

# Antioksidativni kapacitet meda i promjene tijekom procesiranja i skladištenja

---

Flanjak, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2012

*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:109:121356>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-03**

REPOZITORIJ

PTFS

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**

**Ivana Flanjak, dipl. ing.**

**ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET MEDA I PROMJENE  
TIJEKOM PROCESIRANJA I SKLADIŠTENJA**

**DOKTORSKI RAD**

Osijek, srpanj, 2012.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane  
Katedra za kakvoću hrane  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**UDK:** 638.16 : 621.796 (043)  
**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na I. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 29. listopada 2009.  
**Voditelj:** *Dr. sc. Ljiljana Primorac, red. prof.*

### ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET MEDA I PROMJENE TIJEKOM PROCESIRANJA I SKLADIŠTENJA

*Ivana Flanjak, dipl. ing.*

#### Sažetak:

Svrha rada bila je karakterizirati odabrane vrste meda (kesten, kadulja, bagrem i medljikovac) s obzirom na antioksidativni kapacitet te ispitati mogućnost korištenja antioksidativnog kapaciteta u identifikaciji botaničkog podrijetla meda. U cilju razumijevanja antioksidativne sposobnosti meda ispitana je povezanost antioksidativnog kapaciteta s fizikalno-kemijskim parametrima kakvoće meda. Osim toga, ispitan je utjecaj procesiranja i skladištenja na antioksidativni kapacitet i s njim povezane parametre kakvoće.

Rezultati su pokazali da je antioksidativni kapacitet meda prikladan za identifikaciju botaničkog podrijetla te da ukupnom antioksidativnom kapacitetu najviše doprinose fenolne komponente. Utvrđen je sinergistički utjecaj procesiranja i skladištenja na smanjenje kakvoće meda koji je više izražen kod svjetlijih vrsta meda (bagrem i kadulja). Antioksidativni kapacitet nektarnih vrsta meda tijekom procesiranja i skladištenja se povećao, što s nutritivnog stajališta predstavlja povoljnu promjenu, no istovremeno smanjenje drugih parametara kakvoće umanjuje pozitivan utjecaj procesiranja i skladištenja. Promjena antioksidativnog kapaciteta medljikovca bila je najmanja od promatranih vrsta.

**Ključne riječi:** med, antioksidativni kapacitet, procesiranje, skladištenje, promjene

**Rad sadrži:** 116 stranica  
38 slika  
20 tablica  
16 priloga  
176 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. dr. sc. <i>Daniela Čačić Kenjeric</i> , izv. prof.            | predsjednik   |
| 2. dr. sc. <i>Ljiljana Primorac</i> , red. prof. (trajno zvanje) | član-voditelj |
| 3. dr. sc. <i>Nada Vahčić</i> , red. prof. (trajno zvanje)       | član          |
| 4. dr. sc. <i>Milena Mandić</i> , red. prof. (trajno zvanje)     | zamjena člana |

**Datum obrane:** 20. srpnja 2012.

Rad je pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Nacionalnoj i Sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Gradskoj i Sveučilišnoj knjižnici Osijek, Rektoratu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Sveučilišnoj knjižnici Rijeka, Sveučilišnoj knjižnici Split, Sveučilišnoj knjižnici Pula, Sveučilišnoj knjižnici Zadar.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DISSERTATION

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Food and Nutrition Research  
Subdepartment of Food Quality  
Franje Kuhača 20, HR-31000Osijek, Croatia

**UDC:** 638.16 : 621.796 (043)  
**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. I held on October 29<sup>th</sup> 2009.  
**Mentor:** *Ljiljana Primorac*, PhD, full professor

### ANTIOXIDANT CAPACITY OF HONEY AND CHANGES DURING PROCESSING AND STORAGE *Ivana Flanjak, BSc*

#### Summary:

The aim of this work was to characterise selected honey types (chestnut, sage, black locust and honeydew) with aspect of antioxidant capacity and to evaluate possible application of antioxidant capacity as a criterion for botanical origin differentiation. Towards better understanding honey antioxidant capacity, correlation between antioxidant capacity and physicochemical parameters was studied as well as impact of processing and storage on honey antioxidant capacity and correlated parameters.

Results showed that antioxidant capacity is suitable parameter for botanical origin differentiation and that phenolic compounds contribute significantly to the honey antioxidant capacity. Combined effect of processing and storage on honey quality degradation was observed which was more pronounced in lighter honey types (black locust and sage). During processing and storage honey antioxidant capacity increased, that is from nutritional point a positive effect, but at the same time quality degradation was determined with respect to other parameters, which impairs positive effect of processing and storage. Antioxidant capacity change of honeydew honeys was lowest from selected honey types.

**Key words:** honey, antioxidant capacity, processing, storage, changes

**Thesis contains:** 116 pages  
38 figures  
20 tables  
16 supplements  
176 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Daniela Čačić Kenjerić</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Ljiljana Primorac</i> , PhD, prof.                | supervisor   |
| 3. <i>Nada Vahčić</i> , PhD, prof.                      | member       |
| 4. <i>Milena Mandić</i> , PhD, prof.                    | stand-in     |

**Defense date:** July 20<sup>th</sup> 2012

This thesis is printed and deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, National and University Library in Zagreb, City and University Library Osijek, University of J. J. Strossmayer in Osijek, University Library Rijeka, University Library Split, University Library Pula and University Library Zadar.

*Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Ljiljani Primorac red. prof. na nesebičnoj pomoći, korisnim savjetima i strpljenju pri izradi doktorske disertacije.*

*Hvala dr. sc. Mileni Mandić red. prof. na moralnoj i materijalnoj pomoći u izradi doktorske disertacije.*

*Hvala dr. sc. Draganu Bubalu izv. prof., dr. sc. Ivici Strelec doc., Milici, Nataliji i Katarini na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela.*

*Veliko hvala Danieli na brojnim savjetima i podršci.*

*Posebno hvala mojoj obitelji, Marinu i Milu, roditeljima i sestri na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju, strpljenju i vjeri u moj uspjeh.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Definicija i podjela meda .....	4
2.2. Kemijski sastav meda .....	7
2.2.1. Voda .....	7
2.2.2. Ugljikohidrati .....	8
2.2.3. Proteini i aminokiseline .....	9
2.2.4. Kiseline .....	10
2.2.5. Mineralne tvari .....	10
2.2.6. Fenolne komponente .....	11
2.2.7. Komponente arome .....	13
2.2.8. Vitamini .....	14
2.3. Zdravstveni aspekt uporabe meda .....	14
2.4. Antioksidativni kapacitet .....	15
2.4.1. Oksidativni stres, slobodni radikali i antioksidansi .....	15
2.4.2. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta .....	17
2.4.2.1. DPPH metoda .....	20
2.4.2.2. FRAP metoda .....	22
2.4.2.3. Određivanje ukupnih fenola .....	23
2.4.3. Antioksidativni kapacitet meda .....	24
2.5. Utjecaj procesiranja i skladištenja na kakvoću meda .....	27
2.5.1. Aktivnost enzima .....	28
2.5.2. Boja meda .....	31
2.5.3. Stvaranje hidrosimetilfurfurala (HMF) .....	32
2.5.4. Stvaranje produkata Maillardovih reakcija .....	34
2.5.5. Promjena antioksidativnog kapaciteta .....	36
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	37
3.1. Definiranje zadatka .....	38
3.3. Metode .....	40
3.3.1. Melisopalinološka analiza .....	40
3.3.2. Određivanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametara meda .....	40
3.3.3. Određivanje udjela proteina .....	40
3.3.4. Određivanje aktivnosti glukoza-oksidadze .....	41
3.3.5. Određivanje aktivnosti kisele fosfataze .....	42
3.3.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje .....	42
3.3.7. Određivanje boje pomoću Lovibond komparatora .....	42

3.3.8. Određivanje boje kromametrom .....	43
3.3.9. Metode određivanja ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta .....	44
3.3.9.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom .....	44
3.3.9.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom .....	44
3.3.9.3. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta FRAP metodom .....	46
3.4. Statistička obrada podataka .....	46
4. REZULTATI .....	47
5. RASPRAVA .....	85
6. ZAKLJUČCI .....	102
7. LITERATURA .....	104
8. PRILOZI.....	117

## Popis oznaka, kratica i simbola

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
AOAC	Međunarodno udruženje službenih analitičkih kemičara (Association of Analytical Communities)
B	med bagrema
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FRAP	antioksidacijska sposobnost redukcije željeza (Ferric Reducing Antioxidant Power)
F/G	odnos fruktoze i glukoze
F+G	zbroj fruktoze i glukoze
GC-MS	plinska kromatografija s masenim detektorom (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HAT	prijenos vodikovog atoma (Hydrogen Atom Transfer)
HMF	hidroksimetilfurfural
HPLC	visoko tlačna tekućinska kromatografija (High Pressure Liquid Chromatography)
HTST	metoda sterilizacije pri visokim temperaturama kratko vrijeme (High Temperature Short Time)
IC <sub>50</sub>	učinkovita koncentracija (Efficient concentration)
KD	med kadulje
KS	med kestena
MD	medljikovac
MPRRR	Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja
MRP	produkti Maillardovih reakcija (Maillard Reaction Products)
NA	neto apsorbancija (Net absorbance)
ORAC	kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PC	udio fenola (phenol content)
PCA	analiza osnovnih komponenata (Principal Component Analysis)
ROS	reaktivne kisikove vrste (Reactive Oxygen Species)
SET	prijenos jednog elektrona (Single Electron Transfer)
TEAC	antioksidativni kapacitet izražen kao Trolox ekvivalenti (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity)
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin
TRAP	antioksidacijski parametar hvatanja ukupnih radikala (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter)
USDA	Ministarstvo poljoprivrede SAD (United States Department of Agriculture)



## **1. UVOD**

Med se koristi još od početaka ljudske civilizacije, prvenstveno kao hrana, ali i u terapeutske svrhe. Brojne studije pokazale su da med ima antimikrobna i antiseptična svojstva, prebiotička svojstva, a nedavne pokazuju da med ima značajan antioksidativni kapacitet (Gheldof i Engeseth, 2002.; Bogdanov, 2009.). Antioksidansi su komponente koje štite stanice ljudskog organizma od štetnog djelovanja slobodnih radikala sprječavajući i/ili usporavajući nastanak oksidativnog stresa uzorkovanog neravnotežom između nastajanja slobodnih radikala i drugih oksidanasa i antioksidativne obrane organizma. Suvremen način života (loše prehrabene navike, stres, lijekovi) potiču nastajanje slobodnih radikala, što može biti jedan od uzroka mnogih bolesti (bolesti kardiovaskularnog sustava, karcinoma, neurodegenerativnih bolesti, kroničnih upala). Slično djelovanje antioksidansi imaju i u hrani, gdje sprječavanjem oksidacijskih procesa produljuju trajnost proizvoda i doprinose očuvanju nutritivnih karakteristika. Antioksidativni kapacitet meda, kao i mnoga druga svojstva, prvenstveno ovisi o botaničkom podrijetlu meda, no i o različitim čimbenicima vezanim za zemljopisno podrijetlo poput klimatskih uvjeta i florističkog sastava (Frankel i sur., 1998.). Rezultat je sinergističke aktivnosti mnogih sastojaka uključujući fenolne komponente, peptide, aminokiseline, organske kiseline, enzime (katalaza, glukoza-oksidadaza), produkte Maillardovih reakcija, derivate karotenoida, askorbinsku kiselinu te još neke komponente u tragovima. Poznato je da tamnije vrste meda imaju viši udio ukupnih fenola, a time i veći antioksidativni kapacitet od svjetlijih vrsta. Poznavanje antioksidativnog kapaciteta meda te definiranje parametara i sastojaka koji su s njim povezani doprinosi boljem razumijevanju meda kao izvora antioksidanasa.

Med namijenjen tržištu oduvijek je prolazio neki oblik prerade, kako od strane pčelara tako i od industrije. Jedini praktični način za sprječavanje/odgađanje kristalizacije, u svrhu olakšavanja punjenja meda u ambalažu, kao i sprječavanja fermentacije jest toplinski tretman. Dinamika promjena parametara kakvoće meda ovisi o primijenjenoj temperaturi i vremenu zagrijavanja (Turhan i sur., 2008.). Toplinski tretman u trajanju od 1-2 dana pri 40-50° C uzrokuje neznatne promjene u medu dok zagrijavanje na višim temperaturama, radi pasterizacije, dovodi do značajnog pada kakvoće meda, s obzirom da su mnogi sastojci meda koji su odgovorni za specifična nutritivna i biološka svojstva termolabilni (Krell, 1996.; Bogdanov, 2009.). Skladištenjem i procesiranjem meda dolazi do promjena sastava meda, te je od velikog značaja za potrošače i proizvođače poznavati dinamiku ovih promjena.

Cilj ovoga rada bio je odrediti antioksidativni kapacitet odabranih vrsta hrvatskog meda (kesten, kadulja, bagrem i medljikovac), kako bi se utvrdile specifičnosti vezane za botaničko podrijetlo uzoraka, te analizirati povezanost antioksidativnog kapaciteta s fizikalno-kemijskim parametrima, odnosno sastojcima meda. Osim toga, ispitan je utjecaj zagrijavanja i skladištenja na antioksidativni kapacitet i parametre kakvoće meda.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Definicija i podjela meda

Prema Pravilniku o medu, med jest sladak, gust, viskozni, tekući ili kristaliziran 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, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja (MPRRR, 2009.a).

Podjela meda može se zasnivati na njegovom podrijetlu, vremenu i/ili lokaciji proizvoda, fizikalnom stanju, načinu proizvodnje te obliku u kojem će biti dostupan potrošaču (White, 2000.). S obzirom na podrijetlo med se klasificira kao cvjetni (nektarni) proizveden na način da pčele skupljaju nektar različitih medonosnih biljaka i kao medljikovac kojeg pčele proizvode od medne rose (MPRRR, 2009.a).

Nektarni med može biti uniflorni ili poliflorni ovisno o tome prevladava li jedna biljna vrsta ili se sastoji od više njih. Prema Pravilniku o kakvoći uniflornog meda (MPRRR, 2009.b), da bi se med mogao označiti kao uniflorni mora u netopljivom sedimentu sadržavati najmanje 45 % peludnih zrnaca iste biljne vrste. Osim toga, spomenutim Pravilnikom definirane su i minimalne količine peludnih zrnaca specifičnih biljnih vrsta koje su prirodno bogate ili siromašne peludnim zrnacima (**Tablica 1**).

Medljikovac je med kojeg pčele proizvode od medne rose (medljike) koja nastaje uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) na živim dijelovima biljaka ili nastaje od sekreta živih dijelova biljke (Codex Alimentarius Commission, 2001.; Council of the European Union, 2002.). Sve vrste meda od bjelogorične i crnogorične medljike označavaju se samo kao medljikovac, jedino se u posebnu grupu svrstava medljikovac dobiven od medljike medećeg cvrčka (*Metcalfa pruinosa* Say), koji pokazuje različite fizikalno-kemijske karakteristike (Persano Oddo i Piro, 2004.).

Osim nektarnog meda i medljikovca, prema međunarodnom standardu Codex Alimentarius postoji i miješani med koji se dobije miješanjem medljikovca i nektarnog (cvjetnog) meda (Codex Alimentarius Commission, 2001.).

**Tablica 1** Minimalni udjeli peludnih zrnaca za pojedine vrste uniflornih vrsta meda  
(MPRRR, 2009.b)

Naziv biljne vrste	Udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu
Pitomi kesten ( <i>Castanea sativa</i> Mill.)	85 %
Uljana repica ( <i>Brassica napus</i> L.)	60 %
Facelija ( <i>Phacelia tanacetifolia</i> Benth.)	60 %
Lipa ( <i>Tillia</i> sp.)	25 % (10 %*)
Bagrem ( <i>Robinia pseudoacacia</i> L.)	20 %
Metvica ( <i>Mentha</i> sp.)	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 %
Agrumi ( <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)

Sastav meda i njegova svojstva ovise prvenstveno o botaničkom podrijetlu, ali utjecaj imaju i zemljopisni položaj (sastav tla, floristički sastav), klimatski uvjeti, pasmina pčele te uvjeti procesiranja i daljnjeg rukovanja medom (Singhal i sur., 1997.). S ciljem utvrđivanja graničnih vrijednosti za pojedine parametre kakvoće meda i usklađivanja metoda za određivanje istih, doneseni su propisi na međunarodnoj (Codex Alimentarius Commission, 2001.) i europskoj razini (Council of the European Union, 2002.) i osnovana Međunarodna komisija za med (International Honey Commission). U Republici Hrvatskoj su zahtjevi za kakvoću meda definirani Pravilnikom o medu (MPRRR, 2009.a) koji je usuglašen s direktivom Europske unije (Council of the European Union, 2002.). Granične vrijednosti pojedinih parametara dani su u **Tablici 2**.

Osim navedenih, propisani su i dodatni zahtjevi koje med mora ispunjavati kada se stavlja na tržište ili se upotrebljava u proizvodnji namirnica. Medu se ne smiju dodavati nikakvi sastojci, uključujući i aditive, niti bilo kakvi drugi dodaci. Med mora, koliko je to moguće, biti bez organskih i anorganskih tvari stranih njegovom sastavu. Uz iznimku pekarskog meda, ne smije imati strani okus ili miris, biti u stanju vrenja, imati umjetno izmijenjenu kiselost ili biti zagrijavan tako da prirodni enzimi budu uništeni ili u znatnoj mjeri inaktivirani.

**Tablica 2** Granične vrijednosti parametara kakvoće meda koji se stavlja na tržište  
(MPRRR, 2009.a)

Parametar	Granične vrijednosti
Količina šećera	
Količina fruktoze i glukoze (zbroj)	
cvjetni (nektarni) med	≥ 60 g/100g
medljikovac, miješani med	≥ 45 g/100g
Količina saharoze	
općenito	≤ 5 g/100g
bagrem, lucerna, slatkovina, eukaliptus, agrumi, <i>Banksia menziesii</i> , <i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia miliganii</i>	≤ 10 g/100g
lavanda, boražina	≤ 15 g/100g
Količina vode	
općenito	≤ 20 %
vrijesak i pekarski med općenito	≤ 23 %
pekarski med od vrijeska	≤ 25 %
Količina tvari netopljivih u vodi	
općenito	≤ 0,1 g/100g
prešani med	≤ 0,5 g/100g
Električna provodnost	
vrste meda koje nisu dolje navedene i njihove mješavine	≤ 0,8 mS/cm
medljikovac i med kestena i njihove mješavine, osim dolje navedenih	≥ 0,8 mS/cm
iznimke: planika, vrijes, eukaliptus, lipa, vrijesak, manuka, čajevac	
Slobodne kiseline	
općenito	≤ 50 mEq/1000g
pekarski med	≤ 80 mEq/1000g
Aktivnost dijastaze utvrđene nakon prerade i miješanja	
općenito, osim pekarskog meda	≥ 8
vrste s prirodno niskom količinom enzima i HMF < 15mg/kg	≥ 3
HMF nakon prerade i miješanja	
općenito, osim pekarskog meda	≤ 40 mg/kg
medovi iz regija tropske klime i mješavine istih	≤ 80 mg/kg

## 2.2. Kemijski sastav meda

Najznačajnije i ujedno najproblematičnije svojstvo meda je njegova varijabilnost u sastavu. Naime, uzimajući u obzir čimbenike koji utječu na kakvoću meda, očigledno je da navođenje prosječnog sastava meda ima ograničenu vrijednost (White, 2000.). Neke komponente meda potječu od pčele, neke od medonosne biljke, dok neke nastaju ili se mijenjaju tijekom zrenja meda. Kemijski sastav meda prvenstveno ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu, međutim, i unutar iste vrste meda postoje varijacije u sastavu zbog klimatskih varijacija ili različitog zemljopisnog podrijetla (Anklam, 1998.).

Glavne komponente meda su ugljikohidrati (prvenstveno D-fruktoza i D-glukoza) i voda, a u malim količinama u medu se nalaze i organske kiseline, mineralne tvari, vitamini, pigmenti, komponente arome, proteini (uključujući i enzime), fenolne komponente koje su značajne za karakterizaciju meda i njegova nutritivna svojstva (White, 2000.).

### 2.2.1. Voda

Udio vode jedna je od najvažnijih karakteristika meda koja ima veliki utjecaj na njegovu kakvoću, kristalizaciju i održivost. Udio vode u medu kreće se od 13 do 25 %, a čimbenici koji utječu na udio vode su: klimatski uvjeti, relativna vlažnost i temperatura unutar košnice, podrijetlo i sastav nektara, pasmina pčele i snaga pčelinje zajednice, te uvjeti procesiranja i skladištenja (White i Doner, 1980.). Udio vode u medu nije konstantan već se zbog higroskopnosti meda mijenja ovisno o uvjetima skladištenja. Prerano vrcanje meda također može dovesti do proizvodnje meda s povećanim udjelom vode. Med koji sadrži veći udio vode skloniji je fermentaciji koja nastaje djelovanjem osmofilnih kvasaca na ugljikohidrate pretvarajući ih u alkohol i CO<sub>2</sub>. Djelovanjem kisika alkohol se razgrađuje na octenu kiselinu i vodu što rezultira pojavom kiselog okusa meda i kvarenjem. Na pojavu fermentacije utječu broj kvasaca u medu, temperatura te raspodjela i dostupnost vode nakon kristalizacije meda. Sigurnim od fermentacije smatra se med koji ima udio vode niži od 17,1 % (Krell, 1996.). S druge strane, prenizak udio vode može otežati rukovanje prilikom vrcanja i prerade. Od udjela vode ovise mnogi fizikalni parametri poput indeksa refrakcije, kristalizacije, viskoznosti, specifične težine (White, 2000.). Iako u Republici Hrvatskoj ne postoje dodatni kriteriji za specifične klase meda, pčelarske organizacije nekih zemalja (Njemačka, Belgija, Austrija, Italija, Švicarska, Španjolska) predložile su da med visoke kakvoće treba imati do 18,5 % vode (Bogdanov i sur., 1999.a, 1999.b).

### 2.2.2. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su glavni sastojak meda (95 – 99,9 % suhe tvari), pri čemu su glavna monosaharidi D-fruktoza i D-glukoza (85 – 95 % ukupnih ugljikohidrata) koji su odgovorni za slatkoću, energetska vrijednost i fizikalne karakteristike meda (White, 2000.). Osim monosaharida, u medu je identificirano još oko 25 različitih disaharida, trisaharida i oligosaharida (Anklam i Radovic, 2002.; Ruiz-Matute i sur., 2010.). Mnogi od identificiranih ugljikohidrata nisu prisutni u nektaru, već se stvaraju tijekom zrenja i skladištenja meda djelovanjem enzima pčele i kiselina (de la Fuente i sur. 2006.; Ball, 2007.). U prosjeku fruktoze ima više nego glukoze, ali postoje i vrste meda kod kojih prevladava glukoza (med uljane repice, suncokreta, maslačka). Odnos fruktoze i glukoze u literaturi se primjenjuje kao parametar identifikacije meda, a u većini slučajeva je veći od 1 (White, 2000.; Persano Oddo i Piro, 2004.). Od disaharida najznačajnija je saharoza čiji je udio većinom manji od 5 %, osim rijetkih slučajeva kada je njezin udio veći od 5 % (med citrusa, djeteline, lavande). Medljikovac je bogatiji složenijim ugljikohidratima (oligosaharidima) nego nektarni med jer su u proizvodnji medljikovca uključene i lisne uši i pčele odnosno njihovi enzimi (White, 2000.; Bogdanov i sur., 2004.).

Otopina meda ima sposobnost zakretanja ravnine polariziranog svjetla zbog prisutnih ugljikohidrata, od kojih svaki ima specifičan kut zakretanja. Nektarni med zakreće ravninu polariziranog svjetla u lijevo (zbog većeg udjela fruktoze nad glukozom), dok medljikovac zakreće u desno (zbog većeg udjela glukoze nego kod nektarnih medova, ali i prisutnosti složenih ugljikohidrata kao što su saharoza, melecitoza i erloza koje su također desno skrećuće). Određivanje optičke aktivnosti može se koristiti za razlikovanje nektarnog meda od medljikovca (Bogdanov i sur., 2004.), ali se može koristiti i kao jedan od parametara klasifikacije uniflornih vrsta meda (Primorac i sur., 2011.a).

Ugljikohidratni profil meda proučavan je kroz više istraživanja kao mogući parametar botaničkog i zemljopisnog podrijetla te kao indikator patvorenja meda (Anklam, 1998.; Mateo i Bosch-Reig, 1997.; Cordella i sur., 2003.) pri čemu se udio disaharida i oligosaharida pokazao kao dobar parametar za određivanje botaničkog i zemljopisnog podrijetla. U istraživanju Da Costa Leite i sur. (2000.), udio maltoze, nigeroze, turanoze i maltotrioze pokazali su se kao korisni u razlikovanju 70 uzoraka meda iz različitih teritorijalnih regija Brazila. Cotte i sur. (2003.) su primjenom plinske i tekućinske kromatografije uz obradu podataka analizom osnovnih komponenata (*principal component analysis*, PCA) detektirali dodatak industrijskih sirupa u medu u količinama 5 – 10 %. Isti autori su primjenom kromatografskih tehnika i kasnijom obradom podataka PCA analizom postigli razlikovanje meda jele od ostalih analiziranih vrsta meda (bagrem, kesten, repica, lavanda, lipa i suncokret) s točnošću 100 %, dok su se ostale vrste grupirale prema različitim odnosima



ispitivanih šećera. Tako su se med kestena i bagrema razlikovali od ostalih ispitivanih vrsta prema omjeru fruktoze i glukoze (F/G), med lavande i uljane repice izdvojeni su prema omjeru maltoza/trehaloza dok se med suncokreta i uljane repice razlikuju od ostalih prema udjelu glukoze te omjeru erloza/maltuloza (Cotte i sur., 2004.a).

### 2.2.3. Proteini i aminokiseline

Med sadrži vrlo male količine proteina (do 0,2 %) koji uglavnom potječu od pčele, a mogu se koristiti kao pokazatelj čistoće i patvorenja meda (Won i sur., 2008.). Dio proteina u med dopijeva iz biljke (nektara i peludi), te su kao takvi karakteristični za pojedine vrste meda. Baroni i sur. (2002.) analizirali su primjenu proteina meda kao mogućih markera za podrijetlo meda, pri čemu su uspjeli razlikovati med suncokreta i eukaliptusa, međutim podaci o primjeni ove metode na druge vrste meda nisu dostupni.

Mnogo bolji parametar određivanja botaničkog i zemljopisnog podrijetla, kako tvrde mnogi autori, je analiza slobodnih aminokiselina u medu. Podrijetlo aminokiselina u medu mogu biti nektar, pelud i sama pčela, a ukupna količina aminokiselina u medu vrlo rijetko prelazi 300 ppm (Anklam, 1998.; White, 2000.). Mnogi autori pokazali su da je prolin najzastupljenija aminokiselina i čini 50 – 85 % ukupnih aminokiselina (González Paramás i sur., 2006.; Hermosín i sur., 2003.). Istraživanja su dokazala da aminokiselina prolin u med dolazi iz pčele odnosno iz njezinih mišića prilikom prerade nektara u med (Cotte i sur., 2004.b). Udio prolina predložen je od strane Međunarodne komisije za med kao jedan od kriterija zrelosti meda, kao i mogući indikator patvorenja. Kao granična vrijednost za izvorni, nepatvoreni med postavljena je vrijednost udjela prolina od 180 mg/kg koja je prihvaćena u većini europskih zemalja (Bogdanov i sur., 1999.a; 1999.b). Osim prolina, u medu je identificirano još 26 aminokiselina (esencijalnih i neesencijalnih) (Hermosín i sur., 2003.). Uzimajući u obzir da većina aminokiselina vodi podrijetlo iz nektara, a samo manji dio iz peludi i od pčela, te poznavajući raznolikost kemijskog sastava nektara ovisno o vrsti biljke, neki autori smatraju da se sastav i količina pojedinih aminokiselina može koristiti kao marker botaničkog podrijetla. Istraživanja su potvrdila da se kestenov med razlikuje od ostalih vrsta zbog prisutnosti aminokiseline arginina dok je aminokiselina triptofan prisutna samo u medu bagrema (González Paramás i sur., 2006.). Cotte i sur. (2004.b) proveli su ispitivanje aminokiselinskog profila 7 uniflornih vrsta meda (bagrem, kesten, uljana repica, lavanda, jela, lipa i suncokret), te na osnovi rezultata potvrdili da su koncentracije aminokiseline fenilalanina u medu lavande i koncentracije aminokiseline treonina u medu suncokreta značajno više nego kod ostalih ispitivanih vrsta, te predložili da se sadržaj navedenih aminokiselina može koristiti kao marker meda lavande odnosno suncokreta. Analizom 22

aminokiseline u medu primjenom plinske kromatografije uz maseni detektor (GC-MS) i kasnijom obradom podataka PCA analizom, španjolski znanstvenici uspješno su razdvojili 4 vrste meda (ružmarin, eukaliptus, vrijes, naranča) s točnošću preko 90 % (Nozal i sur., 2004.). Iglesias i sur. (2004.) sa 100 % točnošću uspjeli su razlikovati medljikovac od nektarnog meda iako su uzorci bili iz vrlo bliskog teritorijalnog područja, međutim poznato je da se ove dvije vrste meda vrlo dobro razlikuju u mnogim drugim fizikalno-kemijskim parametrima. S druge strane, Hermosín i sur. (2003.) bili su manje uspješni u razlikovanju 10 uniflornih vrsta meda prema aminokiselinskom profilu, te su u svom istraživanju uspjeli izdvojiti tek med lavande koji se ionako pokazao specifičan po koncentraciji aminokiseline fenilalanina.

Ipak, najveći dio proteina u medu čine enzimi (dijastaza, invertaza, glukoza-oksidaza, katalaza, kiselna fosfataza) čija se aktivnost smatra pokazateljem kakvoće, stupnja zagrijavanja te uvjeta skladištenja (Anklam, 1998.). S obzirom da se aktivnost enzima mijenja tijekom procesiranja i skladištenja meda, detaljnije o enzimskoj aktivnosti meda bit se opisano u poglavlju Utjecaj procesiranja i skladištenja na kakvoću meda (Poglavlje 2.5.).

#### 2.2.4. Kiseline

U medu su prisutne male količine organskih kiselina koje su odgovorne za senzorska svojstva (miris i okus) i stabilnost s obzirom na mikrobiološko kvarenje meda. Najzastupljenija kiselina je glukonska koja nastaje iz glukoze djelovanjem pčelinjeg enzima glukoza-oksidaze. Osim glukonske kiseline, u medu se nalaze i mravlja, octena, maslačna, jabučna, jantarna, oksalna, vinska, limunska, mliječna, maleinska, valerijanska, piroglutaminska i benzojeva kiselina. Kiselost meda povezana je s njegovim botaničkim podrijetlom, ali i vremenom i uvjetima skladištenja, procesiranjem i fermentacijskim procesima (White, 2000.; Mato i sur., 2006.). Općenito se može reći da tamnije vrste meda imaju veću kiselost od svjetlijih.

pH vrijednost meda varira ovisno o podrijetlu, za nektarni med se kreće između 3,3 i 4,6, a za medljikovac i med kestena između 4,5 i 6,5.

#### 2.2.5. Mineralne tvari

Mineralne tvari, iako prisutne u medu u malim količinama (0,02 – 1,03 %), važan su parametar kakvoće meda te doprinose njegovoj nutritivnoj vrijednosti. Tamnije vrste meda bogatije su mineralnim tvarima od svjetlijih vrsta. Mineralne tvari u medu uglavnom vode podrijetlo od same biljke s koje pčela skuplja nektar, te se shodno tome mogu koristiti kao

indikator botaničkog podrijetla meda (Bogdanov i sur., 2007.). Količina i sastav mineralnih tvari ovisi i o sastavu tla na kojem je biljka rasla i klimatskim uvjetima, te se stoga profil mineralnih tvari može koristiti i kao pokazatelj zemljopisnog podrijetla (González Paramás i sur., 2000.). Najzastupljeniji mineral u medu je kalij dok su u manjim količinama prisutni natrij, kalcij, magnezij, bakar, željezo, mangan, fosfor, silicij, sumpor (Anklam, 1998.). U medu se mogu naći u vrlo malim količinama teški metali i potencijalni kontaminanti (olovo, kadmij, krom, kositar, litij i nikel), a njihova analiza u medu može biti pokazatelj stupnja zagađenja okoliša (Porrini i sur., 2003.). Istraživanje koje su proveli Nozal Nalda i sur. (2005.) pokazalo je da se analizom profila mineralnih tvari te kasnijom statističkom obradom podataka razlikovnom analizom mogu razlikovati ispitivane vrste meda (vrijesak, vrijes, ružmarin, majčina dušica, lavanda i medljikovac hrasta). Određivanjem sastava mineralnih tvari, ukupne količine pepela i električne provodnosti te odgovarajućom statističkom obradom, Terrab i sur. (2003.) pravilno su klasificirali 92 % od ispitivanih 5 uniflornih vrsta meda dok su svi medljikovci ispravno klasificirani.

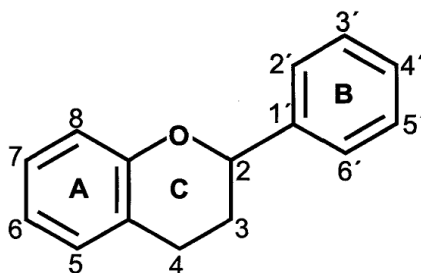
Sastav i udio mineralnih tvari linearno je povezan s električnom provodnosti (sposobnost meda da provodi električnu struju) (Kropf i sur., 2008.; Primorac i sur., 2011.b), te se danas kao mjera mineralnih tvari u rutinskim analizama koristi mjerenje električne provodnosti. Električna provodnost dobar je parametar razlikovanja nektarnog meda od medljikovca, a zajedno s ostalima parametrima kakvoće doprinosi karakterizaciji nektarnih medova (Bogdanov i sur., 1999.a).

### 2.2.6. Fenolne komponente

Fenolne komponente široko su rasprostranjene u biljnom svijetu, a uglavnom nastaju kao sekundarni produkti njihova metabolizma i obično su uključeni u obrambeni mehanizam biljke. S obzirom na broj fenolnih prstena i strukturne oblike koji se vežu na te prstene, fenolne komponente dijele se na 4 velike skupine: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Manach i sur., 2004.).

Fenolne komponente prisutne u medu mogu se podijeliti u tri skupine: flavonoid aglikoni, benzojeva kiselina i njezini esteri te cimetna kiselina i njezini esteri. Omjeri ovih triju skupina variraju značajno ovisno o botaničkom podrijetlu meda (Singhal i sur., 1997.). Izvor fenolnih komponenata u medu uglavnom su cvjetni nektar i propolis (i/ili vosak), a u manjoj mjeri i pelud. Sadržaj flavonoida kreće se oko 0,5 % u peludi, 10 % u propolisu te oko 6000 µg/kg u medu (Anklam, 1998.).

Osnovnu strukturu flavonoida čine 2 aromatska prstena (A- i B-prsten) koji su međusobno povezani mostom od tri ugljikova atoma (C-prsten).



**Slika 1** Osnovna struktura flavonoida (Bravo, 1998.)

Ovisno o modifikacijama strukture C-prstena, flavonoidi se najčešće svrstavaju u 6 podskupina: flavanoni, flavoni, flavanoli, izoflavonoidi, antocijani i flavani (Manach i sur., 2004.). Glavne skupine flavonoida u medu su flavanoni, flavanoli i flavoni, čije su strukturne formule kao i glavni predstavnici u medu prikazani u **Tablici 3**.

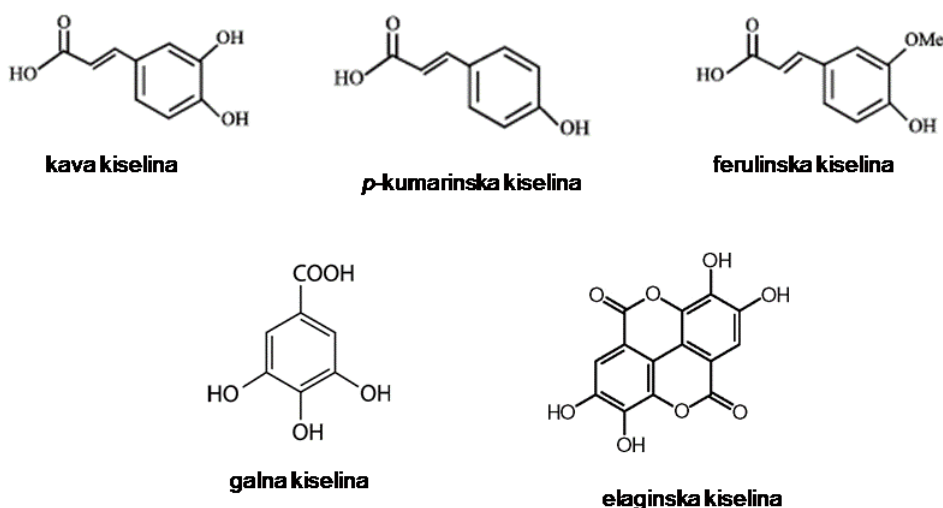
**Tablica 3** Strukturne formule i glavni predstavnici podskupina flavonoida u medu (Ferrerres i sur., 1994.; 1998.; Gil i sur., 1995.; Tomás-Barberán i sur., 2001.; Kenjerić, 2004.)

Podskupina flavonoida	Strukturna formula	Glavni predstavnici u medu
Flavanoni		Hesperetin Naringenin Pinocembrin Pinobanksin
Flavanoli		Kvercetin Kempferol Miricetin
Flavoni		Apigenin Krisin Luteolin Galangin

Neki flavonoidi pokazali su se kao potencijalni markeri u identifikaciji botaničkog podrijetla meda. Istraživanja koja su proveli Ferreres i sur. (1994.; 1998.) pokazala su da je flavanol hesperetin karakterističan za med citrusa, dok je kempferol specifičan marker meda ružmarina. Tomás-Barberán i sur. (2001.) određivali su flavonoidni profil različitih uniflornih

vrsta meda te su nakon HPLC analize potvrdili prijašnja ispitivanja Ferreres i sur. (1994.; 1998.), te osim prethodno navedenih markera botaničkog podrijetla meda ružmarina i citrusa, pokazali da je kvercetin potencijalni marker meda suncokreta, dok med lavande i bagrema u svom flavonoidnom profilu nemaju neki specifični flavonoid koji bi mogao koristiti kao marker za identifikaciju botaničkog podrijetla.

U medu su prisutne i fenolne kiseline koje se najčešće određuju zajedno s flavonoidima, jer prilikom izolacije zaostaju s njima u fenolnoj frakciji meda. Ispitivanja sastava i udjela fenolnih kiselina u medu pokazala su da se pojedine fenolne kiseline pojavljuju samo u specifičnim vrstama meda dok su neke prisutne u više vrsta meda, ali količina varira ovisno o vrsti meda (Anklam, 1998.). Za med kestena karakteristične su hidroksicimetne kiseline (kava kiselina, *p*-kumarinska kiselina i ferulinska kiselina), dok su veće količine elaginske kiseline karakteristične za med vrijesa (Tomás-Barberán i sur., 2001.).



**Slika 2** Strukturne formule nekih fenolnih kiselina identificiranih u medu

### 2.2.7. Komponente arome

Aromatski profil (miris i okus) prehrambenih proizvoda, pa tako i meda, ovisi o hlapivim organskim spojevima prisutnim u samom proizvodu i prostoru oko njega (*headspace*). Komponente arome koje se najčešće nalaze u medu su ugljikovodici, alkoholi, fenoli, esteri, aldehidi, ketoni, furani i spojevi dušika (Anklam, 1998.). Do sada je identificirano preko 600 spojeva koji zajedno doprinose kompleksnoj aromi meda, od kojih su neki karakteristični samo za specifičnu vrstu meda, dok se neki pojavljuju u više vrsta, ali količine istih variraju ovisno o vrsti meda. Istraživanja su pokazala da je metil-antranilat karakterističan za med citrusa (Escriche i sur., 2011.), 2-aminoacetofenon i 4-

aminoacetofenon karakteristični su hlapivi spojevi meda kestena (Alissandrakis i sur., 2011.), dok su za med kadulje karakteristične visoke koncentracije benzojeve kiseline i feniloctene kiseline (Jerković i sur., 2006.). Međutim, aromatski profil meda nije konstantan već se mijenja ovisno o klimatskim uvjetima, procesiranju i skladištenju (Soria i sur., 2005.; Escriche i sur., 2009.). Izolacija hlapivih spojeva iz kompleksnog matriksa kao što je med vrlo je zahtjevna, te su ispitivane različite metode izolacije i ekstrakcije (ekstrakcija ultrazvukom, mikroekstrakcija na krutoj fazi, istovremena destilacija i ekstrakcija pod vakuumom) koje bi omogućile izdvajanje hlapivih spojeva iz meda bez stvaranja nepoželjnih aroma (tzv. artefakata), koje nastaju prilikom izlaganja meda visokim temperaturama (Jerković i sur., 2007.; Piasenzotto i sur., 2003.). Novija istraživanja pokazala su uspješnim primjenu elektronskog nosa u svrhu određivanja botaničkog i zemljopisnog podrijetla meda (Čačić Kenjeric i sur., 2009.; Čačić i sur., 2009.). Prednost ove metode je što je brza, jednostavna i ne zahtjeva prethodnu izolaciju hlapivih spojeva iz meda.

#### 2.2.8. Vitamini

Med sadrži vrlo male količine vitamina koji uglavnom vode podrijetlo iz nektara i peludi te je njihova količina zavisna o botaničkom podrijetlu, ali i o procesiranju meda. Naime, filtracijom meda uklanja se veći dio peludi, a time i značajna količina vitamina. U medu su identificirani vitamin C, B<sub>1</sub> (tiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), B<sub>3</sub> (niacin), B<sub>5</sub> (pantotenska kiselina), B<sub>6</sub> (piridoksin) te vitamin K (White, 2000.; Bogdanov i sur., 2008.).

#### 2.3. Zdravstveni aspekt uporabe meda

Kroz povijest čovječanstva med se paralelno koristio kao sladilo i kao ljekovito sredstvo. Još su najstarije civilizacije koristile med u liječenju i zacjeljivanju rana, kožnih bolesti, ublažavanje kašlja, bolesti očiju i dr. Budući da su se sva pozitivna svojstva meda bazirala isključivo na iskustvima, u suvremenoj medicini javila se potreba za znanstvenim dokazima o pozitivnim učincima meda na zdravlje ljudi (Jones, 2001.; Molan, 2001.a).

Jedno od najranije uočenih pozitivnih svojstava meda je inhibicijsko djelovanje na mikroorganizme. Mnoga istraživanja pokazala su da med djeluje baktericidno i bakteriostatski na širok spektar bakterija, od kojih su mnoge patogene. Inhibicijskom djelovanju meda podložne su čak bakterijske vrste koje su razvile rezistentnost na antibiotike (metil rezistentni *Staphylococcus aureus*, vankomicin rezistentni *Enterococci* i multirezistentni *Pseudomonas aeruginosa*), kao i neke vrste kvasaca, plijesni i virusa (Molan, 1992.; Bogdanov i sur., 2008.; French i sur., 2005.; Candiracci i sur., 2012.). Smatra se da su čimbenici odgovorni za antimikrobnu aktivnost meda visoki osmotski tlak, niska pH

vrijednost, te posebice vodikov peroksid koji nastaje enzimskom razgradnjom glukoze tijekom zrenja meda. Međutim, stvaranje vodikovog peroksida ovisno je o aktivnosti katalaze, enzima također prirodno prisutnog u medu, kao i o djelovanju vanjskih čimbenika (toplina, svjetlost, skladištenje). Neke vrste meda, posebice one dobivene od biljaka vrste *Leptospermum*, posjeduju jaku antimikrobnu aktivnost zahvaljujući takozvanoj "neperoksidnoj" aktivnosti, odnosno prisutnosti različitih fenolnih komponenata (flavonoida i fenolnih kiselina), lizozima i aromatskih kiselina koje ovise o botaničkom podrijetlu meda (Bogdanov, 1997.; Weston i sur., 1999.; 2000.). "Neperoksidne" antimikrobne komponente ostaju aktivne u medu i nakon dodatka katalaze i mnogo su manje osjetljive na svjetlost i toplinu od vodikovog peroksida (Alvarez-Suarez i sur., 2010.a). Novije studije su pokazale da antimikrobne komponente meda inhibiraju razvoj bakterije *Helicobacter pylori* u organizmu, glavnog uzročnika vrieda želuca i gastritisa te ubrzavaju oporavak osoba oboljelih od gastroenteritisa i virusnih infekcija (Manyi-Loh i sur., 2010.; 2011.).

Smatra se da med posjeduje prebiotička svojstva zbog prisutnosti oligosaharida koje se može usporediti s djelovanjem fruktooligosaharida. Istraživanja su pokazala da oligosaharidi u medu potiču razvoj bakterija roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus in vivo* i *in vitro* (Shamala i sur., 2000.; Sanz i sur., 2005.).

Jedno od najjisticanijih pozitivnih svojstava meda u posljednje vrijeme je njegov antioksidativni kapacitet, odnosno sposobnost reduciranja i zaustavljanja štetnih oksidativnih reakcija kako u hrani, tako i u organizmu. Antioksidativni kapacitet meda rezultat je sinergističke aktivnosti različitih komponenata (enzimi, fenolne komponente, aminokiseline, produkti Maillardovih reakcija, organske kiseline, derivati karotenoida, askorbinska kiselina) i značajno ovisi o botaničkom podrijetlu meda (Gheldof i sur., 2002.). Kako je određivanje antioksidativnog kapaciteta jedan od zadataka ovog rada, detaljnije o njemu bit će opisano u narednom poglavlju.

Istraživanja su pokazala da antioksidativne komponente meda, zajedno s antimikrobnim, sudjeluju u sprječavanju upalnih procesa u organizmu i prevenciji infekcija rana i opekotina (Molan, 2001.b; Bogdanov i sur., 2008.) te doprinose antimetastatskoj i antitumorskoj aktivnosti meda (Tsiapara i sur., 2009.; Oršolić, 2009.).

## **2.4. Antioksidativni kapacitet**

### **2.4.1. Oksidativni stres, slobodni radikali i antioksidansi**

Oksidativni stres, čimbenici nastanka kao i posljedice u posljednje vrijeme predmet su mnogih istraživanja. Oksidativni stres u ljudskom organizmu i hrani uzrokuje neravnoteža između nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta (*Reactive Oxygen Species-ROS*), posebice

slobodnih radikala i antioksidativne obrane organizma. Iako je kisik neophodan za funkcioniranje aerobnih organizama i glavni je izvor energije u stanicama, tijekom različitih fizioloških procesa u organizmu prirodno nastaju i vrlo male količine reaktivnih kisikovih vrsta koje mogu uzrokovati oksidaciju bitnih makromolekula (nukleinskih kiselina, lipida, proteina, šećera) te na taj način djelovati kao promotor mnogih bolesti i upalnih procesa (Lee i sur., 2004.; MacDonald-Wicks i sur., 2006.). U biokemijskim procesima, reaktivne kisikove vrste prvenstveno se odnose na slobodne radikale (superoksid anion  $\bullet\text{O}_2^-$ , hidroksil-radikal  $\bullet\text{OH}$ , alkoksil-radikal  $\text{RO}\bullet$ , peroksil-radikal  $\text{ROO}\bullet$ ), iako oksidativno djelovanje pokazuju i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i singlet kisik ( $^1\text{O}_2$ ). Osim kisikovih, i neki dušikovi spojevi (dušikov monoksid radikal  $\text{NO}\bullet$ , dušikov dioksid radikal  $\text{NO}_2\bullet$  i peroksinitrit  $\text{OONO}^-$ ) ubrajaju se u reaktivne vrste (RNS) sposobne za oksidaciju makromolekula. Slobodni radikali su kemijske vrste koje u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Karakterizira ih iznimno visoka reaktivnost i nestabilnost, koja je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu te time postignu stabilnu strukturu. Napadnute molekule, gubeći svoje elektrone, same postaju slobodni radikali, te dolazi do lančanih reakcija u kojima nastaju različiti nepoželjni i štetni spojevi. Čimbenici koji pogoduju stvaranju slobodnih radikala u organizmu su: prooksidativni enzimi (npr. lipooksigenaza), UV zračenje, ionizirajuće zračenje, onečišćivači iz zraka te nepravilna prehrana. Klinička ispitivanja pokazala su da je prekomjerno stvaranje slobodnih radikala u organizmu povezano s pojavom mnogih degenerativnih bolesti poput ateroskleroze, karcinoma, astme, hepatitisa, dermatitisa, bolesti krvožilnog sustava te starenja (Lee i sur., 2004.). Oksidativno djelovanje slobodnih radikala dokazano je i u hrani i smatra se jednim od glavnih čimbenika kemijskog kvarenja hrane koje rezultira pojavom užeglosti i/ili smanjenjem nutritivne vrijednosti hrane, boje, arome, okusa i teksture (Antolovich i sur., 2002.). Zbog navedenog, u posljednje vrijeme povećano je zanimanje znanstvenika iz različitih područja (medicine, nutricionizma), ali i potrošača, za poznavanje antioksidativnog djelovanja pojedinih komponenata prirodno prisutnih u hrani i biološkim sustavima.

Antioksidansi su tvari, koje prisutne u malim količinama u odnosu na neki supstrat, značajno odgađaju ili sprječavaju oksidaciju tog supstrata. Antioksidansi prisutni u organizmu i hrani mogu hvatati i neutralizirati reaktivne kisikove i dušikove vrste, te tako zaustaviti lančanu reakciju stvaranja slobodnih radikala. Takvi antioksidansi nazivaju se primarnim antioksidansima ili hvatačima slobodnih radikala. Primarni antioksidansi prisutni u malim količinama imaju sposobnost odgađanja ili sprječavanja inicijacijskog stupnja lančane reakcije stvaranja slobodnih radikala ili u reakciji sa slobodnim radikalima ( $\text{RO}\bullet$  i  $\text{ROO}\bullet$ ) inhibiranja inicijacijskog i propagacijskog stupnja lipidne oksidacije. Učinkovitost hvatača slobodnih radikala ovisi o sposobnosti doniranja vodika slobodnom radikalima. Kao dobri



hvatači slobodnih radikala pokazale su se fenolne komponente. Druga vrsta antioksidanasa su tzv. preventivni antioksidansi, kao što su superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaza, koji djeluju tako da sprječavaju inicijacijsko stvaranje slobodnih radikala ili smanjuju brzinu kojom se provodi daljnja lančana reakcija. Mehanizmi djelovanja preventivnih antioksidanasa su različiti, a uključuju keliranje s prijelaznim metalima, hvatanje singlet kisika te inhibiciju prooksidativnih enzima (Karadag i sur., 2009.).

Antioksidansi prisutni u biološkim sustavima i hrani mogu se podijeliti u 4 velike skupine:

- Antioksidativni enzimi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza) koji pretvaraju reaktivne kisikove vrste u ne reaktivne molekule kisika.
- Hvatači slobodnih radikala (vitamin C, tokoferoli, fenolne komponente) koji doniraju vodikov atom peroksil-radikalima i pretvaraju ih u stabilnije i ne radikalske produkte te na taj način sprječavaju lipidnu oksidaciju.
- Kelatori prijelaznih metala (fosforna kiselina, limunska kiselina, fenolne komponente, aminokiseline, peptidi i proteini - transferin, feritin i ceruloplazmin) stvaraju komplekse s metalnim ionima (Cu i Fe), te tako odgađaju inicijacijske reakcije katalizirane metalima i razgradnju lipida. Naime, prisutnost metalnih iona može ubrzati inicijacijski stupanj lipidne oksidacije, jer uzrokuje promjenu hidroperoksida u peroksil- i alkoksil-radikale što ubrzava proces oksidacije. Nadalje, metali su uključeni u stvaranje singlet kisika, a vodikov peroksid s metalima može stvarati hidroksil-radikal.
- Hvatači singlet kisika pretvaraju singlet kisik u stabilniji triplet kisik. Da bi neka tvar mogla djelovati kao hvatač singlet kisika, potrebno je da u svojoj strukturi ima konjugirane dvostruke veze, i zbog toga su se kao izuzetno dobri hvatači singlet kisika pokazali karoteniodi, tokoferoli i mokraćna kiselina (Lee i sur., 2004.; Prior i sur., 2005.).

Neki antioksidansi mogu djelovati različitim mehanizmima ovisno o reakcijskom sustavu i izvoru slobodnih radikala. Zbog različitih karakteristika i mehanizama niti jedna metoda zasebno ne može dati točan uvid u hvatanje svih slobodnih radikala (Prior i sur., 2005.).

#### **2.4.2. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta**

Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta *in vitro* pokazuju sposobnost heterogene smjese antioksidanasa koji zajednički djeluju da neutraliziraju slobodne radikale i druge reaktivne vrste. Prilikom mjerenja antioksidativnog kapaciteta, ne mjeri se pojedinačni učinak svakog antioksidansa. Zbog kompleksnog sastava hrane, razdvajanje pojedine komponente i proučavanje djelovanja i doprinosa pojedine komponente ukupnom antioksidativnom kapacitetu skupo je i dugotrajno i ne daje pravi uvid u antioksidativni

kapacitet jer neki antioksidansi mogu djelovati sinergistički (tokoferoli i vitamin C,  $\alpha$ -tokoferol i neke fenolne komponente) (Murakami i sur., 2003.; Lee i sur., 2004.). Uvjeti analize i izbor metode također utječu na rezultate mjerenja. Becker i sur. (2004.), predložili su protokol mjerenja antioksidativnog kapaciteta hrane kroz tri koraka: prvi korak uključuje mjerenje antioksidativnog kapaciteta različitim metodama kako bi se dobio uvid u kompleksni sastav hrane. Daljnji koraci uključuju mjerenje antioksidativnog kapaciteta tijekom skladištenja hrane kako bi se dobio uvid u stabilnost antioksidanasa u proizvodu ili se provode interventne studije na ljudima (efekt djelovanja antioksidanasa *in vivo*). Danas je u literaturi dostupno mnoštvo metoda za mjerenje antioksidativnog kapaciteta, a prednosti i nedostaci pojedinih metoda još se razmatraju. Glavni problem je nestandardiziranost metoda tj. veliki broj modifikacija dostupnih u literaturnim podacima, što uvelike otežava usporedbu rezultata. Sa sigurnošću se jedino može reći da niti jedna metoda ne odražava mehanizam djelovanja svih slobodnih radikala i svih antioksidanasa u kompleksnom sustavu kao što je organizam ili hrana.

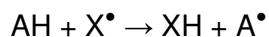
Antioksidansi mogu deaktivirati slobodne radikale preko dva mehanizma:

**HAT mehanizam** (*Hydrogen Atom Transfer*) – prijenos vodikovog atoma

**SET mehanizam** (*Single Electron Transfer*) – prijenos elektrona

Rezultat reakcije je isti, bez obzira na mehanizam, razlika je u kinetici reakcije i potencijalu pratećih reakcija. Prijenos elektrona praćen prijenosom protona i prijenos vodikovog atoma gotovo se uvijek odvijaju paralelno i često ih je vrlo teško razlučiti. Koji će mehanizam prevladati ovisi o strukturi i svojstvima antioksidanasa, topljivosti i koeficijentu razdjeljenja i otapalu. Energija disocijacije veze i ionizacijski potencijal glavni su čimbenici koji određuju dominantni mehanizam i efikasnost antioksidansa (Prior i sur., 2005.).

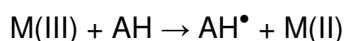
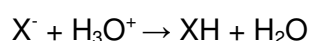
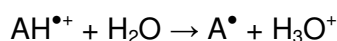
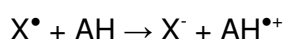
**Metode koje rade na principu HAT mehanizma** mjere sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalima donirajući vodikov atom prema reakciji:



Metode koje rade na principu HAT mehanizma ne ovise o otapalu i pH vrijednosti sustava, obično su brze i završavaju u roku od nekoliko sekundi do nekoliko minuta. Reaktivnost antioksidansa temelji se na kompeticijskoj kinetici, a kvantifikacija se dobiva temeljem kalibracijske krivulje. U reakcijskom mehanizmu sudjeluju generator slobodnih radikala koji oksidira probnu tvar za praćenje procesa (promjenom UV apsorpcije ili fluorescencije) i antioksidans koji se natječe s probnom tvari za slobodne radikale. Nedostatak ovih metoda je osjetljivost na druge reducirajuće komponente, uključujući i metale, čija prisutnost može dovesti do pogrešnih rezultata. Najčešće upotrebljavane metode koje se zasnivaju na HAT mehanizmu su: ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (*Total Radical*

*Trapping Antioxidant Parameter*) i metoda izbjeljivanja krocina (*Crocin bleaching assay*). Doniranje vodikovog atoma ključni je korak u lančanoj reakciji nastanka peroksil-radikala koji imaju glavnu ulogu u štetnoj lipidnoj oksidaciji u hrani i biološkim sustavima. Antioksidansi, posebice vitamin E, vrlo su bitni u zaštiti estera polinezasićenih masnih kiselina u hrani i membranama stanica od autooksidacije. Kod metoda koje rade na principu HAT mehanizma, kao što je ORAC metoda, peroksil-radikali djeluju kao oksidansi, a te metode mogu dati korisne informacije o sposobnosti antioksidanasa da zaustave lančanu reakciju nastajanja slobodnih radikala (Huang i sur., 2005.).

**Metode koje rade na principu SET mehanizma** mjere sposobnost antioksidansa da donira elektron te na taj način reducira komponente, uključujući metale, karbonile i radikale. Mehanizam djelovanja odvija se prema sljedećim reakcijama:



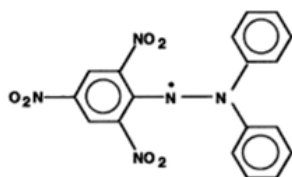
Reaktivnost ovih metoda temelji se na deprotonizaciji i ionizacijskom potencijalu reaktivne funkcionalne skupine. Metode koje rade na principu SET mehanizma ovisne su o pH vrijednosti kao i odabiru otapala. Ionizacijski potencijal opada porastom pH vrijednosti, što se odražava na povećanje sposobnosti doniranja elektrona s deprotonizacijom. Relativno su spore i trebaju duže vrijeme za postizanje kraja reakcije te je uobičajeno da se kod metoda koje rade na principu SET mehanizma mjeri postotak smanjenja koncentracije slobodnog radikala prije nego kinetika reakcije. Kada  $AH^{\bullet+}$  ima dovoljno dugačak životni vijek, može doći do sekundarnih reakcija koje ometaju mjerenje i mogu čak dovesti do toksičnosti i mutagenosti *in vivo*. Metode su osjetljive na askorbinsku i mokraćnu kiselinu, a elementi u tragovima i kontaminanti (posebice metali) ometaju mjerenje i mogu dovesti do pogrešnih rezultata. U reakciji sudjeluju antioksidans i probna tvar koja je ujedno i oksidans koja prima elektron od antioksidansa što rezultira promjenom boje probne tvari. Intenzitet promjene boje proporcionalan je koncentraciji antioksidansa, a reakcija završava kada prestane promjena boje. Nakon završetka reakcije metodom linearne regresije dobije se jednadžba pravca ovisnosti promjene apsorbancije i koncentracije antioksidansa, pri čemu nagib pravca predstavlja redukcijsku sposobnost antioksidansa. SET mehanizam ne uključuje kompeticijsku kinetiku, a redukcijska sposobnost antioksidansa parametar je kojim se može procijeniti samo dio ukupnog antioksidativnog kapaciteta hrane. Ipak, metode koje rade na principu SET mehanizma vrlo se često koriste u procjeni antioksidativnog kapaciteta hrane, uz pretpostavku da je redukcijska sposobnost ekvivalentna antioksidacijskoj sposobnosti.

Najčešće metode koje se koriste za mjerenje antioksidativnog kapaciteta su: FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) te TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda. Iako se TEAC i DPPH metode obično klasificiraju kao SET metode, DPPH• radikal i ABTS<sup>•+</sup> radikal kation mogu reagirati s antioksidansima ili direktnom redukcijom preko prijenosa elektrona (SET mehanizam) ili prijenosom vodikovog atoma (HAT mehanizam). Reaktivnost i mehanizam djelovanja teško je interpretirati bez detaljnog poznavanja sastava i struktura antioksidanasa prisutnih u uzorku koji se ispituje (Huang i sur., 2005.; Prior i sur., 2005.).

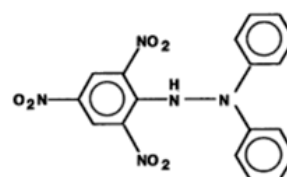
#### 2.4.2.1. DPPH metoda

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikal jedan je od rijetko stabilnih oblika dušikovitih radikala i komercijalno je dostupan. Prilikom mjerenja antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom, DPPH radikal reducira se u reakciji s antioksidansima u hidrazin. Redukcijska sposobnost hvatanja DPPH radikala može se pratiti elektronskom spinskom rezonancijom ili mjerenjem promjene apsorbancije pri 515 – 528 nm (Prior i sur., 2005.; MacDonald-Wicks i sur., 2006.). U praksi, maksimum apsorpcijskog pika je zaobljen, a radna valna duljina se postavlja prema maksimumu apsorbancije određenom na specifičnom instrumentu (Molyneux, 2004.).

DPPH radikal ima sposobnost delokalizacije nesparenog elektrona preko cijele molekule, tako da molekule DPPH radikala ne stvaraju dimere, kao što je slučaj kod većine slobodnih radikala. Delokalizacija elektrona kroz molekulu DPPH odgovorna je za tamno ljubičastu boju koja ima apsorpcijski maksimum na oko 520 nm. Kada alkoholna otopina DPPH• reagira s komponentom koja je sposobna donirati vodikov atom, dolazi do stvaranja svjetlo žutog difenilpikrilhidrazina (DPPH<sub>2</sub>), reduciranog oblika (Molyneux, 2004.).



difenilpikrilhidrazil (ljubičaste boje)

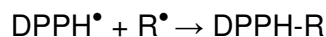
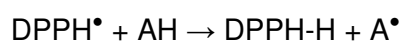


difenilpikrilhidrazin (žute boje)

**Slika 3** Strukturna formula DPPH radikala i reduciranog oblika DPPH<sub>2</sub>

(Molyneux, 2004.)

Metodu su prvi put opisali Brand-Williams i sur. 1995. godine. DPPH radikal apsorbira svjetlost pri 515 nm, a u reakciji s antioksidansima (AH) ili slobodnim radikalima ( $R^\bullet$ ) dolazi do smanjenja apsorbancije čiji se intenzitet prati spektrofotometrijski.



Osim što je metoda jako ovisna o pH vrijednosti i vrsti otapala, vrlo bitan čimbenik koji određuje reakciju je i sterička dostupnost. Male molekule imaju bolji pristup reaktivnom mjestu te time pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom. Mjerenja se provode na sobnoj temperaturi čime se eliminira rizik toplinske razgradnje ispitivanih molekula (Bondet i sur., 1997.; Prior i sur., 2005.). U reakciji s fenolnim komponentama, reakcijski mehanizam može se odvijati prijenosom vodikovog atoma ili prijenosom elektrona. Iako se prvobitno smatralo da se reakcija antioksidansa i  $\text{DPPH}^\bullet$  odvija prema HAT mehanizmu, novije studije pokazale su da prevladava SET mehanizam. Početni prijenos elektrona odvija se vrlo brzo, a prijenos vodikovog atoma značajno je sporiji u polarnim otapalima koji uspostavljaju jake vodikove veze (etanol i metanol). Osim toga, prisutnost kiselina ili baza u otapalu mogu utjecati na ravnotežu ionizacije fenolnih komponenti te na taj način doprinijeti smanjenju ili povećanju konstante brzine reakcije (Huang i sur., 2005.; MacDonald-Wicks i sur., 2006.).

Rezultati mjerenja mogu se izraziti na više načina, a najčešće se sposobnost hvatanja slobodnih radikala izračunava preko postotka preostalog  $\text{DPPH}^\bullet$ :

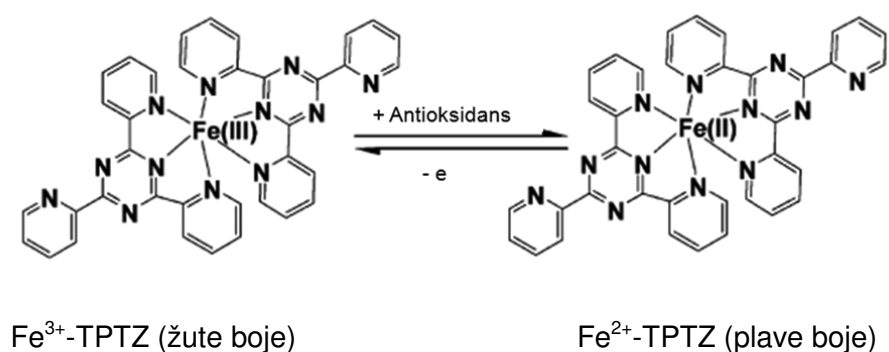
$$\text{Preostali } \text{DPPH}^\bullet (\%) = 100 \times \frac{[\text{DPPH}]_{\text{preostali}}}{[\text{DPPH}]_{T=0}}$$

% preostalog  $\text{DPPH}^\bullet$  proporcionalan je koncentraciji antioksidansa, a uobičajeno se antioksidativni kapacitet nekog uzorka izražava preko  $\text{IC}_{50}$  koja označava koncentraciju antioksidansa potrebnu za smanjenje početne koncentracije  $\text{DPPH}^\bullet$  za 50 %. Nedostatak ovakvog izražavanja antioksidativnog kapaciteta je činjenica da veće  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti znače manji antioksidativni kapacitet uzorka što može biti nejasno posebice prilikom grafičkog prikaza rezultata, ali problem se rješava iskazivanjem rezultata u obliku  $1/\text{IC}_{50}$  (Brand-Williams i sur., 1995.).  $\text{DPPH}^\bullet$  ima relativno dugačak vijek trajanja što umanjuje mogućnost usporedbe s vrlo nestabilnim peroksil-radikalima koji su odgovorni za lipidnu oksidaciju. Zbog toga, mnogi antioksidansi koji *in vivo* reagiraju brzo s peroksil-radikalima, s  $\text{DPPH}^\bullet$  reagiraju vrlo sporo ili uopće ne reagiraju zbog steričkih smetnji. Problem prilikom interpretacije rezultata predstavlja i činjenica da neke komponente koje posjeduju antioksidativno djelovanje, na primjer karotenoidi, imaju apsorpcijski spektar u istom području valnih duljina kao i  $\text{DPPH}$ , te mogu smetati pri mjerenju (Prior i sur., 2005.; Huang i sur., 2005.). Međutim,

metoda je vrlo jednostavna i brza te ne zahtjeva skupu opremu za provođenje, što su najvjerojatniji razlozi čestog korištenja ove metode u procjeni antioksidativnog kapaciteta čistih komponenata, voća, povrća, različitih ekstrakata ili meda (Sánchez-Moreno i sur., 1998.; Bandoniené i sur., 2002.; Beretta i sur., 2005.; Scherer i Teixeira Godoy, 2009.).

#### 2.4.2.2. FRAP metoda

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodu razvili su Benzie i Strain 1996. godine za mjerenje redukcijske sposobnosti plazme, ali se tijekom vremena metoda modificirala i prilagodila za mjerenje antioksidativnog kapaciteta različitih vrsta namirnica i ekstrakata (Halvorsen i sur., 2002.; Guo i sur., 2003.; Pellegrini i sur., 2005.). Metoda se bazira na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju (pH 3,6) reducira žuti kompleks feri željeza ( $\text{Fe}^{3+}$ ) sa TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) u plavo obojeni kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ. Intenzitet nastale plave boje mjeri se spektrofotometrijski pri 593 nm, a proporcionalan je redukcijskoj sposobnosti antioksidanasa.



**Slika 4** FRAP reakcija (Huang i sur., 2005.)

FRAP mehanizam odvija se strogo prema SET mehanizmu, odnosno prijenosu elektrona, i svaka komponenta, bez obzira ima li antioksidativnu sposobnost ili ne, koja ima niži redoks potencijal od  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  parcijalne reakcije ( $\sim 0,7$  V), dovest će do redukcije željeza iz feri u fero oblik, te tako povećati FRAP vrijednost uzorka, odnosno dati lažno veće rezultate (Karadag i sur., 2009.). Kako je mehanizam reakcije baziran na prijenosu elektrona, antioksidansi koji djeluju prema HAT mehanizmu (karotenoidi, tioli, proteini), ne mogu se odrediti FRAP metodom. Nadalje,  $\text{Fe}^{2+}$  poznat je prooksidans koji u reakciji s vodikovim peroksidom može stvarati dodatne hidroksil-radikale ( $\cdot\text{OH}$ ). Potencijalni problem mogu stvoriti i drugi spojevi s fero željezom u smjesi, koji se vežu za kelatore metala u hrani, a

takvi kompleksi mogu reagirati s antioksidansima (MacDonald-Wicks i sur., 2006.; Karadag i sur., 2009.). Vrijeme analize je kratko (4 – 10 minuta), a prema istraživanjima Pulido i suradnika (2000.), neke fenolne komponente (kvercetin, kava kiselina, ferulinska kiselina, taninska kiselina) i askorbinska kiselina reagiraju sporo s FRAP reagensom i potrebno je dulje vrijeme od navedenog za potpuni završetak reakcije. Za razliku od ostalih metoda za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta, FRAP metoda je jednostavna, brza, jeftina i robusna te ne zahtjeva specijalnu opremu za izvođenje.

#### **2.4.2.3. Određivanje ukupnih fenola**

Iako fenolne komponente samo dijelom doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu određene namirnice, gotovo uvijek se uz antioksidativni kapacitet, određuju i ukupni fenoli kao dobar pokazatelj antioksidativnog djelovanja. Mnoga istraživanja pokazala su statistički značajnu pozitivnu korelaciju između udjela fenolnih komponenata, posebice flavonoida i fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta (Beretta i sur., 2005.; Paixao i sur., 2007.; Kopjar i sur., 2009., Sreeramulu i Raghunath, 2011.)

Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola provodi se Folin-Ciocalteu metodom. Metoda se prvobitno koristila za određivanje proteina, ali nakon modifikacije koju su objavili Singleton i sur. (1999.), metoda se koristi za određivanje udjela ukupnih fenola različitih vrsta namirnica. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibneske kiseline, a u reakciji s fenolnim komponentama ove kiseline reduciraju se u okside koji su plavo obojeni. Intenzitet plavog obojenja proporcionalan je koncentraciji fenolnih komponenata u uzorku, a promjena boje prati se pri valnim duljinama 745 - 765 nm (Prior i sur., 2005.). Folin-Ciocalteu reagens nije specifičan samo za fenolne komponente već i mnoge nefenolne komponente (vitamin C, Cu, šećeri, aromatski amini, proteini.....) mogu reducirati reagens u uvjetima analize. Dakle preciznije, rezultat dobiven kao udio ukupnih fenola, obuhvaća ukupne fenole plus ostale reducirajuće komponente u uzorku kao i kelatore metala tj. predstavlja redukcijsku sposobnost uzorka. Uz veliki broj interferirajućih komponenata, veliki problem u usporedbi rezultata predstavljaju mnogobrojne modifikacije metode s obzirom na: vrijeme i temperaturu analize, primijenjenu valnu duljinu, upotrebljeni standard za kalibraciju te pH vrijednost sustava. Unatoč nedostacima, metoda se vrlo često koristi u određivanju ukupnih fenola zbog jednostavnosti i brzine izvedbe (Singleton i sur., 1999.; Prior i sur., 2005.).

### 2.4.3. Antioksidativni kapacitet meda

Iako se antioksidativni kapacitet meda istražuje intenzivno posljednjih dvadesetak godina, točan mehanizam djelovanja kao i kemijska struktura pojedinih komponenata koje su odgovorne za njegovo antioksidativno djelovanje još nisu potpuno poznati. Istraživanja koja su proveli Frankel i sur. (1998.) te Gheldof i sur. (2002.) pokazala su da je antioksidativni kapacitet meda rezultat sinergističkog djelovanja različitih komponenata, uključujući fenolne komponente (flavonoide i fenolne kiseline), peptide, aminokiseline, organske kiseline, enzime (katalaza, glukoza-oksidaža), produkte Maillardovih reakcija, derivate karotenoida, askorbinsku kiselinu te još neke komponente u tragovima. Sastav i udio antioksidanasa u medu prvenstveno ovisi o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu meda najvjerojatnije zbog različitosti u udjelu sekundarnih metabolita biljaka i enzimskoj aktivnosti (Frankel i sur., 1998.). Zbog kompleksnog sastava meda i prisutnosti različitih komponenata koje imaju antioksidativno djelovanje, ne postoji standardna metoda koja bi mogla dati uvid u ukupni antioksidativni kapacitet meda. Zbog toga se, kao i kod drugih prehrambenih proizvoda, antioksidativni kapacitet meda određuje kombinacijom metoda koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja. Najčešće se koriste spektrofotometrijske/fluorimetrijske metode (FRAP, DPPH, TEAC i ORAC metode) u kombinaciji s određivanjem ukupnih fenola. Glavni problem predstavlja nestandardiziranost metoda i različite modifikacije primijenjenih metoda što uvelike otežava usporedbu dobivenih rezultata.

Među prvima koji su pokušali dati smjernice za standardizaciju metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta meda bili su Beretta i sur. (2005.) koji su pokazali da se primjenom različitih metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta (DPPH, FRAP i ORAC metode), uz određivanje ukupnih fenola i boje meda te kasnijom statističkom obradom podataka (PCA analizom), može adekvatno procijeniti ukupni antioksidativni kapacitet meda. Ispitivanje 14 različitih vrsta meda pokazalo je da postoje značajne razlike u ispitivanim parametrima ovisno o vrsti meda. Iste vrste meda, koje potječu s različitih teritorijalnih područja nisu pokazale razlike u ispitivanim parametrima, što pokazuje da je botaničko podrijetlo meda glavni čimbenik koji određuje antioksidativni kapacitet meda. Visoko statistički značajna korelacija dobivena je između udjela ukupnih fenola (PC) i antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH ( $r_{PC/DPPH} = 0,918$ ), FRAP ( $r_{PC/FRAP} = 0,885$ ) i ORAC ( $r_{PC/ORAC} = 0,868$ ) metodama, kao i između boje meda i ispitivanih parametara ( $r_{Boja/PC} = 0,930$ ;  $r_{Boja/FRAP} = 0,918$ ;  $r_{Boja/DPPH} = 0,884$ ;  $r_{Boja/ORAC} = 0,731$ ). Uska povezanost između udjela fenolnih komponenti i antioksidativnog kapaciteta određenog različitim metodama pokazuje da je antioksidativni kapacitet meda u velikoj mjeri rezultat prisutnosti fenolnih komponenata. U ispitivanju je također pokazano da tamnije vrste meda imaju znatno veći antioksidativni kapacitet od svjetlijih vrsta. Rezultati ispitivanja slovenskih znanstvenica



(Bertoncelj i sur., 2007.) koje su provele određivanje antioksidativnog kapaciteta FRAP i DPPH metodama, udjela ukupnih fenola i boje 7 različitih vrsta meda (bagrem, lipa, kesten, jela, smreka, multiflorni i šumski med) potvrdili su povezanost udjela ukupnih fenola, antioksidativnog kapaciteta i boje, ovisno o botaničkom podrijetlu, odnosno činjenicu da su tamnije vrste meda bogatije fenolnim komponentama te da imaju veći antioksidativni kapacitet. Zalibera i sur. (2008.) određivali su antioksidativni kapacitet, udio ukupnih fenola i boju različitih vrsta slovačkog meda. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala (DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup>) određena je elektronskom paramagnetnom rezonancijom te je na osnovu dobivenih rezultata utvrđena linearna povezanost između udjela ukupnih fenola, antioksidativnog kapaciteta i boje meda.

Gheldof i Engeseth (2002.) određivale su antioksidativni kapacitet 7 tipičnih američkih vrsta meda ORAC metodom i udjel ukupnih fenola. Rezultati istraživanja pokazali su značajne varijacije u ORAC vrijednostima i udjelu ukupnih fenola različitih vrsta meda. Med heljde koji je tamne boje, imao je višestruko veće ORAC vrijednosti i udio ukupnih fenola od svjetlijih vrsta (bagrem, djetelina). Male razlike u ORAC vrijednostima primijećene su kod istih vrsta meda s različitih teritorijalnih regija i/ili uzoraka koji su prikupljeni u različito vrijeme, što ukazuje na činjenicu da i klimatski uvjeti kao i sastav tla te procesiranje, rukovanje i skladištenje meda mogu imati utjecaj na antioksidativni kapacitet meda. Daljnja istraživanja tima američkih znanstvenika (Gheldof i sur., 2002.) bila su usmjerena na identifikaciju pojedinih komponenata koje su odgovorne za antioksidativni kapacitet meda. HPLC analizom metanolne fenolne frakcije identificirane su različite fenolne komponente (flavonoidi i fenolne kiseline). Za neke od identificiranih flavonoida (krisin, pinocembrin, pinobanksin) i fenolne kiseline poznato je da posjeduju antioksidativno djelovanje. Rezultati određivanja ukupnih fenola spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom bili su veći od ukupnih fenola određenih HPLC metodom, što se objašnjava činjenicom da je jedan dio fenolnih spojeva prešao u vodenu frakciju prilikom ekstrakcije te se nije mogao odrediti HPLC metodom. Iako fenolni spojevi značajno doprinose antioksidativnom kapacitetu meda, autori navode da oni nisu jedini odgovorni za njegov antioksidativni kapacitet. Antioksidativnom kapacitetu doprinose i druge nefenolne komponente (proteini, organske kiseline, askorbinska kiselina, vodikov peroksid te produkti Maillardovih reakcija). Mnoge od tih komponenata djeluju sinergistički međusobno i/ili s fenolnim komponentama, te na taj način povećavaju ukupni antioksidativni kapacitet meda.

Alvarez-Suarez i sur. (2010.b) određivali su antioksidativni kapacitet 5 vrsta meda s Kube te ispitivali povezanost antioksidativnog kapaciteta s udjelom ukupnih fenola, bojom meda kao i drugim fizikalno-kemijskim parametrima kakvoće meda. Osim povezanosti udjela ukupnih fenola, antioksidativnog kapaciteta i boje meda, autori su pokušali korelirati udio

slobodnih aminokiselina i proteina s antioksidativnim kapacitetom. Rezultati istraživanja pokazali su osrednju statistički značajnu korelaciju između udjela slobodnih aminokiselina određenih spektrofotometrijski i FRAP metode ( $r = 0,6806$ ,  $p \leq 0,05$ ) dok između udjela proteina određenih metodom po Bradfordu i FRAP metode nije nađena statistički značajna korelacija ( $r = 0,341$ ,  $p > 0,05$ ). Nešto više statistički značajne korelacijske koeficijente dobili su Pérez i sur. (2007.) ispitivanjem povezanosti udjela slobodnih aminokiselina ( $r = 0,825$ ,  $p < 0,001$ ), prolina ( $r = 0,571$ ,  $p < 0,001$ ) i nisku statistički značajnu povezanost proteina sa sposobnošću hvatanja slobodnih radikala određenog DPPH metodom ( $r = 0,300$ ,  $p < 0,05$ ). Iste uzorke meda analizirali su i HPLC metodom s obzirom na aminokiselinski profil, te dobili statistički značajne korelacije između pojedinih aminokiselina i antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH metodom, pri čemu su polarne aminokiseline (asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, glicin, treonin i glutamin) imale najveće koeficijente korelacije ( $r > 0,8$ ). S obzirom na rezultate ispitivanja autori zaključuju da i aminokiseline, iako u manjoj mjeri u odnosu na fenolne komponente, doprinose antioksidativnom kapacitetu meda.

Rezultati istraživanja koje su objavile Brudzynski i Miotto (2011.a; 2011.b) pokazali su da produkti Maillardovih reakcija (*Maillard Reaction Products* - MRP), za koje su daljnja ispitivanja istih autorica pokazala da pripadaju skupini melanoidina, doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu. Naime, velika količina reducirajućih šećera kao i prisutnost slobodnih aminokiselina i proteina u medu pogoduju Maillardovim reakcijama u kojima kao krajnji produkti nastaju smeđi polimeri visoke molekulske mase, melanoidini. Sadržaj MRP ili postotak neenzimskog posmeđivanja obično se prati spektrofotometrijski pri valnim duljinama 420 – 450 nm. Određivanjem antioksidativnog kapaciteta ORAC metodom različitih vrsta meda i udjela MRP-a spektrofotometrijski, autorice su pronašle vrlo visoku statistički značajnu korelaciju između navedenih ispitivanih parametara ( $r = 0,938$ ). Tako visoka korelacija pokazatelj je doprinosa MRP ukupnom antioksidativnom kapacitetu nezagrijanog meda. Također je pokazana visoka statistički značajna korelacija između MRP i ukupnih fenola određenih Folin-Ciocalteu metodom ( $r = 0,950$ ) kao i između MRP i boje određene spektrofotometrijski (neto apsorbancija) ( $r = 0,980$ ). Rezultati istraživanja pokazuju da se MRP ne stvaraju samo toplinskom obradom i dugotrajnim skladištenjem meda, kako se dosad smatralo, već da je stvaranje MRP moguće i u nezagrijanom medu.

Oksidativni stres i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta imaju značajnu ulogu u iniciranju različitih kroničnih bolesti i karcinoma. Antioksidansi prisutni u medu mogu biti jedan od izvora istih u prehrani ljudi, s time da treba napomenuti kako su koncentracije antioksidanasa u medu daleko niže od koncentracija u voću i povrću, te da konzumacija meda ne može nadomjestiti antioksidanse iz voća i povrća. S druge strane, zamjena šećera s medom može uz osiguranje energije u prehrani povećati unos nutritivno vrijednih komponenata, između

ostalih i antioksidansa (Gheldof i sur., 2002.). Oksidacijske reakcije uzrokuju mnoge neželjene promjene i u hrani. Istraživanja su pokazala da med, zahvaljujući antioksidativnom kapacitetu, sprječava enzimsko posmeđivanje voća i povrća inhibirajući djelovanje polifenol-oksidade (Chen i sur, 2000.; Jeon i Zhao, 2005.; Vela i sur., 2007.), lipidnu oksidaciju mesa (Antony i sur., 2000.a) te sprječava razvoj patogenih mikroorganizama i mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane (Mundo i sur., 2004.).

## **2.5. Utjecaj procesiranja i skladištenja na kakvoću meda**

Osobitost meda kao prehrambenog proizvoda ne proizlazi iz prisutnosti glavnih sastojaka, ugljikohidrata, koji se nalaze i u drugim slatkim proizvodima (šećer, melasa, sirup, marmelada), nego u mnoštvu sastojaka prisutnih u malim količinama koje vode podrijetlo iz nektara i od pčele. Mnogi od tih sastojaka koji medu daju posebnu aromu, okus i dio su njegove biološke aktivnosti su termolabilni i nestabilni (Krell, 1996.).

Med namijenjen tržištu oduvijek je prolazio neki oblik procesiranja, kako od strane pčelara tako i od strane industrije. Procesiranje meda provodi se u svrhu smanjenja viskoziteta, odgađanja kristalizacije i kontrole fermentacije, kako bi se med lakše punio u ambalažu te osigurala stabilnost tijekom skladištenja meda (Krell, 1996.; Subramanian i sur., 2007.). U tu svrhu najčešće se provodi zagrijavanje meda, iako se u posljednje vrijeme ispituju alternativni postupci prerade (primjena mikrovalova, infracrvenog zračenja, ultrazvuka, membranski postupci) kako bi se u što većoj mjeri smanjile nepoželjne promjene koje se u medu događaju uslijed primjene visokih temperatura (Subramanian i sur., 2007.). Naime, nekontrolirano zagrijavanje meda može dovesti do degradacije kakvoće meda koje rezultira smanjenjem enzimske aktivnosti, pojačanjem intenziteta boje, povećanjem udjela HMF-a i stvaranjem produkata Maillardovih reakcija. Istraživanja su pokazala da osim primijenjene temperature, veliki utjecaj na intenzitet promjena ima i vrijeme zagrijavanja, te se kao ograničavajući čimbenik promjena u medu uzima kombinacija temperatura/vrijeme (Tosi i sur., 2002.; 2004.; Turhan i sur., 2008.). Kako bi se izbjeglo pregrijavanje i očuvala kakvoća, ne preporuča se med zagrijavati na temperaturama višim od 40 °C, no više temperature potrebne su kako bi se u potpunosti otopili kristali šećera i inaktivirali mikroorganizmi (Bogdanov, 2009.). Toplinski tretmani u trajanju od 1 – 2 dana pri 40 – 50 °C neće uzrokovati značajnije promjene, dok su već primjenom temperatura od 50 – 60 °C intenzitet promjena povećava i narušava kakvoća meda (Bogdanov, 2009.; Dimiņš i sur., 2006.). Primjena temperatura pasterizacije (63 – 68 °C/30 – 35 minuta ili 77 °C/nekoliko sekundi) u potpunosti će inaktivirati kvasce odgovorne za fermentaciju i odgoditi kristalizaciju, ali pri tim temperaturama vidljivo je smanjenje aktivnosti enzima (Babacan i

sur., 2002.; Subramanian i sur., 2006.). Primjenom HTST (*High temperature short time*) metoda, Tosi i sur. (2004.) pokazali su da vrlo kratko vrijeme zagrijavanja (nekoliko sekundi do minute) na temperaturama od 80 °C do 140 °C nije značajno utjecalo na stvaranje HMF-a niti smanjenje aktivnosti enzima. Preporuča se med zagrijavati na što nižim temperaturama i što kraće vrijeme kako bi se postigao željeni efekt procesiranja.

Sastav meda tijekom skladištenja nije konstantan, već se mijenja ovisno o uvjetima i duljini skladištenja. Prilikom skladištenja meda treba voditi računa o izvoru svjetlosti, relativnoj vlažnosti zraka u prostoriji kao i temperaturi skladištenja (Krell, 1996.; Bogdanov, 2009.). Promjene do kojih može doći prilikom skladištenja su: fermentacija, promjena senzorskih svojstava (prvenstveno boje i okusa), te gubitak biološki aktivnih komponenata (enzimi i komponente odgovorne za antimikrobnu aktivnost meda). Značajne promjene mogu se dogoditi u sastavu šećera u smislu povećanja udjela disaharida i drugih složenih šećera, te smanjenja udjela jednostavnih šećera. Također može doći do povećanja kiselosti meda te stvaranja HMF-a (Sancho i sur., 1992.; Krell, 1996.). Navedene promjene mogu se dogoditi u svim vrstama meda, ali različitim brzinama ovisno o početnom sastavu (više vode i niži pH, brže promjene) kao i temperature skladištenja (više temperature, brže promjene). UV zračenje uništava glukoza-oksidadu, a time i glavninu antimikrobne aktivnosti meda. Optimalni uvjeti skladištenja meda su temperature prostora između 10 i 16 °C na tamnom kako bi se ograničile promjene sastojaka meda tijekom skladištenja.

Zbog varijabilnosti mnogih komponenata u medu i mnoštva čimbenika koji utječu na kakvoću meda, teško je procijeniti granice koje bi omogućile očuvanje kakvoće tijekom procesiranja i skladištenja. Udio HMF-a i aktivnost dijastaze parametri su koji se obično koriste kao indikatori svježine i intenziteta procesiranja i njihove granične vrijednosti regulirane su međunarodnim i nacionalnim propisima (Codex Alimentarius Commission, 2001.; Council of the European Union, 2002.; MPRRR, 2009.a). Kao dodatni parametri koriste se aktivnost invertaze i udio prolina (Bogdanov i sur., 1999.a; 1999.b).

### 2.5.1. Aktivnost enzima

Med sadrži male količine enzima, od kojih neki vode podrijetlo od biljke dok druge dodaju pčele prilikom pretvorbe nektara u med, a samo mali dio može potjecati od kvasaca i bakterija prisutnih u medu. S obzirom da su enzimi osjetljivi na toplinu, svjetlost i druge oblike energije, njihov udio i aktivnost uglavnom se promatraju s tehnološkog aspekta. Najvažniji enzimi prisutni u medu su dijastaza ( $\alpha$ -amilaza), invertaza ( $\alpha$ -glukozidaza), glukoza-oksidadza, katalaza i kisela fosfataza (White, 2000.).

Dijastaza je enzim koji razlaže škrob na dekstrine i u medu se uglavnom nalazi kao  $\alpha$ -amilaza. Budući da med ne sadrži škrob, njezina funkcija u medu nije potpuno razjašnjena (White, 2000.; Babacan i sur., 2002.). Iako je glavni izvor dijastaze u medu pčela, njezina aktivnost varira ovisno o vrsti meda. Poznato je da neke vrste meda (bagrem, citrus) kao i medovi iz tropskih područja imaju prirodno nisku aktivnost dijastaze, dok je aktivnost dijastaze višestruko veća kod tamnijih vrsta meda (kesten, medljikovac). Varijabilnost u udjelu i aktivnosti dijastaze, a tako i ostalih enzima, posljedica je utjecaja različitih čimbenika (intenzitet i vrijeme lučenja nektara, udio šećera u nektaru, starost i ishrana pčele, temperatura) (Persano Oddo i sur., 1999.).

Invertaza ( $\alpha$ -glukozidaza) također potječe od pčele, iako u malim količinama može biti prisutna i u biljci (White, 2000.; Pesano Oddo i sur., 1999.). Osnovna funkcija invertaze je razgradnja saharoze iz nektara na fruktozu i glukozu, ključnog koraka u zrenju meda, ali invertaza katalizira i transformacije drugih ugljikohidrata (Bogdanov i sur., 1999.a). U neprocesiranom medu, invertaza nastavlja djelovanje i nakon vrcanja, lagano smanjujući količinu saharoze. Visok udio saharoze u nekim vrstama meda (citrus, djetelina, lavanda) potječe od paše izrazito bogate nektarom ili nektara prirodno bogatog šećerima te je potrebno vrlo kratko vrijeme da se postigne odgovarajuća konzistencija što zahtjeva dodatak manjeg udjela enzima od pčela te naposljetku rezultira manjom enzimskom aktivnošću meda (White, 2000.). Najveće količine invertaze mogu se naći u medljikovcu jer je medljika od koje potječe sama bogata enzimima, a posebno invertazom.

Glukoza-oksidaza je enzim koji pčele dodaju u med, a njezina aktivnost uglavnom se povezuje s antimikrobnom aktivnošću meda. Naime, ovaj enzim katalizira pretvorbu D-glukoze u D-glukono- $\delta$ -lakton koji prelazi u glukonsku kiselinu i vodikov peroksid. Nastali produkti odgovorni su za stabilnost meda prema mikrobiološkom kvarenju i fermentacijskim procesima. Aktivnost glukoza-oksidaze vrlo je niska u nerazrijeđenom medu dok se njezina aktivnost povećava razrjeđenjem meda (White i sur., 1963.; Shepartz i Subers, 1964.).

U manjim količinama med sadrži katalazu i kiselu fosfatazu. Katalaza je enzim koji potječe iz peludi i nektara, a manjim dijelom i od kvasaca i drugih mikroorganizama. Katalaza regulira razgradnju vodikovog peroksida na vodu i kisik čime se smanjuje antimikrobna aktivnost meda. Stvaranje vodikovog peroksida u medu, a time i inhibicijsko djelovanje meda na mikroorganizme, regulirano je ravnotežom između aktivnosti katalaze i glukoza-oksidaze (Huidobro i sur., 2005.; Sánchez i sur., 2005.a; Weston, 2000.). Aktivnost kisele fosfataze u medu povezuje se s procesima fermentacije meda. Enzim potječe iz peludi i nektara biljke od koje med vodi podrijetlo, ali i od kvasaca i pčele (Sánchez i sur., 2005.b; Alonso-Torre i sur., 2006.). Uloga joj je hidroliza organskih fosfata u medu oslobađajući anorganske fosfate.

Aktivnost dijastaze i invertaze, zajedno s udjelom HMF-a, obično se koristi kao pokazatelj zagrijavanja i svježine meda. Dok su za aktivnost dijastaze i udio HMF-a propisane granične vrijednosti u međunarodnim i nacionalnim propisima o kakvoći meda (Codex Alimentarius Commission, 2001.; Council of the European Union, 2002.; MPRRR, 2009.a) za aktivnost invertaze to nije slučaj, iako su mnoga ispitivanja pokazala da je invertaza osjetljivija na djelovanje topline i vrijeme skladištenja od dijastaze. Naime, prema istraživanju koje su proveli Karabournioti i Zervalaki (2001.) na 5 uniflornih vrsta meda (medljikovac, naranča, suncokret, pamuk i majčina dušica) aktivnost invertaze počinje se smanjivati već pri 35 °C, temperaturi koja je normalna u ljetnim mjesecima u mnogim zemljama, dok se pri temperaturi od 55 °C aktivnost invertaze smanjila na polovicu početne vrijednosti. Pri 75 °C invertaza je gotovo u potpunosti uništena. Serra Bonvehi i sur. (2000.) ispitivali su utjecaj različitih tehnika i temperatura zagrijavanja na aktivnost invertaze različitih vrsta meda. Zagrijavanje u komori za zagrijavanje toplim zrakom (45 °C/24 sata) smanjilo je aktivnost invertaze u prosjeku za 17 % početne vrijednosti dok je znatno veći pad aktivnosti invertaze primijećen kod pasterizacije (78 °C/15 – 20 sekundi) prosječno 80 %, zagrijavanja pod vakuumom (60 °C/30 minuta pod vakuumom od 300 mmHg) 55 % i električnim grijačem (1kW 15 sati) 93 %. Babacan i sur. (2002.) ispitivali su utjecaj zagrijavanja na aktivnost dijastaze te su zaključili da zagrijavanje pri 63 °C 30 minuta nije imalo značajniji utjecaj na aktivnost dijastaze dok je nakon zagrijavanja pri 85 °C aktivnost dijastaze još bila mjerljiva. Tosi i sur. (2008.) pokazali su da se dijastaza inaktivira u potpunosti tek pri 100 °C, dok se pri nižim temperaturama (60 – 90 °C) aktivnost dijastaze smanjuje porastom temperature. Navedena ispitivanja pokazala su da je dijastaza manje osjetljiva na zagrijavanje nego invertaza. Prema istraživanju Shepartz i Subersa (1964.) glukoza-oksidaza inaktivira se već pri 60 °C što pokazuje da je glukoza-oksidaza osjetljivija na djelovanje topline od dijastaze i invertaze. Osim temperature, glukoza-oksidaza osjetljiva je na svjetlost i druge oblike energije (mikrovalovi). Prema istraživanju Dimiņša i sur. (2006.), primijećen je značajan pad aktivnosti glukoza-oksidaze i invertaze pri temperaturama zagrijavanja 50 – 60 °C, te su autori zaključili da se aktivnost navedenih enzima treba koristiti kao dodatni indikator zagrijavanja uz standardne parametre, dijastazu i HMF. Vrijeme i temperatura skladištenja također utječu na aktivnost enzima. I u ovom slučaju dijastaza se pokazala manje osjetljiva u odnosu na invertazu. Vrijeme potrebno da se aktivnost enzima smanji na polovicu početne vrijednosti (vrijeme poluraspada) ovisi o temperaturi skladištenja. U **Tablici 4** prikazano je vrijeme poluraspada dijastaze i invertaze ovisno o temperaturi skladištenja.

**Tablica 4** Vrijeme poluraspada dijastaze i invertaze ovisno o temperaturi skladištenja

(White i sur., 1964.)

Temperatura skladištenja [°C]	Vrijeme poluraspada dijastaze	Vrijeme poluraspada invertaze
20	1480 dana	820 dana
30	200 dana	83 dana
40	31 dan	9,6 dana
50	5,38 dana	1,28 dana
60	1,05 dana	4,7 sati
70	5,3 sata	47 minuta
80	1,2 sata	8,6 minuta

Iako se glukoza-oksidadaza pokazala izuzetno osjetljiva na djelovanje topline, dugotrajno skladištenje na temperaturama 30 – 40 °C nije imalo značajan utjecaj na njezinu aktivnost, čak je pokazala manju osjetljivost u odnosu na dijastazu (Horn i Hammes, 2002.).

### 2.5.2. Boja meda

Boja meda jedno je od najvarijabilnijih svojstava meda koje značajno utječe na prihvatljivost potrošača, a time i na cijenu. Kreće se od gotovo bezbojne preko tamno žute (jantarne) do vrlo tamno smeđe. Prvenstveno ovisi o botaničkom podrijetlu meda, a s tim je u vezi udio i sastav mineralnih tvari, pigmenata (karotenoidi), fenolnih komponenata te melanoidina kao produkata Maillardovih reakcija (Mateo Castro i sur., 1992.; Frankel i sur., 1998.; White, 2000.). Boja meda obično je povezana sa senzorskim svojstvima. Svjetlije vrste meda (med bagrema) obično su slabije izražene arome i potrošači ih preferiraju, iako se u nekim zemljama Europe (Švicarska, Njemačka, Austrija) preferiraju tamnije vrste meda izraženije arome (medljikovac) (Bogdanov, 2009.).

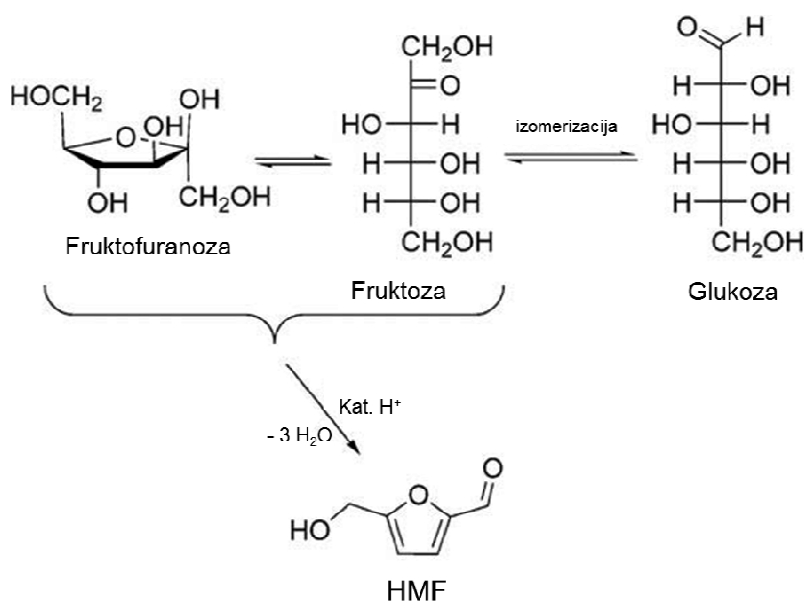
Prilikom kristalizacije meda, koja ovisi o udjelu fruktoze i glukoze u medu, udjelu vode, uvjetima i duljini skladištenja, med postaje nešto svjetliji ovisno o veličini kristala koji nastaju. Poznata je činjenica da med postaje tamniji tijekom skladištenja, iako u potpunosti nisu razjašnjeni mehanizmi koji dovode do ove pojave. Intenzitet tamnjenja povezuje se sa sastavom meda te temperaturom i duljinom skladištenja. Tamnjenje meda rezultat je Maillardovih reakcija, na čiji intenzitet utjecaj imaju udio fruktoze i glukoze, slobodnih aminokiselina vode i pH, zatim karamelizacija fruktoze te reakcije fenolnih komponenata. Tamnjenje meda linearno se povećava s duljinom skladištenja i više je izraženo kod tamnijih

vrsta meda (Pereyra Gonzales i sur., 1999.). Promjene boje meda praćene kromametrom pokazuju tijekom skladištenja smanjenje  $L^*$  (svjetline) i  $b^*$  (žute nijanse) parametara te povećanje  $a^*$  parametra (crvene nijanse). Promjene su intenzivnije kod uzoraka koji imaju veći udio vode i pri višim temperaturama zagrijavanja (Bulut i Kilic; 2009.).

Na promjenu boje meda osim skladištenja ima i zagrijavanje. Prilikom duljeg zagrijavanja meda pri temperaturama 50 – 70 °C uočeno je povećano stvaranje smeđih pigmenata što rezultira tamnijom bojom meda, te se prema ispitivanju Turkmen i sur. (2006.), promjena boje može koristiti kao indikator zagrijavanja. Ispitivanje koje su provele Brudzynski i Miotto (2011.c) na tri vrste meda (svijetli med djeteline, srednje tamni med manuke i tamni med heljde) pokazalo je povećanje stvaranja smeđih pigmenata (melanoidina) i povećanje boje kod sve tri vrste meda zagrijavanjem na temperaturi 121 °C/30 minuta, ali s različitim intenzitetom. Najveće povećanje boje i melanoidina uočeno je kod svijetlog meda djeteline, dok je najmanje povećanje uočeno kod najtamnije vrste, meda heljde. Čini se kako početna boja meda utječe na sadržaj melanoidina u zagrijanim uzorcima. Pretpostavlja se da tamnije vrste meda već sadrže melanoidine, te je zagrijavanje uzrokovalo paralelno stvaranje i pregradnju melanoidina u druge komponente.

### 2.5.3. Stvaranje hidroksimetilfurfurala (HMF)

HMF (5-hidroksimetil-2-furaldehid ili hidroksimetilfurfural) obično se smatra jednim od pokazatelja kakvoće meda i indikator svježine i procesiranja meda. HMF je ciklički aldehid i najvažniji međuprodukt dviju reakcija: degradacije heksoza (fruktoze ili glukoze) u kiselom mediju i dekompozicije 3-deoksiheksuloze u Maillardovim reakcijama (Fallico i sur., 2008.).



**Slika 5** Stvaranje HMF-a iz heksoza

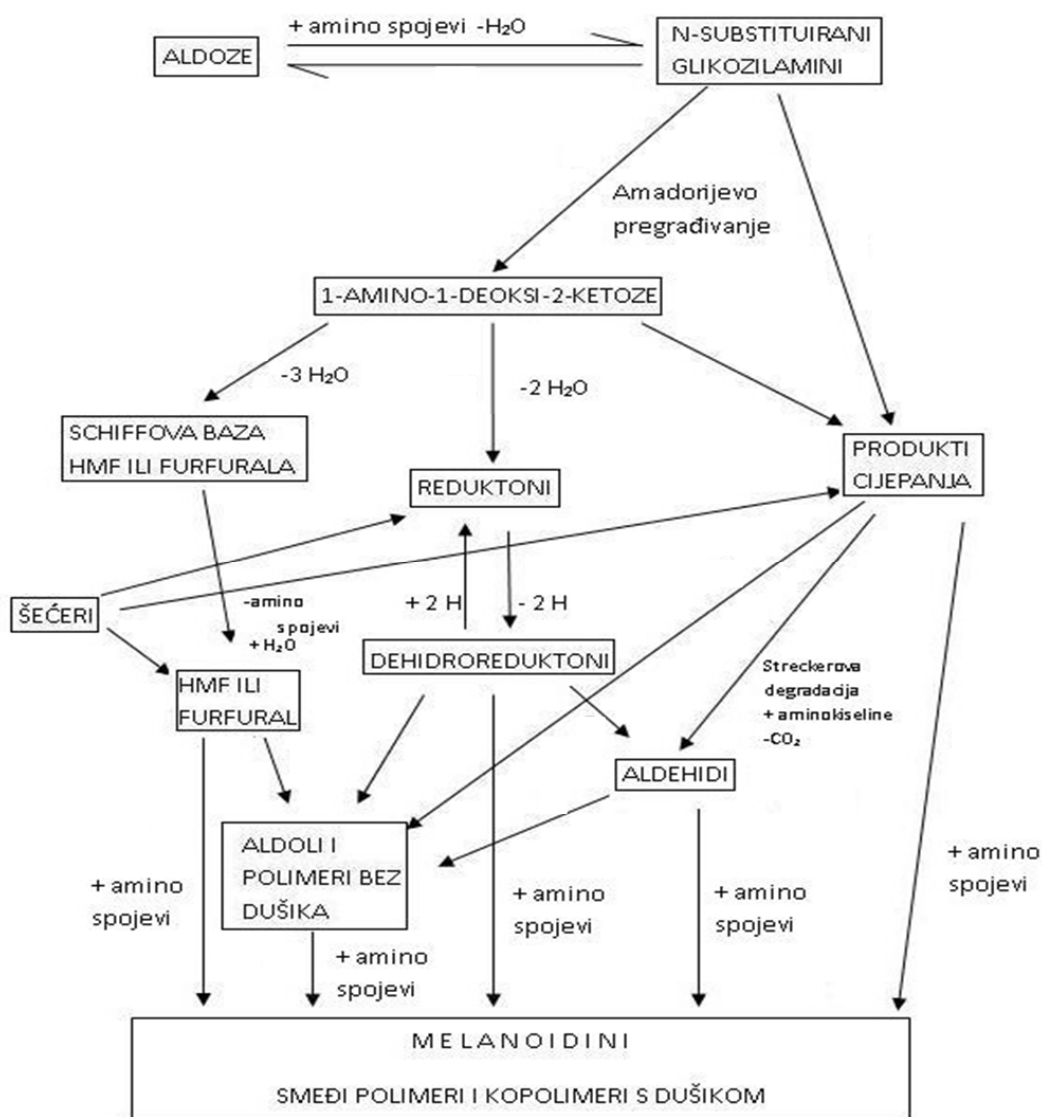


Kako je fruktoza nestabilnija pri nižim pH vrijednostima, termolabilnija (raspada se pri 60 °C) te brže enolizira od glukoze, glavna HMF-a u medu stvara se iz fruktoze (Singh i Bath, 1998.; Dimiņš i sur., 2006.). U većini vrsta svježeg meda udio HMF-a je vrlo mali ili nemjerljiv, dok se skladištenjem i zagrijavanjem meda udio povećava, te se prikladnim smatra korištenje udjela HMF-a kao indikatora zagrijavanja i dugotrajnog skladištenja. Udio HMF-a u medu ovisi o botaničkom podrijetlu meda odnosno kemijskom sastavu, temperaturi i vremenu zagrijavanja te uvjetima skladištenja. Kinetika stvaranja HMF-a povezana je s pH vrijednosti meda, ukupnom i slobodnom kiselosti i udjelom mineralnih tvari (Tosi i sur., 2004.; Fallico i sur., 2008.). Ispitivanja kinetike stvaranja HMF-a zagrijavanjem pokazala su da stvaranje HMF-a slijedi kinetiku prvog reda (Tosi i sur., 2002.; Fallico i sur., 2004.; Turhan i sur., 2008.). Brzina stvaranja HMF-a ovisi o vrsti meda te se pokazalo da med koji ima niži pH pokazuje veći porast HMF-a zagrijavanjem. Prema ispitivanju Fallico i sur. (2004.) najmanji porast HMF-a zagrijavanjem pri temperaturi 50 °C bio je kod meda kestena dok je najveći porast bio kod meda naranče koji ima nižu pH vrijednost. Međutim, prilikom zagrijavanja pri 100 °C stvaranje HMF-a značajno se povećalo kod svih ispitivanih vrsta meda. Razlika u brzini stvaranja HMF-a ovisno o podrijetlu meda vidljiva je i iz ispitivanja Turhan i sur. (2008.) koji su pokazali da je zagrijavanje pri visokim temperaturama (75, 90 i 100 °C u trajanju od 15 – 90 minuta) imalo manji utjecaj na medljikovac u odnosu na nektarni med. Poznato je da duljim skladištenjem meda dolazi do stvaranja HMF-a ovisno o sastavu meda i uvjetima skladištenja. Prema ispitivanjima Moreira i sur. (2007.) te Bulut i Kilica (2009.) temperatura i vrijeme skladištenja ima značajan utjecaj na stvaranje HMF-a. Povećanje udjela HMF-a tijekom skladištenja također slijedi kinetiku prvog reda, a brzina stvaranja ovisi o udjelu vode i temperaturi skladištenja. Skladištenje meda pri temperaturama 30 – 40 °C dovodi do značajnijeg povećanja HMF-a. Treba napomenuti da su te temperature normalne za tropske krajeve i ljetne mjeseci u mnogim zemljama te je prilikom procjene kakvoće meda bitno imati u vidu iz kojeg područja med potječe.

Udio HMF-a u prehrambenim proizvodima ovisi o ravnoteži između degradacije oksidacijom i stvaranja preko različitih prekursora. Poznato je da kao produkt razgradnje šećera kao i HMF-a nastaje levulinska kiselina. Obično se prilikom zagrijavanja prati samo nastajanje HMF-a dok su reakcije razgradnje zanemarene. Iako prilikom zagrijavanja prevladavaju reakcije stvaranja HMF-a, razgradnja HMF-a nije zanemariva (Fallico i sur., 2008.).

### 2.5.4. Stvaranje produkata Maillardovih reakcija

Maillardove reakcije su reakcije neenzimskog posmeđivanja koje je prvi puta opisao Louis Maillard početkom 20. stoljeća. Maillardove reakcije povezuju se sa stvaranjem arome, okusa i boje, koji nastaju prženjem kave i kakaa, pečenjem kruha i pekarskih proizvoda ili kuhanjem i pečenjem mesa. Tijekom Maillardovih reakcija stvara se mnoštvo produkata koji doprinose nutritivnoj vrijednosti hrane. Međutim, tijekom Maillardovih reakcija mogu nastati i potencijalno mutagene i toksične komponente, čime se smanjuje nutritivna i zdravstvena vrijednost hrane (Martins i sur., 2001.). Maillardove reakcije uključuju reakcije amino skupine slobodnih aminokiselina, peptida i proteina s karbonilnim skupinama reducirajućih šećera, aldehida i ketona. Mehanizam nastajanja produkata Maillardovih reakcija (MRP) vrlo je složen i uključuje niz reakcija čiji je shematski prikaz dan na **Slici 6**.



**Slika 6** Shematski prikaz Maillardovih reakcija prema Hodge-u (Martins i sur., 2001.)

Reakcije nastanka MRP mogu se podijeliti u tri stadija koji se kontinuirano odvijaju. Inicijalni stadij uključuje reakcije između amino skupina aminokiselina/proteina i karbonilnih skupina reducirajućih šećera pri čemu nastaju bezbojni *N*-glikozamini koji podliježu reakcijama premještanja i izomerizaciji (Amadorijevo pregrađivanje). Daljnja razgradnja Amadorijevih produkata ovisi o pH vrijednosti sustava. Pri pH 7 i niže, Amadorijevi produkti podliježu 1,2-enolizaciji pri čemu se stvaraju furfural (iz pentoz) i hidroksimetilfurfural (iz heksoza). Pri pH višim od 7, Amadorijevi produkti podliježu uglavnom 2,3-enolizaciji pri čemu nastaju različitih reaktivni spojevi (reduktoni, diacetil). Nastali spojevi jako su reaktivni i nastavljaju daljnje reakcije pregradnje. Karbonilne skupine mogu kondenzirati sa slobodnim amino skupinama što rezultira inkorporacijom dušika u reakcijske produkte. Dikarbonilne komponente reagiraju s aminokiselinama stvarajući aldehide i  $\alpha$ -aminoketone (Strekerova degradacija). Nakon toga, u finalnom stadiju dolazi do niza reakcija (ciklizacija, dehidratacija, premještanje, izomerizacija, kondenzacija) što u konačnici dovodi do stvaranja smeđih polimera i kopolimera s dušikom, melanoidina (Martins i sur., 2001.; Silvan i sur., 2006.).

Smatra se da je med izuzetno pogodan sustav za odvijanje Maillardovih reakcija zbog velike količine reducirajućih šećera i prisutnosti slobodnih aminokiselina i proteina, niskog aktivteta vode i slabo kiselog pH. Svi navedeni uvjeti omogućuju stvaranje MRP već pri sobnim temperaturama, a zagrijavanjem i skladištenjem meda brzina stvaranja MRP se povećava (Pätzold i Brückner, 2005.). Novija istraživanja pokazala su da su melanoidini koji nastaju kao finalni produkti Maillardovih reakcija djelomično odgovorni za antioksidativni kapacitet meda (Brudzynski i Miotto, 2011.a; 2011.b). Villamiel i sur. (2001.) dokazali su stvaranje furozina u medu tijekom zagrijavanja. Furozin se stvara hidrolizom Amadorijevih produkata u kiselom mediju, a može se koristiti kao indikator promjena zagrijavanjem u ranom stadiju Maillardovih reakcija. Prisutnost furozina koristi se kao pokazatelj utjecaja procesiranja i skladištenja u mnogim prehrambenim proizvodima (mliječni proizvodi, tjestenina, dječja hrana). HMF koji nastaje degradacijom 3-deoksiheksuloze u kiselom mediju dobro je poznat kao indikator zagrijavanja i svježine meda i drugih prehrambenih proizvoda. Prisutnost 3-deoksiglukuloze, metilgloksala i glioksala u medu, reaktivnih 1,2-dikarbonilnih intermedijera Maillardovih reakcija, dokazali su Weigel i sur. (2004.). Prisutnost većih količina metilglioksala u medu manuke se obično povezuje s iznimno visokom antibakterijskom aktivnosti koji ovaj med pokazuje (Atrott i Henle, 2009.).

### 2.5.5. Promjena antioksidativnog kapaciteta

U literaturi je dostupan relativno mali broj radova o promjeni antioksidativnog kapaciteta meda tijekom zagrijavanja i skladištenja. Procesiranjem meda dolazi do povećanja antioksidativnog kapaciteta ovisno o primijenjenoj temperaturi i vremenu zagrijavanja (Antony i sur., 2000.b; Blasa i sur., 2006.; Turkmen i sur., 2006.; Brudzynski i Miotto, 2011.c). Povećanje antioksidativnog kapaciteta autori pripisuju stvaranju produkata Maillardovih reakcija, posebice melanoidina, što objašnjavaju povećanjem stvaranja smeđih pigmenata tijekom zagrijavanja meda te visokim korelacijama između stvaranja smeđih pigmenata (određenih spektrofotometrijski pri 420 – 450 nm) i antioksidativnog kapaciteta (Turkmen i sur., 2006.; Brudzynski i Miotto, 2011.c). Povećanje antioksidativnog kapaciteta može se djelom pripisati i produktima Maillardovih reakcija male i srednje molekulske mase za koje se analizom hlapivih komponenata meda pokazalo da pripadaju skupini furana, pirana, imidazola, pirazola te derivatima pirana i furana (Antony i sur., 2000.b). Suprotno navedenim istraživanjima, Nagai i sur. (2001.) i Wang i sur. (2004.) pokazali su da procesiranjem meda dolazi do smanjenja antioksidativnog kapaciteta što autori pripisuju razgradnji vitamina i inaktivaciji antioksidativnih enzima. Wang i sur. (2004.) ispitivali su utjecaj skladištenja u trajanju od 6 mjeseci na antioksidativni kapacitet te pokazali da dolazi do smanjenja antioksidativnog kapaciteta skladištenjem te da temperatura skladištenja nije imala značajan utjecaj na antioksidativni kapacitet meda. Treba napomenuti da je skladištenje meda u ovom ispitivanju provedeno na niskim temperaturama (4 °C i -20 °C) što nisu uobičajene temperature skladištenja meda.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Definiranje zadatka

Ciljevi istraživanja bili su:

- Odrediti antioksidativni kapacitet i s njim povezane parametre, udio ukupnih fenola i boju, 4 vrste meda: bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.), kestena (*Castanea sativa* Mill.), kadulje (*Salvia officinalis* L.) i medljikovca.
- Ispitati utjecaj procesiranja zagrijavanjem na antioksidativni kapacitet meda, udio ukupnih fenola i odabrane parametre kakvoće.
- Ispitati utjecaj skladištenja kroz dvije godine na antioksidativni kapacitet meda, udio ukupnih fenola i odabrane parametre kakvoće.

Istraživanje je obuhvatilo:

- Provedbu melisopalinološke analize i određivanje fizikalno-kemijskih parametara kakvoće meda. U tu svrhu određeni su sljedeći fizikalno-kemijski parametri:
  - udio vode refraktometrijski,
  - električna provodnost konduktometrijski,
  - sastav i udio ugljikohidrata HPLC metodom,
  - specifična rotacija polarimetrijski,
  - kiselost (slobodna, laktonska i ukupna) titrimetrijski,
  - udio hidroksimetilfurfurala (HMF) prema White-u,
  - udio prolina,
  - udio proteina prema Bradford-ici,
  - aktivnost diastaze prema Shade-u,
  - aktivnost invertaze prema Siegenthaler-u,
  - aktivnost glukoza-oksidge prema Schepartz i Subers-u,
  - aktivnost kisele fosfataze prema Bergmeyer-u i sur.,
  - boja meda kromametrom, spektrofotometrijski i pomoću Lovibond komparatora.
- Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH i FRAP metodama i ukupnih fenola modificiranom Folin-Ciocalteu metodom.
- Zagrijavanje uzoraka meda na 45 °C/48 sati (T1) i 65 °C/6 sati (T2), te nakon provedenih toplinskih tretmana određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH i FRAP metodom, određivanje ukupnih fenola i sljedećih parametara kakvoće: aktivnost enzima diastaze, invertaze, glukoza-oksidge i kisele fosfataze, udjela HMF-a i boje.
- Skladištenje toplinski netretiranih i tretiranih uzoraka (T1 i T2) kroz dvije godine na sobnoj temperaturi na tamnom te analizu antioksidativnog kapaciteta, udjela ukupnih fenola i sljedećih parametara kakvoće: aktivnost enzima diastaze, invertaze, glukoza-oksidge i

kisele fosfataze, udjela HMF-a i boje nakon jedne, odnosno nakon dvije godine skladištenja.

Nakon provedenog istraživanja, rezultati su obrađeni primjenom odgovarajućih statističkih testova.

### 3.2. Uzorci meda

Uzorci meda za istraživanje prikupljeni su od pčelara s područja Republike Hrvatske kroz 4 sezone (2008. – 2011. godine). Med bagrema (*R. pseudoacacia* L.) i kestena (*C. sativa* Mill.) karakteristične su vrste za područje kontinentalne Hrvatske, dok je med kadulje (*S. officinalis* L.) tipičan za mediteranski dio Hrvatske. Medljikovac je med koji se po podrijetlu, a time i svojim karakteristikama, razlikuje od nektarnih medova jer se dobiva iz medne rose, a ne od nektara cvjetova medonosnih biljaka.

U svrhu određivanja botaničkog podrijetla i ocjene sukladnosti s propisanim zahtjevima (MPRRR, 2009.a; 2009.b), na svim uzorcima provedena je melisopalinološka analiza i određeni fizikalno-kemijski parametri koji se najčešće povezuju s botaničkim podrijetlom meda. Nakon sortiranja uzoraka prema botaničkom podrijetlu, odabrani su uzorci na kojima je dalje ispitivan utjecaj procesiranja i skladištenja.

**Tablica 5** Analizirani uzorci meda

Vrsta meda	Godina proizvodnje	Oznaka uzorka	Uzorci za procesiranje i skladištenje
Kesten <i>C. sativa</i> Mill.	2008.	KS1 – KS15	KS1 – KS7
Kadulja <i>S. officinalis</i> L.	2008. 2011.	KD1 – KD7 KD8– KD10	KD1 – KD5
Bagrem <i>R. pseudoacacia</i> L.	2009.	B1 – B10	B1 – B5
Medljikovac	2009. 2010.	MD1 – MD7 MD8 – MD10	MD1 – MD5

Uzorci su raspodijeljeni u staklenke volumena 370 mL. Posudice su napunjene do vrha i zatvorene, te nisu otvarane do analize. Jedan dio uzoraka zagrijavan je na 45 °C tijekom 48 sati (toplinski tretman T1), dok je drugi dio uzoraka zagrijavan na 65 °C tijekom 6

sati (toplinski tretman T2). Odmah nakon procesiranja na uzorcima je provedena analiza antioksidativnog kapaciteta DPPH i FRAP metodama, udjela ukupnih fenola, aktivnosti enzima dijastaze, invertaze, glukoza-oksidge i kisele fosfataze, udjela HMF-a i određivanje boje.

Netretirani i toplinski tretirani uzorci skladišteni su kroz dvije godine na sobnoj temperaturi na tamnom, te su nakon jedne, odnosno dvije godine provedene sljedeće analize: određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH i FRAP metodama, udjela ukupnih fenola, aktivnosti enzima dijastaze, invertaze, glukoza-oksidge i kisele fosfataze, udjela HMF-a i određivanje boje.

### **3.3. Metode**

#### **3.3.1. Melisopalinološka analiza**

Melisopalinološka analiza peludnih zrnaca i elemenata medljike u netopivom sedimentu provedena je mikroskopski (mikroskop Olympus DP12) (Louveaux i sur., 1978.), dok je identifikacija peludi u netopivom sedimentu provedena usporedbom morfoloških svojstava peludi s literaturnim referencama (von der Ohe i von der Ohe, 2003.; Kenjerić i sur., 2006).

#### **3.3.2. Određivanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametara meda**

Određivanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametara meda provedeno je prema međunarodno priznatim metodama za analize meda (Bogdanov i sur., 1997.; AOAC International, 2002.), a u skladu s propisima (Codex Alimentarius Commission, 2001.; Council of the European Union, 2002.; MPRRR, 2009.a).

Udio vode određen je refraktometrijski, električna provodnost otopine meda određena je konduktometrijski, specifična rotacija polarimetrijski, udio HMF-a metodom po White-u, aktivnost dijastaze metodom po Shade-u, aktivnost invertaze metodom po Siegenthaler-u, dok je sastav i udio ugljikohidrata određen HPLC metodom (Bogdanov i sur., 1997.). Slobodna, laktonska i ukupna kiselost određena je titrimetrijski, udio prolina određen je spektrofotometrijski, sve prema AOAC metodama (AOAC International, 2002.).

#### **3.3.3. Određivanje udjela proteina**

Određivanje udjela proteina provedeno je spektrofotometrijski, metodom po Bradford-ici (Bradford, 1976.) koja se zasniva na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje



Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke u proteinu, pri čemu nastaje kompleks protein-boja s maksimumom apsorpcije pri 595 nm.

Pripremljena je otopina meda koncentracije 0,2 g/mL u 50 mM kalijevom fosfatnom puferu (pH 7). Alikvot od 0,1 mL otopine meda pomiješan je sa 2 mL Bradford reagensa (Biorad, Njemačka) te nakon 5 minuta izmjerena apsorbanacija smjese pri 595 nm spektrofotometrom Helios  $\gamma$  (Thermo Spectronic, USA) u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto meda sadržavala je 50 mM kalijev fosfatni pufer (pH 7). Količina udjela proteina izračunata je iz baždarnog dijagrama goveđeg serumskog albumina (Merck, Njemačka), a rezultati izraženi u mg/100 g meda.

### 3.3.4. Određivanje aktivnosti glukoza-oksidge

Za određivanje aktivnosti glukoza-oksidge primijenjena je metoda prema Schepartz i Subers-u (1964.). Glukoza-oksidge katalizira oksidaciju D-glukoze u D-glukono- $\delta$ -lakton uz nastajanje vodikova peroksida. Nastali vodikov peroksid reducira se u vodu djelovanjem peroksidaze uz *o*-diansidin kao kosupstrat pri čemu nastaje obojeni produkt sa maksimumom apsorbanacije pri 400 nm (oksidirani *o*-diansidin).

Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti glukoza-oksidge sastojala se od 0,7 mL 2,14 M glukoze u 100 mM natrijevom fosfatnom puferu (pH 6,1), 0,1 mL otopine *o*-diansidina (Merck, Njemačka) u 95 %-nom etanolu, 0,1 mL otopine peroksidaze (peroksidaza iz hrena, Serva, Njemačka) u 100 mM natrijevom fosfatnom puferu (pH 6,1) (aktivnost peroksidaze ekvivalentna 60 internacionalnih jedinica) te 0,1 mL otopine meda (koncentracije 0,2 g/mL) u 100 mM natrijevom fosfatnom puferu (pH 6,1). Reakcija je započeta dodatkom otopine meda i smjesa je inkubirana 30 minuta pri 37 °C. Po isteku vremena reakcija je prekinuta dodatkom 0,1 mL 1 M kloridne kiseline te je smjesi izmjerena apsorbanacija pri 400 nm spektrofotometrom Helios  $\gamma$  (Thermo Spectronic, USA) u odnosu na slijepu probu koja je sadržavala sve komponente reakcijske smjese izuzev otopine meda. Rezultati apsorbanacije korigirani su za vrijednost apsorbanacije reakcijske smjese u nultoj minuti i preračunati u  $\mu$ g nastalog vodikova peroksida po jednom satu i gramu meda ( $\mu$ g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/h g) pomoću baždarnog dijagrama pripremljenog s poznatim koncentracijama vodikova peroksida (Fluka, Njemačka). Reakcijska smjesa u nultoj minuti sadržavala je sve komponente reakcijske smjese, ali je dodatak otopine meda izvršen nakon dodatka 1 M otopine kloridne kiseline. Baždarni dijagram je pripremljen sa poznatim koncentracijama vodikova peroksida uz peroksidazu i *o*-diansidin.

### 3.3.5. Određivanje aktivnosti kisele fosfataze

Aktivnost kisele fosfataze određena je prema metodi Bergmeyera i sur. (1974.). Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti kisele fosfataze sadržavala je 1 mL otopine *p*-nitrofenil fosfata (koncentracije 1 mg/mL; Kemika, Hrvatska) u 0,1 M natrijevom citratnom puferu (pH 5,3) te 0,1 mL otopine meda u 0,1 M natrijevom citratnom puferu (pH 5,3), koncentracije 0,2 g/mL. Reakcija je započeta dodatkom otopine meda, i nakon sat vremena inkubacije pri 37°C reakcija je prekinuta dodatkom 2 mL 0,5 M otopine NaOH, nakon čega je izmjerena apsorbancija pri 405 nm spektrofotometrom Helios  $\gamma$  (Thermo Spectronic, USA) uz slijepu probu koja je sadržavala 1 mL otopine *p*-nitrofenil fosfata u 0,1 M natrijevom citratnom puferu (pH 5,3). Rezultati apsorbancije korigirani su za vrijednost apsorbancije reakcijske smjese u nultoj minuti i aktivnost enzima izražena u mg P/100 g meda tijekom 24 h (mg P/100g meda/24 h). Reakcijska smjesa u nultoj minuti sadržavala je sve komponente reakcijske smjese, ali je dodatak otopine meda izvršen nakon dodatka 0,5 M otopine natrijeva hidroksida.

### 3.3.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje

Intenzitet boje (neto apsorbancija, NA) definira se kao razlika izmjerenih apsorbancija ( $A_{450} - A_{720}$ ) pomnožena s faktorom 1000, a mjeri se profiltriranoj 50 %-noj vodenoj otopini meda (Beretta i sur., 2005.). Pripremljena je 50 % vodena otopina meda i filtrirana preko filter papira (plava vrpca, Schleicher&Schüll, Nr. 589<sup>3</sup>). Filtratu je izmjerena apsorbancija pri 450 i 720 nm spektrofotometrom Helios  $\epsilon$  (Thermo Spectronic, USA).

### 3.3.7. Određivanje boje pomoću Lovibond komparatora

Određivanje boje pomoću Lovibond Honey ColorPod komparatora (Lovibond, UK) temelji se na mjerenju transmitancije uzorka meda pri 430 i 530 nm. Transmitancija je izražena preko milimetara Pfundove skale koja je podijeljena u sedam kategorija (**Tablica 6**).

**Tablica 6** Klasifikacije boje prema Pfundovoj skali

USDA standardi boje	Pfundova skala [mm]
Bezbojna ( <i>water white</i> )	0 – 8
Jako bijela ( <i>extra white</i> )	9 – 17
Bijela ( <i>white</i> )	18 – 34
Jako svijetlo žuta ( <i>extra light amber</i> )	35 – 50
Svijetlo žuta ( <i>light amber</i> )	51 – 85
Žuta ( <i>amber</i> )	86 - 114
Tamno žuta ( <i>dark amber</i> )	> 114

### 3.3.8. Određivanje boje kromametrom

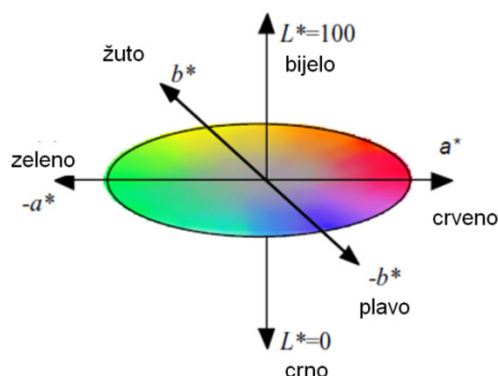
Za određivanje boje meda korišten je kromametar Konika Minolta CR-300 s nastavkom i držačem za tekuće uzorke koji radi na principu mjerenja reflektirane svjetlosti s površine uzorka. Reflektirana svjetlost mjeri se pomoću silikonskih ćelija, a dobivene podatke računalo zapisuje u različitim mjernim sustavima. Kod analize boje meda korišten je sustav CIEL\*a\*b\*. Prije mjerenja kromametar je kalibriran pomoću kalibracijske pločice. Za svaki uzorak provedeno je 5 mjerenja.

U CIEL\*a\*b\* mjernom sustavu određuju se sljedeći parametri:

$L^*$  vrijednost koja pokazuje svjetlinu uzorka ( $L^* = 0$  uzorak je crne,  $L^* = 100$  uzorak je bijele boje)

$a^*$  vrijednost indikator je crvene ( $+a^*$ ) odnosno zelene ( $-a^*$ ) boje

$b^*$  vrijednost indikator je žute ( $+b^*$ ) odnosno plave ( $-b^*$ ) boje



**Slika 7** Prikaz načina očitavanja boje u CIEL\*a\*b\* mjernom sustavu (Ohno, 2000.)

### 3.3.9. Metode određivanja ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta

Kod određivanja ukupnih fenola kao i antioksidativnog kapaciteta DPPH i FRAP metodama, kao slijepa proba korišten je analog šećera (umjetni med čiji sastav odgovara prosječnom sastavu šećera u medu). Analog šećera sastojao se od 40 % fruktoze, 30 % glukoze, 8 % maltoze i 2 % saharoze. Svrha korištenja analoga šećera kao slijepa probe je provjera interferiraju li šećeri kao glavni sastojak meda prilikom provedbe navedenih analiza.

#### 3.3.9.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Za određivanje ukupnih fenola primijenjena je modificirana spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda (Vinson i sur., 2001.; Beretta i sur., 2005.). Metoda se bazira na reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu reagensom u kiselom mediju pri čemu nastaje obojeni produkt. Intenzitet obojenja koji je proporcionalan koncentraciji ukupnih fenola u otopini uzorka mjeri se pri valnoj duljini od 750 nm.

Izvagano je 15 g meda s točnošću  $\pm 0,1$  mg i otopljeno u destiliranoj vodi te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 50 mL. 0,1 mL otopine meda pomiješano je s 1 mL 10 % Folin-Ciocalteu reagensa (Kemika, Hrvatska). Nakon miješanja 2 minute na električnoj miješalici i stajanja 20 minuta na sobnoj temperaturi na tamnom, smjesi je izmjerena apsorbancija pri 750 nm spektrofotometrom Helios  $\epsilon$  (Thermo Spectronic, USA) u odnosu na analog šećera kao slijepu probu. Koncentracija ukupnih fenola izračunata je pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline (Sigma, Njemačka) (0,02 - 0,2 mg/mL), a rezultati izraženi kao mg galne kiseline/kg meda.

#### 3.3.9.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom

Određivanje antioksidativnog kapaciteta mehanizmom hvatanja slobodnih radikala provedeno je DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) metodom (Beretta i sur., 2005.). Metoda se temelji na reakciji stabilnog radikala (DPPH<sup>•</sup>) i donora vodika (npr. fenolne skupine). Prilikom reakcije, otopina radikala DPPH<sup>•</sup>, koja je ljubičaste boje, reagira s antioksidansom pri čemu dolazi do redukcije, što se očituje u promjeni boje u žutu. Promjena apsorbancije mjeri se spektrofotometrijski pri 517 nm.

Izvagano je 15 g meda s točnošću  $\pm 0,1$  mg i otopljeno u destiliranoj vodi te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 25 mL. Iz polazne otopine meda pripravljena su razrjeđenja tako da koncentracija meda u reakcijskim otopinama bude u rasponu 30 - 600 mg/mL (**Tablica 7**).

**Tablica 7** Priprema razrjeđenja osnovne otopine meda

Oznaka	V <sub>osnovne otop. meda</sub> [mL]	V <sub>vode</sub> [mL]	c [mg/mL]	c* [mg/mL]	c** [mg/mL]
1	0,1	1,9	30	1	3
2	0,4	1,6	120	4	12
3	0,8	1,2	240	8	24
4	1,2	0,8	360	12	36
5	1,6	0,4	480	16	48
6	2,0	0	600	20	60

\*konačna koncentracija meda u reakcijskoj otopini za med kestena, kadulje i medljikovca

\*\*konačna koncentracija meda u reakcijskoj otopini za med bagrema

Od svake otopine uzet je alikvot od 0,1 mL (za med kestena, kadulje i medljikovca) odnosno 0,3 mL (za med bagrema) te je dodano po 1 mL (za med kestena, kadulje i medljikovca) odnosno 0,8 mL (za med bagrema) natrijevog acetatnog pufera (pH 5,5) i 1,9 mL 130 mM DPPH reagensa (Sigma, Njemačka) u apsolutnom etanolu. Kod određivanja antioksidativnog kapaciteta meda bagrema korišten je veći volumen kako bi smanjenje DPPH\* bilo bolje izraženo, s obzirom da med bagrema ima nizak antioksidativni kapacitet. Usporedno je za svaku otopinu priređena slijepa proba koja je sadržavala otopinu meda iste koncentracije i natrijev acetatni pufer (pH 5,5), bez DPPH reagensa kako bi se eliminirao utjecaj boje meda. Kao kontrolni uzorak korišten je analog šećera. Tako pripremljene otopine promiješane su na električnoj miješalici i ostavljene stajati na tamnom na sobnoj temperaturi 90 minuta. Po isteku vremena svakoj otopini izmjerena je apsorbancija pri 517 nm spektrofotometrom Helios ε (Thermo Spectronic, USA).

Za svaku koncentraciju izračunao se postotak preostalog DPPH\* prema jednadžbi:

$$\text{Preostali DPPH}^* (\%) = \frac{A - A_s}{A_k} \cdot 100$$

gdje je: A - apsorbancija uzorka

A<sub>s</sub> – apsorbancija slijepa probe

A<sub>k</sub> – apsorbancija kontrolnog uzorka

Iz dobivenih rezultata nacrtana je ovisnost koncentracije meda u otopini, c\* ili c\*\* (mg/mL) o preostaloj količini DPPH\* (%) i iz jednadžbe pravca izračunata koncentracija meda (mg/mL) potrebna za 50 %-tno smanjenje početne koncentracije DPPH\* radikala (IC<sub>50</sub>). Što je dobivena vrijednost za IC<sub>50</sub> manja, veći je antioksidativni kapacitet uzorka.

### 3.3.9.3. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta FRAP metodom

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda je opće prihvaćena metoda za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta koja se temelji na redukciji željeza iz ferri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) u fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oblik u prisutnosti antioksidanasa pri niskom pH (pH 3,6). Nastali  $\text{Fe}^{2+}$  ioni u prisutnosti TPTZ reagensa (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) stvaraju obojeni kompleks, sa maksimumom apsorbancije na 593 nm. Metodu su razvili Benzie i Strain 1996. godine, a Beretta i sur. (2005.) prilagodili metodu za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u medu.

Za izvedbu mjerenja dnevno je pripreman FRAP reagens. FRAP reagens sastojao se od 10 mM otopine TPTZ (Sigma, Njemačka) 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 (pH 3,6) u omjeru 1:1:10. Pripremljeni reagens tijekom analiza mora biti termostatiran na 37 °C u vodenoj kupelji.

Izvagano je 5 g meda s točnošću  $\pm 0,1$  mg i otopljeno u destiliranoj vodi te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 50 mL. Alikvot od 0,2 mL otopine meda pomiješan je s 1,8 mL FRAP reagensa te nakon termostatiranja na 37 °C kroz 10 minuta, smjesi je izmjerena apsorbancija pri 593 nm spektrofotometrom Helios  $\epsilon$  (Thermo Spectronic, USA) u odnosu na analog šećera kao slijepu probu. Vodene otopine željezo sulfata ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) u koncentracijskom rasponu od 50 do 1000  $\mu\text{M}$  koristile su se za izradu kalibracijske krivulje pomoću koje je izračunata FRAP vrijednost ( $\mu\text{M Fe(II)}$ ) 10 %-tne otopine meda).

### 3.4. Statistička obrada podataka

Za svaki ispitivani parametar kakvoće meda, udio peludnih zrnaca specifičnih za biljku od koje med prema deklaraciji vodi podrijetlo kao i antioksidativni kapacitet, udio ukupnih fenola i boju meda, izračunate su srednje vrijednosti i standardna devijacija. Također je izračunata prosječna promjena ispitivanih parametara zagrijavanjem (toplinskim tretmanima T1 i T2) i skladištenjem meda (nakon jedne odnosno druge godine skladištenja).

Ispitivana je korelacija između antioksidativnog kapaciteta, udjela ukupnih fenola, boje meda i izabranih parametara kakvoće meda, a povezanost izražena preko Pearsonovih i Spearmanovih koeficijenata korelacije, uz odabranu razinu značajnosti  $p < 0,05$ .

Navedena obrada podataka određena je korištenjem kompjutorskih programa Microsoft Office Excel (2007., Microsoft Corp., USA) i Statistica (7.0, Statsoft Inc., USA).

## **4. REZULTATI**

Rezultati istraživanja prikazani su u 13 tablica, 32 slike i 16 priloga.

Rezultati melisopalinološke analize i ispitivanih fizikalno-kemijskih parametara prikazani su u **Tablicama 8 – 15**.

Rezultati određivanja boje meda spektrofotometrijski, pomoću Lovibond komparatora i kromametrom prikazani su na **Slikama 8 – 11**.

**Tablice 16 – 19** prikazuju udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet određen DPPH i FRAP metodama prema vrsti meda.

Povezanost udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta meda prikazana je na **Slikama 12 i 13**, a koeficijenti korelacije između antioksidativnog kapaciteta, udjela ukupnih fenola, aktivnosti glukoza-oksidaze, udjela proteina i prolina te boje svih analiziranih uzoraka meda dani su u **Tablici 20**.

Na **Slikama 14 – 26** prikazane su prosječne promjene udjela HMF-a, aktivnosti enzima, boje, udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta zagrijavanjem toplinskim tretmanima T1 i T2, a pojedinačne vrijednosti za svaki analizirani uzorak dani su u **Prilozima 1 – 3**.

Prosječne promjene udjela HMF-a, aktivnosti enzima, boje, udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta skladištenjem uzoraka kroz dvije godine na sobnoj temperaturi na tamnom prikazane su na **Slikama 27 – 39**, a pojedinačne vrijednosti za svaki analizirani uzorak dani su u **Prilozima 4 – 16**.



Tablica 8 Fizikalno-kemijski parametri meda kestena

Oznaka uzorka	Udio peludi kestena [%]	Udio vode [%]	Električna provodnost [mS/cm]	Udio HMF [mg/kg]	pH	Slobodna kiselost [mEq/1000g]	Laktonska kiselost [mEq/1000g]	Ukupna kiselost [mEq/1000g]	Specifična rotacija $[\alpha]_D^{20}$	F/G	F + G [%]
KS1	98	17,9	1,456	0	5,86	8,0	1,3	9,3	-21,5	1,65	69,5
KS2	86	16,7	1,134	1,8	4,71	16,7	5,6	22,3	-20,5	1,50	67,9
KS3	97	19,1	1,566	0,2	4,81	18,4	5,0	23,4	-24,7	1,69	65,3
KS4	85	14,3	0,939	6,2	4,62	18,4	4,8	23,2	-15,6	1,46	67,1
KS5	98	16,0	1,180	0	5,07	11,3	2,5	13,8	-19,8	1,46	69,9
KS6	89	16,2	1,464	0	5,04	14,0	3,1	17,1	-20,4	1,56	72,0
KS7	98	15,4	1,647	0	5,00	16,9	4,1	21,0	-24,8	1,68	72,9
KS8	97	16,2	1,600	0	5,60	10,5	1,6	12,1	-22,1	1,43	71,8
KS9	89	15,8	1,593	0	5,50	9,9	2,5	12,4	-22,0	1,63	70,3
KS10	97	16,4	1,074	4,4	4,91	17,3	3,9	21,2	-16,3	1,83	62,5
KS11	95	18,4	1,332	1,2	4,85	17,8	4,8	22,6	-17,7	1,52	64,3
KS12	96	18,1	1,054	6,2	4,47	27,3	7,7	35,0	-20,9	1,49	65,0
KS13	97	17,6	1,164	2,9	5,04	13,4	0,8	14,2	-21,7	1,32	72,1
KS14	96	16,1	1,497	0,4	5,56	11,1	2,1	13,2	-20,3	1,59	70,1
KS15	86	18,2	1,046	0,3	4,78	14,7	3,4	18,1	-20,4	1,28	71,8
$\bar{X} \pm SD$	94 $\pm$ 5	16,8 $\pm$ 1,3	1,316 $\pm$ 0,242	1,6 $\pm$ 2,3	5,05 $\pm$ 0,40	15,1 $\pm$ 4,8	3,6 $\pm$ 1,9	18,6 $\pm$ 6,5	-20,6 $\pm$ 2,6	1,54 $\pm$ 0,15	68,8 $\pm$ 3,3
$X_{\min}$	85	14,3	0,939	0	4,47	8,0	0,8	9,3	-24,8	1,28	62,5
$X_{\max}$	98	19,1	1,647	6,2	5,86	27,3	7,7	35,0	-15,6	1,83	72,9

Tablica 9 Fizikalno-kemijski parametri meda kadulje

Oznaka uzorka	Udio peludi kadulje [%]	Udio vode [%]	Električna provodnost [mS/cm]	Udio HMF [mg/kg]	pH	Slobodna kiselost [mEq/1000g]	Laktonska kiselost [mEq/1000g]	Ukupna kiselost [mEq/1000g]	Specifična rotacija $[\alpha]_D^{20}$	F/G	F + G [%]
KD1	12	17,4	0,265	2,6	3,97	19,5	5,6	25,1	-18,5	1,32	70,4
KD2	22	17,8	0,221	2,0	4,01	15,4	4,6	20,0	-17,6	1,20	72,8
KD3	16	16,7	0,321	2,1	3,98	23,4	7,8	31,2	-16,2	1,22	71,1
KD4	11	16,2	0,303	2,0	4,04	22,9	8,0	30,9	-16,9	1,29	75,9
KD5	14	15,8	0,386	1,4	4,16	22,3	6,6	28,9	-14,9	1,27	69,9
KD6	19	16,2	0,236	8,7	3,86	24,1	10,6	34,7	-15,1	1,46	67,2
KD7	38	16,1	0,278	4,6	4,03	21,9	8,2	30,1	-17,4	1,50	67,7
KD8	29	15,3	0,315	3,2	3,86	24,3	6,3	30,6	-17,1	1,56	74,4
KD9	27	15,7	0,279	7,7	3,83	28,5	6,0	34,5	-18,2	1,25	78,3
KD10	11	15,8	0,318	1,9	4,01	26,0	6,0	32,0	-18,6	1,28	78,7
$\bar{X} \pm SD$	20 $\pm$ 9	16,3 $\pm$ 0,8	0,292 $\pm$ 0,048	3,6 $\pm$ 2,6	3,98 $\pm$ 0,10	22,8 $\pm$ 3,6	7,0 $\pm$ 1,7	29,8 $\pm$ 4,4	-17,3 $\pm$ 1,3	1,34 $\pm$ 0,13	72,6 $\pm$ 4,1
$X_{min}$	11	15,3	0,221	1,4	3,83	15,4	4,6	20,0	-18,6	1,20	67,2
$X_{max}$	38	17,8	0,386	8,7	4,16	28,5	10,6	34,7	-14,9	1,56	78,7

Tablica 10 Fizikalno-kemijski parametri meda bagrema

Oznaka uzorka	Udio peludi bagrema [%]	Udio vode [%]	Električna provodnost [mS/cm]	Udio HMF [mg/kg]	pH	Slobodna kiselost [mEq/1000g]	Laktonska kiselost [mEq/1000g]	Ukupna kiselost [mEq/1000g]	Specifična rotacija $[\alpha]_D^{20}$	F/G	F + G [%]
B1	25	16,2	0,116	0	4,02	10,0	2,7	12,7	-15,1	1,60	70,3
B2	38	15,7	0,119	0	3,86	11,4	4,4	15,8	-9,0	1,62	68,7
B3	55	17,6	0,119	0,9	3,87	11,2	2,4	13,6	-16,4	1,47	72,0
B4	22	16,9	0,161	2,4	3,88	14,0	5,7	19,7	-13,9	1,50	70,9
B5	73	15,8	0,100	0	3,83	11,3	2,5	13,8	-9,0	1,61	68,6
B6	54	16,0	0,107	0,6	3,76	10,8	0,3	11,1	-14,1	1,61	71,7
B7	47	16,2	0,125	1,1	3,98	12,3	0,6	12,9	-16,4	1,74	67,7
B8	58	15,1	0,110	0,4	3,98	10,7	1,1	11,8	-15,6	1,71	68,3
B9	64	14,6	0,100	0,4	3,96	10,7	2,2	12,9	-13,7	1,69	67,9
B10	22	19,9	0,121	2,4	3,90	11,1	3,6	14,7	-11,6	1,52	70,0
$\bar{X} \pm SD$	46 $\pm$ 18	16,4 $\pm$ 1,4	0,118 $\pm$ 0,017	0,8 $\pm$ 0,9	3,90 $\pm$ 0,08	11,4 $\pm$ 1,1	2,6 $\pm$ 1,7	13,9 $\pm$ 2,4	-13,5 $\pm$ 2,8	1,61 $\pm$ 0,09	69,6 $\pm$ 1,6
$X_{\min}$	22	14,6	0,100	0	3,76	10,0	0,3	11,1	-16,4	1,47	67,7
$X_{\max}$	73	19,9	0,161	2,4	4,02	14,0	5,7	19,7	-9,0	1,74	72,0

Tablica 11 Fizikalno-kemijski parametri medljikovca

Oznaka uzorka	Elementi medljike	Udio vode [%]	Električna provodnost [mS/cm]	Udio HMF [mg/kg]	pH	Slobodna kiselost [mEq/1000g]	Laktonska kiselost [mEq/1000g]	Ukupna kiselost [mEq/1000g]	Specifična rotacija $[\alpha]_D^{20}$	F/G	F + G [%]
MD1	DA	16,0	1,171	0	5,15	21,8	1,3	23,1	14,2	1,05	59,9
MD2	DA	15,3	1,038	0	4,45	54,2	2,0	56,2	-5,8	1,14	66,3
MD3	DA	18,3	1,134	0	5,34	18,5	2,1	20,6	17,4	1,33	49,0
MD4	DA	15,4	1,594	0	5,25	34,3	1,2	35,5	10,9	1,24	58,5
MD5	DA	13,2	1,139	0,7	5,15	21,4	2,3	23,7	16,3	1,27	55,4
MD6	DA	14,6	1,117	0,5	5,20	21,2	2,3	23,5	22,1	1,25	54,7
MD7	DA	16,2	1,248	0	5,37	21,2	0,3	21,5	24,5	1,03	57,8
MD8	DA	15,5	1,020	0,9	4,92	27,6	4,9	32,5	5,2	1,47	61,9
MD9	DA	15,0	1,279	0,8	5,59	19,3	4,5	23,8	20,0	1,50	54,9
MD10	DA	16,5	1,188	0	5,02	20,3	3,9	24,1	14,2	1,10	57,6
$\bar{X} \pm SD$		15,6 $\pm$ 1,3	1,193 $\pm$ 0,163	0,3 $\pm$ 0,4	5,14 $\pm$ 0,31	26,0 $\pm$ 11,0	2,5 $\pm$ 1,5	28,5 $\pm$ 10,9	13,9 $\pm$ 8,9	1,24 $\pm$ 0,16	57,6 $\pm$ 4,7
$X_{\min}$		13,2	1,020	0	4,45	18,5	0,3	20,6	-5,8	1,03	49,0
$X_{\max}$		18,3	1,594	0,9	5,59	54,2	4,9	56,2	24,5	1,50	66,3

**Tablica 12** Udio proteina, prolina i aktivnost enzima meda kestena

Oznaka uzorka	Udio proteina [mg/100g]	Udio prolina [mg/kg]	Aktivnost dijastaze [DN]	Aktivnost invertaze [U/kg]	Aktivnost glukoza- oksidaze [ $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ ]	Aktivnost kisele fosfataze [mg P/100g meda/24h]
KS1	73,5	390,9	22,0	146,9	197,1	35,7
KS2	96,2	694,2	28,6	163,2	298,2	68,4
KS3	96,3	861,0	26,8	157,3	105,1	58,8
KS4	72,6	591,9	16,9	90,5	308,3	55,2
KS5	81,2	576,1	18,9	116,2	154,7	74,3
KS6	90,1	679,9	28,0	164,9	241,7	82,2
KS7	101,1	916,4	29,9	175,3	217,0	92,3
KS8	101,2	841,5	33,7	207,9	275,4	79,8
KS9	88,5	631,2	19,1	128,9	149,7	72,9
KS10	104,7	798,2	20,1	115,2	109,2	112,9
KS11	111,7	690,9	24,5	170,1	334,6	88,1
KS12	122,6	651,1	35,5	212,8	517,9	127,3
KS13	89,7	584,7	21,5	100,8	116,2	83,1
KS14	102,0	899,0	33,5	158,6	142,3	99,7
KS15	91,2	678,5	28,3	219,6	377,6	125,5
$\bar{X}\pm\text{SD}$	94,8 $\pm$ 13,4	699,0 $\pm$ 142,9	25,8 $\pm$ 5,9	155,2 $\pm$ 39,7	236,3 $\pm$ 117,2	83,7 $\pm$ 25,4
$X_{\min}$	72,6	390,9	16,9	90,5	105,1	35,7
$X_{\max}$	122,6	916,4	35,5	219,6	517,9	127,3

**Tablica 13** Udio proteina, prolina i aktivnost enzima meda kadulje

Oznaka uzorka	Udio proteina [mg/100g]	Udio prolina [mg/kg]	Aktivnost dijastaze [DN]	Aktivnost invertaze [U/kg]	Aktivnost glukoza- oksidaze [ $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ ]	Aktivnost kisele fosfataze [mg P/100g meda/24h]
KD1	70,7	176,5	17,4	86,2	187,4	34,4
KD2	53,5	192,1	9,8	60,5	108,6	37,4
KD3	67,8	318,0	18,3	107,6	247,0	39,3
KD4	73,0	279,6	21,8	76,5	185,6	46,3
KD5	81,0	369,9	20,3	131,8	389,4	79,2
KD6	85,4	338,2	14,6	26,4	122,3	51,4
KD7	82,3	304,9	12,4	64,6	219,6	59,2
KD8	91,4	670,5	28,3	145,6	362,3	29,7
KD9	82,2	375,0	26,9	48,0	196,8	20,9
KD10	104,2	438,2	29,5	199,5	486,2	34,7
$\bar{X}\pm\text{SD}$	79,2 $\pm$ 13,9	346,3 $\pm$ 139,3	19,9 $\pm$ 6,8	94,7 $\pm$ 52,1	250,5 $\pm$ 122,9	43,3 $\pm$ 16,7
$X_{\min}$	53,5	176,5	9,8	26,4	108,6	20,9
$X_{\max}$	104,2	670,5	29,5	199,5	486,2	79,2

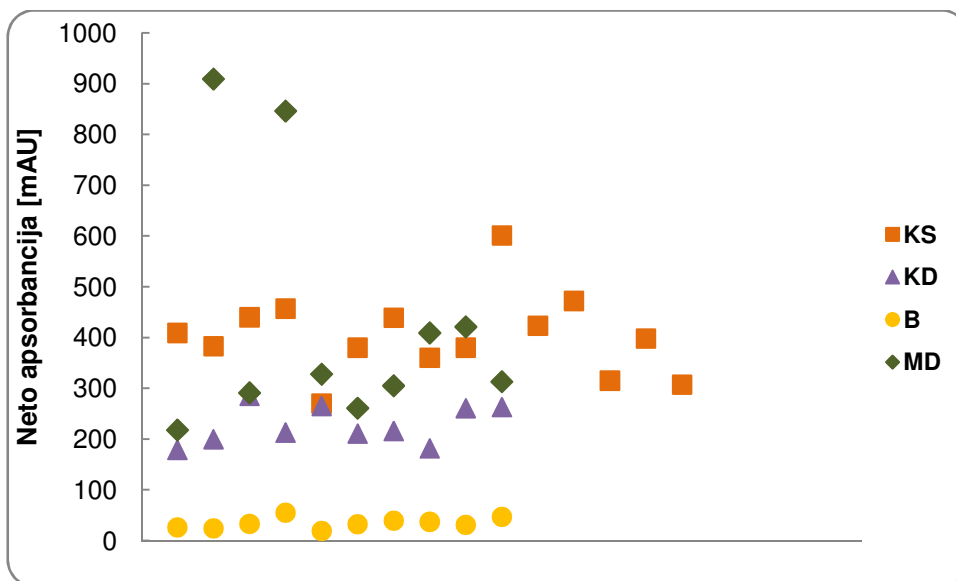
**Tablica 14** Udio proteina, prolina i aktivnost enzima meda bagrema

Oznaka uzorka	Udio proteina [mg/100g]	Udio prolina [mg/kg]	Aktivnost dijastaze [DN]	Aktivnost invertaze [U/kg]	Aktivnost glukoza- oksidaze [ $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ ]	Aktivnost kisele fosfataze [mg P/100g meda/24h]
B1	43,2	167,3	12,9	75,4	28,2	98,9
B2	39,7	174,7	13,9	39,5	28,2	83,9
B3	28,3	169,3	7,5	40,1	1,5	101,1
B4	39,9	200,7	13,7	91,2	144,0	90,3
B5	30,7	127,1	12,7	41,6	28,2	90,3
B6	21,1	151,5	10,3	67,2	18,2	179,1
B7	30,4	134,2	10,0	63,1	85,7	112,0
B8	23,7	151,8	9,0	40,0	29,3	104,2
B9	23,0	144,6	11,5	28,4	23,4	146,4
B10	24,3	148,7	10,5	34,0	16,0	81,5
$\bar{X}\pm\text{SD}$	30,4 $\pm$ 7,9	157,0 $\pm$ 21,5	11,2 $\pm$ 2,1	52,1 $\pm$ 20,7	40,3 $\pm$ 42,5	108,8 $\pm$ 30,9
$X_{\min}$	21,1	127,1	7,5	28,4	1,5	81,5
$X_{\max}$	43,2	200,7	13,9	91,2	144,0	179,1

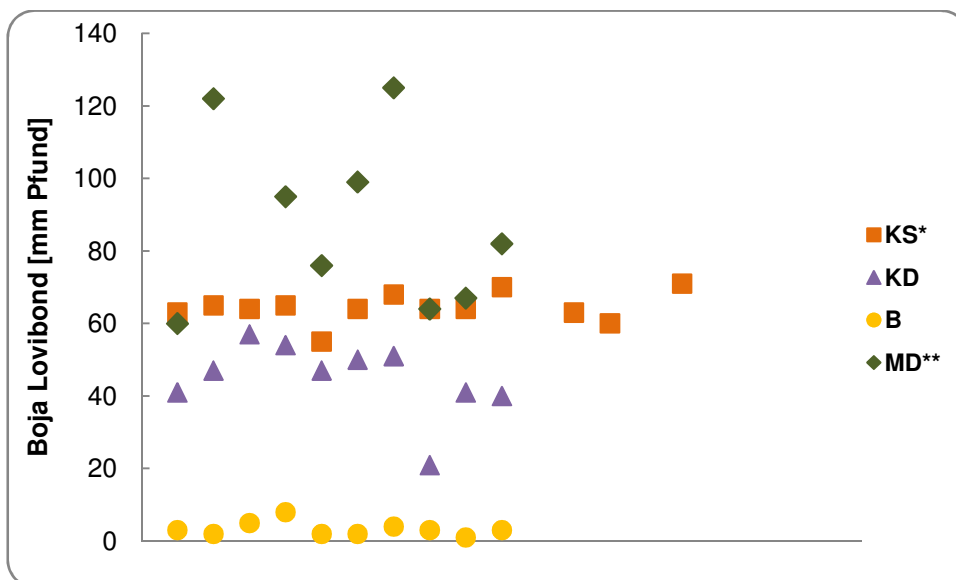
**Tablica 15** Udio proteina, prolina i aktivnost enzima medljikovca

Oznaka uzorka	Udio proteina [mg/100g]	Udio prolina [mg/kg]	Aktivnost dijastaze [DN]	Aktivnost invertaze [U/kg]	Aktivnost glukoza- oksidaze [ $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ ]	Aktivnost kisele fosfataze [mg P/100g meda/24h]
MD1	43,0	347,0	12,8	115,8	357,0	64,3
MD2	90,8	765,8	33,4	223,9	298,7	406,8
MD3	38,0	329,6	16,1	160,8	380,3	81,4
MD4	95,3	1005,8	37,3	277,9	352,4	281,2
MD5	60,3	483,9	19,9	149,9	384,8	176,8
MD6	54,9	418,2	17,6	156,7	431,6	101,5
MD7	30,0	375,1	11,8	121,3	296,8	63,3
MD8	74,8	478,6	26,7	201,1	405,9	58,3
MD9	60,7	291,0	21,7	163,6	253,7	53,4
MD10	46,4	441,7	19,7	189,5	314,8	83,9
$\bar{X}\pm\text{SD}$	59,4 $\pm$ 21,8	493,7 $\pm$ 223,3	21,7 $\pm$ 8,4	176,1 $\pm$ 48,9	347,6 $\pm$ 55,7	137,1 $\pm$ 118,4
$X_{\min}$	30,0	291,0	11,8	115,8	253,7	53,4
$X_{\max}$	95,3	1005,8	37,3	277,9	431,6	406,8





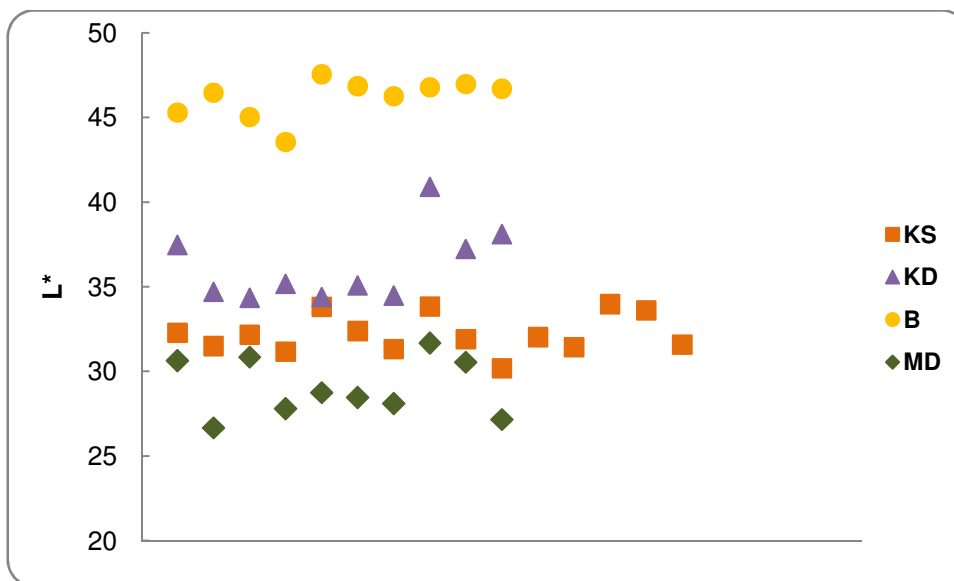
**Slika 8** Boja ispitivanih vrsta meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD)) određena spektrofotometrijski (neto apsorbancija)



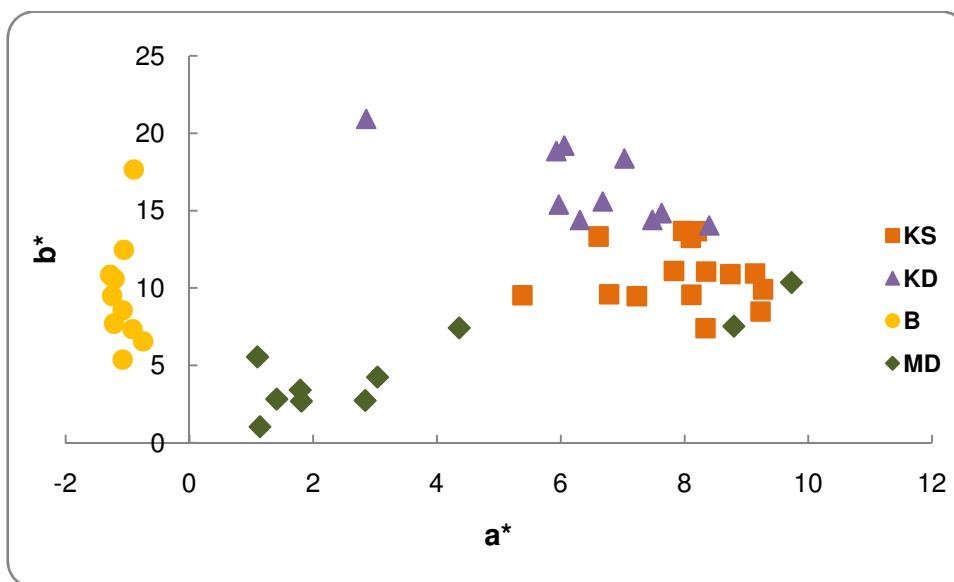
\*određivanje boje provedeno na 13 uzoraka meda kestena

\*\*određivanje boje provedena na 9 uzoraka medljikovca

**Slika 9** Boja ispitivanih vrsta meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD)) određena pomoću Lovibond komparatora



**Slika 10** L\* parametar boje (CIE L\*a\*b\* mjernog sustava) ispitivanih vrsta meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



**Slika 11** a\* i b\* parametri boje (CIE L\*a\*b\* mjernog sustava) ispitivanih vrsta meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))

**Tablica 16** Udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet određen DPPH i FRAP metodama meda kestena

Oznaka uzorka	Udio ukupnih fenola [mg galne kiseline/kg meda]	DPPH IC <sub>50</sub> [mg/mL]	FRAP [μM Fe(II)]
KS1	166,1	17,02	278,3
KS2	149,8	17,25	259,3
KS3	150,3	14,59	256,9
KS4	182,9	13,84	349,3
KS5	130,1	21,36	220,0
KS6	147,4	18,22	260,5
KS7	167,6	15,10	292,9
KS8	171,9	15,09	310,3
KS9	159,4	15,66	289,3
KS10	212,7	11,34	354,3
KS11	163,2	15,43	285,0
KS12	164,6	14,11	301,9
KS13	149,3	17,81	246,7
KS14	186,8	14,87	320,7
KS15	129,2	18,64	216,7
$\bar{X} \pm SD$	162,1 ± 21,6	16,02 ± 2,42	282,8 ± 41,1
$X_{\min}$	129,2	11,34	216,7
$X_{\max}$	212,7	21,36	354,3

**Tablica 17** Udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet određen DPPH i FRAP metodama meda kadulje

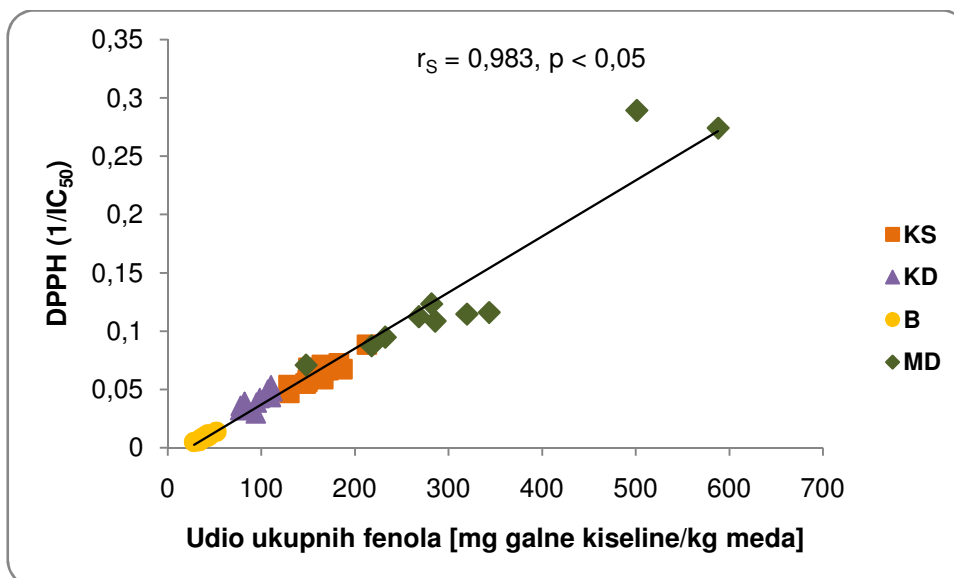
Oznaka uzorka	Udio ukupnih fenola [mg galne kiseline/kg meda]	DPPH IC <sub>50</sub> [mg/mL]	FRAP [μM Fe(II)]
KD1	77,8	27,85	112,9
KD2	77,3	31,16	118,3
KD3	107,1	20,14	197,9
KD4	82,1	25,43	130,5
KD5	110,4	18,65	188,6
KD6	95,1	25,88	140,8
KD7	98,4	23,49	130,8
KD8	94,1	34,08	134,8
KD9	110,4	23,02	183,1
KD10	111,9	20,73	163,1
$\bar{X} \pm SD$	96,5±13,6	25,04±4,92	150,1±30,7
$X_{min}$	77,3	18,65	112,9
$X_{max}$	111,9	34,08	197,9

**Tablica 18** Udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet određen DPPH i FRAP metodama meda bagrema

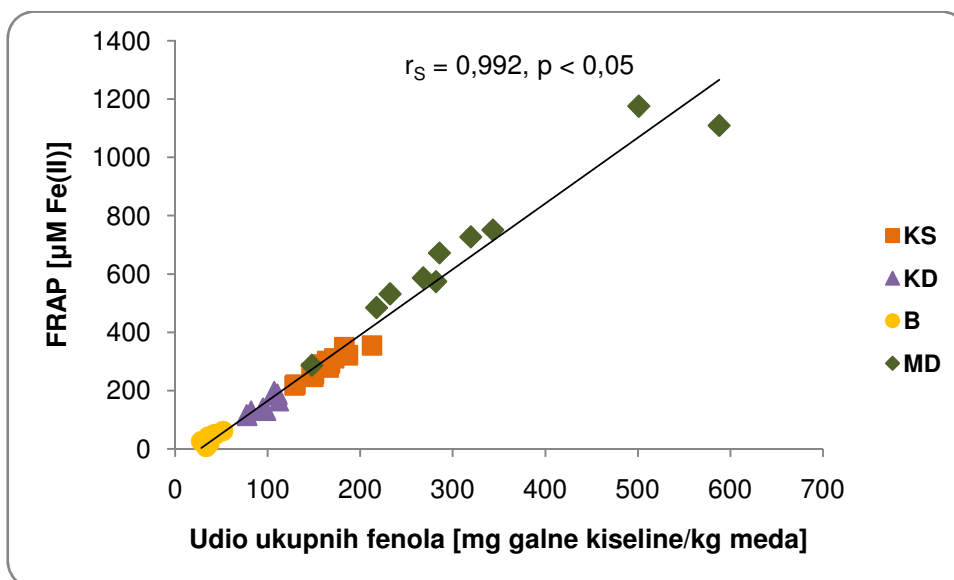
Oznaka uzorka	Udio ukupnih fenola [mg galne kiseline/kg meda]	DPPH IC <sub>50</sub> [mg/mL]	FRAP [μM Fe(II)]
B1	42,5	105,48	50,0
B2	35,8	127,7	41,7
B3	39,7	101,12	44,5
B4	52,0	73,50	61,2
B5	28,2	201,36	25,5
B6	33,8	169,83	14,1
B7	44,9	92,68	51,7
B8	37,2	125,18	18,1
B9	33,8	170,07	6,5
B10	43,0	87,87	47,8
$\bar{X} \pm SD$	39,1±6,8	125,48±42,04	36,1±18,6
X <sub>min</sub>	28,2	73,50	6,5
X <sub>max</sub>	52,0	201,36	61,2

**Tablica 19** Udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet određen DPPH i FRAP metodama medljikovca

Oznaka uzorka	Udio ukupnih fenola [mg galne kiseline/kg meda]	DPPH IC <sub>50</sub> [mg/mL]	FRAP [μM Fe(II)]
MD1	285,7	9,22	671,5
MD2	501,1	3,46	1175,7
MD3	217,7	11,47	483,8
MD4	343,4	8,63	750,7
MD5	232,3	10,57	531,0
MD6	268,2	8,92	586,0
MD7	319,6	8,74	726,8
MD8	281,8	8,12	573,3
MD9	588,0	3,65	1109,1
MD10	147,8	14,14	286,0
$\bar{X} \pm SD$	318,6 ± 132,6	8,69 ± 3,24	689,4 ± 273,3
$X_{\min}$	147,8	3,46	286,0
$X_{\max}$	588,0	14,14	1175,7



**Slika 12** Korelacija između udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta (DPPH metoda) ispitivanih vrsta meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



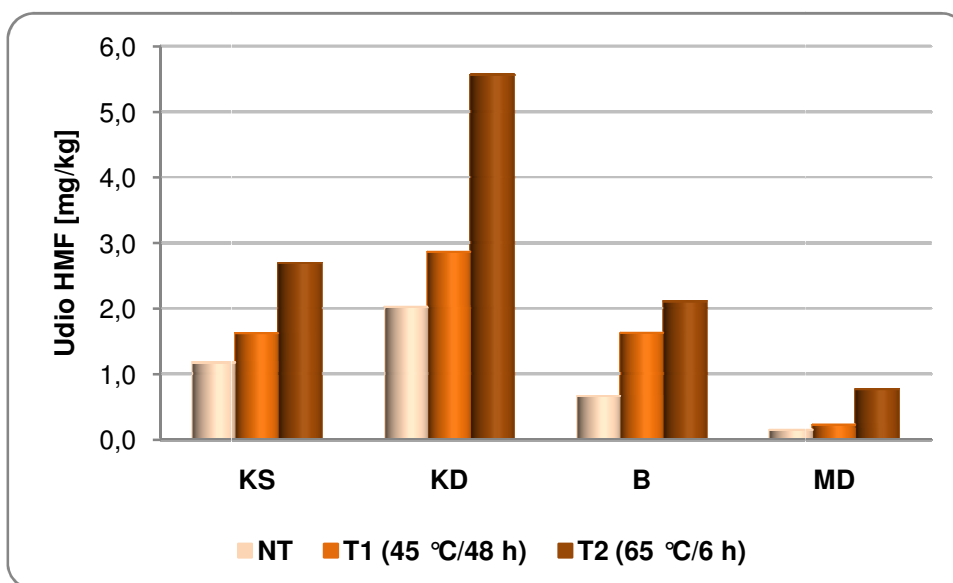
**Slika 13** Korelacija između udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta (FRAP metoda) ispitivanih vrsta meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))

**Tablica 20** Koeficijenti korelacije između antioksidativnog kapaciteta, udjela ukupnih fenola, aktivnosti glukoza-oksidadze, udjela proteina i prolina te boje svih analiziranih uzoraka meda ( $p < 0,05$ )

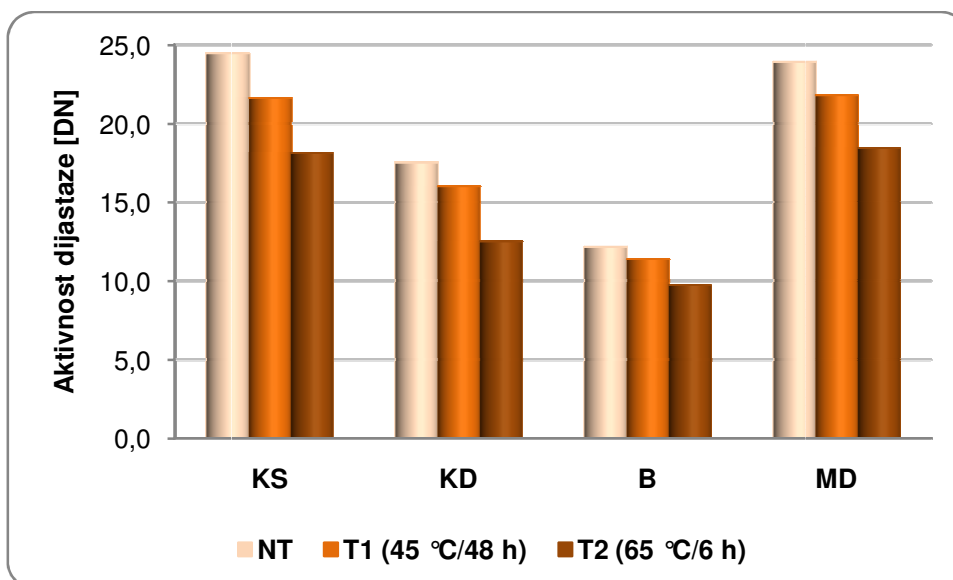
Parametar	Ukupni fenoli	FRAP	DPPH (1/IC <sub>50</sub> )	NA	Boja Lovibond	L*	a*	b*	Udio proteina	Udio prolina	Aktivnost GOX
Ukupni fenoli	1,000										
FRAP	r <sub>P</sub> 0,988 r <sub>S</sub> 0,992	1,000									
DPPH (1/IC <sub>50</sub> )	r <sub>P</sub> 0,975 r <sub>S</sub> 0,983	r <sub>P</sub> 0,966 r <sub>S</sub> 0,985	1,000								
NA	r <sub>P</sub> 0,739 r <sub>S</sub> 0,838	r <sub>P</sub> 0,730 r <sub>S</sub> 0,829	r <sub>P</sub> 0,733 r <sub>S</sub> 0,847	1,000							
Boja Lovibond	r <sub>P</sub> 0,758 r <sub>S</sub> 0,902	r <sub>P</sub> 0,776 r <sub>S</sub> 0,915	r <sub>P</sub> 0,728 r <sub>S</sub> 0,919	r <sub>P</sub> 0,818 r <sub>S</sub> 0,846	1,000						
L*	r <sub>P</sub> -0,719 r <sub>S</sub> -0,921	r <sub>P</sub> -0,719 r <sub>S</sub> -0,940	r <sub>P</sub> -0,683 r <sub>S</sub> -0,947	r <sub>P</sub> -0,812 r <sub>S</sub> -0,816	r <sub>P</sub> -0,956 r <sub>S</sub> -0,969	1,000					
a*	r <sub>P</sub> 0,291* r <sub>S</sub> 0,509	r <sub>P</sub> 0,213* r <sub>S</sub> 0,490	r <sub>P</sub> 0,276* r <sub>S</sub> 0,516	r <sub>P</sub> 0,537 r <sub>S</sub> 0,731	r <sub>P</sub> 0,498 r <sub>S</sub> 0,462	r <sub>P</sub> -0,626 r <sub>S</sub> -0,427	1,000				
b*	r <sub>P</sub> -0,480 r <sub>S</sub> -0,371	r <sub>P</sub> -0,535 r <sub>S</sub> -0,402	r <sub>P</sub> -0,449 r <sub>S</sub> -0,404	r <sub>P</sub> -0,321 r <sub>S</sub> -0,207*	r <sub>P</sub> -0,395 r <sub>S</sub> -0,412	r <sub>P</sub> 0,291* r <sub>S</sub> 0,484	r <sub>P</sub> 0,337 r <sub>S</sub> 0,294	1,000			
Udio proteina	r <sub>P</sub> 0,268* r <sub>S</sub> 0,456	r <sub>P</sub> 0,213* r <sub>S</sub> 0,441	r <sub>P</sub> 0,274* r <sub>S</sub> 0,434	r <sub>P</sub> 0,688 r <sub>S</sub> 0,711	r <sub>P</sub> 0,522 r <sub>S</sub> 0,494	r <sub>P</sub> -0,584 r <sub>S</sub> -0,402	r <sub>P</sub> 0,790 r <sub>S</sub> 0,682	r <sub>P</sub> 0,294 r <sub>S</sub> 0,293*	1,000		
Udio prolina	r <sub>P</sub> 0,432 r <sub>S</sub> 0,698	r <sub>P</sub> 0,407 r <sub>S</sub> 0,694	r <sub>P</sub> 0,387 r <sub>S</sub> 0,681	r <sub>P</sub> 0,807 r <sub>S</sub> 0,854	r <sub>P</sub> 0,655 r <sub>S</sub> 0,768	r <sub>P</sub> -0,660 r <sub>S</sub> -0,684	r <sub>P</sub> 0,564 r <sub>S</sub> 0,602	r <sub>P</sub> -0,109* r <sub>S</sub> -0,052*	r <sub>P</sub> 0,816 r <sub>S</sub> 0,854	1,000	
Aktivnost GOX	r <sub>P</sub> 0,503 r <sub>S</sub> 0,660	r <sub>P</sub> 0,520 r <sub>S</sub> 0,675	r <sub>P</sub> 0,471 r <sub>S</sub> 0,680	r <sub>P</sub> 0,517 r <sub>S</sub> 0,529	r <sub>P</sub> 0,644 r <sub>S</sub> 0,637	r <sub>P</sub> -0,690 r <sub>S</sub> -0,661	r <sub>P</sub> 0,411 r <sub>S</sub> 0,383	r <sub>P</sub> -0,078* r <sub>S</sub> -0,091*	r <sub>P</sub> 0,495 r <sub>S</sub> 0,439	r <sub>P</sub> 0,434 r <sub>S</sub> 0,511	1,000

Koeficijenti korelacije označeni (\*) **nisu** statistički značajni pri  $p < 0,05$ ; r<sub>P</sub> Pearsonov koeficijent korelacije; r<sub>S</sub> Spearmanov koeficijent korelacije  
NA = neto apsorbancija, GOX = glukoza-oksidadza

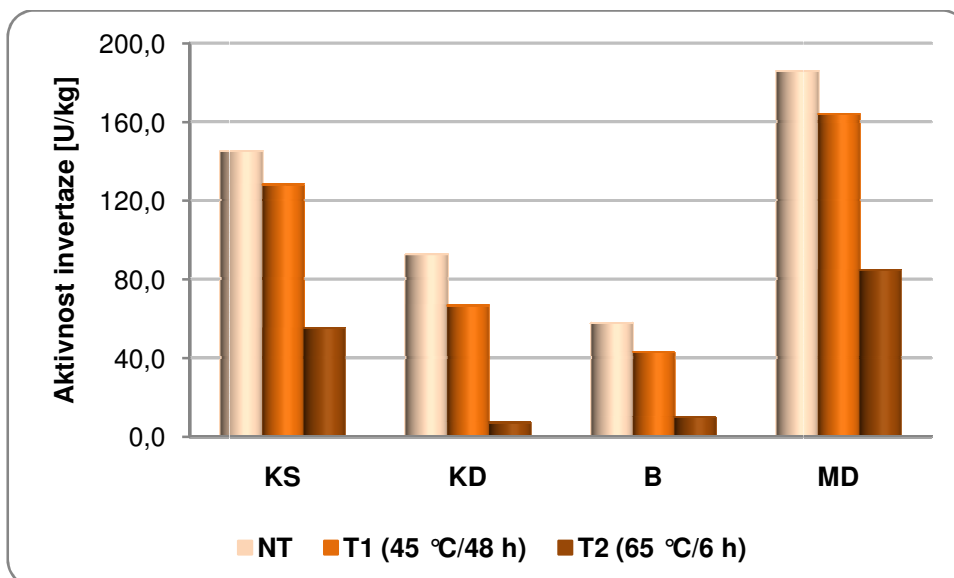




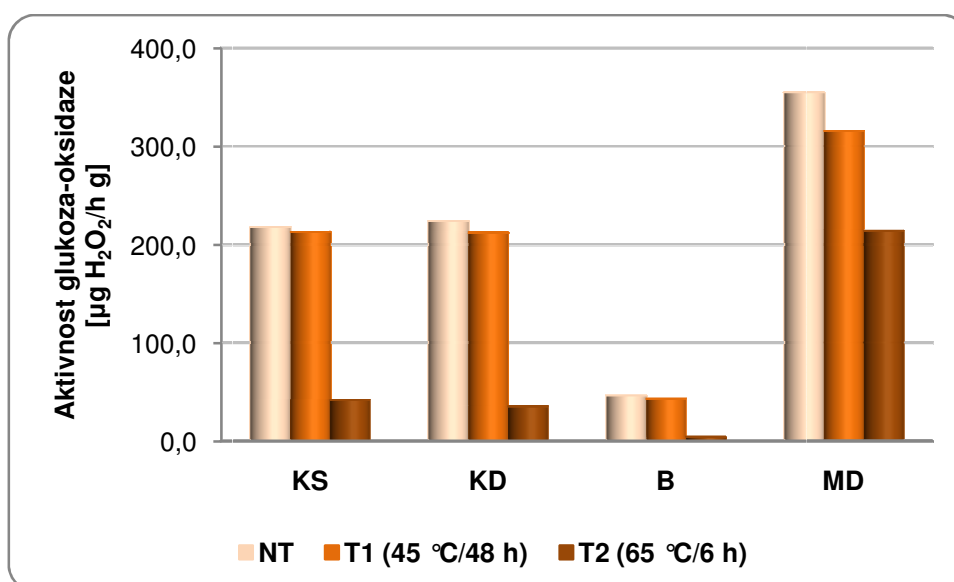
**Slika 14** Promjena udjela HMF-a nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



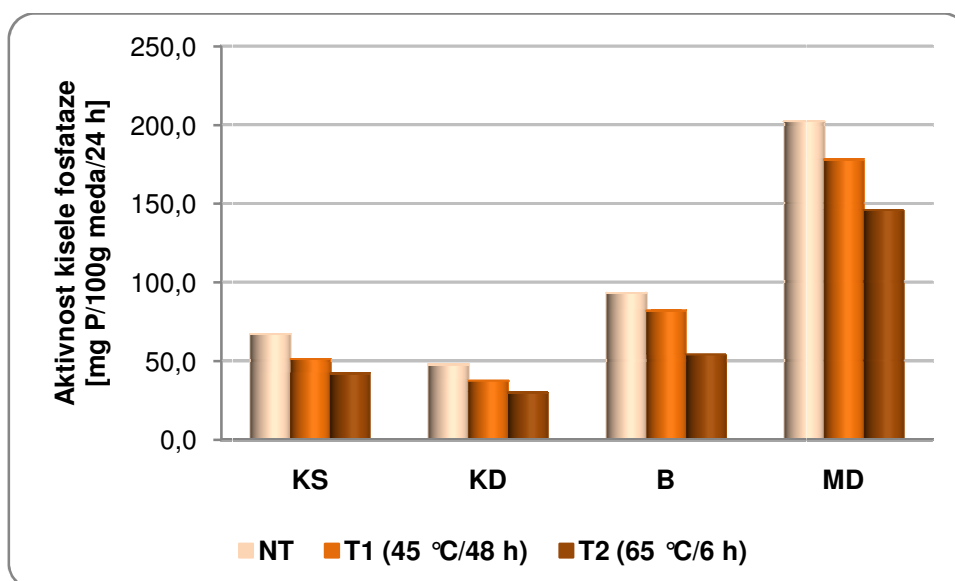
**Slika 15** Promjena aktivnosti dijastaze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



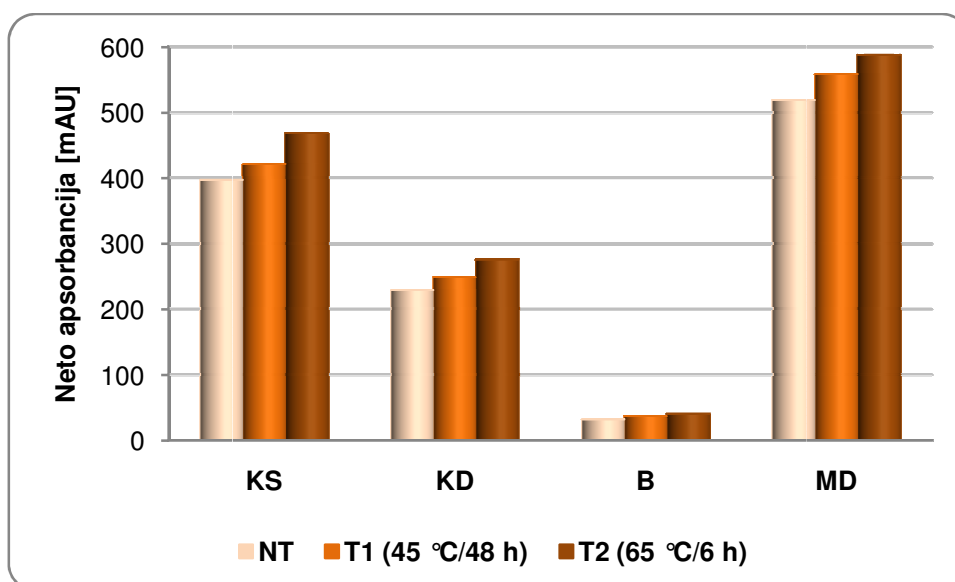
**Slika 16** Promjena aktivnosti invertaze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



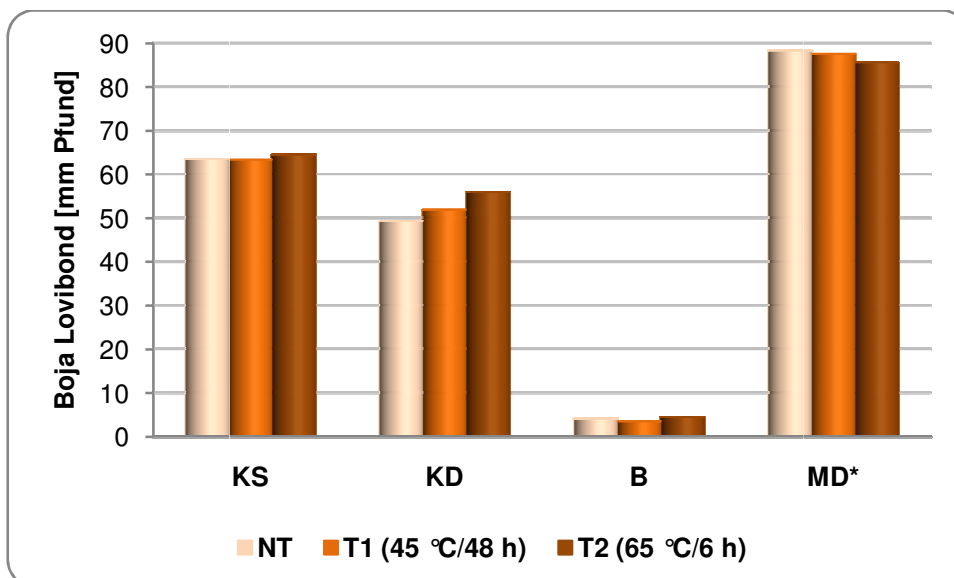
**Slika 17** Promjena aktivnosti glukoza-oksidadze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



**Slika 18** Promjena aktivnosti kisele fosfataze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))

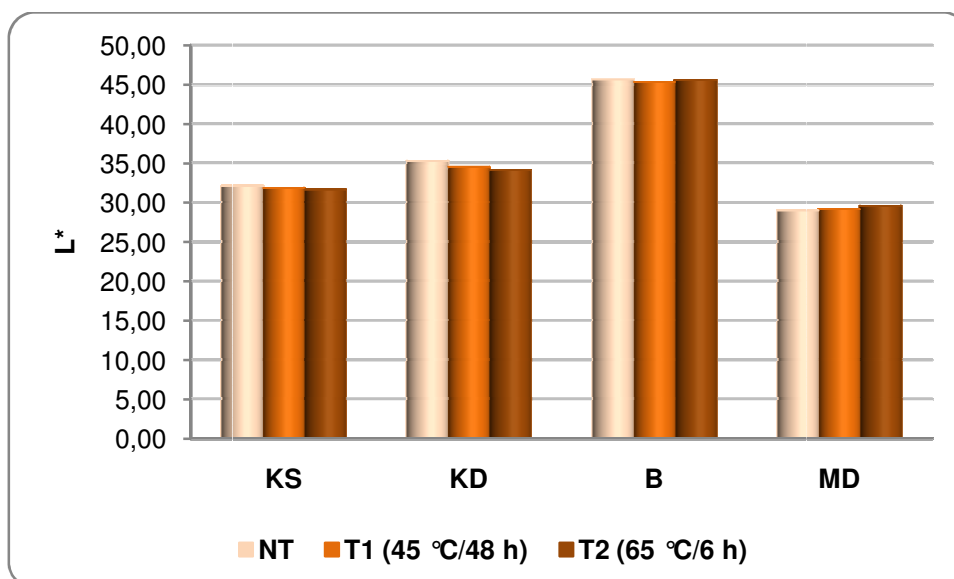


**Slika 19** Promjena boje (neto apsorbancija) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))

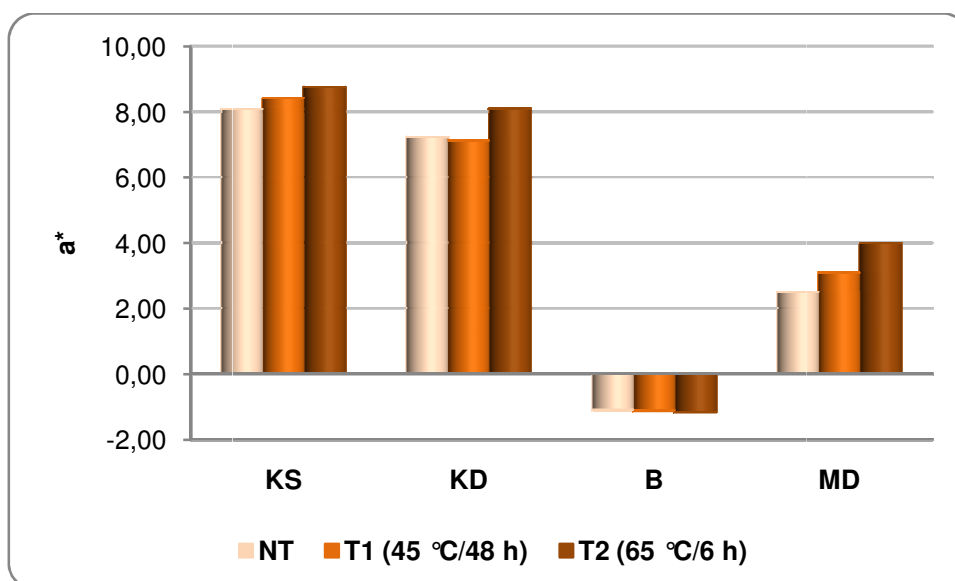


\*prosječna vrijednost dobivena iz rezultata 4 uzorka medljikovca

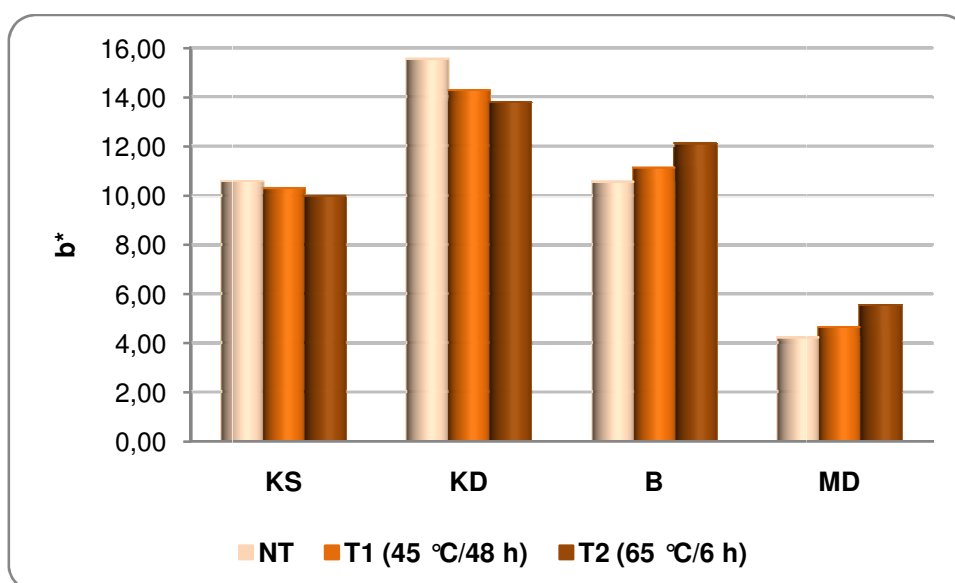
**Slika 20** Promjena boje određene pomoću Lovibond komparatora nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



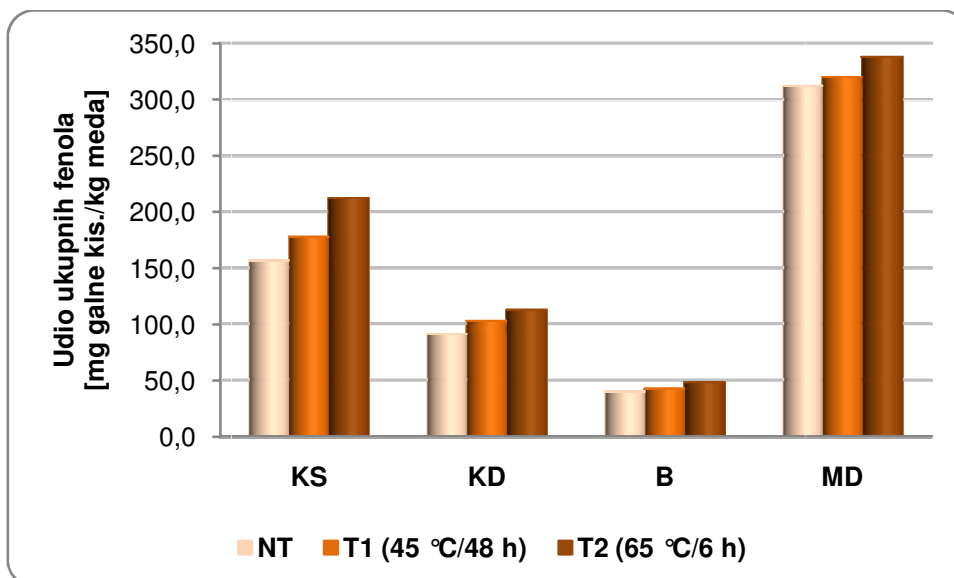
**Slika 21** Promjena L\* parametra boje (CIEL\*a\*b\*) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



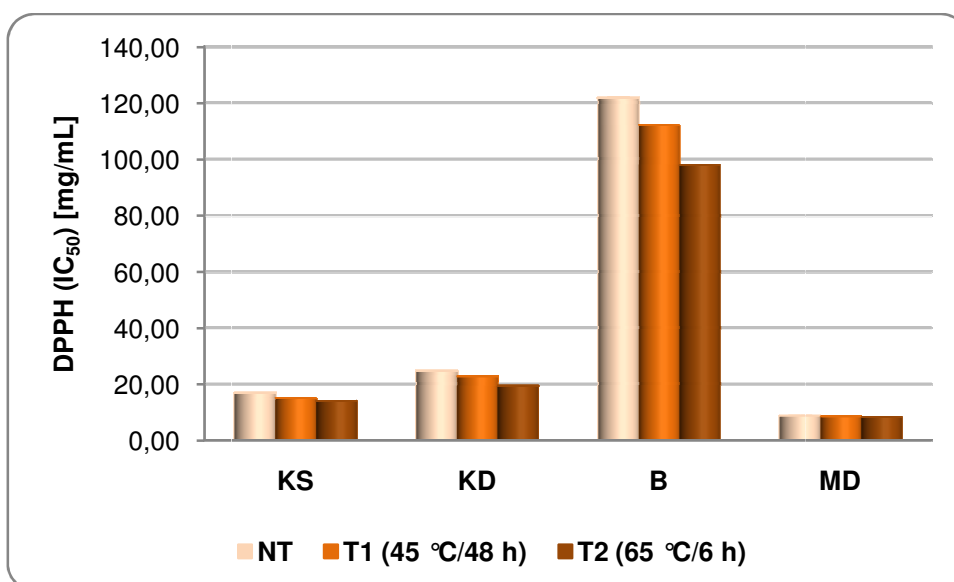
**Slika 22** Promjena  $a^*$  parametra boje (CIEL\* $a^*b^*$ ) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



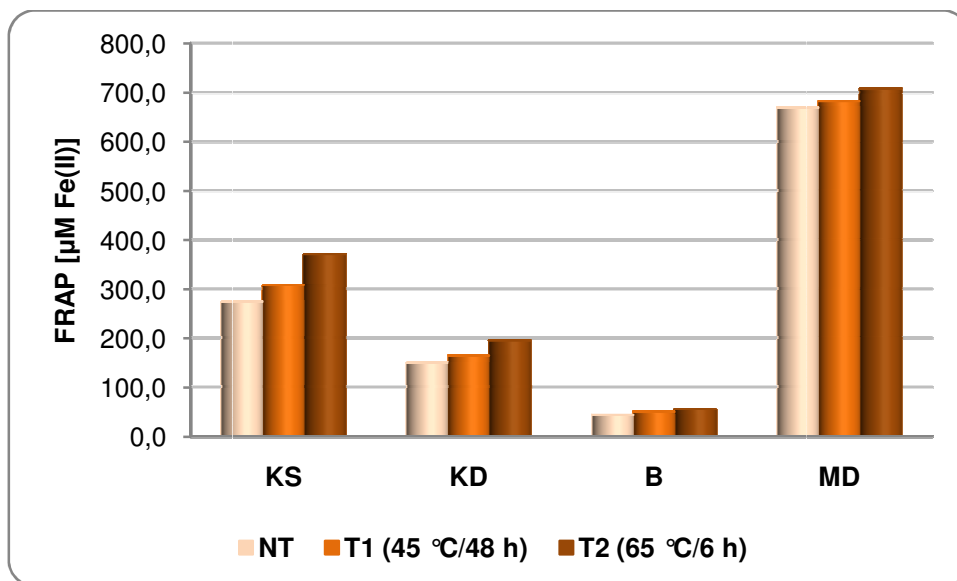
**Slika 23** Promjena  $b^*$  parametra boje (CIEL\* $a^*b^*$ ) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



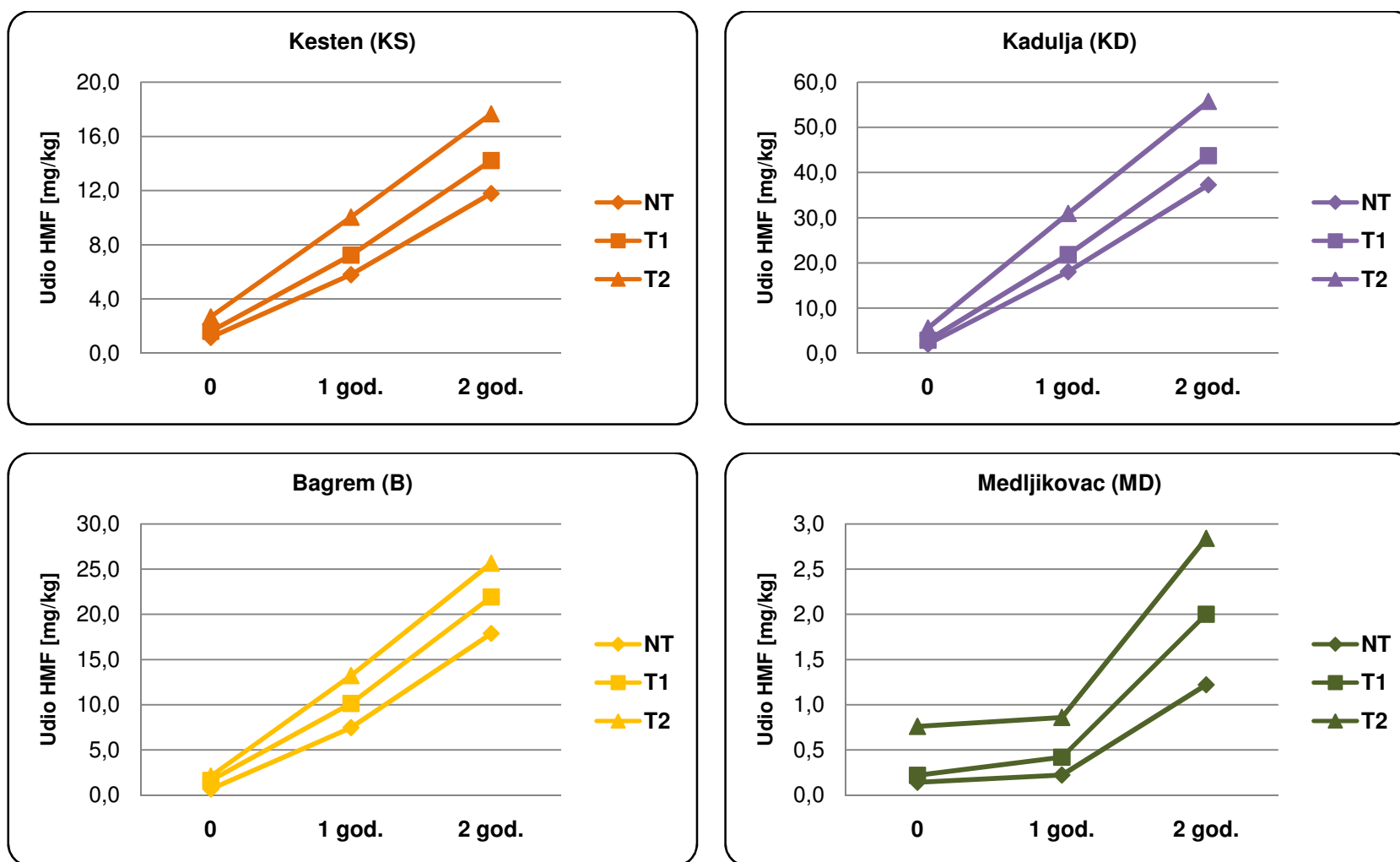
**Slika 24** Promjena udjela ukupnih fenola nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))



**Slika 25** Promjena antioksidativnog kapaciteta (DPPH metoda) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))

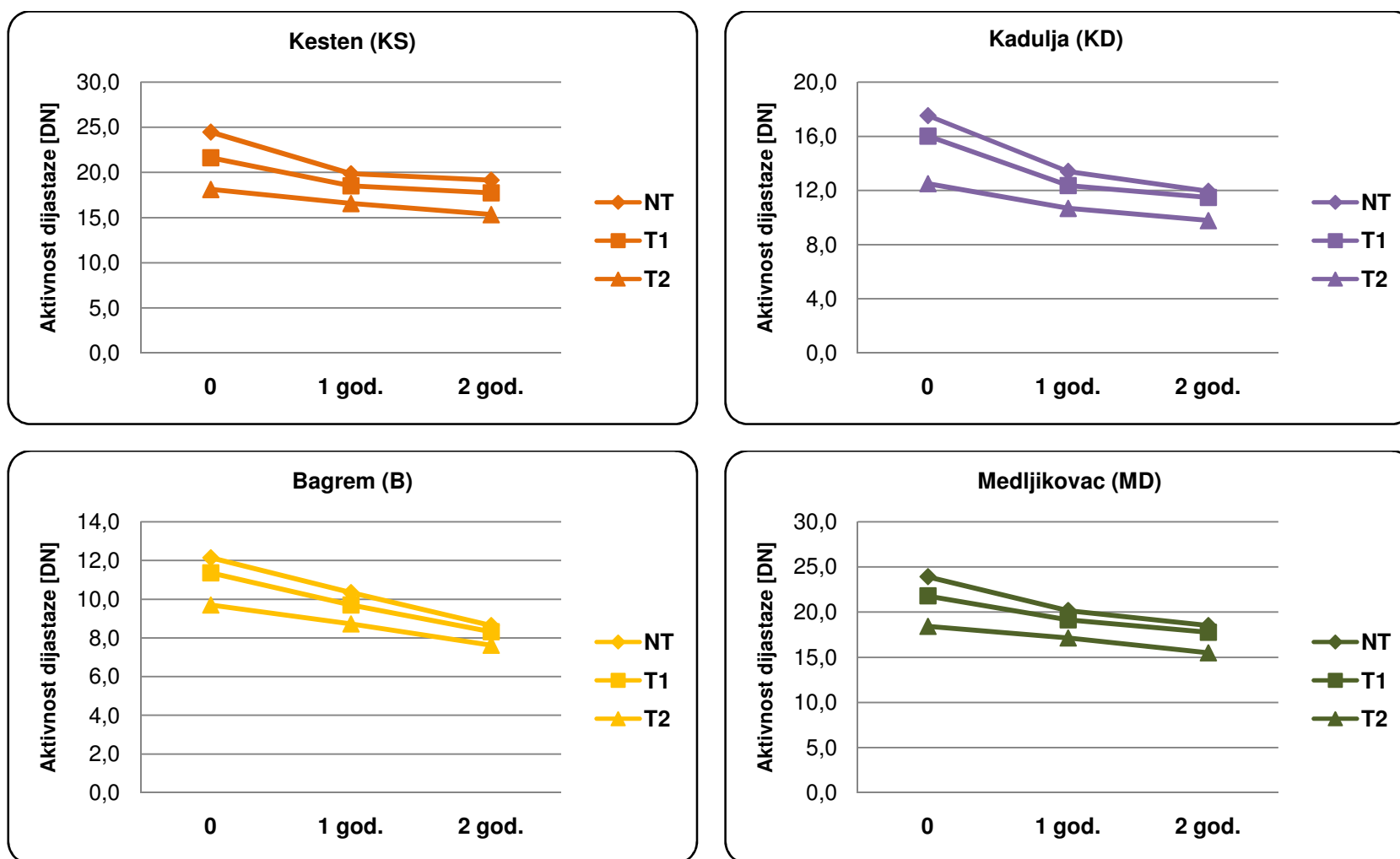


**Slika 26** Promjena antioksidativnog kapaciteta (FRAP metoda) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B), medljikovac (MD))

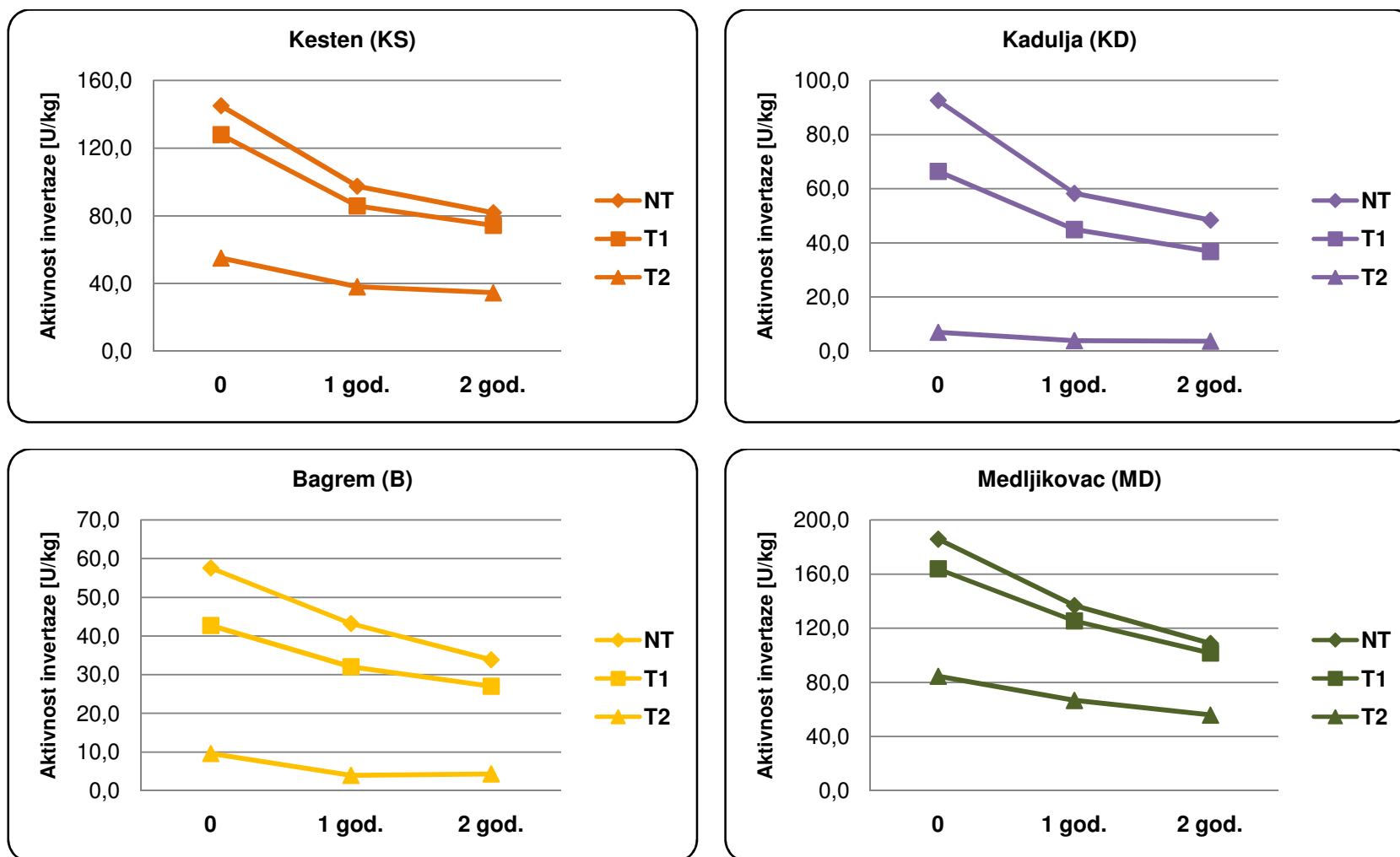


Slika 27 Promjena udjela HMF-a nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

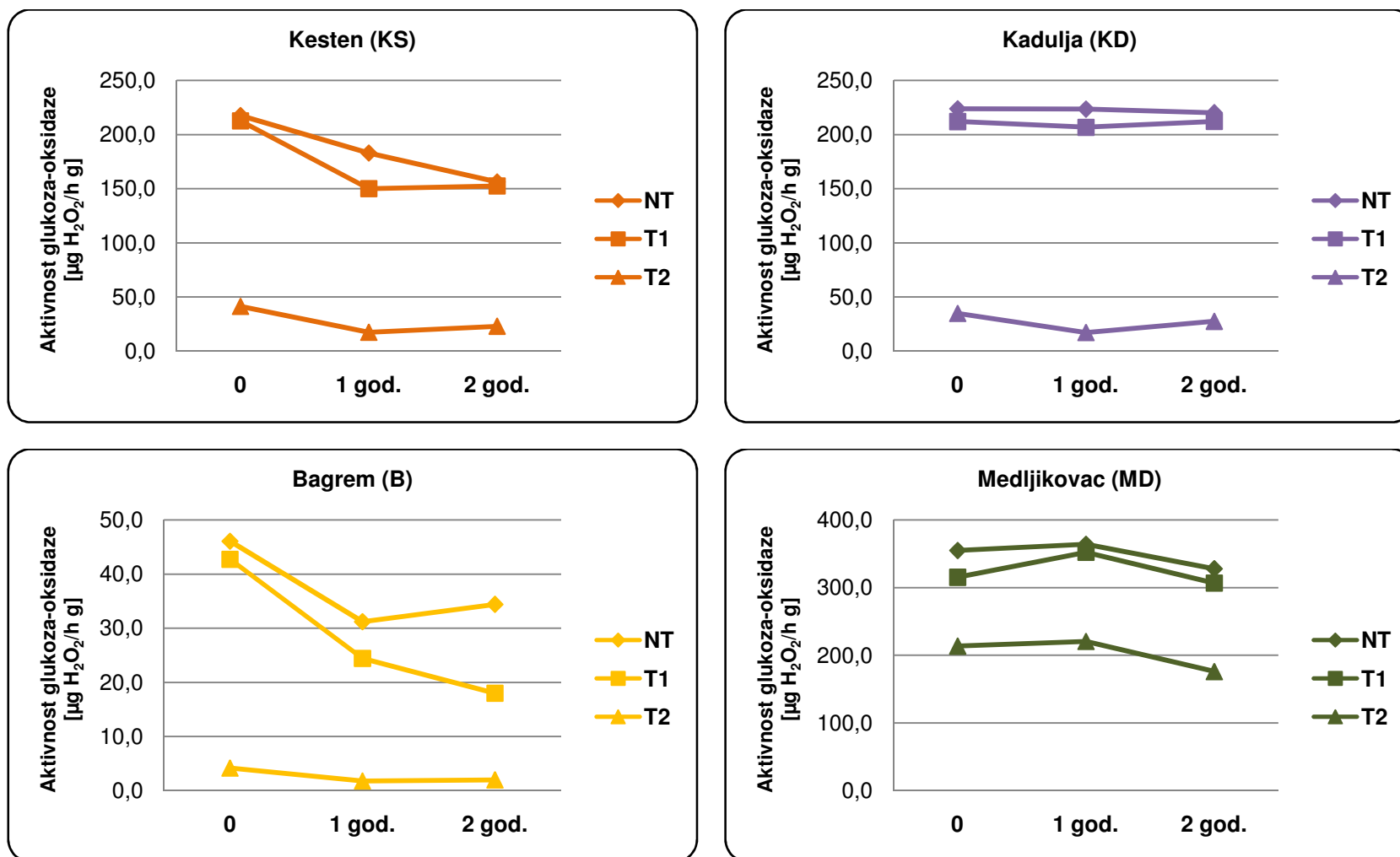




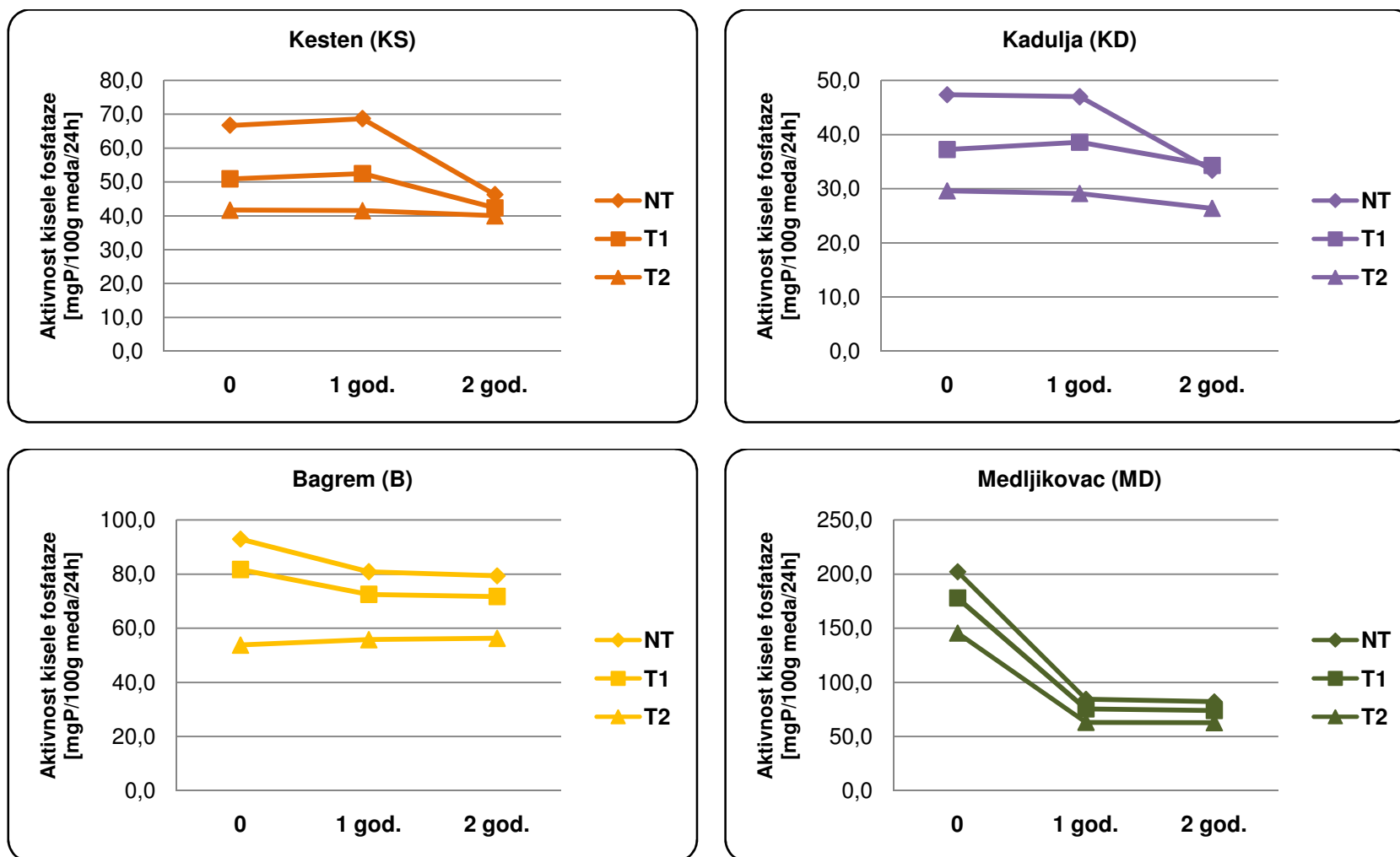
**Slika 28** Promjena aktivnosti dijastaze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem



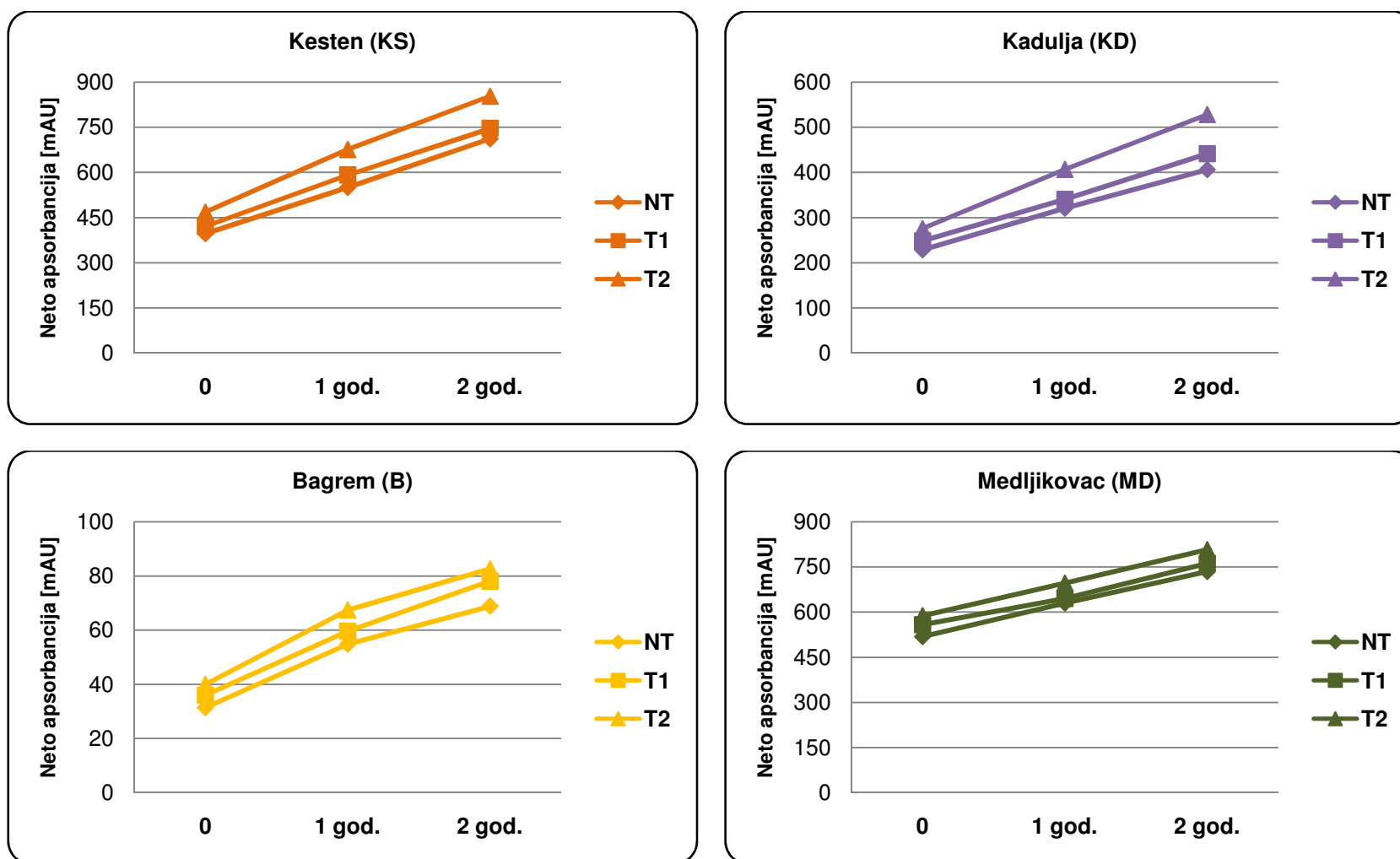
**Slika 29** Promjena aktivnosti invertaze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem



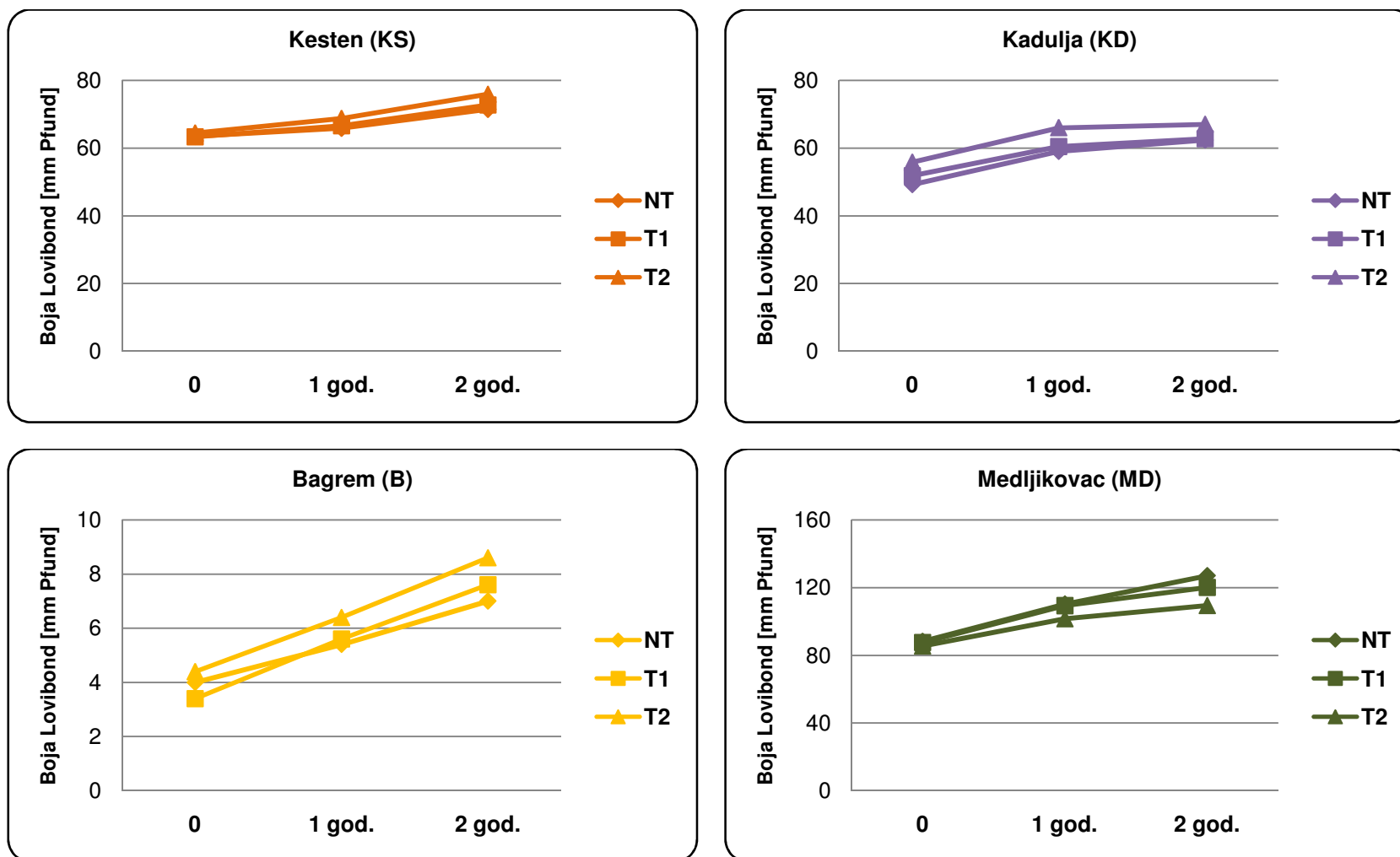
**Slika 30** Promjena aktivnosti glukoza-oksidadze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem



**Slika 31** Promjena aktivnosti kisele fosfataze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

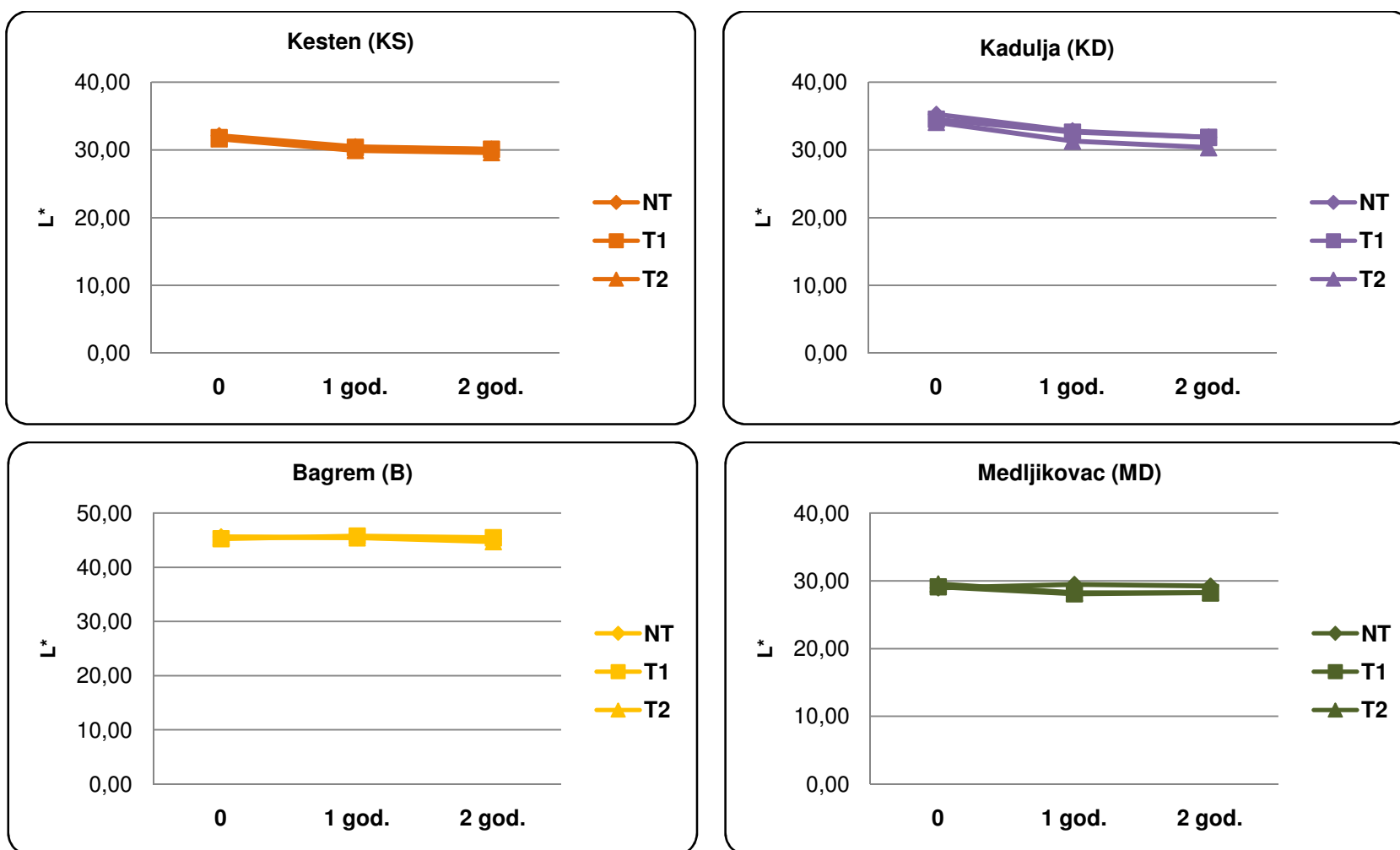


**Slika 32** Promjena boje (neto apsorbancija) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

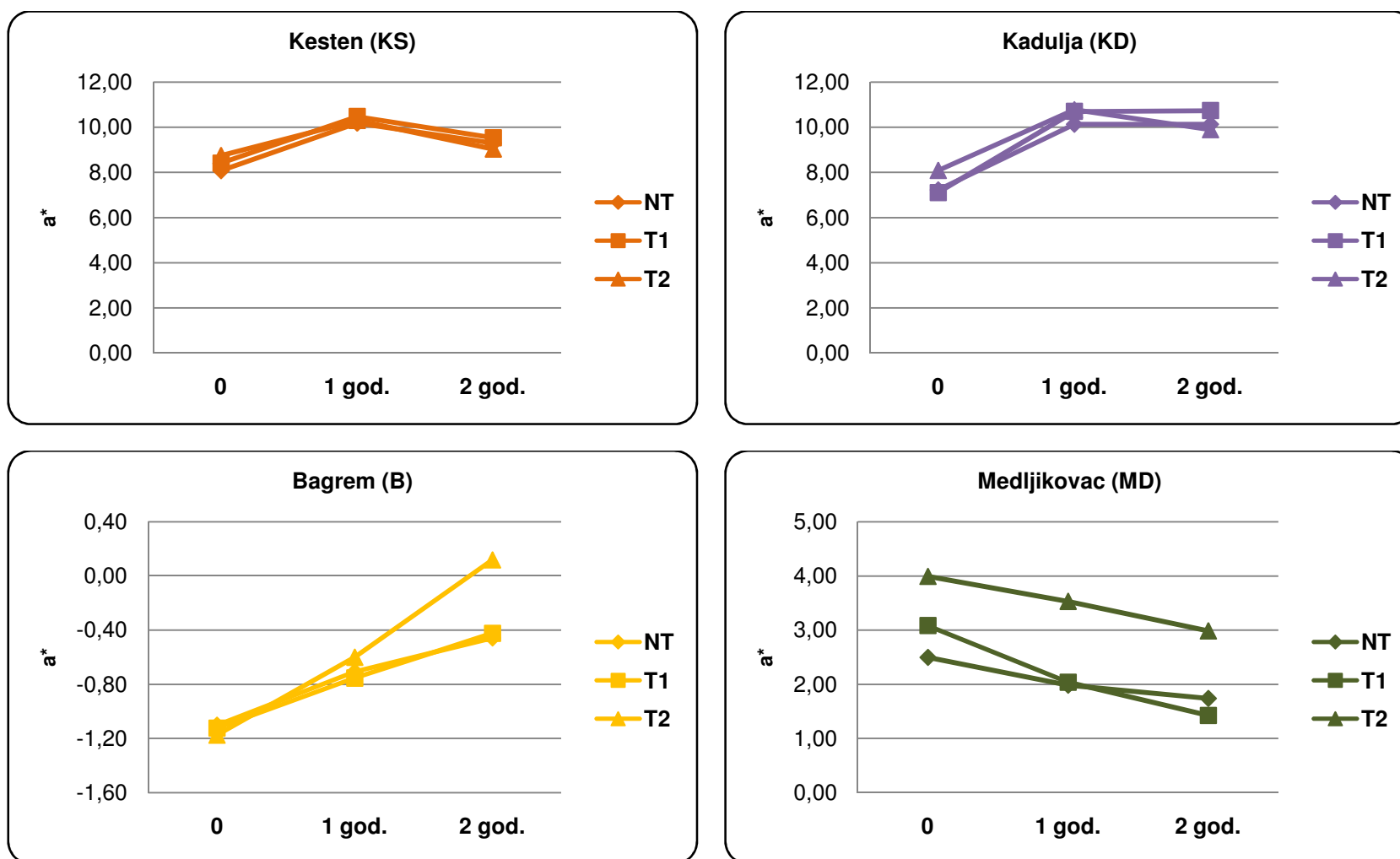


\*prosječne vrijednosti meda kadulje i medljikovca izračunate na osnovi različitog broja uzoraka (Prilog 10)

**Slika 33** Promjena boje određene Lovibond komparatorom nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

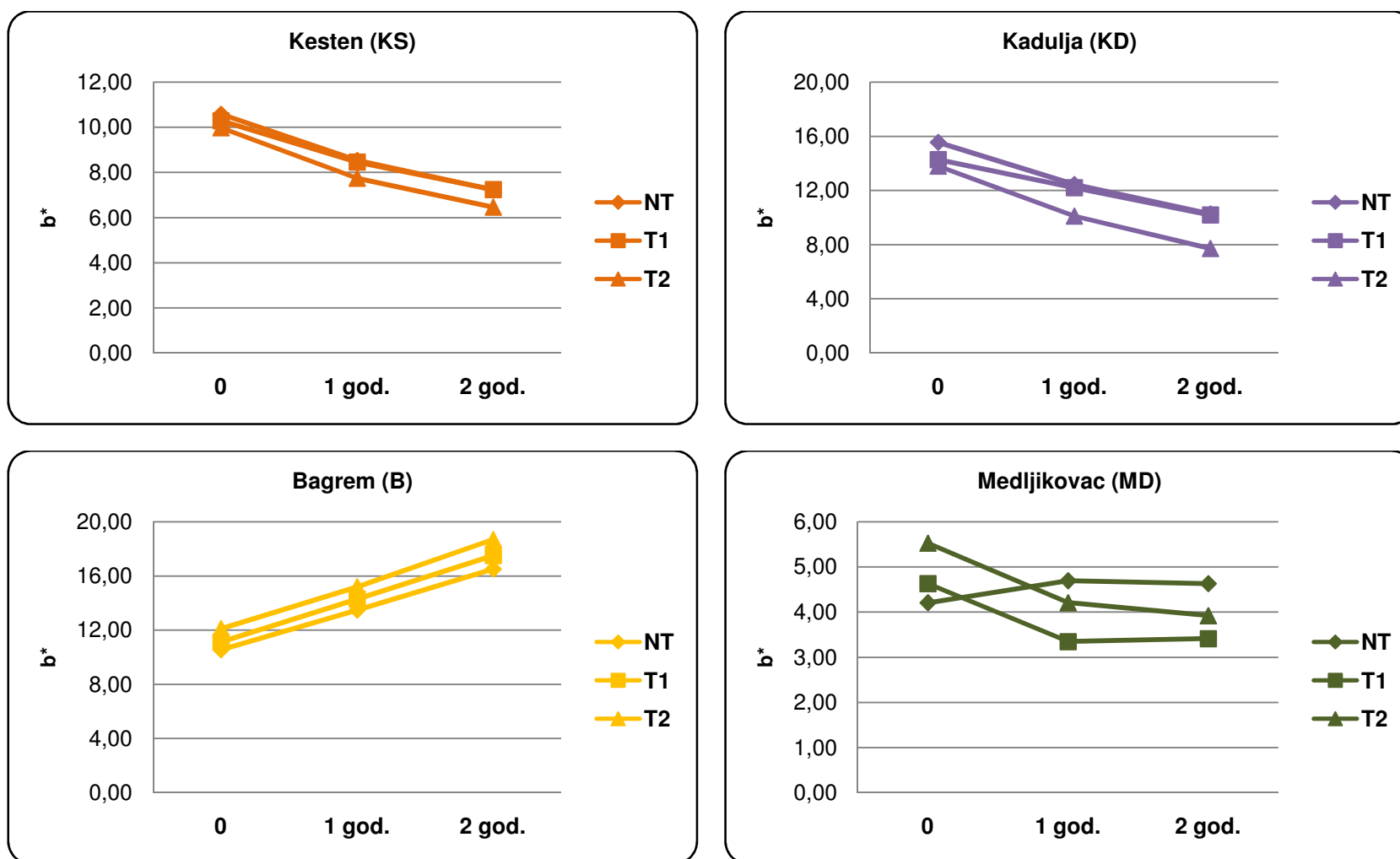


**Slika 34** Promjena  $L^*$  parametra boje (CIE  $L^*a^*b^*$ ) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

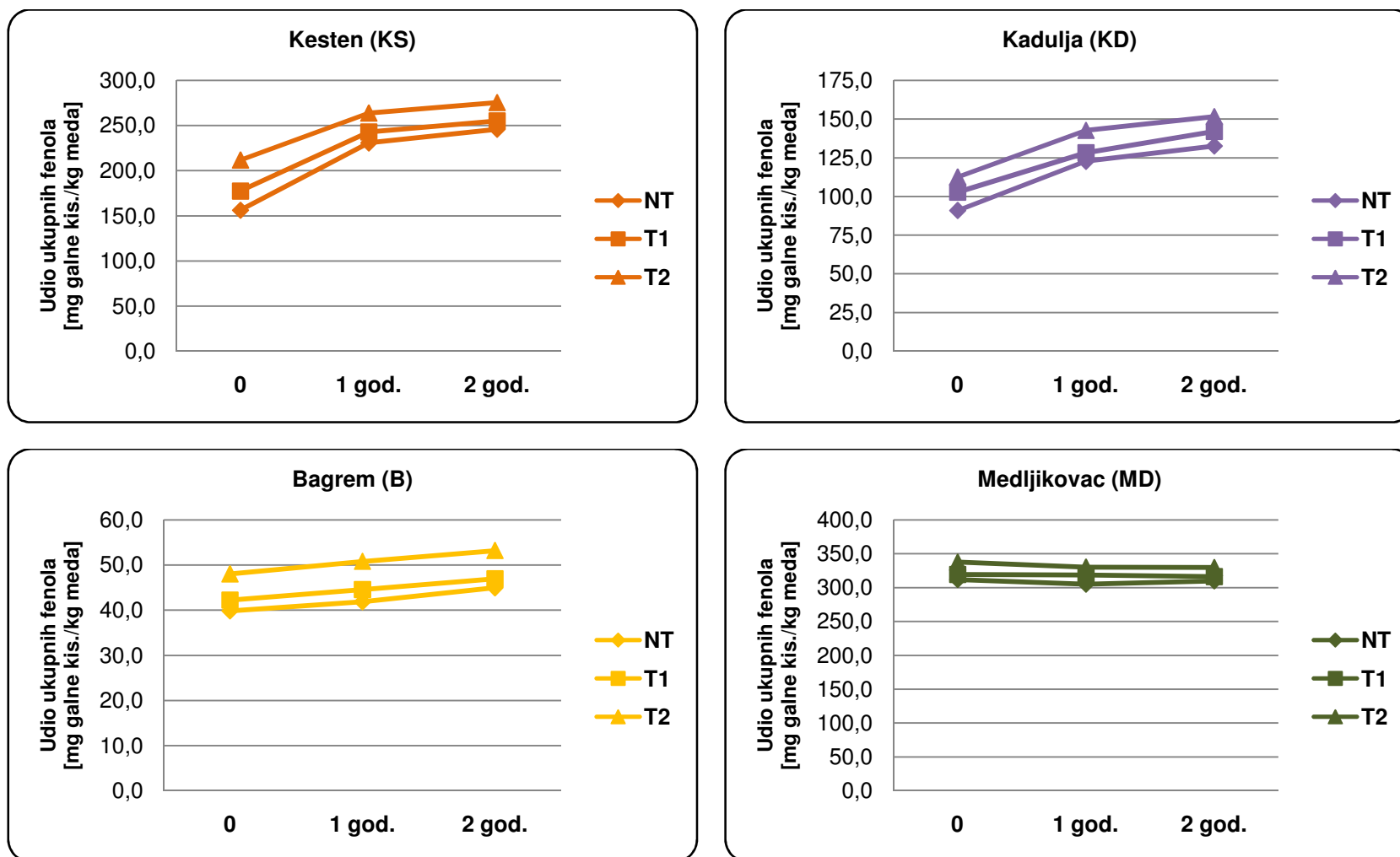


**Slika 35** Promjena  $a^*$  parametra boje (CIE  $L^*a^*b^*$ ) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

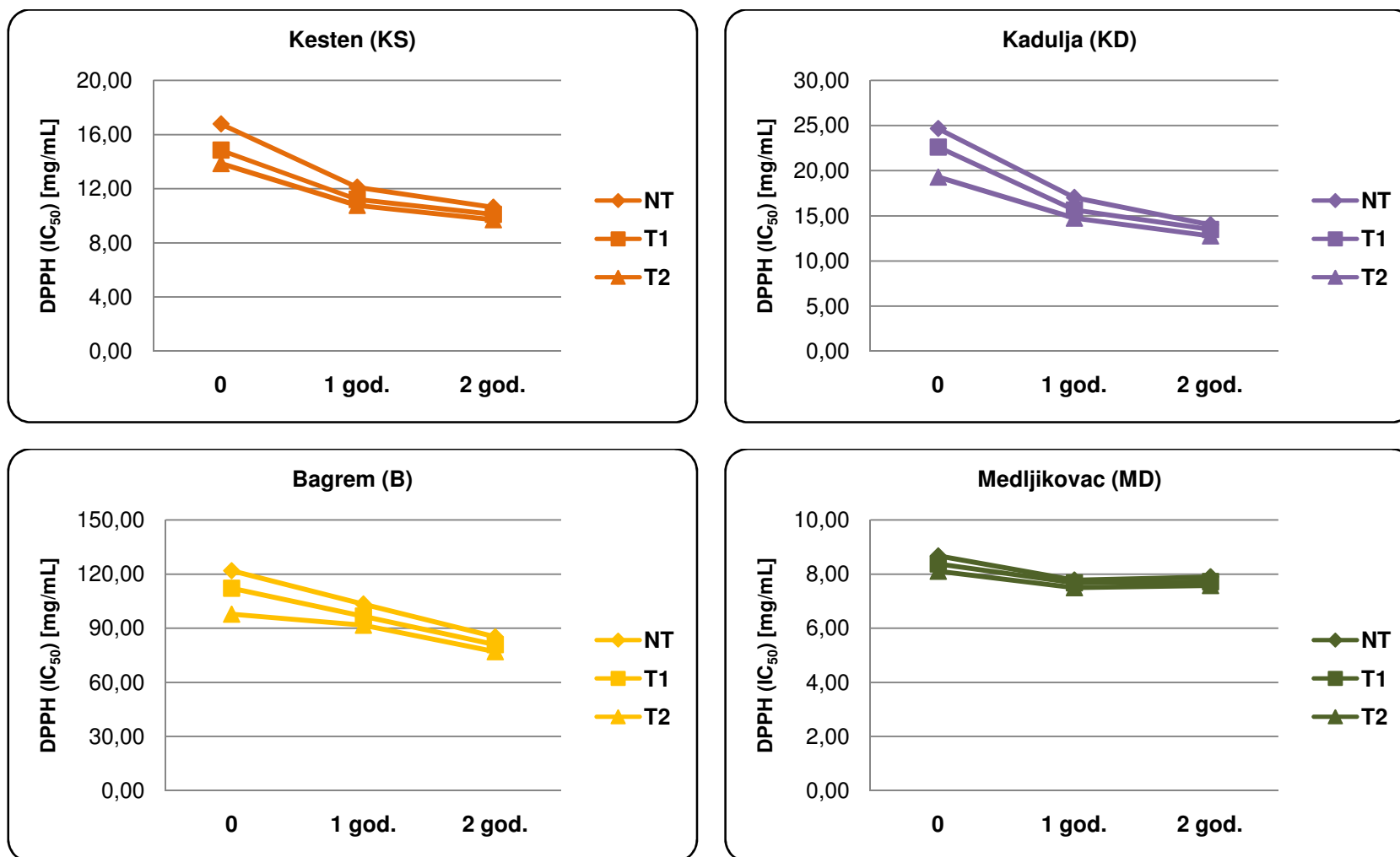




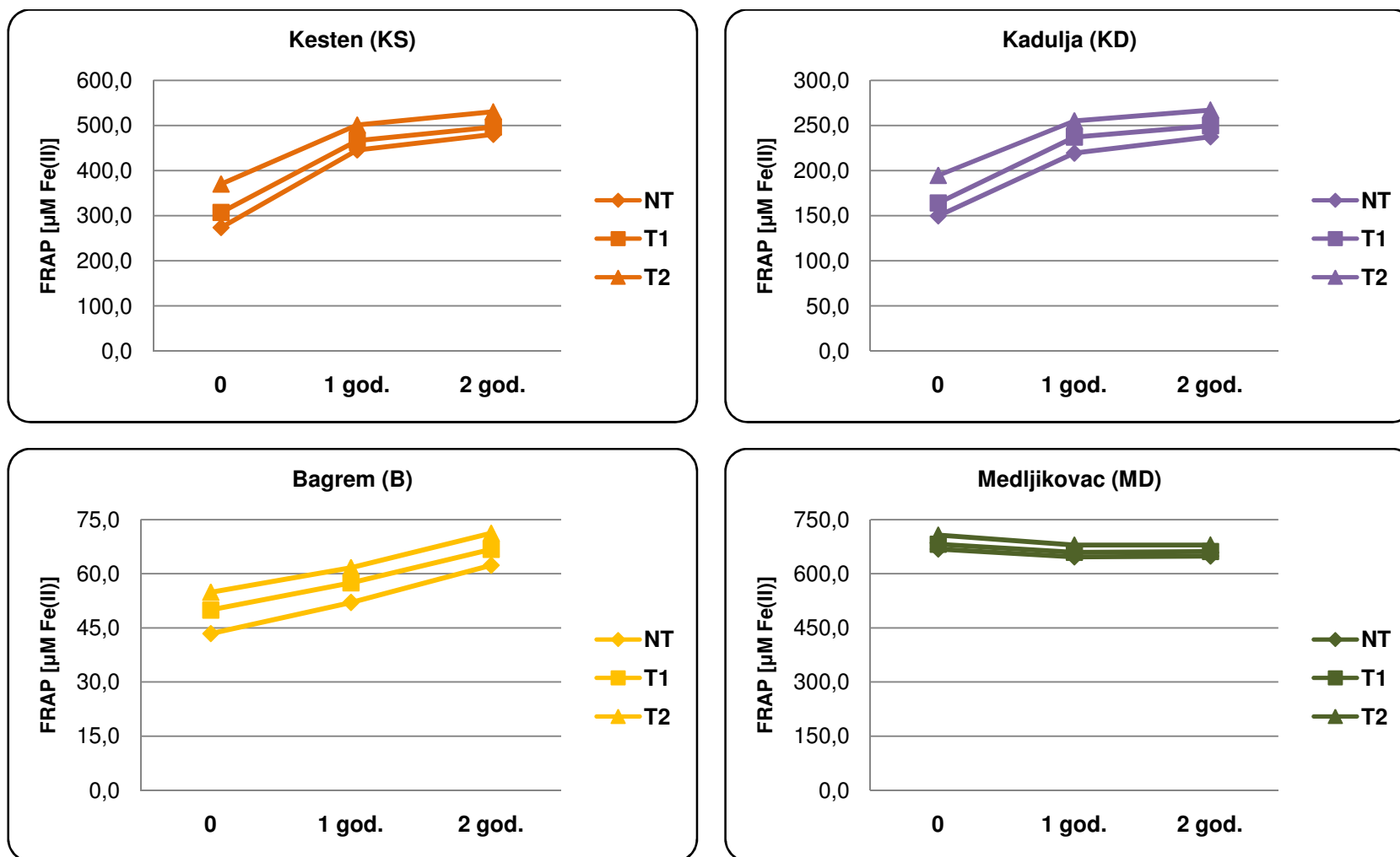
**Slika 36** Promjena  $b^*$  parametra boje (CIE  $L^*a^*b^*$ ) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem



**Slika 37** Promjena udjela ukupnih fenola nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem



**Slika 38** Promjena antioksidativnog kapaciteta (DPPH metoda) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem



**Slika 39** Promjena antioksidativnog kapaciteta (FRAP metoda) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

## **5. RASPRAVA**

U prvom dijelu istraživanja odabrane vrste meda (15 uzoraka meda kestena te po 10 uzoraka meda kadulje, bagrema i medljikovca) karakterizirane su s aspekta antioksidativnog kapaciteta kako bi se utvrdile specifičnosti, te je ispitana povezanost antioksidativnog kapaciteta s fizikalno-kemijskim parametrima odnosno sastojcima meda. Drugi dio istraživanja odnosio se na ispitivanje utjecaja zagrijavanja i skladištenja na kakvoću meda. U tu svrhu odabrani su uzorci (7 uzoraka kestena, te po 5 uzoraka kadulje, bagrema i medljikovca) koji su podvrgnuti zagrijavanju. Toplinski tretiranim uzorcima meda određen je antioksidativni kapacitet, udio ukupnih fenola, boja i parametri kakvoće meda koji se obično smatraju indikatorima procesiranja i svježine meda (aktivnost enzima i udio HMF-a), a rezultati uspoređeni s istim parametrima netretiranih uzoraka. Netretirani i toplinski tretirani uzorci skladišteni su dvije godine na sobnoj temperaturi na tamnom te su nakon jedne odnosno dvije godine određeni antioksidativni kapacitet, udio ukupnih fenola, boja, aktivnost enzima i udio HMF-a kako bi se dobio uvid u dinamiku promjena tijekom skladištenja meda.

Melisopalinološka analiza provedena je na svim uzorcima te su na osnovi rezultata uzorci klasificirani kao uniflorni med kestena, kadulje i bagrema te medljikovac (**Tablice 8 – 11**). Rezultati melisopalinološke analize meda kestena (**Tablica 8**) pokazuju da je prosječni udio peludnih zrnaca kestena u netopivom sedimentu iznosio  $94\pm 5$  % što udovoljava zahtjevima Pravilnika o kakvoći uniflornog meda (MPRRR, 2009.b) i u skladu je s europskim prosjekom koji iznosi 94,5 % (Persano Oddo i Piro, 2004.). Tri uzorka (KS2 i KS15 86 %, KS4 85 %) imali su granične vrijednosti udjela peludnih zrnaca kestena od 85 % potrebnih da bi se med klasificirao kao uniflorni med kestena. Prosječna vrijednost udjela peludnih zrnaca meda kadulje iznosila je  $20\pm 9$  % (**Tablica 9**). Kadulja je biljna vrsta s podzastupljenom peludi te je prema Pravilniku o kakvoći uniflornog meda (MPRRR, 2009.b) za potvrdu uniflornosti potrebno 15 odnosno 10 % (uz odgovarajuća senzorska svojstva) peludnih zrnaca kadulje u netopivom sedimentu. Šest uzoraka od ukupno 10 imali su više od 15 %, a četiri uzorka (KD1, KD4, KD5 i KD10) imala su više od 10 % peludnih zrnaca kadulje, no s obzirom da su po senzorskim i fizikalno-kemijskim svojstvima (električna provodnost, F/G i F+G) odgovarali medu kadulje, svi uzorci meda kadulje korišteni su u daljnjem ispitivanju. Kako navode Louveaux i sur. (1978.), med koji je proizveden od biljaka čija je pelud podzastupljena obično ima nizak udio peludnih zrnaca. Prosječna vrijednost udjela peludnih zrnaca kadulje u ispitivanju nešto je niža od vrijednosti navedene u našem prethodnom ispitivanju (Kenjerić i sur., 2006.). Bagrem je, kao i kadulja, biljka koja ima podzastupljenu pelud, ali su nešto više vrijednosti, točnije 20 %, potrebne da bi se med klasificirao kao uniflorni med bagrema. Prosječna vrijednost udjela peludnih zrnaca bagrema bila je  $46\pm 18$  % (**Tablica 10**), od čega je više od polovice uzoraka imalo udio peludnih zrnaca bagrema veći od 45 % što potvrđuje činjenicu da pelud bagrema može, ali i ne mora biti podzastupljena (Louveaux i sur., 1978.).

Prosječna vrijednost udjela peludnih zrnaca dobivena u ovom ispitivanju značajno je viša od europskog prosjeka koji iznosi 28,1 % te se može ustvrditi da su uzorci bagrema bili visoke čistoće. U svim uzorcima medljikovca identificirani su elementi medljike (spore i hife plijesni, alge) (**Tablica 11**), a i ostali fizikalno-kemijski parametri (električna provodnost > 0,8 mS/cm, F+G minimalno 45 g/100g) propisani Pravilnikom o medu (MPRRR, 2009.a) bili su zadovoljeni.

Fizikalno-kemijski parametri kakvoće meda prikazani u **Tablicama 8 – 15** bili su u skladu s propisima (MPRRR, 2009.a), osim jednog uzorka medljikovca (MD2) koji je imao slobodnu kiselost veću od propisanih 50 mEq/1000g. Pojedini fizikalno-kemijski parametri koriste se za identifikaciju botaničkog podrijetla meda (električna provodnost), neki za procjenu svježine i mogućeg patvorenja (HMF) dok neki imaju dvostruku ulogu (aktivnost dijastaze, kiselost).

Električna provodnost u osnovi se koristi za razlikovanje medljikovca od nektarnog meda, ali i u karakterizaciji uniflornih medova (Bogdanov i sur., 2004.; Primorac i sur., 2011.b). Med kestena, iako pripada skupini nektarnih medova, karakterizira visoka električna provodnost dok je med bagrema karakteriziran niskom električnom provodnosti. Svi uzorci meda kestena korišteni u ovom ispitivanju imali su električnu provodnost veću 0,8 mS/cm (1,316±0,242 mS/cm) (**Tablica 8**), dok je za med bagrema ona iznosila 0,118±0,017 mS/cm (**Tablica 10**). Prosječna vrijednost električne provodnosti meda kadulje bila je 0,292±0,048 mS/cm (**Tablica 9**), a za medljikovac 1,193±0,163 mS/cm (**Tablica 11**). Dobivene vrijednosti električne provodnosti u skladu su s literaturnim podacima za iste vrste meda (Persano Oddo i Piro, 2004.; Kenjerić i sur., 2006.; Kropf i sur., 2008.; Lušić i sur., 2009.; Primorac i sur., 2011.b).

Otopina meda ima sposobnost zakretanja ravnine linearno polariziranog svjetla, a ovisi o udjelu i sastavu prisutnih ugljikohidrata. Vrijednosti specifične rotacije mogu se koristiti kao parametar razlikovanja nektarnih medova od medljikovca, kao i pojedinih uniflornih vrsta (Bogdanov i sur., 2004.; Primorac i sur., 2011.a). Za medljikovac je karakteristično da ima pozitivne vrijednosti specifične rotacije dok nektarni medovi imaju negativne vrijednosti. Prosječna vrijednost specifične rotacije meda kestena iznosila je (-20,6±2,6) (**Tablica 8**), kadulje (-17,3±1,3) (**Tablica 9**), bagrema (-13,5±2,8) (**Tablica 10**), a medljikovca 13,9±8,9 (**Tablica 11**). Uzorak medljikovca hrasta sladuna (*Quercus frainetto* Ten.), MD2, imao je negativnu specifičnu rotaciju (-5,8) (**Tablica 11**) koja je nesvojstvena medljikovcima, međutim, našim ranijim ispitivanjima utvrđeno je da medljikovce hrasta karakterizira upravo negativna rotacija (Primorac i sur., 2009.), te bi se ovaj podatak mogao koristiti u razlikovanju ove od ostalih vrsta medljikovaca.

Odnos fruktoze i glukoze (F/G) u literaturi se koristi za razlikovanje uniflornih vrsta meda, kao i procjenu brzine kristalizacije meda. Med bagrema i kestena karakteriziraju visok udio fruktoze i nizak udio glukoze, a time i visoke F/G vrijednosti, što omogućava da ove vrste meda ostanu duže vrijeme u tekućem stanju (Persano Oddo i sur., 1995.). Med kadulje i medljikovca karakterizira umjerena brzina karakterizacije i relativno niske F/G vrijednosti. Vrijednosti F/G bile su za med kestena  $1,54 \pm 0,15$ , bagrema  $1,61 \pm 0,09$ , kadulje  $1,34 \pm 0,13$  i medljikovca  $1,24 \pm 0,16$  (**Tablice 8 – 11**).

Udio proteina u medu vrlo je nizak, a s tehnološkog aspekta najznačajniji su enzimi. U literaturi je dostupan vrlo mali broj radova o udjelu proteina u medu, dok podataka o udjelu proteina hrvatskih vrsta meda nema. Najviše vrijednosti udjela proteina bile su kod meda kestena (72,6 – 122,6 mg/100g) dok su nešto niže vrijednosti bile kod meda kadulje (53,5 – 104,2 mg/100g) i medljikovca (30,0 – 95,3 mg/100g), a najniže vrijednosti dobivene za med bagrema (21,1 – 43,2 mg/100g) (**Tablice 12 – 15**). Prolin je najzastupljenija aminokiselina u medu, a u med ju dodaju pčele prilikom prerade nektara u med (Cotte i sur., 2004.b). Udio prolina jedan je od kriterija zrelosti meda i mogući indikator patvorenja meda. Kao donja granica za izvorni, nepatvoreni med navodi se vrijednost udjela prolina od 180 mg/kg (Bogdanov i sur., 1999.a; 1999.b) koja je u većini europskih zemalja prihvaćena od strane pčelarskih udruga, dok hrvatski pčelarski savez nije donio takav standard. Iako je poznato da med bagrema prirodno ima nizak udio prolina, samo 1 uzorak meda bagrema (B4) imao je udio prolina veći od 180 mg/kg, a dobivena prosječna vrijednost ( $157,0 \pm 21,5$  mg/kg) (**Tablica 14**) značajno je niža od europskog prosjeka za med bagrema ( $222 \pm 58$  mg/kg). Ostale ispitivane vrste meda imale su visoke (kadulja  $346,3 \pm 139,3$  mg/kg) i vrlo visoke vrijednosti udjela prolina (kesten  $699,0 \pm 142,9$  mg/kg, medljikovac  $493,7 \pm 223,3$  mg/kg) (**Tablice 12, 13, 15**). Literaturni podaci o udjelu prolina za med kestena (Persano Oddo i Piro, 2004.; Šarić i sur., 2008.) nešto su niži od dobivenih u ovom istraživanju, dok su vrijednosti za med kadulje i medljikovca u skladu s literaturnim podacima za hrvatske medove (Kenjerić i sur., 2006.; Šarić i sur., 2008.; Primorac i sur., 2009.).

Iako enzimi uglavnom potječu od pčele, značajne razlike u aktivnosti enzima mogu se uočiti ovisno o vrsti meda, najvjerojatnije zbog različitog prinosa nektara i fiziološkog stanja pčela tijekom sezone. Aktivnosti dijastaze i invertaze različitih vrsta meda, pa i hrvatskog meda, dobro je opisana u literaturi, dok su podaci o aktivnosti glukoza-oksidaze i kisele fosfataze manje zastupljeni, a za hrvatski med ih i nema. Aktivnost dijastaze koristi se kao indikator zagrijavanja i vremena skladištenja, a minimalne vrijednosti za med na tržištu su propisane (MPRRR, 2009.a). Svi ispitivani uzorci udovoljavali su propisima što ukazuje na svježinu analiziranih uzoraka (**Tablice 12 – 15**). Kod svježeg meda aktivnost dijastaze može se koristiti i kao parametar karakterizacije. Najnižu aktivnost dijastaze imao je med bagrema



(DN 11,2±2,1) (**Tablica 14**) zatim slijede med kadulje (DN 19,9±6,8) (**Tablica 13**), medljikovca (DN 21,7±8,4) (**Tablica 15**) dok je med kestena imao najvišu aktivnost diastaze (DN 25,8±5,9) (**Tablica 12**). Sličan je poredak i kod aktivnosti invertaze, redom bagrem, kadulja, no medljikovac ima nešto višu aktivnost invertaze od meda kestena. Podaci se uglavnom slažu s literaturnim podacima (Huidobro i sur., 1995.; Persano Oddo i Piro, 2004.; Kenjeric i sur., 2006.), s izuzetkom meda bagrema koji ima više vrijednosti od talijanskog bagrema (Persano Oddo i sur., 1999.). Glukoza-oksidadza je enzim koji razgrađuje glukozu na glukonsku kiselinu i vodikov peroksid, a najčešće se povezuje s antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima meda. Aktivnost glukoza-oksidadze bila je očekivano najniža u medu bagrema (1,5 – 144,0  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ , prosječna vrijednost 40,3  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ ), zatim u medu kestena (105,1 – 517,9  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ , prosječna vrijednost 236,3  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ ) i kadulje (108,6 – 486,2  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ , prosječna vrijednost 250,5  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ ) dok su najviše vrijednosti bile kod medljikovca (253,7 – 431,6  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ , prosječna vrijednost 347,6  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ ) (**Tablice 12– 15**). Kisela fosfataza vodi podrijetlo iz biljke, a aktivnost se povećava fermentacijom meda. Aktivnost kisele fosfataze u medu kestena kretala se između 35,7 i 127,3 mg P/100g meda/24 h, s prosječnom vrijednosti 83,7 mg P/100g meda/24 h (**Tablica 12**) što je nešto više od podataka objavljenih u radu Sánchez i sur. (2005.b) koji su za dva uzorka meda kestena dobili vrijednosti 71,8 i 67,6 mg P/100g meda/24 h. Aktivnost kisele fosfataze u medu kadulje iznosila je 20,9 – 79,2 (prosječno 43,3 mg P/100g meda/24 h) (**Tablica 13**). Podaci za aktivnost kisele fosfataze bagremovog meda (81,5 – 179,1, prosječno 108,8 mg P/100g meda/24 h) bili su iznenađujuće visoki s obzirom da bagremov med ima najniže vrijednosti ostalih ispitivanih enzima (**Tablica 14**). Najviše vrijednosti kisele fosfataze, koji su prikazani u **Tablici 15**, imao je medljikovac (53,4 – 406,8, prosječno 137,1 mg P/100g meda/24 h).

Udio HMF-a, uz aktivnost enzima, indikator je prekomjernog zagrijavanja i svježine meda. U svježem neprocesiranom medu vrijednosti HMF-a vrlo su niske ili iznose 0. Kod svih ispitivanih uzoraka meda udio HMF-a bio je niži od 10 mg/kg što se smatra granicom za svjež i pravilno procesirani med (**Tablice 8 – 11**).

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja boje izraženi kao neto apsorbancija prikazani su na **Slici 8**. Najniže vrijednosti neto apsorbancije imao je najsvjetliji med bagrema, dok su najviše vrijednosti izmjerene kod medljikovca. Vrijednosti neto apsorbancije meda bagrema bile su između 19 mAU i 55 mAU, meda kadulje 179 – 285 mAU, meda kestena 270 – 457 mAU, a medljikovca 218 – 909 mAU. Najviše vrijednosti neto apsorbancije izmjerene su kod 2 uzorka bjelogoričnih medljikovaca, MD2 909 mAU i MD4 846 mAU koji su prema vizualnom promatranju bili vrlo tamne, skoro crne boje. Vidljive razlike u boji meda pripisuju se različitom sastavu i udjelu pigmenata prisutnih u medu

(karotenoidi, klorofil, produkti Maillardovih reakcija). Boja uzoraka medljikovca u skladu je s literaturnim podacima (Beretta i sur., 2005.; Bertocelj i sur., 2007.). Piljac-Žegarac i sur. (2009.) i Beretta i sur. (2005.) dobili su slične vrijednosti za hrvatski (51 mAU) i talijanski (25 mAU) med bagrema, dok je slovenski med bagrema tamniji s prosječnom vrijednošću neto apsorbancije  $70 \pm 15$  mAU (Bertocelj i sur., 2007.). Neto apsorbancija jednog uzorka meda kadulje (Piljac-Žegarac i sur., 2009.) iznosila je 397 mAU što je nešto više od vrijednosti dobivenih u ovom ispitivanju. Hrvatski med kestena svjetliji je od slovenskog (Bertocelj i sur., 2007.) i talijanskog meda kestena (Beretta i sur., 2005.) čije su vrijednosti iznosile 376 - 613 mAU, odnosno 610 mAU. Rezultati mjerenja boje pomoću Lovibond komparatora daju podatke samo o intenzitetu žute (jantarne) nijanse meda. Unatoč ovom ograničenju, određivanje boje meda komparatorom u mnogim zemljama se koristi kao standardna metoda za procjenu boje. Rezultati određivanja boje meda Lovibond komparatorom prikazani su na **Slici 9**. S obzirom na rezultate vidljivo je grupiranje po vrstama. Najniže vrijednosti imao je med bagrema (1 – 8 mm Pfundove skale) koji prema USDA klasifikaciji pripadaju najsvjetlijim medovima koje karakterizira bezbojna (*water white*) boja. Vrijednosti za med kadulje kretale su se od 21 mm do 57 mm Pfundove skale te se s obzirom na vrijednosti med kadulje svrstava u bijelu (*white*) do jako svjetlo žutu (*extra light amber*) kategoriju boje meda. Med kestena može se svrstati u kategoriju svjetlo žutih (*light amber*) medova, a vrijednosti su se kretale između 55 mm i 70 mm Pfundove skale. Najveći raspon rezultata dobiven je kod medljikovca, no s obzirom da su ispitivani uzorci pripadali različitim podvrstama medljikovaca (crnogorični i bjelogorični) veliki raspon rezultata bio je očekivan. Boja medljikovca kretala se od 60 mm do 125 mm Pfundove skale, što prema klasifikaciji odgovara trima kategorijama: svjetlo žuta (*light amber*), žuta (*amber*) i tamno žuta (*dark amber*). Dva uzorka meda kestena (KS11 i KS14) i jedan uzorak medljikovca (MD3) nisu se mogli očitati, najvjerojatnije zbog kristalizacije i zamućenja. Naime, nedostatak ove metode je što uzorci za analizu moraju biti potpuno bistri. U odnosu na literaturne podatke (Persano Oddo i Piro, 2004.; Devillers i sur., 2004.; Al i sur., 2009.), analizirani uzorci meda bagrema bili su svjetliji, što ukazuje na visoku kakvoću uzoraka meda bagrema jer se smatra da med bagrema visoke kakvoće treba biti što svjetliji gotovo bezbojan. Podaci o boji meda kadulje određeni Lovibond komparatorom nisu dostupni u literaturi. Med kestena imao je niže vrijednosti od literaturnih podataka (Persano Oddo i sur., 1995.; Devillers i sur., 2004.; Persano Oddo i Piro, 2004.) dok su vrijednosti boje medljikovca bile u skladu s podacima za rumunjski (Al i sur., 2009.) i europski medljikovac (Persano Oddo i Piro, 2004.). Određivanje boje kromametrom (CIEL\*a\*b\* mjerni sustav) vrlo često se koristi za procjenu boje različitih prehrambenih proizvoda, a sve češće se koristi za određivanje boje meda. Više vrijednosti L\* parametra karakteristične su za svjetlije vrste meda, što je u skladu s dobivenim rezultatima, jer su uzorci meda bagrema imali najviše vrijednosti L\* parametra (43,56 – 47,56) (**Slika 10**). L\* vrijednosti meda kadulje bile su od

34,34 do 40,91, dok su  $L^*$  vrijednosti meda kestena bile od 30,18 do 33,98. Najniže vrijednosti imao je medljikovac (26,67 – 30,85). Pozitivne vrijednosti parametra  $a^*$  pokazuju intenzitet crvene boje. Svi uzorci meda kestena, kadulje i medljikovca imali su pozitivne  $a^*$  vrijednosti, dok je med bagrema imao negativne  $a^*$  vrijednosti što ukazuje na prisutnost zelene nijanse. Svi analizirani uzorci imali su pozitivne vrijednosti  $b^*$  parametra čije vrijednosti pokazuju intenzitet žute nijanse (**Slika 11**). Žuta nijansa rezultat je prisutnosti karotenoida u nektaru, dok su crvene nijanse rezultat prisutnosti flavonoida i antocijana. Zelena nijansa (negativne  $a^*$  vrijednosti), koja je određena kod meda bagrema, potječe od veće količine klorofila u nektaru (Bertoncelj, 2008.). Pregledom literature uočljive su velike razlike u vrijednostima svih parametara boje, posebice  $a^*$  i  $b^*$  parametara za iste vrste meda (Mateo Castro i sur., 1992.; Díez i sur., 2004.; González-Miret i sur., 2005.; Bertoncelj i sur., 2007.). Razlike se pripisuju različitom zemljopisnom podrijetlu uzoraka koji ima utjecaj na udio i sastav pigmenata kao i različitim izvedbama mjerenja jer ne postoji standardni postupak određivanja boje kromametrom.

Karakterizacija različitih vrsta meda s aspekta antioksidativnog kapaciteta i udjela ukupnih fenola provedena je s ciljem utvrđivanja razlika između pojedinih vrsta meda te mogućnosti upotrebe antioksidativnog kapaciteta kao parametra za identifikaciju botaničkog podrijetla.

Udio ukupnih fenola određen je modificiranom Folin-Ciocalteu metodom, a dobiveni rezultati pokazali su da se udio ukupnih fenola značajno razlikuje ovisno o vrsti meda (**Tablice 16 – 19**). Prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola meda kestena iznosila je  $162,1 \pm 21,6$  mg galne kiseline/kg meda (**Tablica 16**), meda kadulje  $96,5 \pm 13,6$  mg galne kiseline/kg meda (**Tablica 17**), meda bagrema  $39,1 \pm 6,8$  mg galne kiseline/kg meda (**Tablica 18**), a medljikovca  $318,6 \pm 132,6$  mg galne kiseline/kg meda (**Tablica 19**). Udio ukupnih fenola meda bagrema dobro je opisan u literaturi. Dobiveni podaci u potpunosti se slažu s podacima u literaturi (Gheldof i Engeseth, 2002.; Beretta i sur., 2005.; Bertoncelj i sur., 2007.; Krpan i sur., 2009.) bez obzira na zemljopisno podrijetlo uzoraka. Obzirom na usko područje rasprostranjenosti kadulje (*Salvia officinalis* L.), podaci o ovoj vrsti meda u literaturi su oskudni. Piljac-Žegarac i sur. (2009.) objavili su podatak o udjelu ukupnih fenola meda kadulje koji je iznosio 55,40 mgGAE/100g, što je značajno više od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju, no kako su mjerenja provedena različitim modifikacijama Folin-Ciocalteu metode rezultati se ne mogu uspoređivati. Rezultati udjela ukupnih fenola meda kestena niži su od vrijednosti za slovenski (Bertoncelj i sur., 2007.) i talijanski med kestena (Beretta i sur., 2005.). Prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola medljikovca viša je od literaturnih podataka, čemu su doprinijele vrlo visoke vrijednosti udjela ukupnih fenola izmjerene kod dva uzroka medljikovca (MD2 i MD9) koje su iznosile 501,1 i 588,0 mg galne kiseline/kg meda

što spada u red najviših vrijednosti dostupnih u literaturi. Ostali uzorci medljikovca u skladu su s literaturnim podacima (Beretta i sur., 2005.; Bertonselj i sur., 2007.; Lachman i sur., 2010.).

Antioksidativni kapacitet ispitivanih vrsta meda određen je pomoću DPPH i FRAP metoda. DPPH metoda koristi se za procjenu sposobnosti hvatanja slobodnih radikala pri čemu se mjeri intenzitet promjene boje stabilnog dušikovog radikala DPPH<sup>•</sup> koji se u reakciji s antioksidansima reducira u žuto obojeni produkt. Antioksidativni kapacitet meda izražen je kao IC<sub>50</sub>, što označava učinkovitu koncentraciju koja je potrebna za 50 %-tno smanjenje početne koncentracije DPPH radikala. Veće vrijednosti IC<sub>50</sub> znače niži antioksidativni kapacitet uzoraka meda. Rezultati antioksidativnog kapaciteta ispitivanih vrsta meda prikazane su u **Tablicama 16 – 19**. Najniži antioksidativni kapacitet, izražen kao IC<sub>50</sub> imao je najsvjetliji med bagrema (73,50 – 201,36 mg/mL), slijedi med kadulje (18,65 – 34,08 mg/mL), dok su tamne vrste meda imale najviši antioksidativni kapacitet odnosno najniže IC<sub>50</sub> (11,34 – 21,36 mg/mL med kestena i 3,46 – 14,14 mg/mL medljikovac). FRAP metoda jednostavna je spektrofotometrijska metoda kojom se određuje ukupni antioksidativni kapacitet, a temelji se na redukciji feri oblika željeza (Fe<sup>3+</sup>) u fero (Fe<sup>2+</sup>) oblik u prisutnosti antioksidanasa. Rezultati mjerenja izraženi su kao FRAP vrijednosti (μM (Fe(II)) 10 %-tne otopine meda). FRAP vrijednosti meda kestena iznosile su 216,7 – 354,3 μM (Fe(II)) (**Tablica 16**), meda kadulje 112,9 – 197,9 μM (Fe(II)) (**Tablica 17**), meda bagrema 6,5 – 61,2 μM (Fe(II)) (**Tablica 18**), a medljikovca 286,0 – 1175,7 μM (Fe(II)) (**Tablica 19**). Kao i kod DPPH metode, najniži antioksidativni kapacitet izmjeren je kod meda bagrema dok su najviše vrijednosti bile kod medljikovca. Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti da se udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet mogu koristiti kao razlikovni parametar botaničkog podrijetla, međutim daljnja ispitivanja na većem broju uzoraka potrebna su kako bi se s većom sigurnošću odredile granice za pojedine vrste meda. Osim toga, ispitivanje antioksidativnog kapaciteta trebalo bi se proširiti i na druge vrste meda koje se proizvode u Hrvatskoj kako bi se kreirala baza podataka o antioksidativnom kapacitetu hrvatskih vrsta meda.

Najviše vrijednosti antioksidativnog kapaciteta određenog i DPPH i FRAP metodom imala su dva uzorka medljikovca (MD2 i MD9) čije su IC<sub>50</sub> vrijednosti iznosile 3,46 mg/mL i 3,65 mg/mL, a FRAP vrijednosti 1175,7 μM (Fe(II)) i 1109,1 μM (Fe(II)). Ova dva uzorka imala su ujedno i vrlo visoke udjele ukupnih fenola. Uzorak MD2 pripada medljikovcu hrasta sladuna (*Quercus frainetto* Ten.) koji je karakterističan za područje istočne Hrvatske. Obzirom na ograničenu rasprostranjenost ove biljne vrste, podaci o karakterizaciji medljikovca hrasta sladuna vrlo su oskudni. Jerković i sur. (2010.) također su ispitivali antioksidativni kapacitet medljikovca hrasta sladuna te dobili vrlo visoke FRAP vrijednosti

(4,8 i 16,1 mmol Fe<sup>2+</sup>/kg). Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti da ovu vrstu medljikovca karakterizira izuzetno visok antioksidativni kapacitet. Daljnja ispitivanja na većem broju uzoraka potrebna su kako bi se bolje karakterizirala ova posebna vrsta medljikovca. Podaci o antioksidativnom kapacitetu meda kadulje također su malo zastupljeni u literaturi. FRAP vrijednost jednog uzorka kadulje s područja kontinentalne Hrvatske iznosila je 121,27  $\mu$ M (Fe(II)) (Piljac-Žegarac i sur., 2009.) što je u skladu s FRAP vrijednostima meda kadulje dobivenim u ovom istraživanju. Iako su podaci o antioksidativnom kapacitetu meda bagrema i kestena dostupni u mnogim radovima, usporedba rezultata uvelike je otežana zbog nepostojanja standardnih metoda za mjerenje antioksidativnog kapaciteta. Rezultati antioksidativnog kapaciteta meda bagrema u skladu su s podacima Krpan i sur. (2009.) za hrvatski med bagrema, dok je iz komparacije s rezultatima Beretta i sur. (2005.) i Bertoncej i sur. (2007.) vidljivo da hrvatski med bagrema ima niži antioksidativni kapacitet od slovenskog i talijanskog meda bagrema. Ako se izuzmu dva uzorka medljikovca koja su imala vrlo visoki antioksidativni kapacitet, vrijednosti antioksidativnog kapaciteta ostalih ispitivanih medljikovaca, kao i uzorci meda kestena bili su u skladu s literaturom (Beretta i sur., 2005.; Bertoncej i sur., 2007.; Bobis i sur., 2008.; Lachman i sur., 2010.).

Kako je antioksidativni kapacitet meda rezultat djelovanja različitih komponenata, među kojim najveći doprinos imaju fenolne komponente, ispitana je povezanost udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta (DPPH i FRAP metodama). Povezanost udjela ukupnih fenola s antioksidativnim kapacitetom određenog DPPH metodom prikazana je na **Slici 12**, a s FRAP metodom na **Slici 13**. Dobiveni koeficijenti korelacije (Pearsonov i Spearmanov koeficijent korelacije) između navedenih parametara prikazani su u **Tablici 20**. Ispitana je i povezanost udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta s bojom meda, udjelom proteina i prolina te aktivnošću glukoza-oksidge. Navedeni fizikalno-kemijski parametri u literaturi se povezuju s antioksidativnim kapacitetom meda. Boja meda u istraživanju određena je različitim metodama (spektrofotometrijski, pomoću Lovibond komparatora i kromametrom) te je ispitana i povezanost rezultata boje određenih različitim metodama. Koeficijenti korelacije (Pearsonov i Spearmanov koeficijent korelacije) prikazani su u **Tablici 20**. Visoke IC<sub>50</sub> vrijednosti (DPPH metoda) označavaju nizak antioksidativni kapacitet meda, pa su za ispitivanje povezanosti antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH metodom s drugim parametrima rezultati izraženi kao recipročna vrijednost, 1/IC<sub>50</sub>. Kako je vidljivo iz **Slika 12** i **13**, postoji vrlo visoka povezanost između udjela ukupnih fenola i DPPH i FRAP vrijednosti. Visoko statistički značajne vrijednosti koeficijenta korelacije utvrđene su između udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH metodom (izražen kao 1/IC<sub>50</sub>) ( $r_s = 0,983$ ,  $p < 0,05$ ) odnosno FRAP metodom ( $r_s = 0,992$ ,  $p < 0,05$ ) (**Tablica 20**). Visoke statistički značajne korelacije između udjela ukupnih fenola i

antioksidativnog kapaciteta određenog FRAP metodom ukazuju da je redukcijsko djelovanje meda posljedica redukcijske sposobnosti fenolnih komponenata koje mogu reducirati  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ . Također je poznato da fenolne komponente mogu hvatati slobodne radikale te na taj način djelovati kao antioksidansi. Potvrdu tome daje visoka korelacija između udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH metodom koja se temelji na hvatanju slobodnog DPPH radikala (Lee i sur., 2004.). Vrlo visoka korelacija dobivena je i između dviju ispitivanih metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta ( $r_s = 0,985$ ,  $p < 0,05$ ). Podaci o visokim statistički značajnim korelacijama između udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta određenog različitim metodama (DPPH, FRAP, ORAC) dostupni su u mnogim literaturnim referencama (Gheldof i Engeseth, 2002.; Beretta i sur., 2005.; Bertoncelj i sur., 2007.; Alvarez-Suarez i sur., 2010.b; Bruzynski i Miotto, 2011.a). Visoke vrijednosti Pearsonovih (0,728 – 0,776) i Spearmanovih (0,838 – 0,919) koeficijenata korelacije utvrđene se između boje (neto apsorbancija i Lovibond boja) i udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta (**Tablica 20**). Negativne visoko statistički značajne vrijednosti koeficijenata korelacije utvrđene su između  $L^*$  parametra boje (CIEL\*a\*b\* mjernog sustava) i udjela ukupnih fenola te antioksidativnog kapaciteta čije su se vrijednosti kretale između (-0,683) i (-0,719) (Pearsonov koeficijent korelacije) te (-0,921) i (-0,947) (Spearmanov koeficijent korelacije) (**Tablica 20**). Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima (Beretta i sur., 2005.; Bertoncelj i sur., 2007.; Alvarez-Suarez i sur., 2010.b; Bruzynski i Miotto, 2011.a) i zaključcima autora da je boja meda usko povezana s njegovim antioksidativnim kapacitetom te da porastom boje meda raste i njegov antioksidativni kapacitet. Iako fenolne komponente najvećim dijelom doprinose antioksidativnom kapacitetu meda, dokazano je da iste nisu jedine odgovorne. Prema nekim autorima, ukupnom antioksidativnom kapacitetu meda doprinose proteini i slobodne aminokiseline, enzimi (glukoza-oksidaza, katalaza) te produkti Maillardovih reakcija (Frankel i sur., 1998.; Gheldof i sur., 2002.; Bertoncelj i sur., 2007.). Temeljem toga ispitana je povezanost antioksidativnog kapaciteta s udjelom proteina i prolina te aktivnosti glukoza-oksidaze. U **Tablici 20** prikazani su Pearsonovi i Spearmanovi koeficijenti korelacije, te je vidljiva niska statistički značajna povezanost između antioksidativnog kapaciteta i udjela prolina. Nešto niže statistički značajne Pearsonove koeficijente korelacije između udjela prolina i antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH metodom objavili su Pérez i sur. (2007.) dok Alvarez-Suarez i sur. (2010.b) nisu pronašli statistički značajnu korelaciju između ispitivanih parametara. S druge strane, Meda i sur. (2005.) objavili su značajno jaču povezanost udjela prolina i antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH metodom ( $r = 0,809$ ,  $p < 0,001$ ). Povezanost između udjela proteina i antioksidativnog kapaciteta izražena preko Pearsonovog koeficijenta korelacije bila je niska i nije bila statistički značajna što je u skladu s podacima u literaturi (Alvarez-Suarez i sur., 2010.b). Poznato je da između aktivnosti glukoza-oksidaze meda i

antioksidativnog kapaciteta postoji povezanost, međutim, u literaturi ta vrsta podataka nije nađena. U ovom istraživanju dobivena je osrednja statistički značajna korelacija između aktivnosti glukoza-oksidadaze i antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH ( $r_S = 0,680$ ,  $r_P = 0,471$ ,  $p < 0,05$ ) i FRAP metodom ( $r_S = 0,675$ ,  $r_P = 0,520$ ,  $p < 0,05$ ). Vrlo visoke statistički značajne vrijednosti koeficijenta korelacije utvrđene su između neto apsorbancije i Lovibond boje ( $r_S = 0,846$ ,  $p < 0,05$ ), neto apsorbancije i  $L^*$  ( $r_S = -0,816$ ,  $p < 0,05$ ) te Lovibond boje i  $L^*$  ( $r_S = -0,969$ ,  $p < 0,05$ ) što pokazuje da su sve tri metode određivanja prikladne za određivanje boje meda. Slaba negativna povezanost utvrđena je između Lovibond boje koja prati intenzitet žute (jantarne) nijanse meda i  $b^*$  parametra čije pozitivne vrijednosti pokazuju intenzitet žute nijanse ( $r_S = -0,412$ ,  $r_P = -0,395$ ,  $p < 0,05$ ), iako je bilo za očekivati jaču povezanost ova dva parametra.

Kako je med proizvod koji se vrlo često podvrgava nekom obliku procesiranja s ciljem lakšeg daljnjeg rukovanja i odgađanja/spriječavanja neželjenih promjena (kristalizacija i fermentacija) ispitan je utjecaj procesiranja na parametre svježine meda (aktivnost enzima i udio HMF-a), boju meda, udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet. Zagrijavanje meda u svrhu dekrystalizacije obično se provodi na temperaturama 45 – 50 °C nekoliko dana u komorama s toplim zrakom (Krell, 1996.; Falico i sur., 2004.; Bogdanov, 2009.) dok se temperature 63 – 68 °C obično primjenjuju kako bi se inaktivirali kvasci odgovorni za fermentaciju i odgodila kristalizacija meda (Babacan i sur., 2002.; Subramanian i sur., 2006.). Toplinski tretmani T1 (45 °C/48 h) i T2 (65 °C/6 h) odabrani je s ciljem utvrđivanja utjecaja temperature dekrystalizacije i pasterizacije na kakvoću meda. Rezultati utjecaja procesiranja različitim toplinskim tretmanima na analizirane fizikalno-kemijske parametre prikazani su na **Slikama 14 – 26** i **Prilozima 1 – 3**. Također je ispitan utjecaj skladištenja na iste fizikalno-kemijske parametre netretiranih i toplinski tretiranih uzorka meda, kako bi se utvrdila dinamika promjena i mogući zajednički učinak zagrijavanja i skladištenja na promjene antioksidativnog kapaciteta i parametara kakvoće meda. Rezultati utjecaja skladištenja na analizirane fizikalno-kemijske parametre netretiranih i toplinski tretiranih uzoraka prikazani su na **Slikama 27 – 39** i **Prilozima 4 – 16**.

HMF je ciklički aldehid koji u medu nastaje uglavnom kiselinom razgradnjom heksoza. Poznato je da zagrijavanje meda i dulje skladištenje dovode po povećanja udjela HMF-a, a njegov udio u medu smatra se pokazateljem svježine i intenziteta zagrijavanja meda. Kako je vidljivo iz **Slike 14**, zagrijavanje meda primijenjenim toplinskim tretmanima nije dovelo do većeg povećanja udjela HMF-a. Dapače, zagrijavanjem na nižoj temperaturi duže vrijeme (45 °C/48 h) povećanje udjela HMF-a bilo je zanemarivo i unutar granica pogreške metode. Primjenom više temperature zagrijavanja (65 °C/6 h) povećanje udjela HMF-a bilo je neznatno, osim kod meda kadulje gdje je porast HMF-a bio oko 1,5 puta u

odnosu na vrijednosti nezagrijanih uzoraka. Sve izmjerene vrijednosti nakon toplinskih tretmana bile su niže od 10 mg/kg, što pokazuje da su ispitivani toplinski tretmani prikladni jer ne dovode po značajnog povećanja udjela HMF-a. Skladištenjem dvije godine na sobnoj temperaturi primijećen je značajniji porast udjela HMF-a, a intenzitet povećanja razlikovao se ovisno o vrsti meda (**Slika 27**). Razlike u povećanju udjela HMF-a proizlaze iz različitog kemijskog sastava, prvenstveno pH vrijednosti meda. Kod vrsta meda koje imaju niži pH, skladištenje pri istim uvjetima dovesti će do većeg porasta udjela HMF-a nego kod vrsta meda s višim pH (Horn i Hammes, 2002.). To je potvrđeno i u ovom ispitivanju, naime značajniji porast udjela HMF-a netretiranih i toplinski tretiranih uzoraka utvrđen je kod meda kadulje i bagrema čije je pH iznosio 3,98 (med kadulje) i 3,90 (med bagrema) nego kod meda kestena i medljikovca koji su imali viši pH (**Tablice 8 – 11**). Kod medljikovca, nakon jedne godine skladištenja nije primijećeno povećanje udjela HMF-a, dok je nakon dvije godine promjena bila neznatna (prosječne vrijednosti bile su niže od 3 mg/kg). Visoki pH (5,05) (**Tablica 11**) i manji udio reducirajućih šećera medljikovca u odnosu na nektarne vrste meda doprinose stabilnosti medljikovca s obzirom na povećanje udjela HMF-a. Dinamika stvaranja HMF-a nektarnih medova (kesten, kadulja, bagrem) pratila je kinetiku prvog reda, tj. udio HMF-a linearno se povećavao duljinom skladištenja što je u skladu s literaturnim podacima (Moreira i sur., 2007.; Bulut i Kilic, 2009.). Prema nacionalnim (MPRRR, 2009.a) i međunarodnim propisima (Codex Alimentarius Commission, 2001.; Council of the European Union, 2002.) maksimalna dopuštena vrijednost HMF-a iznosi 40 mg/kg. Svi uzorci meda kestena, bagrema i medljikovca udovoljavali su propisima čak i na kraju skladištenja, međutim, kod meda kadulje to nije bio slučaj. Prosječna vrijednost udjela HMF-a toplinski netretiranih uzoraka meda kadulje nakon dvije godine skladištenja iznosila je 37,2 mg/kg (**Slika 27**), s tim da su neki uzorci (**Prilog 4**) imali više vrijednosti od propisanih 40 mg/kg dok su prosječne vrijednosti toplinski tretiranih uzoraka bile veće od 40 mg/kg (T1 43,7 mg/kg i T4 55,7 mg/kg). Na osnovi prikazanih rezultata može se zaključiti da su s obzirom na dinamiku stvaranja HMF-a primijenjeni toplinski tretmani prikladni, te da je kombinirani utjecaj procesiranja i skladištenja najviše izražen kod meda kadulje. Kako bi se udovoljilo propisanim zahtjevima u pogledu udjela HMF-a, preporuča se med kadulje skladištiti kraće od dvije godine.

Poznato je da se aktivnost enzima smanjuje zagrijavanjem i skladištenjem meda no dinamika promjena, posebice tijekom skladištenja, slabo je opisana u literaturi. Zagrijavanje na oba toplinska tretmana dovelo je do smanjenja aktivnosti svih analiziranih enzima (dijastaze, invertaze, glukoza-oksidaze, kisele fosfataze). Smanjenje enzimske aktivnosti meda bilo je izraženije primjenom više temperature zagrijavanja kroz kraće vrijeme (65 °C/6 h) u odnosu na nižu temperaturu zagrijavanja duže vrijeme (45 °C/48 h) i netretirane uzorke.



Smanjenje aktivnosti dijasaze zagrijavanjem na nižim temperaturama duže vrijeme iznosilo je 6 – 11 % dok je primjenom viših temperatura prosječno smanjenje iznosilo 20 – 29 % (**Slika 15**). Aktivnost invertaze smanjena je zagrijavanjem toplinskim tretmanom T1 za 12 – 28 %, dok se primjenom toplinskog tretmana T2 aktivnost invertaze smanjila na oko polovicu početne vrijednosti kod meda kestena i medljikovca, a pad od čak 83 % i 92 % bio je kod meda bagrema odnosno kadulje (**Slika 16**). Dobiveni podaci potvrđuju u literaturi već objavljenu činjenicu da je invertaza osjetljivija na djelovanje topline nego dijasaza te da je aktivnost invertaze mnogo bolji pokazatelj zagrijavanja od dijasaze (Serra Bonvehi i sur., 2000.; Karabournioti i Zervalaki, 2001.). Niža temperatura zagrijavanja praktično nije imala utjecaj na smanjenje aktivnosti glukoza-oksidaze nektarnih vrsta meda dok je smanjenje kod medljikovca bilo prosječno 11 %. Značajniji pad aktivnosti glukoza-oksidaze (preko 80 % kod nektarnih medova i oko 40 % kod medljikovca) uočen je kod drugog toplinskog tretmana (T2) (**Slika 17**). Prema navodima raznih autora (Shepartz i Subers, 1964.; Horn i Hammes, 2002.; Dimiņš i sur., 2006.) glukoza-oksidaza gotovo u potpunosti se inaktivira pri temperaturama 50 – 60 °C, što dobiveni rezultati u ovom istraživanju i potvrđuju. Smanjenje aktivnosti kisele fosfataze toplinskim tretmanom T1 analiziranih vrsta meda iznosila je 12 – 24 %, dok je primjenom toplinskog tretmana T2 smanjenje iznosilo 28 – 42 % (**Slika 18**). Kako se aktivnost kisele fosfataze meda rijetko određuje, a pregledom literature nema radova koji prate dinamiku promjene aktivnosti kisele fosfataze zagrijavanjem, podaci dobiveni u istraživanju dat će potpuniji uvid u dinamiku promjena enzimske aktivnosti meda. Na osnovi dobivenih rezultata vidljivo je da su invertaza i glukoza-oksidaza osjetljivije na djelovanje topline nego dijasaza i kiselu fosfatazu, te da bi se aktivnost ova dva enzima trebala koristiti kao dodatni parametri procjene intenziteta zagrijavanja uz već standardne parametre (dijasazu i HMF).

Smanjenje aktivnosti dijasaze skladištenjem bio je podjednako kod svih analiziranih vrsta meda te nakon dvije godine skladištenja aktivnost dijasaze iznosi 70 – 80 % početne vrijednosti. Osim toga, primijenjeni toplinski tretmani nisu imali veći utjecaj na dinamiku promjena tijekom skladištenja (**Slika 28**). Nakon dvije godine skladištenja svi uzorci meda kestena i medljikovca udovoljavali su propisanim zahtjevima (MPRRR, 2009.a) u pogledu aktivnosti dijasaze. Prema Pravilniku o medu (MPRRR, 2009.a), ako je aktivnost dijasaze niža od 8, udio HMF-a mora biti niži od 15 mg/kg. Prema tim zahtjevima, uzorak KD2 (med kadulje) nije udovoljio propisima već nakon jedne godine skladištenja, dok uzorci meda bagrema B1, B3 i B5 nakon dvije godine skladištenja više nisu u skladu s propisima (**Prilog 5**). Kao i kod zagrijavanja, smanjenje aktivnosti invertaze tijekom skladištenja bilo je izraženije nego kod dijasaze. Nakon jedne godine skladištenja smanjenje aktivnosti invertaze kod meda kestena iznosilo je oko 30%, meda kadulje 32 – 44 %, meda bagrema

25 – 58 %, a medljikovca 21 – 26 % ovisno o početnom toplinskom tretmanu. Nakon druge godine skladištenja zabilježen je daljnji pad do 16 % u odnosu na početne vrijednosti analiziranih uzoraka meda (**Slika 29**). Gotovo iste vrijednosti smanjenja aktivnosti invertaze objavili su Sánchez i sur. (2001.) za španjolski med kestena odnosno (-27 %) nakon jedne godine i (-40 %) nakon dvije godine skladištenja na sobnoj temperaturi na tamnom). Aktivnost glukoza-oksidaze tijekom skladištenja ovisi o vrsti meda i početnom zagrijavanju, te se prema rezultatima mogu razlikovati tri tipa promjena (**Slika 30**). Kod prvog tipa, koji je utvrđen kod meda kestena i bagrema, intenzitet smanjenja aktivnosti tijekom skladištenja bio je podjednak kod netretiranih i toplinski tretiranih uzoraka (T1 toplinski tretman) dok je kod toplinski tretiranih uzoraka tretmanom T2 pad aktivnosti bio izraženiji. Drugom tipu pripada med kadulje kod kojeg se aktivnost glukoza-oksidaze nije promijenila skladištenjem netretiranih uzoraka i uzoraka zagrijavanih na nižoj temperaturi (T1), dok je kod uzoraka zagrijavanih na višoj temperaturi (T2) uočen pad aktivnosti od 50 % odnosno 21 % u odnosu na početne vrijednosti. Najvjerojatniji razlog ove razlike u dinamici promjena je taj što je primjenom toplinskog tretmana T2 aktivnost enzima vrlo niska, a kod niske aktivnosti enzima preciznost metode je manja. Kod medljikovca (treći tip promjene), aktivnost glukoza-oksidaze nakon jedne godine neznatno je porasla da bi se vrijednosti nakon druge godine skladištenja smanjile 3 – 18 % u odnosu na početne vrijednosti ovisno o zagrijavanju. Dinamika promjena kisele fosfataze tijekom skladištenja bila je također ovisna o vrsti meda (**Slika 31**) te su i kod ovog enzima vidljiva tri tipa promjene. Kod prvog tipa, koji je utvrđen kod meda kestena i kadulje, nakon prve godine skladištenja nema vidljive promjene u aktivnosti kisele fosfataze, dok se nakon druge godine skladištenja aktivnost smanjuje. Kod meda bagrema (drugi tip) promjena aktivnosti kisele fosfataze bila je vrlo mala tijekom cijelog vremena skladištenja, dok je kod medljikovca (treći tip) nakon prve godine uočen nagli pad aktivnosti enzima (oko 60 %), a daljnjim skladištenjem aktivnost enzima ostaje ista. Sánchez i sur. (2005.b) ispitivanjem dinamike promjena aktivnosti kisele fosfataze tijekom skladištenja također su utvrdili različite trendove promjene ovisno o vrsti meda. U navedenom radu, aktivnost kisele fosfataze linearno se smanjivala tijekom dvije godine skladištenja na sobnoj temperaturi. Razlika u dinamici promjena može biti rezultat malog broja ispitivanih uzoraka te različito zemljopisno podrijetlo.

Iako je poznat i u mnogim radovima opisan utjecaj procesiranja na promjenu boje meda, podaci o promjeni boje tijekom skladištenja slabije su zastupljeni. Stoga je jedan od zadataka istraživanja bio odrediti promjenu boje meda primjenom toplinskih tretmana T1 i T2 i skladištenja, te ispitati utjecaj toplinskih tretmana na promjenu boje tijekom skladištenja. Osim toga, ispitana je prikladnost primijenjenih metoda određivanja boje s obzirom na veličinu promjena. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja boje su pokazali porast boje

kod oba toplinska tretmana svih analiziranih vrsta meda, a promjena je bila intenzivnija primjenom više temperature zagrijavanja (T1 porast do 16 %, T2 do 29 %) (**Slika 19**). Tamnjenje meda zagrijavanjem može se pripisati stvaranju Maillardovih produkata, karamelizaciji fruktoze te reakcijama fenolnih komponenata (Pereyra Gonzales i sur., 1999.; Turkmen i sur., 2006.). Naime, zagrijavanjem meda dolazi do reakcije između karbonilne skupine reducirajućih šećera i amino skupine slobodnih aminokiselina, peptida i proteina prisutnih u medu što rezultira stvaranjem smeđe obojenih polimera, melanoidina. Najizraženiji porast boje bio je kod najsvjetlijeg meda bagrema, zatim kod kadulje, kestena i medljikovca. Takav trend povećanja boje u skladu je s rezultatima Brudzynski i Miotto (2011.c) koje su ispitivanjem utjecaja zagrijavanja (121 °C/30 min) na tri vrste meda različite boje, najveći porast boje dobile kod najsvjetlije ispitivane vrste, a najmanji kod najtamnije vrste meda. Skladištenje uzoraka meda je uzrokovalo dodatno tamnjenje svih analiziranih vrsta meda, a intenzitet boje linearno se povećavao skladištenjem (**Slika 32**). Tamnjenje skladištenjem netretiranih i toplinski tretiranih uzoraka pokazuje da se produkti Maillardovih reakcija spontano stvaraju i kod toplinski netretiranih uzoraka meda. Kemijski sastav meda (visok udio reducirajućih šećera i prisutnost slobodnih aminokiselina i proteina, te nizak aktivitet vode i slabo kiseli pH) pogoduje stvaranju produkata Maillardovih reakcija i kod neprocesiranih medova tijekom skladištenja na sobnoj temperaturi (Pätzold i Brückner, 2005.; Turkmen i sur., 2006.; Brudzynski i Miotto, 2011.c). Mjerenjem boje meda pomoću Lovibond komparatora porast intenziteta boje zagrijavanjem uočen je samo kod meda kadulje (6 % kod T1 odnosno 14 % kod T2) dok kod ostalih ispitivanih vrsta promjene nije bilo (**Slika 20**). Skladištenje meda dovelo je do porasta boje i to najviše kod medljikovca (**Slika 33**). Za pravilno određivanje boje Lovibond komparatorom potrebno je da uzorci meda budu potpuno bistri, no kako je dio uzoraka tijekom vremena kristalizirao, a primjena toplinskog tretmana nije bila opravdana, neki uzorci meda kadulje i medljikovca nisu se mogli očitati na Lovibond komparatoru (vidi **Prilog 10**). Mjerenje boje kromametrom nije pokazalo promjenu svjetline analiziranih uzoraka ( $L^*$  parametra CIEL\*a\*b\* mjernog sustava) zagrijavanjem (**Slika 21**), dok je vidljiv neznatni porast crvene (kod meda kestena, kadulje i medljikovca) odnosno zelene nijanse (kod meda bagrema) (**Slika 22**). Neznatan porast žute nijanse zagrijavanjem vidljiv je kod meda bagrema i medljikovca, a smanjenje kod meda kestena i kadulje (**Slika 23**). Vidljivija promjena  $L^*$  parametra tijekom skladištenja uočljiva je samo kod kadulje (smanjenje vrijednosti prosječno 10 % nakon dvije godine skladištenja) (**Slika 34**). Promjena  $a^*$  i  $b^*$  parametara tijekom skladištenja ovisila je o vrsti meda, a najizraženija je bila kod meda bagrema (**Slike 35 i 36**). Na osnovi dobivenih podataka vidljivo je da spektrofotometrijsko određivanje boje najbolje opisuje dinamiku promjena boje te bi se ova metoda trebala primjenjivati prilikom opisivanja dinamike promjene boje zagrijavanjem i skladištenjem meda.

Nakon što su utvrđene razlike u udjelu ukupnih fenola i antioksidativnom kapacitetu analiziranih vrsta meda, ispitan je utjecaj procesiranja i skladištenja na navedene parametre kako bi se u prvom redu odredio predznak promjena (smanjenje ili povećanje), te ispitale moguće razlike u dinamici promjena antioksidativnog kapaciteta različitih vrsta meda. U literaturi postoji mali broj podataka o promjeni antioksidativnog kapaciteta procesiranjem i skladištenjem, a rezultati istraživanja se razlikuju ovisno o primijenjenim temperaturama i uvjetima skladištenja (Wang i sur., 2004.; Blasa i sur., 2006.; Turkmen i sur., 2006.; Bertoncelj, 2008.; Šarić, 2010.; Brudzynski i Miotto, 2011.c).

Promjena udjela ukupnih fenola zagrijavanjem prikazana je na **Slici 24**, dok su promjene antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodama prikazane na **Slikama 25 i 26**. Rezultati pokazuju da se udio ukupnih fenola kao i antioksidativni kapacitet meda kestena i kadulje povećao zagrijavanjem, a promjene su bile intenzivnije primjenom više temperature (T2 toplinski tretman). Prosječni porast udjela ukupnih fenola kod meda kestena iznosio je 14 % kod T1 i 36 % kod T2, meda kadulje 13 % kod T1 i 24 % kod T2. Kod meda bagrema i medljikovca zagrijavanjem na nižoj temperaturi nije uočena promjena ukupnih fenola dok je primjenom više temperature promjena bila mala. Antioksidativni kapacitet određen DPPH metodom nektarnih vrsta meda povećao je u prosjeku 9 % nakon zagrijavanja na nižoj temperaturi (T1 toplinski tretman) odnosno oko 20 % nakon zagrijavanja na višoj temperaturi (T2 toplinski tretman) (**Slika 25**). Promjena FRAP vrijednosti zagrijavanjem uzoraka bila je vidljivija u odnosu IC<sub>50</sub> vrijednosti (**Slika 26**), što se može pripisati različitom mehanizmu određivanja i komponentama koje su uključene u reakcije s reagensima. Uspoređujući promjene udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta između nektarnih vrsta, vidljivo je da je intenzitet porasta zagrijavanjem kod svih nektarnih vrsta podjednak. Porast antioksidativnog kapaciteta zagrijavanjem meda može se djelom pripisati stvaranju produkata Maillardovih reakcija, jer je poznato da neki od njih posjeduju antioksidativna svojstva (Antony i sur., 2000.; Martins i sur., 2001.). Ovoj tezi u prilog idu podaci o tamnjenju meda tijekom zagrijavanja, koja se pripisuje nastanku produkata Maillardovih reakcija. Povećanje antioksidativnog kapaciteta zagrijavanjem meda objavili su Turkmen i sur. (2006.) te Brudzynski i Miotto (2011.b; 2011.c), a porast pripisali stvaranju produkata Maillardovih reakcija i objasnili visokim korelacijama između porasta boje i antioksidativnog kapaciteta meda. Promjena neto apsorbancije meda kao i antioksidativnog kapaciteta bila je najmanja kod medljikovca. Skladištenje uzoraka dovelo je do daljnjeg povećanja udjela ukupnih fenola (**Slika 37**) kao i antioksidativnog kapaciteta (**Slike 38 i 39**) kod nektarnih vrsta, dok kod medljikovca niti nakon dvije godine skladištenja nije došlo do promjene udjela ukupnih fenola. Antioksidativni kapacitet uzoraka medljikovca određen DPPH metodom povećao se nakon jedne godine skladištenja prosječno 8 %, a

daljnjim skladištenjem nije došlo do porasta antioksidativnog kapaciteta (**Slika 38**) dok je prosječni porast antioksidativnog kapaciteta nektarnih vrsta meda nakon dvije godine skladištenja iznosio 26 – 39 %, s time da dinamika porasta antioksidativnog kapaciteta nije ovisila o prethodnom toplinskom tretmanu. Promjena FRAP vrijednosti tijekom skladištenja intenzivnija je u odnosu na  $IC_{50}$  vrijednosti, i ovisila je o prethodnom toplinskom tretmanu. Tako je najveći porast FRAP vrijednosti nakon dvije godine skladištenja bio kod netretiranih uzoraka meda kestena (75 %), kadulje (59 %) i bagrema (44 %), a najmanji kod toplinski tretiranih uzoraka tretmanom T2 (43 % kod meda kestena, 37 % kod kadulje, a 30 % kod bagrema). Kod medlijkovca nakon dvije godine skladištenja promjena antioksidativnog kapaciteta FRAP metodom bila je zanemariva. Bertoncelej (2008.) je također pratila dinamiku promjene udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta te utvrdila da skladištenjem tijekom jedne godine na sobnoj temperaturi u tamnom različitim vrsta slovenskog meda dolazi do povećanja antioksidativnog kapaciteta određenog FRAP metodom u prosjeku 7 %. Šarić (2010.) te Wang i sur. (2004.) utvrdili su smanjenje antioksidativnog kapaciteta tijekom skladištenja, no kako je skladištenje uzoraka provedeno na svjetlu, razumljive su razlike u promjeni antioksidativnog kapaciteta skladištenjem.

Iako zagrijavanjem meda primijenjenim toplinskim tretmanima kao i skladištenjem dolazi do povećanja antioksidativnog kapaciteta što se s nutritivnog aspekta smatra povoljnim, istovremeno dolazi do degradacije kakvoće meda s obzirom na smanjenje aktivnosti enzima i stvaranje HMF-a, te se preporuča med procesirati na što nižim temperaturama i konzumirati u što kraćem vremenu. Posebice treba biti oprezan kod procesiranja meda kadulje i bagrema koji su se pokazali osjetljivijim na promjene od meda kestena i medlijkovca.

## **6. ZAKLJUČCI**

- Analizom odabranih vrsta meda utvrđene su značajne razlike antioksidativnog kapaciteta ovisno o vrsti meda. Najveći antioksidativni kapacitet izmjeren je kod medljikovca, slijede med kestena, kadulje, a najniže vrijednosti antioksidativnog kapaciteta imao je med bagrema. Temeljem dobivenih vrijednosti vidljivo je da se antioksidativni kapacitet meda može koristiti kao jedan od parametara identifikacije botaničkog podrijetla meda.
- Ukupnom antioksidativnom kapacitetu meda najvećim dijelom doprinose fenolne komponente, a u manjoj mjeri prolin i glukoza-oksidaza.
- Primjenom odabranih toplinskih tretmana i nakon skladištenja dvije godine na sobnoj temperaturi u tamnom, svi uzorci meda kestena i medljikovca bili su u skladu sa zakonom propisanim zahtjevima za kakvoću meda. Kombinirani utjecaj zagrijavanja i skladištenja doveo je do toga da neki uzorci meda bagrema i kadulje već nakon jedne godine skladištenja nisu udovoljavali propisanim zahtjevima u pogledu aktivnosti diastaze i udjela HMF-a. Stoga se uvjeti zagrijavanja (temperatura i vrijeme) te duljina skladištenja trebaju prilagoditi vrsti meda.
- Zagrijavanjem i skladištenjem meda došlo je do porasta antioksidativnog kapaciteta nektarnih vrsta meda (kesten, kadulja, bagrem) dok kod medljikovca nije bilo promjene ili je ona bila neznatna.
- Iako je procesiranje i skladištenje meda uzrokovalo porast antioksidativnog kapaciteta što s nutritivnog aspekta predstavlja poželjnu promjenu, istovremeno je došlo do degradacije kakvoće meda s obzirom na smanjenje aktivnosti enzima i stvaranje HMF-a, tako da se prilikom procesiranja trebaju izabrati najpovoljniji uvjeti koji će u što većoj mjeri očuvati kakvoću meda, a osigurati željeni efekt procesiranja.

## **7. LITERATURA**



- Al ML, Daniel D, Moise A, Bobis O, Laslo L, Bogdanov S: Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry* 112:863-867, 2009.
- Alissandrakis E, Tarantilis PA, Pappas C, Harizanis PC, Polissiou M: Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa* L.) and eucalypts (*Eucalyptus globulus* Labill.) honeys and flowers to identification of botanical marker compounds. *LWT - Food Science and Technology* 44:1042-1051, 2011.
- Alonso-Torre SR, Cavia MM, Fernández-Muiño MA, Moreno G, Huidobro JF, Sancho MT: Evolution of acid phosphatase activity of honeys from different climates. *Food Chemistry* 97:750-755, 2006.
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M: Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 3:15-23, 2010a.
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Díaz, D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F, Damiani E, Astolfi P, Bompadre S, Battino M: Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology* 48:2490-2499, 2010b.
- Anklam E: A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 63:549-562, 1998.
- Anklam E, Radovic B: Suitable analytical methods for determining the origin of European honey. *American Laboratory News* 33:60-64, 2001.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K: Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127:183-198, 2002.
- Antony SM, Rieck JR, Dawson PL: Effect of dry honey on oxidation in turkey breast meat. *Poultry Science* 79:1846-1850, 2000.a
- Antony SM, Han IY, Rieck JR, Dawson PL: Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3985-3989, 2000.b
- AOAC International: *Official methods of analysis*. 17<sup>th</sup>ed., rev.1, Gaithersburg, Maryland, 2002.
- Atrott J, Henle T: Methylglyoxal in manuka honey-correlation with antibacterial properties. *Czech Journal of Food Sciences* 27:S163-S165, 2009.
- Babacan S, Pivarnik LF, Rand AG: Honey amylase activity and food starch degradation. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology* 67(5):1625-1630, 2002.
- Ball DW: The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education* 84(10):1643-1646, 2007.
- Bandoniené D, Murkovic M, Pfannhauser W, Venskutonis PR, Gruzdiené D: Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *European Food Research and Technology* 214:143-147, 2002.

- Baroni MV, Chiabrando GA, Costa C, Wunderlin DA: Assessment of the floral origin of honey by SDS-Page immunoblot techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1362-1367, 2002.
- Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH: Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology* 219:561-571, 2004.
- Benzie IFF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239:70-76, 1996.
- Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM: Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 533:185-191, 2005.
- Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl M: Enzymes as biochemical reagents. In *Methods of enzymatic analysis, vol. 1, 2nd ed.* Academic Press, Inc., New York, USA, 495-496, 1974.
- Bertoncelj J. Identifikacija in vsebnost nekaterih antioksidatnov v slovenskem medu. *Doktorska disertacija*, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2008.
- Bertoncelj J, Doberšek U, Jamnik M, Golob T: Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry* 105(2):822-828, 2007.
- Blasa M, Candiracci A, Accorsi M, Piacentini MC, Albertini MP, Piatti E: Raw *Millefiori* honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry* 97:217-222, 2006.
- Bobis O, Marghitas L, Rindt IK, Niculae M, Dezmiorean D: Honeydew honey: correlations between chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial effect. *Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii* 41(2):271-277, 2008.
- Bogdanov S: Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30(7):748-753, 1997.
- Bogdanov S: *The Book of honey*. 2009. <http://www.bee-hexagon.net/> [29.05.2010.]
- Bogdanov S, Martin P, Lüllmann C: Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie (extra issue)* 28:1-59, 1997.
- Bogdanov S, Lüllmann C, Martin P, von der Ohe W, Russmann H, Vorwohl G, Persano Oddo L, Sabatini AG, Marcazzan GL, Piro R, Flamini C, Morlot M, Lheretier J, Borneck R, Marioleas P, Tsigouri A, Kerkvliet J, Ortiz A, Ivanov T, D'Arcy B, Mossel B, Vit P: Honey quality and International regulatory standards: review of the International Honey Commission." *Bee world* 80(2):61-69, 1999a.
- Bogdanov S, Lüllmann C, Martin P, von der Ohe W, Russmann H, Vorwohl G, Persano Oddo L, Sabatini AG, Marcazzan GL, Piro R, Flamini C, Morlot M, Lheretier J, Borneck R, Marioleas P, Tsigouri A, Kerkvliet J, Ortiz A, Ivanov T, D'Arcy B, Mossel B, Vit P: Honey quality, methods of analysis and International regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 90:108-125, 1999b.
- Bogdanov S, Rouff K, Persano Oddo L: Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 35:S4-S17, 2004.

- Bogdanov S, Haldimann M, Luginbühl W, Gallmann P: Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research* 46(4):269-275, 2007.
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P: Honey for nutrition and health: a review. *American Journal of the College of Nutrition* 27:677-689, 2008.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30:609-615, 1997.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, 1976.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 28:25-30, 1995.
- Bravo L: Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56(11):317-333, 1998.
- Brudzynski K, Miotto D: The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chemistry* 124:869-874, 2011a.
- Brudzynski K, Miotto D: Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chemistry* 127:1023-1030, 2011b.
- Brudzynski K, Miotto D: The recognition of high molecular weight melanoidins as the main components responsible for radical-scavenging capacity of unheated and heat-treated Canadian honeys. *Food Chemistry* 125:570-575, 2011c.
- Bulut L, Kilic M: Kinetics of hydroxymethylfurfural accumulation and color change in honey during storage in relation to moisture content. *Journal of Processing and Preservation* 33:22-32, 2009.
- Candiracci M, Citterio B, Piatti E: Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chemistry* 131:493-499, 2012.
- Chen L, Mehta A, Berenbaum M, Zangerl AR, Engeseth NJ: Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:4997-5000, 2000.
- Codex Alimentarius Commission: Revised Codex Standard for honey. *Alinorm*, 19-26, 2001.
- Cordella CBY, Militão JSLT, Clément MC, Cabrol-Bass D: Honey characterisation and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. Honey floral species characterisation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3234-3242, 2003.
- Cotte JF, Casabianca H, Chardon S, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF: Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A* 1021:145-155, 2003.

- Cotte JF, Casabianca H, Chardon S, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF: Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380:698-705, 2004a.
- Cotte JF, Casabianca H, Giroud B, Albert M, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF: Characterisation of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:1342-1350, 2004b.
- Council of the European Union: Council Directive 2001/110/EC of Dec 20, 2001, relating to honey. *Official Journal of European Community*, L10:47-52, 2002.
- Čačić Kenjerić F, Mannino S, Benedetti S, Primorac Lj, Čačić Kenjerić D: Honey botanical origin determination by electronic nose. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 48(2):99-103, 2009.
- Čačić F, Primorac Lj, Kenjerić D, Benedetti S, Mandić ML: Application of electronic nose in honey geographical origin characterisation. *Journal of Central European Agriculture* 10(1):19-26, 2009.
- Da Costa Leite JM, Trugo LC, Costa LSM, Quinteiro LMC, Barth OM, Dutra VML, De Maria CAB: Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chemistry* 70:93-98, 2000.
- de la Fuente E, Sanz ML, Martínez-Castro I, Sanz J: Development of a robust method for the quantitative determination of disaccharides in honey by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1135:212-218, 2006.
- Devillers J, Morlot M, Pham-Delégue MH, Doré JC: Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry* 86:305-312, 2004.
- 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.
- Dimiņš F, Kūka P, Kūka M, Čakste I: The criteria of honey quality and its changes during storage and thermal treatment. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture* 16(311): 73-78, 2006.
- Escriche I, Visquert M, Juan-Borrás M, and Fito P: Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry* 112:329-338, 2009.
- Escriche I, Kadar M, Juan-Borrás M, and Domenech E: Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International* 44:1504-1513, 2011.
- Fallico B, Zappala M, Arena E, Verzera A: Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry* 85:305-313, 2004.
- Fallico B, Arena E, Zappala M: Degradation of 5-hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of Food Science* 73(9):625-631, 2008.
- Ferreres F, Giner JM, Tomás-Barberán FA: A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65:371-372, 1994.

- Ferreres F, Juan T, Pérez-Arquillué C, Herrera-Martache A, García-Viguera C, Tomás-Barberán FA: Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77:506-510, 1998.
- Frankel S, Robinson GE, Berenbaum MR: Antioxidant content and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research* 37:27-31, 1998.
- French VM, Cooper RA, Molan PC: The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56:228-231, 2005.
- Gheldof N, Engeseth NJ: Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(10):3050-3055, 2002.
- Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ: Identification and quantification of antioxidant components of honey from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21):5870-5877, 2002.
- Gil MI, Ferreres F, Ortiz A, Subra E, Tomás-Barberán FA: Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:2833-2838, 1995.
- González Paramás AM, Gómez Báñez 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(1):148-156, 2006.
- González Paramás AM, Gómez Báñez JA, García-Villanova RJ, Rivas Palá T, Ardanuy Albajar R, and Sánchez Sánchez J: Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:157-165, 2000.
- González-Miret ML, Terrab A, Hernanz D, Fernández-Recamales MA, Heredia FJ: Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2574-2580, 2005.
- Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y: Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* 23:1719-1726, 2003.
- Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikom I, Hvattum E, Remberg SF, Wold A-B, Haffner K, Baugerød, Andersen LF, Moskaug JØ, Jacobs DR, Blomhoff R: A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition* 132(3):461-471, 2002.
- Hermosín I, Chicón RM, Cabezudo MD: Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 83:263-268, 2003.
- Horn H, Hammes WP: The influence of temperature on honey quality parameters. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 98(10): 366-372, 2002.
- Huang D, Ou B, Prior RL: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856, 2005.

- Huidobro JF, Santana FJ, Sanchez MP, Sancho MT, Munitegui S, Simal-Lozano J: Diastase, invertase and  $\beta$ -glucosidase activities from north-west Spain. *Journal of Apicultural Research* 43(1):39-44, 1995.
- Huidobro JF, Sánchez MP, Muniategui S, Sancho MT: Precise method for the measurement of catalase activity in honey. *Journal of AOAC International* 88(3): 800-804, 2005.
- 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.
- Jeon M, Zhao Y: Honey in combination with vacuum impregnation to prevent enzymatic browning of fresh-cut apples. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56(3):165-176, 2005.
- Jerković I, Mastelić J, Marijanović Z: A variety of volatile compounds as markers in unifloral honey from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity* 3:1307-1316, 2006.
- Jerković I, Mastelić J, Marijanović Z, Klein Ž, Jelić M: Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and *Castanea sativa* L. *Ultrasonics Sonochemistry* 14:750-756, 2007.
- 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.
- Jones R: Honey and healing through the ages. In *Honey and healing*. International Bee Research Association, Cardiff, 1-4, 2001.
- Karabournioti S, Zervalaki P: The effect of heating on honey HMF and invertase. *Apiacta* 36(4):177-181, 2001.
- Karadag A, Ozcelik B, Saner S: Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2:41-60, 2009.
- Kenjeric D: Određivanje botaničkog podrijetla nekih vrsta monofloranog meda na temelju flavonoidnog profila određenog RP-HPLC metodom. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2004.
- Kenjeric D, Primorac Lj, Mandić ML, Bubalo D, Perl Pirički A, Flanjak I: Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) honey characterisation. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 102(10):479-484, 2006.
- Kopjar M, Piližota V, Hribar J, Simčić M: Total phenol content and antioxidant activity of water solutions of plant extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 1(1):1-7, 2009.
- Krell R: Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin* 124, 1996.
- Kropf U, Jamnik M, Bertoncej J, Golob T: Linear regression model of the ash mass fraction and electrical conductivity for Slovenian honey. *Food Technology and Biotechnology* 46(3):335-340, 2008.

- Krpan M, Marković D, Šarić G, Skoko B, Hruškar M, Vahčić N: Antioxidant activities and total phenolics of acacia honey. *Czech Journal of Food Sciences* 27:S245-S247, 2009.
- Lachman J, Orsák M, Hejtmánková A, Kovářová E: Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT-Food Science and Technology* 43:52-58, 2010.
- Lee J, Koo N, Min DB: Reactive oxygen species, aging, and antioxidant nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3:21-32, 2004.
- Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G: Methods of melissopalynology. *Bee World* 59:139-157, 1978.
- Lušić D, Nekić D, Ožanić M, Majetić V, Malenica Staver M: Odabrani pokazatelji kvalitete medljikovaca Gorskog Kotara 2006. i 2007. godine. U *44. hrvatski i 4. međunarodni simpozij agronoma*, str. 696-701. Poljoprivredni fakultet Osijek, 2009.
- MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML: Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:2046-2056, 2006.
- Manach C, Schalkert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747, 2004.
- Manyi-Loh CE, Clarke AM, Mkwetshana NF, Ndip RN: Treatment of *Helicobacter pylori* infections: Mitigating factors and prospective natural remedies. *African Journal of Biotechnology* 9(14):2032-2042, 2010.
- Manyi-Loh CE, Clarke AM, Ndip RN. An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research* 5(8):844-852, 2011.
- Martins SIFS, Jongen WMF, van Boekel MAJS: A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology* 11:364-373, 2001.
- Mateo Castro R, Jiménez Escamilla M, Bosch Reig M: Evaluation of the color of some Spanish unifloral honey types as a characterization parameter. *Jornal of AOAC International* 75(3):537-542, 1992.
- Mateo R, Bosch-Reig F: Sugar profile of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry* 60:33-41, 1997.
- Mato I, Huidobro JF, Simal-Lozano J, Sancho MT: Analytical methods for the determination of organic acids in honey. *Critical reviews in Analytical Chemistry* 36:3-11, 2006.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG: Determination of the total phenolics, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* 91:571-577, 2005.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o medu*. Narodne novine, 93/09, 2009a.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o kakvoći uniflornog meda*. Narodne novine, 122/09, 2009b.

- Molan PC: The antibacterial activity of honey. 1.The nature of antibacterial activity. *Bee World* 73:5-28, 1992.
- Molan PC: Why honey is effective as a medicine. In *Honey and healing*. International Bee Research Association, Cardiff, 5-11, 2001a.
- Molan PC: Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *American Journal of Clinical Dermatology* 2(1):13-19, 2001b.
- Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Food Science and Technology* 26(2):211-219, 2004.
- Moreira RFA, De Maria CAB, Pietroluongo M, Trugo LC: Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical condition. *Food Chemistry* 104:1236-1241, 2007.
- Mundo MA, Padilla-Zakour OI, Worobo RW: Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology* 97:1-8, 2004.
- Murakami M, Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T: Effects of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol on antioxidant activity of polyphenolic compounds. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology* 68(5):1622-1625, 2003.
- Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N: Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly and propolis. *Food Chemistry* 75:237-240, 2001.
- Nozal Nalda MJ, Bernal Yagüe JL, Diego Calvia JC, Martín Gómez MT: Classifying honeys from the Soria Province of Spain via multivariate analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382:311-319, 2005.
- 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.
- Ohno Y: CIE fundamentals for color measurements. U *NIP16: International Conference on Digital Printing technologies*, str. 540-545. Society for imaging Science and Technology, Vancouver, 2000.
- Oršolić N: Bee honey and cancer. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(4):93-103, 2009.
- Paixão N, Perestrelo R, Marques JC, Câmara JS: Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry* 105:204-214, 2007.
- Pätzold R, Brückner H: Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies in the mechanism of their formation as result of the Maillard reaction. *European Food Research and Technology* 223(3):347-354, 2005.
- Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, Del Rio D, Bianchi M, Brighenti F: Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *Molecular Nutrition & Food Research* 50:1030-1038, 2005.



- Pereyra Gonzales A, Burin L, Buera MP: Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International* 32:185-191, 1999.
- 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, Piazza MG, Sabatini AG, Accorti M: Characterisation of unifloral honeys. *Apidologie* 26:453-465, 1995.
- Persano Oddo L, Piazza MG, Pulcini P: Invertase activity in honey. *Apidologie* 30(1):57-65, 1999.
- Persano Oddo, L, Piro R: Main European unifloral honeys:descriptive sheets. *Apidologie* 35:S38-S81, 2004.
- Piasenzotto L, Gracco L, Conte L: Solid phase microextracion (SPME) applied to honey quality control. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:1037-1044, 2003.
- Piljac-Žegarac J, Stipčević T, Belščak A: Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(2):43-50, 2009.
- Porrini C, Sabatini AG, Girotti S, Ghini S, Medrzycki P, Grillenzoni F, Borlotti L, Gattavecchia E, Celli G: Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta* 38:63-70, 2003.
- Primorac Lj, Angelkov B, Mandić ML, Kenjerić D, Nedeljko M, Flanjak I, Perl Pirički A, Arapčeska M: Comparison of the Croatian and Macedonian honeydew honey. *Journal of Central European Agriculture* 10(3):263-270, 2009.
- Primorac Lj, Flanjak I, Kenjerić D, Bubalo D, Topoljnjak Z: Specific rotation and carbohydrate profile of Croatian unifloral honeys. *Czech Journal of Food Sciences* 29:515-519, 2011a.
- Primorac Lj, Flanjak I, Cvijetić M, Đapić Z: Electrical conductivity and ash content of selected honey types. U *International Scientific and Professional Conference 13th Ruzicka days "Today science-tomorrow industry"*, str. 406-411. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011b.
- Prior RL, Wu X, Schaich K: Standardised methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10):4290-4302, 2005.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F: Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric Reducing/Antioxidant Power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(8):3396-3402, 2000.
- Ruiz-Matute AI, Brokl M, Soria AC, Sanz ML, Martínez-Castro I: Gas chromatographic-mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chemistry* 120:637-642, 2010.
- Sánchez, MP, Huidobro JF, Mato I, Muniategui S, Sancho MT: Evolution of invertase activity in honey over two years. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:416-422, 2001.

- Sánchez MP, Huidobro JF, Muniategui S, Sancho MT: Evolution of catalase activity during the storage of honey. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 101:62-65, 2005a.
- Sánchez MP, Huidobro JF, Muniategui S, Sancho MT: Evolution of acid phosphatase activity during the storage of honey. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 101:9-15, 2005b.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F: A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76:270-276, 1998.
- Sancho MT, Muniategui S, Huidobro JF, Lozano JS: Aging of honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(1):134-138, 1992.
- Sanz ML, Polemis N, Morales V, Corzo N, Drakoularakou A, Gibson GR, Rastall RA: In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2914-2921, 2005.
- Schepartz AI, Subers MH: The glucose oxidase of honey. I. Purification and some general properties of the enzyme. *Biochimica et biophysica acta* 85:228-237, 1964.
- Scherer R, Teixeira Godoy H: Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* 112:654-658, 2009.
- Serra Bonvehi J, Torrentó MS, Raich JM: Invertase activity in fresh and processed honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:507-512, 2000.
- Shamala TR, Shri Jyothi Y, Saibaba P: Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Letters in Applied Microbiology* 30:453-455, 2000.
- Silván JM, van de Lagemaat J, Olano A, del Castillo MD: Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1543-1551, 2006.
- Singh N, Bath PK: Relationship between heating and hydroxymethylfurfural formation in different honey types. *International Journal of Food Science and Technology* 35:154-156, 1998.
- Singhal RS, Kulkarni PR, Rege DV: Honey: Quality Criteria. In *Handbook of indices of food quality*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 358-379, 1997.
- Singleton VL, Ortofer R, Lamuela-Raventós RM: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299:152-178, 1999.
- Soria AC, González M, de Lorenzo C, Martínez-Castro I, Sanz J: Estimation of the honeydew ratio in honey samples from their physicochemical data and from their volatile composition obtained by SPME and GC-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:817-824, 2005.
- Sreeramulu D, Raghunath M: Antioxidant and phenolic content of nuts, oil seeds, milk and milk products commonly consumed in India. *Food and Nutrition Sciences* 2:422-427, 2011.
- Subramanian R, Umesh Hebbar H, Rastogi NK: Processing of honey: a review. *International Journal of Food Properties* 10:127-143, 2007.

- Šarić G: Flavonoidi u medu-udjel i pormjene tijekom skladištenja te njihov utjecaj na antioksidacijska svojstva meda. *Doktorska disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2010.
- Šarić G, Matković D, Hruškar M, Vahčić N: Characterisation and classification of Croatian honey by physicochemical parameters. *Food Technology and Biotechnology* 46(4):355-367, 2008.
- Terrab A, González AG, Díez MJ, Heredia FJ: Mineral content and electrical conductivity of honeys produced in Northwest Marocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:637-643, 2003.
- Tomás-Barberán FA, Martos I, Ferreres F, Radovic BS, Anklam E: HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(5):485-496, 2001.
- Tosi E, Ciappini M, Ré E, Lucero H: Honey heating treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry* 77:71-74, 2002.
- Tosi EA, Ré E, Lucero H, Bulacio L: Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 37:669-678, 2004.
- Tosi E, Martinet R, Ortega M, Lucero H, Ré E: Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry* 106:883-887, 2008.
- Tsiapara AV, Jaakkola M, Chinou I, Graikou K, Tolonen T, Virtanen V, Moutsatsou P: Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7); prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chemistry* 116:702-708, 2009.
- Turhan I, Tetik N, Karhan M, Gurel F, Reyhan Tavukcuoglu H: Quality of honeys influenced by thermal treatment. *LWT-Food Science and Technology* 41(8):1396-1399, 2008.
- Turkmen N, Sari F, Poyrazoglu ES, Veliglu YS: Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry* 95(4):653-657, 2006.
- Vela L, de Lorenzo C, Pérez RA: Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1069-1075, 2007.
- Villamiel M, del Castillo MD, Corzo N, Olano A: Presence of furosine in honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:790-793, 2001.
- Vinson JA, Proch J, Bose P: Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. *Methods in Enzymology* 335:103-114, 2001.
- Von der Ohe K, von der Ohe W: Celle's melissopylinological collection. Celle: Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, 2003.
- Wang X-H, Gheldof N, Engeseth NJ: Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology* 69(2):96-101, 2004.
- Weigel KU, Opitz T, Henle T: Studies of the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey. *European Food Research and Technology* 218:147-151, 2004.

- Weston RJ: The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food chemistry* 71:235-239, 2000.
- Weston RJ, Brocklebank LK, Lu Y: Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chemistry* 70:427-435, 2000.
- Weston RJ, Mitchell KR, Allen KL: Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry* 64:295-301, 1999.
- White JW, Subers MH, Schepartz AI: The identification of inihbine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta* 73:57-70, 1963.
- White JW, Kushnir I, Subers MH: Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Food Technology* 18(4):153-156, 1964.
- White, JW, Doner LW: Honey composition and properties. *Beekeeping in the United States: Agriculture Handbook* 335:82-91, 1980.
- White JW: Honey. In *The Hive and the Honey Bee*. Dadant&Sons, Hamilton, Illinois, 869-918, 2000.
- Won SR, Lee DC, Ko SH, Kim JW, Rhee HI: Honey major protein characterisation and its application to adulteration detection. *Food Research International* 41:952-956, 2008.
- Zallibera M, Staško A, Šlebodová A, Jančovičová V, Čermáková T, Brezová V: Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys - An electron paramagnetic resonance study. *Food Chemistry* 110:512-521, 2008.

## **8. PRILOZI**

**Prilog 1** Promjena HMF-a i aktivnosti enzima zagrijavanjem uzoraka meda

(kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B) i medljikovac (MD)) toplinskim tretmanima T1 (45 °C/48 h) i T2 (65 °C/6 h)

Uzorci meda	Udio HMF [mg/kg]			Aktivnost dijastaze [DN]			Aktivnost invertaze [U/kg]			Aktivnost glukoza-oksidge [µg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /h g]			Aktivnost kisele fosfataze [mg P/100g meda/24h]		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	0,0	0,0	0,2	22,0	18,7	16,7	146,9	132,2	94,8	197,1	192,7	78,1	35,7	24,6	17,3
KS2	1,8	2,1	3,2	28,6	25,0	21,0	163,2	130,6	44,0	298,2	282,0	32,4	68,4	42,0	39,0
KS3	0,2	1,4	3,0	26,8	22,4	17,7	157,3	123,1	31,3	105,1	99,0	13,2	58,8	43,2	28,7
KS4	6,2	7,5	9,5	16,9	16,3	13,6	90,5	89,5	29,9	308,3	306,0	72,9	55,2	51,1	48,8
KS5	0,0	0,0	0,0	18,9	17,6	14,5	116,2	102,0	44,9	154,7	155,9	27,0	74,3	54,9	52,1
KS6	0,0	0,0	1,2	28,0	25,3	21,1	164,9	153,1	66,7	241,7	236,3	39,2	82,2	68,5	54,2
KS7	0,0	0,3	1,7	29,9	26,0	22,2	175,3	164,9	73,2	217,0	216,0	26,6	92,3	72,1	51,6
$\bar{X}$	1,2	1,6	2,7	24,4	21,6	18,1	144,9	127,9	55,0	217,4	212,6	41,3	66,7	50,9	41,7
SD	2,3	2,7	3,2	5,1	4,0	3,4	30,6	26,5	24,0	73,4	71,4	24,7	18,8	16,4	14,1
KD1	2,6	3,5	5,9	17,4	16,4	13,1	86,2	62,0	3,7	187,4	187,2	7,6	34,4	30,5	22,4
KD2	2,0	3,3	5,9	9,8	8,7	7,0	60,5	44,4	5,5	108,6	104,5	16,9	37,4	32,7	27,0
KD3	2,1	3,5	6,5	18,3	16,4	12,9	107,6	71,2	4,6	247,0	237,2	26,0	39,3	27,5	25,1
KD4	2,0	2,3	5,7	21,8	19,4	15,6	76,5	46,7	4,2	185,6	173,7	7,3	46,3	39,0	36,8
KD5	1,4	1,7	3,8	20,3	19,1	13,9	131,8	107,6	16,9	389,4	357,1	116,6	79,2	56,5	36,6
$\bar{X}$	2,0	2,9	5,6	17,5	16,0	12,5	92,5	66,4	7,0	223,6	211,9	34,9	47,3	37,2	29,6
SD	0,4	0,8	1,0	4,6	4,3	3,3	27,8	25,6	5,6	104,9	94,0	46,3	18,4	11,6	6,7
B1	0,0	0,5	0,9	12,9	11,9	9,6	75,3	60,4	11,7	28,2	25,4	1,53	98,9	98,4	48,0
B2	0,0	0,2	0,0	13,9	12,9	10,4	39,5	25,5	7,2	28,2	23,3	0	83,9	80,4	50,5
B3	0,9	2,4	3,5	7,5	6,9	6,0	40,1	28,4	6,2	1,5	0,0	0	101,1	71,1	46,9
B4	2,4	4,8	5,7	13,7	13,1	11,7	91,2	74,7	18,0	144,0	138,6	17,1	90,3	82,1	59,8
B5	0,0	0,2	0,4	12,7	12,0	10,8	41,6	24,4	5,0	28,2	26,1	2,4	90,3	76,3	63,7
$\bar{X}$	0,7	1,6	2,1	12,1	11,4	9,7	57,5	42,7	9,6	46,0	42,7	4,2	92,9	81,7	53,8
SD	1,0	2,0	2,4	2,6	2,5	2,2	24,1	23,3	5,3	56,0	54,7	7,3	7,0	10,3	7,5
MD1	0,0	0,0	0,0	12,8	12,5	10,6	115,8	95,1	57,0	357,0	324,4	171,0	64,3	59,4	33,1
MD2	0,0	0,0	0,5	33,4	31,8	25,5	223,9	186,3	44,8	298,7	241,3	126,9	406,8	387,7	346,1
MD3	0,0	0,2	0,0	16,1	15,1	13,2	160,8	139,5	94,5	380,3	364,4	301,4	81,4	75,6	76,5
MD4	0,0	0,0	2,5	37,3	31,3	27,4	277,9	261,5	161,9	352,4	290,6	212,2	281,2	217,5	148,6
MD5	0,7	0,9	0,8	19,9	18,2	15,4	149,9	136,2	64,1	384,8	355,5	256,6	176,8	148,6	123,0
$\bar{X}$	0,1	0,2	0,8	23,9	21,8	18,4	185,7	163,7	84,5	354,6	315,2	213,6	202,1	177,8	145,5
SD	0,3	0,4	1,0	10,8	9,1	7,6	64,7	63,5	47,0	34,3	50,5	68,7	143,5	133,2	120,6

**Prilog 2** Promjena boje određene spektrofotometrijski (neto apsorbancija), pomoću Lovibond komparatora i kromametrom (CIEL\*a\*b\*) zagrijavanjem uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B) i medljikovac (MD)) toplinskim tretmanima T1 (45 °C/48 h) i T2 (65 °C/6 h)

Uzorci meda	Neto apsorbancija [mAU]			Boja Lovibond [mm Pfund]			L*			a*			b*		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	409	425	487	63	62	62	32,28	31,53	31,48	8,35	7,97	8,96	11,06	9,55	10,07
KS2	383	409	436	65	64	64	31,50	31,36	31,52	7,23	8,09	8,61	9,48	9,66	9,62
KS3	440	463	501	64	64	65	32,17	31,22	30,67	9,14	8,90	8,64	10,95	9,23	8,42
KS4	457	478	535	65	65	67	31,17	30,41	30,38	9,23	8,57	8,58	8,48	8,07	7,58
KS5	270	279	338	55	58	62	33,82	34,28	33,57	6,61	7,67	7,91	13,33	14,24	13,33
KS6	380	401	451	64	63	64	32,39	32,61	32,55	7,83	8,93	9,39	11,11	11,78	11,51
KS7	439	489	527	68	67	67	31,32	31,16	31,15	8,11	8,73	9,14	9,57	9,44	9,27
$\bar{X}$	397	421	468	63	63	64	32,09	31,80	31,62	8,07	8,41	8,75	10,57	10,28	9,97
SD	63	71	68	4	3	2	0,90	1,27	1,11	0,95	0,50	0,48	1,57	2,06	1,93
KD1	179	188	218	41	44	50	37,46	35,92	35,02	5,93	6,26	7,37	18,85	16,20	15,22
KD2	200	212	233	47	51	53	34,71	34,04	34,01	7,63	7,47	8,29	14,84	13,56	13,50
KD3	285	310	354	57	59	64	34,34	32,73	32,80	8,40	6,52	8,35	14,05	11,34	11,81
KD4	213	249	259	54	56	58	35,18	35,60	34,74	6,68	7,51	8,20	15,59	16,27	14,88
KD5	265	282	313	47	49	54	34,41	34,20	33,65	7,48	7,79	8,21	14,40	13,98	13,56
$\bar{X}$	228	248	275	49	52	56	35,22	34,50	34,04	7,22	7,11	8,08	15,55	14,27	13,79
SD	45	50	57	6	6	5	1,30	1,29	0,89	0,95	0,68	0,40	1,93	2,06	1,35
B1	26	31	39	3	3	5	45,30	45,54	45,57	-1,25	-1,34	-1,45	9,51	10,43	11,62
B2	24	27	31	2	2	3	46,47	45,44	46,63	-1,22	-1,24	-1,41	7,71	8,30	9,49
B3	33	35	39	5	4	5	45,03	44,65	44,77	-1,06	-1,00	-1,07	12,48	13,04	13,70
B4	55	64	68	8	7	8	43,56	43,50	43,41	-0,90	-0,85	-0,68	17,66	17,64	18,90
B5	19	23	23	2	1	1	47,56	47,18	47,23	-1,08	-1,19	-1,26	5,39	6,19	6,78
$\bar{X}$	31	36	40	4	3	4	45,58	45,26	45,52	-1,10	-1,12	-1,17	10,55	11,12	12,10
SD	14	16	17	3	2	3	1,51	1,35	1,51	0,14	0,20	0,31	4,74	4,44	4,59
MD1	218	235	259	60	62	58	30,63	31,52	33,20	4,36	5,45	7,66	7,43	8,85	12,03
MD2	909	979	932	122	112	116	26,67	26,69	26,56	1,14	1,15	1,58	1,05	1,17	1,20
MD3	291	309	338	N.O.	N.O.	N.O.	30,85	30,39	29,92	1,10	1,13	1,16	5,56	5,15	4,71
MD4	846	881	1020	95	97	96	27,80	27,74	27,76	2,84	3,03	3,04	2,74	2,71	2,78
MD5	328	387	387	76	79	72	28,75	29,22	30,18	3,04	4,65	6,51	4,25	5,27	6,89
$\bar{X}$	518	558	587	88	88	86	28,94	29,11	29,52	2,50	3,08	3,99	4,21	4,63	5,52
SD	331	345	359	27	22	26	1,80	1,95	2,55	1,39	1,98	2,94	2,47	2,92	4,22

N.O. nema očitavanja

**Prilog 3** Promjena udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta (DPPH i FRAP metodama) zagrijavanjem uzoraka meda (kesten (KS), kadulja (KD), bagrem (B) i medljikovac (MD)) toplinskim tretmanima T1 (45 °C/48 h) i T2 (65 °C/6 h)

Uzorci meda	Udio ukupnih fenola [mg galne kis./kg meda]			DPPH (IC <sub>50</sub> ) [mg/mL]			FRAP [μMFe(II)]		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	166,1	197,8	243,4	17,02	14,79	13,49	278,3	339,8	396,4
KS2	149,8	169,9	192,5	17,25	14,84	14,11	259,3	283,3	331,7
KS3	150,2	167,5	200,2	14,59	13,39	13,24	256,9	299,5	350,2
KS4	182,9	207,4	234,2	13,84	12,91	11,80	349,3	368,6	417,1
KS5	130,1	146,4	185,3	21,36	18,36	16,67	220,0	235,7	321,9
KS6	147,4	166,6	197,8	18,22	16,01	14,76	260,5	298,3	361,0
KS7	167,5	186,7	229,4	15,10	13,56	12,86	292,9	324,5	412,6
$\bar{X}$	156,3	177,5	211,8	16,77	14,84	13,85	273,9	307,1	370,1
SD	17,2	20,9	23,2	2,57	1,88	1,56	40,1	42,7	38,7
KD1	77,8	82,1	89,3	27,85	26,89	23,84	112,9	130,0	145,5
KD2	77,3	92,2	99,8	31,16	27,18	22,48	118,3	122,9	147,6
KD3	107,0	121,0	131,5	20,14	18,15	15,62	197,9	200,5	248,3
KD4	82,1	94,6	102,7	25,43	23,01	19,72	130,5	151,2	183,8
KD5	110,4	123,8	139,2	18,65	17,75	14,74	188,6	215,5	248,1
$\bar{X}$	90,9	102,7	112,5	24,65	22,60	19,28	149,6	164,0	194,7
SD	16,4	18,6	21,6	5,23	4,55	4,04	40,4	41,8	51,2
B1	42,7	45,6	53,8	105,48	103,87	84,44	48,6	54,0	59,5
B2	36,0	37,4	40,3	127,70	127,44	105,79	40,7	45,2	49,0
B3	39,8	40,8	44,2	101,12	98,00	92,87	43,3	52,1	55,2
B4	52,3	57,1	67,2	73,50	61,88	63,33	59,3	65,7	73,8
B5	28,3	30,2	34,6	201,36	169,07	142,50	25,2	32,6	36,7
$\bar{X}$	39,8	42,2	48,0	121,83	112,05	97,79	43,4	50,0	54,9
SD	8,8	10,0	12,8	48,45	39,59	29,38	12,4	12,2	13,7
MD1	281,8	290,9	294,7	9,22	8,98	8,78	622,1	626,7	627,9
MD2	494,9	498,2	530,9	3,46	3,47	3,56	1078,3	1084,5	1105,0
MD3	214,6	220,3	232,3	11,47	11,24	11,11	452,4	457,6	499,8
MD4	338,9	347,0	385,0	8,63	8,30	7,72	693,8	730,5	767,4
MD5	229,0	240,0	244,3	10,57	9,85	9,34	495,0	507,6	534,3
$\bar{X}$	311,8	319,3	337,4	8,67	8,37	8,10	668,3	681,4	706,9
SD	113,4	111,4	123,7	3,12	2,95	2,82	248,8	249,1	245,5



**Prilog 4** Promjena udjela HMF-a nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	Udio HMF [mg/kg]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5	0,0	1,7	2,3	3,8
KS2	1,8	2,1	3,2	6,9	8,1	11,4	16,8	18,3	23,7
KS3	0,2	1,4	3,0	12,5	13,8	18,3	16,4	23,9	28,9
KS4	6,2	7,5	9,5	12,2	12,6	19,2	18,2	20,3	27,3
KS5	0,0	0,0	0,0	4,2	4,4	6,2	7,1	7,2	9,0
KS6	0,0	0,0	1,2	1,2	4,7	5,9	8,6	12,8	12,0
KS7	0,0	0,3	1,7	3,6	6,6	9,3	13,7	14,7	18,9
$\bar{X}$	1,2	1,6	2,7	5,8	7,2	10,0	11,8	14,2	17,7
SD	2,3	2,7	3,2	5,0	4,7	6,9	6,1	7,5	9,6
KD1	2,6	3,5	5,9	20,3	25,1	34,9	41,8	48,5	61,0
KD2	2,0	3,3	5,9	14,9	18,9	27,7	31,0	37,3	47,8
KD3	2,1	3,5	6,5	20,3	23,3	30,2	39,5	44,8	59,6
KD4	2,0	2,3	5,7	21,9	27,1	40,3	46,9	53,8	69,7
KD5	1,4	1,7	3,8	12,8	14,6	21,6	27,0	34,0	40,6
$\bar{X}$	2,0	2,9	5,6	18,0	21,8	30,9	37,2	43,7	55,7
SD	0,4	0,8	1,0	4,0	5,0	7,1	8,1	8,1	11,5
B1	0,0	0,5	0,9	7,4	10,2	13,1	19,0	23,0	27,4
B2	0,0	0,2	0,0	4,2	7,2	10,0	13,2	16,3	21,0
B3	0,9	2,4	3,5	8,7	11,2	14,0	19,9	23,5	26,9
B4	2,4	4,8	5,7	12,4	15,7	20,2	24,0	30,3	32,8
B5	0,0	0,2	0,4	4,6	6,4	8,8	13,2	16,5	20,1
$\bar{X}$	0,7	1,6	2,1	7,5	10,1	13,2	17,9	21,9	25,6
SD	1,0	2,0	2,4	3,3	3,7	4,5	4,7	5,8	5,2
MD1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,9	0,9	1,5
MD2	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	1,1	1,4	2,4	2,8
MD3	0,0	0,2	0,0	0,3	0,5	0,8	1,5	2,6	2,6
MD4	0,0	0,0	2,5	0,3	0,3	1,5	2,1	3,6	5,3
MD5	0,7	0,9	0,8	0,0	0,0	0,9	0,2	0,5	2,0
$\bar{X}$	0,1	0,2	0,8	0,2	0,4	0,9	1,2	2,0	2,8
SD	0,3	0,4	1,0	0,2	0,3	0,6	0,7	1,3	1,5

**Prilog 5** Promjena aktivnosti dijastaze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	Aktivnost dijastaze [DN]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	22,0	18,7	16,7	18,9	18,0	15,9	18,7	17,7	13,9
KS2	28,6	25,0	21,0	22,0	20,8	18,8	21,7	20,1	17,4
KS3	26,8	22,4	17,7	18,4	16,6	15,3	17,8	15,4	14,1
KS4	16,9	16,3	13,6	15,0	14,2	12,5	14,6	13,0	11,9
KS5	18,9	17,6	14,5	16,5	15,8	14,0	16,2	15,3	13,3
KS6	28,0	25,3	21,1	23,5	21,6	19,4	21,9	20,7	17,4
KS7	29,9	26,0	22,2	24,6	22,5	20,0	23,0	21,9	19,3
$\bar{X}$	24,4	21,6	18,1	19,8	18,5	16,6	19,1	17,7	15,3
SD	5,1	4,0	3,4	3,6	3,2	2,9	3,2	3,3	2,7
KD1	17,4	16,4	13,1	14,3	13,2	11,9	13,1	12,6	10,8
KD2	9,8	8,7	7,0	7,5	6,9	6,0	6,7	6,5	5,4
KD3	18,3	16,4	12,9	13,7	12,5	11,0	12,4	11,7	10,0
KD4	21,8	19,4	15,6	15,8	14,3	12,0	13,3	13,1	10,9
KD5	20,3	19,1	13,9	15,7	14,9	12,5	14,2	13,5	11,8
$\bar{X}$	17,5	16,0	12,5	13,4	12,4	10,7	11,9	11,5	9,8
SD	4,6	4,3	3,3	3,4	3,2	2,7	3,0	2,9	2,5
B1	12,9	11,9	9,6	10,9	10,3	9,0	8,9	8,5	7,8
B2	13,9	12,9	10,4	11,6	10,7	10,0	9,3	9,1	8,1
B3	7,5	6,9	6,0	6,3	6,0	5,3	5,3	5,1	4,6
B4	13,7	13,1	11,7	12,5	11,4	10,3	10,9	10,5	9,9
B5	12,7	12,0	10,8	10,4	10,1	9,0	8,8	8,4	7,7
$\bar{X}$	12,1	11,4	9,7	10,3	9,7	8,7	8,6	8,3	7,6
SD	2,6	2,5	2,2	2,4	2,1	2,0	2,0	2,0	1,9
MD1	12,8	12,5	10,6	10,9	10,4	9,4	9,9	9,7	8,5
MD2	33,4	31,8	25,5	28,8	26,6	23,4	25,7	23,3	19,7
MD3	16,1	15,1	13,2	14,1	13,6	12,1	12,6	12,4	11,3
MD4	37,3	31,3	27,4	29,7	29,1	26,0	28,8	28,4	24,5
MD5	19,9	18,2	15,4	17,3	16,0	14,7	15,5	15,0	13,4
$\bar{X}$	23,9	21,8	18,4	20,2	19,1	17,1	18,5	17,8	15,5
SD	10,8	9,1	7,6	8,6	8,2	7,2	8,3	7,8	6,5

**Prilog 6** Promjena aktivnosti invertaze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2)  
uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	Aktivnost invertaze [U/kg]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	146,9	132,2	94,8	99,1	92,2	71,6	86,0	81,9	64,5
KS2	163,2	130,6	44,0	99,0	82,2	29,8	81,8	70,9	26,2
KS3	157,3	123,1	31,3	85,4	66,6	21,4	67,9	53,9	20,1
KS4	90,5	89,5	29,9	76,0	72,8	22,9	67,3	64,9	21,9
KS5	116,2	102,0	44,9	85,5	75,0	34,7	70,6	69,3	32,6
KS6	164,9	153,1	66,7	112,9	101,6	45,9	94,0	88,1	39,0
KS7	175,3	164,9	73,2	124,0	109,8	40,3	105,1	91,0	37,5
$\bar{X}$	144,9	127,9	55,0	97,4	85,7	38,1	81,8	74,3	34,5
SD	30,6	26,5	24,0	16,8	16,0	17,2	14,4	13,3	15,1
KD1	86,2	62,0	3,7	55,3	38,3	2,5	44,0	32,0	2,3
KD2	60,5	44,4	5,5	38,9	29,3	2,4	30,2	24,0	2,9
KD3	107,6	71,2	4,6	65,5	47,9	4,0	52,4	38,8	2,2
KD4	76,5	46,7	4,2	42,5	29,9	2,2	35,3	23,3	1,8
KD5	131,8	107,6	16,9	89,1	79,2	8,5	80,1	66,1	9,4
$\bar{X}$	92,5	66,4	7,0	58,3	44,9	3,9	48,4	36,8	3,7
SD	27,8	25,6	5,6	20,2	20,6	2,7	19,6	17,5	3,2
B1	75,3	60,4	11,7	60,3	47,0	6,5	47,3	38,4	6,1
B2	39,5	25,5	7,2	28,4	17,2	1,9	20,1	14,4	1,9
B3	40,1	28,4	6,2	27,4	20,7	3,7	21,8	17,8	3,3
B4	91,2	74,7	18,0	68,2	57,4	6,5	58,2	50,8	8,3
B5	41,6	24,4	5,0	31,6	17,8	1,4	21,7	13,5	2,2
$\bar{X}$	57,5	42,7	9,6	43,2	32,0	4,0	33,8	27,0	4,4
SD	24,1	23,3	5,3	19,5	18,8	2,4	17,7	16,7	2,8
MD1	115,8	95,1	57,0	77,7	72,2	46,1	64,9	61,8	40,3
MD2	223,9	186,3	44,8	161,5	140,4	29,5	132,7	117,6	22,6
MD3	160,8	139,5	94,5	121,4	110,8	77,7	97,1	92,2	66,9
MD4	277,9	261,5	161,9	218,7	204,5	125,4	160,5	153,4	101,2
MD5	149,9	136,2	64,1	104,3	98,8	55,1	88,5	83,4	48,7
$\bar{X}$	185,7	163,7	84,5	136,7	125,3	66,8	108,7	101,7	55,9
SD	64,7	63,5	47,0	55,0	50,6	37,1	37,8	35,2	29,9

**Prilog 7** Promjena aktivnosti glukoza-oksidge nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih  
(T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	Aktivnost glukoza-oksidge [ $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{h g}$ ]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	197,1	192,7	78,1	147,3	135,2	38,0	131,1	128,3	42,3
KS2	298,2	282,0	32,4	257,8	230,0	14,8	236,0	224,1	23,3
KS3	105,1	99,0	13,2	94,3	96,0	7,9	71,2	72,3	9,4
KS4	308,3	306,0	72,9	284,4	211,9	30,2	273,1	260,5	40,8
KS5	154,7	155,9	27,0	137,5	111,1	11,9	91,4	104,3	15,2
KS6	241,7	236,3	39,2	197,4	130,8	13,4	159,4	151,9	16,8
KS7	217,0	216,0	26,6	161,6	134,8	7,0	131,8	126,3	14,2
$\bar{X}$	217,4	212,6	41,3	182,9	150,0	17,6	156,3	152,5	23,1
SD	73,4	71,4	24,7	68,0	50,8	11,8	73,8	66,9	13,2
KD1	187,4	187,2	7,6	204,6	195,0	7,5	218,1	209,9	23,1
KD2	108,6	104,5	16,9	112,1	100,7	4,5	114,8	110,7	8,8
KD3	247,0	237,2	26,0	252,6	228,6	18,9	251,9	239,9	22,0
KD4	185,6	173,7	7,3	189,8	180,7	3,9	173,1	160,5	4,7
KD5	389,4	357,1	116,6	357,7	328,4	51,5	342,3	339,2	79,2
$\bar{X}$	223,6	211,9	34,9	223,4	206,7	17,3	220,0	212,0	27,6
SD	104,9	94,0	46,3	90,5	82,7	20,1	85,5	86,4	30,0
B1	28,2	25,4	1,53	26,2	26,2	0,4	28,4	24,3	1,0
B2	28,2	23,3	0,0	24,4	21,0	0,0	28,7	23,4	0,0
B3	1,5	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	3,3	0,9	0,0
B4	144,0	138,6	17,1	83,3	58,7	8,4	89,2	24,2	8,6
B5	28,2	26,1	2,4	20,6	16,2	0,3	22,3	17,2	0,5
$\bar{X}$	46,0	42,7	4,2	31,2	24,4	1,8	34,4	18,0	2,0
SD	56,0	54,7	7,3	30,8	21,5	3,7	32,3	10,0	3,7
MD1	357,0	324,4	171,0	360,3	326,8	178,6	318,9	300,3	148,3
MD2	298,7	241,3	126,9	326,1	329,2	180,4	290,0	266,2	132,6
MD3	380,3	364,4	301,4	380,1	379,1	274,7	316,2	307,8	218,8
MD4	352,4	290,6	212,2	363,8	341,9	209,5	343,5	296,8	156,5
MD5	384,8	355,5	256,6	388,6	383,1	259,7	370,4	362,3	224,2
$\bar{X}$	354,6	315,2	213,6	363,8	352,0	220,6	327,8	306,7	176,1
SD	34,3	50,5	68,7	24,1	27,2	44,6	30,4	34,9	42,4

**Prilog 8** Promjena aktivnosti kisele fosfataze nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	Aktivnost kisele fosfataze [mg P/100 g meda/24h]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	35,7	24,6	17,3	33,3	23,0	21,5	32,1	25,4	28,0
KS2	68,4	42,0	39,0	65,7	46,0	32,2	47,7	48,5	44,3
KS3	58,8	43,2	28,7	54,0	47,0	32,7	46,9	33,7	35,7
KS4	55,2	51,1	48,8	73,1	48,5	51,0	45,1	38,6	36,1
KS5	74,3	54,9	52,1	75,6	58,9	47,3	37,8	38,8	39,2
KS6	82,2	68,5	54,2	86,6	71,0	51,5	55,4	49,1	45,3
KS7	92,3	72,1	51,6	92,4	72,9	54,3	58,9	62,3	51,4
$\bar{X}$	66,7	50,9	41,7	68,7	52,5	41,5	46,3	42,3	40,0
SD	18,8	16,4	14,1	20,1	17,1	12,6	9,3	12,0	7,7
KD1	34,4	30,5	22,4	34,1	30,5	24,4	37,2	40,0	39,6
KD2	37,4	32,7	27,0	34,5	34,3	26,7	31,9	30,3	25,2
KD3	39,3	27,5	25,1	38,5	30,8	24,5	49,3	43,5	30,9
KD4	46,3	39,0	36,8	50,7	41,7	32,2	37,6	47,5	34,9
KD5	79,2	56,5	36,6	77,0	55,6	37,7	11,0	10,2	1,2
$\bar{X}$	47,3	37,2	29,6	47,0	38,6	29,1	33,4	34,3	26,4
SD	18,4	11,6	6,7	18,1	10,5	5,8	14,0	14,9	15,0
B1	98,9	98,4	48,0	59,9	67,2	52,4	58,7	57,1	54,4
B2	83,9	80,4	50,5	81,6	65,1	52,8	76,2	66,0	52,6
B3	101,1	71,1	46,9	82,3	70,1	49,3	80,6	71,9	47,9
B4	90,3	82,1	59,8	89,4	83,5	58,8	87,3	83,7	63,5
B5	90,3	76,3	63,7	91,0	76,9	65,4	93,8	79,8	63,0
$\bar{X}$	92,9	81,7	53,8	80,8	72,5	55,7	79,3	71,7	56,3
SD	7,0	10,3	7,5	12,4	7,6	6,4	13,3	10,7	6,8
MD1	64,3	59,4	33,1	21,3	20,3	16,4	21,1	21,8	18,3
MD2	406,8	387,7	346,1	179,3	175,7	168,8	179,9	173,5	172,7
MD3	81,4	75,6	76,5	40,2	31,3	23,4	37,0	32,7	22,5
MD4	281,2	217,5	148,6	114,3	80,0	54,4	114,7	84,9	49,8
MD5	176,8	148,6	123,0	66,8	70,3	53,2	57,9	57,1	51,2
$\bar{X}$	202,1	177,8	145,5	84,4	75,5	63,2	82,1	74,0	62,9
SD	143,5	133,2	120,6	63,5	61,4	61,4	65,1	60,7	63,2

**Prilog 9** Promjena boje (neto apsorbancija) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	Neto apsorbancija [mAU]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	409	425	487	586	621	734	800	846	980
KS2	383	409	436	488	577	622	654	664	771
KS3	440	463	501	648	686	765	909	929	1062
KS4	457	478	535	501	515	618	621	639	744
KS5	270	279	338	402	433	489	489	539	592
KS6	380	401	451	553	584	653	662	708	823
KS7	439	489	527	674	723	849	845	895	999
$\bar{X}$	397	421	468	550	591	676	711	746	853
SD	63	71	68	95	99	118	146	146	168
KD1	179	188	218	268	288	356	364	383	457
KD2	200	212	233	266	286	346	351	379	453
KD3	285	310	354	379	411	463	480	525	609
KD4	213	249	259	330	343	408	407	446	556
KD5	265	282	313	359	373	460	427	472	564
$\bar{X}$	228	248	275	320	340	407	406	441	528
SD	45	50	57	52	54	55	52	62	69
B1	26	31	39	53	64	75	69	83	89
B2	24	27	31	44	47	53	54	59	64
B3	33	35	39	50	56	62	68	77	79
B4	55	64	68	86	88	101	103	119	124
B5	19	23	23	41	43	46	50	52	57
$\bar{X}$	31	36	40	55	60	67	69	78	83
SD	14	16	17	18	18	22	21	26	26
MD1	218	235	259	316	324	353	389	401	441
MD2	909	979	932	1018	1035	1120	1136	1158	1207
MD3	291	309	338	396	418	439	463	494	520
MD4	846	881	1020	1002	1014	1110	1161	1227	1300
MD5	328	387	387	415	434	456	523	528	567
$\bar{X}$	518	558	587	629	645	696	734	762	807
SD	331	345	359	349	349	385	381	397	411

**Prilog 10** Promjena boje određene Lovibond komparatorom nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	Boja Lovibond [mm Pfund]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	63	62	62	64	67	68	70	72	76
KS2	65	64	64	64	64	66	71	70	74
KS3	64	64	65	70	71	74	80	80	85
KS4	65	65	67	68	68	70	71	72	75
KS5	55	58	62	60	61	64	63	65	66
KS6	64	63	64	66	64	66	68	71	73
KS7	68	67	67	69	71	73	77	79	82
$\bar{X}$	63	63	64	66	67	69	71	73	76
SD	4	3	2	3	4	4	6	5	6
KD1	41	44	50	55	57	64	N.O.	N.O.	65
KD2	47	51	53	60	60	N.O.	N.O.	62	66
KD3	57	59	64	60	62	69	63	65	72
KD4	54	56	58	60	62	N.O.	63	62	67
KD5	47	49	54	60	61	65	61	62	65
$\bar{X}$	49	52	56	59	60	66	62	63	67
SD	6	6	5	2	2	3	1	2	3
B1	3	3	5	6	5	6	7	7	8
B2	2	2	3	3	4	4	4	6	6
B3	5	4	5	6	6	7	9	9	10
B4	8	7	8	10	10	12	12	12	14
B5	2	1	1	2	3	3	3	4	5
$\bar{X}$	4	3	4	5	6	6	7	8	9
SD	3	2	3	3	3	4	4	3	4
MD1	60	62	58	91	83	65	127	110	67
MD2	122	112	116	N.O.	111	113	N.O.	119	123
MD3	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	141	135	148	149	145
MD4	95	97	96	102	102	105	107	112	115
MD5	76	79	72	138	N.O.	90	126	110	97
$\bar{X}$	88	88	86	110	109	102	127	120	109
SD	27	22	26	25	24	26	17	17	29

N.O. nema očitavanja

**Prilog 11** Promjena L\* parametra boje (CIEL\*a\*b\*) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	L*								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	32,28	31,53	31,48	30,55	30,64	30,15	30,17	30,09	29,57
KS2	31,50	31,36	31,52	30,15	30,34	30,03	29,42	30,34	29,58
KS3	32,17	31,22	30,67	29,60	29,00	28,58	28,62	28,61	27,97
KS4	31,17	30,41	30,38	29,75	29,80	29,33	30,19	30,05	29,54
KS5	33,82	34,28	33,57	32,80	32,85	32,21	32,51	32,07	31,72
KS6	32,39	32,61	32,55	30,68	30,52	30,15	30,26	30,37	29,93
KS7	31,32	31,16	31,15	29,69	29,29	29,07	29,46	28,96	28,87
$\bar{X}$	32,09	31,80	31,62	30,46	30,35	29,93	30,09	30,07	29,60
SD	0,90	1,27	1,11	1,12	1,27	1,17	1,22	1,12	1,14
KD1	37,46	35,92	35,02	33,82	33,61	32,17	32,76	32,27	30,68
KD2	34,71	34,04	34,01	32,25	32,19	30,78	32,23	31,67	30,20
KD3	34,34	32,73	32,80	31,55	31,19	30,47	31,32	30,87	29,59
KD4	35,18	35,60	34,74	33,28	33,03	31,19	30,72	31,93	30,06
KD5	34,41	34,20	33,65	33,04	33,02	31,71	32,31	32,44	31,06
$\bar{X}$	35,22	34,50	34,04	32,79	32,61	31,26	31,87	31,84	30,32
SD	1,30	1,29	0,89	0,89	0,94	0,69	0,83	0,62	0,57
B1	45,30	45,54	45,57	44,32	45,62	45,50	44,48	45,29	44,68
B2	46,47	45,44	46,63	46,47	46,44	45,97	46,60	46,50	45,86
B3	45,03	44,65	44,77	45,16	45,43	44,93	44,68	44,63	43,96
B4	43,56	43,50	43,41	43,59	43,69	43,52	43,36	43,65	42,89
B5	47,56	47,18	47,23	47,73	47,50	47,09	47,17	47,07	46,11
$\bar{X}$	45,58	45,26	45,52	45,45	45,74	45,40	45,26	45,43	44,70
SD	1,51	1,35	1,51	1,66	1,41	1,32	1,58	1,38	1,34
MD1	30,63	31,52	33,20	28,64	29,32	31,91	29,24	28,25	31,25
MD2	26,67	26,69	26,56	31,22	26,07	26,04	29,54	26,16	25,98
MD3	30,85	30,39	29,92	31,38	28,80	27,82	30,85	31,77	29,23
MD4	27,80	27,74	27,76	26,97	26,83	26,91	26,86	26,80	26,87
MD5	28,75	29,22	30,18	29,00	29,28	28,34	29,51	28,39	27,76
$\bar{X}$	28,94	29,11	29,52	29,44	28,06	28,20	29,20	28,27	28,22
SD	1,80	1,95	2,55	1,86	1,51	2,25	1,45	2,17	2,08



**Prilog 12** Promjena a\* parametra boje (CIEL\*a\*b\*) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	a*								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	8,35	7,97	8,96	10,80	11,24	11,12	10,41	10,57	10,02
KS2	7,23	8,09	8,61	10,38	10,63	10,69	7,95	10,30	9,70
KS3	9,14	8,90	8,64	10,03	9,65	8,93	8,23	7,53	6,54
KS4	9,23	8,57	8,58	10,00	10,26	9,99	9,67	9,53	8,98
KS5	6,61	7,67	7,91	10,94	11,20	11,48	10,97	10,97	11,10
KS6	7,83	8,93	9,39	10,22	10,67	10,70	9,33	10,12	9,66
KS7	8,11	8,73	9,14	8,89	9,63	9,15	8,52	7,69	7,25
$\bar{X}$	8,07	8,41	8,75	10,18	10,47	10,29	9,30	9,53	9,04
SD	0,95	0,50	0,48	0,67	0,66	0,97	1,14	1,38	1,61
KD1	5,93	6,26	7,37	10,12	10,57	10,94	10,91	11,06	10,60
KD2	7,63	7,47	8,29	10,01	10,64	10,47	10,79	10,62	9,78
KD3	8,40	6,52	8,35	9,68	10,39	10,51	10,70	10,38	9,15
KD4	6,68	7,51	8,20	10,67	11,04	11,08	7,80	10,75	9,67
KD5	7,48	7,79	8,21	10,16	10,84	10,86	10,43	10,85	10,23
$\bar{X}$	7,22	7,11	8,08	10,13	10,70	10,77	10,13	10,73	9,89
SD	0,95	0,68	0,40	0,36	0,25	0,27	1,31	0,25	0,55
B1	-1,25	-1,34	-1,45	-0,89	-0,94	-0,94	-0,60	-0,57	-0,05
B2	-1,22	-1,24	-1,41	-1,00	-1,16	-1,10	-1,03	-1,02	-0,51
B3	-1,06	-1,00	-1,07	-0,43	-0,49	-0,34	-0,12	-0,03	0,33
B4	-0,90	-0,85	-0,68	-0,08	-0,01	0,55	0,64	0,68	1,44
B5	-1,08	-1,19	-1,26	-1,14	-1,17	-1,17	-1,18	-1,18	-0,62
$\bar{X}$	-1,10	-1,12	-1,17	-0,71	-0,75	-0,60	-0,46	-0,42	0,12
SD	0,14	0,20	0,31	0,44	0,50	0,72	0,74	0,76	0,83
MD1	4,36	5,45	7,66	2,28	3,77	7,97	1,38	2,11	8,69
MD2	1,14	1,15	1,58	3,14	1,63	1,47	3,15	1,27	0,97
MD3	1,10	1,13	1,16	0,97	1,33	2,50	1,03	1,07	1,15
MD4	2,84	3,03	3,04	2,56	2,58	2,47	2,10	1,67	1,52
MD5	3,04	4,65	6,51	0,97	0,89	3,24	1,04	1,02	2,60
$\bar{X}$	2,50	3,08	3,99	1,98	2,04	3,53	1,74	1,43	2,99
SD	1,39	1,98	2,94	0,98	1,15	2,56	0,90	0,46	3,25

**Prilog 13** Promjena b\* parametra boje (CIEL\*a\*b\*) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	b*								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	11,06	9,55	10,07	8,65	8,97	8,29	7,76	7,69	6,72
KS2	9,48	9,66	9,62	8,02	8,49	8,01	5,93	7,82	6,64
KS3	10,95	9,23	8,42	6,71	6,13	5,37	5,02	4,46	3,79
KS4	8,48	8,07	7,58	7,37	7,50	6,72	7,37	7,26	6,31
KS5	13,33	14,24	13,33	12,53	12,63	11,61	11,20	10,56	9,90
KS6	11,11	11,78	11,51	9,14	8,87	8,33	7,47	7,59	7,04
KS7	9,57	9,44	9,27	7,24	6,57	5,89	5,81	5,28	4,85
$\bar{X}$	10,57	10,28	9,97	8,52	8,45	7,75	7,22	7,24	6,46
SD	1,57	2,06	1,93	1,96	2,15	2,07	2,03	1,97	1,92
KD1	18,85	16,20	15,22	14,38	13,77	11,42	11,97	11,35	8,60
KD2	14,84	13,56	13,50	11,38	11,60	9,30	10,75	9,88	7,55
KD3	14,05	11,34	11,81	10,40	9,94	8,89	9,51	8,66	6,38
KD4	15,59	16,27	14,88	13,27	12,64	10,10	8,16	10,05	7,22
KD5	14,40	13,98	13,56	12,73	13,04	10,83	10,96	11,01	8,86
$\bar{X}$	15,55	14,27	13,79	12,43	12,20	10,11	10,27	10,19	7,72
SD	1,93	2,06	1,35	1,57	1,49	1,05	1,47	1,06	1,02
B1	9,51	10,43	11,62	12,34	13,84	15,24	15,69	17,50	19,07
B2	7,71	8,30	9,49	11,26	12,04	12,97	14,76	15,57	17,33
B3	12,48	13,04	13,70	15,31	16,01	16,39	17,80	18,87	19,09
B4	17,66	17,64	18,90	19,34	19,83	20,72	21,48	22,09	22,57
B5	5,39	6,19	6,78	9,15	9,70	10,59	12,75	13,44	15,36
$\bar{X}$	10,55	11,12	12,10	13,48	14,28	15,18	16,50	17,49	18,68
SD	4,74	4,44	4,59	3,96	3,87	3,81	3,33	3,28	2,66
MD1	7,43	8,85	12,03	4,12	5,44	10,38	4,68	3,88	9,45
MD2	1,05	1,17	1,20	7,18	1,05	1,05	5,73	0,93	0,90
MD3	5,56	5,15	4,71	6,03	3,88	3,31	6,15	7,09	4,25
MD4	2,74	2,71	2,78	2,36	2,26	2,20	1,83	1,83	1,67
MD5	4,25	5,27	6,89	3,77	4,10	4,09	4,75	3,33	3,33
$\bar{X}$	4,21	4,63	5,52	4,69	3,35	4,21	4,63	3,41	3,92
SD	2,47	2,92	4,22	1,91	1,71	3,64	1,69	2,37	3,36

**Prilog 14** Promjena udjela ukupnih fenola nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2)  
uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	Udio ukupnih fenola [mg galne kis./kg meda]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	166,1	197,8	243,4	250,6	262,1	290,9	267,4	274,1	296,6
KS2	149,8	169,9	192,5	212,6	224,6	240,0	219,4	228,0	242,4
KS3	150,2	167,5	200,2	247,7	263,5	280,8	277,0	288,0	295,2
KS4	182,9	207,4	234,2	229,0	238,6	266,4	233,8	238,6	275,5
KS5	130,1	146,4	185,3	191,5	198,2	219,8	206,4	217,9	231,8
KS6	147,4	166,6	197,8	221,8	236,6	248,6	231,4	245,3	270,2
KS7	167,5	186,7	229,4	262,6	275,0	300,0	285,6	292,3	315,4
$\bar{X}$	156,3	177,5	211,8	230,8	242,7	263,8	245,8	254,9	275,3
SD	17,2	20,9	23,2	24,6	26,5	29,1	30,6	29,8	30,1
KD1	77,8	82,1	89,3	103,2	106,6	120,5	112,8	116,6	123,4
KD2	77,3	92,2	99,8	101,3	111,4	126,2	118,6	131,5	135,4
KD3	107,0	121,0	131,5	140,6	146,9	157,0	147,8	157,9	165,6
KD4	82,1	94,6	102,7	120,0	121,9	136,8	122,9	136,3	153,1
KD5	110,4	123,8	139,2	148,3	154,1	172,8	160,3	167,0	180,5
$\bar{X}$	90,9	102,7	112,5	122,7	128,2	142,7	132,5	141,9	151,6
SD	16,4	18,6	21,6	21,4	21,3	21,8	20,5	20,4	22,9
B1	42,7	45,6	53,8	46,6	48,5	57,6	49,0	50,9	61,9
B2	36,0	37,4	40,3	36,5	39,8	42,7	39,4	40,8	44,6
B3	39,8	40,8	44,2	39,8	41,8	44,6	42,7	44,6	46,1
B4	52,3	57,1	67,2	55,7	59,5	70,1	59,5	61,9	72,0
B5	28,3	30,2	34,6	30,7	33,1	38,9	34,1	36,5	41,3
$\bar{X}$	39,8	42,2	48,0	41,9	44,5	50,8	44,9	46,9	53,2
SD	8,8	10,0	12,8	9,6	10,0	12,9	9,8	9,9	13,2
MD1	281,8	290,9	294,7	239,5	245,3	253,0	214,1	222,3	228,5
MD2	494,9	498,2	530,9	491,5	501,1	514,1	499,2	508,3	522,3
MD3	214,6	220,3	232,3	204,0	209,8	222,2	197,3	197,8	216,5
MD4	338,9	347,0	385,0	351,4	390,7	410,4	394,6	402,7	423,4
MD5	229,0	240,0	244,3	239,0	246,7	250,6	244,4	250,1	256,8
$\bar{X}$	311,8	319,3	337,4	305,1	318,7	330,1	309,9	316,2	329,5
SD	113,4	111,4	123,7	118,1	123,4	126,7	131,5	133,8	136,2

**Prilog 15** Promjena antioksidativnog kapaciteta (DPPH metoda) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	DPPH (IC <sub>50</sub> ) [mg/mL]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	17,02	14,79	13,49	11,96	10,41	10,14	10,37	10,11	9,99
KS2	17,25	14,84	14,11	12,55	11,34	11,14	11,26	10,89	10,69
KS3	14,59	13,39	13,24	10,84	10,14	9,97	10,18	9,91	9,54
KS4	13,84	12,91	11,80	11,08	9,75	8,67	10,29	9,57	9,47
KS5	21,36	18,36	16,67	14,83	14,20	13,69	12,32	11,56	11,03
KS6	18,22	16,01	14,76	12,66	12,08	11,77	10,90	9,97	9,01
KS7	15,10	13,56	12,86	10,81	10,53	10,01	9,05	8,73	8,25
$\bar{X}$	16,77	14,84	13,85	12,10	11,21	10,77	10,62	10,11	9,71
SD	2,57	1,88	1,56	1,43	1,53	1,62	1,02	0,91	0,96
KD1	27,85	26,89	23,84	19,68	18,24	16,62	17,62	16,80	15,37
KD2	31,16	27,18	22,48	20,07	17,54	16,47	13,70	13,23	12,50
KD3	20,14	18,15	15,62	14,28	13,45	13,20	13,11	12,75	12,08
KD4	25,43	23,01	19,72	16,48	14,77	14,43	13,86	13,45	13,23
KD5	18,65	17,75	14,74	14,57	14,21	12,99	11,69	11,25	10,71
$\bar{X}$	24,65	22,60	19,28	17,02	15,64	14,74	14,00	13,50	12,78
SD	5,23	4,55	4,04	2,75	2,12	1,74	2,20	2,04	1,71
B1	105,48	103,87	84,44	97,33	87,59	84,12	90,43	86,96	82,75
B2	127,70	127,44	105,79	109,09	100,72	95,99	80,09	77,45	76,31
B3	101,12	98,00	92,87	87,36	80,91	80,21	80,35	77,18	76,54
B4	73,50	61,88	63,33	64,41	60,99	58,55	59,43	54,32	50,36
B5	201,36	169,07	142,50	158,75	152,86	139,67	116,13	108,73	99,18
$\bar{X}$	121,83	112,05	97,79	103,39	96,61	91,71	85,29	80,93	77,03
SD	48,45	39,59	29,38	35,04	34,56	30,03	20,60	19,64	17,57
MD1	9,22	8,98	8,78	9,30	9,27	9,20	9,82	9,62	9,47
MD2	3,46	3,47	3,56	3,60	3,55	3,33	3,48	3,46	3,52
MD3	11,47	11,24	11,11	10,59	10,44	10,33	10,98	10,77	10,49
MD4	8,63	8,30	7,72	5,71	5,57	5,40	5,67	5,50	5,39
MD5	10,57	9,85	9,34	9,69	9,55	9,23	9,55	9,24	9,02
$\bar{X}$	8,67	8,37	8,10	7,78	7,68	7,50	7,90	7,72	7,58
SD	3,12	2,95	2,82	2,98	2,96	2,99	3,18	3,09	2,97

**Prilog 16** Promjena antioksidativnog kapaciteta (FRAP metoda) nezagrijanih (NT) i toplinski tretiranih (T1 i T2) uzoraka meda skladištenjem

Uzorci meda	FRAP [ $\mu\text{M Fe(II)}$ ]								
	Svježi			Nakon 1 godine			Nakon 2 godine		
	NT	T1	T2	NT	T1	T2	NT	T1	T2
KS1	278,3	339,8	396,4	498,3	523,6	562,6	529,3	548,3	601,0
KS2	259,3	283,3	331,7	416,7	426,9	435,5	442,6	456,7	473,3
KS3	256,9	299,5	350,2	464,3	506,0	544,8	521,7	532,9	584,8
KS4	349,3	368,6	417,1	451,9	455,5	472,6	460,5	465,5	480,7
KS5	220,0	235,7	321,9	373,3	384,5	417,1	397,4	414,0	438,6
KS6	260,5	298,3	361,0	428,6	463,6	489,0	471,2	493,3	535,2
KS7	292,9	324,5	412,6	486,7	505,5	583,3	538,6	562,6	596,4
$\bar{X}$	273,9	307,1	370,1	445,7	466,5	500,7	480,2	496,2	530,0
SD	40,1	42,7	38,7	43,2	49,6	64,2	52,1	54,4	66,4
KD1	112,9	130,0	145,5	169,3	190,5	200,7	190,2	202,6	211,2
KD2	118,3	122,9	147,6	167,6	185,5	200,5	175,7	195,0	209,3
KD3	197,9	200,5	248,3	245,7	272,9	290,5	276,7	290,7	312,9
KD4	130,5	151,2	183,8	225,0	234,3	243,8	233,3	241,9	256,7
KD5	188,6	215,5	248,1	288,6	302,4	339,3	310,2	317,9	345,2
$\bar{X}$	149,6	164,0	194,7	219,2	237,1	255,0	237,2	249,6	267,0
SD	40,4	41,8	51,2	51,7	51,0	60,0	56,8	53,8	60,8
B1	48,6	54,0	59,5	60,0	66,2	68,3	64,5	67,2	72,4
B2	40,7	45,2	49,0	45,7	49,3	54,3	56,5	60,5	64,5
B3	43,3	52,1	55,2	50,2	54,5	59,3	53,9	57,9	61,9
B4	59,3	65,7	73,8	70,0	77,1	82,9	97,4	103,3	107,9
B5	25,2	32,6	36,7	34,3	40,2	43,6	39,3	44,8	49,3
$\bar{X}$	43,4	50,0	54,9	52,0	57,5	61,7	62,3	66,7	71,2
SD	12,4	12,2	13,7	13,6	14,5	14,8	21,6	22,0	22,1
MD1	622,1	626,7	627,9	511,0	516,9	527,6	482,4	489,6	496,4
MD2	1078,3	1084,5	1105,0	1068,6	1082,1	1091,2	1065,3	1080,3	1106,0
MD3	452,4	457,6	499,8	432,4	444,0	459,5	419,1	433,1	448,6
MD4	693,8	730,5	767,4	711,0	733,3	773,8	758,6	776,7	794,5
MD5	495,0	507,6	534,3	510,3	519,1	543,4	519,5	527,4	551,7
$\bar{X}$	668,3	681,4	706,9	646,6	659,1	679,1	649,0	661,4	679,4
SD	248,8	249,1	245,5	257,4	260,1	259,0	265,8	268,5	273,1