

# Aminokiselinski profil medljikovaca određen metodom tekućinske kromatografije uz fluorescencijski detektor

---

Tuček, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:533775>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Anita Tuček**

**AMINOKISELINSKI PROFIL MEDLJKOVACA ODREĐEN METODOM  
TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE UZ FLUORESCENCIJSKI DETEKTOR**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, listopad, 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za Ispitivanje hrane i prehrane  
Katedra za kakvoću hrane  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Kontrola kakvoće hrane  
**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 29. lipnja 2022.  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. *Blanka Bilić Rajs*, poslijedoktorand

### Aminokiselinski profil medljikovaca određen metodom tekućinske kromatografije uz fluorescencijski detektor

*Anita Tuček*, 0113145584

**Sažetak:** Medljikovac proizvode pčele od slatkog soka (medne rose ili medljike) kojeg luče biljke ili različite vrste insekata koji žive na bjelogoričnom i crnogoričnom drveću. Imajući u vidu da kemijski sastav meda prvenstveno ovisi o podrijetlu medljike/nektara, u ovom diplomskom radu određen je aminokiselinski sastav medljikovaca kako bi se utvrdile eventualne specifičnosti u udjelima pojedinih aminokiselina ovisno o podrijetlu. Za potrebe dokazivanja botaničkog podrijetla provedena je melisopalinoška i senzorska analiza, a određeni su i odabrani fizikalno-kemijski parametri kvalitete. Od 13 analiziranih uzoraka, 7 medljikovaca je podrijetlom od medljike sa crnogoričnog drveća ili ona prevladava u uzorcima, a 6 uzoraka je podrijetlom od medljike sa bjelogorice. Za određivanje aminokiselina korištena je HPLC metoda uz prethodnu derivatizaciju sa o-ftaldialdehidom (OPA) i 9-fluorenilmetil kloroformatom (FMOC-Cl). Najzastupljenije aminokiseline u medljikovcima su: prolin, fenilalanin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina i cistein. Najmanje zastupljene su histidin, lizin, metionin, triptofan i leucin. Uočava se veći ukupni udio aminokiselina u medljikovcima od bjelogorične medljike u odnosu na medljikovec od crnogorične medljike. Po ukupnim aminokiselinama izdvaja se medljikovac hrasta sladuna sa 734,70 mg/kg dok je ukupni udio aminokiselina u ostalim ispitivanim uzorcima iznosio 114,57 – 378,08 mg/kg.

**Ključne riječi:** medljikovac, botaničko podrijetlo, aminokiseline, HPLC

**Rad sadrži:** 47 stranica  
6 slika  
6 tablica  
0 priloga  
67 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Ljiljana Primorac</i>              | predsjednik   |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i>             | član-mentor   |
| 3. dr. sc. <i>Blanka Bilić Rajs</i> , poslijedoktorand | član          |
| 4. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>                  | zamjena člana |

**Datum obrane:** 20. listopada 2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Food and Nutrition Research  
Subdepartment of Food Quality  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Food Quality Control

**Thesis subject:** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on June 29, 2022

**Mentor:** *Ivana Flanjak*, PhD, associate prof.

**Technical assistance:** *Blanka Bilić Rajs*, PhD, postdoc.

### Amino Acid Profile of Honeydew Honey Determined by Liquid Chromatography with Fluorescence Detector

*Anita Tuček*, 0113145584

**Summary:** Honeydew honey is produced by the honey bees from sweet sap (honeydew) secreted by plants or different types of insects that live on latifoliae and coniferous trees. Specific types of honeydew can be produced without the participation of insects. Bearing in mind that the chemical composition of honey primarily depends on the origin of honeydew/nectar, the aim of this study was to determine the amino acid composition of honeydew in order to determine possible specificities in the proportions of individual amino acids depending on the origin of the honeydew. For the purposes of determination of the botanical origin, a melissopalynological and sensory analysis was carried out, and selected physico-chemical quality parameters were determined. Out of 13 analysed samples, 7 honeydews originate from honeydew from coniferous trees or it predominates in the samples, and 6 samples originate from honeydew from latifoliae trees. The HPLC method with prior derivatization with o-phthalaldehyde (OPA) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) was used for the determination of amino acids. The most abundant amino acids in honeydew are proline, phenylalanine, aspartic acid, glutamic acid and cysteine. The least represented are histidine, lysine, methionine, tryptophan and leucine. A higher total proportion of amino acids is observed in honeydews from latifoliae honeydew compared to honeydews from coniferous honeydew. In terms of total amino acids, the *Quercus frainetto* honeydew honey stands out with 734.70 mg/kg, while the total amino acids content in the other tested samples was 114.57 - 378.08 mg/kg.

**Key words:** honeydew honey, botanical origin, amino acid, HPLC

**Thesis contains:** 47 pages  
6 figures  
6 tables  
0 supplements  
67 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Ljiljana Primorac</i> , PhD, prof.             | chair person |
| 2. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, prof. associate prof. | Supervisor   |
| 3. <i>Blanka Bilić Rajs</i> , PhD, postdoc.          | Member       |
| 4. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof.                 | stand-in     |

**Defense date:** October 20, 2022

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology  
Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Flanjak na pruženoj prilici da obradim ovu temu, na pomoći i savjetima oko obrade rezultata i pisanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se dr. sc. Blanki Bilić Rajs i Katarini Gal, dipl. ing. na radnoj atmosferi i savjetima za vrijeme provedbe eksperimentalnog dijela rada. Također, zaposlenicima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta, asistentima i profesorima koji se potrudili prenijeti svoje znanje u ovih 5 godina studiranja.*

*Hvala mojim roditeljima na pruženoj prilici, potpori i mogućnosti da ovo ostvarim.*

*Posebno hvala kolegicama i posljedično prijateljicama, na svim zajedničkim druženjima koja su olakšala te slatke studentske muke i na bezgraničnoj podršci koju si međusobno pružamo. Mojoj Martini, Tei, Jeleni i posebno Anti, hvala što ste me uvijek saslušali i trpili za vrijeme ispita i kolokvija, što ste me bodrili i vjerovali u mene.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. OPIS I PODJELA MEDA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. SASTAV MEDA</b> .....	<b>5</b>
2.2.1. Ugljikohidrati .....	6
2.2.2. Voda.....	7
2.2.3. Proteini i aminokiseline .....	7
2.2.4. Polifenoli i flavonoidi .....	7
2.2.5. Minerali i vitamini.....	8
2.2.6. Organske kiseline.....	8
2.2.7. Hidroksimetilfurfural (HMF) .....	9
2.2.8. Kontaminanti i mikroorganizmi .....	9
<b>2.3. MEDLIKOVAC</b> .....	<b>9</b>
2.3.1. Medljikovac/medun hrasta sladuna.....	11
2.3.2. Goranski medun .....	12
<b>2.4. AMINOKISELINE</b> .....	<b>13</b>
2.4.1. Aminokiseline u medu .....	16
2.4.2. Analiza aminokiselina u medu .....	17
2.4.2.1. Određivanje sastava i udjela aminokiselina HPLC metodom .....	17
2.4.2.2. Određivanje sastava i udjela aminokiselina GC metodom.....	18
2.4.2.3. Određivanje sastava i udjela aminokiselina elektroforezom .....	19
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>21</b>
3.2.1. Melisopalinološka analiza.....	21

3.2.2. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara .....	22
3.2.2.1. Određivanje udjela vode .....	22
3.2.2.2. Određivanje električne provodnosti.....	23
3.2.2.3. Određivanje aktivnosti dijastaze .....	23
3.2.2.4. Određivanje udjela HMF-a .....	23
3.2.3. Senzorska analiza.....	24
3.2.4. Određivanje aminokiselinskog sastava .....	24
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>27</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>33</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>39</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>41</b>



## Popis oznaka, kratica i simbola

F/G	fruktoza/glukoza
G/V	glukoza/voda
HMF	hidroksimetilfurfural
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. high performance liquid chromatography)
GC	plinska kromatografija (engl. gas chromatography)
FMOC-Cl	9-fluorenilmetil kloroformat
DEEMM	dietil oksimetilen malonat
OPA	<i>orto</i> -ftaldialdehid
AK	aminokiselina

## **1. UVOD**

Med je proizvod kojeg proizvode pčele radilice (*Apis mellifera*) od nektara i/ili medne rose te peludi. Nektar i medna rosa su primarne tvari od kojih se proizvodi pa se prema njima med dijeli na nektarni med i medljikovac. Pčele unose pelud u košnice zbog visokog udjela bjelančevina koja im je važna za izgradnju zajednice, a ono što ne potroše spremaju u saće i zatvaraju sa medom kako bi spriječile kvarenje. Prema udjelu i vrsti peludi koja se nalazi u medu moguće je odrediti botaničko podrijetlo (Šimić, 1980; Vahčić i Matković, 2009; Mujić i sur., 2014). U visokim koncentracijama u medu se nalaze šećeri, a u manjim koncentracijama nalaze se proteini, aminokiseline, enzimi, minerali, vitamini, fenolne tvari i organske kiseline (Maddocks i Jenkins, 2013; Seraglio i sur., 2019; Shen i sur., 2019).

Medljikovac ili medun se dobiva od medne rose sa crnogoričnih i bjelogoričnih stabala (najčešće iz rodova *Pinus*, *Abies*, *Castanea* i *Quercus*) i/ili izlučevina lisnih i štitastih uši (porodica *Aphididae*, red *Homoptera* - jednokrilci) koje sišu biljni sok navedenih stabala (Vahčić i Matković, 2009; Pita-Calvo i Vázquez, 2018). U odnosu na cvjetni med, medljikovac ima znatno veći udio minerala i vitamina što se očituje u tamnijoj boji i samom okusu meda (Broznić i sur., 2018). Najčešće vrste medljikovaca koje se proizvode u Republici Hrvatskoj su: hrastov, jelin i smrekov (Vahčić i Matković, 2009).

Aminokiseline su tvari kojih u medu ima u malom udjelu, ali su od velikog značaja pa se sve češće provode istraživanja sa aminokiselinama kao glavnim fokusom. Razlog sve veće zainteresiranosti se javlja zbog mogućnosti korištenja sastava i udjela aminokiselina u svrhu određivanja botaničkog i geografskog podrijetla meda; određivanja starosti meda; a sa nutritivnog aspekta je važno zbog njihovog pozitivnog utjecaja na zdravlje (Cotte i sur., 2004; González Paramás i sur., 2006). Aminokiseline se najčešće određuju metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (high-performance liquid chromatography, HPLC), a za provedbu i uspješnost analize vrlo je važna priprema uzorka pa se zato vrši derivatizacija uzorka, najčešće prije same analize (Bernal i sur., 2005).

Cilj rada bio je provesti istraživanje na uzorcima medljikovaca kako bi se dobio uvid u sastav i udio aminokiselina, te kako bi se utvrdilo postoji li mogućnost određivanja botaničkog podrijetla prema specifičnostima njihova sastava.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. OPIS I PODJELA MEDA

Prema Pravilniku o medu (MP, 2015): „Med jest prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.“ Prema podrijetlu dijeli se na cvjetni ili nektarni med koji se dobiva od nektara biljaka te medljikovac ili medun dobiven uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka. Nektarni med može biti uniflorni – sadrži najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste, uz par izuzetaka gdje taj postotak ovisi o biljnoj vrsti i multiflorni - mješavine više biljnih vrsta (MPRRR, 2009). Medljikovac pčele proizvode od medne rose sa crnogorice ili bjelogorice. Kada govorimo o kombinaciji cvjetnog meda i medljikovca, takav med se naziva miješani med (Vahčić i Matković, 2009).

Prema načinu proizvodnje, med se dijeli na: med u saću (pčele ga skladište u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, a prodaje se u poklopljenom saću ili dijelovima takvog saća), med sa saćem ili s dijelovima saća, cijedeni med (dobiva se ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla), vrcani med (dobiven vrcanjem otklopljenog saća bez legla), prešani med (dobiva se prešanjem saća bez legla) i filtrirani med (MP, 2015).

U Hrvatskoj se proizvodi veliki broj vrsta meda zbog različitih klimatskih uvjeta i sastava tla te raznolike flore. U medonosno bilje ubrajaju se sljedeće porodice: vrbe (*Salicaceae*), ružičnjače (*Rosaceae*), krstašice (*Brassicaceae*), mahunarke (*Fabaceae*), glavočike (*Compositae*) i usnatice (*Lamiaceae*); (Šimić, 1980). Najčešće vrste meda u Hrvatskoj su: bagremov (*Robinia pseudoacacia* L.), kestenov (*Castanea sativa* Mill.), med od kadulje (*Salvia officinalis* L.) i med od lipe (*Tilia* spp.); zatim vrijeskov (*Calluna vulgaris* L.), ružmarinov (*Rosmarinus officinalis* L.), lavandin (*Lavandula* spp.), med od suncokreta (*Helianthus annuus*), gloza (*Crataegus*), planike (*Arbutus unedo* L.), uljane repice (*Brassica napus* L.) i cvjetni med koji nastaje od nektara raznog medonosnog bilja (Denžić Lugomer i sur., 2017).

## 2.2. SASTAV MEDA

Sastav meda i njegove karakteristike prvenstveno potječu od nektara ili medne rose od kojeg se proizvodi; do promjena u sastavu zatim dolazi zbog utjecaja pčela za vrijeme prerade i naknadno za vrijeme dozrijevanja, a u saću dolazi do promjena zbog biokemijskih reakcija koje se odvijaju u medu (Iglesias i sur., 2006). Najveći udio u medu čine glukoza (prosječno 31,3 %) i fruktoza (prosječno 38,2 %) uz manje udjele disaharida i oligosaharida. Ugljikohidrati čine 95 % suhe tvari pa se zbog njihova visoka udjela med najčešće koristi kao sladilo. U manjim koncentracijama u medu se nalaze proteini, aminokiseline, enzimi, minerali, vitamini, fenolne tvari i organske kiseline (Maddocks i Jenkins, 2013; Seraglio i sur., 2019; Shen i sur., 2019). Udio navedenih tvari ovisi o sljedećim faktorima: geografskom i botaničkom podrijetlu meda, vrsti pčela koje ga proizvode, klimatskim uvjetima, te samom pčelaru koji kasnije prerađuje i skladišti med (Denžić Lugomer i sur., 2017). Udio vode i ugljikohidrata je najčešće konstantnih vrijednosti uz moguće male razlike kod različitih vrsta, dok je udio ostalih tvari vrlo promjenjiv i to određuje svojstva poput boje, mirisa, okusa meda i pozitivnog djelovanja na zdravlje. U odnosu na cvjetni med, medljikovac je tamnije boje i intenzivnijeg okusa zbog većeg udjela minerala (Maddocks i Jenkins, 2013; Seraglio i sur., 2019; Shen i sur., 2019).

Sastav meda uvelike utječe na njegova senzorska svojstva, tako i na boju koja se često povezuje sa okusom. Med svjetlije boje povezuje se sa laganijim i blažim okusom, a tamnija nijansa sa intenzivnijim i jačim okusom. Ovo „pravilo“ vrijedi za svježije medove jer tijekom dužeg skladištenja može doći do promjene boje zbog djelovanja neenzimskih reakcija posmeđivanja (Seraglio i sur., 2019).

Med ima terapijsko djelovanje na zdravlje što se očituje u antioksidacijskim, antibakterijskim, antimikrobnim, protuupalnim i antidijabetičkim svojstvima. Istražuju se mogućnosti korištenja meda za liječenje gastrointestinalnih, kardiovaskularnih i oboljenja živčanog sustava te u tretiranju rana (Eteraf-Oskouei i Najafi, 2013; Samarghandian i sur., 2017). Antioksidacijska svojstva najviše potječu od fenolnih komponenata, a protuupalna svojstva se vežu sa antimikrobnim svojstvima vodikova peroksida i bioaktivnih tvari koje djeluju na mikroorganizme. Za antimikrobni učinak odgovorni su: nizak pH meda, udio fenolnih tvari, visok osmotski tlak, vodikov peroksid, lizozomi i antimikrobni peptidi (Seraglio i sur., 2019; Cviljević i sur., 2020). Osim peroksidne aktivnosti, antimikrobna svojstva potječu i od proteina

i peptida iz meda (Bilikova i sur., 2015). Također, dokazano je da tamniji medovi (medljikovac, kestenov med) imaju jači antimikrobni učinak što se povezuje sa većim udjelom fenolnih komponenti i samim tim jačim antioksidacijskim djelovanjem (Seraglio i sur., 2019; Cviljević i sur., 2020).

### 2.2.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati čine najveći udio u sastavu meda, a sladak okus ima zahvaljujući visokom udjelu fruktoze i glukoze (60 - 80 %); (Pérez i sur., 2007). Ukupni udio monosaharida u medljikovcima kreće se u rasponu od 59,9 do 79,7 g na 100 g meda (Seraglio i sur., 2019). Saharoza, maltoza, izomaltoza, turanoza, nigerosa i trehaloza su najčešće pronađeni disaharidi u medljikovcu; te maltotrioza, rafinoza, melecitoza i erloza od oligosaharida (Vahčić i Matković, 2009; Shaaban i sur., 2020). Specifična rotacija meda ovisi o sastavu i udjelu ugljikohidrata koji imaju sposobnost zakretanja linearno polarizirane svjetlosti. Fruktoza ima negativan kut zakretanja pa medovi u kojima prevladava imaju negativnu specifičnu rotaciju. Glukoza, disaharidi i oligosaharidi imaju pozitivan kut zakretanja što rezultira pozitivnom specifičnom rotacijom (Primorac i sur., 2011). Visok udio saharoze može upućivati na prerano vrcanje meda ili na moguće patvorenje meda dodavanjem šećernih sirupa, ali postoje i vrste koje imaju prirodno visoki udio saharoze (npr. med od bagrema, citrusa, lavande..) (Persano Oddo i Piro, 2004; Seraglio i sur., 2019).

Udio ugljikohidrata u medu izravno utječe na fizikalna svojstva meda od kojih se najviše ističe kristalizacija. Kristalizacija meda ovisi o omjeru fruktoze i glukoze i omjeru glukoze i vode u medu (glukoza/voda omjer će biti detaljnije opisan u Poglavlju 2.2.2.). Ako je vrijednost fruktoza/glukoza (F/G) omjera iznad 1,3 kristalizacija će biti sporija; a ako je F/G vrijednost manja od 1,0 kristalizacija će biti brža (Seraglio i sur., 2019). Srednja vrijednost F/G omjera u medljikovcima, dobivena analiziranjem 721 uzorka različitog geografskog podrijetla, iznosi  $1,25 \pm 0,12$  (Persano Oddo i Piro, 2004).

Med je vrlo higroskopan zbog visokog udjela šećera pa u kontaktu sa zrakom visoke vlažnosti može vezati dio vode na sebe. Također, visok udio vode u medu može uzrokovati naknadnu fermentaciju tijekom skladištenja i gubitak okusa čime se gubi na kvaliteti proizvoda (Denžić Lugomer i sur., 2017).

### 2.2.2. Voda

Voda je druga najzastupljenija komponenta u medu. Udio vode u medu ovisi o stupnju zrelosti koji je med dosegao u košnici, botaničkom i geografskom podrijetlu, klimatskim uvjetima, načinu procesiranja i uvjetima skladištenja. Udio vode je važan i zbog aktiviteta vode ( $a_w$ ) što utječe na rast i razvoj mikroorganizama, enzimske reakcije i procese kvarenja uzrokovane fermentacijom. Aktivitet vode u medu najviše ovisi o udjelu glukoze. Aktivitet vode je veći u kristaliziranom medu u odnosu na nekristalizirani med jer se u kristaliziranom medu glukoza veže samo sa jednom molekulom vode, u odnosu na nekristalizirani gdje je vezana sa pet molekula vode. Prema literaturnim podacima,  $a_w$  medljikovaca je ispod 0,60 (Seraglio i sur., 2019).

Udio vode, odnosno omjer glukoze i vode (G/V) u medu utječe i na kristalizaciju meda. Ako je G/V omjer manji od 1,7 tada će kristalizacija biti sporija; ako je G/V omjer iznad 2,0, kristalizacija će biti brža. U medljikovcima taj omjer je obično ispod 2,0, a srednja vrijednost G/V omjera iznosi  $1,61 \pm 0,17$  (Persano Oddo i Piro, 2004; Seraglio i sur., 2019).

### 2.2.3. Proteini i aminokiseline

Proteina u medu ima vrlo malo, a najvećim dijelom potječu od pčela (González Paramás i sur., 2006). Kada se govori o proteinima, u glavnom fokusu su enzimi: glukoza oksidaza, invertaza,  $\beta$ -glukozidaza i diastaza (Bilikova i sur, 2015).

Detaljnije o sastavu i udjelu aminokiselina u medu i njihovom značaju za kvalitetu i nutritivnu vrijednost meda biti će opisano u Poglavlju 2.4.

### 2.2.4. Polifenoli i flavonoidi

Kao sekundarni metaboliti biljaka, polifenoli utječu na boju, aromu i senzorska svojstva; poboljšavaju otpornost biljaka od bolesti i mikroorganizama, a imaju i antioksidativnu aktivnost. U ovisnosti o strukturi, flavonoidi se dijele na sljedeće podgrupe: flavoni, flavani, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, halkoni i antocijani. Pronalazimo ih u hrani biljnog podrijetla: voću, povrću (luk, lisnato povrće i rajčica kao najveći izvori), sjemenkama, kavi, čaju, vinu, te propolisu i medu (Kurtagić, 2017).

U medu se najčešće mogu pronaći flavononi, flavani i flavonoli. Uz flavonoide, med je bogat i fenolnim kiselinama poput galne, kafeinske, kumarinske i ferulične. Flavonoidi su komponente



čiji sastav i udio u medu zavisi o geografskom i botaničkom podrijetlu; pa se pojedini spojevi mogu identificirati samo u određenoj vrsti meda i mogu služiti kao markeri za identifikaciju i kontrolu podrijetla (Kurtagić, 2017). Smatra se da flavonoidi u medu potječu iz peludi i propolisa te da nastaju kao nusprodukti za vrijeme prerade nektara i medne rose (Güneş i sur., 2016).

### 2.2.5. Minerali i vitamini

Udio minerala je vrlo važan čimbenik koji govori o kvaliteti meda i njegovom geografskom podrijetlu. Osim što se određuju mikroelementi i makroelementi, određuju se i udjeli teških metala koji mogu upućivati na kontaminaciju okoliša, a mogu imati i negativan utjecaj na zdravlje ljudi. Najčešće se mogu pronaći sljedeći minerali: kalij, kalcij, natrij, magnezij, cink, željezo, fosfor, mangan, bakar i selen (Lasić i sur., 2018). Minerali iz zemlje i biljaka se kvantitativno prenose na nektar, pelud i medljiku pa su zbog toga biološki dostupni u medu (Seraglio i sur., 2019).

Lasić i sur. (2018) su proveli istraživanje sa ciljem otkrivanja poveznice između udjela minerala i botaničkog i geografskog podrijetla meda i određivanja količine prisutnih kontaminanata. Odredili su da udio K, Ca, Na, Mg, Mn i Fe je podjednak u različitim vrstama meda, dok Seraglio i sur. (2019) su zaključili da u medljikovcima od navedenih minerala, najveći udio čini K sa udjelom od 70 % i više od ukupnog udjela minerala. Što se tiče ukupnog udjela minerala, određeno je da najviše minerala ima kestenov, zatim lipov, a najmanje bagremov med; čime se potvrđuje tvrdnja da tamnije vrste meda imaju veći udio minerala od onih svjetlijih (Lasić i sur., 2018).

Med ima malo vitamina u svom sastavu i ne može zadovoljiti preporučene dnevne doze za ljudski organizam. Oni najviše potječu iz peludi i nektara. Ako se med filtrira, čime se iz njega uklanja i pelud, smanjuje se udio vitamina. U medljikovcu se najviše mogu pronaći vitamini B skupine - tiamin, riboflavin, niacin, piridoksin, pantotenska kiselina, biotin i folna kiselina; vitamin C i kod nekih vitamin K (Vahčić i Matković, 2009; Seraglio i sur., 2019).

### 2.2.6. Organske kiseline

Tamniji medovi imaju veći udio organskih kiselina i time veću ukupnu kiselost, dok svjetliji medovi poput bagremovog i cvjetnog meda imaju manju količinu organskih kiselina. Iako je kiselost jedna od karakteristika meda, povećana kiselost upućuje na fermentaciju meda.

Najzastupljenija organska kiselina je glukonska kiselina jer ona nastaje djelovanjem glukoza oksidaze na glukozu prisutnu u medu. Uz nju, med sadrži octenu, mravlju, maslačnu, mliječnu, vinsku, limunsku, benzojevu i oksalnu kiselinu (Vahčić i Matković, 2009).

#### 2.2.7. Hidroksimetilfurfural (HMF)

U kiselom mediju dolazi do dehidracije glukoze i fruktoze pri čemu nastaje ciklički aldehid – hidroksimetilfurfural, a može nastati i Maillardovim reakcijama. Prirodno je prisutan u medu u malim koncentracijama te je jedan od parametara za određivanje svježine meda; svježi med ima vrlo male količine HMF-a, dok se njegova koncentracija povećava dugotrajnim skladištenjem i/ili nepravilnim procesiranjem meda. Zbog toga je važno skladištenje meda pri nižim temperaturama. U svježe vrcanom medu udio mu je do 10 mg/kg (Vahčić i Matković, 2009; Shapla i sur., 2018).

#### 2.2.8. Kontaminanti i mikroorganizmi

Kontaminanti se ne ubrajaju u prirodne sastojke meda, ali se mogu pronaći u njemu zbog raznih onečišćenja okoliša. Najčešći kontaminanti su pesticidi i ostatci antibiotika. Pesticidi mogu dospjeti indirektnim putem u med preko zemlje, zraka i vode što prelazi na biljke koje pčele oprašuju. Sve veća upotreba pesticida i insekticida u poljoprivredne svrhe dovodi u pitanje kvalitetu meda, ali i život pčela. Ostatci antibiotika su mogući ako se pčele tretiraju istima u svrhu liječenja nekih bolesti zajednice (Seraglio i sur., 2019).

Zbog svog sastava (niskog pH, visoke osmolarnosti, velike koncentracije šećera), med je relativno siguran proizvod sa mikrobiološkog aspekta. Od mikroorganizama, postoji opasnost od onih koji se u tim uvjetima mogu razvijati - poput bakterije *Clostridium botulinum* koja u organizmu izlučuje toksin botulin, a koji je posebno opasan za novorođenčad i dojenčad jer nemaju razvijen imunološki sustav (Seraglio i sur., 2019).

### 2.3. MEDLJKOVAC

Medljikovac ili medun dobiva se od medne rose/medljike sa crnogoričnih i bjelogoričnih stabala, najčešće iz rodova *Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Castanea*, *Fagus*, *Larix* i *Quercus* i od izlučevina lisnih i štitarastih uši; porodica *Aphididae*, red *Hemiptera* – jednokrilci, te insekti iz porodica *Psillidae*, *Lecanoidae* i *Eriosomatidae*; koje sišu biljni sok navedenih stabala (Diéz i sur., 2004; Vahčić i Matković, 2009; Krakar, 2012; Pita-Calvo i Vázquez, 2018). Medna rosa koju izlučuju

uši se djelomično probavlja u probavnom sustavu: bjelančevine lisne uši iskoriste kao hranu, ugljikohidrate djelomično probave, a ostatak izluče (Pita-Calvo i Vázquez, 2018). U medljikovcu najviše ima ugljikohidrata, a u odnosu na nektarni med, medljikovac sadrži i veći udio oligosaharida. Njihov udio i sastav ne ovisi samo o vrsti biljke sa koje se uzima medljika, nego i od vrste uši (Vahčić i Matković, 2009). Sastav ugljikohidrata hrvatskih medljikovaca prikazan je u **Tablici 1**.

**Tablica 1** Sastav ugljikohidrata hrvatskih medljikovaca (Primorac i sur., 2009)

Vrsta šećera	Srednja vrijednost [%]	Min-max [%]
<b>Fruktoza</b>	32,4	27,7 – 37,0
<b>Glukoza</b>	31,0	25,7 - 35,2
<b>Ksiloz</b>	0,1	0,0 - 0,4
<b>Maltoza</b>	9,7	1,0 - 17,8
<b>Melecitoza</b>	0,2	0,0 - 0,9
<b>Saharoza</b>	1,4	0,4 - 2,8
<b>Rafinoza</b>	0,2	0,0 - 2,1
<b>Ukupni šećeri</b>	75,0	71,4 - 80,7

Ostale tvari koje se mogu pronaći u medljikovcima su: aminokiseline, minerali, enzimi i organske kiseline; uz to pronalaze se elementi medne rose poput spora, algi i plijesni (Vahčić i Matković, 2009). U odnosu na nektarni med, medljikovac ima znatno veći udio minerala i vitamina što se očituje u tamnijoj boji i samom okusu meda. Od minerala, najzastupljeniji su kalij, kalcij, natrij i magnezij, a u manjoj količini aluminij, cink, željezo, nikal i mangan (Broznić i sur., 2018).

Najčešće vrste medljikovaca:

- hrastov medljikovac – tamno crvene boje, zbog velike gustoće se teško vrca iz saća, opora okusa;
- jelov medljikovac – smeđe do tamno sive boje sa tamno zelenim podtonom, ugodna okusa i mirisa;

- smrekov medljikovac – jantarne boje uz crvenkastu nijansu i intenzivan miris po smoli (Vahčić i Matković, 2009).

Aromu meda najviše izgrađuju hlapljive tvari. Tvari arome mogu potjecati od pčela, ali mogu i naknadno nastati tijekom skladištenja meda. Analiziranjem uzoraka meda od jele (*Abies* spp.) pokazalo se da najviše sadrži butansku kiselinu,  $\alpha$ -pinen i metil butirat. Pronađene su visoke koncentracije octene kiseline u više vrsta španjolskih medljikovaca čime se može zaključiti da je octena kiselina njihovo obilježje. Hrvatski medljikovac od hrasta sladuna (*Quercus frainetto* Ten.) ima visoke količine terpena, alifatskih kiselina i derivata benzena (Jerković i Marijanović, 2010; Pita-Calvo i Vázquez, 2018).

Zanimanje za medljikovac je poraslo zbog njegova bogata sastava i terapijskog učinka pa se sve više provode analize kemijskog sastava (Pita-Calvo i Vázquez, 2018). U Republici Hrvatskoj dvije su vrste medljikovaca posebno istraživane zbog specifičnih karakteristika i načina proizvodnje, a to su medljikovac/medun hrasta sladuna i „Goranski medun“. Medun hrasta sladuna (obuhvaćen pod pojmom „Slavonski med“) je zaštićen oznakom izvornosti na europskoj razini, a „Goranski medun“ je zaštićen oznakom izvornosti na nacionalnoj razini.

### 2.3.1. Medljikovac/medun hrasta sladuna

„Slavonski med“ je skupni naziv za sljedeće vrste meda: med od bagrema, med od lipe, med od uljane repice, med od suncokreta, med od kestena, cvjetni med i medun hrasta sladuna. Svaki „Slavonski med“ koji je sukladan specifikaciji proizvoda, a stavlja se na tržište mora biti označen logom „Slavonski med“ (**Slika 1**). Sve faze proizvodnje „Slavenskog meda“ moraju se provoditi na zemljopisnom području Slavonske regije koje je omeđeno rijekama Dravom, Savom i Dunavom; zapadni dio Slavonske granice se prostire do zapadne administrativne granice Bjelovarsko - bilogorske županije, grada Novska i općina Lipovljani i Jasenovac. Hrast sladun kao šumska vrsta je specifična za jugoistočnu Europu: rasprostire se na Apeninskom poluotoku i Peloponezu, sjeveroistočno do pokrajine Tokaj u Mađarskoj i sjeverozapadno do Požeške kotline. Termofilna šuma hrasta sladuna i cera je razvijena na južnim padinama Krndije od grada Kutjevo do sela Duboka i Ljeskovića u čaglinskom kraju (Krakar, 2012; Udruga proizvođača Slavenskog meda, 2017).

Medun hrasta sladuna (*Quercus frainetto* Ten.) se dobiva od medne rose koju izlučuju žirovi – sok curi iz kutikula žira. Ta se pojava naziva „medenje žirova“, a može potrajati do dva

mjeseca (srpanj i kolovoz). Da bi došlo do pojave medenja, potrebno je suho i toplo vrijeme bez vjetrova. Medun hrasta sladuna ima miris koji podsjeća na šumski med, izrazito je tamne boje, izrazito je kiseo i srednje slatkoće. U netopivom sedimentu prevladavaju elementi medne rose (hife, spore), a može se pronaći sporedna pelud od pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.); (Udruga proizvođača Slavanskog meda, 2017). Od 2018. godine medun hrasta sladuna je zaštićen oznakom izvornosti na europskoj razini (MP, 2018).



**Slika 1** Logo „Slavanskog meda“ (Web 1)

Udio vode i udio HMF-a su parametri kvalitete proizvoda čije propisane vrijednosti se odnose na sve vrste meda koje nose oznaku „Slavonski med“. Postotak vode smije iznositi maksimalno 18,3 %, a količina HMF-a maksimalno 16,5 mg/kg. Uz navedene vrijednosti za vodu i HMF, medun hrasta sladuna mora imati vrijednost za električnu provodljivost minimalno 0,8 mS/cm, aktivnost dijastaze mora biti minimalno 8, a količina saharoze maksimalno 4 g/100 g (Udruga proizvođača Slavanskog meda, 2017). Medun hrasta sladuna ističe se po visokom udjelu fenolnih tvari i antioksidacijske sposobnosti, visokom udjelu proteina i prolina te enzimskoj aktivnosti. Karakteriziraju ga visoke vrijednosti za kiselost i aktivnost dijastaze, negativna specifična rotacija i vrlo tamna boja. Najzastupljeniji mineral je kalij, zatim fosfor, magnezij i kalcij (Flanjak i sur., 2021).

### **2.3.2. Goranski medun**

Kao posebna kategorija medljikovca, osim meduna hrasta sladuna, u Republici Hrvatskoj se izdvaja „Goranski medun“. Njegova glavna karakteristika, kojom je definiran, je zemljopisno podrijetlo. Prema specifikaciji proizvoda, „Goranski medun“ se proizvodi na području Gorskog kotara (Primorsko-goranska županija) i Ogulinsko-plašćanske udoline (Karlovačka županija). Najčešća drveća od kojih se dobiva su: jela (*Abies alba* Mill.) i smreka (*Picea abies* L.) koje

pripadaju crnogoričnim drvećima te od bjelogoričnih, bukva (*Fagus sylvatica* L.) i javor (*Acer* spp.). Za stvaranje medne rose odgovorne su biljne i štitaraste uši koje se hrane biljnim sokom spomenutih drveća (Udruga proizvođača meduna, 2018).

Proizvode ga autohtone pasmine sive pčele (*Apis mellifera carnica*). Od fizikalno-kemijskih svojstava, „Goranski medun“ mora imati sljedeće vrijednosti: udio vode najviše 18,00 %; električna vodljivost najmanje 0,9 mS/cm; HMF najviše 15 mg/kg. Povećana električna vodljivost je povezana sa visokim udjelom minerala. Mora imati veliku zastupljenost elemenata medne rose (zelene alge, spore gljiva, dijelovi hifa) i peludnu zastupljenost iz porodica i rodova *Poaceae*, *Plantago* spp., *Filipendula* spp., *Quercus* spp., *Fagus* spp., *Artemisia* spp., *Salix* spp., *Helianthemum* spp. Karakterizira ga slabija slatkoća i aroma srednjeg intenziteta; tamno bež do crvenkasto-smeđa boja i srednje do jako izražen miris sa notama smole i suhog lišća (Udruga proizvođača meduna, 2018). Od 2021. godine, „Goranski medun“ je zaštićen oznakom izvornosti na nacionalnoj razini (MP, 2021). Logo oznake izvornosti Goranskog meduna je prikazan na **Slici 2**.



**Slika 2** Oznaka izvornosti „Goranskog meduna“ (Web 2)

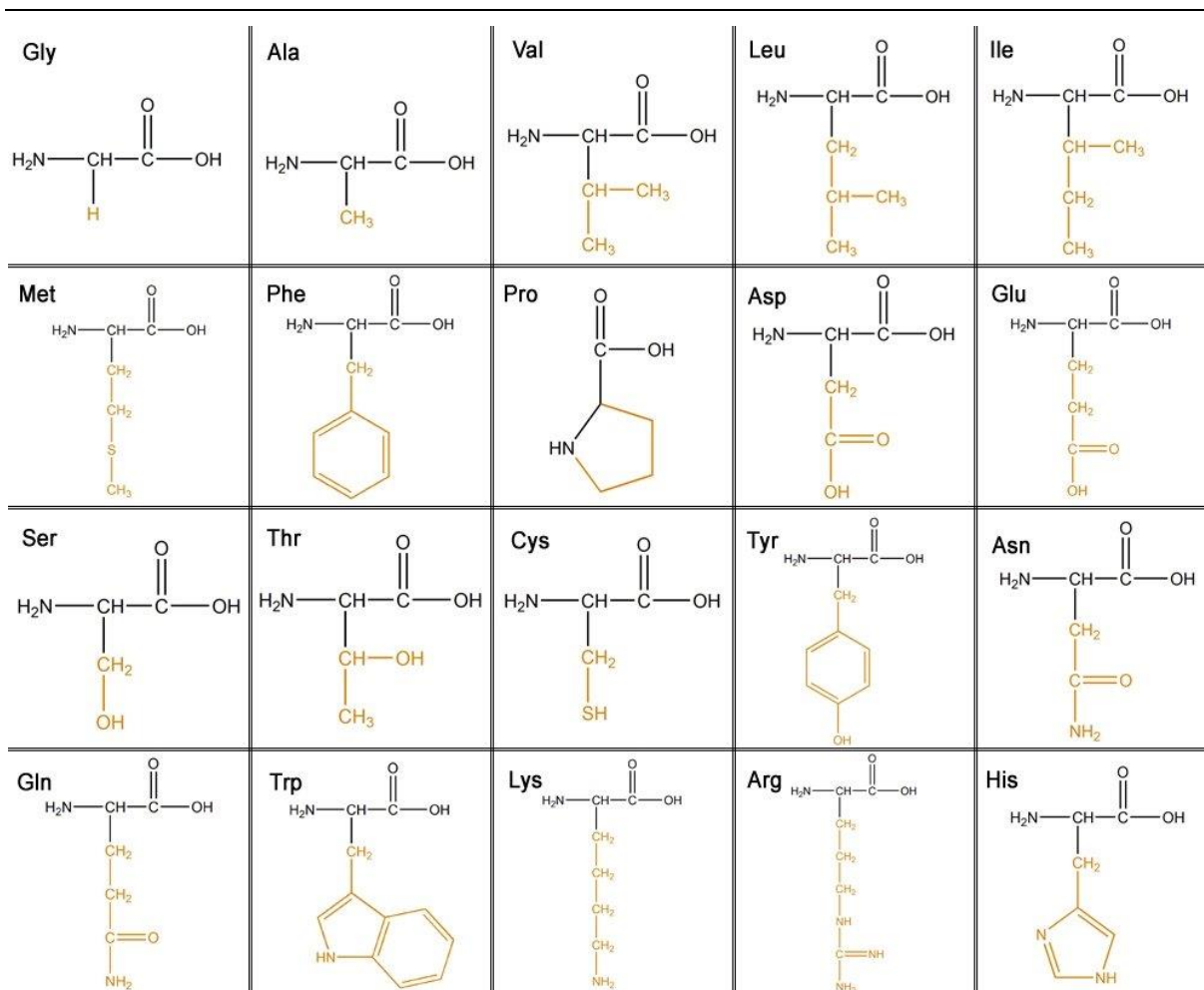
### 2.4. AMINOKISELINE

Proteini se ubrajaju u jedne od najvažnijih spojeva jer su važni za funkcioniranje organizama. Njihova struktura je kompleksna, a ono što je jednako kod svih proteina jest da su to polimerne molekule. Ono što će se detaljnije opisivati u ovom poglavlju su monomerne jedinice koje izgrađuju proteine, a to su aminokiseline (Berg i sur., 2013).

Aminokiseline (AK) su molekule koje su izgrađene od središnjeg ugljikovog atoma ( $\alpha$ -ugljikov atom) na koji su vezani vodik, karboksilna skupina, amino skupina i specifična skupina R (bočni ogranak). Od ukupno 300 aminokiselina koje se mogu pronaći u prirodi, samo njih 20 izgrađuju proteine (**Slika 3**), a to su: alanin (Ala, A), arginin (Arg, R), asparagin (Asn, N), asparaginska kiselina/aspartat (Asp, D), cistein (Cys, C), fenilalanin (Phe, F), glutamin (Gln, Q), glutaminska kiselina/glutamat (Glu, E), glicin (Gly, G), histidin (His, H), izoleucin (Ile, I), leucin (Leu, L), lizin (Lys, K), metionin (Met, M), prolin (Pro, P), serin (Ser, S), treonin (Thr, T), triptofan (Trp, W), tirozin (Tyr, Y), valin (Val, V); (Berg i sur., 2013). U prirodi postoji cijeli niz drugih aminokiselina koje se nalaze u životinjskim i biljnim tkivima ili nastaju kao međuprodukti metabolizma (Miloš, 2009; Wu, 2009).

Prema bočnom ogranku, dijele se u četiri skupine:

- 1) nepolarne ili hidrofobne – glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenilalanin, triptofan i metionin;
- 2) polarne i bez naboja – serin, treonin, cistein, tirozin, asparagin i glutamin;
- 3) polarne i negativno nabijene – asparaginska i glutaminska kiselina;
- 4) polarne i pozitivno nabijene – arginin, histidin i lizin (Miloš, 2009).



Slika 3 Prikaz strukturnih formula aminokiselina (Web 3)

Aminokiseline u organizam se unose kao slobodne aminokiseline ili nastaju razgradnjom proteina. Nakon što se potrebne aminokiseline iskoriste za izgradnju proteina, višak se razgrađuje primarno u jetri. Esencijalne aminokiseline su one koje organizam ne može sintetizirati ili ih ne može sintetizirati u dovoljnoj količini. One su: fenilalanin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, treonin, triptofan, valin; te arginin koji je uvjetno esencijalan jer ga je potrebno unositi putem hrane u djece, a odrasli ju mogu sintetizirati (Wu, 2009; Berg i sur., 2013).

Gledajući širu sliku, proteine koje unosimo hranom, a s obzirom na sastav aminokiselina dijelimo na:



- a) kompletne – kompletni proteini smatraju se oni koji u svom sastavu imaju sve esencijalne aminokiseline u dovoljnoj količini, a pronalazimo ih u mlijeku, jajima, mesu i siru;
- b) nekompletne – ne sadržavaju sve esencijalne aminokiseline, to su uglavnom proteini biljnog podrijetla iz mahunarki i žitarica (Mandić, 2007).

Kao biološki aktivne komponente sudjeluju u mnogim procesima u organizmu: prekursori su nekih hormona, npr. hormona rasta, inzulina, glukagona, prolaktina; sudjeluju u apsorpciji i metabolizmu nutrijenata, npr. sintezi i oksidaciji masnih kiselina i glukoze; važni su za imunološke reakcije organizma u smislu smanjivanja utjecaja patogena i stvaranja antitijela; djeluju kao neurotransmiteri i antioksidativna zaštita. Sa drugog aspekta, aminokiseline povećavaju biološku vrijednost prehrambenih proizvoda te utječu na okus i aromu istih (Bernal i sur., 2005; Wu, 2009).

#### 2.4.1. Aminokiseline u medu

Aminokiseline su tvari koje pronalazimo u manjem udjelu, ali su velikog značaja. Razlog sve veće zainteresiranosti za aminokiseline u medu se javlja zbog mogućnosti određivanja i potvrde botaničkog i geografskog podrijetla meda; određivanja starosti odnosno svježine meda, a sa nutricionističkog aspekta je važno zbog saznanja o sastavu proteina i aminokiselina zbog njihova utjecaja na zdravlje (González Paramás i sur., 2006). Njihovo podrijetlo nije u potpunosti objašnjeno, ali postoje tri objašnjenja njihova podrijetla u medu. Prva mogućnost je da na sastav i udio aminokiselina utječe udio peludi u medu; pelud u svom sastavu sadrži aminokiseline, ali u vrlo malim količinama u odnosu na ukupnu količinu aminokiselina u medu pa se zaključuje da pelud nema značajan utjecaj na njihov udio. Sljedeća mogućnost je da aminokiseline potječu od pčela za vrijeme prerade nektara i medljike; da bi se podržala ta tvrdnja, istraživanjem je dokazano da pčele u svom mišićnom sastavu imaju veliku količinu prolina, aminokiseline koje ima u najvećoj količini u medu. Uz to, izvor aminokiselina je sam nektar i medljika od koje pčele proizvode med (Hermosín i sur., 2003; Cotte i sur., 2004).

Provođenjem istraživanja na uzorcima različitih botaničkih podrijetla španjolskih medova, Hermosín i sur. (2003) su dobili uvid u sastav slobodnih aminokiselina pri čemu je najviše bilo prolina, fenilalanina, tirozina i lizina, zatim arginina, histidina, valina i glutaminske kiseline (Hermosín i sur., 2003). U cvjetnom medu, u najvećim količinama ima, od najvećeg do

najmanjeg udjela: prolina, fenilalanina, tirozina, glutaminske kiseline, asparagina i asparaginske kiseline. U medljikovcima to su: prolin, glutaminska kiselina, asparaginska kiselina, asparagin, glutamin i fenilalanin (Iglesias i sur., 2004).

Udio aminokiselina može biti vrlo različit za različite vrste meda, ali imaju neke dodirne točke. To su potvrdili Pérez i sur. (2007) koji su proveli istraživanje na cvjetnom medu, medljikovcu i miješavini cvjetnog meda i medljikovca na ukupno 53 uzorka. U sve tri vrste meda najzastupljenija aminokiselina je bila prolin. Od ukupno 27 uzorka koje su Meda i sur. (2005) analizirali, dva su bili medljikovci i njihove vrijednosti za prolin su  $797,1 \pm 14,1$  mg/kg i  $1216,6 \pm 15,7$  mg/kg. Prema Iglesias i sur. (2006) prolin je aminokiselina koja je najzastupljenija sa oko 33 % od ukupnih aminokiselina. Visok udio prolina u svim vrstama meda povezuje se sa njegovim podrijetlom jer ono većinom potječe od pčela, pa geografsko i botaničko podrijetlo nemaju preveliki utjecaj na njegovu koncentraciju. Na osnovi različitog sastava i udjela aminokiselina postoji mogućnost razlikovanja navedenih skupina meda (Iglesias i sur., 2006; Pérez i sur., 2007). Pojedine AK se mogu koristiti kao markeri pri određivanju botaničkog podrijetla meda. Primjeri mogućih markera su treonin u medu suncokreta i fenilalanina u medu od lavande (Cotte i sur., 2004).

### **2.4.2. Analiza aminokiselina u medu**

Svaki sastojak meda se detaljno proučava kako bi se jasnije dobio uvid njihovog utjecaja na ukupni sastav. Plinska (gas chromatography, GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) te elektroforeza često se koriste za određivanje aminokiselina u svrhu utvrđivanja geografskog i botaničkog podrijetla meda (Cotte i sur., 2004; Pereira i sur., 2008).

#### **2.4.2.1. Određivanje sastava i udjela aminokiselina HPLC metodom**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti se intenzivno počela razvijati i koristiti početkom 1900-te godine. Vrlo je točna i brza pa se njome mogu separirati i analizirati mnoge tvari poput aminokiselina, vitamina, lipida, nukleinskih kiselina, proteina i peptida, biljnih metabolita i pigmenata, i farmaceutika (Ahuja, 2003).

Aminokiseline se mogu analizirati HPLC metodom, a za njih je vrlo važna priprema uzorka. Zato se vrši derivatizacija uzorka, najčešće prije same analize, ali u nekim metodama može se vršiti i nakon separacije na stacionarnoj fazi. S obzirom na količinu aminokiselina u uzorku i njihove različitosti postoji više vrsta reagenasa kojima se aminokiseline mogu pripremati odnosno

derivatizirati (Bernal i sur., 2005). Zbog toga su Bernal i sur. (2005) proveli istraživanje na medu sa ciljem određivanja aminokiselina upotrebom različitih reagenasa. Koristili su sljedeće reagense: 9-fluorenilmetil kloroformat (FMOC-Cl), 6-aminokinolin-N-hidroksisukcinimidil karbamat (AQC) i dietil oksimetilen malonat (DEEMM). FMOC-Cl se najčešće koristi za analiziranje aminokiselina jer stvara vrlo stabilne fluorescentne derivate. DEEMM stvara stabilne derivate koji se mogu detektirati u UV području. Bernal i sur. (2005) su zaključili da su FMOC-Cl i AQC bolji od DEEMM jer daju bolje rezultate pri određivanju profila meda.

*Orto-ftaldialdehid* (OPA) najčešće se koristi kao reagens za derivatizaciju zbog visoke osjetljivosti na AK i brze reakcije derivatizacije na sobnoj temperaturi. Njegovim korištenjem se osigurava analiza AK bez dodatnog obrađivanja uzorka (ekstrakcije i pročišćavanja). Jedini nedostatak ovog reagensa je taj što ne reagira sa prolinom, hidrokisprolinom i cisteinom (Nozal i sur., 2004; Pereira i sur., 2008). Za određivanje sekundarnih AK, u kombinaciji sa OPA-om, koristi se FMOC-Cl (Sarwar i Botting, 1993). Jedan od postupaka određivanja AK u medu je sljedeći: otapanje uzoraka meda u ultra čistoj vodi; dodaje se pufer pa OPA reagens i otopina uzorka te se promiješa; nakon toga se dodaje FMOC-Cl. Tako pripremljen uzorak se koristi za analizu u HPLC uređaju (Cotte i sur., 2004).

Rebane i Herodes (2010) su razvili metodu određivanja AK koristeći se DEEMM reagensom za derivatizaciju. Postupak metode je priprema uzorka ekstrakcijom, derivatizacija DEEMM-om i kromatografska analiza. Uzorak meda se otapa u fosfatnom puferu, filtrira i provodi se ekstrakcija na čvrstoj fazi te dobiveni ekstrakt AK se otapa u ultra čistoj vodi. Otopljenom ekstraktu se dodaje DEEMM koji omogućuje detekciju u UV području, metanol i boratni pufer. Za identifikaciju AK koristi se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti sa UV detektorom i masenom spektrometrijom. Razlika između DEEMM-a i OPA-e je ta da korištenjem OPA reagensa analiza uzorka se mora provesti odmah nakon derivatizacije, a korištenjem DEEMM-a derivatizirani uzorak mora odstajati 24 sata prije same analize.

#### **2.4.2.2. Određivanje sastava i udjela aminokiselina GC metodom**

Plinska kromatografija se može koristiti za kvantitativno i kvalitativno analiziranje uzorka (Ahuja, 2003). Pri određivanju AK ovom metodom, obavezna je priprema uzorka, odnosno derivatizacija prije analize kako bi se povećala hlapljivost uzoraka i samim time poboljšalo

određivanje analita od interesa. Za te potrebe najčešće se koristi otopina etilkloroformata, piridina i etanola ili trifluoetanol (Nozal i sur., 2004).

Nozal i sur. (2004) su proučavali upotrebu GC sa plameno-ionizacijskim detektorom ili masenom spektrometrijom u svrhu brze analize AK u medu. Analizom su točno odredili botaničko podrijetlo 65 uzoraka meda od ukupno 74 analiziranih uzoraka. Prema tome, ova metoda bi se mogla koristiti za brzo određivanje AK jer je trajanje metode 15 min.

Azevedo i sur. (2017) su proveli istraživanje na brazilskom medljikovcu iz roda *Mimosa* koristeći se plinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom (GC-MS metoda). Na otopinama uzoraka prvo se provela ekstrakcija na čvrstoj fazi, zatim derivatizacija alkil kloroformom koji reagira sa amino i karbonilnom skupinom aminokiselina. Cilj njihova istraživanja bio je odrediti slobodne AK u navedenom medu i mednoj rosi koju proizvode biljne uši prije nego ju pčela skupi. Rezultati pokazuju veću količinu prolina u medljikovcu u odnosu na mednu rosu čime se može zaključiti da pčele znatno utječu na količinu ove AK.

### **2.4.2.3. Određivanje sastava i udjela aminokiselina elektroforezom**

Kapilarna elektroforeza je vrlo korisna metoda za određivanje AK jer je vrlo selektivna; za analizu se mogu koristiti male količine uzoraka i reagenasa, jednostavan je način pripreme uzoraka i analize se provedu kroz kratko vrijeme. Za derivatizaciju se najčešće koriste: OPA, FMOC i fenilizotiocijanat (PITC); (Mato i sur., 2006; Pobožy i sur., 2006).

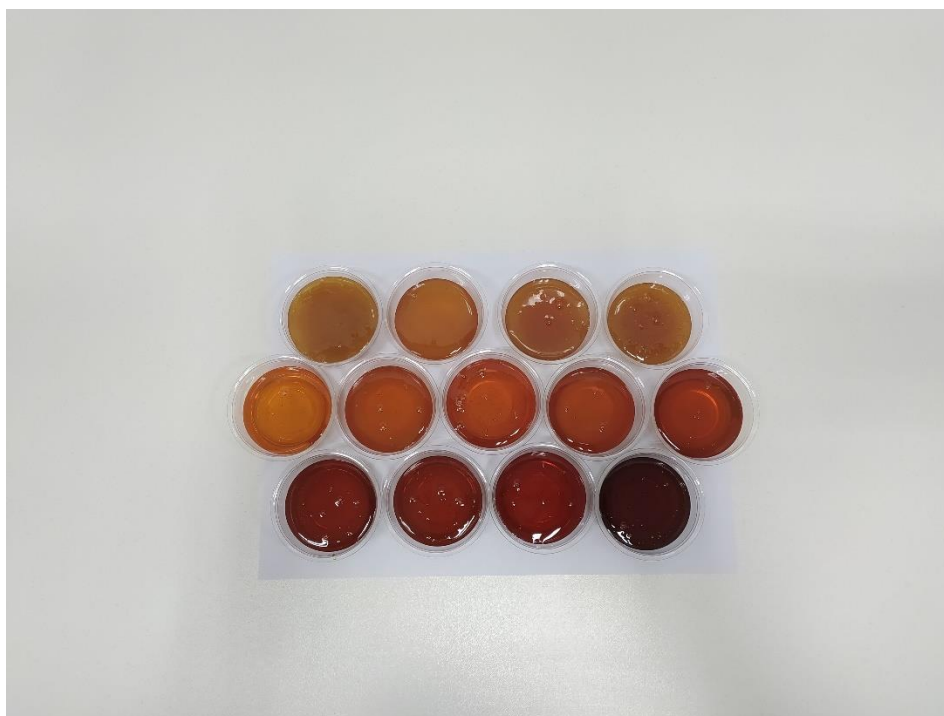
### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je provesti analizu sastava i udjela aminokiselina u uzorcima medljikovaca različitog podrijetla kako bi se utvrdile eventualne specifičnosti ovisno o podrijetlu medljikovaca.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

Za potrebe izrade ovog diplomskog rada analizirani su medljikovci sa područja Republike Hrvatske. Prikupljeno je 13 uzoraka tijekom 2021. godine (**Slika 4**), a potvrda botaničkog podrijetla provedena je na osnovi melisopalinološke analize, odnosno prisutnosti elemenata medne rose u netopivom sedimentu, odabranih fizikalno-kemijskih parametara i senzorske analize.



**Slika 4** Prikaz analiziranih uzoraka medljikovaca (Tuček, 2022)

#### 3.2.1. Melisopalinološka analiza

Utvrdjivanje botaničkog podrijetla meda vrši se utvrđivanjem količine i oblika peludnih zrnaca, odnosno u slučaju medljikovaca i elemenata medne rose; melisopalinološka analiza se provodi mikroskopski (Anklam, 1998; Pavliček i sur., 2022). Prema Pravilniku o kakvoći uniflornog meda (MPRRR, 2009), da bi se med mogao deklarirati po određenoj biljnoj vrsti, mora u netopljivom sedimentu sadržavati najmanje 45 % peludnih zrnaca iste vrste, uz određene

iznimke definirane Pravilnikom. Osim za utvrđivanje botaničkog podrijetla, ovom analizom može se odrediti geografsko podrijetlo, može se dobiti uvid u način prerade meda (filtracija, fermentacija), moguće patvorenje i kontaminacija meda (Von der Ohe i sur., 2004).

Elementi medne rose su spore gljivica i hife, alge i vosak koji potječu od insekata što proizvode mednu rosu. Skupine spora i algi te višestanične hife se broje kao jedan element. Vosak se pri melisopalinološkoj analizi ne broji jer je vrlo lomljiv čime njegova vrijednost može biti veća od stvarne vrijednosti; drugi razlog je niska relativna gustoća zbog čega se može dogoditi da se ne istaloži u sedimentu. U medljikovcima se može pronaći i pelud iz biljaka koje ne luče nektar (Louveaux i sur., 1978). Uzorak meda može se deklarirati kao medljikovac ako mu je omjer elemenata medne rose i broja peludnih zrnaca veći od tri (Díez i sur., 2004).

Za potrebe ove analize otapa se 10 g dobro izmiješanog meda u 20 mL destilirane vode. Otopina meda se zagrijava na 40 °C na vodenoj kupelji nakon čega se provodi centrifugiranje dva puta kroz 10 min na 1000 g. Centrifugiranjem se dobiva sediment koji se prenosi na predmetno stakalce i razmazuje te suši. Nakon sušenja slijedi mikroskopska analiza pri povećanju od 200 – 400 x (Louveaux i sur., 1978). Peludna zrnca, elementi medne rose te moguće nečistoće, kvasci i čestice škroba se broje u zasebne kategorije (Von der Ohe i sur., 2004).

#### **3.2.2. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara**

Kod pripreme uzoraka med se mora dobro izmiješati pazeći da se što manje zraka umiješa u uzorak. Ako je med kristalizirao, tada se može zagrijati do 40 °C kako bi se kristali otopili (Bogdanov, 2009).

##### **3.2.2.1. Određivanje udjela vode**

Određivanje vode refraktometrijski koristi se zbog jednostavnosti i ponovljivosti metode. U tu svrhu koristi se Abbe-ov refraktometar. Indeks refrakcije ovisi o količini suhe tvari: veći udio suhe tvari znači veći indeks refrakcije. Mjerenjem se očitava indeks refrakcije pri 20 °C te se podaci o udjelu vode (%) očitavaju iz tablice za proračun udjela vode u medu. U slučaju da temperatura za vrijeme provedbe mjerenja je iznad 20 °C, tada se rezultatu za svaki °C dodaje 0,00023; ako je ispod 20 °C rezultatu se za svaki °C oduzima 0,00023 (Bogdanov, 2009).

### 3.2.2.2. Određivanje električne provodnosti

Električna provodnost je jedan od kriterija za određivanje botaničkog podrijetla meda, a sama metoda nije zahtjevna i može se izvesti u većini laboratorija. Njegova vrijednost je povezana sa količinom pepela i kiselina u medu; što su veći njihovi udjeli to je veća električna provodnost (Bogdanov, 2009). Definira se kao vodljivost 20 % vodene otopine meda pri 20 °C pri čemu se 20 % odnosi na suhu tvar meda (Pavliček i sur., 2022). 20 g suhe tvari meda otopi se u destiliranoj vodi i prenosi u tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake. Električna provodnost određuje se konduktometrijski. Rezultati se izražavaju u mS/cm; za med vrijednosti električne provodnosti kreću se od 0,1 do 3 mS/cm (Bogdanov, 2009).

### 3.2.2.3. Određivanje aktivnosti dijastaze

Određivanje aktivnosti dijastaze provodi se spektrofotometrijski sa netopljivim plavo obojenim umreženim tipom škroba. Za analizu se koriste Phadebas tablete koje sadrže 45 mg plavo obojenog škroba po tableti. Hidrolizu škroba provodi enzim dijastaza prisutna u medu pri čemu nastaju plavo obojeni topljivi fragmenti u otopini koji se određuju spektrofotometrijski pri 620 nm. Apsorbancija otopine je proporcionalna aktivnosti dijastaze iz uzorka. Aktivnost dijastaze se izražava kao dijastatski broj (DN). Jedan DN se definira kao enzimska aktivnost 1 g meda koji može hidrolizirati 0,01 g škroba u 1 h pri 40 °C. Aktivnost dijastaze računa se prema sljedećim jednadžbama: za vrijednosti dijastatskog broja do 8 vrijedi **jednadžba (1)**, a za DN vrijednosti veće od 8 **jednadžba (2)**.

$$DN = 35,2 \times \Delta A_{620} - 0,46 \quad (1)$$

$$DN = 28,2 \times \Delta A_{620} + 2,64 \quad (2)$$

Pri čemu je  $\Delta A_{620}$  razlika apsorbancije uzorka i apsorbancije slijepe probe (Bogdanov, 2009).

### 3.2.2.4. Određivanje udjela HMF-a

Određivanje hidrosimetilfurfurala prema White-u može se primijeniti za sve vrste meda. Određivanje HMF-a temelji se na njegovoj sposobnosti apsorpcije UV zraka pri valnoj duljini od 284 nm što se mjeri na spektrofotometru. Pri navedenoj valnoj duljini apsorbiraju i druge komponente koje ometaju rezultat. Kako bi se dobila točna vrijednost, zbog navedenih smetnji, određuje se apsorbancija vodene otopine uzorka meda i standardne vodene otopine meda sa dodatkom natrij bisulfita pri 284 i 336 nm. Njihova razlika predstavlja apsorbanciju



uzorka. Udio HMF-a u medu je razlika apsorbancija uzoraka pri 336 nm i 284 nm; vrijednosti su izražene u mg/kg (Bogdanov, 2009).

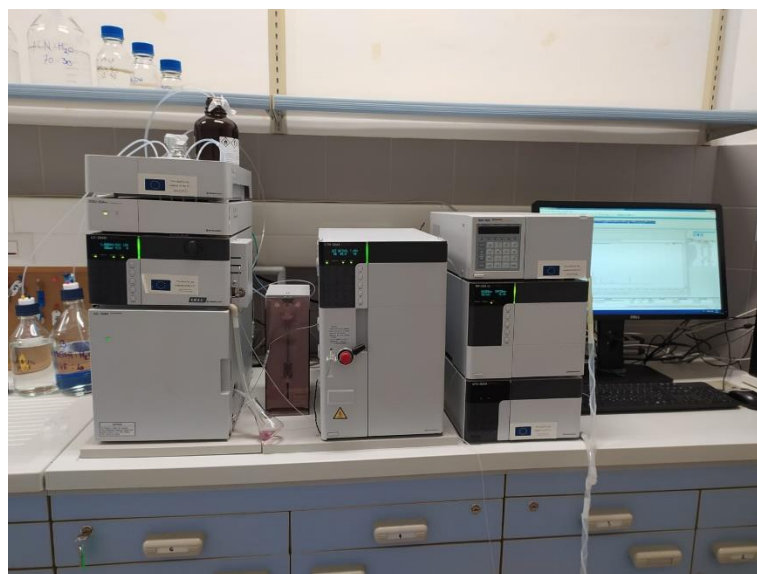
### 3.2.3. Senzorska analiza

Senzorsku analizu prikupljenih uzoraka medljikovaca proveo je panel od 5 senzorskih analitičara. Ocjenjivanje je provedeno metodom bodovanja. Ocjenjivači su ocjenama 1 do 5 ocjenjivali miris, okus, boju, čistoću i bistrinu uzoraka. Množenjem ocjena sa pripadajućim faktorima značajnosti dobiveni su ponderirani bodovi, a suma ponderiranih bodova koristila se za procjenu kvalitete uzoraka (HPS, 2010). Rezultati senzorske analize iskazani su kao „zadovoljava“ ako ispitivani uzorak posjeduje karakteristična senzorska svojstva za medljikovce (Persano Oddo i Piro, 2004).

### 3.2.4. Određivanje aminokiselinskog sastava

Sastav i udio aminokiselina u medu određen je HPLC metodom uz fluorescencijski detektor prema metodi Chen i sur. (2017) uz određene modifikacije. Modificirana metoda validirana je prije analize uzoraka medljikovaca.

Analiza je provedena na HPLC uređaju proizvođača Shimadzu (**Slika 5**). Uređaj se sastoji od: jedinice za degaziranje (DGU-20A5R), visoko tlačne kvarterne pumpe (LC-20AD), autosamplera (SIL-10AF), fluorescencijskog detektora (RF20AxS) i komore za kolonu (CTO-20AC). Upravljanje HPLC sustavom provodi se pomoću računalnog programa LabSolution Lite (Release 5.52).



**Slika 5** HPLC uređaj (Tuček, 2022)

### Priprema uzorka

Određivanje aminokiselina se provelo na ukupno 13 uzoraka medljikovaca u tri ponavljanja. Prije vaganja svakog uzorka, potrebno je med dobro izmiješati pazeći da se umiješa što manje zraka. Za pripremu otopine uzorka odvagano je 3,0000 g uzorka. Izvagani uzorak se u čašici otopio sa ultra čistom vodom nakon čega se kvantitativno prenio u odmjernu tikvicu od 25 mL. Odmjerna tikvica se zatvori čepom i promiješa par sekundi na vortex miješalici.

### Postupak derivatizacije

Prije same analize, uzorak je potrebno derivatizirati kako bi se aminokiseline prevele u fluorescirajuće derivate. U epruvetu se prvo dodaje 150  $\mu\text{L}$  0,4 M boratnog pufera (pH 10,2) i 120  $\mu\text{L}$  otopine uzorka; zatim se promiješa na vortex miješalici. Nakon 30 sekundi, dodaje se 30  $\mu\text{L}$  ortoftaldialdehida (OPA) i promiješa se šest puta. Zatim se dodaje 30  $\mu\text{L}$  9-fluorenilmetil kloroformata (FMOC-Cl) i miješa se šest puta. Zadnji korak je dodatak 1920  $\mu\text{L}$  vode nakon čega se uzorak miješa dva puta. Tako pripremljen uzorak se prenosi u vijalu preko membranskog najlonskog filtra veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ .

### Parametri analize

Odjeljivanje aminokiselina provodi se na Shimadzu Shim-pack GIST C18 koloni (150 x 4,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) pri temperaturi kolone od 40 °C. Pokretna faza sastoji se od dva eluensa, eluens A je 40 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,8), a eluens B otopina acetonitrila, metanola i vode u omjeru 45:45:10. Primijenjeno je gradijentno eluiranje pri uvjetima gradijenta pokretne faze navedenog u **Tablici 2.**

**Tablica 2** Gradijent pokretne faze

Vrijeme analize (min)	Udio eluensa B (%)
0,01	5
36,00	55
36,50	40
50,00	40
55,00	5

Protok pokretne faze podešen je na 1 mL/min, a volumen injektiranja uzorka iznosio je 5  $\mu$ L. Valne duljine emisije i ekscitacije za detekciju odijeljenih aminokiselina postavljene su na 350 nm i 450 nm, osim za detekciju prolina koji se detektiran pri 266 nm i 305 nm. Identifikacija odijeljenih aminokiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja pojedine aminokiseline u uzorku s vremenom zadržavanja iste u standardnoj otopini dok je kvantifikacija provedena metodom vanjske kalibracije. Za identifikaciju i izradu kalibracijske krivulje korišten je standard aminokiselina Amino Acid Standard (AAS18) kupljen od tvrtke Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD).

## **4. REZULTATI**

**Tablica 3** Rezultati fizikalno-kemijskih parametara, senzorske analize i melisopolinološke analize

	Udio vode (%)	Električna provodnost (mS/cm)	Aktivnost dijastaze (DN)	Udio HMF (mg/kg)	Prisutnost elemenata medne rose	Senzorska analiza	Izvor medne rose	Deklariran*
<b>1</b>	15,2	1,994	54,3	0,2	Da	zadovoljava	bjelogorica	medljikovac
<b>2</b>	16,0	0,956	34,4	1,4	Da	zadovoljava	bjelogorica	medljikovac
<b>3</b>	15,3	1,252	47,9	1,3	Da	zadovoljava	bjelogorica	medljikovac
<b>4</b>	16,9	1,091	24,4	1,1	Da	zadovoljava	crnogorica + bjelogorica	Goranski medun
<b>5</b>	15,9	1,170	17,5	1,2	Da	zadovoljava	crnogorica	medun
<b>6</b>	15,4	2,050	48,0	2,7	Da	zadovoljava	bjelogorica	medljikovac
<b>7</b>	16,8	1,344	20,5	0,5	Da	zadovoljava	crnogorica + bjelogorica	Goranski medun
<b>8</b>	17,5	1,224	20,7	1,8	Da	zadovoljava	jela	medun jela
<b>9</b>	17,7	1,317	20,4	0,5	Da	zadovoljava	crnogorica + bjelogorica	Goranski medun
<b>10</b>	17,7	1,102	30,8	0,2	Da	zadovoljava	crnogorica + bjelogorica	Goranski medun
<b>11</b>	18,4	1,375	18,8	0,9	Da	zadovoljava	jela	medun jela
<b>12</b>	16,1	0,915	41,6	4,2	Da	zadovoljava	bjelogorica	medljikovac
<b>13</b>	16,2	1,085	37,6	1,7	Da	zadovoljava	hrast sladun	medljikovac hrasta sladuna

\* deklariran prema položaju košnica od strane pčelara

**Tablica 4** Količina pojedinačnih aminokiselina u ispitivanim medljikovcima od bjelogorične medljike (mg/kg)

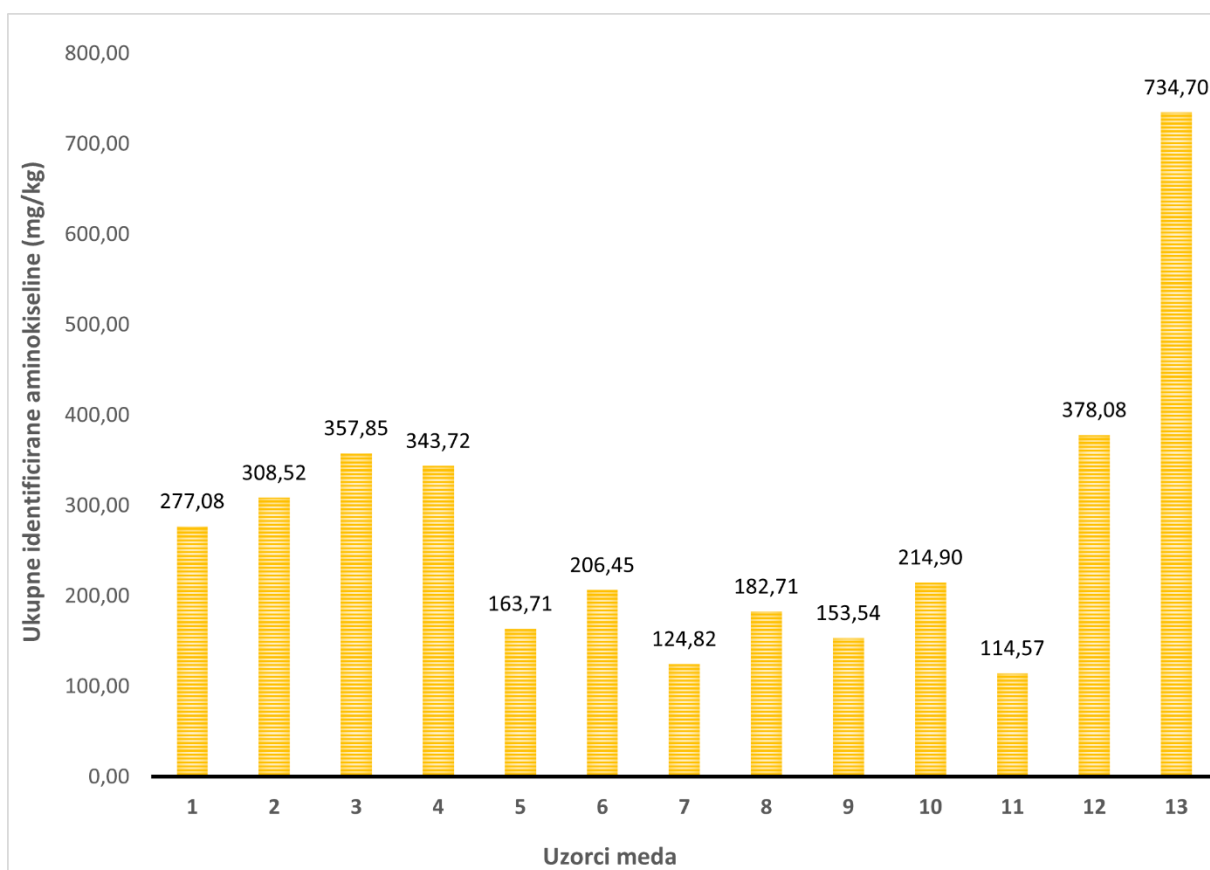
AK	1	2	3	6	12	13
	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO
<b>L-Asp</b>	28,62 ± 4,51	18,21 ± 0,82	59,85 ± 7,87	22,89 ± 2,48	23,05 ± 5,87	119,10 ± 13,66
<b>L-Glu</b>	23,24 ± 1,72	23,65 ± 1,05	29,37 ± 0,98	22,78 ± 1,55	48,29 ± 5,47	146,13 ± 6,37
<b>L-Ser</b>	5,01 ± 0,51	12,69 ± 4,36	10,34 ± 3,01	7,38 ± 2,63	15,18 ± 0,63	33,94 ± 1,58
<b>L-His</b>	0,40 ± 0,24	2,22 ± 0,87	2,12 ± 0,31	0,79 ± 0,19	0,00 ± 0,00	16,04 ± 0,21
<b>Gly</b>	4,69 ± 0,39	5,10 ± 1,84	6,88 ± 1,50	6,08 ± 1,50	10,36 ± 0,86	15,67 ± 0,85
<b>L-Thr</b>	4,05 ± 0,81	11,83 ± 0,80	9,44 ± 0,40	4,40 ± 0,83	14,76 ± 2,53	26,95 ± 0,50
<b>L-Arg</b>	7,09 ± 0,77	20,03 ± 1,24	20,13 ± 0,48	5,59 ± 0,23	12,17 ± 1,93	30,66 ± 0,93
<b>L-Ala</b>	12,24 ± 0,47	15,06 ± 1,60	16,10 ± 0,97	12,12 ± 1,36	20,43 ± 0,60	52,10 ± 0,53
<b>L-Tyr</b>	17,48 ± 1,13	9,17 ± 0,89	15,55 ± 0,53	7,54 ± 0,16	19,07 ± 0,58	18,30 ± 0,24
<b>L-Cys</b>	11,09 ± 0,63	17,18 ± 4,22	20,31 ± 1,30	18,68 ± 1,09	27,58 ± 0,86	57,20 ± 2,57
<b>L-Val</b>	3,97 ± 0,33	8,55 ± 0,76	8,52 ± 0,28	3,73 ± 0,45	10,76 ± 0,93	16,05 ± 0,17
<b>L-Met</b>	0,48 ± 0,11	1,09 ± 0,17	1,12 ± 0,07	0,42 ± 0,25	9,91 ± 1,79	39,66 ± 7,07
<b>L-Trp</b>	0,99 ± 0,68	6,81 ± 0,61	3,04 ± 0,58	0,64 ± 0,50	2,01 ± 0,65	6,74 ± 0,58
<b>L-Phe</b>	49,22 ± 4,40	73,92 ± 4,29	40,36 ± 0,49	21,02 ± 0,78	52,29 ± 3,00	34,78 ± 0,88
<b>L-Ile</b>	3,23 ± 0,36	4,68 ± 0,39	10,26 ± 0,27	2,86 ± 0,29	8,51 ± 0,18	8,16 ± 0,21
<b>L-Leu</b>	2,94 ± 0,41	4,01 ± 0,54	7,39 ± 0,30	3,11 ± 0,20	6,62 ± 0,20	4,74 ± 0,10
<b>L-Lys</b>	1,76 ± 0,86	2,42 ± 0,22	4,14 ± 0,30	1,83 ± 0,61	5,03 ± 0,90	6,86 ± 0,19
<b>L-Pro</b>	100,58 ± 4,48	71,90 ± 11,15	92,92 ± 2,19	64,59 ± 13,98	92,05 ± 7,03	101,62 ± 3,42

SO – standardno odstupanje

Tablica 5 Količina pojedinačnih aminokiselina u ispitivanim medljikovcima od crnogorične medljike (mg/kg)

AK	4	5	7	8	9	10	11
	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO	Srednja vrijednost ± SO
L-Asp	14,87 ± 4,18	7,53 ± 1,28	5,43 ± 0,64	8,23 ± 1,02	6,18 ± 2,43	8,84 ± 0,76	4,22 ± 0,55
L-Glu	25,75 ± 3,27	12,45 ± 0,98	9,98 ± 0,66	13,57 ± 0,87	12,02 ± 2,36	20,68 ± 1,15	6,37 ± 0,48
L-Ser	12,15 ± 3,52	8,70 ± 4,22	7,53 ± 1,37	13,42 ± 3,22	9,48 ± 3,55	9,95 ± 0,10	8,74 ± 3,61
L-His	1,16 ± 0,42	0,73 ± 0,38	0,00 ± 0,00	0,57 ± 0,53	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Gly	6,96 ± 1,60	4,71 ± 1,86	3,88 ± 0,72	6,14 ± 1,46	4,92 ± 1,16	5,73 ± 0,24	4,17 ± 0,97
L-Thr	7,13 ± 0,56	5,77 ± 0,72	3,21 ± 0,53	6,15 ± 1,07	4,90 ± 1,14	7,37 ± 0,47	2,81 ± 0,79
L-Arg	6,34 ± 2,52	3,18 ± 0,35	1,71 ± 0,61	2,26 ± 0,40	2,05 ± 0,56	3,47 ± 0,56	1,33 ± 0,65
L-Ala	12,37 ± 1,29	7,86 ± 1,16	7,02 ± 1,10	9,91 ± 1,12	8,52 ± 1,27	12,08 ± 0,23	6,29 ± 0,92
L-Tyr	8,35 ± 0,92	4,25 ± 0,53	2,72 ± 0,52	4,84 ± 0,62	3,87 ± 0,81	10,89 ± 0,57	1,87 ± 0,43
L-Cys	19,52 ± 2,75	9,87 ± 0,49	14,81 ± 1,75	15,84 ± 1,79	16,17 ± 2,26	20,41 ± 1,90	14,70 ± 0,69
L-Val	4,67 ± 0,45	3,59 ± 0,57	2,67 ± 0,69	4,29 ± 0,39	3,31 ± 0,98	5,36 ± 0,43	2,43 ± 0,47
L-Met	0,34 ± 0,05	0,38 ± 0,08	3,51 ± 0,73	4,45 ± 0,94	3,26 ± 1,96	3,36 ± 0,73	2,19 ± 0,69
L-Trp	1,83 ± 0,07	1,93 ± 0,60	0,47 ± 0,17	0,72 ± 0,46	0,38 ± 0,45	0,94 ± 0,85	0,16 ± 0,27
L-Phe	136,10 ± 5,03	9,33 ± 0,94	6,87 ± 0,59	11,57 ± 0,56	9,20 ± 2,47	25,38 ± 0,99	3,04 ± 0,34
L-Ile	2,09 ± 1,57	2,59 ± 0,35	1,70 ± 0,36	3,04 ± 0,48	2,65 ± 0,54	0,00 ± 0,00	1,29 ± 0,26
L-Leu	3,64 ± 0,28	2,06 ± 0,32	1,27 ± 0,16	2,27 ± 0,51	1,95 ± 0,23	3,77 ± 0,27	1,17 ± 0,36
L-Lys	3,36 ± 0,66	4,38 ± 0,19	1,57 ± 0,06	2,54 ± 0,15	2,20 ± 0,32	3,85 ± 0,69	1,56 ± 0,19
L-Pro	77,11 ± 4,70	74,39 ± 12,57	50,48 ± 9,36	72,91 ± 1,34	62,50 ± 8,37	72,81 ± 1,78	52,27 ± 3,57

SO – standardno odstupanje



**Slika 6** Količina ukupnih identificiranih aminokiselina u ispitivanim medljikovcima (mg/kg)



Tablica 6 Udjeli pojedinačnih aminokiselina u ukupnim aminokiselinama ispitivanih medljikovaca (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>L-Asp</b>	10,3	5,9	16,7	4,3	4,6	11,1	4,3	4,5	4,0	4,1	3,7	6,1	16,2
<b>L-Glu</b>	8,4	7,7	8,2	7,5	7,6	11,0	8,0	7,4	7,8	9,6	5,6	12,8	19,9
<b>L-Ser</b>	1,8	4,1	2,9	3,5	5,3	3,6	6,0	7,3	6,2	4,6	7,6	4,0	4,6
<b>L-His</b>	0,1	0,7	0,6	0,3	0,4	0,4	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2
<b>Gly</b>	1,7	1,7	1,9	2,0	2,9	2,9	3,1	3,4	3,2	2,7	3,6	2,7	2,1
<b>L-Thr</b>	1,5	3,8	2,6	2,1	3,5	2,1	2,6	3,4	3,2	3,4	2,4	3,9	3,7
<b>L-Arg</b>	2,6	6,5	5,6	1,8	1,9	2,7	1,4	1,2	1,3	1,6	1,2	3,2	4,2
<b>L-Ala</b>	4,4	4,9	4,5	3,6	4,8	5,9	5,6	5,4	5,5	5,6	5,5	5,4	7,1
<b>L-Tyr</b>	6,3	3,0	4,3	2,4	2,6	3,7	2,2	2,6	2,5	5,1	1,6	5,0	2,5
<b>L-Cys</b>	4,0	5,6	5,7	5,7	6,0	9,1	11,9	8,7	10,5	9,5	12,8	7,3	7,8
<b>L-Val</b>	1,4	2,8	2,4	1,4	2,2	1,8	2,1	2,3	2,2	2,5	2,1	2,8	2,2
<b>L-Met</b>	0,2	0,4	0,3	0,1	0,2	0,2	2,8	2,4	2,1	1,6	1,9	2,6	5,4
<b>L-Trp</b>	0,4	2,2	0,8	0,5	1,2	0,3	0,4	0,4	0,2	0,4	0,1	0,5	0,9
<b>L-Phe</b>	17,8	24,0	11,3	39,6	5,7	10,2	5,5	6,3	6,0	11,8	2,7	13,8	4,7
<b>L-Ile</b>	1,2	1,5	2,9	0,6	1,6	1,4	1,4	1,7	1,7	0,0	1,1	2,2	1,1
<b>L-Leu</b>	1,1	1,3	2,1	1,1	1,3	1,5	1,0	1,2	1,3	1,8	1,0	1,8	0,6
<b>L-Lys</b>	0,6	0,8	1,2	1,0	2,7	0,9	1,3	1,4	1,4	1,8	1,4	1,3	0,9
<b>L-Pro</b>	36,3	23,3	26,0	22,4	45,4	31,3	40,4	39,9	40,7	33,9	45,6	24,3	13,8

## **5. RASPRAVA**

Med je vrlo vrijedna prehrambena namirnica koja ima bogati sastav i okus. Njegova potražnja na tržištu je sve veća pa zbog toga sve češće dolazi do patvorenja meda. Pod patvorenjem se smatra lažno deklariranje (naziva, sastava, djelovanja meda i njegova podrijetla). Med se krivotvori i dodatkom šećera i šećernih sirupa ili razrjeđivanjem sa vodom (Anklam, 1998; Chen i sur., 2017). Za dokazivanje botaničkog podrijetla meda koristi se melisopalinološka analiza; to je dugotrajna i zahtjevna metoda pa se traže alternativni načini koji će omogućiti brže određivanje botaničkog podrijetla. U tu svrhu razmatra se udio fenolnih tvari, sastav šećera i u novije vrijeme, sastav i udio aminokiselina (Iglesias i sur., 2004). U ovom diplomskom radu analiziralo se 13 uzoraka medljikovaca čije je botaničko podrijetlo dokazano pomoću fizikalno-kemijskih parametara, senzorskih karakteristika i melisopalinološke analize što je prikazano u **Tablici 3.**

Utvrđivanje botaničkog podrijetla meda vrši se utvrđivanjem količine i oblika peludnih zrnaca, odnosno u slučaju medljikovaca i elemenata medne rose (Anklam, 1998; Pavliček i sur., 2022). U **Tablici 3** navedeni su izvori medne rose ispitivanih medljikovaca prema informaciji pčelara odnosno položaju košnica. Prisutnost medne rose je utvrđena u svim uzorcima i preko toga se utvrdio izvor medne rose, a samim time i podrijetlo medljikovaca. Medna rosa sa bjelogoričnog drveća utvrđena je u uzorcima 1, 2, 3, 6, 12 i 13. Uzorak 13 specifična je vrsta medljikovaca od bjelogorice, medljikovac ili medun hrasta sladuna. Medljikovac ili medun hrasta sladuna karakterizira se kao med izrazito tamne do gotovo crne boje sa srednje slatkim i izrazito kiselim okusom te mirisom koji podsjeća na šumski med (Udruga proizvođača Slavenskog meda, 2017). Ima visok udio fenolnih tvari, proteina i prolina te visoku antioksidacijsku sposobnost i enzimsku aktivnost (Flanjak i sur., 2021). Nadalje, kod preostalih uzoraka (4, 5, 7, 8, 9, 10 i 11) izvor medne rose je sa crnogoričnog drveća ili je prevladavajuća medna rosa sa crnogorice. Uzorci 4, 7, 9 i 10 deklarirani su kao „Goranski medun“ kojeg karakterizira tamno bež do crvenkasto-smeđa boja, miris koji podsjeća na smolu, karamel, suho lišće i paljeno drvo te relativno slabija slatkoća; ima povišeni udio minerala i električnu provodnost (Udruga proizvođača meduna, 2018). Što se tiče njihovih melisopalinoloških svojstava, prema Specifikaciji „Goranskog meduna“ (Udruga proizvođača meduna, 2018), moraju prevladavati elementi medne rose - zelene alge, spore gljiva, dijelovi hifa i peludni spektar iz porodica i rodova *Poaceae*, *Plantago* spp., *Filipendula* spp., *Quercus* spp., *Fagus* spp.,

*Artemisia* spp., *Salix* spp., *Helianthemum* spp. Uzorci 8 i 11 deklarirani su kao medljikovci od jele.

Medun hrasta sladuna (uzorak 13) imao je električnu provodnost 1,085 mS/cm, aktivnost dijastaze 37,6 DN, udio vode 16,2 % i količinu HMF-a 1,65 mg/kg; što je u skladu sa zahtjevima specifikacije za medun hrasta sladuna (Udruga proizvođača Slavenskog meda, 2017) te prema podacima objavljenim u radu Flanjak i sur. (2021) za ovu vrstu meda. U usporedbi sa rezultatima iz rada Flanjak i sur. (2021), male su razlike u aktivnosti dijastaze i HMF-a zbog toga što se ovdje analizirao samo 1 uzorak.

Uzorci deklarirani kao „Goranski medun“ imali su sljedeće vrijednosti odabranih analiziranih fizikalno-kemijskih parametara: udio vode 16,8 – 17,7 %; električnu provodnost 1,091 – 1,344 mS/cm; aktivnost dijastaze 20,4 – 30,8 DN; udio HMF-a 0,2 – 1,1 mg/kg (**Tablica 3**).

Određivanje udjela vode je važno jer je to prvi pokazatelj stabilnosti meda. Što je veći udio vode znači da je veća mogućnost fermentacije meda za vrijeme skladištenja (Bogdanov, 2009). Udio vode u medu ne smije prelaziti 20 % (MP, 2015; Vijeće Europske unije, 2002; Codex Alimentarius Commission, 2001). Svi ispitivani uzorci imali su udio vode manji od 20 %, u rasponu od 15,2 % do 18,4 % što znači da zadovoljavaju propisani zahtjev (**Tablica 3**). Električna provodnost je proporcionalna udjelu kiselina i minerala: ako je njihov udio veći, vrijednost električne provodnosti će biti veća. Često se koristi kao rutinska analiza pri određivanju botaničkog podrijetla meda (Bogdanov, 2009). Električna provodnost uzoraka kretala se od 0,915 mS/cm do 2,050 mS/cm (**Tablica 3**). Za medljikovce ona ne smije biti manja od 0,8 mS/cm te svi analizirani uzorci zadovoljavaju ovaj parametar razlikovanja (MP, 2015; Vijeće Europske unije, 2002; Codex Alimentarius Commission, 2001). Aktivnost dijastaze izražena kao dijastatski broj (DN) za većinu vrsta meda, pa tako i medljikovce, ne smije biti manja od 8. Svi uzorci zadovoljavaju ovaj parametar, jer je najmanja vrijednost aktivnosti dijastaze iznosila 17,5 (uzorak 5), a najveća 54,3 (uzorak 1) (**Tablica 3**). Udio HMF-a, koji se koristi kao parametar svježine odnosno procesiranja meda, ne smije prelaziti 40 mg/kg (MP, 2015; Vijeće Europske unije, 2002; Codex Alimentarius Commission, 2001). Svi uzorci su ispod zadane granice sa vrijednostima 0,2 do 4,2 mg/kg što ukazuje da su svi analizirani uzorci svjež i pravilno procesirani (**Tablica 3**).

U radu Pavliček i sur. (2022) udio vode u 2 analizirana uzorka medljikovaca iznosio je 16,5 % i 17,4 %, a aktivnost dijastaze (DN) 17 – 48; što su vrlo slične vrijednosti rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Električna provodnost je 0,84 mS/cm i 1,10 mS/cm, a udio HMF-a 3,1 mg/kg i 31,6 mg/kg. Glavna razlika je u vrijednostima HMF-a, koje su znatno više u istraživanju koje su objavili Pavliček i sur. (2022). HMF je prirodno prisutan u svježem medu u vrlo niskim koncentracijama. Ako je temperatura okoliša iznad 20 °C, ako se med zagrijavao na visokim temperaturama, neprikladno skladištenje i/ili krivotvorio dodatkom invertnog šećera ili sirupa; vrijednost HMF-a brzo raste (Pita-Calvo i sur., 2017). Nepravilno procesiranje i starost uzoraka mogući su uzroci razlika.

Šarić i sur. (2008) su određivali fizikalno-kemijske parametre na pet uzorka hrvatskih medljikovaca. Udio vode im je iznosio 15,0 % – 20,2 %, što je usporedivo sa rezultatima ovog istraživanja. Vrijednosti ostalih parametara bile su: električna provodnost 0,68 mS/cm – 1,45 mS/cm; aktivnost dijastaze 12,8 – 35,0 DN; udio HMF-a 1,3 mg/kg – 2,1 mg/kg. U odnosu na rezultate navedenog istraživanja, ispitivani uzorci iz ovoga rada imaju veće vrijednosti električne provodnosti i aktivnosti dijastaze te veći raspon vrijednosti HMF-a.

Primorac i sur. (2009) su proveli istraživanje na 16 uzoraka hrvatskih medljikovaca. Dobiveni rezultati za udio vode (14,9 % - 17,5 %), aktivnost dijastaze (16,6 DN – 40,2 DN) i količinu HMF-a (0,0 – 3,9 mg/kg) su usporedivi sa rezultatima ovog istraživanja; dok vrijednosti za električnu provodnost (0,81 mS/cm – 1,16 mS/cm) nisu usporedive jer su niže od onih dobivenih u ovom istraživanju.

Kao što je vidljivo u **Tablici 3**, svi ispitivani uzorci zadovoljavaju uvjete senzorske analize; ispitivana senzorska svojstva su miris, boja, okus i kristalizacija. Boja se kreće od tamne do vrlo tamne sa zelenom nijansom. Srednje su slatkoće i intenziteta arome, a u aromi i mirisu izražen je „drvenasti“ ton. Ponekad ostavljaju naknadni okus u ustima, ali bez gorčine i sa slabom kiselosti. Imaju veliku viskoznost zbog malog udjela vode i sporo kristaliziraju (Persano Oddo i Piro, 2004).

Vrijednosti pojedinačnih aminokiselina (AK) u uzorcima medljikovaca od bjelogorične medljike prikazani su u **Tablici 4**. Najzastupljenije su sljedeće AK: prolin (64,59 mg/kg - 101,62 mg/kg), fenilalanin (21,02 mg/kg - 73,92 mg/kg), asparaginska kiselina (18,21 mg/kg – 119,10 mg/kg) i glutaminska kiselina (22,78 mg/kg – 146,13 mg/kg). U najmanjim količinama ima: histidina

(0,00 mg/kg – 16,04 mg/kg), metionina (0,42 mg/kg – 39,66 mg/kg) i triptofana (0,64 mg/kg - 6,81 mg/kg).

Kako je vidljivo iz **Tablice 4** medljikovac hrasta sladuna (uzorak 13) karakterizira veliki udio prolina ( $101,62 \pm 3,42$  mg/kg), ali kod ovog uzorka se ističu i glutaminska kiselina ( $146,13 \pm 6,37$  mg/kg) i asparaginska kiselina ( $119,10 \pm 13,66$  mg/kg) koje bi se mogle koristiti kao mogući markeri, ali su za potvrdu potrebna dodatna istraživanja. U najmanjem udjelu ima leucina ( $4,74 \pm 0,10$  mg/kg).

Količine pojedinačnih aminokiselina u uzorcima medljikovaca od crnogorične medljike prikazane su u **Tablici 5**. Najzastupljenije AK su prolin ( $50,48$  mg/kg –  $77,11$  mg/kg) i cistein ( $9,87$  mg/kg –  $20,41$  mg/kg); a najmanje zastupljene su histidin ( $0,00$  mg/kg -  $1,16$  mg/kg), izoleucin ( $0,00$  mg/kg –  $3,04$  mg/kg) i metionin ( $0,34$  mg/kg –  $4,45$  mg/kg).

U **Tablici 5** mogu se vidjeti količine pojedinačnih aminokiselina uzoraka 4, 7, 9 i 10 deklariranih kao „Goranski medun“. Količina prolina u tim uzorcima se kreće od  $50,48$  mg/kg do  $77,11$  mg/kg, a ističu se po visokim količinama cisteina  $14,81$  mg/kg -  $20,41$  mg/kg. Uzorak 4 ima najveću količinu fenilalanina ( $136,10 \pm 5,03$  mg/kg) u odnosu na sve ispitivane uzorke. Prema sastavu i udjelu AK, uzorci 4 i 10 imaju viši udio Phe, Glu, Ala i Cys od ostalih medljikovaca od crnogorične medljike pa se može zaključiti da ta dva uzorka imaju više elemenata bjelogorice. Naime, prema specifikaciji „Goranski medun“ potječe od medne rose sa smreke ili jele u kombinaciji sa bjelogoričnim zajednicama javora i bukve što može biti jedan od uzroka viših vrijednosti navedenih aminokiselina (Udruga proizvođača meduna, 2018).

Dva su uzorka prema informaciji pčelara odnosno položaju košnica deklarirana kao medljikovac od jele (uzorak 8 i 11), čije vrijednosti pojedinačnih AK se nalaze u **Tablici 5**. Dominantna AK u oba uzorka je prolin čije su vrijednosti iznosile:  $72,91 \pm 1,34$  mg/kg (uzorak 8) i  $52,27 \pm 3,57$  mg/kg (uzorak 11); zatim cistein sa vrijednošću  $15,84 \pm 1,79$  mg/kg (uzorak 8) i  $14,70 \pm 0,69$  mg/kg (uzorak 11). Najmanje zastupljene aminokiseline su histidin ( $0,00$  mg/kg;  $0,57$  mg/kg) i triptofan ( $0,16$  mg/kg;  $0,72$  mg/kg). **Tablica 6** prikazuje udio pojedinačnih AK u odnosu na ukupne AK. Udio glutaminske kiseline u ukupnim AK (7,4 % za uzorak 8 i 5,6 % za uzorak 11) se mogu usporediti sa vrijednostima za udio glutaminske u ukupnim AK iz rada Shaaban i sur. (2020), koje su 6 – 16 %. U uzorcima 8 i 11 u većem udjelu ima prolina (39,9 %; 45,6 %) i serina (7,3 %; 7,6%) od vrijednosti tih AK iz rada Shaaban i sur. (2020).

Količina ukupnih aminokiselina u ispitivanim medljikovcima je prikazana na **Slici 6**. Raspon ukupnih identificiranih AK medljikovaca od bjelogorične medljike se kreće od 206,45 do 734,70 mg/kg, a medljikovaca od crnogorične medljike 114,57 – 343,72 mg/kg. Najviše se ističe uzorak 13, medun hrasta sladuna, sa ukupnom vrijednosti AK od 734,70 mg/kg koja je za 50 % i više veća od ukupnih AK u ostalim ispitivanim uzorcima.

Razlike u udjelima pojedinačnih AK u ukupnim AK možemo vidjeti u **Tablici 6** gdje su rezultati izraženi u postotcima. Prema podacima iz **Tablice 6**, najzastupljenije AK u medljikovcima su: Pro (13,8 – 45,6 %), Phe (2,7 – 39,6 %), Asp (3,7 – 16,7 %), Glu (5,6 – 19,9 %) i Cys (4,0 – 12,8 %). Najmanje zastupljene su: His (0,0 – 2,2 %), Lys (0,6 – 2,7 %), Met (0,1 – 5,4 %), Trp (0,1 – 2,2 %) i Leu (0,6 – 2,1 %). Ovi podatci odgovaraju onima koje su objavili Iglesias i sur. (2004).

Vrijednost za ukupni udio AK poljskog medljikovca iznosi  $749,15 \pm 70,46$  mg/kg; ta vrijednost je usporediva sa ukupnim udjelom AK meduna hrasta sladuna što iznosi 734,70 mg/kg; a u odnosu na ostale uzorke (114,57 – 378,08 mg/kg), poljski medljikovac ima veći ukupni udio AK. Vrijednost ukupnih AK meduna hrasta sladuna usporediva je sa vrijednostima poljskih medljikovaca, različita geografska podrijetla, analiziranih u radu Łozowicka i sur. (2021) čije vrijednosti su  $739,0 \pm 54,0$  mg/kg i  $728,9 \pm 40,0$  mg/kg.

U usporedbi sa medljikovcem iz Srbije (Sakač i sur., 2019), medljikovci analizirani u ovom istraživanju imaju veće udjele asparaginske kiseline i cisteina, dok sve ostale AK su u manjem udjelu. Ono što se ističe kod srpskog šumskog meda (medljikovac) je da ima veliku količinu serina, valina i izoleucina (109; 109; 60,1 mg/kg) u odnosu na medljikovce iz ovog istraživanja što bi se moglo koristiti kao parametar za njihovo razlikovanje.

## **6. ZAKLJUČCI**



---

Iz rezultata dobivenih u ovom istraživanju, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- najzastupljenije aminokiseline u medljikovcima su prolin (50,48 – 101,62 mg/kg), glutaminska kiselina (6,37 – 146,13 mg/kg), fenilalanin (3,04 – 136,10 mg/kg), asparaginska kiselina (4,22 – 119,10 mg/kg) i cistein (9,87 – 57,20 mg/kg); dok su najmanje zastupljene aminokiseline histidin (0,00 – 16,04 mg/kg), lizin (1,56 – 6,86 mg/kg), metionin (0,34 – 39,66 mg/kg), triptofan (0,16 – 6,81 mg/kg) i leucin (1,17 – 7,39 mg/kg);
- medljikovci od bjelogorične medljike imaju više ukupnih aminokiselina od uzoraka kojima je podrijetlo crnogorična medljika ili gdje prevladava crnogorična medljika;
- mogući markeri za razlikovanje medljikovca hrasta sladuna od ostalih medljikovaca su visok udio glutaminske kiseline ( $146,13 \pm 6,37$  mg/kg) i asparaginske kiseline ( $119,10 \pm 13,66$  mg/kg) kojih u ostalim uzorcima ima u znatno manjim količinama, visok udio prolina ( $101,62 \pm 3,42$  mg/kg) i ukupnih aminokiselina (734,70 mg/kg) te ističe se histidin, u udjelu od  $16,04 \pm 0,21$  mg/kg, koji se u ostalim uzorcima nalazi u vrlo malim količinama ili je odsutan, no potrebna su daljnja istraživanja za potvrdu ovih hipoteza;
- količina prolina u uzorcima „Goranskog meduna“ se kreće od 50,48 mg/kg do 77,11 mg/kg, a specifičnost ove vrste medljikovaca je visok udio cisteina (14,81 mg/kg - 20,41 mg/kg).

## **7. LITERATURA**

- Ahuja S: *Chromatography and Separation Science*. Academic Press, San Diego, 2003.
- Anklam E: A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 63:549-562, 1998.
- Azevedo MS, Seraglio SKT, Rocha G, Balderas CB, Piovezan M, Gonzaga LV, de Barcellos Falkenberg D, Fett R, de Oliviera MAL, Costa ACO: Free amino acid determination by GC-MS combined with a chemometric approach for geographical classification of bracatinga honeydew honey (*Mimosa scabrella* Bentham). *Food Control* 78:383-392, 2017.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- Bernal JL, Nozal MJ, Toribio L, Diego JC, Ruiz A: A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. *Journal of Separation Science* 28:1039-1047, 2005.
- Bilikova K, Kristof Krakova T, Yamaguchi K, Yamaguchi Y: Major royal jelly proteins as markers of authenticity and quality of honey. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 66:259-267, 2015.
- Bogdanov S: Harmonised methods of the international honey commission. *International honey commission (IHC)*, 1-63, 2009.
- Broznić D, Ratkaj I, Malenica Staver M, Kraljević Pavelić S, Žurga P, Bubalo D, Gobin I: Evaluation of the Antioxidant Capacity, Antimicrobial and Antiproliferative Potential of Fir (*Abies alba* Mill.) Honeydew Honey Collected from Gorski kotar (Croatia). *Food Technology & Biotechnology* 56:533-545, 2018.
- Chen H, Jin L, Chang Q, Peng T, Hu X, Fan C, Pang G, Lu M, Wang W: Discrimination of botanical origins for Chinese honey according to free amino acids content by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection with chemometric approaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97:2042-2049, 2017.
- Codex Alimentarius Commission: Revised Codex Standard for Honey, CXS 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2 (2001), Amn. 2019.
- Cotte JF, Casabianca H, Giroud B, Albert M, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF: Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:1342-1350, 2004.

- Cviljević S, Bilić Rajs B, Primorac Lj, Strelec I, Gal K, Cvijetić Stokanović M, Penava A, Mindum A, Flanjak I: Antibacterial activity of chestnut honey (*Castanea sativa* Mill.) against *Helicobacter pylori* and correlation to its antioxidant capacity. *Hrana u zdravlju i bolesti* 9:52-56, 2020.
- Denžić Lugomer M, Pavliček D, Kiš M, Končurat A, Majnarić D (2017): Quality assessment of different types of Croatian honey between 2012 and 2016. *Veterinarska stanica* 48:93-99, 2017.
- Díez MJ, Andrés C, Terrab A: Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *International Journal of Food Science and Technology* 39:167–176, 2004.
- Esteraf-Oskouei T i Najafi M: Traditional and Moderns Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 16:731-742, 2013.
- Flanjak I, Bilić Rajs B, Lončarić Z, Kerovec D, Primorac LJ: *Quercus frainetto* honeydew honey from Croatia: composition and properties. *Journal of Apicultural Research* 60: 67-72, 2021.
- González Paramás AM, Gómez Bárez JA, Cordón Marcos C, García-Villanova RJ, Sánchez Sánchez J: HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry* 95:148-156, 2006.
- Güneş ME, Şahin S, Demir C, Borum E, Tosunoğlu A: Determination of phenolic compounds profile in chestnut and floral honeys and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Food Biochemistry* 41:e12345, 2016.
- Hermosín I, Chicón RM, Cabezudo MD: Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 83:263-268, 2003.
- HPS, Hrvatski pčelarski savez: Pravilnik ocjenjivanja kvalitete meda na natjecanjima u Republici Hrvatskoj, 2010.
- Iglesias MT, de Lorenzo C, del Carmen Polo M, Martín-Álvarez PJ, Pueyo E: Usefulness of Amino Acid Composition To Discriminate between Honeydew and Floral Honeys. Application to Honeys from a Small Geographic Area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:84-89, 2004.
- Iglesias MT, Martín-Álvarez PJ, Polo MC, de Lorenzo C, González M, Pueyo E: Changes in the Free Amino Acid Contents of Honeys During Storage at Ambient Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9099-9104, 2006.

- Jerković I, Marijanović Z: Oak (*Quercus frainetto* Ten.) Honeydew Honey – Approach to Screening of Volatile Organic Composition and Antioxidant Capacity (DPPH and FRAP Assay). *Molecules* 15:3744-3756, 2010.
- Krakar D: Karakteristike meduna hrasta sladuna iz Požeške kotline. *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi* 1:375-397, 2012.
- Kurtagić H: Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti* 6:28-35, 2017.
- Lasić D, Bubalo D, Bošnjir J, Šabarić J, Konjačić M, Dražić M, Racz A (2018): Influence of the Botanical and Geographical Origin on the Mineral Composition of Honey. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 83:335-343, 2018.
- Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G: Methods of Melissopalynology. *International Commission for Bee Botany* 139– 153, 1978.
- Łozowicka B, Kaczyński P, Iwaniuk P: Analysis of 22 free amino acids in honey from Eastern Europe and Central Asia using LC-MS/MS technique without derivatization step. *Journal of Food Composition and Analysis* 98:103837, 2021.
- Maddocks SE i Jenkins RE: Honey: a sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance?. *Future Microbiology* 8:1419-1429, 2013.
- Mandić ML: *Znanost o prehrani: hrana i prehrana u čuvanju zdravlja*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Mato I, Huidobro JF, Simal-Lozano J, Sancho MT: Rapid Determination of Nonaromatic Organic Acids in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:1541-1550, 2006.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG: Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry* 91:571-577, 2005.
- Miloš M: *Osnove biokemije*. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2009.
- MP, Ministarstvo poljoprivrede: *Naziv „Slavonski med“ registriran na EU razini*, 2018.  
<https://poljoprivreda.gov.hr/vijesti/naziv-slavonski-med-registriran-na-eu-razini/669>  
[08.10.2022]

- MP, Ministarstvo poljoprivrede: *Pravilnik o medu*. Narodne novine 53/15, 2015.
- MP, Ministarstvo poljoprivrede: ZOI Goranski medun – u postupku registracije, 2021. <https://poljoprivreda.gov.hr/istaknute-teme/hrana-111/oznake-kvalitete/zoi-zozp-zts-poljoprivrednih-i-prehrambenih-proizvoda/zasticena-oznaka-izvornosti-zoi/zoi-goranski-medun-u-postupku-registracije/4075> [08.10.2022]
- MPRRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o kakvoći uniflornog meda*. Narodne novine 122/09, 2019.
- Mujić I, Alibabić V, Travljanin D: *Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda*. Veleučilište u Rijeci, Rijeka, 2014.
- Nozal MJ, Bernal JL, Toribio ML, Diego JC, Ruiz A: Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1047:137-146, 2004.
- Pavliček D, Furmeg S, Jaki Tkalec V, Denžić Lugomer M, Novosel T: Ispitivanje kakvoće meda na hrvatskom tržištu u razdoblju 2019.-2021. godine. *Veterinarska stanica* 53:513-523, 2022.
- Pereira V, Pontes M, Câmara JS, Marques JC: Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure. *Journal of Chromatography A* 1189:435–443, 2008.
- Pérez RA, Iglesias MT, Pueyo E, González M, de Lorenzo C: Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:360-365, 2007.
- Persano Oddo L i Piro R: Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* 35:38-81, 2004.
- Pita-Calvo C, Guerra-Rodriguez ME, Vázquez M: Analytical Methods Used in the Quality Control of Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:690-703, 2017.
- Pita-Calvo C i Vázquez M: Honeydew Honeys: A Review on the Characterization and Authentication of Botanical and Geographical Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66:2523-2537, 2018.

- Poboży E, Czarkowska W, Trojanowicz M: Determination of amino acids in saliva using capillary electrophoresis with fluorimetric detection. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 67:37-47, 2006.
- Primorac LJ, Angelkov B, Mandić ML, Kenjerić D, Nedeljko M, Flanjak I, Perl Pirički A, Arapceska M: Usporedba hrvatskog i makedonskog medljikovca. *Journal of Central European Agriculture* 10:263-270, 2009.
- Primorac LJ, Flanjak I, Kenjerić D, Bubalo D, Topolnjak Z: Specific Rotation and Carbohydrate Profile of Croatian Unifloral Honeys. *Czech Journal of Food Sciences* 29:515-519, 2011.
- Rebane R i Herodes K: A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl etoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. *Analytica Chimica Acta* 672:79-84, 2010.
- Sakač MB, Jovanov PT, Marić AZ, Tomičić ZM, Pezo LL, Dapčević Hadnađev TR, Novaković AR: free amino acid profiles of honey samples from Vojvodina (Republic of Serbia). *Food and Feed Research* 46:179-187, 2019.
- Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F: Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy Research* 9:121-127, 2017.
- Sarwar G i Botting HG: Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *Journal of Chromatography* 615:1-22, 1993.
- Seraglio SKT, Silva B, Bergamo G, Brugnerotto P, Gonzaga LV, Fett R, Costa ACO: An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Research International* 119:44-66, 2019.
- Shaaban B, Seeburger V, Schroeder A, Lohaus G: Sugar, amino acid and inorganic ion profiling of the honeydew from different hemipteran species feeding on *Abies alba* and *Picea abies*. *PLoS ONE* 15:e0228171, 2020.
- Shapla UM, Solayman M, Alam N, Khalil MI, Gan SH: 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal* 12:1-18, 2018.

- Shen S, Wang J, Chen X, Liu T, Zhuo Q, Zhang SQ: Evaluation of cellular antioxidant components of honeys using UPLC-MS/ MS and HPLC-FLD based on the quantitative composition-activity relationship. *Food Chemistry* 293:169-177, 2019.
- Šarić G, Matković D, Hruškar M, Vahčić N: Characterisation and Classification of Croatian Honey by Physicochemical Parameter. *Food Technology and Biotechnology* 46:355–367, 2008.
- Šimić F: *Naše medonosno bilje*. Znanje, Zagreb, 1980.
- Udruga proizvođača meduna: Goranski medun oznaka izvornosti Specifikacija proizvoda, 2018. [https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/proizvodi\\_u\\_postupku\\_zastite-zoi-zozp-zts/Specifikacija\\_Goranski\\_Medun.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/proizvodi_u_postupku_zastite-zoi-zozp-zts/Specifikacija_Goranski_Medun.pdf) [09.08.2022.]
- Udruga proizvođača Slavenskog meda: Slavonski med oznaka izvornosti Specifikacija proizvoda, 2017. [https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/86/Izmijenjena\\_Specifikacija\\_proizvoda-Slavonski\\_med\\_.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/86/Izmijenjena_Specifikacija_proizvoda-Slavonski_med_.pdf) [10.09.2022.]
- Vahčić N, Matković D: Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda, 2009. <https://pdfcoffee.com/kemijske-fizikalne-i-senzorske-karakteristike-meda-pdf-free.html> [15.08.2022.]
- Vijeće Europske Unije: Direktiva vijeća 2001/110/EC od 20. prosinca 2001. o medu. Službeni list Europske Unije, L10:47-52, 2002.
- Von der Ohe W, Persano Oddo L, Piana ML, Morlot M, Martin P: Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* 35:18-25, 2004.
- Web 1: [https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/86/Izmijenjena\\_Specifikacija\\_proizvoda-Slavonski\\_med\\_.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/86/Izmijenjena_Specifikacija_proizvoda-Slavonski_med_.pdf) [6.9.2022]
- Web 2: [https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/proizvodi\\_u\\_postupku\\_zastite-zoi-zozp-zts/Specifikacija\\_Goranski\\_Medun.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/proizvodi_u_postupku_zastite-zoi-zozp-zts/Specifikacija_Goranski_Medun.pdf) [28.08.2022]
- Web 3: [https://www.bionet-skola.com/w/Datoteka:Tablica\\_aminokiselina.jpg](https://www.bionet-skola.com/w/Datoteka:Tablica_aminokiselina.jpg) [28.08.2022]
- Wu G: Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Springer* 37:1-17, 2009.