

# Parametri kvalitete i antioksidativni kapacitet meda od bršljana (*Hedera helix* L.)

---

**Zebec, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:109:926953>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-22**

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**

**Ana Zebec**

**PARAMETRI KVALITETE I ANTIOKSIDATIVNI  
KAPACITET MEDA OD BRŠLJANA (*HEDERA HELIX L.*)**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

**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 održanoj 28. lipnja 2024.  
**Mentor:** prof. dr. sc. Ivana Flanjak

### PARAMETRI KVALITETE I ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET MEDA OD BRŠLJANA (*HEDERA HELIX L.*)

Ana Zebec, 0011167818

#### Sažetak:

Med je proizvod visoke nutritivne vrijednosti, a na tržištu se mogu naći mnoge vrste meda, od prepoznatljivih vrsta koje se pojavljuju svake godine, do rijetkih uniflornih vrsta čija pojavnost ovisi o klimatskim uvjetima i dostupnosti izvora nektara i/ili medne rose ili se pojavljuju samo na određenom geografskom području. U ovom diplomskom radu određeni su fizikalno-kemijski parametri, udio ukupnih fenola, antioksidativni kapacitet rijetke uniflorne vrste meda od bršljana (*Hedera helix L.*) s ciljem karakterizacije, a statističkom obradom rezultata testirana je razlika u odabranim parametrima prema regiji prikupljanja uzoraka. Osim toga, ispitane su senzorske karakteristike kako bi se dobio potpuniji opis meda. Prema dobivenim rezultatima, med od bršljana karakterizira nizak omjer fruktoze i glukoze (F/G), visok omjer glukoze i vode (G/W) što ukazuje na brzu kristalizaciju ove vrste meda te visoka slobodna kiselost. Udio ukupnih fenola iznosio je  $146,70 \pm 17,09$  mg galne kiseline/kg meda, a FRAP vrijednost  $295,51 \pm 35,88$   $\mu\text{M Fe (II)}$ . Statistička obrada podataka pokazala je da se uzorci iz dviju regija Republike Hrvatske statistički značajno razlikuju prema udjelu vode, električnoj provodnosti, aktivnosti dijastaze te FRAP vrijednostima. Za opis ove specifične vrste meda i potvrdu preliminarnih rezultata potrebno je provesti analizu na većem broju uzoraka kako bi se dobio bolji i potpuniji uvid u karakteristike meda od bršljana i dao prijedlog za preporučene raspone vrijednosti za parametre kvalitete za potvrdu uniflornosti.

**Ključne riječi:** med, botaničko podrijetlo, karakterizacija, parametri kvalitete, antioksidativni kapacitet

**Rad sadrži:** 48 stranica  
12 slika  
4 tablice  
0 priloga  
42 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	doc. dr. sc. <i>Blanka Bilić Rajs</i>	predsjednik
2.	prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i>	član-mentor
3.	prof. dr. sc. <i>Đurđica Ačkar</i>	član
4.	prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>	zamjena člana

**Datum obrane:** 26. rujna 2024.

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

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

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Food Quality Control

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. IX held on 28 June 2024.

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

### QUALITY PARAMETERS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF IVY (*HEDERA HELIX L.*) HONEY

*Ana Zebec, 0011167818*

#### Summary:

Honey is a product of high nutritional value, and many types of honey can be found on the market, from common types that appear every year, to rare unifloral types whose appearance depends on climatic conditions and the availability of nectar and/or honeydew or they appear only in a specific geographical area. In this study, the physicochemical parameters, the total phenolic content, and the antioxidant capacity of a rare unifloral type of ivy honey (*Hedera helix L.*) were determined with the aim of characterization and statistical analysis of the results tested the difference in the selected parameters according to the region of sample collection. In addition, the sensory characteristics were determined to obtain a more complete description of this honey type. Based on the obtained results, ivy honey is characterized by a low ratio of fructose and glucose (F/G), a high ratio of glucose and water (G/W), which indicates rapid crystallization of this type of honey, and high free acidity. The average total phenolic content was  $146.70 \pm 17.09$  mg gallic acid/kg honey, and FRAP value was  $295.51 \pm 35.88$   $\mu\text{M Fe (II)}$ . Statistical analysis showed that the samples from the two regions of the Republic of Croatia differ significantly in terms of water content, electrical conductivity, diastase activity and FRAP values. For description of this specific type of honey and confirmation of preliminary results, it is necessary to perform an analysis on a larger number of samples to get a better and more complete insight into the characteristics of ivy honey and to make a proposal for recommended values for quality parameters to confirm uniflorality.

**Key words:** honey, botanical origin, characterisation, quality parameters, antioxidant capacity

**Thesis contains:** 48 pages  
12 figures  
4 tables  
0 supplements  
46 references

**Original in:** Croatian

#### Review and defence committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Blanka Bilić Rajs</i> , PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, prof.               | supervisor   |
| 3. <i>Đurđica Ačkar</i> , PhD, prof.               | member       |
| 4. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof.               | stand-in     |

**Defence date:** September 26, 2024.

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

**DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA**

26.09.2024.

**TE OCIJENJEN USPJEHOM**

izvrstan (5)

**Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:**

**1. doc. dr. sc. Blanka Bilić Rajs**

predsjednik



(potpis)

**2. prof. dr. sc. Ivana Flanjak**

član



(potpis)

**3. prof. dr. sc. Đurđica Ačkar**

član



(potpis)

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. DEFINICIJA I VRSTE MEDA NA TRŽIŠTU</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. BOTANIČKO PODRIJETLO MEDA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3.1. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara</b> .....	<b>6</b>
2.3.1.1. Boja .....	7
2.3.1.2. Optička aktivnost .....	7
2.3.1.3. Električna provodnost .....	7
2.3.1.4. Ugljikohidrati .....	8
2.3.1.5. pH i kiselost .....	8
2.3.1.6. Aminokiseline i proteini .....	9
2.3.1.7. Dijastaza i invertaza .....	9
2.3.1.8. Voda .....	10
2.3.1.9. Hidroksimetilfurfual (HMF) .....	10
2.3.1.10. Mineralne tvari .....	10
<b>2.3.2. Melisopalinološka analiza</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3.3. Senzorska analiza meda</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET MEDA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5. MED OD BRŠLJANA</b> .....	<b>17</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.1. Određivanje udjela vode</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.2. Određivanje električne provodnosti</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.3. Određivanje aktivnosti dijastaze Phadebas metodom</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.4. Određivanje slobodne kiselosti i pH vrijednosti</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2.5. Određivanje hidroksimetilfurfural-a (HMF) u medu</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.7. Određivanje sastava ugljikohidrata u medu</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.8. Određivanje ukupnih fenola</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.9. Određivanje antioksidativnog kapaciteta</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.10. Senzorska analiza meda</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2.11. Statistička obrada rezultata</b> .....	<b>25</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>26</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>34</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>42</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>44</b>



## Popis oznaka, kratica i simbola

IHC	Međunarodna komisija za med (engl. <i>International Honey Commission</i> )
AOAC	Međunarodno udruženje službenih analitičkih kemičara (engl. <i>Association of Analytical Communities</i> )
MPRRR	Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja
HMF	Hidroksimetilfurfural
DN	Dijastatski broj
FRAP	Antioksidacijska sposobnost redukcije željeza (engl. <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
F+G	Zbroj udjela fruktoze i glukoze
F/G	Omjer udjela fruktoze i glukoze
G/W	Omjer udjela glukoza i vode



## **1. UVOD**

Med je prirodni prehrambeni proizvod, složenog fizikalno-kemijskog sastava uz širok spektar organoleptičkih karakteristika što ga čini najpoželjnijim pčelinjim proizvodom. Raznolikost ovog prehrambenog proizvoda u sastavu i svojstvima ovisi o medonosnim biljnim vrstama i/ili sekretu živih dijelova biljaka, geografskom području, godišnjem dobu te uvjetima skupljanja i skladištenja meda (Makowicz i sur., 2018; Svečnjak i sur., 2015; Tafere, 2021). Kompleksan fizikalno-kemijski sastav vidljiv je u činjenici da med čini više od 200 različitih spojeva od kojih su neki enzimi, proteini, polifenoli, flavonoidi, minerali, vitamini te ugljikohidrati. Potonje navedeni spojevi zaslužni su za visoku slatkoću meda (Fратиanni i sur., 2021). Zahvaljujući širokoj paleti bioaktivnih spojeva, med je od davnina korišten kao alternativni izvor za liječenje različitih oboljenja. Naime, bioaktivni spojevi u medu imaju antimikrobno, antioksidativno, antifungalno, antitumorsko i antikarcinogeno djelovanje (Kolaylı i sur., 2017). Kompleksan sastav meda doveo je do razvoja zahtjevnih i složenih analitičkih metoda koje se primjenjuju pri kontroli kvalitete ove namirnice. One uključuju određivanje različitih fizikalno-kemijskih parametara, senzorsku i melisopalinološku analizu. Botaničko i geografsko podrijetlo nektara ili medljike značajno utječu na konačni kemijski sastav meda, a shodno tome i na označavanje proizvoda. Nektar različitih biljnih vrsta doprinosi različitim omjerima ukupnog sastava svakog uzorka meda. Svojstva dva meda istog botaničkog, ali različitog geografskog podrijetla mogu varirati zbog razlike u klimatskim uvjetima i vegetaciji u različitim regijama (Lazarević i sur., 2017; Svečnjak i sur., 2015).

Cilj ovog diplomskog rada je provedba karakterizacije posebne vrste meda, meda od bršljana. Uzorci ove specifične vrste meda prikupljeni su sa različitih lokacija na području Republike Hrvatske te je provedena sveobuhvatna analiza namijenjena klasifikaciji njegovih svojstava.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. DEFINICIJA I VRSTE MEDA NA TRŽIŠTU

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

Med se dijeli prema podrijetlu te prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja. Prema podrijetlu, med može biti cvjetni ili nektarni med i medljikovac ili medun. Cvjetni med dobiven je od nektara biljaka, a medljikovac se u pravilu dobiva od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka (MPRRR, 2015).

Prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja nekoliko je vrsta meda: med u saću, med sa saćem ili med s dijelovima saća, cijedeći, vrcani, prešani i filtrirani med. Med kojeg skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća karakteristika je meda od saća. Med sa saćem ili njegovim dijelovima je vrsta koja sadrži jedan ili više proizvoda meda od saća. Ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla dobiva se cijedeći med. Vrcani med proizvodi se vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla. Za proizvodnju prešanog meda potrebno je provesti prešanje saća bez legla, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45 °C. Uklanjanjem stranih anorganskih ili organskih tvari što rezultira značajnim uklanjanjem peludi dobiva se filtrirani med (MPRRR, 2015).

Na tržištu je osim navedenih vrsta, dostupan i med za industrijsku uporabu. To je vrsta meda koji se koristi u industriji ili kao sastojak hrane koja se potom prerađuje i može imati strani okus ili miris, biti u stanju vrenja ili prevrilo ili biti pregrijan. Također, ovaj proizvod trebao bi imati oznaku „namijenjeno isključivo za kuhanje i pečenje“ u blizini imena proizvoda (MPRRR, 2015; MP, 2017; Council of the European Union, 2002).

## 2.2. BOTANIČKO PODRIJETLO MEDA

Senzorska i fizikalna svojstva te kemijski sastav meda ovise o botaničkom podrijetlu te regionalnim i klimatskim uvjetima područja u kojem se med proizvodi (Ramzi i sur., 2017).

Međunarodna komisija za med (*IHC – International Honey Commission*) osnovana je 1990. godine s ciljem istraživanja meda te povećanja svijesti o njegovoj kvaliteti. Glavna misija Međunarodne komisije za med je poboljšanje postojećih metoda analize te predlaganje novih kriterija prilikom određivanja kvalitete meda (Persano Oddo i sur., 2004).

Činjenica koju treba uzeti u obzir prilikom određivanja botaničkog podrijetla meda je ta da niti jedan med nije u potpunosti isti kao drugi. Razlog tomu je prisutnost širokog spektra mogućih izvora iz kojih med nastaje. Na primjer, nektar i/ili medna rosa koji potječu od velikog broja različitih biljaka razlikuju se, te shodno tomu ne možemo reći kako su dva meda iste vrste potpuno identični. Također, geografski čimbenici kao što su klima, kiselost tla ili drugi pedološki uvjeti mogu utjecati na nektar i sastav meda (Persano Oddo i sur., 1995; Persano Oddo i sur., 2004).

Široka lepeza različitih medova može predstavljati prepreku s obzirom na zahtjeve tržišta za prisutnosti dosljednih proizvoda, međutim, ova varijabilnost može biti i dobra prilika za upoznavanje potrošača sa posebnim karakteristikama koje med ima, ovisno o botaničkom podrijetlu. Međunarodni standard Codex Alimentarius za med (Codex Alimentarius Commission, 2001) i Direktiva Europske unije o medu (Council of the European Union, 2002) usuglasili su se oko dopuštanja iznimki u određenim parametrima u odnosu na propisane vrijednosti (udio saharoze, električna provodnost, udio vode) za med proizveden iz određenih botaničkih izvora, ako on potječe iz naznačenog podrijetla i ima odgovarajuće fizikalno-kemijske, organoleptičke i melisopalinološke karakteristike.

Standardizirane analitičke metode koje se primjenjuju prilikom karakterizacije različitih tipova meda uključuju određivanje fizikalno-kemijskih parametara, kvalitativnu i kvantitativnu melisopalinološku analizu te senzorsku analizu što je detaljnije prikazano u **Tablici 1** (Persano Oddo i sur. 1995; 2004). Navedenim analitičkim metodama osim karakterizacije, moguće je provjeriti je li došlo do patvorenja ili kontaminacije meda. U većini slučajeva med se patvori na način da mu se dodaje škrobni sirup, invertni sirup ili dolazi do miješanja meda niske kvalitete i niže cijene sa kvalitetnijim medom. S druge strane, med ima nekoliko mogućih izvora mikrobiološke i parazitološke kontaminacije. Skupini primarnih izvora kontaminacije pripada pelud, probavni trakt pčele, prašina, zrak, tlo i nektar. Rukovanje medom i njegova obrada

pripadaju sekundarnim izvorima kontaminacije. Pravilnom primjenom dobre proizvođačke prakse lako je kontrolirati sekundarnu kontaminaciju (Pospiech i sur., 2021). Naposljetku, sve tri gore navedene skupine metoda validirane su i usklađene od strane Međunarodne komisije za med (IHC) i mogu se koristiti u okviru međunarodnog standarda za med i direktive Europske unije o medu (Bogdanov i sur., 2004).

U Republici Hrvatskoj Pravilnik o medu (MPRRR, 2015) propisuje kriterije kojima med mora udovoljavati pri stavljanju na tržište ili ako se upotrebljava u bilo kojem proizvodu namijenjenom za konzumaciju. Ovaj Pravilnik u skladu je s Direktivom vijeća Europske unije 2001/110/EZ o medu (Council of the European Union, 2002). Osim njega, u Republici Hrvatskoj dostupan je i Pravilnik o kakvoći uniflornog meda (MPRRR, 2009) koji propisuje zahtjeve kakvoće kojima u proizvodnji i pri stavljanju na tržište mora udovoljavati uniflorni med.

**Tablica 1** Odabrani parametri za opis europskih uniflornih medova  
(preuzeto i prilagođeno iz Persano Oddo i sur., 2004).

Senzorska analiza	Vizualna
	Olfaktorna
	Okus
Melisopalinološka analiza	Kvalitativna
	Kvantitativna
Fizikalno-kemijska analiza	Boja
	Električna provodnost
	Specifična rotacija
	Voda
	Dijastaza
	Invertaza
	Prolin
	pH
	Slobodna kiselost
	Laktoni
	Ukupna kiselost
	Fruktoza
	Glukoza
	Saharoza
	Fruktoza + glukoza (F+G)
	Omjer fruktoza/glukoza (F/G)
Omjer glukoza/voda (G/V)	

### 2.3.1. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara

Fizikalno-kemijski parametri meda određuju se prema usklađenim metodama od strane Međunarodne komisije za med (IHC) (Pospiech i sur., 2021). Najčešće se pri utvrđivanju

kvalitete i/ili patvorenja te karakterizaciji koriste fizikalno-kemijski parametri opisani u daljnjem tekstu.

#### 2.3.1.1. Boja

Fizikalno svojstvo koje potrošači prvo uoče je boja meda. Ona varira od svijetlo žute, smeđe pa do gotovo crne boje. Kod tipičnih vrsta meda, boja može biti i zelenkasta te crvena (Bogdanov i sur., 2004). Kakva će boja meda biti ovisi o biljnom i geografskom podrijetlu te sadržaju pepela, temperaturi i vremenu skladištenja. Sadržaj aminokiselina (tirozina, triptofana) i minerala veći je kod tamnijih medova. Razne vrste meda mijenjaju boju različitim intenzitetom i u različitom omjeru što ovisi o sastavu meda. Prirodne promjene boje događaju se tijekom kristalizacije pri čemu med obično postaje svjetliji. S druge strane, procesiranjem meda te dugotrajnim skladištenjem med postaje tamniji (Szabó i sur., 2016).

Najčešće korištene metode za određivanje boje temelje se na optičkoj usporedbi, a to su metoda po Pfund-u i Lovibond-u. Vrijednosti ovih komparatora daju mjeru intenziteta boje. Lovibond komparatori lakši su za rukovanje od Pfund komparatora, ali med se općenito klasificira prema Pfund-ovoj skali boja. Iz tog razloga su na tržištu dostupni Lovibond komparatori sa Pfund skalom (Bogdanov i sur., 2004). Osim navedenih metoda, za određivanje boje mogu se koristiti CIE  $L^*a^*b$  metoda i spektrofotometrijsko utvrđivanje intenziteta boje (Bogdanov i sur., 2004).

#### 2.3.1.2. Optička aktivnost

Med ima sposobnost rotacije ravnine linearno polariziranog svjetla. Najzastupljeniji šećeri u medu (fruktoza i glukoza) pokazuju različitu optičku rotaciju. Shodno tome, optička aktivnost fruktoza je negativna, dok je optička aktivnost glukoze pozitivna. Ukupna optička aktivnost ovisi o koncentraciji različitih šećera u medu. Mjerenje ovog fizikalno-kemijskog parametra provodi se polarimetrom te je njegovo određivanje korisno za razlikovanje medljikovca ili meduna (desno-rotirajući, pozitivne vrijednosti) od cvjetnih (nektarnih) vrsta meda (lijevo-rotirajući, negativne vrijednosti) (Bogdanov i sur., 2004).

#### 2.3.1.3. Električna provodnost

Električna provodnost meda definira se kao električna provodnost 20 % w/v vodene otopine meda kod 20 °C, gdje se 20 % odnosi na suhu tvar meda. Organske kiseline, proteini i minerali (ukupni pepeo) doprinose električnoj provodnosti meda. Što je veća koncentracija navedenih

spojeva u medu, veća je i provodnost otopine meda. Ovaj parametar često se određuje tijekom rutinske analize kvalitete meda te utvrđivanja botaničkog i geografskog podrijetla. Kao primjer može se uzeti medljikovac koji je bogat izvor minerala te shodno tomu, ima najvišu vrijednost električne provodnosti u usporedbi s drugim vrstama meda (Lazarević i sur., 2017).

#### 2.3.1.4. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati kao glavni sastojci čine 95 % suhe tvari meda. U najvećem udjelu prisutni su reducirajući šećeri. Voćni šećer ili fruktoza prisutna je u prosjeku oko 41 %, a grožđanog šećera ili glukoze je prosječno oko 34 %. Osim njih, u medu su prisutni i drugi šećeri: saharoza, maltoza, turanoza, izomaltoza, trehaloza, maltotrioza i melecitoza. Količina ugljikohidrata u medu utječe na energetska vrijednost meda, viskoznost, higroskopnost i granulaciju. Fruktoza i glukoza prisutne su, u većoj ili manjoj mjeri, u nektaru ili u ugljikohidratnoj izlučevini insekata koji sisaju tekućinu iz floema biljke. Količina i omjer fruktoze u odnosu na glukozu uglavnom ovisi o izvoru nektara, cvjetnoj paši i enzimu invertazi koja razgrađuje saharozu na jednostavnije šećere – glukozu i fruktozu. Ovaj enzim nalazi se u cvijetu s kojeg pčele skupljaju nektar, a prisutan i u njihovom tijelu. U gotovo svim vrstama meda, fruktoza je ugljikohidrat u najvećem omjeru. Med od uljane repice (*Brassica napus*) i med od maslačka (*Taraxacum officinale*) odstupaju od ovog pravila te je u njima udio glukoze veći od udjela fruktoze. Posljedično, ti medovi obično brzo kristaliziraju. Omjer fruktoza/glukoza također utječe na okus meda jer je fruktoza puno slađa od glukoze (da Silva i sur., 2015; Bogdanov i sur., 2004; Lazarević i sur., 2017; Ramzi i sur., 2017; Tafere, 2021).

Relativna količina glukoze i fruktoze korisna je za klasifikaciju uniflornih medova, kao i za omjer fruktoze/glukoze i glukoze/vode. Sastav šećera moguće je odrediti različitim kromatografskim metodama: tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) sa detektorom indeksa loma, ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom s pulsirajućim amperometrijskim detektorom (HPAEC-PAD) i plinskom kromatografijom (GC) sa plameno ionizacijskim detektorom (FID) (Bogdanov i sur., 2004).

#### 2.3.1.5. pH i kiselost

Med je po prirodi kiseo proizvod, sa niskom pH vrijednosti koja se kreće od 3,5 do 5,5. Na kiselost meda utječu organske kiseline, u najvećoj mjeri glukonska i anorganski ioni od kojih su neki fosfati, sulfati i kloridi (Ramzi i sur., 2017). Određivanjem slobodne i ukupne kiselosti



te pH vrijednosti moguće je klasificirati uniflorne medove (Bogdanov i sur., 2004). Osim toga, određivanje pH vrijednosti može pomoći pri utvrđivanju patvorenja. Prema jednom istraživanju, dodavanje visoko-fruktuznog kukuruznog sirupa brazilskom medu rezultiralo je povećanjem pH vrijednosti u usporedbi s nepatvorenom vrstom istog tog meda (da Silva i sur., 2015). Prirodna kiselost meda utječe na njegovu antimikrobnu aktivnost i ima važnu ulogu u trajnosti meda (Kavanagh i sur., 2019).

#### 2.3.1.6. Aminokiseline i proteini

Proteini su u medu prisutni iz nektara i peludi biljaka. Mogu biti u obliku složene strukture ili jednostavnih spojeva, aminokiselina. Sadržaj aminokiselina i proteina relativno je mali i ne prelazi 0,7 %. Med sadrži gotovo sve fiziološki važne aminokiseline, a prolin je najzastupljenija među njima kod većine vrsta meda. Količina prolina ovisi o nektaru, odnosno, vremenu provedenom u pčelinjem želučanom sustavu gdje se odvija pretvorba nektara u med. Prolin se koristi kao kriterij procjene zrelosti meda, a u nekim slučajevima i za otkrivanje patvorenja dodatkom šećera (da Silva i sur., 2015). Njegova vrijednost u medu trebala bi biti viša od 200 mg/kg. Ukoliko je udio prolina u medu niži od 180 mg/kg, znak je vjerojatnog patvorenja meda dodatkom šećera (Tafere, 2021). Ovaj parametar pokazuje karakteristične vrijednosti u različitim uniflornim medovima koje su približno povezane s enzimskom aktivnošću. Međutim, med nije moguće klasificirati samo na temelju sadržaja ove aminokiseline (Bogdanov i sur., 2004).

#### 2.3.1.7. Dijastaza i invertaza

Određivanjem aktivnosti enzima moguće je utvrditi svježinu meda. Enzimi u medu potječu od pčela i biljnog nektara te različite vrste meda pokazuju značajne razlike u enzimskoj aktivnosti. Razlog tomu je različito fiziološko stanje žlijezda pčela tijekom produktivne sezone i brzine protoka nektara. Aktivnost dijastaze parametar je koji ukazuje je li tijekom obrade meda došlo do njegovog zagrijavanja budući da je navedeni enzim osjetljiv na zagrijavanje i skladištenje (Bogdanov i sur., 2004; Ramzi i sur., 2017).

Invertaza se koristi kao dodatni kriterij za ocjenu kvalitete meda budući da je ovaj enzim osjetljiviji i brže gubi aktivnost tijekom skladištenja u usporedbi s dijastazom (Dimiņš i sur., 2006).

#### 2.3.1.8. Voda

Sadržaj vode u medu parametar je kvalitete koji se povezuje sa svježinom meda, a visok udio vode pospješuje pojavu fermentacije meda uz pomoć osmofilnih kvasaca. Ovisno o sezoni proizvodnje i klimi, med ima različit udio vode, što utječe na omjer glukoza/voda te fizikalne osobine meda (viskoznost i kristalizaciju). Općenito, viskoznost se smanjuje kako sadržaj vode raste zbog njezinih reoloških svojstava. Što je veći sadržaj vode, niža je viskoznost meda. Također, viskoznost je obrnuto proporcionalna temperaturi te se smanjuje povećanjem temperature zbog manjeg molekularnog trenja i smanjenih hidrodinamičkih sila. Udio vode u medu uglavnom se određuje pomoću refraktometra (Ramzi i sur., 2017; Bogdanov i sur., 2004).

#### 2.3.1.9. Hidroksimetilfurfural (HMF)

Hidroksimetilfurfural (HMF) je heterociklični organski spoj sa šest ugljikovih atoma koji sadrži aldehidnu i alkoholnu funkcionalnu grupu. Ovaj organski spoj nastaje na dva načina: prirodno i polako se formira tijekom skladištenja meda razgradnjom fruktoze te mnogo brže zagrijavanjem meda. Količina HMF-a prisutna u medu, parametar je za procjenu intenziteta zagrijavanja koje je nastupilo (Tafere, 2021). Budući da svježi med gotovo ne sadrži hidroksimetilfurfural (HMF), on nije parametar koji se koristi tijekom određivanja botaničkog podrijetla meda. Međutim, prije određivanja faktora koji ovise o skladištenju meda kao što su aktivnost enzima i boja, poželjno je osigurati da je ispitivani med svjež i nezagrijan. Nekoliko je faktora koji utječu na količinu HMF-a: temperatura i vrijeme zagrijavanja meda, uvjeti skladištenja, upotreba metalnih spremnika i kemijska svojstva meda. Niska koncentracija hidroksimetilfurfurala i visoka aktivnost diastaze pokazatelj su prikladnih uvjeta toplinske obrade i skladištenja meda.

Nekoliko je metoda koje za utvrđivanje sadržaja HMF-a: HPLC metoda, metoda po White-u i Winkler-ova metoda. Potonje navedena metoda koristi reagens koji pokazuje kancerogena svojstva te se zbog toga ne bi trebala koristiti. Metoda po White-u najčešće je korištena metoda (Bogdanov i sur., 2004; Lazarević i sur., 2017; Ramzi i sur., 2017).

#### 2.3.1.10. Mineralne tvari

Udio minerala u medu relativno je nizak, a kreće se od 0,1 % do 0,2 % u nektarnom medu do preko 1 % u medljikovcima. Najzastupljeniji mineral meda je kalij (45 - 85 % ukupnog sadržaja minerala), a uz njega prisutni su i natrij, kalcij i magnezij. Bakar, željezo i cink (elementi u

tragovima) prisutni su u nešto nižim koncentracijama. Minerali u medu potječu iz tla što upućuje na to da njegov sastav utječe na udio i sadržaj minerala u medu. Vrsta medonosnih biljaka, cvjetna pokrivenost područja s kojeg pčele prikupljaju nektar te nektarni i peludni sastav također utječe na sadržaj minerala u medu. Iz tog razloga udio minerala može biti pokazatelj botaničkog podrijetla meda. Osim navedenog, minerali mogu biti prisutni zbog različitih antropogenih aktivnosti kao što su poljoprivreda, industrija i odlagališta otpada. Prema tome, med može biti koristan pokazatelj za procjenu onečišćenja okoliša (Lazarević i sur., 2017).

### **2.3.2. Melisopalinološka analiza**

Medonosne pčele skupljaju nektar sa cvjetova te tako pohranjuju pelud, važnu komponentu u prehrani pčela. Pelud je bogata vitaminima, mineralima, fitosterolima, proteinima, fenolnim spojevima, flavonoidima, aminokiselinama i lipidima.

Peludna analiza meda ili melisopalinologija od iznimne je važnosti kada je u pitanju kontrola kvalitete. Med sadrži brojna peludna zrnca i dijelove medne rose poput voska, algi i spora plijesni koji daju reprezentativan prikaz okoliša iz kojeg med potječe. Kvalitativnom i kvantitativnom peludnom analizom moguće je odrediti geografsko i botaničko podrijetlo meda uz već opisanu analizu fizikalno-kemijskih parametara te senzorska ispitivanja. Melisopalinologija daje korisne informacije o postupku ekstrakcije, filtracije i fermentacije meda. Osim toga, analizom možemo dobiti uvid u autentičnost proizvoda i informacije o prisutnosti drugih čestica u medu: mineralne prašine, čađe, dijelova saća ili škroba (Von Der Ohe i sur., 2004).

#### **2.3.2.1. Kvalitativna mikroskopska analiza**

Princip kvalitativne mikroskopske analize je koncentriranje mikroskopskih čestica od interesa centrifugiranjem meda otopljenog u vodi. Nakon pripreme uzorka slijedi ispitivanje izdvojenog sedimenta pod mikroskopom. Ovom koraku može, ali i ne mora prethoditi acetoliza (Louveaux i sur., 1978).

Određivanje geografskog podrijetla temelji se na identifikaciji i brojanju peludnih zrnaca, ali i drugih čestica u medu. Identifikacija se utvrđuje uz pomoć literaturnih podataka i nativnih preparata. Analiza može biti potpuna ili orijentacijska. Orijentacijska analiza ograničena je na identifikaciju najčešće prisutnih čestica i na pretraživanje određenih značajnih karakterističnih

elemenata u sedimentu. Suprotno tomu, potpuna analiza daje sliku o svim peludnim zrnacima i drugim česticama prisutnim u uzorku. Utvrđivanje geografskog podrijetla može se provesti na temelju karakterističnih peludnih zrnaca prisutnih u uzorku koja su specifična za određenu regiju. Peludni spektar ovisi o cvjetnim, poljoprivrednim i šumskim uvjetima na mjestu gdje se proizvodi med (Louveaux i sur., 1978).

Učestalost pojave peluda iste vrste i čestica medne rose u uzorku temelj je za određivanje botaničkog podrijetla meda. Generalno govoreći, med se može dodatno označiti botaničkim podrijetlom (uniflorni med) ako je pelud te biljke dominantna u pripremljenom uzorku (Louveaux i sur., 1978). Prema Pravilniku o kakvoći uniflornog meda propisani su zahtjevi kakvoće koje uniflorni med mora zadovoljiti u proizvodnji i stavljanju na tržište (MPRRR, 2009). Prema navedenom Pravilniku, uniflorni med može se označiti prema određenoj biljnoj vrsti ako u netopljivom sedimentu sadrži najmanje 45 % peludnih zrnaca iste biljne vrste. Udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu za specifične biljne vrste dan je u **Tablici 2**. Iz tablice je vidljivo da je za određene biljne vrste dozvoljen manji udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu, kao na primjer, prilikom deklariranja meda od lipe, kadulje, agruma ili lavande. Ukoliko navedene vrste imaju karakteristična senzorska svojstva meda za određenu biljnu vrstu (miris, okus, boja) mogu se označiti kao ta vrsta uniflornog meda i pri nižim udjelima peludnih zrnaca. S druge strane, postoje biljne vrste (kesten, uljana repica ili facelija) koje su prirodno bogate peludom i za potvrdu uniflornosti ovih vrsta meda potrebno je zadovoljiti veće vrijednosti u odnosu na općenitih 45 % peludi jedne biljne vrste.

**Tablica 2** Udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu za određene biljne vrste  
(MPRRR, 2009)

Naziv biljne vrste	Udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu
Pitomi kestren ( <i>Castanea sativa</i> Mill.)	85%
Uljana repica ( <i>Brassica napus</i> L.)	60%
Facelija ( <i>Phacelia tanacetifolia</i> Benth.)	60%
Lipa ( <i>Tilia</i> spp.)	25% (10%*)
Bagrem ( <i>Robinia pseudoacacia</i> L.)	20%
Metvica ( <i>Mentha</i> spp.)	20%
Vrijesak ( <i>Calluna vulgaris</i> L.)	20%
Vrisak, Primorski vrijesak ( <i>Satureja montana</i> L.)	20%
Maslačak ( <i>Taraxacum officinale</i> Weber)	20%
Ružmarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	20%
Kadulja ( <i>Salvia officinalis</i> L.)	15% (10%*)
Planika ( <i>Arbutus unedo</i> L.)	10%
Agurmi ( <i>Citrus</i> spp.)	10% (5%*)
Lavanda ( <i>Lavandula</i> spp.)	10% (5%*)

\* uz karakteristična senzorska svojstva meda za određenu biljnu vrstu (miris, okus, boja)

### 2.3.2.2. Kvantitativna mikroskopska analiza

Kvantitativnom analizom određuje se količina sedimenta u medu. Ova analiza pruža informacije o načinu ekstrakcije meda (prešanje, centrifugiranje, ocjeđivanje) te o eventualno prisutnom onečišćenju koje nije uobičajeno za med (zemlja, zamjena za pelud, kvasci). Princip metode zasniva se u centrifugiranju meda i dobivanju sedimenta čija se količina mjeri u kalibriranim epruvetama za centrifugiranje (Louveaux i sur., 1978). Količina sedimenta određuje se s kalibriranog kraja epruvete. Med ekstrahiran centrifugiranjem sadrži malu količinu sedimenta. Također, niska količina sedimenta može biti pokazatelj meda koji je prirodno siromašan peludom (npr. med od citrusa), pretjerano filtriranog meda ili krivotvorenog meda (ukoliko su pčele hranjene šećerom). Velika količina sedimenta ukazuje na med dobiven prešanjem (Louveaux i sur., 1978).

Peludna analiza neophodna je metoda za autentifikaciju podrijetla i karakteristika meda. Glavna kritična točka melisopalinološke analize je ispravnost identifikacije peluda i naknadno tumačenje rezultata. Iz tog razloga je važno da analitičar ima dobro iskustvo u melisopalinologiji i dobro opće znanje o medu. Uz spomenute fizikalno-kemijske parametre i senzorsku analizu o kojoj će biti riječi u sljedećem poglavlju, melisopalinološka analiza doprinosi određivanju i kontroli botaničkog podrijetla meda (von der Ohe i sur., 2004).

### 2.3.3. Senzorska analiza meda

Uz određivanje fizikalno-kemijskih parametara i melisopalinološku analizu, senzorska analiza treća je važna metoda koja se koristi za procjenu kvalitete i određivanje botaničkog podrijetla meda (Milojković Opsenica i sur., 2015). Generalno, ova metoda koristi se za ispitivanje senzorskih svojstava proizvoda ispitivanjem boje, mirisa, okusa, dodira i teksture. Korištenje senzorske analize u mnogim područjima omogućuje utvrđivanje organoleptičkog profila različitih proizvoda (hrane, kozmetike, farmaceutika). Osim toga, analiza je korisna u predviđanju kako će ispitivani proizvod percipirati krajnji potrošač. Kada je riječ o medu, senzorska analiza omogućuje razlikovanje botaničkog podrijetla meda i identificiranje te kvantificiranje određenih nedostataka: fermentaciju, prisutne nečistoće, neugodne okuse i mirise (Piana i sur., 2004). Osim navedenog, pri identifikaciji stranih spojeva u medu, senzorsko ispitivanje omogućuje prepoznavanje kontaminacije tvarima kao što je naftalin (*p*-diklorenzen), eterično ulje (timol), miris dima, metala i sredstva protiv insekata (benzaldehyd) (Milojković Opsenica i sur., 2015). Senzorska analiza može biti presudna pri deklariranju uniflornog meda. To se može zaključiti iz činjenice da senzorska ispitivanja omogućuju detektiranje prisutnosti drugih komponenata koje nisu identificirane drugim analitičkim ispitivanjima (fizikalno-kemijskim i melisopalinološkim). Ukoliko se senzorskim ispitivanjem utvrdi prisutnost tvari koja značajno mijenja tipične senzorske karakteristike meda, takav med ne može se deklarirati kao unifloran (Piana i sur., 2004).

Za neke vrste meda kao što je lipin med (*Tilia* spp.), fizikalno-kemijska analiza ne može dati dovoljno specifičnih svojstava te je stoga važno uzeti u obzir i senzorska ispitivanja. Slično vrijedi i za med od kadulje u kojem senzorska ispitivanja mogu prevagnuti u potvrdu uniflornosti (Milojković Opsenica i sur., 2015).

Općenito, potvrda botaničkog podrijetla meda temelji se na identifikaciji karakterističnog sastava i tipičnih svojstava meda koja se očekuju s obzirom na uspostavljeni standard za med. Kvalitetniji unifloran med je med kojeg karakteriziraju specifični miris, okus, izgled i senzorska svojstva te takav med, što je više moguće odgovara opisanom standardu za tu vrstu meda (Milojković Opsenica i sur., 2015).

## 2.4. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET MEDA

Fenolne kiseline i flavonoidi sekundarni su metaboliti biljnog podrijetla koji pripadaju skupini polifenola. Fenolne kiseline pronađene u medu mogu biti derivati benzojeve kiseline, poput galne i elagične kiseline ili derivati cimetine kiseline (kafeinska, sinapinska, ferulinska i kumarinska kiselina). Flavonoidi se sastoje od fenolnih hidroksilnih skupina vezanih za prstenaste strukture. Ovi spojevi mogu se podijeliti u različite podskupine prema strukturnim varijacijama unutar prstena. Tako skupine mogu biti hidroksilirane, metoksilirane ili glikozidno povezane s monosaharidima ili oligosaharidima, a ponekad mogu imati acilne skupine na različitim pozicijama osnovne strukture flavonoida ili na glikozidnom dijelu. Flavonoidi pokazuju veliku sklonost procesu polimerizacije i na taj način stvaraju tanine. Najvažniji flavonoidi u medu su flavanoni, flavoni i flavonoli koji potječu iz propolisa, nektara i peludi. Količina flavonoida u medu može biti do 6 mg/kg, dok je njihova količina znatno veća u peludi (0,5 %) i propolisu (10 %) (Gašić i sur., 2017).

Udio polifenola u medu povezuje se sa njegovim antimikrobnim i antioksidativnim učincima. Oksidativni stres nastaje zbog nedostatka ravnoteže u kemijskoj reakciji između stvaranja slobodnih radikala i prirodnog zaštitnog učinka tijela što dovodi do oštećenja stanica i remećenja genetske strukture. Antioksidativnim svojstvima meda pridonose flavonoidi, fenolne kiseline, askorbinska kiselina, katalaza, peroksidaza, karotenoidi i produkti Maillardovih reakcija (melanoidini). Oni utječu na smanjenje rizika od srčanih bolesti, raka, pada imunološkog sustava te različitih upalnih procesa. Nadalje, med također može doprinijeti sprječavanju oksidacijskih reakcija u hrani kao što je enzimsko posmeđivanje voća i povrća te oksidacija lipida u mesu. Antimikrobna svojstva meda očituju se u njegovoj sposobnosti za inhibicijom rasta mikroorganizama. Alkoholni ekstrakti meda pokazuju inhibitorni učinak na niz bakterijskih vrsta, uključujući aerobe i anaerobe, Gram-pozitivne i Gram-negativne. Provedena istraživanja pokazala su da med sa visokim udjelom ukupnih polifenola inhibira rast nekih bakterija kao što su: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* i nekoliko kvasaca i gljiva *Candida albicans*, *Candida krusei* i *Cryptococcus neoformans* (Valdés-Silverio i sur., 2018; Feás i sur., 2011). Osim pozitivnog učinka na zdravlje, antioksidacijska aktivnost meda i udio polifenola povezuje se s bojom meda. Naime, istraživanja su pokazala da med tamnije boje ima veći ukupni sadržaj fenola i posljedično, veću antioksidativnu aktivnost (Beretta i sur., 2005; Bertoneclj i sur., 2007; Flanjak i sur., 2016; Kavanagh i sur., 2019).

Identifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva može pomoći u razlikovanju i dokazivanju autentičnosti meda različitog botaničkog i geografskog podrijetla. Na primjer, flavonoidi se mogu koristiti kao markeri botaničkog podrijetla europskog meda od eukaliptusa (*Eucalyptus camaldulensis*). Navedeni med sadrži tricetin kao glavni marker, dok je za australski med od eukaliptusa (*Eucalyptus pilligaensis*) predložen luteolin kao glavni marker botaničkog podrijetla. Flavonoidni profil australskog meda od eukaliptusa vrlo je različit od europskog meda od eukaliptusa. Kad se govori o istom botaničkom podrijetlu, razlike u polifenolnom profilu mogu biti posljedica različitih područja sakupljanja meda (Gašić i sur., 2017).

Nekoliko međunarodnih tijela, poput Međunarodnog udruženja službenih analitičkih kemičara (AOAC) i Međunarodne komisije za med (IHC), predlažu službene i/ili standardizirane postupke za analizu meda. Međutim, unatoč velikoj važnosti polifenola u medu, još uvijek nije službeno preporučena niti jedna metoda za njihovo određivanje. Razlozi mogu biti povezani s poteškoćama koje se pojavljuju prilikom pokušaja usklađivanja jednostavnosti, brzine, niskih troškova analize, održivosti za okoliš, preciznosti, točnosti i osjetljivosti. Osim navedenog, važno je uzeti u obzir *cis*-izomerizaciju i druge moguće strukturne promjene koje se mogu dogoditi tijekom analize. Nadalje, usporedba različitih metoda s ciljem odabira najprikladnije vrlo je teška zbog različitih uvjeta pripreme uzoraka i raznolikosti postupaka za izolaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva. Prema većini objavljenih analitičkih postupaka, određivanje polifenola u medu uključuje osnovne korake njihove izolacije iz uzorka, odvajanje, pročišćavanje, identifikaciju i kvantifikaciju željenih spojeva. Odvajanje i identifikacija obično se provode kromatografskim ili elektroforetskim tehnikama. Odabir instrumentalnih tehnika i operativnih parametara uvelike ovisi o analitičkim ciljevima i tipu karakterizacije (kvalitativna i/ili kvantitativna) (Bogdanov i sur., 2004; Gašić i sur., 2017; Pascual-Maté i sur., 2017; Tafere, 2021). U svrhu izrade ovog diplomskog rada korištena je modificirana Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih fenola u medu od bršljana bez kvantifikacije pojedinačnih fenolnih spojeva.



## 2.5. MED OD BRŠLJANA

Bršljan je vazdazeleni višegodišnji grm koji cvjeta od rujna do studenog na sjevernoj zemljinoj hemisferi. Pripada rodu *Hedera* i obuhvaća otprilike 16 vrsta rasprostranjenih diljem Europe, Sjeverne Afrike, Makaronezije i Azije. Prirodno raste ili se uzgaja na ogradama, kućama, građevinama, drveću, a moguće ga je pronaći i na liticama. Listovi bršljana bogati su saponinima i fenolnim spojevima što bršljan čini biljkom od medicinskog značaja. Farmaceutski proizvodi koji sadrže standardizirani ekstrakt listova bršljana pomažu pri olakšavanju infekcija dišnog sustava. Osim istraživanja sastava lišća bršljana, nema puno znanstvenih istraživanja koja se odnose na analizu kemijskog sastava i biološke aktivnosti drugih dijelova biljke. Dostupni znanstveni radovi proučavali su fenolne spojeve u cvjetovima i plodovima bršljana te antimikrobna i antioksidativna svojstva ekstrakta iz lišća, cvjetova i plodova (Beril Sen i sur., 2023; Garbuzov i sur., 2014; Makowicz i sur., 2018).

Kako je već spomenuto, bršljan cvate kasno u sezoni. Kasno cvjetanje pčelama omogućuje vrijedan izvor hrane, odnosno peluda (**Slika 1**) prije početka zimske sezone kada su pčelama ograničeni drugi izvori hrane. Bršljan ima male, žuto-zelene i nektarom bogate cvjetove koji svojom slatkoćom privlače pčele. U prvim mjesecima nakon sakupljanja, med proizveden iz cvjetova bršljana ima snažan i neugodan okus. Također, med od bršljana teško je ukloniti iz saća čak i ako se sakupljanje provede na vrijeme jer ovu vrstu meda karakterizira brza kristalizacija u kratkom vremenskom roku (oko 2 tjedna). Razlog tomu je visok sadržaj glukoze u medu od bršljana (Beril Sen i sur., 2023; Makowicz i sur., 2018).

Med od bršljana rijetka je vrsta meda te je vrlo malo dostupnih istraživanja provedeno na ovoj vrsti meda. Provođenje detaljnijih istraživanja za upoznavanje s kemijskim profilom i biološkom aktivnosti meda od bršljana neophodno je za opis karakteristika ove vrste meda.



**Slika 1** Mikroskopski prikaz peludnog zrnca bršljana u netopljivom sedimentu meda (Zebec, 2024).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je odrediti fizikalno-kemijske parametre kvalitete, antioksidativni kapacitet i udio ukupnih fenola te senzorska svojstva meda od bršljana, kako bi se utvrdile specifičnosti te na taj način doprinijelo opisu ove uniflorne vrste sa različitih područja Republike Hrvatske.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

Ukupno 11 uzoraka meda od bršljana prikupljeno je od pčelara iz dvije regije, primorske Hrvatske-PH (N=6) i kontinentalne Hrvatske-KH (N=5). Nakon potvrde uniflornosti uzoraka melisopalinološkom analizom, odnosno potvrde zadovoljenosti minimalnog udjela peludnih zrnaca bršljana u netopivom sedimentu uzoraka meda, provedene su analize odabranih fizikalno-kemijskih parametara kvalitete koji se koriste u karakterizaciji uniflornih vrsta meda te parametara koji se povezuju s uvjetima procesiranja i skladištenja. Naposljetku je provedena i senzorska analiza prikupljenih uzoraka u svrhu opisa ove specifične vrste meda. Dobiveni rezultati obrađeni su statistički, a ispitana je i razlika u analiziranim parametrima s obzirom na lokaciju odnosno regije iz kojih potječu uzorci meda od bršljana.

#### 3.2.1. Određivanje udjela vode

Princip refraktometrijskog određivanja je da se indeks loma povećava s udjelom suhe tvari uzorka. Prije provedbe same analize na uzorcima, važno je kalibrirati refraktometar destiliranom vodom ili drugim certificiranim referentnim materijalom. Uzorci meda za analizu pripremaju se zagrijavanjem na temperaturi od 50 °C ( $\pm 0,2$  °C) u vodenoj kupelji kako bi se uzorci meda dekrystalizirali. Po završetku zagrijavanja, slijedi očitavanje indeksa refrakcije. Prizme refraktometra moraju biti suhe i čiste. Uzorak meda ravnomjerno se raspodijeli po površini prizme i indeks refrakcije dva puta očita za isti uzorak. Na temelju očitane indeksa refrakcije izračuna se količina vode (%) uz pomoć tablice za proračun. U pravilu, analiza se provodi na temperaturi od 20 °C, a ako se indeks refrakcije ne očita na toj temperaturi potrebno je napraviti korekciju za razliku u temperaturi (Bogdanov, 2009).

### 3.2.2. Određivanje električne provodnosti

Električna provodnost meda određuje se pomoću konduktometra, a rezultati izražavaju u mS/cm. Metoda se temelji na mjerenju električnog otpora koji je obrnuto proporcionalan električnoj provodnosti otopine. Pri provođenju analize potrebno je otopiti količinu meda koja odgovara 20 g suhe tvari meda u destiliranoj vodi. Nakon otapanja i kvantitativnog prenošenja u odmjernu tikvicu od 100 mL, tikvica se napuni destiliranom vodom do oznake. Prije mjerenja uređaj se kalibrira otopinom standarda kalijevog klorida (KCl). Elektrodu se potom ispere destiliranom vodom i osuši staničevinom. Nakon što je uređaj spreman za rad, električna provodnost određuje se za pripremljenu otopinu uzorka. Temperatura mjerenja mora biti 20 °C (Bogdanov, 2009).

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti dijastaze Phadebas metodom

Aktivnost enzima dijastaze izražava se kao dijastatski broj (DN) u Schade jedinicama i definira se na sljedeći način: jedna dijastatska jedinica odgovara aktivnosti enzima u 1 g meda, koja može hidrolizirati 0,01 g škroba u jednom satu na temperaturi 40 °C. Određivanje aktivnosti dijastaze vrši se spektrofotometrijski pri čemu se kao supstrat koristi netopivi, plavo obojeni umreženi tip škroba. Supstrat se hidrolizira enzimom pri čemu se stvaraju topivi, plavo obojeni produkti čiji se intenzitet određuje na valnoj duljini od 620 nm. Apsorbancija otopine direktno je proporcionalna aktivnosti enzima. Za određivanje aktivnosti dijastaze Phadebas metodom potrebno je izvagati 1,00 g meda u odmjernu tikvicu od 100 mL, otopiti u acetatnom puferu i dopuniti do oznake. Potom se 5 mL otopine prenese u epruvetu i stavi u vodenu kupelj na 40 °C. Nadalje, slijedi priprema slijepa probe dodavanjem 5 mL acetatnog pufera u drugu epruvetu i temperiranje po uzoru na epruvetu sa uzorkom. Po završetku temperiranja, u obje epruvete dodaje se Phadebas tableta pomoću pincete i započne mjeriti vrijeme. Epruvete sa otopinama miješaju se na vortex miješalici dok se tableta ne otopi (oko 10 sekundi) i vrate u vodenu kupelj. Nakon točno 30 minuta od početka mjerenja vremena, prekida se reakcija dodavanjem 1 mL otopine natrijevog hidroksida (NaOH), a otopina se ponovo promiješa na vortex miješalici. Otopine se potom filtriraju kroz filter papir i mjeri se apsorbancija na 620 nm uz acetatni pufer kao slijepu probu. Apsorbancija slijepa probe oduzima se od apsorbancije uzorka ( $A_{620}$ ), a aktivnost dijastaze računa se prema sljedećim formulama (Bogdanov, 2009):

**Formula (1)** koristi se za vrijednosti aktivnosti dijastaze 8 - 40:

$$DN = 28,2 * \Delta A_{620} + 2,64 \quad (1)$$

**Formula (2)** koristi se za vrijednosti aktivnosti dijastaze do 8:

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

### 3.2.4. Određivanje slobodne kiselosti i pH vrijednosti

Slobodna kiselost meda prikazuje sadržaj svih slobodnih kiselina, a izražava se u miliekvivalentima po kg meda (mEq/kg) ili milimolima kiseline po kilogramu meda (mmol/kg). Za provedbu analize potrebno je otopiti 10 g meda u 75 mL destilirane vode bez CO<sub>2</sub> u čaši od 250 mL. Potom se otopina miješa na magnetskoj miješalici, uroni elektroda pH metra i očita pH vrijednost. Zatim slijedi titriranje s 0,1 M NaOH do pH 8,3 pri čemu titracija mora biti gotova u roku od dvije minute. Slobodna kiselost meda izračunava se prema **formuli (3)**:

$$\text{Slobodna kiselost } \left( \frac{\text{mEq}}{\text{kg}} \right) = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH} * 10 \quad (3)$$

### 3.2.5. Određivanje hidroksimetilfurfural-a (HMF) u medu

Ovom analizom određuje se koncentracija 5-hidroksimetil-furan-2-karbaldehida u medu, a pri tome su na raspolaganju tri dostupne metode: HPLC metoda, metoda po Winkler-u i metoda po White-u (Bogdanov, 2009). U svrhu utvrđivanja ovog fizikalno-kemijskog parametra meda od bršljana korištena je metoda po White-u. Ova metoda zahtijeva korištenje spektrofotometra i mjerenje apsorbancije na dvije valne duljine: 284 nm i 336 nm te izražavanje dobivenih rezultata u mg/kg. Izvaže se 5 g meda te se otapa u otprilike 25 ml vode i kvantitativno prenosi u odmjernu tikvicu od 50 ml. U odmjernu tikvicu dodaje se po 0,5 ml Carrez I i Carrez II otopina, promiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina profiltrira se preko filter papira. Nakon filtracije, pipetira se po 5 ml filtrata u dvije epruvete. U prvu se dodaje voda (otopina uzorka), a u drugu 0,2 %-tna otopina natrijevog bisulfita (standardna otopina) (Bogdanov, 2009). Nakon kratkog miješanja na vortex miješalici slijedi očitavanje apsorbancije otopine uzorka i standardne otopine na dvije valne duljine (284 nm i 336 nm) te računanje količine HMF-a u danom uzorku prema **formuli (4)**.

$$\text{Udio HMF} - a \text{ (mg/kg)} = (A_{284} - A_{336}) * 149,7 * 5 * \frac{D}{W} \quad (4)$$

gdje je:

- $A_{284}$  – apsorbancija na 284 nm,
- $A_{336}$  – apsorbancija na 336 nm,
- 149,7 – faktor,
- 5 – teorijska nominalna masa uzorka,
- D – faktor razrjeđenja, u slučaju kad je razrjeđenje potrebno,
- W – masa uzorka u gramima (g).

### 3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje

Metoda se zasniva na mjerenju razlike u apsorbanciji na valnim duljinama od 450 i 720 nm (**formula (6)**) i izražavanju rezultata kao neto apsorbancija (NA). Uzorci meda pripremaju se kao 50 %-tna otopina meda u destiliranoj vodi. Potrebno je otopiti 12,5 g meda u laboratorijsku čašu od 50 mL i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 25 mL. Po nadopunjavanju odmjerne tikvice do oznake slijedi filtriranje tako pripremljene otopine i očitavanje vrijednosti apsorbancije filtrata u spektrofotometru. Filtriranje se provodi kako bi se uklonile eventualno prisutne velike čestice u medu (Beretta i sur., 2005).

$$\text{NA (mAU)} = (A_{450} - A_{720}) * 1000 \quad (6)$$

### 3.2.7. Određivanje sastava ugljikohidrata u medu

U svrhu izrade ovog diplomskog rada za analizu sastava i udjela ugljikohidrata korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) uz detektor indeksa loma (RI). Za potrebe diplomskog rada dani su rezultati za zbroj fruktoze i glukoze, omjer fruktoze i glukoze te omjer glukoze i vode. Za provedbu analize potrebno je podesiti temperaturu uređaja na 30 °C, prirediti mobilnu fazu, uzorke meda i standardne otopine šećera. Mobilna faza sastoji se od acetonitrila i destilirane vode u omjeru 70:30. Uzorci meda pripremaju se vaganjem 5 g meda i otapanjem u 40 mL destilirane vode. U odmjernu tikvicu od 100 mL odpipetira se 25 mL metanola, u nju kvantitativno prenese otopina meda i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Potom se pomoću membranskog filtra otopina meda filtrira u staklenu bočicu (vialicu) i tako

pripremljen uzorak spreman je za analizu na HPLC-u (Bogdanov, 2009). Identifikacija odijeljenih ugljikohidrata temelji se na usporedbi vremena zadržavanja pikova sa vremenima zadržavanja pikova standarda ugljikohidrata, a kvantifikacija dobivenih površina svakog pika korištenjem kalibracijskih krivulja standardnih otopina.

### 3.2.8. Određivanje ukupnih fenola

Za provedbu analize ukupnih fenola korištena je modificirana Folin-Ciocalteu metoda opisana od strane Beretta i sur. (2005). Metoda se zasniva na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa i fenolnih spojeva pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks čiji se intenzitet mjeri na valnoj duljini od 750 nm. Međutim, test se temelji na redoks reakciji pri čemu drugi spojevi (npr. reducirajući šećeri – glukoza, fruktoza i maltoza) također mogu reducirati Folin-Ciocalteu reagens i tako može doći do neželjene interferencije (Lawag Lozada i sur., 2023). Šećerni analog koji se koristi kao slijepa proba je mješavina šećera čiji sastav približno odražava sastav šećera u medu. Sastav šećernog analoga je 40 % fruktoza, 30 % glukoza, 8 % maltoza i 2 % saharoza (Bertoncelj i sur., 2007). Za provedbu metode potrebno je izvagati 15 g meda i otopiti sa destiliranom vodom u odmjernu tikvicu od 50 ml. Potom se uzme 0,1 ml tako otopljenog uzorka, prenese u male epruvete i pomiješa s 1 ml 10 %-tnog Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon dodanog reagensa slijedi miješanje na vortex miješalici 2 minute i inkubiranje pripremljenih uzoraka 20 minuta na sobnoj temperaturi u tamnom. Po završetku inkubacije slijedi očitavanje apsorbancije na valnoj duljini od 750 nm u odnosu na šećerni analog kao slijepu probu. Nakon određivanja ukupnih fenola u pripremljenim uzorcima slijedi kvantifikacija koja se vrši koristeći galnu kiselinu kao standard (0,02 – 0,2 mg/mL), a rezultati se izražavaju kao mg galne kiseline/kg meda (Beretta i sur., 2005).

### 3.2.9. Određivanje antioksidativnog kapaciteta

FRAP test (Ferric Reducing Antioxidant Power) je metoda koja mjeri ukupni antioksidativni kapacitet proizvoda (Benzie i Strain, 1996). Analiza se temelji na reakciji pri niskom pH od 3,6 gdje se feri željezo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) sa TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) reducira do fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) TPTZ kompleksa. Tijekom reakcije dolazi do razvoja boje u plavu te mjerenja apsorbancije na 593 nm čija vrijednost odgovara intenzitetu plave boje (Benzie i Strain, 1996). Za provedbu analize potrebno je pripremiti reagens. FRAP reagens sastoji se od 10 mM otopine TPTZ u 40 mM HCl, 20 mM željezo klorida ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) i 0,3 M natrijevog acetatnog pufera u omjeru 1:1:10.



Reagens mora biti svježe pripreman svaki dan i termostatiran na temperaturi od 37 °C u vodenoj kupelji. Priprema uzorka sa analizu sastoji se od vaganja 5 g meda, otapanja destiliranom vodom i kvantitativnog prenošenja u odmjernu tikvicu od 50 ml. Potom se uzme alikvot otopine meda od 0,2 ml i pomiješa sa 1,8 ml dnevno pripremljenog FRAP reagensa. Nakon miješanja na vortex miješalici, uzorak za analizu termostatira se na 37 °C tijekom 10 minuta. Nakon isteka vremena termostatiranja, slijedi mjerenje apsorbancije na valnoj duljini od 593 nm u odnosu na šećerni analog kao slijepu probu. Vodene otopine željezo sulfata ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) u koncentracijskom rasponu od 50 do 1000  $\mu\text{M}$  koriste se za izradu kalibracijske krivulje na temelju koje se izračuna FRAP vrijednosti ( $\mu\text{M}$  Fe(II) 10 %-tne otopine meda) (Benzie i Strain, 1996; Beretta i sur., 2005).

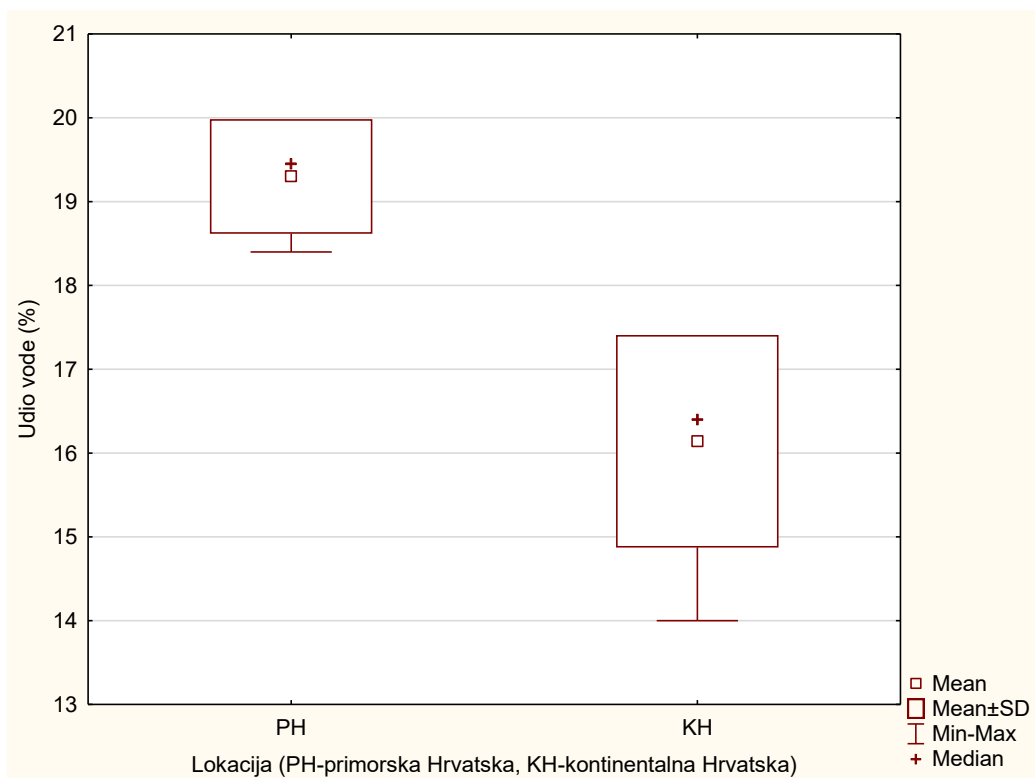
### **3.2.10. Senzorska analiza meda**

Ovom analizom provode se vizualna ispitivanja, ispitivanja mirisa, okusa, arome te fizikalne karakteristike (npr. kristalizacija meda) uniflornog meda. Uzorke meda od bršljana senzorski je ocijenio panel od 5 ocjenjivača koji su opisali karakteristike te procijenili intenzitet pojedinih mirisno-okusnih karakteristika (Piana i sur., 2004).

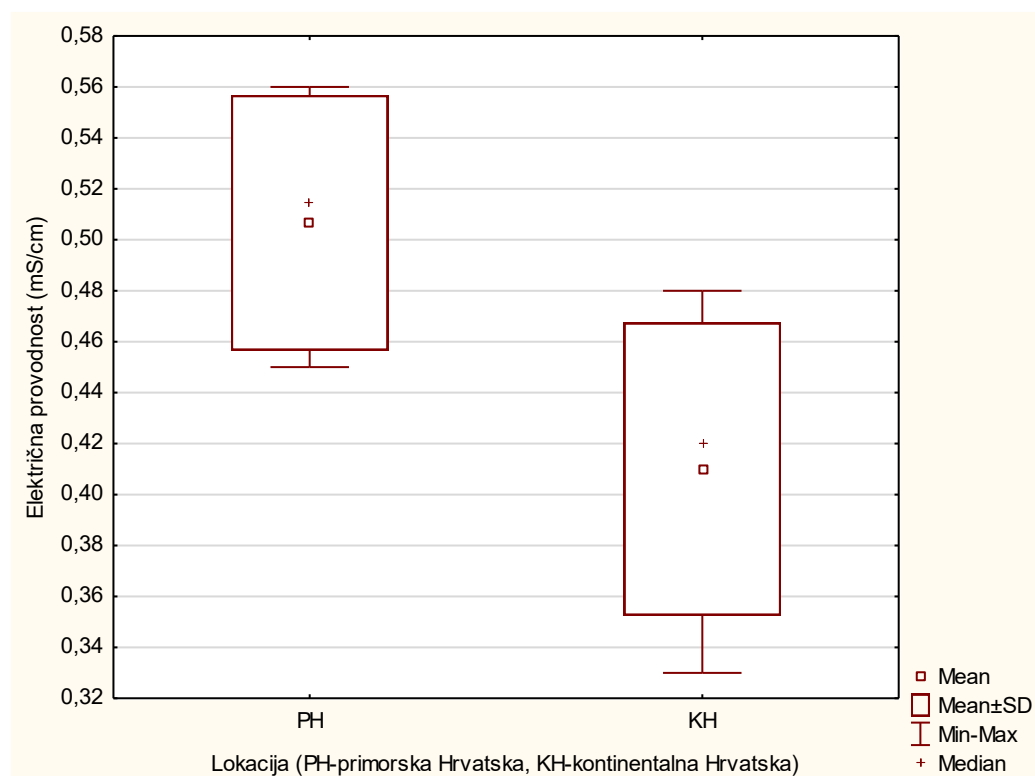
### **3.2.11. Statistička obrada rezultata**

Rezultati svih mjerenja obrađeni su statistički pomoću programa Microsoft Excel 2021 i Statistica 14.0.0.15. Za svaki ispitivani parametar izračunati su srednja vrijednost, standardna devijacija, medijan te minimum i maksimum. Kako bi se testirala razlika u ispitivanim parametrima s obzirom na lokaciju prikupljenih uzoraka, korišten je neparametrijski Mann-Whitney U test. Statistički značajne razlike u ispitivanim svojstvima prema lokacijama smatrane su one kod kojih je p-vrijednost bila  $<0,05$ .

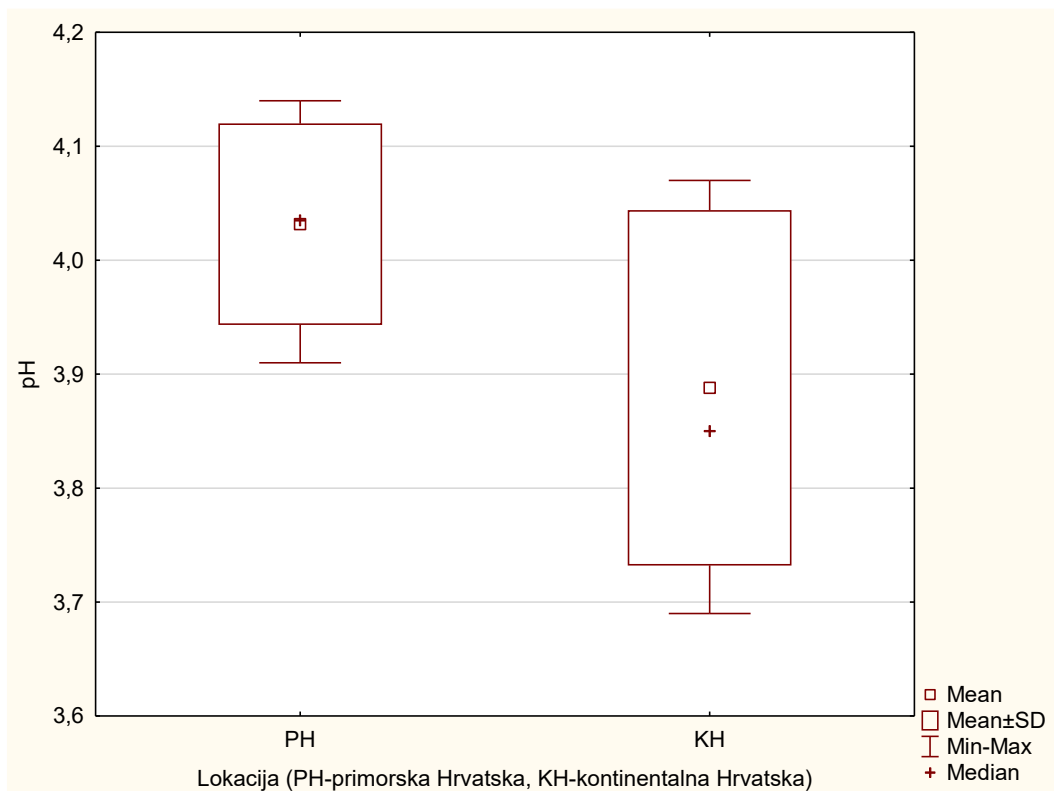
## **4. REZULTATI**



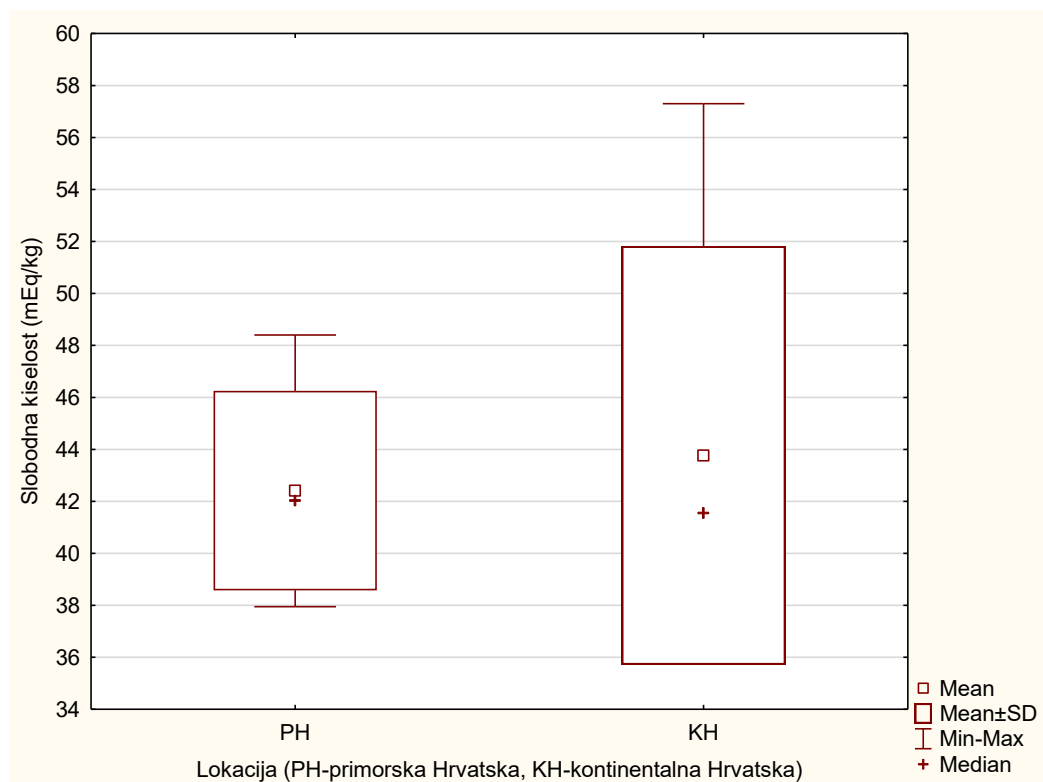
Slika 2. Udio vode u ispitivanim uzorcima meda od bršljana



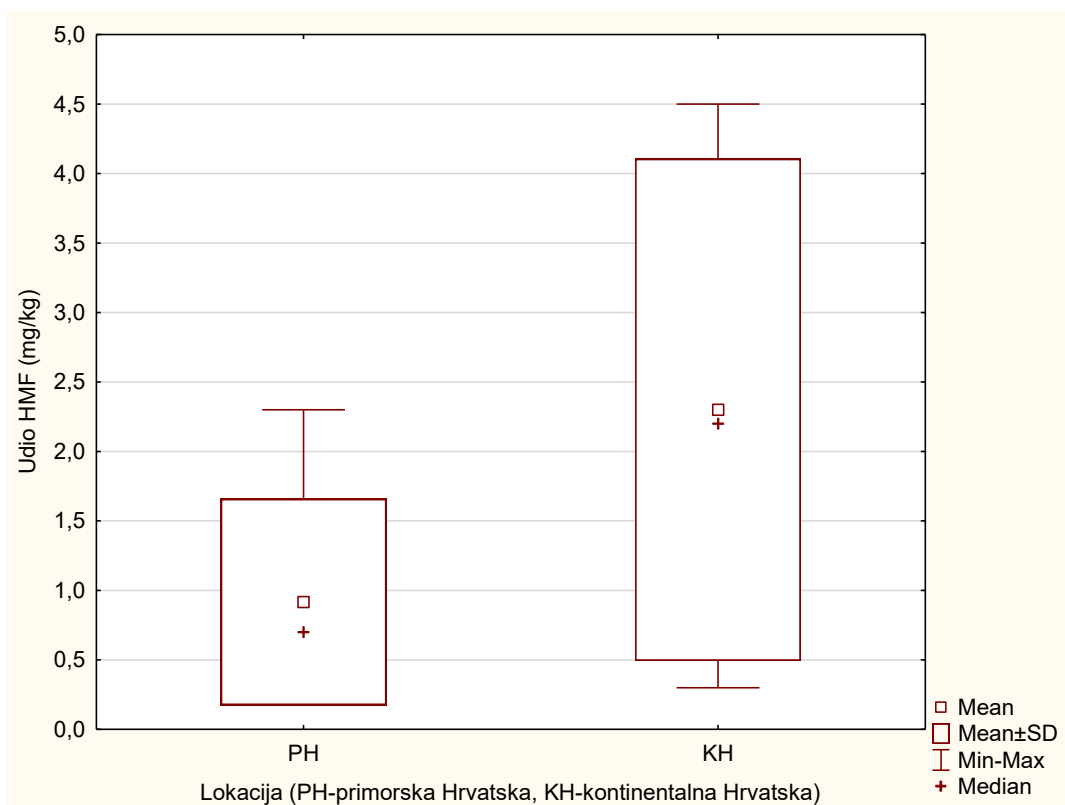
Slika 3. Električna provodnost ispitivanih uzoraka meda od bršljana



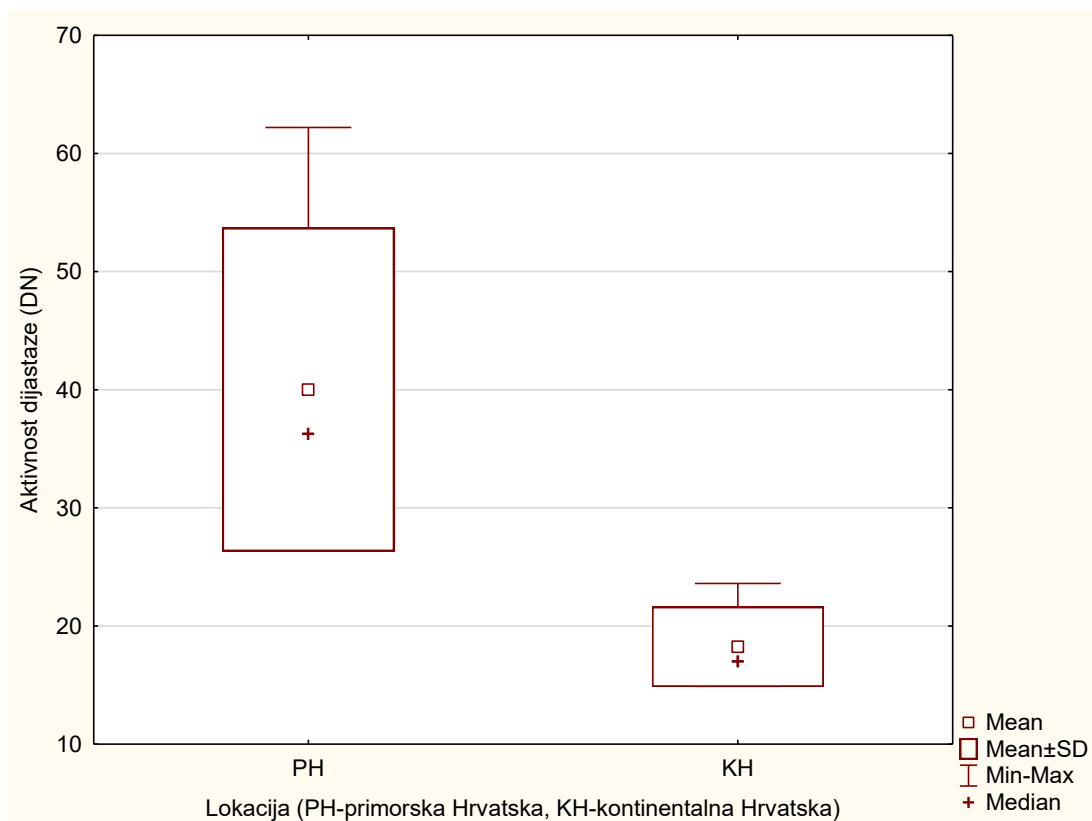
Slika 4. pH vrijednost ispitivanih uzoraka meda od bršljana



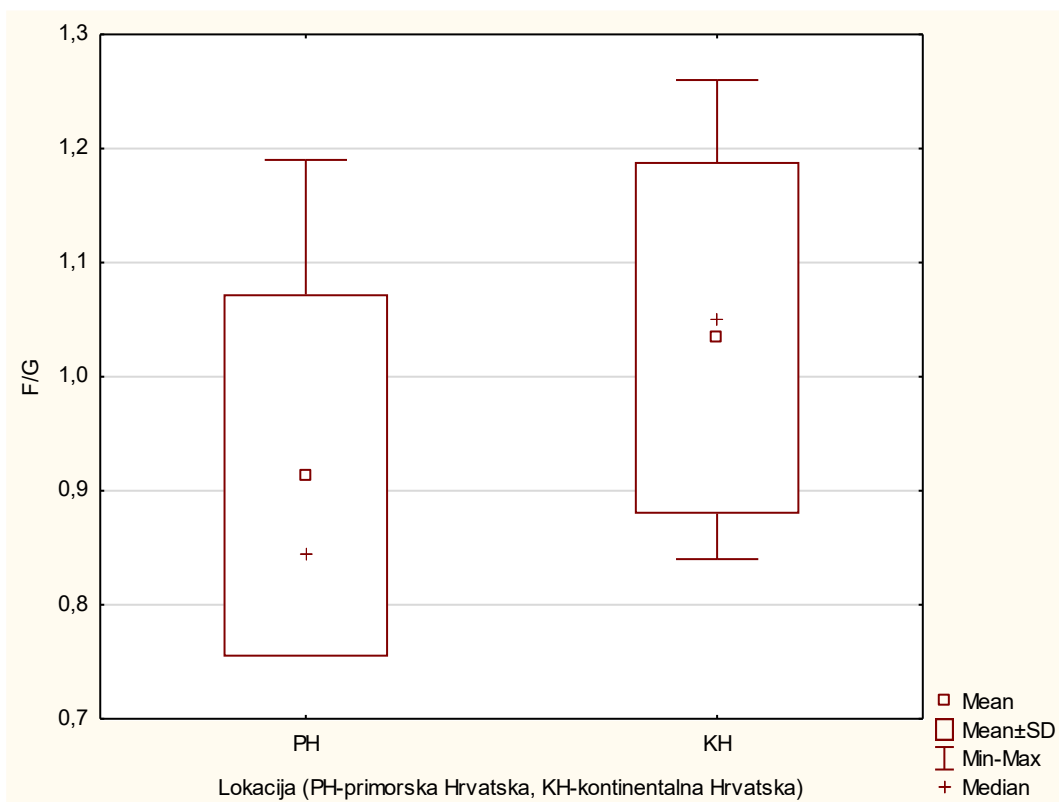
Slika 5. Slobodna kiselost ispitivanih uzoraka meda od bršljana



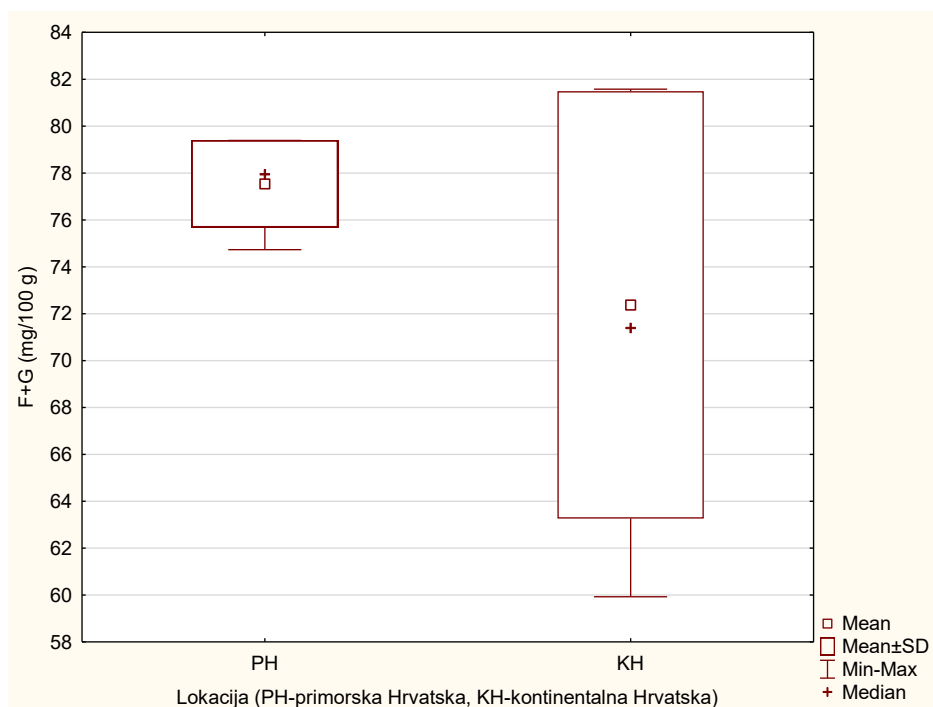
**Slika 6.** Udio HMF-a u ispitivanim uzorcima meda od bršljana



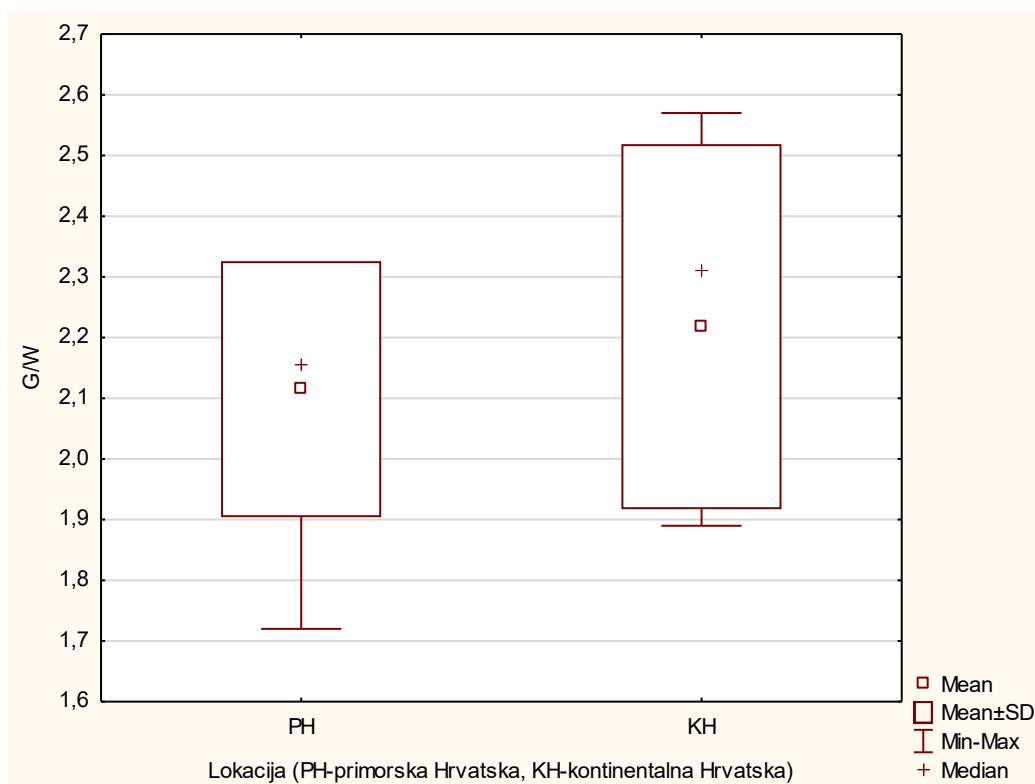
**Slika 7.** Aktivnost dijastaze ispitivanih uzoraka meda od bršljana



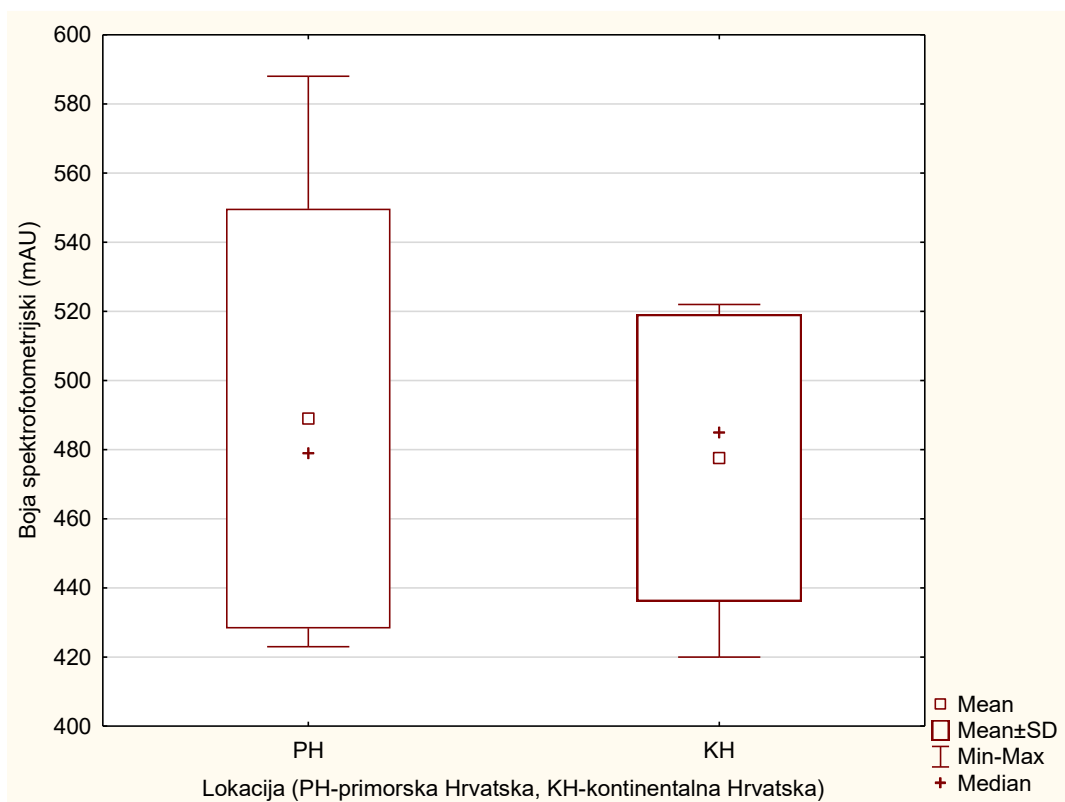
**Slika 8.** Omjer udjela fruktoze i glukoze (F/G) u ispitivanim uzorcima meda od bršljana



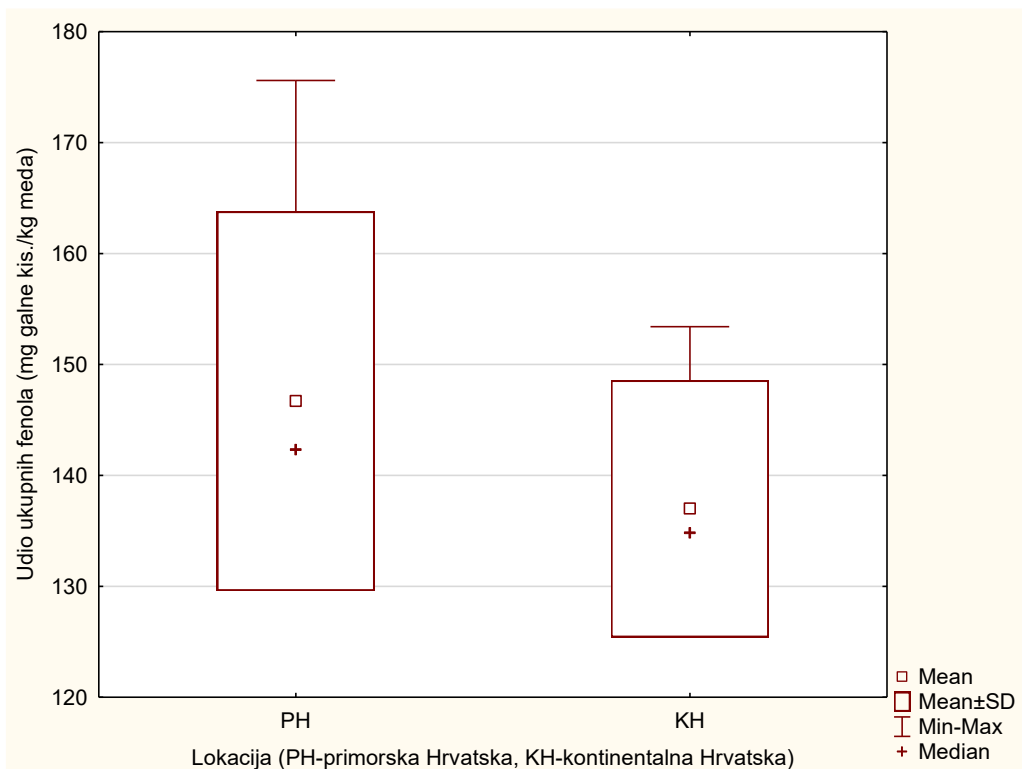
**Slika 9.** Zbroj udjela fruktoze i glukoze (F+G) u ispitivanim uzorcima meda od bršljana



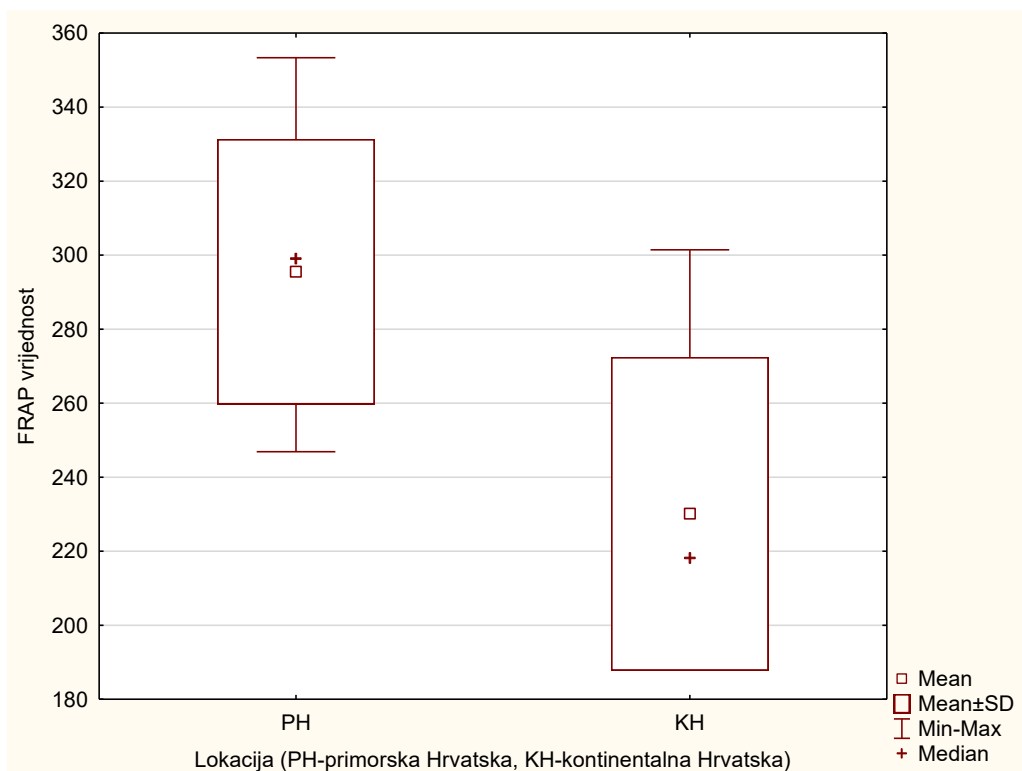
**Slika 10.** Omjer udjela glukoze i vode (G/W) u ispitivanim uzorcima meda od bršljana



**Slika 11.** Boja ispitivanih uzoraka meda od bršljana



**Slika 12.** Udio ukupnih fenola u ispitivanim uzorcima meda od bršljana



**Slika 12.** Ukupni antioksidativni kapacitet (FRAP vrijednost) u ispitivanim uzorcima meda od bršljana



**Tablica 3.** Rezultati Mann-Whitney U testa

Varijabla	p-vrijednost
Udio vode (%)	<b>0,00811</b>
Električna provodnost (mS/cm)	<b>0,02248</b>
pH	0,12069
Slobodna kiselost (mEq/kg)	0,92727
Udio HMF (mg/kg)	0,27332
Aktivnost dijastaze (DN)	<b>0,00811</b>
F/G	0,17090
F+G (mg/100 g)	0,64808
G/W	0,41131
Boja spektrofotometrijski (mAU)	0,85513
Udio ukupnih fenola (mg galne kis./kg meda)	0,31530
FRAP vrijednost	<b>0,03577</b>

Podobljanje p-vrijednosti su statistički značajne prema Mann-Whitney U testu za nezavisne varijable

**Tablica 4.** Rezultati senzorske analize meda od bršljana

Parametar	Svojstva
Boja	<i>Intenzitet boje: svijetao do srednji</i> <i>Ton boje: svojstven vrsti meda</i>
Miris	<i>Intenzitet mirisa: srednji</i> <i>Opis: aromatičan, cvjetni</i>
Okus	<i>Slatkoća: slaba</i> <i>Kiselost: slaba do odsutna</i> <i>Gorčina: slaba do odsutna</i> <i>Intenzitet arome: srednji</i> <i>Opis arome: osvježavajuća, aromatična, cvjetna, topla</i> <i>Postojanost/aftertaste: srednja</i> <i>Ostali osjećaji u ustima: -</i>
Fizikalne karakteristike	<i>Brzina kristalizacije: brza</i>

## **5. RASPRAVA**

Pri provedbi pravilne karakterizacije uniflornih vrsta meda potrebno je voditi se Pravilnicima i uputama. Metode međunarodne komisije za med (IHC) validirane su i priznate te se koriste pri opisu pojedine vrste meda. Karakterizacija meda obuhvaća određivanje fizikalno-kemijskih parametara, melisopalinološku analizu i senzorska ispitivanja. Pri provedbi navedenih analitičkih metoda, važno je uvjeriti se da su ispitivani uzorci meda u skladu s Pravilnikom o medu (MPRRR, 2015) i Pravilnikom o kakvoći uniflornog meda (MPRRR, 2009). Vrijednosti odabranih fizikalno-kemijskih parametara koji se određuju pri analizi meda daju širok raspon rezultata budući da sastav meda nije isti i varira. Stoga je bitno da vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara koji se određuju budu unutar raspona koji je specifičan za analiziranu vrstu meda, s posebnom pažnjom na najkarakterističnije parametre (Persano Oddo i Bogdanov, 2004). Zadatak ovog diplomskog rada bio je doprinijeti karakterizaciji meda od bršljana određivanjem odabranih fizikalno-kemijskih parametara kvalitete, antioksidativnog kapaciteta te opisom senzorskih svojstava ove specifične vrste meda. Osim toga, testirana je razlika u fizikalno-kemijskim parametrima s obzirom na lokaciju odnosno regiju iz koje potječu prikupljeni uzorci kako bi se utvrdile eventualne specifičnosti s obzirom na geografsko podrijetlo.

Udio vode u medu ovisi o raznim čimbenicima kao što su: sezona skupljanja, postignut stupanj zrelosti u košnici, udio vlage u biljci i klimatski čimbenici. Voda u medu kriterij je kvalitete koji daje informacije o stabilnosti meda i otpornosti na kvarenje. Cilj je da u medu bude dovoljno nizak udio vode koji neće utjecati na kvarenje meda fermentacijom. Prema tome, može se zaključiti da udio vode u medu utječe na vijek trajanja gotovog proizvoda i karakteristike obrade (Ramzi i sur., 2017). Srednja vrijednost udjela vode u analiziranim uzorcima meda bršljana iz primorske Hrvatske (PH) iznosila je  $19,3 \pm 0,7$  %, a iz kontinentalne Hrvatske (KH)  $16,1 \pm 1,3$  (**Slika 2**). Time je potvrđeno da određen udio vode u medu bršljana zadovoljava Pravilnik o medu (MPRRR, 2015) i Direktivu vijeća Europske unije (Council of the European Union, 2002) koji propisuju da udio vode u medu smije biti najviše 20 %, no vrijednosti udjela vode kod uzoraka iz PH su vrlo visoke i kod ovih uzoraka moguća je vrlo brza fermentacija. Naime, smatra se da za med koji ima udio vode iznad 17 % postoji opasnost od fermentacije zbog povoljnih uvjeta za razvoj kvasaca. Razlika u udjelu vode u dvije ispitivane regije pokazala se statistički značajnom prema Mann-Whitney U testu ( $p=0,00811$ ) što se može djelomično objasniti u razlikama u klimatskim uvjetima u vrijeme proizvodnje meda od bršljana. Paša bršljana jedna je od posljednjih prije zime, a proizvodnja meda je tijekom rujna i listopada. Na visok udio vode utječu relativna vlažnost zraka, količina padalina

te broj sunčanih dana tijekom proizvodnje meda. Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ, 2023) u oba mjeseca relativna vlažnost zraka (RVZ) bila je visoka posebice u listopadu (srednja mjesečna RVZ u PH 72 %, odnosno 79 % u KH) dok je istovremeno srednja mjesečna količina oborina u PH u listopadu iznosila 158 mm, a u KH značajno manje (60 mm) što djelomično može objasniti razliku u udjelu vode u uzorcima iz PH i KH, a utjecaj ima i stanje u košnici te uvjeti vrcanja i rukovanja s medom. Dobiveni rezultati udjela vode u uzorcima meda od bršljana usporedivi su s vrijednosti udjela vode u medu bršljana dostupnoj u literaturi ( $19,92 \pm 0,001$  g/100 g), a koju su odredili Ramzi i sur. (2017). Čak i više vrijednosti udjela vode određene na dva uzorka meda od bršljana u Irskoj od strane Kavanagh i sur. (2019), a iznose 23,70 % i 24,80 %. Kako sami autori navode, jedan od razloga visokog udjela vode može biti sposobnost meda da lako apsorbira vlagu iz zraka, a Irska je zemlja s visokom vlažnosti zraka. Drugi razlog može se pripisati nedovoljnoj zrelosti meda gdje pčela nije stigla poklopiti med prije nego je on ekstrahiran.

Električna provodnost meda povezana je sa udjelom pepela, organskih kiselina, proteina, nekih složenih šećera i poliola te varira s botaničkim podrijetlom (Ramzi i sur., 2017). Što je veći sadržaj pepela i kiselina, to je veća električna provodnost. Pretpostavlja se da je visok sadržaj pepela u medu, a time i visoka provodnost, povezan s geografskim podrijetlom i visokim udjelom minerala u tlu (Kavanagh i sur., 2019). Određene vrijednosti električne provodnosti na uzorcima meda od bršljana iz PH iznosile su od 0,45 do 0,56 mS/cm, a u uzorcima iz KH od 0,33 do 0,48 mS/cm (**Slika 3**). Dobivene vrijednosti statistički su značajno različite prema Mann-Whitney U testu ( $p=0,02248$ ), a razlike se mogu pripisati različitom geografskom podrijetlu prikupljenih uzoraka, prvenstveno razlici u sastavu mineralnih tvari u tlu te s manjim udjelom gore navedenim čimbenicima. Prema Pravilniku o medu (MPRRR, 2015) i Direktivi vijeća Europske unije (Council of the European Union, 2002) električna provodnost meda od bršljana smije biti najviše 0,8 mS/cm budući da med od bršljana spada u skupinu cvjetnih (nektarnih vrsta meda). Prema tome, izračunate vrijednosti električne provodnosti meda od bršljana zadovoljavaju propise. Sličan rezultat dobili su Ramzi i sur. (2017) čija je vrijednost električne vodljivosti meda od bršljana iznosila  $0,51 \pm 0,001$  mS/cm dok su vrijednosti električne provodnosti uzoraka irskog meda od bršljana (Kavanagh i sur., 2019) značajno u odnosu na prethodno spomenute i iznose 0,24 mS/cm i 0,26 mS/cm.

Kiselost meda utječe na njegova antimikrobna svojstva i ima važnu ulogu u vijeku trajanja meda (Kavanagh i sur., 2019). Pravilnik o medu (MPRRR, 2015) i Direktiva vijeća Europske unije (Council of the European Union, 2002) propisuju maksimalnu vrijednost za slobodnu

kiselost meda koja smije iznositi najviše 50 mEq kiseline na 1000 g meda za sve vrste meda. Prema rezultatima analiza (**Slike 4 i 5**) provedenim na uzorcima meda od bršljana, srednja pH vrijednost uzoraka iz PH iznosila je  $4,03 \pm 0,09$ , a iz KH  $3,89 \pm 0,16$  dok se slobodna kiselost kretala od 37,95 mEq/kg do 48,40 mEq/kg, odnosno do 35,95 mEq/kg do 57,30 mEq/kg. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da med od bršljana karakteriziraju visoke vrijednosti slobodne kiselosti što uz druge čimbenike koji doprinose brznoj fermentaciji (visok glukoza/voda omjer, uvjeti skladištenja...) može biti opasno sa aspekta sigurnosti te se preporuča med od bršljana čuvati na niskim temperaturama u hladnjaku. Prema podacima dostupnim u literaturi, slobodna kiselost meda od bršljana iznosi  $34,67 \pm 0,58$  mEq/kg (Ramzi i sur., 2017) usporediva je s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. pH vrijednost meda od bršljana prema Ramzi i sur. (2017) iznosi  $3,54 \pm 0,011$ , a Kavanagh i sur. (2019) navode vrijednosti od 3,91 i 3,79. Svi navedeni pH rezultati dostupni u literaturi nešto su niži s obzirom na određene vrijednosti u ovom istraživanju, ali i dalje unutar okvira standardne devijacije.

Važan parametar kvalitete meda je sadržaj hidroksimetilfurfurala (HMF). Uz aktivnost enzima (invertaza, dijastaza) pokazatelj je svježine meda (Bogdanov i sur., 2002). HMF produkt je razgradnje fruktoze (jednog od glavnih ugljikohidrata u medu) koji se prirodno i polako stvara tijekom skladištenja meda, a puno brže pri njegovom zagrijavanju. Količina HMF-a prisutna u medu koristi se kao referentna vrijednost za količinu zagrijavanja kojoj je med podvrgnut. Što je viša vrijednost HMF-a, kvaliteta meda je niža (Tafere, 2021). Razlika u vrijednosti HMF-a može se uočiti na lokalno proizvedenom i uvezenom medu. Naime, lokalno proizveden med zapadne Europe uglavnom je negrijan i do potrošača dolazi u istoj godini proizvodnje, dok je uvezeni med zagrijavan i skladišten dulji vremenski period prije dolaska na tržište (Bogdanov i Martin, 2002). Pravilnik o medu (MPRRR, 2015) i Direktiva vijeća Europske unije (Council of the European Union, 2002) propisuju najvišu dozvoljenu vrijednost HMF-a u medu koja za med bršljana iznosi 40 mg/kg. Srednja vrijednost sadržaja hidroksimetilfurfurala (HMF) u analiziranim uzorcima meda od bršljana iz PH iznosila je  $0,9 \pm 0,7$  mg/kg, a u uzorcima iz KH  $2,3 \pm 1,8$  mg/kg (**Slika 6**) i nije se statistički značajno razlikovala s obzirom na lokaciju uzoraka (**Tablica 3**). Rezultati dobiveni u ovom ispitivanju ukazuju na pravilno rukovanje s medom nakon vrcanja, a svi uzorci zadovoljavaju propise u pogledu udjela HMF-a (MPRRR, 2015; Council of the European Union, 2002).

Kako je već ranije spomenuto, aktivnost dijastaze je uz sadržaj HMF-a pokazatelj svježine i načina rukovanja s medom. Aktivnost dijastaze smanjuje se povećanjem temperature. Prema tome, visok udio HMF-a i niska aktivnost dijastaze mogu biti pokazatelji zagrijavanja i

nepravilnog skladištenja meda. Prema Pravilniku o medu (MPRRR, 2015) i Direktivi vijeća Europske unije (Council of the European Union, 2002) aktivnost dijastaze izražena kao dijastatski broj (DN) mora biti najmanje 8. Iz **Slike 7**. vidljivo je da svi uzorci meda od bršljana zadovoljavaju propise, a razlika obzirom na lokaciju je statistički značajna ( $p=0,00811$ ). Iz rezultata dostupnih u literaturi (Ramzi i sur., 2017) vrijednost dijastaze (DN) za med od bršljana iznosi  $18,61 \pm 0,3$  što je usporedivo s vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju u uzorcima iz kontinentalne Hrvatske ( $18,2 \pm 3,4$ ) (**Slika 7**).

Ugljikohidrati su najzastupljenije komponente u medu. Važni parametri pri određivanju botaničkog podrijetla i klasifikaciji uniflornih vrsta su: udio fruktoze, glukoze i saharoze, ukupni udio reducirajućih šećera, njihov međusobni omjer i omjer glukoze i vode (Persano Oddo i Piro., 2004). U ovom istraživanju dani su podaci za zbroj i omjer fruktoze i glukoze te omjer glukoze i vode (**Slike 8-10**). Sva tri parametra nisu se statistički značajno razlikovala s obzirom na lokaciju uzoraka (**Tablica 3**), a vrijednosti zbroja fruktoze i glukoze (F + G) bili su unutar propisanih vrijednosti (**Slika 9**) za cvjetni med (MPRRR, 2015; Council of the European Union, 2002). Omjer fruktoze i glukoze (F/G) te omjer glukoze i vode (G/W) bitni su za kristalizaciju meda, a posljedično i za pojavu fermentacije. Med od bršljana vrlo brzo kristalizira, djelomično zbog visokog udjela glukoze i nižeg udjela fruktoze odnosno niskog F/G omjera koji za uzorke iz PH u prosjeku iznosi  $0,91 \pm 0,16$ , a za uzorke iz KH  $1,03 \pm 0,15$ . Dobivene vrijednosti F/G omjera u skladu su s rezultatima za druge uniflorne vrste meda sklone kristalizaciji, kao što su med od uljane repice, suncokreta ili maslačka (Persano Oddo i Piro, 2004). Do kristalizacije meda dolazi najvećim dijelom zbog kristalizacije glukoze i vezanjem molekula vode pri čemu nastaje glukoza monohidrat, a zbog veće topljivosti u vodi fruktoza ostaje u medu. Voda koja se veže na glukozu postaje slobodna i dostupna mikroorganizmima, posebice osmofilnim kvascima. Kristalizacijom meda povećava se aktivitet vode, stvaraju se povoljni uvjeti za razvoj kvasaca i povećava se mogućnost fermentacije meda. Uz F/G omjer za predviđanje brzine kristalizacije meda koristi se omjer glukoze i vode (G/W), čak su istraživanja pokazala da je G/W omjer bolji pokazatelj brzine kristalizacije od F/G omjera (Krishnan i sur., 2021). Prema Krishnan i sur. (2021) medovi koji imaju G/W omjer  $< 1,7$  sporo kristaliziraju dok medovi sa G/W omjerom  $> 2,0$  kristaliziraju brzo i u potpunosti. Kako je vidljivo na **Slici 10** svi ispitivani uzorci meda imali su G/W omjer iznad 1,7 što potvrđuje i vizualna opažanja jer su svi uzorci bili kristalizirani.

Boja meda povezana je s botaničkim podrijetlom i sastavom meda te je važna pri klasifikaciji uniflornih medova. Na boju meda, uz botaničko podrijetlo, utječe nekoliko faktora: pčelarska

praksa (učestalost mijenjanja voska), doticaj s metalima, izloženost svjetlu i visokim temperaturama (Kavanagh i sur., 2019). Iako na boju utječu navedeni faktori, ona se povezuje sa udjelom pigmenata s antioksidativnim djelovanjem (karotenoidi, flavonoidi,..) u medu (Beretta i sur., 2005). Točnije, mnoga provedena istraživanja (Beretta i sur., 2005; Bertonecelj i sur., 2007; Flanjak i sur., 2016) utvrdila su da tamniji medovi imaju veći ukupni sadržaj fenola i posljedično, veći antioksidativni kapacitet. Boja uzoraka meda od bršljana određena je spektrofotometrijski, jer druge metode koje se u literaturi koriste za procjenu boje meda (CIE L\*a\*b\* metoda ili metoda uz pomoć Lovibond komparatora) zahtijevaju da uzorci za analizu budu u tekućem stanju što bi u slučaju uzoraka meda od bršljana zahtijevalo dekrizalizaciju primjenom povišenih temperatura što može potaknuti stvaranje produkata Maillardovih reakcija i povećanje intenziteta boje. Boja meda od bršljana određena spektrofotometrijski kretala se od 420 mAU do 588 mAU što je prema literaturnim podacima usporedivo s vrijednostima za med od kestena (Beretta i sur., 2005; Bertonecelj i sur., 2007; Flanjak i sur., 2016) iako se vizualno ove dvije vrste značajno razlikuju po boji što je posljedica razlike u fizikalnim svojostima odnosno kristaliziranom stanju meda od bršljana dok je med od kestena u tekućem stanju.

Analiza polifenola važna je pri proučavanju botaničkog i geografskog podrijetla meda. Određivanje polifenola pomaže pri karakterizaciji meda, ali i identifikaciji zdravstvenih svojstava od kojih je jedan inhibicijski učinak na patogene bakterije (Fратиanni i sur., 2021). Osim toga, polifenoli kao bioaktivne tvari mogu biti učinkoviti u smanjenju zdravstvenih rizika uzrokovanih od strane slobodnih radikala te tako pomoći pri zaštiti stanice od oštećenja (Kolaylı i sur., 2017). **Slika 12** prikazuje vrijednosti udjela ukupnih polifenola dobivenih analizom na spektrofotometru. Udio ukupnih fenola u medu od bršljana kreće se od 126,05 mg galne kiseline/kg meda do 175,60 mg galne kiseline/kg meda, a prema Mann-Whitney U testu statistički značajna razlika između regija nije utvrđena. Podaci dostupni u literaturi pokazuju znatno veće vrijednosti ukupnih fenola u medu bršljana:  $45,23 \pm 0,00$  mg galne kiseline/100 g meda (Kolaylı i sur., 2017) i  $257,07 \pm 8,73$  mg galne kiseline/kg meda (Fратиanni i sur., 2021). Razlika u vrijednostima između navedenih istraživanja i vrijednosti utvrđenih u ovom radu može se pripisati raznim čimbenicima, od kojih su neki geografsko porijeklo, „čistoća“ meda i uvjeti skladištenja. Osim toga, u obzir treba uzeti i vrstu modifikacije Folin-Ciocalteu metode koja je korištena za određivanje ukupnih fenola u navedenim radovima te utvrditi jesu li rezultati usporedivi.

Komponente meda odgovorne za antioksidativni učinak su flavonoidi, fenolne kiseline, askorbinska kiselina, katalaza, peroksidaza, karotenoidi i produkti Maillardovih reakcija. Najveći utjecaj na sadržaj fenola u medu, a time i na antioksidativnu aktivnost ima botaničko podrijetlo (Kavanagh i sur., 2019). Prema radu Nasrolahi i sur. (2012), lijekovi protiv dijabetesa u kombinaciji s medom mogli bi poboljšati glikemijsku kontrolu, pojačati antioksidativnu obranu i smanjiti oksidativno oštećenje. Time bi se dogodila reverzija degeneriranih beta stanica u gušterači i povećala proizvodnja inzulina, a shodno tome i smanjila inzulinska rezistencija prema molekulama glukoze u cirkulaciji. Uniflorni medovi poput meda od citrusa i timijana pokazali su se korisnim za glikemijski indeks. S druge strane, razine serumskog inzulina bile su značajno niže nakon konzumacije meda od kestena. Iz tog razloga važno je poznavati antioksidativnu aktivnost meda. Kako je vidljivo na **Slici 13** FRAP vrijednosti uzoraka meda od bršljana iz PH kretale su se od 246,9  $\mu\text{M Fe (II)}$  do 353,33  $\mu\text{M Fe (II)}$ , a u uzorcima iz KH od 188,81  $\mu\text{M Fe (II)}$  do 301,43  $\mu\text{M Fe (II)}$ . Mann-Whitney U test pokazao je statistički značajnu razliku u FRAP vrijednostima u uzorcima iz različitih regija, a razlika može potjecati iz različitog udjela komponenti koje doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu meda. Prema trenutno dostupnoj literaturi, nema radova u kojima se može pronaći vrijednost antioksidativne aktivnosti za med od bršljana. Uspoređujući dobivene FRAP vrijednosti za med od bršljana sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti za druge vrste meda, uočljivo je da med od bršljana pokazuje sličnost sa medom od kestena (Bertoncelj i sur., 2007; Flanjak i sur., 2016).

Iz **Tablice 2** u kojoj su opisane senzorske karakteristike meda od bršljana vidljivo je da ovu specifičnu vrstu med karakterizira svjetla do srednje žuta boja i brza kristalizacija. Intenzitet arome je srednji, a u opisu arome mogu se zamijetiti osvježavajuća, aromatična, cvjetna i topla nota. Slatkoća meda je slaba, a kiselost i gorčina su slabe do odsutne.

Uzimajući u obzir sve provedene analize, vidljivo je da svi analizirani uzorci meda bršljana zadovoljavaju propise (MPRRR, 2015; Council of the European Union, 2002) uz izuzetak jednog uzorka koji je imao slobodne kiseline veće od maksimalnih 50 mEq/kg. U dostupnoj literaturi nema dovoljno informacija o medu bršljana, a dostupni podaci često nisu u skladu s onima dobivenim pri izradi ovog rada. Razlozi tomu mogu biti korištenje različitih metoda pri određivanju istog fizikalno-kemijskog parametra, uvjeti skladištenja, zrelost meda, geografsko i botaničko podrijetlo te mnogi drugi. Uspoređujući rezultate analiziranih fizikalno-kemijskih parametara meda od bršljana sa podacima dostupnim u radu autora Persano Oddo i Piro (2004) čiji je cilj bio prikupiti analitičke podatke glavnih europskih uniflornih medova i osigurati



kriterije kvalitete za njih, uočljivo je da je med bršljana pokazuje sličnost sa medom od maslačka (*Taraxacum officinale* L.). Sličnosti su vidljive u svijetlo žutoj boji meda, električnoj provodnosti, niskom omjeru fruktoze prema glukozi i visokom omjeru glukoze i vode. Ipak, med od bršljana karakterizira visoka slobodna kiselost što za med od maslačka nije karakteristično (Persano Oddo i Piro, 2004).

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Svi analizirani uzorci u skladu su s nacionalnim i međunarodnim propisima s obzirom na analizu fizikalno-kemijskih parametara, uz izuzetak jednog uzorka koji je imao nešto veću slobodnu kiselost od propisane vrijednosti.
- Analize su provođene na svježim, pravilno skladištenim i termički netretiranim uzorcima što se može vidjeti po niskom sadržaju HMF-a i visokoj aktivnosti dijastaze.
- Sastav ugljikohidrata meda od bršljana karakterizira viši udio glukoze i relativno nizak udio fruktoze iz čega proizlazi nizak F/G omjer koji zajedno s visokim G/W omjerom ukazuje sklonost brzom kristalizaciji.
- Visoka slobodna kiselost jedna je od karakteristika meda od bršljana te bi ona mogla biti koristan parametar pri klasifikaciji ovog meda u budućnosti.
- Udio ukupnih fenola kretao se od 126,05 mg galne kiseline/kg meda do 175,60 mg galne kiseline/kg meda, a FRAP vrijednosti iznosile su od 188,81  $\mu\text{M}$  Fe (II) do 353,33  $\mu\text{M}$  Fe (II). Prema dostupnim podacima rezultati dobiveni u ovom istraživanju prvi su podaci za ovu uniflornu vrstu meda što svakako doprinosi značaju ovog istraživanja u opisu uniflornih vrsta meda u Hrvatskoj.
- Statistička obrada podataka pokazala je da se uzorci iz primorske Hrvatske i kontinentalne Hrvatske statistički značajno razlikuju prema udjelu vode, električnoj provodnosti, aktivnosti dijastaze te FRAP vrijednostima. Za potpuniji opis ove specifične vrste meda i potvrdu ovih preliminarnih rezultata potrebno je provesti analizu na većem broju uzoraka i kroz više pčelarskih sezona kako bi se dobio bolji i potpuniji uvid u karakteristike meda od bršljana i dao prijedlog za preporučene raspone vrijednosti za parametre kvalitete za potvrdu uniflornosti.

## **7. LITERATURA**

- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239, 70-76.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 185-191.
- Beril Sen, N., Guzelmeric, E., Vovk, I., Glavnik, V., Kırmızıbekmez, H., Yesilada, E. (2023) Phytochemical and Bioactivity Studies on Hedera helix L. (Ivy) Flower Pollen and Ivy Bee Pollen. *Antioxidants*, 12(7), 1394.
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T. (2007) Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105, 822–828.
- Garbuzov, M., Ratnieks, F. (2014) Ivy: An underappreciated key resource to flower-visiting insects in autumn. *Insect Conservation and Diversity*, 7, 91-102.
- Bogdanov, S. (2009) Harmonised methods of the International Honey Commission. *International Honey Commission (IHC)*, 5, 1-62.
- Bogdanov, S., Martin, S. (2002) Honey authenticity: a review. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93, 232-254.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano Oddo, L. (2004) Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35, 4-17.
- Codex Alimentarius Commission. (2001) *Revised Codex Standard for Honey*. Codex. Stan 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2, 1-7.
- Council of the European Union. (2002) Council Directive 2001/110/EC of Dec 20, 2001, relating to honey. *Official Journal of European Community*, 10, 47-52.
- da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Fett, R. (2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*, 196, 309-323.
- DHMZ, Državni hidrometeorološki zavod, Mjesečni agrometeorološki bilten. [https://meteo.hr/podaci.php?section=podaci\\_agro&param=mjesečni\\_agro\\_bilten&Mjesec=10&Godina=2023](https://meteo.hr/podaci.php?section=podaci_agro&param=mjesečni_agro_bilten&Mjesec=10&Godina=2023) (1.9.2024.)
- Dimiņš, F., Kūka, P., Kūka, M., Čakste, I. (2006) The Criteria of Honey Quality and Its Changes during Storage and Thermal Treatment. *Scientific Journal of the Latvia University of Life Sciences and Technologies*, 16, 73-78.

- Feás, X., Estevinho, M.L. (2009) A Survey of the In Vitro Antifungal Activity of Heather (*Erica* Sp.) Organic Honey. *Journal of Medicinal Food*, 14, 1284-1288.
- Flanjak, I., Kenjeric, D., Bubalo, D., Primorac, Lj. (2016) Characterisation of selected Croatian honey types based on the combination of antioxidant capacity, quality parameters, and chemometrics. *European Food Research and Technology*, 242, 467-475.
- Fратиани, F., Ombra, M.N., d'Acierno, A., Caputo, L., Amato, G., De Feo, V., Coppola, R., Nazzaro, F. (2021) Polyphenols Content and In Vitro  $\alpha$ -Glycosidase Activity of Different Italian Monofloral Honeys, and Their Effect on Selected Pathogenic and Probiotic Bacteria. *Microorganisms* 9(8), 1694.
- Gašić, U.M., Milojković Opsenica D.M., Tešić, Ž.L. (2017) Polyphenols as possible markers of botanical origin of honey. *Journal of AOAC International*, 100, 852-861.
- Kavanagh, S., Gunnoo, J., Passos, T.M., Stout, J.C., White, B. (2019) Physicochemical properties and phenolic content of honey from different floral origins and from rural versus urban landscapes. *Food Chemistry*, 272, 66-75.
- Kolaylı, S., Baltas, N., Sahin, H., Karaoglu, S. (2017) Evaluation of Anti-Helicobacter Pylori Activity and Urease Inhibition by Some Turkish Authentic Honeys. *Journal of Food Science and Engineering* 7:67-73, 2017.
- Krishnan, R., Mohammed, T., Kumar, S.K., Arunima, S.H. (2021) Honey crystallization: Mechanism, evaluation and application. *The Pharma Innovation Journal*, 10(5), 222-231.
- Lawag Lozada, I., Nolden, S.E., Schaper, A.M.A., Lim Young, L., Locher, C. (2023) A Modified Folin-Ciocalteu Assay for the Determination of Total Phenolics Content in Honey. *Applied Sciences* 13, 2135.
- Lazarević, K.B., Jovetić, M.S., Tešić, Ž.,LJ. (2017) Physicochemical Parameters as a Tool for the Assessment of Origin of Honey. *Journal of AOAC International*, 100, 4.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. (1978) Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 59, 139-157.
- Makowicz, E., Kafarski, P., Jasicka-Misiak, I. (2018) Chromatographic fingerprint of the volatile fraction of rare *Hedera helix* honey and biomarkers identification. *European Food Research and Technology*, 244, 2169–2179.

- Milojković Opsenica D., Lušić D., Tešić Ž. (2015) Modern analytical techniques in the assessment of the authenticity of Serbian honey, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66, 233-241.
- MP, Ministarstvo poljoprivrede. (2017) *Pravilnik o izmjenama Pravilnika o medu*. Narodne novine 47/2017.
- MPRRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. (2009) *Pravilnik o kakvoći uniflornog meda*. Narodne novine 122/09.
- MPRRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. (2015) *Pravilnik o medu*. Narodne novine 53/15.
- Nasrolahi, O., Heidari, R., Rahmani, F., Farokhi, F. (2012) Effect of natural honey from Ilam and metformin for improving glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2, 212–221.
- Pascual-Maté, A., Osés, S.M., Fernández-Muiño, M.A., Sancho, M.T. (2017) Analysis of Polyphenols in Honey: Extraction, Separation and Quantification Procedures. *Separation & Purification Reviews*, 47, 142–158.
- Piana, M.L., Persano Oddo, L., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., Guyot Declerck, C. (2004) Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, 35, 26-37.
- Persano Oddo, L., Bogdanov, S. (2004) Determination of honey botanical origin: problems and issues. *Apidologie*, 35:2-3.
- Persano Oddo, L., Piana, L., Bogdanov, S., Bentabol, A., Gotsiou, P., Kerkvliet, J., Martin, P., Morlot, M., Ortiz Valbuena, A., Ruoff, K., Ohe, K. (2004) Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie*, 35, 82-93.
- Persano Oddo, L., Piro, R. (2004) Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35, 38-81.
- Persano Oddo, L., Piazza, M.G., Sabatini, A.G., Accorti, M. (1995) Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, 26, 453-465.
- Pospiech, M., Javůrková, Z., Hrabec, P., Čížková, H., Titěra, D., Štarha, P., Ljasovská, S., Kružík, V., Podskalská, T., Bednář, J., Kundrliková Burešová, P., Tremlová, B. (2021) Physico-Chemical and Melissopalynological Characterization of Czech Honey. *Applied Sciences*, 11, 4989.

- Ramzi, M., Kashaninejad, M., Salehi, F., Sadeghi Mahoonak, A.R., Razavi, S.M.A. (2017) Rheological and Physicochemical Properties of Honeys as a Function of Temperature, Concentration and Moisture Content. *Journal of Food Biosciences and Technology* 7:35-48.
- Svečnjak, L., Bubalo, D., Baranović, G., Novosel, H. (2015) Optimization of FTIR-ATR spectroscopy for botanical authentication of unifloral honey types and melissopalynological data prediction. *European Food Research and Technology*, 240, 6.
- Szabó, T.R., Mézes, M., Szalai, T., Zajác, E., Weber, M. (2016) Colour identification of honey and methodical development of its instrumental measuring. *Columella - Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 3, 29-36.
- Tafere, A.D. (2021) Chemical Composition and uses of Honey: A Review. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 4, 194-201.
- Valdés-Silverio, L.A., Iturralde, G., García-Tenesaca, M., Paredes-Moreta, J., Narváez-Narváez, D.A., Rojas-Carrillo, M., Tejera, E., Beltrán-Ayala, P., Giampieri, F., Sengz-Suarez, J.M. (2018) Physicochemical Parameters, Chemical Composition, Antioxidant Capacity, Microbial Contamination and Antimicrobial Activity of Eucalyptus Honey from the Andean Region of Ecuador. *Journal of Apicultural Research*, 57, 3.
- Von Der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M.L., Morlot, M., Martin, P. (2004) Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35, 18-25.