

Fizikalno-kemijska analiza cvjetnog i livadnog meda

Džakula, Gabrijela

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:049972>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Gabrijela Džakula

**ANALIZA FIZIKALNO-KEMIJSKIH
SVOJSTAVA CVJETNOG I LIVADNOG
MEDA – SEZONA 2023.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Marine Krpan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

FIZIKALNO-KEMIJSKA ANALIZA CVJETNOG I LIVADNOG MEDA

Gabrijela Džakula, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058224975

Sažetak: Med je proizvod koji pčele stvaraju od nektara biljaka, biljnih sekreta ili izlučevina kukaca koji se hrane biljkama. Pčele skupljaju ove tvari, dodaju vlastite specifične komponente, uklanjaju vodu i pohranjuju med u saće dok ne sazri. Ovaj rad imao je za cilj analizirati fizikalno-kemijska svojstva 34 uzorka cvjetnog meda i 27 uzoraka livadnog meda u okviru natjecanja „Zzagimed 2023“ te usporediti rezultate s zahtjevima Pravilnika o medu. U svim uzorcima mjerene su sljedeće karakteristike: maseni udio vode, električna provodnost, kiselost, udio reducirajućih šećera, saharoza i hidroksimetilfurfural. Rezultati analiza su pokazali da gotovo svi uzorci udovoljavaju propisanim standardima.

Ključne riječi: cvjetni med, livadni med, fizikalno-kemijska svojstva

Rad sadrži: 41 stranicu, 8 slika, 3 tablice, 28 literaturnih navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Marina Krpan

Pomoć pri izradi: prof.dr.sc. Nada Vahčić, Renata Petrović, ing., Valentina Hohnjec, teh.sur.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Nada Vahčić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Marina Krpan (mentor)
3. prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Ivana Rumora Samarin (zamjenski član)

Datum obrane: 30. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Quality Control

Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

Physicochemical analysis of flower and meadow honey

Gabrijela Džakula, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058224975

Abstract: Honey is a naturally sweet product produced by bees from plant nectar, plant secretions, or excretions of insects that feed on plants. Bees collect these substances, add their own specific components, remove water, and store the honey in honeycombs until it matures. The aim of this study was to analyze the physical and chemical properties of 34 samples of flower honey and 27 samples of meadow honey as part of the "Zzzagimed 2023" competition, and to compare the results with the requirements of honey regulations. The characteristics measured in all samples included: moisture content, electrical conductivity, acidity, reducing sugars, sucrose, and hydroxymethylfurfural. Results of the analysis indicated that almost all samples met the prescribed standards.

Keywords: flower honey, meadow honey, physicochemical properties

The thesis contains: 48 pages, 8 figures, 3 tables, 28 references, 00 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Marina Krpan, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Nada Vahčić, PhD, Full professor, Renata Petrović, Eng. Valentina Hohnjec, tech. assist.

Reviewers:

1. Nada Vahčić, PhD, Full professor (president)
2. Marina Krpan, PhD, Full professor (mentor)
3. Ines Panjkota Krbavčić, PhD, Full professor (member)
4. Ivana Rumora Samarin, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September, 30th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DEFINICIJA MEDA	2
2.2. VRSTE MEDA.....	2
2.3. POKAZATELJI KAKVOĆE MEDA.....	6
2.4. KEMIJSKI SASTAV MEDA	7
2.4.1. Ugljikohidrati.....	7
2.4.2. Voda.....	8
2.4.3. Proteini i aminokiseline	8
2.4.4. Enzimi	9
2.4.5. Vitamini i minerali	9
2.4.6. Organske kiseline	10
2.4.7. Hidroksimetilfurfural (HMF).....	11
2.4.8. Fitokemikalije.....	11
2.5. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA.....	12
2.5.1. Kristalizacija	13
2.5.2. Viskoznost.....	14
2.5.3. Higroskopnost	14
2.5.4. Električna vodljivost.....	14
2.5.5. Optička aktivnost	15
2.5.6. Indeks refrakcije	15
2.5.7. Specifična masa	15
2.6. PATVORENJE MEDA.....	16
2.6. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. ZADATAK DIPLOMSKOG RADA.....	19
3.2. METODE RADA.....	19
3.2.1. Priprema uzoraka za analizu	19
3.2.2. Određivanje udjela vode u medu	20
3.2.3. Određivanje kiselosti meda.....	20
3.2.4. Određivanje električne provodnosti meda	21
3.2.5. Određivanje udjela hidroksimetilfurfurala u medu	22
3.2.6. Određivanje udjela reducirajućih šećera u medu	24
3.2.7. Određivanje udjela saharoze u medu	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
5. ZAKLJUČAK	38

1. UVOD

Kao i druge grane poljoprivrede, pčelarstvo je složena poljoprivredna djelatnost. Djelatnost koja povezuje biljonogojstvo, prerađivačku industriju i voćarstvo. Vjeruje se da pčelarstvo značajno doprinosi očuvanju biološke raznolikosti. Smatra se da je Indija pradomovina medonosne pčele. Fosilni ostaci medonosnih pčela poznati su još od prije 40-50 milijuna godina, a pripadaju porodici *Apinae* iz fosilnog roda *Electrapis*.

Med se već stoljećima koristi kao prehrambena namirnica i prirodni lijek, a definira se kao slatka tvar prirodnog porijekla koju stvaraju medonosne pčele (*Apis mellifera*). Pčele ga proizvode prikupljanjem izlučevina iz živih dijelova biljaka, nektara ili izlučevina insekata koji se hrane biljnim sokovima. Nakon što ih pokupe, pčele dodaju svoje specifične tvari i pohranjuju ih u saće kako bi sazrele. Nektar, koji pčele sakupljaju, sastoji se od vodene otopine glukoze, saharoze i fruktoze te ga izlučuju cvjetne žlijezde zvane nektarije (Relić, 2006).

Svaka vrsta meda posjeduje jedinstvena kemijska, fizikalna i organoleptička svojstva. Kemijski gledano, med se sastoji od više od 70 različitih sastojaka. Dio tih sastojaka potječe od biljke iz koje je med proizveden, neke dodaju pčele, dok se druge razvijaju tijekom procesa sazrijevanja u saću. Fizikalna svojstva meda uključuju viskoznost, električnu vodljivost, indeks loma i slične karakteristike, a usko su povezana s njegovim kemijskim sastavom. Najvažnija senzorska svojstva su boja, miris i okus, koji u najvećoj mjeri ovise o botaničkom porijeklu meda.

Med je prehrambena tvar koja doprinosi poboljšanju zdravlja srca i krvotoka, a istovremeno je poznata kao jedna od najprobavljivijih namirnica. Unatoč tome, njegova prisutnost u prehrani ljudi je prilično ograničena. Med je bogat antioksidansima i može se koristiti kao funkcionalna hrana zbog svojih pozitivnih učinaka na organizam. Flavonoidi prisutni u medu djeluju kao antioksidansi jer mogu izravno neutralizirati slobodne radikale, a također štite vitamin C od oksidacije. Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, med je predmet različitih istraživanja.

S obzirom na to da se med nalazi među 10 najčešće falsificiranih proizvoda u Europskoj uniji, važno je stalno provoditi kontrole njegove kvalitete. Za zaštitu potrošača, prije nego što med dođe na tržište, nužno je primijeniti određene validirane metode za utvrđivanje njegovih kvalitativnih parametara, prema smjernicama Codex Alimentarius, Međunarodne komisije za med i Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske.

Ovaj rad imao je za cilj analizirati fizikalno-kemijska svojstva 34 uzorka cvjetnog meda i 27 uzoraka livadnog meda koji su uzeti s 19. Međunarodnog natjecanja pčelara u kvaliteti meda - Zzagimed 2023. Rezultati tih analiza uspoređeni su s kriterijima sastava meda prema važećem Pravilniku o medu (Pravilnik, 2015).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA MEDA

Prema pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda, med je prirodan sladak proizvod koji pčele medarice (*Apis mellifera*) stvaraju od nektara biljaka, izlučevina biljaka ili sekreta kukaca koji sišu s biljaka. Pčele prikupljaju ove materijale, dodaju svoje specifične tvari, uklanjaju vodu i pohranjuju med u saće gdje on sazrijeva (Pravilnik, 2015).

2.2. VRSTE MEDA

Med se može podijeliti u dvije glavne vrste, ovisno o njegovom podrijetlu. Cvjetni ili nektarni med proizvodi se od nektara cvjetova medonosnog bilja, dok se šumski med ili medljikovac uglavnom dobiva iz izlučevina insekata iz roda Hemiptera, koji se hrane sokovima biljaka.

Prema načinu dobivanja, med može biti različitih oblika: med u saću, med sa saćem ili dijelovima saća, cijedeći med, vrcani med, prešani med, filtrirani med i pekarski med. Med u saću pčele skladište u stanicama saća, a na tržište dolazi u obliku cijelog saća ili njegovih dijelova. Med sa saćem sadrži komadiće saća bez pčelinjeg legla, uronjene u med.

Cijedeći med se dobiva prirodnim kapanjem iz saća, dok se vrcani med proizvodi centrifugiranjem otvorenih saća. Prešani med nastaje prešanjem saća bez legla, uz moguću primjenu topline. Filtrirani med dobiva se uklanjanjem organskog i anorganskog sedimenta, uključujući pelud, dok je pekarski med namijenjen isključivo industrijskoj upotrebi kao sastojak u proizvodnji hrane, zbog specifičnog okusa i mirisa.

Med se obično naziva prema biljkama s kojih pčele sakupljaju nektar. Najpoznatije vrste meda su bagremov, lipov, kestenov, med od uljane repice, vrijeska, kadulje, livadni med i mnoge druge (Pravilnik, 2015).

Ovaj je rad baziran na detaljniji opis i analizu cvjetnog i livadnog meda.

2.2.1. Cvjetni ili nektarni med

Cvjetni ili nektarni med je med dobiven od nektarnih biljaka. Nektar je slatka tekućina koju proizvode biljke kako bi privukle pčele koje nose pelud. Pčele sišu nektar i skladište med u posebnom dijelu želuca, gdje pčelinji enzimi razgrađuju složene šećere u jednostavne šećere. Pčele u košnici zatim prenose nektar koji je skupila jedna pčela drugoj pčeli i ubacuju nektar u košnice. Pčele koriste svoja krila za poticanje isparavanja, smanjujući udio vode u nektaru sa 70-80 % na samo 18 %. Upravo tim procesom nastaje med.

Med se može klasificirati kao monoflorni ili poliflorni. Monoflorni med potječe od jedne vrste biljke i mora sadržavati najmanje 45 % peludnih zrnaca te biljke u netopljivom talogu. S druge strane, poliflorni med je mješavina nektara različitih biljnih vrsta. Ipak, postoje iznimke od ovog pravila za određene vrste meda. Na primjer, za bagremov, lavandin i kaduljin med, minimalni udio peludnih zrnaca je 20 %, dok za lipov med iznosi 25 %, a za kestenov med 85 % (Vahčić i Matković, 2009).

Najčešće vrste monoflornog meda u Republici Hrvatskoj su:

- Kesten (*Castanea sativa Mill*) je biljka koja ima jednodomne cvjetove, ženski i muški cvjetovi rastu na istom visokom i razgranatom stablu, ali su odvojeni. Muški cvjetovi služe za proizvodnju peluda, dok ženski cvjetovi proizvode nektar. Med od kestena je tamno smeđe boje i ima jak i oštar miris te slatkast, gorak ili trpak okus koji često odbija potrošače. Također, med od kestena se brzo kristalizira. Stabla kestena se mogu naći u šumama u blizini Hrvatske Kostajnice, Dvora na Uni, Zagreba i Istre. Kesten je visoko i razgranato stablo koje raste u prirodnim šumama. Zbog vrijednih plodova, kesten se smatra voćkom i najmedonosnijom vrstom voća, te je jedina biljka koja je važna za pčele. Cvatnja kestena počinje u drugoj polovici lipnja i traje 10-20 dana. Med od kestena najbolje uspijeva u toplom vremenu bez vjetera i s dovoljnom vlagom u zraku. Med je tamne boje i ima vrlo jak i oštar miris. Također, ima karakterističan gorak okus zbog kojeg mnogi potrošači ne vole njegovu aromu.
- Bagrem (*Robinia pseudoacacia*) je drvo koje cvjeta u drugoj polovini svibnja i početkom lipnja. Cvjetanje traje oko 10 do 12 dana. Med koji se dobiva od bagrema je svijetle boje i proziran. Ima blagi miris i ugodan okus, s tri specifične arome koje potječu od same biljke. Ovaj med rijetko kristalizira. U Hrvatskoj, najveće šume bagrema nalaze se u Baranji, Podravini i na Moslavačkoj gori. Zanimljivo je da se korištenjem razlika u nadmorskoj visini može produžiti period paše bagrema, što ukupno može trajati do 20 dana. Nažalost, vremenski uvjeti tijekom cvatnje u kontinentalnim područjima često mogu biti nepovoljni. Može biti hladno i kišovito ili jako vruće i vjetrovito. Ovi nepovoljni uvjeti mogu utjecati na količinu meda koji se može dobiti od bagrema.

- Kadulja, poznata i kao *Salvia officinalis*, je biljka koja izgleda kao trajni drvenasti grm. Možemo je nazvati pravim rajem za pčele, jer je druga po važnosti za njih, odmah poslije bagrema. Ona se najčešće može naći na područjima primorskog i dalmatinskog krša. Cvjetanje kadulje počinje rano, krajem travnja ili početkom svibnja. Prvo se cvjetovi pojavljuju bliže moru, dok se na unutrašnjosti i višim predjelima završava oko sredine lipnja. Međutim, vrijeme može imati veliki utjecaj na rast i razvoj kadulje. Na primjer, kišno i hladno vrijeme, kao i suša i vjetar, mogu negativno utjecati na nju. Med koji se dobije od kadulje ima svjetložutu boju, koja može varirati u zavisnosti od prisustva polena vinove loze koja cvjeta u isto vrijeme. Ukus meda je ugodan, s blagom gorčinom, a miris cvjeta biljke je vrlo izražajan. Kada se kristalizira, med od kadulje formira srednje krupne kristale, ali ne postaje previše tvrd (Šimić, 1980).
- Lavanda (*Lavandula officinalis* L.) je višegodišnji, gusto razgranat grm s uskim, svijetlim listovima i cvjetovima ljubičasto-modre boje, koji su grupirani u prividne klasove na vrhovima grančica. U našu zemlju lavanda je stigla iz Francuske, a najzastupljenija je na otoku Hvaru. Cvjeta tijekom lipnja i srpnja, a cvatnja traje oko 30 dana. Lavanda je bogat izvor nektara, što rezultira visokim prinosima meda po košnici, zbog čega je vrlo važna za prehranu pčela. Ipak, lavandini cvjetovi sadrže malo peluda, što može dovesti do smanjenja broja pčelinjeg legla. Med od lavande je svijetložute boje, bistar i proziran, s izraženim mirisom biljke i oštrim okusom, koji nije uvijek popularan među potrošačima (Vahčić i Matković, 2009).
- Lipa je biljka koja ima posebno značenje za pčele. Postoji nekoliko vrsta lipe, kao što su sitnolisna lipa, krupnolisna lipa i srebrnolisna lipa. Krajem lipnja, sitnolisna i krupnolisna lipa cvjetaju, ali pčele skupljaju samo cvjetni prah jer vjetar i sunce brzo isuše nektar prije nego ga pčele mogu sakupiti. To je zbog činjenice da cvijet lipe ima plitku čašicu koju vjetar lako isušuje. Da bi lipa bila izvor nektara, mora rasti zaštićena od vjetra i imati dovoljno vlage u tlu. S druge strane, srebrnolisna lipa cvjeta kasnije i ima obilan nektar, slično kao i bagrem. U Hrvatskoj, možemo pronaći veće površine pod lipom na području Bilogore. Lipov med je poseban i prepoznatljiv po svojoj svjetložutoj do blago zelenkastoj boji. Ima ugodan, malo gorkast okus i izražajan miris cvijeta lipe. Ono što je zanimljivo je da lipov med sporo kristalizira, što znači da se može ostaviti pčelama za zimsku ishranu. To je kao da pčele imaju svoju posebnu zalihu hrane za hladne zimske dane. Lipa je biljka koja ima veliku važnost za pčele i pruža im ne samo cvjetni prah, već i ukusan med koji je poseban po svom okusu i mirisu (Šimić, 1980).
- Ružmarin je biljka koja raste u našem kraju. Može narasti do visine od 2 metra i ima niske i debelolisne grane. Njegovi cvjetovi su plave boje. Možemo ga naći samostalno ili u kombinaciji s drugim biljkama u makiji, posebno na dalmatinskim otocima.

Zanimljivo je da ružmarin privlači pčele, iako ne proizvodi puno peluda. On cvjeta od rujna do svibnja, a u proljeće može cvjetati čak 40 dana. Kada pčele skupljaju nektar s ružmarina, dobijemo med koji je svijetle boje, proziran i bez mirisa. On ima ugodan i blag okus, a brzo kristalizira u fine sitne kristale. Kada se stvrdne, med postaje potpuno bijel (Vahčić i Matković, 2009).

- Suncokret (*Helianthus annuus L.*) je jednogodišnja biljka koja se uzgaja prvenstveno za proizvodnju ulja, a najzastupljenija je u Slavoniji. Cvjeta početkom srpnja, a najbolje uspijeva u lijepom, stabilnom vremenu s vlažnim zrakom. Med od suncokreta ima jantarno žutu boju, blag miris karakterističan za biljku te slatkast do blago trpak okus. Nakon vrcanja brzo kristalizira (Šimić, 1980).
- Amorfa (*Amorpha fruticosa L.*) je grmolika biljka koja može narasti do visine od 2 metra. Na vrhovima njenih grana nalaze se cvjetovi tamnocrvene do ljubičaste boje. Cvjeta početkom lipnja, otprilike 15 dana nakon bagrema. U Hrvatskoj je amorfa česta u šumama uz rijeku Odru, između Novske i Okučana, te u šumama Slavonske Posavine. Med dobiven od amorfe tamnocrvenkaste je boje, blagog mirisa i okusa (Šimić, 1980).

Livadni med je med dobiven iz različitog livadnog cvijeća. Često se u njemu mogu naći medljike, lipe, te različite druge biljke, korovi i ostalo što cvate u isto vrijeme. Upravo iz tog razloga same karakteristike livadnog meda, kao što su okus, miris i sklonost kristalizaciji variraju ovisno o vrstama iz kojeg se med dobije. Tako na primjer boja meda varira od svijetle do tamnožute (Vahčić i Matković, 2009). Slika 1. prikazuje različite uzorke meda koji su korišteni za analizu.



Slika 1. Uzorci meda

(Izvor: <https://www.pdz.hr/2019/08/07/obavijest-zzzagimed-2019-javni-poziv/>)

2.3. POKAZATELJI KAKVOĆE MEDA

Med je viskozna tekućina, a njegova boja može varirati od svjetložute do zlatno smeđe. Nekoliko je ključnih stvari na koje treba obratiti pažnju kada se provjerava kvaliteta meda. Jedan od najvažnijih pokazatelja kvalitete je prisutnost hidroksimetilfurfurala, ili skraćeno HMF. U svježem medu, HMF-a gotovo da i nema, pa je njegov udio manji od 1 mg/kg (Kapš, 2013).

Voda čini oko 15 do 23 % meda, a njezin sadržaj ima ključnu ulogu u tome kako se med ponaša – hoće li kristalizirati, koliko će biti gust, i kako će se čuvati. Ako je razina vode u medu ispod 17,1 %, to stvara neprijateljske uvjete za bakterije i druge mikroorganizme, jer im nedostaje vode za preživljavanje.

Pored toga, med se sastoji od 70 % šećera, a tu su glukoza i fruktoza. Zanimljivo je da fruktoza mora biti u većem postotku nego glukoza. Također, važno je da sadržaj sahara ne prelazi 5 %, jer to može utjecati na kvalitetu.

Još jedan važan faktor u očuvanju meda je vodikov peroksid, koji se stvara tijekom enzimske reakcije. Ova supstanca je kao prirodni borac protiv mikroorganizama, odnosno toksična je za njih. Količina vodikovog peroksida ovisi od prisutnosti enzima katalaze; dakle, med koji ima visok nivo vodikovog peroksida obično ima nisku aktivnost ovog enzima, i obrnuto (Laktić i Šukelja, 2008).

Prema pravilniku o kvaliteti meda, postoji nekoliko važnih pravila koja med mora ispunjavati kako bi bio spreman za tržište. Med mora sadržavati najmanje 65 % prirodnih šećera, dok medljikovac, koji je posebna vrsta meda, treba imati barem 60 %.

Osim toga, važno je da med ne sadrži previše mineralnih tvari. Na primjer, običan med može imati do 6 % minerala, dok medljikovac može imati malo više, do 1,2 %.

Također, med ne smije imati više od 0,1 % tvari koje nisu topljive u vodi. Ovo je važno jer želimo da med bude čist i kvalitetan.

Još jedan važan faktor je hidroksimetilfurfural (HMF) – tvar koja može ukazivati na kvalitetu meda. Njegova razina ne smije prelaziti 40 mg/kg, a ako je ispod 0,8, tada ne smije biti veći od 15 mg/kg.

Med ne smije biti obojen umjetnim bojama, niti mu se smiju dodavati konzervansi ili arome. Treba zadržati svoj prirodni ukus, boju i miris.

Sadržaj vode u medu ne smije prelaziti 20 %, osim kod meda vrijeska, koji može imati do 20 % vode. Električna provodljivost, koja ukazuje na kvalitetu, ne bi trebala biti veća od 0,8 mS/cm (Pravilnik, 2015).

2.4. KEMIJSKI SASTAV MEDA

Med je kompleksna smjesa koju čini preko 70 različitih tvari. Ovisno o vrsti meda, biljkama i mjestu gdje je skupljen, vremenskim uvjetima, vrsti pčela i vještinama pčelara, sastav meda može biti različit.

Najveći dio meda čine ugljikohidrati poput fruktoze i glukoze, zajedno s vodom, što čini više od 99 % meda. Ostatak su proteini koji uključuju enzime, minerali, organske kiseline, fenolni spojevi, vitamini, arome i razni derivati klorofila. Iako su ovi sastojci u medu prisutni u vrlo malim količinama (<1 %), oni su odgovorni za senzorska svojstva meda i njegovu hranjivu vrijednost (Singhal i sur., 1997).

2.4.1. Ugljikohidrati

U medu, većinu suhe tvari (95 do 97 %) čine ugljikohidrati ili šećeri. Med sadrži različite vrste šećera, kao što su fruktoza i glukoza, koje nazivamo jednostavnim šećerima. Također sadrži i druge šećere poput saharoze, koja je vrsta disaharida, i polisaharide u manjim količinama. Količina svakog šećera u medu ovisi o vrsti meda i enzimima koje pčele proizvode (Kapš, 2013).

Ovi šećeri se razlikuju po svojoj sposobnosti da polariziranu svjetlost zakreću u različitim smjerovima. Na primjer, glukoza zakreće svjetlost udesno, dok fruktoza zakreće ulijevo. Saharoza također zakreće svjetlost udesno, ali kada se izloži enzimu invertazi, ona se pretvara u šećer koji zakreće svjetlost ulijevo. Glukoza i fruktoza igraju ključnu ulogu u davanju medu slatkog okusa i određuju njegova fizička svojstva, kao što su gustoća, viskoznost i sklonost kristalizaciji. Pored njih, u medu se mogu naći i drugi šećeri, kao što su izomaltoza i maltoza (Mujić i sur., 2014). Fruktoza, koja je najzastupljeniji šećer u medu, je 1,5 puta slađa od običnog šećera (Vahčić i Matković, 2009). U nekim vrstama meda, poput medljikovca lipe, bora i jele, prisutan je šećer melecitoza, čija slaba topljivost sprječava kristalizaciju meda.

Količina šećera u medu igra važnu ulogu u procesu fermentacije. Većina ugljikohidrata u medu može fermentirati, ali to ovisi o udjelu vode i količini šećera. Ako se med pravilno skladišti s udjelom vode ispod 17,1 % i udjelom šećera iznad 83 %, neće fermentirati.

Šećeri su glavna komponenta koja utječe na okus meda. Na osnovu različitih omjera monosaharida, oligosaharida i disaharida moguće je na temelju brojnih istraživanja utvrditi o kojoj vrsti meda se radi (Vahčić i Matković, 2009). Mogu biti reducirajući ili nereducirajući. Reducirajući šećeri sadrže određene kemijske skupine koje im omogućuju da reagiraju s drugim tvarima. Polisaharidi mogu imati krajeve lanaca koji mogu biti reducirajući ili nereducirajući, ovisno o tome može li se prsten monosaharidne jedinice otvoriti. Svi

nemodificirani monosaharidi su reducirajući, dok je saharoza primjer nereducirajućeg šećera (Mujić i sur. 2014).

Enzim saharaza, poznat i kao invertaza ili α -glukozidaza, nalazi se u medu i pripada skupini hidrolaza. Prisutnost ovog enzima u medu je izrazito važno, jer je odgovoran za promjene koje se događaju tijekom sazrijevanja meda. Ovaj enzim ima prirodno konzervirajuće djelovanje. On djeluje tako što razbija glikozidnu vezu, pri čemu se kao produkt dobije glukoza i fruktoza. Mješavina ova dva ugljikohidrata naziva se invertni šećer i čini glavni dio meda (Kapš, 2013).

2.4.2. Voda

Voda ima ključnu ulogu u medu jer značajno utječe na njegovu kvalitetu, teksturu i trajnost. Voda omogućava medu da bude tečan i jednostavan za mazanje. Udio vode u medu može varirati od 15 do 23 %, a to ovisi od vrste meda, sezone i njegove zrelosti. Međutim, bitno je da med ne sadrži više od 21 % vode, jer višak vode može dovesti do fermentacije.

Med ima higroskopska svojstva, što znači da se količina vode u njemu mijenja u ovisnosti od vlažnosti zraka tijekom skladištenja. Stabilnost meda i njegova otpornost na mikrobiološko kvarenje, poput fermentacije, direktno su povezani s količinom vode. Zbog toga se udio vode smatra jednim od najvažnijih parametara za procjenu kvalitete meda. Aktivnost vode određuje koliko su povoljni uvjeti za rast mikroorganizama, pa i u medu. Aktivnost vode u medu ovisi od koncentracije šećera (fruktoze, glukoze, te u manjoj mjeri saharoze, maltoze i izomaltoze) u vodi meda (Chirife i sur, 2006).

Udio vode također utječe na kristalizaciju meda, težinu i viskoznost. Međutim, najvažniji utjecaj vode je na trajnost meda. Ako med sadrži manje od 18 % vode, uglavnom je zaštićen od fermentacije. Ipak, čak i pri sadržaju vode manjem od 17,1 %, postoji rizik od fermentacije uz prisutnost kvasaca i odgovarajuće temperature (Vahčić i Matković, 2009).

Prema hrvatskim standardima, med koji se prodaje ne smije sadržavati više od 20 % vode, osim meda od vrieska, koji može imati do 23 % vode. Udio vode u medu može se izmjeriti refraktometrom, instrumentom koji koristi svjetlost za mjerenje gustoće meda (Laktić i Šukelja, 2008).

2.4.3. Proteini i aminokiseline

Proteini i aminokiseline u medu dolaze od pčela ili peludi. Kada se aminokiseline pomiješaju sa šećerima, mogu stvoriti žute i smeđe proizvode koji dovode do tamnije boje meda. Ova reakcija se događa kada med dugo stoji ili se zagrijava. Tamniji med bi po pravilu trebao sadržavati više proteina od svjetlijeg meda (Laktić i Šukelja, 2008).

Udio proteina u medu može biti od 0 do 1,7 %. Pored proteina, med također sadrži slobodne aminokiseline. Iako je ukupni udio proteina u medu mali, sadrži oko 18 esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina. Omjeri aminokiselina se razlikuju ovisno o vrsti biljke.

Neki primjeri aminokiselina u medu su prolin, histidin, lizin, arginin, asparaginska kiselina, serin, treonin, glutaminska kiselina, alanin, glicin, cistein, metionin, valin, izoleucin, leucin, fenilalanin, tirozin i triptofan. Najzastupljenija aminokiselina je prolin, koja čini 80-90 % svih aminokiselina. Prolin uglavnom dolazi od pčela i dolazi u med tijekom prerade nektara. Njegov udio može nam reći koliko je med zreo i može ukazivati na krivotvorenje meda ako je udio manji od 180 mg/kg (Missio da Silva i sur., 2016).

2.4.4. Enzimi

Enzimi prisutni u medu potječu iz pčelinjih izlučevina, cvjetnog praha i nektara. Djeluju kao biološki katalizatori koji ubrzavaju kemijski proces pretvaranja nektara u med. Najzastupljeniji enzimi u medu su invertaza, katalaza, dijastaza, kiselna fosfataza i drugi (Laktić i Šukelja, 2008). Dijastaza (α - i β -amilaza) ima ulogu razgradnje škroba u jednostavnije ugljikohidrate. Njena aktivnost jedan je od ključnih pokazatelja intenziteta zagrijavanja meda tijekom prerade i skladištenja, pri čemu se ta aktivnost smanjuje uslijed zagrijavanja.

Invertaza, prisutna u pčelinjim slinovnicama, razgrađuje šećer saharozu u jednostavnije šećere, glukozu i fruktozu. Ovaj enzim je aktivan tijekom cijelog procesa sazrijevanja meda (Mujić i sur., 2014).

Katalaza razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik, dok kiselna fosfataza hidrolizira fosfatne estere. Glukoza oksidaza, još jedan značajan enzim, oksidira malu količinu glukoze u glukonolakton, koji se zatim pretvara u glukonsku kiselinu. Ova reakcija proizvodi vodikov peroksid, koji ima baktericidna svojstva (Moreira i sur., 2007). Dakle, glukoza oksidaza je još jedan važan enzim u procesu stvaranja meda, a dolazi iz ždrijelne žlijezde pčela.

Aktivnost enzima se smatra pokazateljem kakvoće, starosti, stupnja zrelosti i načina čuvanja meda. Enzimi daju medu svojstva koja se umjetnim putem ne mogu proizvesti niti nadomjestiti (Mujić i sur., 2014).

2.4.5. Vitamini i minerali

Med je prirodni proizvod koji je poznat po svojoj slatkoći i koristi se u različite svrhe, uključujući prehranu i liječenje. Najzastupljeniji vitamini u medu su vitamini B skupine, gdje se mogu izdvojiti tiamin (B_1), riboflavin (B_2), niacin (B_3), pantotenska kiselina (B_5), biotin (B_8) i folna kiselina (B_9), a u nižoj koncentraciji prisutni su i vitamin C i vitamin K. Različite vrste meda

imaju različit udio minerala, a medljike i tamniji medovi obično imaju najviše minerala (Mujić i sur., 2014).

Kalij je najzastupljeniji mineral u medu, ali također možemo pronaći i druge minerale poput natrija, kalcija, fosfora, sumpora, klora, magnezija, željeza i aluminijska. Bakar se također može pronaći u tragovima. Količina minerala u medu ovisi o vrsti biljke iz koje je med dobiven, klimatskim uvjetima i sastavu tla na kojem su biljke rasle (Škenderov i Ivanov, 1986).

Važno je napomenuti da propisi ograničavaju udio minerala u medu. Općenito, med ne smije sadržavati više od 0,6 % mineralnih tvari. Međutim, medljikovac može sadržavati do 1,2 % minerala. Sastav tla određene regije može se očitovati u mineralnom sastavu nektara i peluda medonosne biljke (Vahčić i Matković, 2009).

Dakle, iako med nije glavni izvor vitamina, on može pružiti različite minerale koji su važni za naše tijelo.

2.4.6. Organske kiseline

Med je prirodni proizvod koji sadrži različite vrste organskih kiselina. Udio ovih kiselina u medu varira, ali prosječno je oko 0,57 %. Među kiselinama koje se mogu pronaći u medu su mravlja, maslačna, oksalna, octena, vinska, limunska, piroglutaminska, jabučna, benzojeva, mliječna, maleinska, valerijanska, glukonska, pirogroždana, jantarna, α -ketoglutarina, glikolna i 2,3-fosfogliceratna kiselina.

Najzastupljenija kiselina u medu je glukonska kiselina, koja se formira iz glukoze uz pomoć posebnih enzima. Mnoge od ovih kiselina su prisutne u medu u obliku estera, a također se mogu pronaći i anorganski ioni poput fosfata, klorida i sulfata. Neki od ovih spojeva dolaze u med putem nektara i medljike, dok se drugi stvaraju tijekom skladištenja.

Ukupna kiselost meda je važan pokazatelj njegove kvalitete. Ona je povezana s fermentacijskim procesima, okusom i mirisom meda. Mnoge organske kiseline u medu su prisutne u obliku estera i značajno utječu na njegov miris i okus. Također, niska pH vrijednost meda sprječava rast mikroorganizama, što mu daje baktericidna svojstva.

Količina slobodnih kiselina određena je Pravilnikom o medu (Pravilnik, 2015), a propisano je da med koji se stavlja na tržište (s izuzetkom pekarskog meda) smije imati najviše 50 mEq slobodnih kiselina na 1000 grama meda.

Ukupna kiselost meda može varirati od 8,7 do 59,5 mEq/kg, s prosječnom vrijednošću od 29,1. Osim vrste meda, kiselost ovisi i o uvjetima skladištenja i temperaturnoj obradi meda. pH vrijednost meda se kreće od 3,2 do 6,5.

Ako je kiselost meda previsoka, to obično ukazuje na to da je med fermentirao neko vrijeme. Ovo se događa kada se alkohol, koji je produkt fermentacije, pretvori u organsku kiselinu (Vahčić i Matković, 2009).

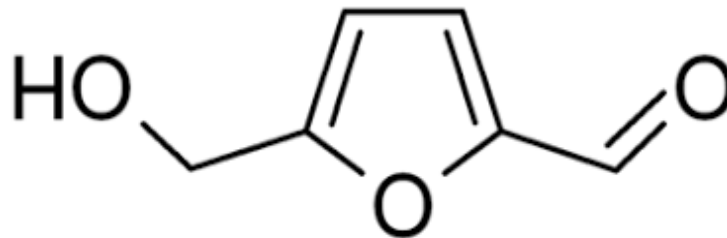
2.4.7. Hidroksimetilfurfural (HMF)

Hidroksimetilfurfural (HMF) je ciklički aldehid i to je prikazano na slici 2, a formira se u medu kroz procese dehidracije fruktoze i glukoze u kiselom okruženju. HMF se dalje razgrađuje na levulinsku i mravlju kiselinu. Brzina ove reakcije raste s povećanjem temperature, pri čemu je porast proporcionalan porastu temperature.

Količina HMF-a u medu ovisi o različitim čimbenicima, kao što su vrsta meda, pH vrijednost, prisutnost kiselina i vlage te izloženost svjetlu. Povišena koncentracija HMF-a može ukazivati na moguće patvorenje meda dodatkom sirupa invertnog šećera (Missio da Silva i sur., 2016).

U svježem proizvedenom medu, razina HMF-a je vrlo niska, obično ispod 1 mg/kg, no ova vrijednost brzo raste ako je med izložen temperaturama višim od 20 °C (Vahčić i Matković, 2009). Uobičajeno, svježiji cijedeni med ne sadrži više od 1 mg/kg HMF-a. Viša koncentracija može ukazivati na pretjerano zagrijavanje tijekom prerade.

U Hrvatskoj, maksimalno dozvoljena razina HMF-a u medu je 40 mg/kg. Međutim, med u tropskim krajevima često sadrži i do 80 mg/kg HMF-a zbog visokih temperatura tijekom skladištenja i transporta (Pravilnik, 2015).



Slika 2. Kemijska struktura hidroksimetilfurfurala (prema Markowicz Bastos i sur., 2012)

2.4.8. Fitokemikalije

Med sadrži različite spojeve koji potječu iz biljaka s kojih pčele prikupljaju nektar ili mednu rosu. Ovi spojevi, poznati kao fitokemikalije, pokazali su se korisnima za ljudsko zdravlje.

Jedna od značajnih skupina fitokemikalija prisutnih u medu su antioksidansi. Ovi spojevi pomažu u zaštiti organizma od slobodnih radikala, izrazito reaktivnih molekula koje mogu promijeniti strukturu drugih molekula poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Takve promjene mogu oštetiti stanice, što vodi ka starenju i zdravstvenim problemima (Vahčić i Matković, 2009).

Antioksidansi prisutni u medu i drugim namirnicama štite hranu od kvarenja uzrokovanog oksidacijskim procesima izazvanim svjetlom, toplinom ili metalima. Ovi spojevi mogu biti enzimatski (poput katalaze i glukoza-oksidade) i neenzimatski (poput organskih kiselina, Maillardovih produkata, aminokiselina, proteina, flavonoida, fenola te vitamina E i C). Količina antioksidansa u medu primarno ovisi o botaničkom podrijetlu, dok na nju u manjoj mjeri utječu geografsko podrijetlo, skladištenje i način prikupljanja (Kapš, 2013).

Flavonoidi su druga važna skupina fitokemikalija prisutnih u medu. Ove prirodne tvari nalaze se u biljkama i zaslužne su za boje voća, povrća, sjemenki i cvijeća. Osim što štite biljke od mikroorganizama i UVB zračenja, flavonoidi također djeluju kao antioksidansi, imaju antimikrobna svojstva, inhibiraju različite enzime u tijelu, a neki čak imaju antitumorski učinak te djeluju kao estrogeni. Najčešći flavonoidi u medu su pinocembrin, galangin, kamferol, kvercetin, apigenin, pinobanksin, krisin, hesperidin i luteolin. Količina flavonoida u medu može doseći 6000 µg/kg, no njihov udio je značajno veći u peludi (0,5 %) i propolisu (10 %).

Uz flavonoide, med također sadrži fenolne spojeve, poput fenolnih kiselina (galne, kafeinske, kumarinske, ferulične, elaginske) i njihovih estera. Količina ovih spojeva varira ovisno o biljnom podrijetlu meda. Iako različite vrste meda mogu imati različite koncentracije flavonoida i fenolnih spojeva, svi oni imaju blagotvorne učinke na ljudski organizam. Fenolni spojevi također utječu na boju meda, pri čemu tamnije vrste meda sadrže veće količine fenolnih spojeva u usporedbi s onim svjetlijim (Meda i sur., 2005).

2.5. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA

Fizikalna svojstva meda, koja uključuju kristalizaciju, viskoznost, električnu vodljivost, higroskopnost, optička svojstva, specifičnu masu i indeks refrakcije usko su povezana s njegovim kemijskim sastavom. Ta svojstva variraju ovisno o vrsti meda, njegovom sastavu, podrijetlu, načinu prerade i uvjetima skladištenja (Škenderov i Ivanov, 1986).

Određeni sastojci meda mogu utjecati na više fizikalnih svojstava istovremeno. Na primjer, indeks loma svjetlosti, viskoznost i specifična masa ovise o sadržaju vode u medu. Optička aktivnost je povezana s koncentracijom i prisutnošću određenih ugljikohidrata, a električna vodljivost određena je sadržajem mineralnih tvari u medu.

2.5.1. Kristalizacija

Kristalizacija je prirodan proces do kojeg dolazi uslijed prezasićenosti, pri čemu nastaje struktura kristalne rešetke iz tekuće faze. Glavna komponenta u medu koja je zadužena za kristalizaciju je glukoza. Kada je koncentracija glukoze previše visoka, ona počinje da se taloži i formira kristale. Ovi kristali su zapravo glukoza monohidrat, koji je vrsta šećera. Kada se glukoza kristalizira, ona gubi vodu, a ta voda postaje slobodna. Slobodna voda povećava sadržaj vode u dijelovima meda koji nisu kristalizirani. To može dovesti do brže fermentacije i kvarenja meda (Kezić i sur., 2013).

Fruktoza, druga komponenta meda, ostaje tečna oko kristala glukoze. Formiranje kristala može biti primarno ili sekundarno. Primarno formiranje znači da prethodno formirani kristali ne postoje, pa je potrebna dodatna energija za formiranje kristala. Sekundarno formiranje se događa samo u već formiranim kristalima (Vahčić i Matković, 2009).

Brzina rasta kristala zavisi od temperature. Kada je temperatura niža, kristali se formiraju brže, ali su manji. Optimalna temperatura za kristalizaciju meda je između 10 i 15 °C. Na temperaturi iznad 25 °C kristalizacija se usporava, a na temperaturama većim od 30 °C odvija se dekrystalizacija meda (Kezić i sur., 2013). Brzina kristalizacije također ovisi od drugih faktora kao što su odnos fruktoze i glukoze, prisutnost organskih kiselina, minerala, proteina te vlažnost zraka i način skladištenja.

Važno je napomenuti da kristalizacija u principu ne utječe na kemijsku ili nutritivnu vrijednost meda. Međutim, mnogi potrošači ne vole kristalizirani med zbog njegovog izgleda (Kapš, 2013). Zato se često pokušava izbjeći kristalizacija meda. Međutim, na tržištu postoji i poseban tip meda koji se zove kremasti med. Kod ovog meda, kristalizacija se svjesno izvodi. Proizvođači koriste proces koji se zove dinamička kristalizacija. To znači da se med polako miješa, ručno ili automatski, kako bi se inicirala kristalizacija. Rezultat je kremasti i lako mazivi med. U dosadašnjim analizama pokazalo se da najbrže kristaliziraju medljikovac, suncokretov i maslačkov med (Laktić i Šukelja, 2008).

2.5.2. Viskoznost

Viskoznost je fizikalna veličina koja opisuje otpor tekućine prema protjecanju. Viskoznost meda direktno zavisi od sadržaja vode u njemu. Što je gustoća meda veća, a sadržaj vode manji, to je viskoznost meda viša.

Pored vode, viskoznost zavisi i od količine i odnosa monosaharida i oligosaharida, kao i od prisutnosti proteina. Istraživanja su pokazala da veći udjeli di- i trisaharida doprinose povećanju viskoznosti (Assil i sur., 1991). Zbog toga dva meda mogu imati različite viskoznosti čak i ako imaju isti sadržaj vode. Med s niskim udjelom vode teče sporije, dok med s 15 % više vode može biti i do tri puta fluidniji (Vahčić i Matković, 2009).

Temperatura također značajno utiče na viskoznost. S porastom temperature viskoznost se smanjuje, dok snižavanje temperature povećava viskoznost. Ovaj učinak je najizraženiji pri temperaturama ispod 15 °C (Kezić i sur., 2013).

2.5.3. Higroskopnost

Higroskopnost meda je svojstvo koje mu omogućava da apsorbira ili otpušta vodu, ovisno o vlažnosti zraka i sadržaju vode u medu. Ovo svojstvo je povezano s visokim udjelom šećera u medu. Kada je zrak vlažan, med će upiti vodu iz okoline, dok će u suhim uvjetima otpustiti višak vode. Med s nižim udjelom vode teče sporije, dok je med s oko 15 % više vode tri puta fluidniji (Kapš, 2008).

Ovaj proces traje dok se ne postigne ravnoteža, odnosno kada je vlažnost zraka 58 %, a sadržaj vode u medu 17,4 %. Zbog viskoznosti meda, voda se polako kreće kroz njega, pa su promjene zbog higroskopnosti uglavnom vidljive na površini. To znači da se apsorbirana voda polako kreće prema unutrašnjosti meda (Vahčić i Matković, 2009). Higroskopnost meda je posebno izražena zbog visokog sadržaja fruktoze, koja je učinkovitija u privlačenju i zadržavanju vlage u usporedbi s glukozom i drugim šećerima.

Ovo svojstvo higroskopnosti je važno za pčelare i potrošače. Pčelari moraju pažljivo skladištiti med, posebno u vlažnim uvjetima, jer povećani sadržaj vode može dovesti do fermentacije i kvarenja meda. Dakle, higroskopnost meda je ključan faktor koji treba uzeti u obzir kako bi se očuvala njegova svježina i kvaliteta (Škenderov i Ivanov, 1986).

2.5.4. Električna vodljivost

Električna vodljivost je fizikalna karakteristika meda koja zavisi od koncentracije mineralnih tvari i kiselina prisutnih u njemu. Veći udio ovih tvari povećava sposobnost meda da provodi

električnu struju. Električna vodljivost se mjeri u milisimensima po centimetru (mS/cm) (Petričko, 2015). Ova vodljivost se procjenjuje kao provodnost 20%-tne vodene otopine meda pri temperaturi od 20 °C, pri čemu 20 % označava količinu suhe tvari u medu.

Mjerenjem električne provodljivosti možemo saznati odakle med potječe i razlikovati različite vrste meda. Prema europskom i hrvatskom zakonu, električna provodljivost u nektarnim i miješanim medovima mora biti manja od 0,8 mS/cm. S druge strane, medljikovac i med od kestena moraju imati veću električnu provodljivost od 0,8 mS/cm. Ipak, uvijek postoje iznimke. Neke vrste meda, poput planike, vrijesa, eukaliptusa, lipe, vrijeska, manuke i čajevca, imaju posebne karakteristike koje im daju veću električnu provodljivost (Pravilnik, 2015).

2.5.5. Optička aktivnost

Med ima sposobnost da mijenja smjer svjetlosti koja prolazi kroz njega. To se događa zbog različitih sastojaka koji se nalaze u medu, posebno ugljikohidrata. Fruktaza, koja je jedan od sastojaka meda, rotira svjetlost ulijevo, dok glukoza i drugi šećeri rotiraju svjetlost udesno (Škenderov i Ivanov, 1986).

Ovo svojstvo meda koristi se u analitičke svrhe kako bi se razlikovao medljikovac od nektarnog meda. Medljikovac ima veći udio fruktoze, što rezultira negativnom optičkom aktivnošću - rotacijom svjetlosti ulijevo. S druge strane, nektarni med ima veći udio glukoze i drugih šećera koji rotiraju svjetlost udesno. Ovo svojstvo se može objasniti većim sadržajem fruktoze u nektarnom medu i većim udjelom oligosaharida, melecitoze i erloze, u medljikovcu (Kezić i sur., 2013).

2.5.6. Indeks refrakcije

Indeks refrakcije koristi se za određivanje udjela vode i topivih suhih tvari u medu. Ova mjerenja provode se pomoću refraktometra, instrumenta koji mjeri lom svjetlosti pri prolasku kroz otopinu. Uobičajeno se mjerenja izvode pri temperaturi od 20 °C, no rezultati mogu varirati ovisno o temperaturi mjerenja (Batinić, 2014). Budući da med i saharoza, koja je jedan od sastojaka meda, imaju različite indekse loma svjetlosti, za točno određivanje udjela u medu koriste se posebne tablice za usporedbu.

2.5.7. Specifična masa

Specifična masa meda je mjera koja izražava odnos između mase meda i mase jednake količine vode. Ova vrijednost ovisi prije svega o sadržaju vode u medu. Kvalitetni med obično

ima specifičnu masu veću od 1,42. Također, biljke s kojih pčele prikupljaju nektar mogu utjecati na specifičnu masu meda (Vahčić i Matković, 2009).

2.6. PATVORENJE MEDA

Patvorenje hrane definira se kao namjerna izmjena sastava dodavanjem jeftinijih ili manje kvalitetnih sastojaka kako bi proizvod bio privlačniji i ekonomski isplativiji. Med je jedan od najčešće patvorenih proizvoda, često "obogaćen" raznim dodacima kako bi se poboljšali njegov izgled i okus. Osim meda, često se patvore i maslinovo ulje, sok od naranče, sok od jabuke, mlijeko i kava. Glavni razlog za ovo patvorenje leži u ekonomskim interesima – trgovci biraju jeftinije sastojke ili uklanjaju skuplje kako bi povećali profit (Jaafar i sur., 2020). Patvorenje meda postaje sve veći problem.

Potražnja za medom raste, dok se broj pčela smanjuje zbog klimatskih promjena, zagađenja i bolesti. Sve veća svjesnost ljudi o zdravstvenim prednostima meda, poput pozitivnih učinaka na probavu, srce, nesanicu i bolesti jetre, potiče ih da više brinu o tome što jedu i kako je to proizvedeno. Ova svijest svakako predstavlja korak prema zdravijem načinu života (Mahmoudi i sur., 2016). Patvorenje meda može se podijeliti u dvije glavne kategorije: izravno patvorenje u kojem se dodatni sastojci direktno dodaju u med, i neizravno patvorenje, gdje se pčele hrane šećernim sirupima kako bi se povećao prinos ili kada se med miješa s medom niže kvalitete (Zábrowská i Vorlová, 2015).

Među najčešće korištenim dodacima u medu su visokofruktozni sirup, šećerni sirupi od kukuruza, pšenice i repe, te invertni šećerni sirup. Ovi dodaci često su teški za identifikaciju putem laboratorijskih analiza jer su njihovi profili ugljikohidrata prilagođeni da imitiraju pravi med. U Europskoj uniji, oko 40 % meda na tržištu dolazi iz uvoza, pri čemu je više od 50 % tog uvezenog meda u 2015. godini poteklo iz Kine. Istraživanja su pokazala da je velik dio tog meda bio patvoren korištenjem šećernih sirupa od kukuruza ili trske, unatoč izazovima u provedbi analiza za detekciju patvorenja na vanjskim granicama EU (Službeni list Europske unije, 2018).

Patvorenje meda nije samo izazov za pčelare već predstavlja ozbiljnu prijetnju za zdravlje potrošača. Konzumacija meda prepunog šećera i aditiva može dovesti do povišenog nivoa šećera u krvi, što povećava rizik od dijabetesa tipa II, problema s lipidima u krvi i visokog krvnog pritiska. Osim zdravstvenih rizika, postoji i ekonomska prijetnja. Prisutnost lažnog meda na tržištu smanjuje povjerenje potrošača u kvalitetu proizvoda. Pčelari koji ulažu trud u proizvodnju visokokvalitetnog meda, pridržavajući se svih dobrih praksi, suočavaju se s izazovima jer potrošači teško mogu razlikovati pravi med od patvorenog. Stoga, borba za

kvalitetan med postaje borba za očuvanje zdravlja i povjerenja u proizvode koje potrošači konzumiraju.

Jedna od najčešćih metoda patvorenja meda uključuje dodavanje šećernih sirupa, često uz primjenu topline kako bi se osigurala bolja mješavina. Tijekom zagrijavanja, može se stvoriti hidrokсимetilfurfural (HMF), čija visoka koncentracija može ukazivati na patvorenje meda. Za određivanje razine HMF-a koriste se metode poput tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC), plinske kromatografije uparene s masenom spektrometrijom (GC-MS) i micelarne elektrokinetičke kromatografije (MEKC).

Osim HMF-a, važan parametar za otkrivanje patvorenja je aktivnost enzima dijastaze i invertaze. Aktivnost invertaze se koristi kao bolji pokazatelj zbog toga što se brže razgrađuje tijekom zagrijavanja meda (Fakhlaei i sur., 2020).

Za otkrivanje dodanih šećernih sirupa razvijene su različite analitičke metode. Visoko djelotvorna kromatografija anionske izmjene s pulsnom amperometrijskom detekcijom (HPAEC-PAD) koristi se za prepoznavanje kukuruznog sirupa i visoko fruktoznog kukuruznog sirupa. Ova metoda uključuje tretiranje uzoraka aktivnim ugljenom kako bi se uklonili monosaharidi i disaharidi iz meda, omogućujući analizu oligosaharida. Oligosaharidni profil pomaže u prepoznavanju prisutnosti patvorina. Također, GC-MS, HPLC i analiza omjera stabilnih izotopa ugljika (SCIRA) koriste se za detekciju dodatka visoko fruktoznog sirupa u med (Morales i sur., 2008).

SCIRA metoda uspoređuje omjere izotopa ugljika ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) u medu i proteinima iz meda kako bi otkrila dodatke šećernih sirupa iz kukuruza ili šećerne trske. Ako su omjeri izotopa u proteinu i šećeru iz istog izvora, trebali bi biti slični, što pomaže u prepoznavanju patvorenja. Za detekciju kukuruznog šećernog sirupa koriste se i metode poput matrice potpomognute laserske desorpcije/ionizacije povezane s masenom spektrometrijom (MALDI-MS), Headspace plinske kromatografije povezane sa spektrometrijom ionske pokretljivosti (HS-GC-IMS) i tekućinske kromatografije povezane s masenom spektrometrijom za određivanje omjera stabilnih izotopa (LC-IRMS).

Metoda LC-IRMS, koja predstavlja unapređenje tehnike SCIRA, koristi se za analizu pojedinačnih šećera kao što su saharoza, fruktoza i glukoza, te za određivanje omjera izotopa ugljika (^{13}C) u ovim šećerima i u di- i trisaharidima. Ova metoda omogućuje otkrivanje dodataka šećernih sirupa dobivenih iz biljaka poput riže, repe, šećerne trske i pšenice (Elflein i Rætzke, 2008).

Za identifikaciju dodataka šećernih sirupa koristi se i tekućinska kromatografija povezana s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), koja, iako je vrlo osjetljiva, može biti i skupa. Ova tehnika omogućava detekciju specifičnog markera rižinog sirupa, 2-acetil-3-glukopiranozida, koji se prirodno ne nalazi u medu.

Indirektno patvorenje može se otkriti pomoću tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u kombinaciji s kvadropol-TOF masenom spektrometrijom (UHPLC/Q-TOF-MS). Ova metoda omogućava prepoznavanje dodataka poput visoko fruktoznog kukuruznog sirupa, rižinog sirupa i invertnog šećera.

S druge strane, SDS-PAGE (Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) može se koristiti za otkrivanje patvorenja miješanjem meda različitog podrijetla. Ova tehnika omogućava razdvajanje proteina peludi meda, koji mogu služiti kao pokazatelji podrijetla meda, jer se molekulska masa glavnih proteina razlikuje ovisno o vrsti pčela.

Botaničko podrijetlo meda može se utvrditi analizom flavonoida, peludi, aromatskih komponenti, te mjerenjem električne provodljivosti, kiselosti, pH vrijednosti, udjela šećera, boje, profila i udjela oligosaharida, aminokiselina i mineralnih tvari. Ove analize koriste se za utvrđivanje i zemljopisnog podrijetla meda. Peludna analiza, koja uključuje brojenje i identificiranje peludnih zrnaca mikroskopom prema njihovim specifičnim karakteristikama, često je korištena metoda zbog svoje pristupačnosti, iako zahtijeva stručne analitičare (Bogdanov i Martin, 2002).

Patvorenje meda može imati ozbiljne posljedice za ljudsko zdravlje, jer loše rukovanje tijekom proizvodnje može dovesti do ne higijenskih uvjeta i nesigurnih proizvoda. Povećana konzumacija patvorenog meda povezuje se s raznim zdravstvenim problemima, uključujući rak, astmu i čireve (Tura i Seboka, 2019).

2.6. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA

Boja, okus i miris su ključna senzorska svojstva meda koja značajno ovise o njegovom botaničkom podrijetlu, kao i o uvjetima prerade i skladištenja. Analiza ovih svojstava je od velike važnosti za određivanje ukupne kvalitete meda. Budući da fizikalno-kemijske analize ne mogu uvijek pružiti dovoljno informacija za sve vrste meda, senzorska analiza postaje ključna u ocjeni njegovih karakteristika.

Senzorska analiza može otkriti patvorenje meda, poput dodavanja šećera, hranjenja pčela šećerom ili netočnog označavanja botaničkog podrijetla meda. Također može identificirati prisutnost kontaminanata poput sredstava protiv moljaca ili repelenta (Vahčić i Matković, 2009).

Boja meda varira u rasponu od svjetložute do tamnosmeđe, ovisno o njegovom botaničkom izvoru. Na primjer, bagremov med je gotovo bijel i zelenkast, dok je kestenov med tamnosmeđi. Ostale vrste meda imaju boje koje se nalaze između ovih krajnosti. Livadni med i med od djeteline su svijetle boje, med od lipe je crvenkast, vrijesak je tamnožut, dok je suncokretov med jantarnožut, a med uljane repice ima specifičnu boju. Nakon kristalizacije, med može

postati svjetliji zbog bijelih kristala glukoze, ali s vremenom potamni, posebno pri višim temperaturama. Boja meda također ovisi o kemijskom sastavu, uključujući prisutnost karotenoida, flavonoida, klorofila, antocijanina, tanina i šećera. Tamnija boja može nastati zbog Maillardovih reakcija, koje uključuju kondenzaciju proteina i aminokiselina s reducirajućim šećerima, stvarajući melanoide i uzrokujući razgradnju fruktoze. Također, količina pepela, posebno željeza, bakra i mangana, može utjecati na boju. Prozirnost i jasnoća meda ovise o prisutnosti čestica poput peludi. Med s proljeća obično je svjetliji, dok kasnojletni med može biti tamniji.

Miris i okus meda određuju se prema biljkama s kojih je nektar prikupljen. Aromatske tvari iz tih biljaka daju medu specifična senzorna svojstva. Na primjer, monoflorni medovi poput bagremovog, vrieska ili lipe imaju prepoznatljiv okus koji odgovara biljci iz koje potječu. Okus i miris meda su usko povezani i nadopunjuju se. Punoća i slatkoća meda ovise o udjelu ugljikohidrata, aminokiselina, eteričnih ulja i organskih kiselina, dok kiseli okus može biti posljedica fermentacije. Među mirisne spojeve ubraja se i hidroksimetilfurfural (HMF). Med sadrži preko 50 spojeva koji doprinose njegovom mirisu (Škenderov i Ivanov, 1986).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Na uzorcima meda sa međunarodnog natjecanja "Zzzagimed 2023" provedene su analize različitih fizikalno-kemijskih parametara, uključujući kiselost, maseni udio vode, maseni udio reducirajućih šećera, električnu provodnost, maseni udio saharoze i maseni udio hidroksimetilfurfurala. Analizirano je ukupno 146 uzoraka meda, među kojima je bilo 34 uzorka cvjetnog meda i 27 uzoraka livadnog meda.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema uzoraka za analizu

Uzorci meda pripremaju se za analizu ovisno o njihovoj konzistenciji. Ukoliko je med tekući, promiješa se staklenim štapićem prije analiziranja ili se protrese.

Granulirani med se zagrijava u vodenoj kupelji na 60-65 °C tijekom 30 minuta, a med se povremeno miješa štapićem ili protrese kružnim pokretima te se na kraju med brzo prohladi. Ukoliko se određuju HMF i dijastaza, zagrijavanje se preskače jer temperatura utječe na analizu.

Med sa stranom tvari poput voska ili dijelova pčele tretira se zagrijavanjem u vodenoj kupelji na 40 °C nakon čega se procijedi kroz tkaninu postavljenu na ljepilo koje se održava toplom vodom.

Kada je u pitanju med u saću, saće se otvori, a med se iscijedi kroz žičano sito s kvadratnim otvorima promjera 0,5 mm x 0,5 mm. Ukoliko se nakon ovog postupka u medu nađu dijelovi saća ili voska, provodi se postupak sličan kao kod granuliranog meda. Dakle, med se zagrijava u vodenoj kupelji na 60-65 °C 30 minuta uz povremeno miješanje, a zatim ga se ohladi. Granulirani med u saću se zagrije na temperaturu otopljenog voska, izmiješa i ohladi, nakon čega se ukloni vosak (International Honey Commission, 2009).

3.2.2. Određivanje udjela vode u medu

Metoda za određivanje sadržaja vode u medu koristi refraktometriju. Nakon pripreme uzorka, koristi se refraktometar za mjerenje indeksa refrakcije pri 20 °C. Na osnovu rezultata mjerenja, pomoću specijalizirane tablice može se izračunati udio vode u medu (% m/m).

Ako se mjerenje ne obavi pri 20 °C, potrebno je primijeniti korekciju temperature da bi se rezultati prilagodili toj temperaturi. Za temperature iznad 20 °C, na rezultat se dodaje 0,00023 za svaki °C iznad, dok se za temperature ispod 20 °C oduzima 0,00023 za svaki °C ispod (International Honey Commission, 2009). Za ovu analizu potrebno je koristiti refraktometar, stakleni štapić i 96 % etanol kao reagens.

3.2.3. Određivanje kiselosti meda

Princip

Metoda za određivanje kiselosti meda temelji se na titraciji. Uzorak meda se titrira otopinom natrijevog hidroksida koncentracije 0,1 mol/L, uz dodatak fenolftaleina kao indikatora. Titracija se nastavlja sve dok med ne poprimi blago ružičastu boju, što označava završetak procesa (IHC, 2009).

Reagensi

1. 1%-na otopina fenolftaleina (m/V) u etanolu, neutralizirana
2. Otopina natrijeva hidroksida c (NaOH)=0,1 mol/L (bez karbonata), Gram – mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
3. Destilirana voda bez CO₂ dobivena kuhanjem, a zatim ohlađena

Aparatura i pribor:

1. Erlenmeyerova tikvica volumena 100 mL

2. staklena menzura volumena 100 mL
3. čašice za odvagu meda
4. bireta
5. stakleni štapić
6. tehnička vaga tip ET 1111, Tehtnica, Železniki

Postupak

Treba izvagati 10 g uzorka i otopiti ga u 75 mL deionizirane vode, nakon čega se započinje s titracijom. Prvo se dodaje 4 do 5 kapi fenolftaleina, a zatim se natrijevim hidroksidom titrira sve dok ne dođe do promjene boje (International Honey Commission, 2009).

Račun

Ukupna kiselost se računa prema formuli:

$$\text{Kiselost} = 10 \times V$$

gdje je: V – broj potrošenih mL 0,1 mol (NaOH)/L potreban za neutralizaciju 10 g meda.

3.2.4. Određivanje električne provodnosti meda

Princip

Električna provodnost meda mjeri se konduktometrom. Temelji se na mjerenju električne otpornosti koja je obrnuto proporcionalna provodnosti.

Aparatura i pribor:

1. staklene laboratorijske čaše volumena 100 mL
2. plastične čašice za odvagu uzorka
3. odmjerne tikvice volumena 100 mL
4. stakleni štapić
5. konduktometar Mettler – Toledo 8603, Mettler – Toledo GmbH (Schwerzenbach, Švicarska)
6. tehnička vaga ET 1111, Tehtnica, Železniki

Postupak

Za pripremu uzoraka za mjerenje, potrebno je 20 g meda otopiti u destiliranoj vodi, prenijeti u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Ova 20 %-tna otopina se zatim prebacuje u stakleni spremnik od 40 mL, u koji se stavlja elektroda konduktometra. Nakon svakog mjerenja, elektroda se ispiru destiliranom vodom i briše.

Mjerenja se provode pri konstantnoj temperaturi od 20 °C. Ako temperatura odstupa od ove vrijednosti, potrebno je izvršiti korekcije: za temperaturu iznad 20 °C, od vrijednosti se oduzima 3,2 % za svaki °C iznad, dok se za temperaturu ispod 20 °C dodaje 3,2 % za svaki °C ispod (International Honey Commission, 2009).

Račun

Električna provodnost se izračunava prema sljedećoj formuli $SH = K \times G$

gdje je:

SH – električna otpornost meda u mS/cm

K – konstanta elektrode u cm⁻¹

G – provodnost u mS

Rezultati se prikazuju s točnošću 10⁻² mS/cm

3.2.5. Određivanje udjela hidroksimetilfurfurala u medu

Princip

Za određivanje udjela hidroksimetilfurfurala (HMF) u medu koristi se nekoliko metoda, no u ovom radu koristi se Winklerova metoda. Alikvotni dio otopine meda, zajedno s otopinama p-toluidina i barbiturne kiseline, se međusobno pomiješaju. Nakon što reakcija završi, intenzitet obojenja se spektrofotometrijski mjeri na 550 nm, a uspoređuje se s kontrolnim uzorkom (International Honey Commission, 2009).

Aparatura i pribor:

1. spektrofotometar UV-1280, Shimadzu (Kyoto, Japan)
2. analitička vaga, osjetljivost ± 0,0001 g, tip Shimadzu AX200 (Kyoto, Japan)
3. kivete promjera 1 cm
4. odmjerne tikvice od 50 i 100 mL
5. stalak za epruvete
6. staklene epruvete
7. staklena laboratorijska čaša od 50 mL
8. Erlenmeyerove tikvice

Reagensi i postupak

1. Otopina p-toluidina

Nakon što se precizno izmjeri 10,0 grama p-toluidina, tvar se otopi zagrijavanjem u vodenoj kupelji u 50 mL 2-propanola. Otopina se potom prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, doda nekoliko mililitara 2-propanola i 10 mL ledene octene kiseline. Otopina se hladi na sobnoj

temperaturi, a zatim se tikvica dopunjava 2-propanolom do označene linije. Prije upotrebe, otopina treba stajati najmanje 24 sata na tamnom mjestu. Otopina se baca nakon tri dana, ili ranije ako se pojavi nepoželjno obojenje.

2. Otopina barbiturne kiseline

500 mg barbiturne kiseline prenosi se u odmjernu tikvicu od 100 mL i dodaje se 70 mL vode. Smjesa se polako otapa zagrijavanjem tikvice u vodenoj kupelji dok je tikvica začepljena. Nakon što se otopina ohladi na sobnoj temperaturi, tikvica se dopunjava deioniziranom vodom do označene linije.

3. Carrezova otopina I

Izvaže se 15 grama kalij heksacijanoferata (II) i otopi se u 100 mL deionizirane vode.

4. Carrezova otopina II

Izvaže se 30 grama cink acetata i otopi se u 100 mL deionizirane vode.

Postupak

Za pripremu uzoraka, potrebno je izvagati 10,0 grama meda, otopiti ga u 20 mL vode, a zatim kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 50 mL uz pomoć staklenog štapića. U tikvicu se dodaje 1,0 mL Carrezove otopine I, dobro promiješa, zatim se dodaje 1,0 mL Carrezove otopine II i ponovno promiješa. Nakon toga, tikvica se dopunjava destiliranom vodom do oznake i ponovo promiješa.

Kako bi se spriječilo stvaranje pjene, dodaje se nekoliko kapi etanola. Otopina se zatim filtrira kroz filter papir, pri čemu se prvih 10 mL filtrata odbacuje, a ostatak filtrata koristi se za neposredne analize. Ako su uzorci vrlo bistri, Carrezove otopine možda neće biti potrebne za pročišćavanje.

Iz uzorka otopine pipetira se po 2,0 mL u dvije epruvete. U obje epruvete dodaje se 5,0 mL p-toluidinske otopine. U jednu epruvetu se dodaje 1 mL vode (za kontrolni uzorak), dok se u drugu dodaje 1 mL otopine barbiturne kiseline, uz miješanje. Dodavanje reagensa treba biti kontinuirano i trajati 1 do 2 minute. Kada intenzitet boje dostigne maksimum, što se događa nakon 3–4 minute, apsorbancija se mjeri na 550 nm u kiveti promjera 1 cm (International Honey Commission, 2009).

Račun

$$\text{HMF} = (192 \times A \times 10)/m$$

pri čemu je:

A - apsorbancija

192 - faktor razrjeđivanja i koeficijent ekstinkcije

m - masa meda (g)

3.2.6. Određivanje udjela reducirajućih šećera u medu

Princip

Određivanje udjela reducirajućih šećera u medu temelji se na reakciji redukcije Fehlingove otopine, pri čemu se koristi otopina reduciranih šećera iz meda. Metilensko plavo koristi se kao indikator u ovom postupku titracije (International Honey Commission, 2009).

Aparatura i pribor:

1. analitička vaga, osjetljivost $\pm 0,0001$ g, tip Shimadzu AX200 (Kyoto, Japan)
2. laboratorijske čaše, 100 i 250 mL
3. bireta
4. menzura, 100 mL
5. stakleni filter
6. stakleni lijevci
7. porculanski filter
8. Erlenmeyerove tikvice, 100 i 200 mL
9. odmjerne tikvice, 100 i 300 mL
10. plamenik
11. eksikator
12. azbestna mrežica
13. vodena kupelj, Inko Zagreb
14. zračna sušnica tip ST – 01/02, Instrumentaria Zagreb

Reagensi

1. Fehlingova otopina

Otopina A: Izvaži se 69,28 g bakrenog sulfata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) i doda se destilirana voda do jedne litre. Otopinu je potrebno pripremi 24 sata prije titracije.

Otopina B: Izvaži se 346 g kalij-natrijeva tartarata ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$) i 100 g natrijeva hidroksida (NaOH) i otopi se u litri destilirane vode. Otopina se nakon toga filtrira.

2. Standardna otopina invertnog šećera (10 g/L vode)

Kako bi se pripremila standardna otopina, potrebno je izvagati 9,5 g čiste saharoze. 5 mL klorovodične kiseline (oko 36,5 %) pomiješa se s saharozom i nadopuni destiliranom vodom do ukupnog volumena od 100 mL. Otopinu je potrebno ostaviti da stoji nekoliko dana, ovisno o temperaturi: ako se nalazi na $12\text{ }^\circ\text{C}$ do $15\text{ }^\circ\text{C}$, može stajati do sedam dana, dok je za temperaturu od $20\text{ }^\circ\text{C}$ do $25\text{ }^\circ\text{C}$ potrebno 18 dana.

Nakon što je otopina stajala potrebno vrijeme, nadopunjuje se vodom do ukupnog volumena od 1 litre. Ogovarajuća količina otopine neutralizira se s 1 mol/L otopinom NaOH, a zatim se razrijedi na koncentraciju od 2 g/L, čime se dobiva standardna otopina.

3. Otopina metilenskog modrog bojila

Prvo je potrebno 2 g metilenskog modrog bojila otopiti u destiliranoj vodi, a zatim razrijediti vodom do jedne litre.

4. Stipsa (alaun)

Potrebno je pripremiti hladno zasićenu otopinu $[K_2SO_4 \cdot Al_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O]$ u vodi. Uz stalno miješanje staklenim štapićem, dodaje se amonijev hidroksid dok otopina ne postane alkalna, što se provjerava pomoću lakmus papira. Nakon toga, otopina se ostavi da se slegne, a zatim se ispire vodom, dekantirajući dok voda ne pokazuje samo blago pozitivne rezultate na test za sulfate, koji se provjerava s otopinom barijeva klorida. Višak vode se odstranjuje, a preostala pasta se pohranjuje u bocu s brušenim zatvaračem.

Postupak

Nakon što se izvaže 2 g homogeniziranoga meda (W2), prenese se pomoću staklenog štapića u odmjerenu tikvicu volumena 200 mL i otopi u vodi, a tikvica se dopuni vodom do oznake.

50 mL otopine meda otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i doda joj se destilirane vode kako bi dobili razrijeđenu otopinu meda.

Standardizacija Fehlingove otopine

Otpipetira se 5 mL Fehlingove otopine A i pomiješa s 5 mL Fehlingove otopine B. Otopina mora potpuno reagirati s 0,050 g invertnog šećera koji je dodan u količini od 25 mL kao standardna otopina invertnog šećera (2 g/L).

Određivanje

Za pripremu uzorka, pipetom se odmjeri 5 mL Fehlingove otopine A i prenese u Erlenmeyerovu tikvicu zapremine 250 mL. Zatim se doda 5 mL Fehlingove otopine B, a zatim se ulije (25 mL - "X mL") destilirane vode i dodaje malo plovućca. Razrijeđena otopina meda dodaje se iz birete, sve dok ne ostane približno 1,5 mL manje od početne količine ("X mL" - 1,5 mL). Smjesa se zatim zagrijava do vrenja i održava na toj temperaturi dvije minute. Tijekom vrenja, dodaje se 1,0 mL 0,2 %-tne otopine metilenskog modrog bojila. Titracija se završava dodavanjem razrijeđene otopine meda dok indikatorska boja ne nestane, a cijeli postupak treba biti završen unutar tri minute. Količina potrošene razrijeđene otopine meda bilježi se kao "Y mL" (International Honey Commission, 2009).

Račun

Invertni šećer izračunava se u g /100 g prema formuli:

$$C = 2/W \times 1000/Y$$

gdje je:

C – invertni šećer u g

W – masa uzetog uzorka u g

Y – volumen razrijeđene otopine meda potrošenog za određivanje u mL

3.2.7. Određivanje udjela saharoze u medu

Princip

Metoda za određivanje sadržaja saharoze u medu oslanja se na hidrolizu saharoze, nakon čega se provodi titracija Fehlingove otopine reducirajućim šećerima prisutnim u medu, pri čemu se koristi metilensko plavo kao indikator (International Honey Commission, 2009).

Reagensi

1. standardna otopina invertnog šećera, utvrđena metodom određivanja reduciranih šećera
2. Fehlingova otopina (A i B), utvrđena metodom određivanja reduciranih šećera
3. otopina natrijeva hidroksida $c(\text{NaOH}) = 5 \text{ mol/L}$, Gram – mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
4. klorovodična kiselina $c(\text{HCl}) = 6,34 \text{ mol/L}$, CARLO ERBA Reagents S.A.S. (Val- de-Reuil, Francuska)
5. 2 %-na otopina metilenskog modrog bojila (2 g/L), Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

Priprema uzorka

Nakon što se izvaže 2 g homogeniziranog meda, prenese se u odmjernu tikvicu i otopi u destiliranoj vodi, a tikvicu je potrebno nadopuniti vodom do volumena 200 mL.

Hidroliza uzorka

Otopina meda (50 mL) se prenosi u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, nakon čega se dodaje 25 mL destilirane vode. U pripremljeni uzorak se uranja toplomjer, a zatim se zagrijava na 65 °C u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon zagrijavanja, tikvica se uklanja iz kupelji i dodaje se 10 mL klorovodične kiseline [$c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/L}$]. Otopina se hladi 15 minuta, zatim se temperatura prilagođava na 20 °C i otopina se neutralizira s 5 mol/L otopinom NaOH, koristeći lakmus papir kao indikator. Nakon što se otopina ponovo ohladi na 20 °C, tikvica se dopunjava vodom do ukupnog volumena od 100 mL, čime se dobiva razrijeđena otopina meda.

Određivanje

Određivanje se provodi na sličan način kao i analiza reducirajućih šećera, uključujući prethodnu titraciju i postupak mjerenja količine invertnog šećera prije inverzije.

Račun

Obračunava se postotak invertnog šećera nakon inverzije, pri čemu se primjenjuje formula za određivanje postotka invertnog šećera prije inverzije.

Saharoza se iskazuje u g/100 g meda i izračunava prema formuli:

Maseni udio saharoze [g/100 g] = (količina invertnog šećera nakon inverzije - količina invertnog šećera prije inverzije) x 0,95

4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu 19. Međunarodnog natjecanja pčelara u kvaliteti meda - Zzzagimed 2023. analizirana su fizikalno-kemijska svojstva 34 uzorka cvjetnog meda i 27 uzoraka livadnog meda.

Tablice 1 i 2 prikazuju dobivene vrijednosti fizikalno kemijskih parametara cvjetnog i livadnog meda (maseni udio vode, kiselost, električna provodnost, maseni udio saharoze, maseni udio reducirajućih šećera i maseni udio HMF). Tablice također prikazuju i zahtjeve Pravilnika o medu kako bi se usporedile vrijednosti.

Slike 3,4,5,6,7, i 8 prikazuju usporedbu rezultata za svaki od navedenih parametara. Za statističku obradu dobivenih podataka korišten je program Microsoft Excel.

Tablica 1. Rezultati fizikalno-kemijske analize cvjetnog meda

Uzorak	Maseni udio vode (%)	Kiselost (mmol/kg)	Električna provodnost (mS/cm)	Maseni udio reducirajućih šećera (%)	Maseni udio saharoze (%)	Maseni udio HMF (mg/kg)
11.	17,32	13,00	0,283	62,08	2,30	1,31
13.	18,6	13,00	0,475	68,20	3,25	1,74
25.	17,28	18,00	0,214	75,29	1,51	2,24
32.	18,04	16,00	0,721	70,98	1,56	2,08
33.	18,56	27,00	0,742	77,26	1,08	0,40
35.	18,56	24,00	0,322	72,52	1,49	1,70
37.	15,57	24,00	0,194	71,95	1,78	1,46
42.	16,04	19,00	0,441	66,79	1,66	1,02
46.	17,28	19,00	0,186	74,42	1,48	2,14
50.	17,6	19,00	0,223	72,77	1,57	1,09
55.	18,6	24,00	0,699	70,05	1,96	2,32
60.	18,24	35,00	0,439	68,88	0,98	9,97
66.	17,32	18,00	0,181	74,81	1,89	4,41
68.	18,24	37,00	0,389	72,52	1,07	0,24
69.	16,32	15,00	0,288	71,16	2,72	0,73
70.	16,6	26,00	0,499	67,39	2,24	1,72
73.	17,52	17,00	0,692	72,03	1,86	0,25
81.	16,08	20,00	0,578	73,77	2,48	1,56
86.	17,16	25,00	0,676	72,98	1,40	1,45
88.	15,53	18,00	0,191	74,49	2,02	4,59
96.	19,6	37,00	0,425	72,80	0,86	1,37
100.	16,83	15,00	0,608	71,37	2,47	0,71
106.	18,24	20,00	0,419	72,83	1,94	2,93

Tablica 1. Rezultati fizikalno-kemijske analize cvjetnog meda - nastavak

Uzorak	Maseni udio vode (%)	Kiselost (mmol/kg)	Električna provodnost (mS/cm)	Maseni udio reducirajućih šećera (%)	Maseni udio saharoze (%)	Maseni udio HMF (mg/kg)
107.	17,44	26,00	0,797	71,13	1,64	3,17
110.	16,6	24,00	0,259	75,36	1,81	4,47
120.	18,32	29,00	0,748	69,77	1,86	3,26
125.	16,8	14,00	0,203	68,85	2,80	1,92
132.	16,87	24,00	0,315	73,89	1,59	2,80
133.	17,48	23,00	0,786	73,30	1,58	0,88
136.	17,52	17,00	0,621	67,30	2,19	0,79
138.	19,32	21,00	0,380	66,91	1,54	1,13
140.	17,88	15,00	0,539	77,92	2,35	0,62
146.	15,16	17,00	0,834	65,13	2,59	16,62
Prosječna vrijednost	17,40	21,48	0,46	71,42	1,86	2,51
Zahtjevi pravilnika	<20	<50	<0,8	>60	<5	<40

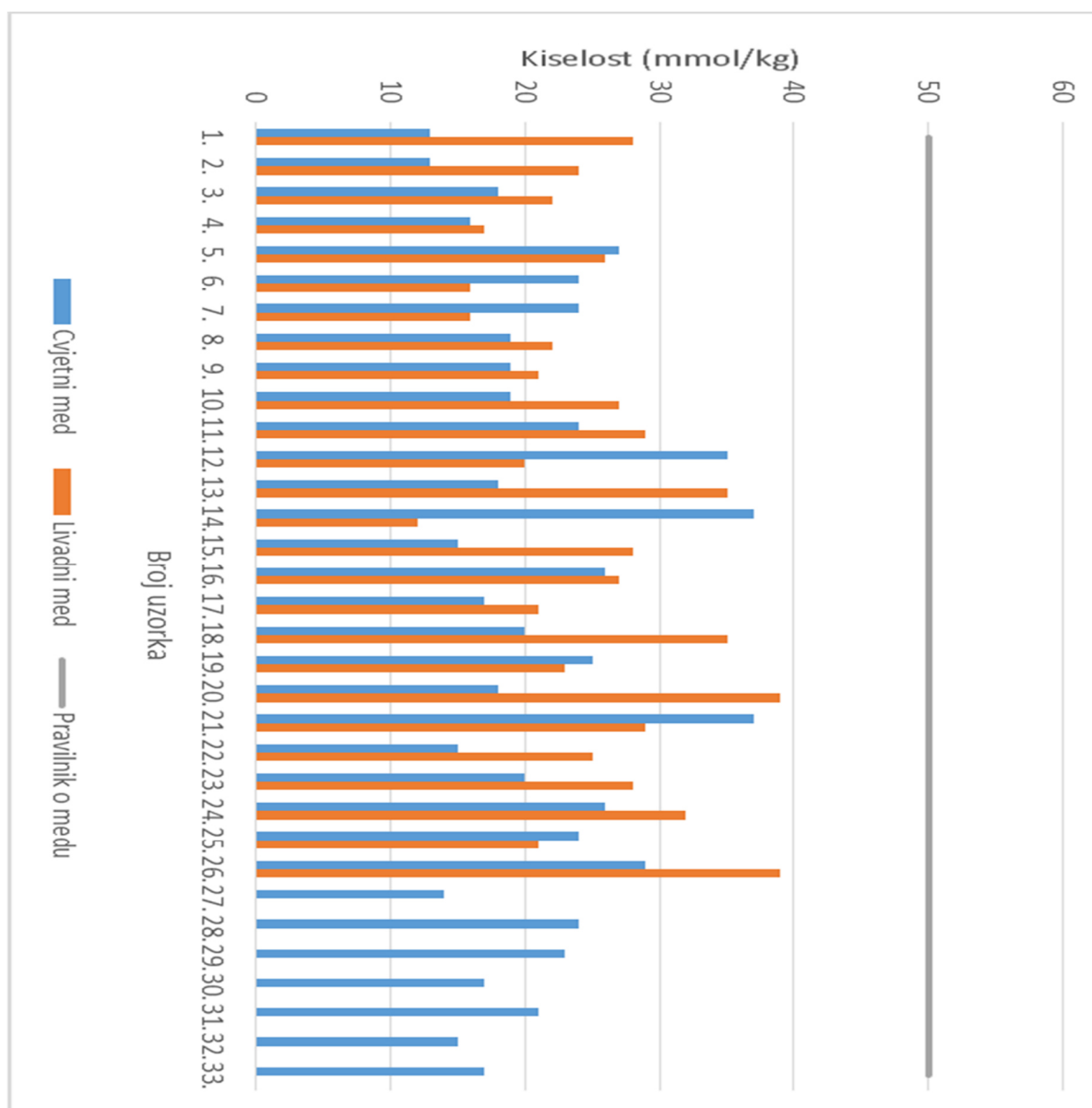
Tablica 2. Rezultati fizikalno-kemijske analize livadnog meda

Uzorak	Maseni udio vode (%)	Kiselost (mmol/kg)	Električna provodnost (mS/cm)	Maseni udio reducirajućih šećera (%)	Maseni udio saharoze (%)	Maseni udio HMF (mg/kg)
4.	18,44	28,00	0,625	71,13	1,04	1,38
18.	16,6	24,00	0,655	50,26	1,90	0,77
22.	17,24	22,00	0,484	70,84	1,72	1,59
23.	17,44	17,00	0,441	71,81	1,92	1,08
29.	17,32	26,00	0,446	73,28	0,89	7,82
38.	16,83	16,00	0,170	73,16	1,50	2,88
43.	16,8	16,00	0,213	70,71	1,81	2,13
53.	18,64	22,00	0,506	72,22	1,81	1,91
61.	15,72	21,00	0,735	64,14	1,98	0,96
71.	19,04	27,00	0,467	74,27	1,23	0,17
72.	16,72	29,00	0,523	67,65	2,21	3,52
85.	17,28	20,00	0,558	74,29	0,95	2,62
90.	16,97	35,00	0,696	72,80	1,51	2,48
91.	15,76	12,00	0,577	69,03	2,20	1,51
92.	17,64	28,00	0,865	76,28	1,53	1,06
108.	17,32	27,00	0,429	72,48	1,46	2,84
109.	16,08	21,00	0,200	75,92	1,59	2,00
116.	17,52	35,00	0,475	73,30	1,17	2,41
117.	16,83	23,00	0,215	76,27	1,17	2,59
121.	18,6	39,00	0,421	73,80	0,92	2,92
124.	16,6	29,00	0,497	74,43	1,59	5,44
130.	17,24	25,00	0,749	70,74	1,50	0,97
139.	17,68	28,00	0,344	71,63	1,72	5,05
141.	18,52	32,00	0,770	73,38	1,50	1,07
142.	17,56	21,00	0,482	73,82	2,10	1,41
143.	17,52	39,00	0,635	78,73	0,30	3,33
Prosječna vrijednost	17,30	25,46	0,50	71,78	1,50	2,38
Zahtjevi pravilnika	<20	<50	<0,8	>60	<5	<40



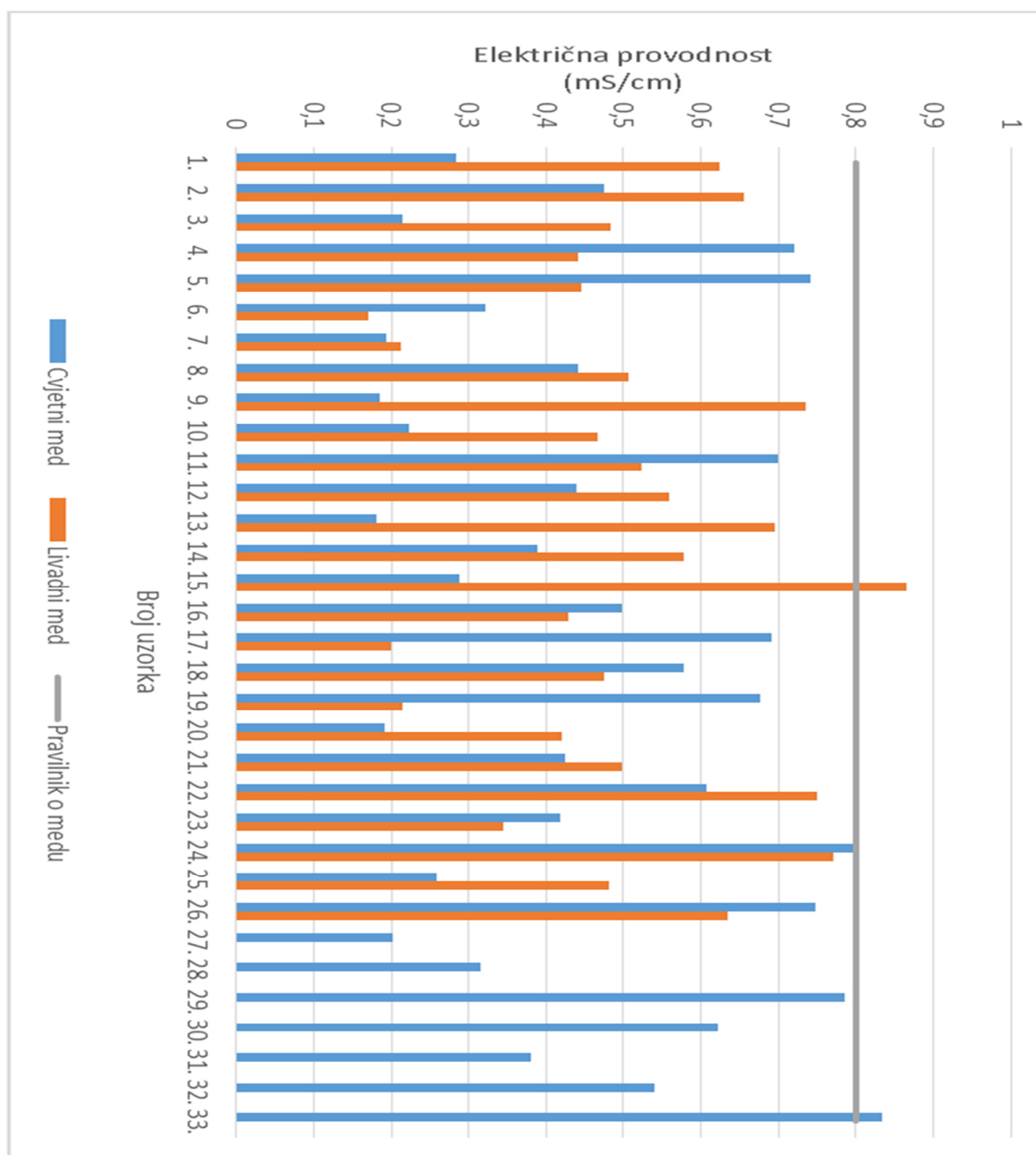
Slika 3. Usporedba zahtjeva iz Pravilnika o medu s izmjerenim vrijednostima masenog udjela vode (%) u livadnom i cvjetnom medu

Prema podacima prikazanim na slici 3, maseni udio vode u analiziranim uzorcima cvjetnog meda varira između 15,16 % i 19,60 %, s prosjekom od 17,40 %, dok u livadnom medu varira od 15,72 % do 19,04 %, s prosječnom vrijednošću od 17,30 %. Prema Pravilniku, maseni udio vode ne smije prelaziti 20 %, što znači da oba tipa meda ispunjavaju ovaj zahtjev. Povećani udio vode može biti rezultat nedovoljne zrelosti meda ili nepravilnog skladištenja, s obzirom na to da med lako upija vlagu.



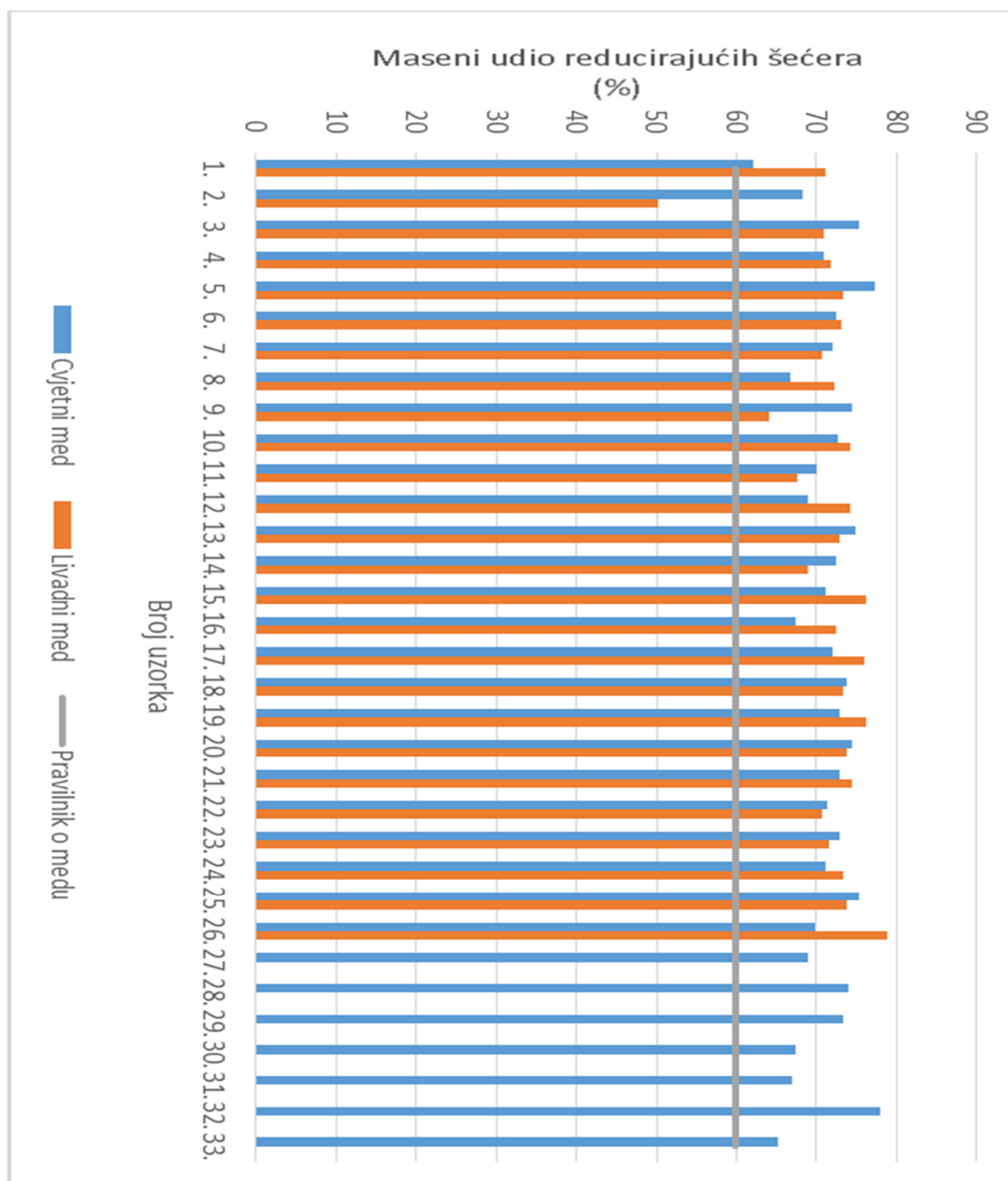
Slika 4. Usporedba zahtjeva iz Pravilnika o medu s izmjerenim vrijednostima kiselosti u livadnom i cvjetnom medu

Prosječna kiselost cvjetnog meda u analiziranim uzorcima iznosi 21,48 mmol/kg, s rasponom između 13 mmol/kg i 37 mmol/kg, dok je prosječna kiselost livadnog meda 25,46 mmol/kg, s rasponom od 12 mmol/kg do 39 mmol/kg, kako je prikazano na slici 4. Svi uzorci su u skladu s propisima koji dopuštaju da kiselost cvjetnog i livadnog meda ne prelazi 50 mmol/kg. Kiselost meda utječe na njegova fizikalna, kemijska i senzorska svojstva, a posebno je važna za mikrobiološku stabilnost meda. Niska pH vrijednost meda, koja se kreće između 3,2 i 6,5, pomaže u inhibiranju rasta mnogih mikroorganizama, čime se povećavaju antimikrobna svojstva meda (Vahčić i Matković, 2009). Također, prirodna kiselost meda može se povećati tijekom vremena skladištenja i dozrijevanja, kao i tijekom fermentacije zbog tvorbe octene kiseline. Kiselost može poslužiti kao jedan od indikatora moguće patvorenja meda.



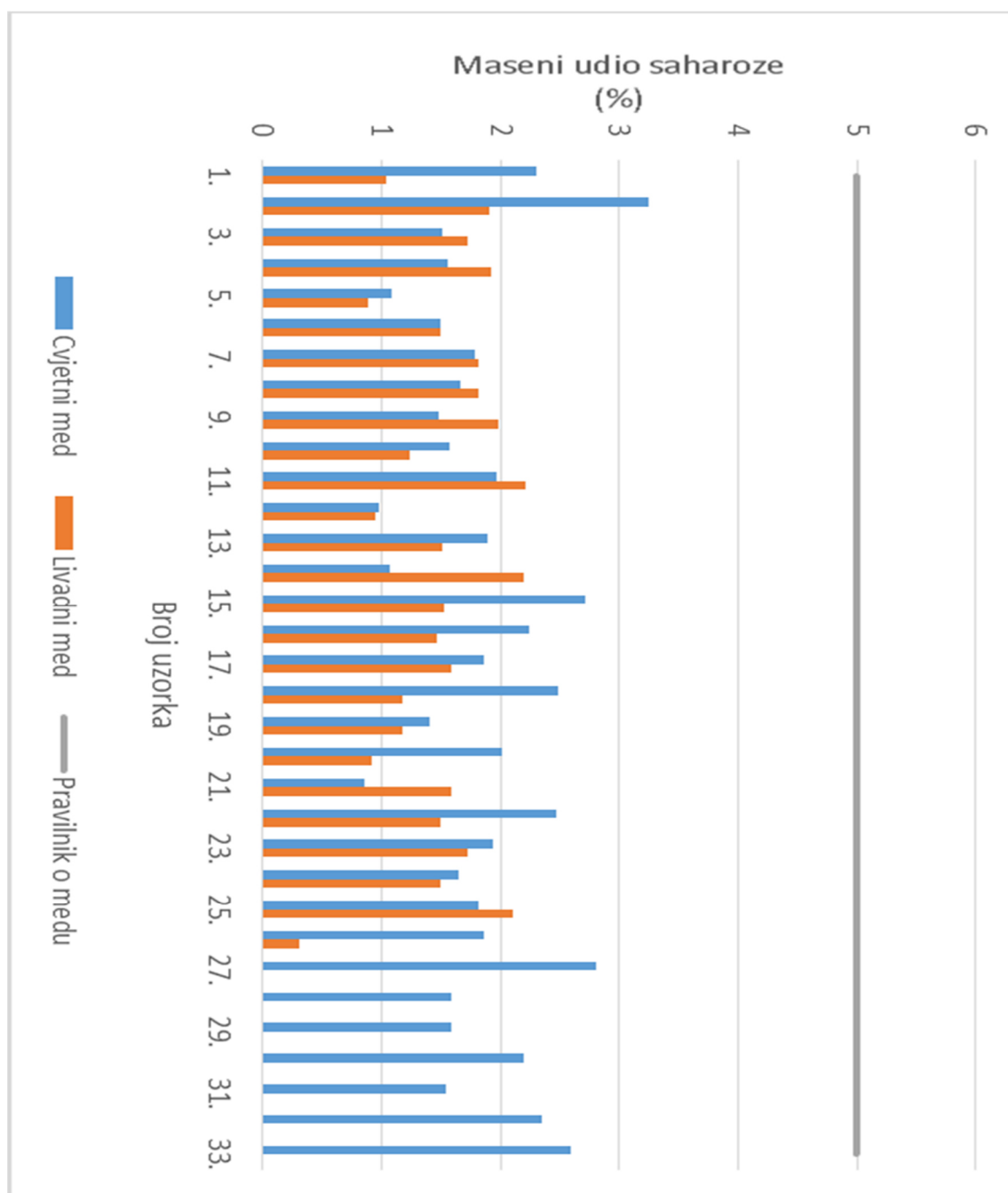
Slika 5. Usporedba zahtjeva iz Pravilnika o medu s izmjerenim vrijednostima električne provodnosti u livadnom i cvjetnom medu

Slika 5 prikazuje prosječnu vrijednost električne provodnosti cvjetnog meda koja iznosi 0,46 mS/cm, s rasponom od 0,181 mS/cm do 0,834 mS/cm. U livadnom medu prosječna vrijednost je također 0,46 mS/cm, s najmanjom izmjerenom vrijednošću od 0,170 mS/cm i najvećom od 0,865 mS/cm. Prema Pravilniku, električna provodnost cvjetnih i livadnih medova mora biti manja od 0,8 mS/cm. Na temelju rezultata, uzorci pod brojevima 146 i 92 ne zadovoljavaju ovaj zahtjev. Razlog povećane električne provodnosti meda može biti povišen maseni udio mineralnih tvari i kiselina, odnosno došlo je do miješanja sa šumskim medom.



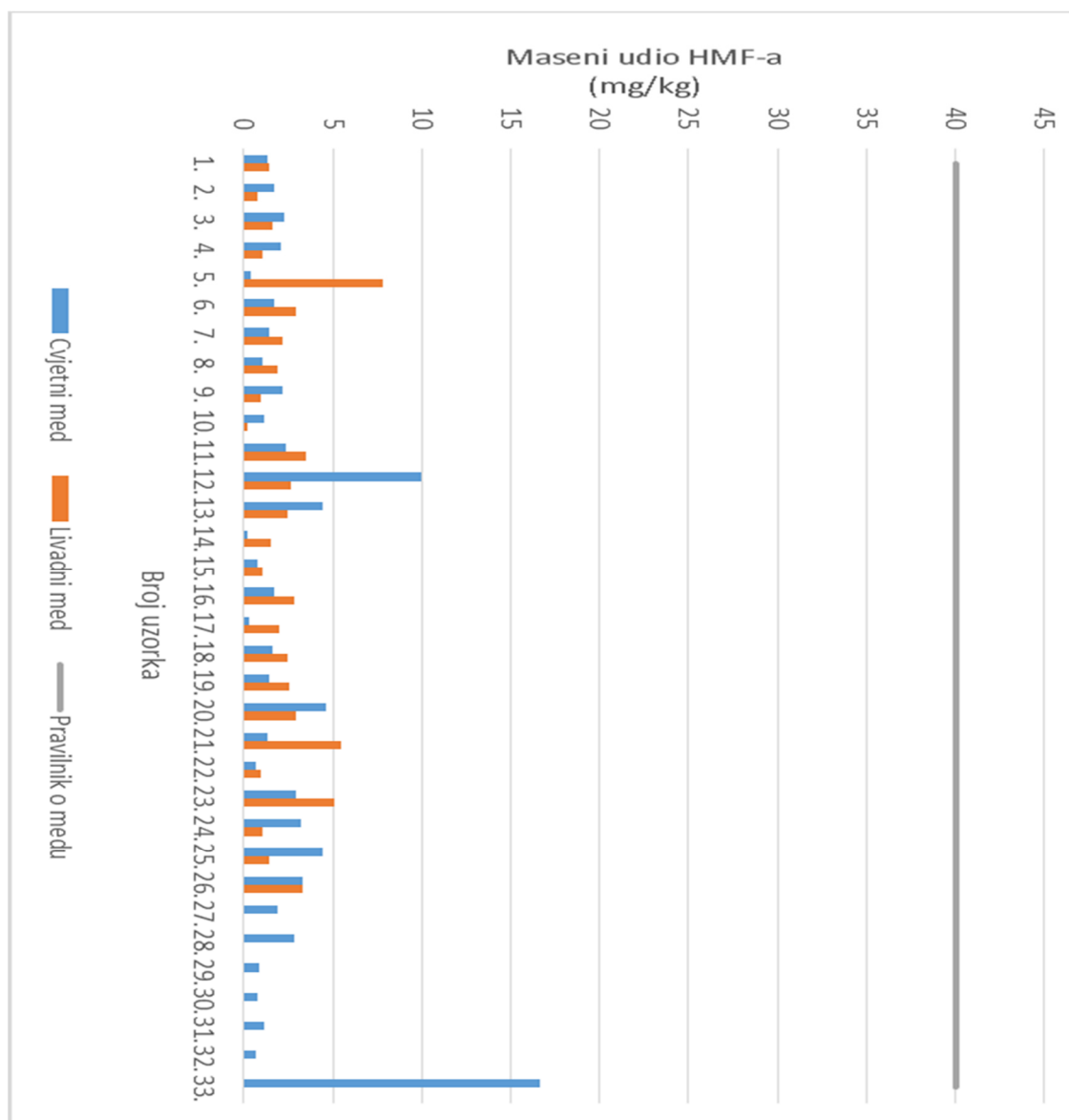
Slika 6. Usporedba zahtjeva iz Pravilnika o medu s izmjerenim vrijednostima masenog udjela reducirajućih šećera (%) u livadnom i cvjetnom medu

U ispitivanim uzorcima cvjetnog meda koji su prikazani na slici 6 maseni udio reducirajućih šećera kreće se od 62,08 % do 77,92 %, s prosječnom vrijednošću od 71,42 %. U uzorcima livadnog meda maseni udio reducirajućih šećera varira od 50,26 % do 78,73 %, s prosječnom vrijednošću od 71,78 %. Pravilnik o medu zahtijeva minimalnu vrijednost od 60,00 %, a na osnovu rezultata vidljivo je da uzorak pod brojem 18 ne ispunjava ovaj kriterij.



Slika 7. Usporedba zahtjeva iz Pravilnika o medu s izmjerenim vrijednostima masenog udjela saharaže (%) u livadnom i cvjetnom medu

Slika 7 prikazuje da prosječan udio saharaže u cvjetnom medu iznosi 1,86 %, s rasponom od 0,86 % u medu s najmanjim udjelom do 3,25 % u medu s najvećim udjelom saharaže. U livadnom medu udio saharaže varira od 0,30 % do 2,21 %, s prosječnom vrijednošću od 1,50 %. Prema Pravilniku o medu, udio saharaže mora biti manji od 5 %, a prema dobivenim rezultatima, svi uzorci zadovoljavaju ovaj kriterij. Veći udio saharaže mogao bi ukazivati na patvorenje meda.



Slika 8. Usporedba zahtjeva iz Pravilnika o medu s izmjerenim vrijednostima masenog udjela HMF-a (mg/kg) u livadnom i cvjetnom medu

Maseni udio hidrosimetilfurfurala (HMF) u cvjetnom medu, kako prikazuje slika 8, varira od 0,24 mg/kg do 16,62 mg/kg, dok u livadnom medu iznosi od 0,17 mg/kg do 7,82 mg/kg. Prosječna koncentracija HMF-a je 2,51 mg/kg za cvjetni med i 2,38 mg/kg za livadni med. Svi analizirani uzorci iz oba tipa meda ispunjavaju regulativne zahtjeve, prema kojima maksimalna dopuštena koncentracija HMF-a ne smije prelaziti 40 mg/kg.

Koncentracija HMF-a u medu ovisi o vrsti meda, udjelu slobodnih kiselina, pH vrijednosti, sadržaju vode, te izloženosti povišenim temperaturama i svjetlosti. HMF je ključni pokazatelj kvalitete meda, pri čemu je poželjno da je njegova količina minimalna ili da je odsutan u potpunosti. Visoke koncentracije HMF-a često ukazuju na nepravilno ili predugo skladištenje, jer se razina HMF-a povećava s vremenom i pri čuvanju meda na povišenim temperaturama.

Tablica 3. Razlika u pojedinim fizikalno-kemijskim parametrima

Parametri	p-vrijednost
Maseni udio vode (%)	0,683
Kiselost (mmol/kg)	0,025
Električna provodnost (mS/cm)	0,436
Maseni udio reducirajućih šećera (%)	0,752
Maseni udio saharoze (%)	0,010
Maseni udio HMF-a (mg/kg)	0,841

Za prikaz rezultata u tablici 3 korištena je jednostruka analiza varijance pomoću Microsoft Excel programa te nam p-vrijednost pokazuje ima li razlike između cvjetnog i livadnog meda za svaki od navedenih parametara. Na osnovu dobivenih rezultata vidljivo je da između cvjetnog i livadnog meda nema statistički značajne razlike u udjelu vode, električne provodnosti, udjelu reducirajućih šećera, udjelu HMF-a, odnosno postoje razlike kada je u pitanju kiselost i udio saharoze.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu istraživanja koje je u kojem su analizirana fizikalno-kemijska svojstva 34 uzorka cvjetnog meda i 27 uzoraka livadnog meda s 19. Međunarodnog natjecanja pčelara u kvaliteti meda - Zzzagimed 2023, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Svi uzorci udovoljavaju Pravilniku u pogledu masenog udjela vode, a on nalaže da ne smije biti veći od 20 %.

2. Električna provodnost ne bi smjela biti veća od 0,8 mS/cm, no dva uzorka su premašila tu vrijednost, što može biti posljedica prisutnosti medljike, koja povećava udio mineralnih tvari, a time i električnu provodnost. Ostali analizirani uzorci zadovoljili su ovaj kriterij Pravilnika.

3. Kiselost je u svim uzorcima bila unutar granica propisanih Pravilnikom, koji dozvoljava maksimalno 50 mmol/kg.

4. Jedan uzorak imao je manji udio reducirajućih šećera od propisanih 60 grama.

5. Svi uzorci zadovoljili su propisani maksimum do 5 % za maseni udio saharoze. Također, maseni udio hidroksimetilfurfurala u svim uzorcima bio je unutar granica propisanih Pravilnikom, s vrijednostima ispod 40 mg/kg.

6. Dobiveni rezultati fizikalno-kemijskih analiza provedenih na cvjetnom i livadnom medu u skladu su s Pravilnikom i drugim istraživanjima.

6. LITERATURA

Assil H, Sterling R, Sporns P (1991) Crystal control in processed liquid honey, *Journal of Food Science*, **56**, 1034-1041. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb14635.x>.

Batinić K, Palinić D (2014) Priručnik o medu, Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru, Mostar.

Bogdanov S, Martin P (2002) *Honey authenticity: a Review*. Swiss Bee Research Centre, 1-20. <https://doi.org/10.1039%2Fd1ra00069a>

Chirife J, Zamora MC, Motto A (2006) The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys, *Journal of Food Engineering*, **72**, 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.009>.

Fakhlai R, Selamat J, Khatib A, Razis AFA, Sukor R, Ahmad S, i sur. (2020) The Toxic Impact of Honey Adulteration: A Review. *Foods* **9**, 1538. <https://doi.org/10.3390/foods9111538>

González FM, Espada-Bellido E, Guillén-Cueto L, Palma M, Barroso CG, Barbero GF (2018) Rapid quantification of honey adulteration by visible-near infrared spectroscopy combined with chemometrics, *Talanta*, **188**, 288-292. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.095>

IHC (2009) *Harmonised methods of the International Honey Commission*. <http://www.ihc-platform.net> Pristupljeno 16. srpnja 2024.

Jaafar M, Othman M, Yaacob M, Talip B, Ilyas M, Ngajikin N, Fauzi N (2020) A Review on Honey Adulteration and the Available Detection Approaches, *International Journal of Integrated Engineering*, **12**, 125-131. <https://doi.org/10.30880/ijie.00.00.0000.00.0000>

Kezić N, Bubalo D, Grgić Z, Dražić M, Barišić D, Filipi J i sur. (2013) *Konvencionalno i ekološko pčelarenje*. Interna skripta, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, str. 130-157.

Kapš P (2013) *Liječenje pčelinjim proizvodima Apiterapija*, Geromar, Udruga Dobar život, Zagreb.

Laktić Z, Šukelja D (2008) *Suvremeno pčelarstvo*, Nakladni zavod Globus, Zagreb.

Mahmoudi R, Ghoghghi A, Ghajarbeygi P (2016) Honey safety hazards and public health, *Journal of Chemical Health Risks*, **6**, 249-267.

Markowicz Bastos D, Monaro E, Siguemoto E, Séfora M (2012) Maillard Reaction Products in Processed Food: Pros and Cons. U: Valdez B (ured.) . *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*, IntechOpen, str. 288.

- Moreira RF, Maria CA, Pietroluongo M, Trugo LC (2007) Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions, *Food Chemistry*, **104**, 1236-1241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.055>
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo L, Nacoulma OG (2005) Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radicals scavenging activity, *Food Chemistry*, **91**, 571-577. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>
- Mujić, I i sur. (2014) *Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda*, Studiograf Rijeka, Rijeka.
- Missio da Silva P, Gauche C, Gonzaga LV, Oliveira Costa, AC, Fett R (2016) Honey: chemical composition, stability and authenticity, *Food Chemistry*, **196**, 309-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>.
- Medved I (2021) *Patvorenje meda*. <https://www.agroportal.hr/uzgoj-pcela/36349> Pristupljeno 6. kolovoza 2024.
- Petričko P (2015) *Fizikalno kemijski parametri cvjetnog meda kontinentalne Hrvatske*, Završni rad, Veleučilište u Karlovcu.
- Pravilnik (2015) *Pravilnik o medu*. Narodne novine **53**, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_53_1029.html Pristupljeno 6. kolovoza 2024.
- Relić B (2006) *Pčelarstvo*, Biblioteka Agro-Hit, Bjelovar.
- Singhal RS, Kulkarni PP, Rege DV (1997) *Handbook of indices of food quality*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 358-385.
- Službeni list Europske unije (2018) Mogućnosti i izazovi za pčelarski sektor EU-a, *Rezolucija Europskog parlamenta od 1. ožujka 2018. o mogućnostima i izazovima za pčelarski sektor EU-a (2017/2115(INI))*. <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:52018IP0057&from=EN> Pristupljeno 7. kolovoza 2024.
- Spano N, Casula L, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Scanu R, Tapparo A, Sanna G (2005) An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey, *Talanta*, **68**, 1390-1395. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.003>
- Šarić G, Matković D, Hruškar M, Vahčić N (2008) Characterisation and Classification of Croatian Honey by Physicochemical Parameters, *Food Technology and Biotechnology*, **46**, 355-367.
- Šimić F (1980) *Naše medonosno bilje*, Znanje, Zagreb.

Škenderov S, Ivanov C (1986) *Pčelinji proizvodi i njihovo korišćenje*, Nolit, Beograd.

Vahčić N, Matković D (2009) Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda. <http://www.pcelinjak.hr> Pristupljeno 22. srpnja 2024.

Tura AG, Seboka DB (2019) Review on Honey Adulteration and Detection of Adulterants in Honey, *Journal of Gastroenterology*, **4**, 1-6. <http://dx.doi.org/10.11648/j.ijg.20200401.11>.

Zábrodská B, Vorlová L (2015) Adulteration of honey and available methods for detection – a review, *Acta Veterinaria Brno*, **83**, 85-102. <http://dx.doi.org/10.2754/avb201483S10S85>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Gabrijela Džakula izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis