hrane za medonosne pčele. Smatra se da su proteini peludnog podrijetla glavni izvor dušika u prehrani pčela. Također, proteini peludnog podrijetla mogu ojačati pčelin imunosni sustav i otpornost na patogene (Brudzynski i Maldonado-Alvarez, 2015).

Najvažniji neenzimski proteini u medu životinjskog podrijetla su takozvani glavni proteini matične mliječi (engl. *Major Royal Jelly Proteins*, MRJP). Oni potječu iz hipofaringealnih žlijezda medonosnih pčela (Murešan i sur., 2022). Najzastupljeniji protein iz ove skupine je *Major Royal Jelly Protein1* (MRJP1), čija je primarna uloga izvor energije. Također, istraživanja su pokazala da njegova razgradnja proteazama stimulira rast stanica i jačanje imunosnog sustava (Brudzynski i Maldonado-Alvarez, 2015). Ovaj se protein također koristi kao znak autentičnosti i kvalitete meda (Bocian i sur., 2019).

Većina proteina u medu su enzimi, od kojih su najvažniji invertaza, dijastaza ( $\alpha$ -amilaza), glukoza-oksidaza, katalaza, kiselna fosfataza i  $\beta$ -glukozidaza. Njihova aktivnost u medu koristi se kao parametar kvalitete, autentičnosti i svježine te indikator načina procesiranja i



skladištenja (Flanjak i sur., 2016). Pravilan rad ovih enzima osigurava potrebnu količinu jednostavnih ugljikohidrata u medu, koji su pčelama glavni izvor energije za let i održavanje kolonije (Brudzynski i Maldonado-Alvarez, 2015).

Invertaza je enzim zaslužan za konverziju nektara i medljikovca u med, jer katalizira reakciju hidrolize saharoze na monosaharide glukozu i fruktozu (Machado De-Melo i sur., 2017). Invertaza u medu većinom potječe iz pčelinih žlijezda. Njezina aktivnost ovisi o protoku nektara, količini šećera u nektaru, temperaturi te o samoj koloniji pčela. Aktivnost invertaze prisutna je i nakon ekstrakcije i skladištenja, tako da s vremenom udio saharoze u medu pada, dok udio glukoze i fruktoze raste. Njena aktivnost se znatno smanjuje ili u potpunosti nestaje pod utjecajem topline, stoga se invertaza koristi kao indikator autentičnosti i svježine meda (Flanjak i sur., 2016).

Dijastaza u medu, točnije  $\alpha$ -amilaza, katalizira reakciju hidrolize škroba na jednostavnije ugljikohidrate. Njezina prisutnost u medu nije sasvim razjašnjena, budući da med ne sadrži kompleksne ugljikohidrate poput škroba, ali se njena prisutnost može pripisati tome da dijastaza sudjeluje u probavi peludi kod pčela (Machado De-Melo i sur., 2017). Dijastaza je podrijetlom iz pčelinih žlijezda, ali njezina aktivnost ovisi o vrsti meda, npr. monoflorni med ima prirodno nisku aktivnost dijastaze (Flanjak i sur., 2016). Aktivnost dijastaze u medu propisana je Pravilnikom o medu (2015); za med općenito, aktivnost dijastaze po Schadeu mora iznositi najmanje 8, dok za med s prirodno niskom enzimskom aktivnosti (npr. med od mandarine i drugih citrusa) mora iznositi najmanje 3.

Glukoza-oksidaza, također podrijetlom od pčela, katalizira reakciju oksidacije glukoze u glukonolakton, koji se dalje hidrolizira na glukonsku kiselinu i vodikov peroksid. Vodikov peroksid zaslužan je za suzbijanje rasta i razvoja mikroorganizama te fermentacije i kvarenja meda (Flanjak i sur., 2016). Vodikov peroksid jako je važan u još nezasićenom medu jer omogućuje mikrobiološku otpornost dok udio ugljikohidrata u medu naraste dovoljno da se rast i razvoj mikroorganizama spriječi. Nakon što med postane zasićen šećerima, glukonska kiselina snižava pH vrijednost meda, čime inhibira enzim glukoza-oksidazu (Machado De-Melo i sur., 2017).

U nešto manjim udjelima, ali svejedno od važnog utjecaja, u medu su pronađeni enzimi

katalaza, kisela fosfataza i  $\beta$ -glukozidaza.

Katalaza je enzim koji katalizira reakciju razgradnje vodikovog peroksida na vodu i kisik. Uglavnom potječe iz peludi. Koncentracija vodikovog peroksida direktno ovisi o aktivnosti katalaze i glukoza-oksidaze, a samim time ovisi i antimikrobni potencijal meda (Vahčić i Matković, 2009).

Kisela fosfataza katalizira reakciju hidrolize fosfatnih estera u kiselom okruženju na alkohole i anorganske fosfate, a potječe iz nektara i peludi (Machado De-Melo i sur., 2017).

$\beta$ -glukozidaza je enzim koji katalizira hidrolizu glikozidnih toksina koje pčele unesu te pretvara  $\beta$ -glukane u oligosaharide i glukozu (Machado De-Melo i sur., 2017).

Također, u vrlo niskim količinama, u medu su pronađene i proteaze, enzimi koji kataliziraju reakciju cijepanja proteina na manje peptidne jedinice, te esteraze, enzimi koji kataliziraju reakciju razgradnje estera (Machado De-Melo i sur., 2017). Pokazalo se da su proteaze u medu serinski enzimi, te su zaslužni za razgradnju MRJP1 proteina. Proteaze u medu mogu biti biljnog ili životinjskog podrijetla (Murešan i sur., 2022).

Istraživanja su pokazala da oko 40-80 % ukupnog dušika u medu predstavlja proteinski dušik, a ostatak pripada slobodnim aminokiselinama. Kao i proteini, aminokiseline mogu biti životinjskog ili biljnog podrijetla, stoga se njihov udio u medu razlikuje čak i u medu istih vrsta (Machado De-Melo i sur., 2017). U medu je pronađeno 26 aminokiselina, od kojih je najzastupljeniji prolin. Iznimke su med lavande, ružmarina i timijana, kod kojih je najzastupljenija aminokiselina fenilalanin (Flanjak i sur., 2016). Prolin čini gotovo 80-90 % ukupnih aminokiselina u medu. Potječe iz pčelinjih žlijezda slinovnica tijekom konverzije nektara ili medljikovca u med. Udio prolina u medu predložen je kao indikator zrelosti i patvorenja meda, iako u Hrvatskoj njegova količina nije propisana Pravilnikom o medu (2015). U europskim laboratorijima za kontrolu kakvoće meda prihvaćena je granična vrijednost prolina za izvorni med; 180 mg/kg (Vahčić i Matković, 2009).

## **2.6. METODE ODREĐIVANJA UKUPNIH PROTEINA**

U dostupnoj literaturi, najčešće korištene metode određivanja ukupnih proteina u medu predstavljaju metoda po Kjeldahl-u, metoda po Bradford-u i metoda po Lowry-u.

### 2.6.1. Metoda po Kjeldahl-u

Metoda po Kjeldahl-u primjer je metode određivanja proteina indirektno preko dušika te je jedna od najčešće primjenjivanih metoda određivanja proteina. Metoda po Kjeldahl-u sastoji se od tri koraka: spaljivanja, destilacije i titracije (Valverde i sur., 2022). Kjeldahl-ovim postupkom određuje se prvenstveno ukupni udio dušika prisutnog u –NH skupinama, a zatim se taj udio preračunava u udio proteina množenjem s odgovarajućim faktorom pretvorbe F (100/X) (Vahčić i sur., 2008).

Prednosti metode po Kjeldahl-u su široka primjena u određivanju ukupnih proteina te metoda ne zahtjeva skupu opremu. Nedostaci ove metode su njezino dugo trajanje te što uključuje rukovanje koncentriranom sumpornom kiselinom i katalizatorima koji sadrže teške metale, a samim time zahtijeva odgovorno zbrinjavanje opasnog otpada (Saez-Plaza i sur., 2013). Znanstvenici koji su koristili ovu metodu u analizama smatraju da faktor pretvorbe 6,25 može precijeniti sadržaj proteina i dati netočne rezultate. Razlog tome je što se dušik u medu ne nalazi isključivo u obliku proteina, već i u slobodnim aminokiselinama (Valverde i sur., 2022).

### 2.6.2. Metoda po Bradford-u

Metoda po Bradford-u je kolorimetrijska metoda koja se temelji na stvaranju kompleksa proteina sa bojilom *Coomassie Brilliant Blue G-250*, dajući otopini plavu boju. Količina plave boje u otopini određuje se mjerenjem apsorbancije otopine pri 595 nm (Kruger, 2009). Udio proteina se zatim određuje iz dobivene apsorbancije pomoću prethodno izrađenog baždarnog dijagrama uz BSA (engl. *Bovine Serum Albumine*) (Valverde i sur., 2022)

Prednosti ove metode su visoka osjetljivost, visoka brzina reakcije stvaranja kompleksa protein-bojilo te stabilnost kompleksa protein-bojilo koja mu omogućuje trajanje do čak 60 minuta. Metoda po Bradford-u jednostavna je metoda primjenjiva na više različitih vrsta namirnica, što omogućuje njezinu automatizaciju (Chua i sur., 2013) Nedostaci ove metode su moguće smetnje drugih kemikalija, zbog kojih se dobivaju netočni rezultati (Mæhre i sur., 2018).

### 2.6.3. Metoda po Lowry-u

Metoda po Lowry-u je, kao i metoda po Bradford-u, kolorimetrijska metoda. Temelji se na biuret reakciji, u kojoj peptidne veze proteina reagiraju s bakrovim sulfatom u alkalnim uvjetima, dajući bakrove ione, koji zatim reagiraju s Folin – Ciocalte-ovim reagensom. U Folin – Ciocalte-ovoj reakciji dolazi do redukcije fosfomolibdovolframata u plavi

heteropolimolibdat, te do oksidacije aromatskih aminokiselina, a bakrovi ioni služe kao katalizator (Waterborg, 2009). Rezultat reakcije je jako plavo obojenje, čiji se intenzitet mjeri pri 750 nm ili 500 nm, ovisno o koncentraciji proteina. Udio proteina u otopini se zatim određuje iz izmjerene apsorbancije pomoću prethodno izrađenog baždarnog dijagrama uz BSA (engl. *Bovine Serum Albumine*) (Marković i sur., 2017)

Prednosti metode po Lowry-u su osjetljivost, jednostavnost i dostupnost (Mæhre i sur., 2018). Međutim, metoda po Lowry-u ima puno nedostataka: dugo trajanje reakcije, nelinearnost standardne krivulje u baždarnom dijagramu te nespecifičnost reagensa; neki od reagensa koji mogu ući u reakciju s Folin – Ciocalte-ovim reagensom su EDTA (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*), tiolni reagensi, kalij i magnezij (Chua i sur., 2013). Zbog nespecifičnosti i nestabilnosti reagensa, rezultati određivanja metodom po Lowry-u mogu biti precijenjeni (Mæhre i sur., 2018).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

U ovom radu provedene su laboratorijske analize određivanja udjela ukupnih proteina u 18 uzoraka različitih vrsta meda navedenih u Tablici 1., koji su predstavljali dio uzoraka analiziranih u okviru 18. Međunarodnog natjecanja pčelara u kvaliteti meda – Zzzagimed 2022.

##### 3.1.1. Uzorci

Analizirani uzorci meda poznatog su podrijetla s područja Republike Hrvatske iz sezone 2022. Korišteni uzorci i njihove oznake prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Analizirani uzorci meda

Vrsta meda	Broj uzoraka	Oznake uzoraka
amorfa	5	87, 93,109, 158, 202
suncokret	4	90, 110, 124, 204
kadulja	1	135
drača	2	50, 195
mandarina	2	145, 168
uljana repica	1	108
heljda	1	191
lipa	1	166
kesten	1	96

##### 3.1.2. Laboratorijsko posuđe i uređaji

Tijekom laboratorijskih analiza korišteni su sljedeći uređaji i posuđe:

- analitička vaga (AX200, Shimadzu, Japan)
- aluminijska lađica
- kivete za Kjeltex sustav (500 mL)
- blok za spaljivanje (Digestion system 6 1007 Digester, Tecator, Švedska)
- Kjeltex sustav (Kjeltex™ 8100 Tecator™ Line, Foss, UK)
- Erlenmeyerova tikvica (250 mL)
- trbušasta pipeta (25 mL)

- bireta
- menzura (30 mL)
- staklena čaša (100 mL)

### 3.1.3. Reagensi

- 96 %-tna sumporna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Lach-Ner s.r.o., Češka)
- Kjeldahlove tablete (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + CuSO<sub>4</sub>, bez udjela žive i selena, Merck KGaA, Njemačka)
- 40 % natrijev hidroksid (NaOH)
- 4 %-tna borna kiselina (BH<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, Fisher BioReagents™, Belgija)
- klorovodična kiselina (HCl, 0,1 mol/L, Kemika, Hrvatska)
- obojeni indikator bromkrezol zeleno (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)
- obojeni indikator metilno crvenilo (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)

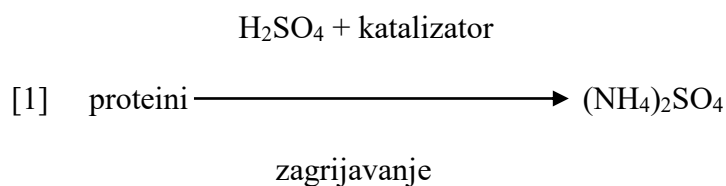
## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Princip metode određivanja

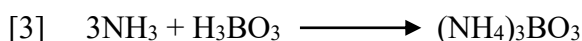
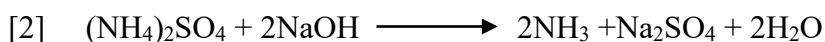
Analize meda provedene su po principu metode određivanja ukupnih proteina po Kjeldahl-u. Metoda određivanja ukupnih proteina po Kjeldahl-u jedna je od najčešće primjenjivanih metoda za određivanje udjela ukupnih proteina. Osnovni princip metode je spaljivanje namirnice koncentriranom sumpornom kiselinom i redukcija dušika do amonijaka (Vahčić i sur., 2008). Metoda se sastoji od postupaka spaljivanja, destilacije i titracije.

Organske tvari iz uzorka razaraju se zagrijavanjem uz dodatak sumporne kiseline i katalizatora u bloku za spaljivanje, pri čemu dolazi do oslobađanja proteinskog i neproteinskog dušika (osim dušika vezanog uz nitrata i nitrite) u obliku amonijevog sulfata. Spaljenom uzorku se dodaje natrijev hidroksid kako bi se oslobodio amonijak, koji se zatim predestilira u odmjereni volumen borne kiseline sa indikatorima, te nastaje amonijev borat. Amonijev borat titrira se klorovodičnom kiselinom, pri čemu nastaje amonijev klorid i borna kiselina. Pri tome se odvijaju sljedeće reakcije:

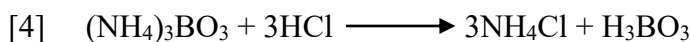
1. Postupkom vlažnog spaljivanja nastaje nastaje amonijev sulfat



2. Postupkom destilacije dodatkom natrijevog hidroksida oslobađa se amonijak koji se zatim predestilira u bornu kiselinu s indikatorima, pri čemu nastaje amonijev borat



3. Postupkom titracije klorovodičnom kiselinom nastaje amonijev klorid i borna kiselina



Udio ukupnih proteina dobiva se množenjem postotka dušika s odgovarajućim faktorom pretvorbe  $F (100/X)$  gdje  $X$  predstavlja postotak dušika u proteinima određenih namirnica ili skupine namirnica (Vahčić i sur., 2008).

### 3.2.2. Postupak određivanja

U aluminijsku lađicu odvagane se 5,0000 g (s točnošću  $\pm 0,0001$ ) uzorka meda te se lađica s uzorkom pažljivo prebaci u kivetu za Kjeltac sustav od 500 mL, tako da grlo kivete ostane čisto. Postupak spaljivanja nužno je provoditi u digestoru. U kivetu s uzorkom dodaje se 20 mL 96 %-tne sumporne kiseline i 1 Kjeldahlova tableta. Kiveta se zatim postavlja u blok za spaljivanje gdje se lagano zagrijava, pri tome pazeći da sadržaj kivete ne prelazi polovicu volumena kivete. Kad se reakcija u kiveti smiri, grijanje se pojača. Spaljivanje traje nekoliko sati, ovisno o pojedinom uzorku. Spaljivanje je završeno kada je u kiveti zaostala tekućina bez crnih neizgorelih komadića. Po završetku spaljivanja, kivete se pomiču iz bloka za spaljivanje kako bi se njihov sadržaj ohladio na sobnu temperaturu. Nakon hlađenja sadržaja, slijedi postupak destilacije. U destilacijsku jedinicu Kjeltac sustava postavlja se kiveta s uzorkom i dobro učvršćuje, a na izlazno postolje destilacijske jedinice postavlja se Erlenmeyerova tikvica s 25 mL borne kiseline i pripadajućim indikatorima, na način da je destilacijska cijevčica uronjena u otopinu borne kiseline. Destilacija započinje doziranjem 50 mL 40 %-tnog natrijevog hidroksida u kivetu, a zatim se nastali amonijak predestilira u otopinu borne kiseline. Destilacija se provodi 6 minuta. Nakon završene destilacije, prvotna ružičasta boja otopine borne kiseline prelazi u plavo-zelenu boju, što ukazuje na prisutnost amonijaka (Slika 1). Destilat se zatim titrira klorovodičnom kiselinom do promjene boje ponovo u ružičastu.



(a)

(b)

**Slika 1.** Uzorak prije destilacije (a) i uzorak nakon završene destilacije (b) (vlastita fotografija)

Udio dušika izračunava se prema jednadžbi:

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

gdje je

V – volumen HCl utrošene za titraciju uzorka (mL)

N – molaritet HCl utrošene za titraciju uzorka (mol/L)

m – masa uzorka (mg)

Udio ukupnih proteina izračunava se prema jednadžbi:

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

gdje je

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



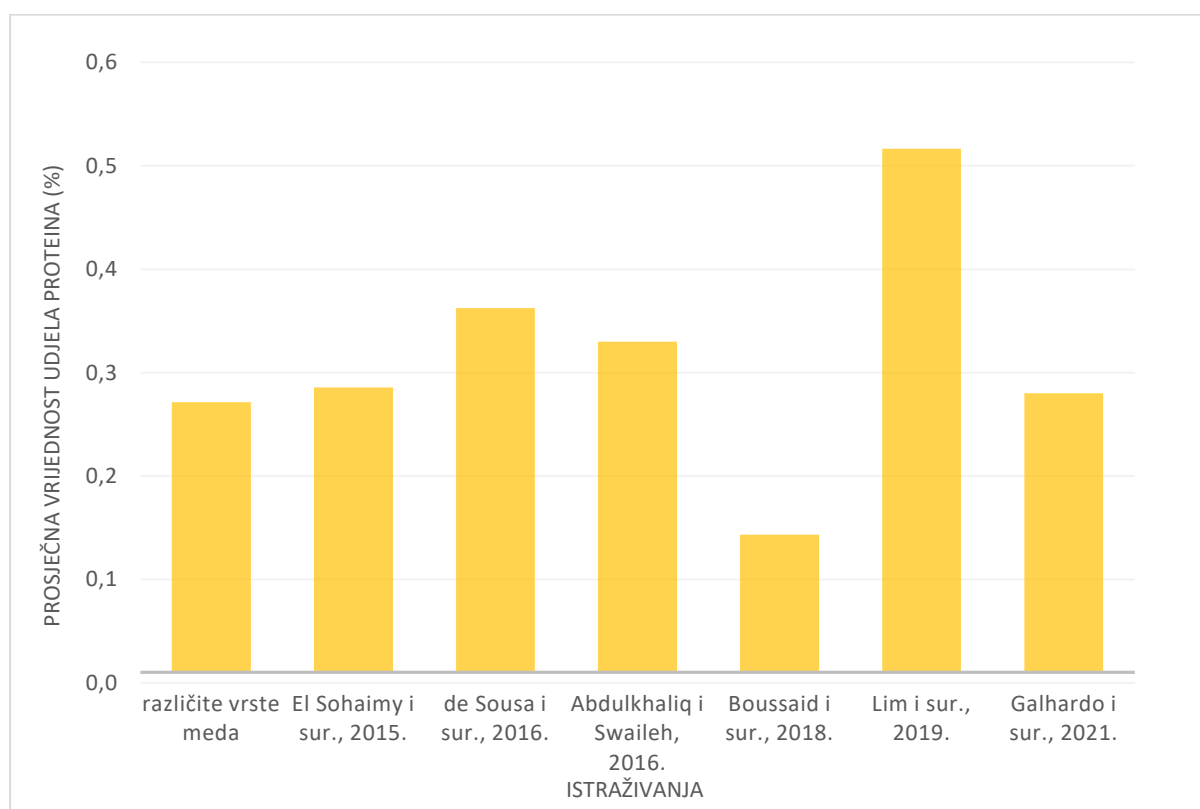
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju, određen je udio ukupnih proteina metodom po Kjeldahl-u u 18 uzoraka različitih vrsta meda (amorfa, n = 5; suncokret, n = 4; kadulja, n = 1; drača, n = 2; mandarina, n = 2; uljana repica, n = 1; heljda, n = 1; lipa, n = 1; kesten n = 1). Udjeli ukupnih proteina u uzorcima meda dobiveni su metodom po Kjeldahl-u indirektno određivanjem udjela dušika te množenjem dobivene vrijednosti s faktorom preračunavanja 6,25. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 2. i uspoređeni s podacima iz dostupne literature na Slici 2.

**Tablica 2.** Udio dušika i ukupnih proteina (%) u analiziranim uzorcima meda (n=18)

Uzorak	Vrsta meda	Oznaka uzorka	Udio dušika (%)	Udio proteina (%)
1	amorfa	87	0,04	0,22
2		93	0,02	0,10
3		109	0,05	0,32
4		158	0,03	0,21
5		202	0,04	0,26
6	suncokret	90	0,02	0,12
7		110	0,06	0,40
8		124	0,04	0,23
9		204	0,09	0,54
10	kadulja	135	0,05	0,32
11	drača	50	0,02	0,12
12		195	0,02	0,14
13	mandarina	145	0,05	0,30
14		168	0,03	0,20
15	uljana repica	108	0,05	0,33
16	heljda	191	0,10	0,65
17	lipa	166	0,01	0,09
18	kesten	96	0,05	0,33
<b>Raspon</b>			0,01 – 0,10	0,09 – 0,65

Iz rezultata prikazanih u Tablici 2. vidljivo je da je analizirano ukupno 5 uzoraka meda od amorfe, čija se vrijednost udjela ukupnih proteina kretala u rasponu 0,10-0,32 % (Tablica 2). Prosječna vrijednost pri tome je iznosila 0,22 %. Vrijednosti udjela ukupnih proteina u 4 analizirana uzorka meda od suncokreta kretale su se između 0,12-0,54 % (Tablica 2), s prosječnom vrijednosti 0,32 %. Analizirana su 2 uzorka meda od drače te su njihove vrijednosti udjela ukupnih proteina iznosile 0,12 % i 0,14 % (Tablica 2). Prosječna vrijednost udjela ukupnih proteina za med drače iznosila je 0,13 %. Isto tako, analizirana su 2 uzorka meda od mandarine, te je njihova prosječna vrijednost udjela ukupnih proteina iznosila 0,25 %. Analizirani su po jedan uzorak meda od kadulje, uljane repice, heljde, lipe i kestena, te su njihove vrijednosti prikazane u Tablici 2. Promatrajući sve analizirane uzroke, vidljivo je da je najviši udio ukupnih proteina određen u uzorku 16 meda heljde (0,65 %), a najniži u uzorku 17 meda lipe (0,09 %) (Tablica 2).



**Slika 2.** Grafički prikaz prosječne vrijednosti udjela ukupnih proteina (%) u uzorcima različitih vrsta meda analiziranih u ovom istraživanju u usporedbi s rezultatima drugih istraživanja u kojima je primijenjena metoda po Kjeldahl-u.

Iz podataka na Slici 2., vidljivo je da su prosječne vrijednosti udjela ukupnih proteina u uzorcima meda ( $n = 18$ ) analiziranih ovim istraživanjem u skladu s rezultatima istraživanja autora koji su također koristili metodu po Kjeldahl-u za određivanje udjela ukupnih proteina u medu (Galhardo i sur., 2021; Lim i sur., 2019; Boussaid i sur., 2018; Abdulkhaliq i Swaileh, 2016; de Sousa i sur., 2016; El Sohaimy i sur., 2015).

Promatrajući vrijednosti za pojedinu analiziranu vrstu meda, u dostupnoj znanstvenoj literaturi pronađeni su podaci o udjelu ukupnih proteina u medu suncokreta (Erban i sur. 2019), kadulje (Flanjak i sur., 2016), heljde (Erban i sur., 2019), lipe (Erban i sur., 2019; Kropf i sur., 2010) i kestena (Flanjak i sur., 2016; Kropf i sur., 2010), pri čemu autori Erban i suradnici (2019) i Flanjak i suradnici (2016) nisu koristili metodu po Kjeldahl-u već spektrofotometrijsku metodu po Bradford-u. Podaci o udjelima ukupnih proteina u medu od amorfe, drače, mandarine i uljane repice nisu zabilježeni u dostupnoj znanstvenoj literaturi.

Prosječni udio ukupnih proteina u medu od suncokreta u ovom istraživanju iznosio je 0,32 %, što je više u odnosu na rezultate dobivene u istraživanju Erban i suradnika (2019), gdje je ta vrijednost dobivena metodom po Bradford-u iznosila 0,04 %.

Udio ukupnih proteina u medu kadulje koji su metodom po Bradford-u zabilježili Flanjak i suradnici (2016) iznosio je 0,08 %, dok je u ovom istraživanju on iznosio 0,32 % (Tablica 2). Erban i suradnici (2019) također su istraživali udio ukupnih proteina u medu od heljde. U usporedbi s ovim istraživanjem (0,65 %) (Tablica 2), njihova vrijednost udjela ukupnih proteina određena metodom po Bradford-u bila je znatno niža (0,14 %) (Erban i sur., 2019).

Udio ukupnih proteina u uzorku meda od lipe (0,09 %) (Tablica 2) analiziranom u ovom istraživanju niži je u odnosu udio na ukupnih proteina određen u medu od lipe također metodom po Kjeldahl-u (0,29 %) u istraživanju Kropf i suradnika (2010), dok je viši od rezultata koji za istu vrstu meda navode Erban i suradnici (2019) primjenom metode po Bradford-u (0,03 %).

Udio ukupnih proteina u medu od kestena (0,33 %) (Tablica 2) dobivenih ovim istraživanjem u skladu je s rezultatima (0,34 %) Kropf i suradnika (2010) dobivenih također metodom po Kjeldahl-u. U usporedbi s istraživanjem Flanjak i suradnika (2016), gdje je vrijednost udjela ukupnih proteina u medu od kestena određena metodom po Bradford-u iznosila 0,09 %, vrijednost udjela ukupnih proteina u medu od kestena dobivena ovim istraživanjem bila je viša (0,33 %) (Tablica 2).

Razlike u dobivenim rezultatima za pojedine vrste meda mogu biti posljedica odabira različitih metoda analize ukupnih proteina. Također, na rezultate može utjecati različito biljno i geografsko podrijetlo te različite vrste i kolonije medonosnih pčela.

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima (n=18) meda kretao se u rasponu od 0,09 do 0,65 %, te je prosječno iznosio 0,27 %.
2. Promatrajući pojedine vrste meda, najviši udio ukupnih proteina određen je u medu heljde (0,65 %), slijede med uljane repice i kestena (0,33 %), med suncokreta i kadulje (0,32 %), med mandarine (0,25 %), med amorfe (0,22 %), med drače (0,13 %), dok je najniži udio ukupnih proteina određen u medu lipe (0,09 %).
3. Rezultati analiza u skladu su s rezultatima istraživanja autora koji su također za određivanje udjela ukupnih proteina primjenjivali metodu po Kjeldahl-u.

## 6. POPIS LITERATURE

Abdulkhaliq A, Swaileh KM (2016) Physico-chemical properites of multi-floral honey from the West Bank, Palestine. *Int J Food Prop* **20(2)**, 447-454.

<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1166128>

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>

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

Brudzynski K, Maldonado-Alvarez L (2015) Polyphenol-Protein Complexes and Their Consequences for the Redox Activity, Structure and Function of Honey. A Current View and New Hypothesis – a Review. *Polish J Food Nutr Sci* **65(2)**, 71-80.

<https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0030>

Bučar M (2008) Medonosne biljke kontinentalne Hrvatske, Matica hrvatska – Petrinja, Petrinja.

Chua LS, Lee JY, Chan GF (2013) Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **405**, 3063-3074.

<https://doi.org/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 Strossmeyera 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, Gullon B, Pintado MM i sur. (2016) Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT – Food Sci Technol* **65**, 645-651. <http://dx.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 Agricul Sci* **60(2)**, 279-287.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2015.10.015>

Flanjak I, Strelec I, Kenjerić D, Primorac Lj (2016) Croatian produced unifloral honeys characterised according to the protein and proline content and enzyme activities. *J Apic Sci* **60(1)**, 39-48. <https://doi.org/10.1515/jas-2016-0005>

Galhardo D, Garcia RC, Schneider CR, Braga GC, Chambó ED, de Franca DLB i sur. (2021) Physicochemical, bioactive properties and antioxidant of *Apis mellifera* L. honey from western Paraná, Southern Brazil. *Food Sci Technol* **41**, 247-253. <https://doi.org/10.1590/fst.11720>

Juszczak L, Socha R, Roznowski J, Fortuna T, Nalepka K (2008) Physicochemical properties and quality parameters of herb honeys. *Food Chem* **113**, 538-542.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.098>

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

Kovačić S, Nikolić T, Ruščić M, Milović M, Stamenković V, Mihelj D i sur. (2008) Flora jadranske obale i otoka: 250 najčešćih vrsta, Školska knjiga, Zagreb.

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

Kruger NJ (2009) The Bradford Method for Protein Quantitation. U: Walker JM (ured.) The Protein Protocols Handbook, 3 izd., Humana Press, Totowa, str. 17-24.

Lim DCC, Abu Bakar MF, Majid M (2019) Nutritional composition of stingless bee honey from different botanical origins. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci* **269**, 012025. [10.1088/1755-1315/269/1/012025](https://doi.org/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)**, 5 <https://doi.org/10.3390/foods7010005>

Machado De-Melo AA, de Almeida-Muradian LB, Sancho MT, Pascual-Maté A (2017) Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J Apic Res* **57(1)**, 5-37. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>

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

Medved I (2020) Drača kao medonosna biljka - [Agroportal.hr](https://www.agroportal.hr) <https://www.agroportal.hr/uzgoj-pcela/33901>. Pristupljeno: 22. svibnja 2023.

Mureşan 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 – Food Sci Technol* **154**, 112883. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112883>

Nanda V, Sarkar BC, Sharma HK, Bawa AS (2003) Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *J Food Compos Anal* **16**, 613-619. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00062-0)

Nikolić T, Mitić B, Boršić I (2014) Flora Hrvatske: Invazivne biljke, Alfa d.d., Zagreb, str. 70-73.

Popović V, Sikora V, Adamović D, Glamočija Đ, Rajčić V, Ikanović J (2013) Uticaj folijarne prihrane na prinos i kvalitet heljde u organskom sistemu gajenja. *Bilten za alternativne biljne vrste* **45(86)**, 55-59. [10.13140/RG.2.1.3779.5042](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3779.5042)

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: 22. svibnja 2023.

Sáez-Plaza P, Navas MJ, Wybraniec S, Michałowski T, Asuero AG (2013) An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality control. *Crit Rev Anal Chem* **43(4)**, 224-272.  
<https://doi.org/10.1080/10408347.2012.751787>

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

Šimić E (2022) Kemijski sastav nekih uniflornih medova – sezona 2021 (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Šimić F (1980) Naše medonosno bilje. <https://www.tehnologijahrane.com/knjiga/nase-medonosno-bilje>. Pristupljeno 20. svibnja 2023.

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: 22. svibnja 2023.

Valverde S, Ares AM, Elmore JS, Benral J (2022) Recent trends in the analysis of honey constituents. *Food Chem* **387**, 132920 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132920>

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



Waterborg JH (2009) The Lowry Method for Protein Quantitation. U: Walker JM (ured.) The Protein Protocols Handbook, 3 izd., Humana Press, Totowa, str. 7-10.

## Izjava o izvornosti

Ja \_\_\_\_\_Lucija Matijašević\_\_\_\_\_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