

Fizikalno-kemijske karakteristike matične mliječi

Vukadin, Ilijana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:944271>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



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

Ilijana Vukadin

FIZIKALNO-KEMIJSKE KARAKTERISTIKE MATIČNE MLIJEČI

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Diplomski sveučilišni studij Znanost o hrani i nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Kontrola kakvoće hrane
Tema rada je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 28. rujna 2018.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*
Pomoć pri izradi: dr. sc. *Blanka Bilić Rajs*

Fizikalno-kemijske karakteristike matične mliječi

Ilijana Vukadin, 403-DI

Sažetak:

Poznavanje kemijskog sastava matične mliječi od velikog je interesa za potrošače, ali i pčelare jer se sve češće konzumira u prirodnom obliku (kao svježa ili liofilizirana), ili se dodaje u druge proizvode (dodaci prehrani, medicinski proizvodi) kao funkcionalni sastojak. Iako je potrošnja matične mliječi u porastu, kvaliteta matične mliječi još uvijek nije zakonski regulirana već su dostupne preporuke za kvalitetu matične mliječi koje je objavila međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO). Kako bi se utvrdio kemijski sastav matične mliječi proizvedene u Republici Hrvatskoj i provjerila kvaliteta iste u odnosu na preporučene vrijednosti, prikupljeno je 13 uzoraka svježe matične mliječi sa područja istočne Hrvatske te je u uzorcima određen udio vode, bjelančevina, sastav i udio ugljikohidrata, udio 10-HDA, pH te ukupna kiselost. Kvaliteta matične mliječi sa područja istočne Hrvatske pokazala se zadovoljavajućom jer je većina uzoraka bila u skladu sa preporukama norme za kvalitetu matične mliječi i dostupnim literaturnim podacima.

Ključne riječi: matična mliječ, karakteristike, kvaliteta

Rad sadrži: 38 stranica
10 slika
4 tablice
0 priloga
25 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

1. prof. dr. sc. <i>Ljiljana Primorac</i>	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i>	član-mentor
3. prof. dr. sc. <i>Zlatko Puškadija</i>	član
4. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>	zamjena člana

Datum obrane: 25. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Graduate program Food Science and Nutrition

Scientific area: Biotechnical science

Scientific field: Food technology

Course title: Food Quality Control

Thesis subject was approved by Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no X. held on September 28, 2018.

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

Technical assistance: *Blanka Bilić Rajs*, PhD

Physicochemical Characteristics of Royal Jelly

Ilijana Vukadin, 403-DI

Summary:

Knowledge of the royal jelly chemical composition is of great interest to consumers as well as beekeepers as it is increasingly consumed in natural form (as fresh or freeze-dried), or added to other products (dietary supplements, medical products) as a functional ingredient. The quality of royal jelly is still not legally regulated, but there are recommendations for royal jelly quality published by the International Organization for Standardization (ISO). In order to determine the chemical composition of royal jelly produced in the Republic of Croatia and to evaluate its quality in relation to the recommended values, 13 samples of fresh royal jelly from eastern Croatia were collected and the water and protein content, composition and content of carbohydrates, 10-HDA content, pH and total acidity were determined in the samples. The quality of royal jelly from the area of eastern Croatia proved to be satisfactory, as most of the samples were in accordance with the recommendations of the standard for royal jelly quality and the available literature data.

Key words: royal jelly, characteristics, quality

Thesis contains: 38 pages
10 figures
4 tables
0 supplements
25 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|------------------------------------------------|--------------|
| 1. <i>Ljiljana Primorac</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof. | supervision |
| 3. <i>Zlatko Puškadija</i> , PhD, prof. | member |
| 4. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof. | stand in |

Defense date: September 25, 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Flanjak na pomoći, trudu i podršci tijekom izrade ovog rada kao i kroz ostale periode suradnje na raznim projektima tijekom studiranja. Također se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci u raznim oblicima bez koje sve ovo ne bi bilo moguće. Za kraj se želim zahvaliti profesorima koji su svojim zalaganjem, primjerom i radom ostavili trajnu želju za nastavkom daljnjeg usavršavanja u struci nakon studiranja kao i svima ostalima koji su mi na bilo koji način doprinijeli tijekom ovog perioda života.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. MATIČNA MLIJEČ.....	4
2.2. KEMIJSKI SASTAV I KVALITETA MATIČNE MLIJEČI.....	6
2.3. AUTENTIČNOST MATIČNE MLIJEČI.....	11
2.4. ZDRAVSTVENI ASPEKTI.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. ZADATAK.....	18
3.2. UZORCI.....	18
3.3. METODE.....	18
3.3.1. Određivanje udjela vode liofilizacijom.....	18
3.3.2. Određivanje udjela bjelančevina.....	19
3.3.3. Određivanje pH i ukupne kiselosti.....	19
3.3.4. Određivanje udjela 10-HDA.....	19
3.3.5. Određivanje sastava i udjela ugljikohidrata.....	20
4. REZULTATI.....	21
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČCI.....	32
7. LITERATURA.....	35

Popis oznaka, kratica i simbola

ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. <i>International Organization for Standardization</i>)
IHC	Međunarodna komisija za med (engl. <i>International Honey Commission</i>)
10-HDA	(2E)-10-hidroksidec-2-enska kiselina
HPLC	Visokotlačna tekućinska kromatografija (engl. <i>High pressure liquid chromatography</i>)

1. UVOD

Matična mliječ je mješavina izlučevina hipofaringealnih i mandibularnih žlijezda pčela radilica koju ličinke i matica koriste za ishranu. Period ishrane matičnom mliječi predstavlja ključnu ulogu u morfologiji organizma pčela te u konačnici određuje hijerarhiju košnice (Balkanska i Kashamov, 2011). Ishrana pčela, način proizvodnje, pakiranje, transport i skladištenje utječu na konačnu kvalitetu matične mliječi (ISO, 2016).

Svježa matična mliječ sadrži vodu (62,0 - 68,5 %), bjelančevine (11 - 18 %), ugljikohidrate (7 - 18 %), od kojih su najzastupljenije glukoza (2 - 9 %) i fruktoza (2 - 9 %), lipide (2 - 8 %) od kojih je nezasićena masna kiselina (2E)-10-hidroksidec-2-enska kiselina (10-HDA) (min 1,4 %) specifična za matičnu mliječ, te aminokiseline, vitamine i minerale u manjim udjelima (Balkanska i Kashamov, 2011; ISO, 2016). Zbog specifičnog kemijskog sastava odnosno prisutnosti biokativnih komponenti kao što su 10-HDA, glavni protein matične mliječi 3 (MRJP3) i apisin kojima se pripisuju mnogi pozitivni učinci na zdravlje, matična mliječ sve je više zastupljena u ljudskoj prehrani ili kao dodatak medicinskim i prehrambenim proizvodima (Balkanska i Kashamov, 2011; Zheng i sur., 2011).

Rutinsko testiranje autentičnosti matične mliječi i kontrola parametara kvalitete najčešće obuhvaćaju određivanje udjela vode, ugljikohidrata (udio saharoze, glukoze i fruktoze), bjelančevina te udio 10-HDA (Wytrychowski i sur., 2013).

Povećana potrošnja matične mliječi bilo za prehranu ljudi ili kao dodatak u medicinskim i kozmetičkim proizvodima, otvara mogućnost krivotvorenja od strane nesavjesnih pčelara radi ostvarivanja ekonomskog profita. Matična mliječ najčešće se krivotvori dodatkom različitih jefitnijih sirovina kao što su: jogurt, bjelanjak jaja, nezrele banane, kukuruzni škrob, kondenzirano mlijeko pomiješano s propolisom, med ili se dodaje voda, a u novije vrijeme dodaje se i sintetski proizvedena 10-HDA (Stocker i sur., 2005; Garcia-Amoedo i sur., 2007; Sabatini i sur., 2009; Zheng i sur., 2011; Wytrychowski i sur., 2013). Dodatak navedenih sirovina dovodi do povećanja udjela vode i šećera, smanjenja udjela lipida, bjelančevina i 10-HDA te netopljivosti u alkalnom mediju (Sabatini i sur., 2009).

Cilj ovog rada je odrediti fizikalno-kemijske karakteristike matične mliječi kako bi se utvrdio kemijski sastav matične mliječi proizvedene u Republici Hrvatskoj i provjerila kvaliteta iste u odnosu na preporučene vrijednosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MATIČNA MLIJEČ

Mlade pčele radilice starosti od petog do četrnaestog dana života izlučuju matičnu mliječ koja nastaje u mandibularnim i hipofaringealnim žlijezdama, a nakon navedenog perioda izlučivanje prestaje prirodnom atrofijom žlijezda (Daniele i Casabianca, 2012; Wytrychowski i sur., 2013). Ishrana matičnom mliječi utječe na značajne razlike u morfologiji, razvoju, životnom vijeku i ponašanju između radilica, trutova i matice budući da se matičnom mliječi ličinke radilica i trutova hrane do trećeg dana života, a ličinke buduće matice tijekom svih stadija života (Balkanska i Kashamov, 2011; Daniele i Casabianca, 2012; Furusawa i sur., 2016). Smatra se da rojalaktin, protein iz matične mliječi, najvećim dijelom doprinosi razlikama odnosno tome da je matica otprilike 2 puta veća i da živi do 10 puta dulje (Furusawa i sur., 2016).

Matična mliječ je složenog kemijskog sastava, blijedo žute boje, viskozne i kremaste konzistencije, oštrog mirisa i oporog okusa (Murešan i sur., 2016). Na sobnoj temperaturi svjež matična mliječ je pasta ili žele dok tijekom skladištenja može djelomično kristalizirati (ISO, 2016).



Slika 1 Matična mliječ (GloryBee, 2018)

Dvije su metode proizvodnje matične mliječi: umjetnim presađivanjem ličinki i bez presađivanja ličinki. Prva metoda je zastupljenija zbog jednostavnijih i jeftinijih alata za proizvodnju, iako je dugotrajna, fizički zahtjevnija te ograničena dostupnošću ličinki, dok je druga metoda fizički nezahtjevna, ali zahtjeva upotrebu skupljih alata (**Tablica 1**).

Tablica 1 Usporedba dviju metoda za proizvodnju matične mliječi (Hu i sur., 2017)

	METODA UZ PRESAĐIVANJE LIČINKI	METODA BEZ PRESAĐIVANJA LIČINKI
PREDNOSTI	Rasprostranjena metoda Jednostavni i jeftini alati	Fizički nezahtjevna Presađivanje ličinki nepotrebno
NEDOSTACI	Fizički zahtjevna Presađivanje ličinki potrebno	Matice moraju imati visoki stupanj polaganja jajašaca Skuplji alati

2.2. KEMIJSKI SASTAV I KVALITETA MATIČNE MLIJEČI

Poznavanjem fizikalno-kemijskog sastava matične mliječi osigurava se kvaliteta proizvoda na tržištu (Sabatini i sur., 2009). Republika Hrvatska trenutno nema propise za kontrolu kvalitete i autentičnosti matične mliječi, ali određene zemlje (npr. Švicarska, Japan, Brazil, Kina) uspostavile su nacionalne propise. Usvajanjem prijedloga Međunarodne komisije za med (IHC) o izradi standarda na temelju prikupljenih podataka o fizikalno-kemijskim parametrima kvalitete matične mliječi, 2016. godine je Međunarodna organizacija za normizaciju (ISO) izdala prvu verziju norme o matičnoj mliječi (Kanelis i sur., 2015; ISO, 2016). Temeljem niza istraživanja uočeno je kako okolišni uvjeti ne utječu značajno na kemijski sastav matične mliječi (Sabatini i sur., 2009). Za karakterizaciju matične mliječi uobičajeno se određuje udio vode, bjelančevina, slobodnih aminokiselina, šećera, lipida (kao slobodne ili ukupne organske kiseline), 10-HDA, mineralnih tvari, aktivnost enzima (superoksid dismutaza (SOD) i glukoza oksidaza), ukupna kiselost te analiza sedimenata (Bärnuțiu i sur., 2011). U međunarodnoj normi za kvalitetu matične mliječi dane su preporučene vrijednosti fizikalno-kemijskih karakteristika te obuhvaćene preporuke o proizvodnji, skladištenju, pakiranju, označavanju te higijenski zahtjevi za plasman na međunarodno tržište. Preporučene vrijednosti fizikalno-kemijskih karakteristika svježe matične mliječi prikazane su u **Tablici 2**.

Tablica 2 Preporučene vrijednosti fizikalno-kemijskih karakteristika svježe matične mliječi (ISO, 2016)

KARAKTERISTIKA	ZAHTJEVI	
Udio vode (%)	62,0 - 68,5	
Udio 10-HDA (%)	min 1,4	
Udio bjelančevina (%)	11 - 18	
Ukupni šećeri (%)	7 - 18	
Fruktoza (%)	2-9	
Glukoza (%)	2-9	
Saharoza (%)	<3,0	Na ^a
Erloza (%)	<0,5	Na ^a
Maltoza (%)	<1,5	Na ^a
Maltotrioza (%)	<0,5	Na ^a
Ukupna kiselost ((1 mol/L NaOH)/100g)	30,0 - 53,0	
Ukupni lipidi (%)	2 - 8	
C ¹³ /C ¹² omjer izotopa (δ‰)	-29 do -20	-29 do -14
Na ^a = nije primjenjivo za matičnu mliječ dobivenu od pčela koje su prihranjivane šećernim sirupima		

Prema fizikalnim svojstvima matična mliječ je često heterogena zbog prisutnosti čestica različite veličine koje su netopive u vodi. Vrlo je kisela s pH od 3,4 do 4,5 te gustoćom od 1,1 g/mL (Sabatini i sur., 2009). Prema preporukama međunarodne norme te IHC podacima, udio vode može iznositi od 60 do 70 %, kada se prikupljanje matične mliječi obavlja 72 sata nakon premještanja ličinki što je uobičajen postupak (Sabatini i sur., 2009; Kanelis i sur., 2015). Unatoč visokom aktivitetu vode (a_w) koji iznosi preko 0,92 matična mliječ ima visoku mikrobiološku stabilnost. Udio vode poprilično je ujednačen zbog konstantnog održavanja

vlage unutar košnice kontinuiranim osiguravanjem svježih zaliha matične mliječi i same higroskopnosti matične mliječi (Sabatini i sur., 2009). Na smanjen udio vode, niži od 60 % može utjecati rano prikupljanje matične mliječi (prvi dan nakon premještanja ličinki) ili kasno (četvrti dan nakon premještanja ličinki) (Kanelis i sur., 2015). Udio proteina u matičnoj mliječi kreće se od 10% do 20% i predstavlja najvažniji dio suhe tvari matične mliječi (Sabatini i sur., 2009; Kanelis i sur., 2015). Glavni proteini u matičnoj mliječi molekularne mase od 49 do 87 kDa čine 90% ukupnog udjela proteina, dok manje proteine izgrađuju proteini i peptidi različitih funkcija kao što su antimikrobne i antifungalne. Najzastupljeniji protein je albumin (50%), zatim slijedi rojalizin (glavni protein matične mliječi), apisimin te apalbumin (Bärnuțiu i sur., 2011). Aminokiseline koje se nalaze u najvišem postotku jesu prolin, lizin, glutaminska kiselina, alanin, fenilalanin, aspartat i serin u iznosu od 0,1 mg/g matične mliječi (Bärnuțiu i sur., 2011). Vrijeme i temperatura skladištenja utječu na proteolitičku enzimsku aktivnost, te pri skladištenju na 23 °C u odnosu na 4 °C može doći do porasta udjela prolina i lizina (Sabatini i sur., 2009). Udio ugljikohidrata zauzima oko 30% suhe tvari matične mliječi. Glavni ugljikohidrati jesu monosaharidi, glukoza i fruktoza koji predstavljaju 90% ukupnih šećera s tim da fruktoza prevladava. Od disaharida, saharoza je uvijek prisutna iako u varijabilnim koncentracijama. Od oligosaharida mogu se pronaći trehaloza, gentiobioza, izomaltoza, rafinoza, erloza, melecitoza koje su prisutne u vrlo maloj koncentraciji, ali korisne za identifikaciju karakterističnog uzorka te u nekim slučajevima mogu pomoći pri procjeni autentičnosti proizvoda (Sabatini i sur., 2009). Prema preporukama ISO i IHC gornja granica udjela saharoze iznosi 3% za matičnu mliječ dobivenu od pčela hranjenih prirodnom hranom te do 6% ako su pčele prihranjivane drugim hranjivima tvarima, na primjer dodatak bjelančevina i ugljikohidrata (Kanelis i sur., 2015). U literaturi se navodi da udio fruktoze u matičnoj mliječi može iznositi 2 - 13 % uz preporučeni raspon od 2% do 8%, a udio glukoze od 2% do 10% uz preporučeni raspon 2 - 8%. Smanjeni udjeli fruktoze i glukoze mogu se dobiti pri dohrani pčela sirupima (Kanelis i sur., 2015). Lipidi su prisutni u nešto manjem udjelu koji iznosi od 8% do 19% suhe tvari, ali predstavljaju značajnu komponentu matične mliječi (Sabatini i sur., 2009). Dio lipida sastoji se od monokarboksilnih, dihidroksikarboksilnih i dikarboksilnih organskih kiselina s 8 i 10 ugljikovih atoma karakterističnog molekulskog rasporeda koji se rijetko pronalazi u prirodi (Sabatini i sur., 2009). Navedenim masnim kiselinama pripisuje se većina bioloških aktivnosti matične mliječi

(Ferioli i sur., 2006). Udio organskih kiselina iznosi od 80% do 90% ukupnih lipida, a uglavnom se nalaze kao slobodne organske kiseline. Hidroksi kiseline s 10 ugljikovih atoma kao što je 10-hidroksidecenska i (2*E*)-10-hidroksidec-2-enska kiselina (10-HDA) nalaze se u najvišoj koncentraciji, te im se pripisuje uloga markera (Sabatini i sur., 2009). Glavna nezasićena masna kiselina 10-HDA čini više od 50% slobodnih masnih kiselina. Prema preprukama ISO i IHC udio 10-HDA bi trebao zadovoljiti minimum od 1,4%, dok je u Brazilskom nacionalnom propisu za kvalitetu matične mliječi minimalni udio 2% (Kanelis i sur., 2015). Identifikacija i kvantifikacija organskih kiselina predstavlja kriterije za definiranje izvrsnosti matične mliječi te prisutnosti matične mliječi u drugim proizvodima. Prema rezultatima analiza sastav organskih kiselina ostaje stabilan do dvije godine od proizvodnje neovisno o temperaturi skladištenja (Sabatini i sur., 2009). Udio pepela odnosno mineralnih tvari u svježoj matičnoj mliječi iznosi od 0,8% do 3%, a glavni elementi su K, Ca, Na, Mg, Zn, Fe, Cu i Mn. Pretpostavlja se kako je udio mineralnih tvari u matičnoj mliječi uvjetovan unutarnjim (biološki čimbenici pčela) i vanjskim čimbenicima (okoliš, prikupljanje hrane, razdoblje proizvodnje matične mliječi) (Sabatini i sur., 2009). Od vitamina sadrži retinol (A), kalciferol (D), tokoferole (E), tiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), pantotensku kiselinu (B5), piridoksin (B6), folnu kiselinu (B9), cijanokobalamin (B12) i askorbinsku kiselinu (C) (Bärnuțiu i sur., 2011).

Higijenski zahtjevi propisani u međunarodnoj normi (ISO, 2016) odnose se na mikrobiološku kvalitetu matične mliječi kako je navedeno u **Tablici 3**.

Tablica 3 Kriteriji prihvatljivosti broja mikroorganizama u svježoj matičnoj mliječi (ISO, 2016)

KARAKTERISTIKA	ZAHTJEVI
Broj kolonija (cfu/g)	max 500
Patogene bakterije	
<i>Enterobacteriaceae</i> (cfu/g)	Odsutnost u 10 g
<i>Salmonella</i> (cfu/g)	Odsutnost u 25 g

Matična mliječ osjetljiva je na toplinu, svjetlost i zrak. Budući da su zamijećene promjene u fizikalnim i kemijskim svojstvima kao što je tamnjenje, povećanje viskoznosti i udjela netopivih proteina te smanjenje udjela slobodnih aminokiselina, potrebno je poduzeti adekvatne mjere skladištenja odmah nakon prikupljanja (Hu i sur., 2017). Kako bi se spriječile oksidacijske promjene potaknute svjetlošću i zrakom, matičnu mliječ potrebno je pohraniti u zatamnjene sterilne bočice te promiješati sadržaj kako bi se ravnomjerno rasporedio i vakumirati nakon zatvaranja (ISO, 2016). Nakon vakumiranja potrebno je bočice s matičnom mliječi ohladiti u hladnjaku na temperaturi raspona od 0 do 5 °C ukoliko će se koristiti ubrzo ili u suprotnom potrebno ju je zamrznuti na temperaturi od -18 °C, kako bi se usporile i smanjile kemijske promjene tijekom skladištenja. Postupkom liofilizacije sprječava se toplinska razgradnja biološki aktivnih sastojaka matične mliječi, odnosno liofilizirana matična mliječ zadržava svojstva svježeg proizvoda. Matičnu mliječ obrađenu liofilizacijom potrebno je pakirati u spremnik bez dotoka zraka budući da je matična mliječ u obliku praha veoma higroskopana. U liofiliziranom stanju, matična mliječ je stabilnija te time manje osjetljiva na temperaturne oscilacije i može se čuvati na sobnoj temperaturi kroz duži period. Nakon otvaranja bočice s matičnom mliječi potrebno ju je skladištiti u hladnjaku te iskoristiti tijekom 12 mjeseci. Također treba izbjegavati cikluse odmrzavanja i zamrzavanja (Hu i sur., 2017).

2.3. AUTENTIČNOST MATIČNE MLIJEČI

Matična mliječ sve je zastupljenija u ljudskoj prehrani zbog biološki aktivnih tvari u sastavu kojima se pripisuju zdravstveni učinci (Oršolić, 2013). Koristi se u mnogim sektorima od prehrambene, farmaceutske do kozmetičke industrije. Potražnja za matičnom mliječi rezultirala je velikim uvozom u zemlje koje nezadovoljavaju potrebe domaćeg tržišta. Trenutno nema podataka o tržištu matične mliječi iako je Kina priznata kao vodeći svjetski proizvođač i izvoznik (Sabatini i sur., 2009). Visoka potražnja za matičnom mliječi dovela je do paralelnog povećanja krivotvorenja radi ostvarivanja ekonomskog profita. Stoga krivotvorenje matične mliječi predstavlja glavni problem kvalitete. Udio vode, ugljikohidrata (saharoza, glukoza i fruktoza), bjelančevina i 10-HDA najčešći su parametri kontrole kvalitete i rutinskog testiranja autentičnosti (Wytrychowski i sur., 2013).

Više je načina krivotvorenja, od ishrane pčela sirovinama koje im nisu prirodna hrana, zamjene određenog volumena matične mliječi nekom drugom sirovinom ili cjelokupnom zamjenom proizvoda drugom sirovinom (Sabatini i sur., 2009). Prirodna matična mliječ nastaje razgradnjom nektara i peludi u hipofaringealnim i mandibularnim žlijezdama pčela radilica. Biološka svojstva matične mliječi značajno koreliraju s prirodnim prekursorima nastanka, nektarom i peludi. Studija koju su proveli Dimou i sur. (2013) pokazuje kako je melisopalinološka analiza važna za određivanje zemljopisnog podrijetla budući da pčele pri proizvodnji matične mliječi uglavnom konzumiraju svježe prikupljenu pelud koja obuhvaća vrste peludi okolne flore. Peludni spektar je vrlo uzak iz razloga što se prikupljanje matične mliječi obavlja u kratkom vremenskom periodu stoga je sustavna analiza peludi obavezna pri kontroli kvalitete i autentičnosti matične mliječi (Daniele i Casabianca, 2012; Dimou i sur., 2013; ISO, 2016).

Česta je primjena dodataka jeftinih sirupa poput visoko fruktoznog kukuruznog sirupa (HFCS) kao izvora šećera i/ili biotehnološkog kvasaca u prahu kao izvora bjelančevina u ishrani pčela radi povećanja proizvodnje i smanjenja troškova (Wytrychowski i sur., 2013; Stocker i sur., 2005). Istraživanjem provedenim od strane Wytrychowski i sur. (2013) uočeno je povećanje udjela maltoze i maltotrioze ako se pčele prihranjuju hidrolizatima žitarica i kukuruznog škroba, a povećanje udjela saharoze i erloze ako se koriste šećerni sirupi proizvedeni od šećerne repe ili trske.

Autentičnost matične mliječi može se odrediti mjerenjem omjera stabilnih izotopa elemenata $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) i $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) koji ovise o botaničkom podrijetlu, ali i klimatskim uvjetima (Stocker i sur., 2005). Zemljopisna područja s visokim udjelom vlage i niskim temperaturama imaju niže $\delta^{15}\text{N}$ vrijednosti dok područja s niskim udjelom vlage i visokim temperaturama imaju više $\delta^{15}\text{N}$ vrijednosti (Stocker i sur., 2005). Sezonske varijacije (botaničko podrijetlo) značajnije utječu na $\delta^{15}\text{N}$ nego $\delta^{13}\text{C}$ vrijednosti (Stocker i sur., 2005). Razlikuju se vrijednosti izotopa $\delta^{13}\text{C}$ nastalog fotosintetskim putem biljaka koje sadrže ugljikohidrate sa tri (medonosne biljke) odnosno četiri ugljikova atoma (žitarice), budući da C3 biljke daju niže vrijednosti $\delta^{13}\text{C}$ (od -32 do -25 ‰) u odnosu na C4 biljke (od -15 do -9 ‰) što može potvrditi prihranu pčela sirupima (Stocker i sur., 2005). Također vrijednosti izotopa $\delta^{15}\text{N}$ zabilježene za mahunarke iznose od 0 do 2 ‰, dok za krstašice iznose iznad 8 ‰. Navedene vrijednosti $\delta^{15}\text{N}$ mogu varirati ovisno o gnojidbi tla koje mijenja vrijednosti izotopa dušika te se podaci uspoređuju sa $\delta^{13}\text{C}$ kako bi se potvrdila autentičnost. Određivanje $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{15}\text{N}$ vrijednosti pokazalo se kao dobra brza metoda za razlikovanje autentične i krivotvorene matične mliječi.

Jedan od češćih oblika krivotvorenja matične mliječi pokazalo se dodavanje meda u matičnu mliječ, a može se detektirati kroz povećanje udjela šećera u uzorcima matične mliječi, te smanjenje udjela ostalih komponenti (Sabatini i sur., 2009). Jedan od važnih kriterija određivanja autentičnosti matične mliječi je određivanje udjela 10-HDA. Međutim, u novije vrijeme moguće je krivotvorenje dodatkom sintetski proizvedene 10-HDA (Zheng i sur., 2011). Istraživanja su pokazala da se krivotvorenje matične mliječi može provoditi zamjenom dijela proizvoda jeftinijom sirovinom koju je teško odrediti organoleptički, kao što je jogurt, bjelanjak jajeta, voda, nezrele banane, kukuruzni škrob, kondenzirano mlijeko pomiješano s propolisom (Garcia-Amoedo i sur., 2006; Sabatini i sur., 2009). Ovaj oblik krivotvorenja matične mliječi moguće je detektirati jer se povećava udio vode, smanjuje udio lipida, proteina i 10-HDA, te krivotvoreni proizvodi pokazuju određeni stupanj netopljivosti u alkalnom mediju, ovisno o vrsti i postotku određene dodane supstance (Sabatini i sur., 2009).

Jedan od važnih aspekata kvalitete matične mliječi je definiranje parametara svježine (Sabatini i sur., 2009). Na temelju dosadašnjih podataka o skladištenju matične mliječi može se smatrati kako skladištenje pri 4 °C ne mijenja značajno sastav matične mliječi iako

isključivo skladištenje smrzavanjem spriječava degradaciju biološki aktivnih tvari. Vrijeme i temperatura skladištenja utječu na određene komponente. Istraživanje provedeno tijekom razdoblja od godine dana skladištenjem pri temperaturi od 4 °C i 20 °C ukazuje na promjene enzima glukoza oksidaze ovisno o vremenu i temperaturi. Tijekom prvog mjeseca pri temperaturi od 20 °C aktivnost enzima se značajno degradirala, a do kraja godine u potpunosti. Međutim, pri temperaturi od 4 °C zamijećena je djelomična degradacija tijekom cijelog perioda praćenja (Sabatini i sur., 2009). Vrijeme skladištenja i temperatura utječu i na sadržaj furozina, jednog od produkata Maillardovih reakcija, budući da se udio povećava skladištenjem ovisno o temperaturi (Sabatini i sur., 2009). Furozin je dodatni parameter kvalitete koji nema preporučene vrijednosti u važećem izdanju međunarodne norme, već se određuje informativno, ali se u reviziji norme planiraju uvrstiti preporučene vrijednosti za ovaj parametar (ISO, 2016). Udio 5-hidroksimetil-2-furaldehida (HMF) koji je također jedan od produkata Maillardovih reakcija može predstavljati parametar svježine budući da je utvrđeno kako proizvodi skladišteni pri temperaturi od - 18 do + 4 °C ne sadrže mjerljive razine HMF-a, a nasuprot njima proizvodi skladišteni pri 25 °C pokazuju porast udjela HMF-a tijekom prvog mjeseca skladištenja (Ciulu i sur., 2013; Hu i sur., 2017). Ciulu i sur. (2013) predložili su metodu za određivanje HMF-a u matičnoj mliječi, ali su potrebna daljnja istraživanja kako bi se definirala moguća uporaba HMF-a kao parametra svježine matične mliječi.

2.4. ZDRAVSTVENI ASPEKTI

Različita *in vivo* i *in vitro* istraživanja, a koja su navedena u daljnjem tekstu, pokazuju kako matična mliječ ima povoljne učinke na zdravlje zbog prisustva bioaktivnih tvari (Oršolić, 2013). Najznačajnija bioaktivna tvar matične mliječi je 10-HDA, te antibakterijski proteini i protein apisin koji potiče proliferaciju monocita ljudskog organizma. Na sisavcima su ispitani brojni fiziološki i farmakološki učinci, a neki od njih uključuju vazodilataciju i sniženje krvnog tlaka, sniženje vrijednosti kolesterola, antioksidativnu aktivnost, protuupalni, imunomodulacijski, antimikrobni, antiosteoporozni i protutumorski učinak kao i usporavanje procesa starenja (Oršolić, 2013). Istraživanja o matičnoj mliječi u svrhu humane terapije započela su još 1922. godine u Francuskoj, no još uvijek zdravstvene tvrdnje nisu usuglašene te su stoga potrebna daljnja istraživanja (Oršolić, 2013). Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) osporila je sve zdravstvene tvrdnje vezane za matičnu mliječ, jer nema dovoljno dokaza o primjeni matične mliječi i učincima na ljudsko zdravlje (Kanelis i sur., 2015).

Dugovječnost

Tijekom starenja dolazi do narušavanja homeostaze nakupljanjem reaktivnih vrsta kisika i posljedičnog oštećenja DNA, bjelančevina i lipida. Ispitivanja provedena na miševima pokazala su kako matična mliječ smanjuje i/ili sprječava oksidativna oštećenja u stanicama što posljedično produžava životni vijek. Literaturni podaci navode kako (2*E*)-10-hidroksidec-2-enska kiselina i 10-hidroksi-decenska kiselina u prisutnosti askorbinske kiseline potiču sintezu transformirajućeg faktora rasta koji potiče sintezu kolagena, glavnog proteina vezivnog tkiva (Oršolić, 2013).

Utjecaj na središnji živčani sustav (SŽS)

Napretkom medicine i povećanjem broja starije populacije, povećava se pad kognitivnih mogućnosti te porast neuropsihijatrijskih poremećaja kao što je Alzheimerova bolest i depresija. Istraživanja su pokazala kako matična mliječ potiče neurogenezu svih vrsta stanica živčanog sustava (neurona, astrocita i oligodendrocita). Također istraživanja sugeriraju kako matična mliječ potiče ekspresiju mRNA neurotrofičkog čimbenika glija stanica (GDNF), koji je

dominantan marker aksona u hipokampusu (područje mozga zaduženo za prevođenje informacija iz kratkoročnog u dugoročno pamćenje) (Oršolić, 2013).

Dijabetes

Matična mliječ sadrži određene tvari molekulski slične inzulinu za koje istraživanja navode kako mogu potaknuti sintezu preadipocita u adipocite. Istraživanja na štakorima oboljelim od dijabetesa tipa 2 pretpostavljaju kako bi dugotrajna primjena matične mliječi bila učinkovita u spriječavanju inzulinske rezistencije, a uočeno je kako matična mliječ potiče regeneraciju stanica gušterače što posljedično potiče adekvatnu sintezu inzulina i spriječava nastanak dijabetesa (Oršolić, 2013).

Protutumorski učinak

Protutumorski učinak pripisuje se aktivnoj komponenti 10-HDA i zasićenim dikarboksilnim kiselinama (sukcinska, adipinska, pimelinska, glutarna, suberinska, sebacinska i azelainska kiselina). Učinak je ispitan na određenim vrstama karcinoma te je zamijećeno kako navedene komponente kojima se pripisuju imunomodulatorna svojstva, potiču smanjenje broja tumorskih stanica, kroz sintezu T limfocita, stanica ključnih za obranu organizma od virusa i tumorskih stanica (Oršolić, 2013).

Antioksidativni učinak

Istraživanja su pokazala kako slobodne aminokiseline matične mliječi djeluju antioksidativno kroz povećanje razine glutaciona (GSH), endogenog peptidnog antioksidansa, te endogenih antioksidativnih enzima glutation peroksidaze (GPx), aktivnosti glutation-S-transferaze (GST) i superoksid dismutaze (SOD). Također je uočeno smanjenje toksičnosti izazvano tetraklormetanom, paracetamolom i kadmijem na stanice hepatocita, što umanjuje posljedičnu genotoksičnost i nefrotoksičnost (Oršolić, 2013).

Antialergijski učinak

Istaživanja na miševima pokazala su kako glikoprotein MRJP3 (eng. *major royal jelly protein*; MRJP3, glavni protein matične mliječi) posjeduje antialergijski učinak budući da inhibira interleukine IL-4. Stoga bi imunoregulatorni učinak MRJP3, mogao imati klinički značaj pri razvoju antialergijskih peptida (Oršolić, 2013).

Antimikrobna aktivnost

Današnje farmaceutsko tržište ima niz problema zbog rezistencije mikroorganizama na antibiotike, gdje se javlja potreba za razvojem nove vrste antibiotika. Plijesni i bakterije koje luče određene tvari izvor su novih antibiotika, a kukci su tek odnedavno predmet istraživanja. Mnoge studije dokazale su antibakterijsko djelovanje matične mliječi djelovanjem 10-HDA, različitih proteina i peptida koji djeluju inhibitorno na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (Oršolić, 2013).

Učinak na kardiovaskularni sustav

Ispitivanja u *in vitro* uvjetima navode kako *trans*-2-oktenoična kiselina i 10-HDA, sudjeluju u kontroli krvnog tlaka zbog čega im se pripisuje antihipertenzivni učinak. Nadalje ACE inhibitorni peptidi matične mliječi otporni su na želučano-crijevne proteaze, stoga u krvotoku mogu djelovati antihipertenzivno regulacijom prostaglandina i dušikovog monoksida (Oršolić, 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak diplomskog rada bio je odrediti fizikalno-kemijske karakteristike matične mliječi kako bi se utvrdio kemijski sastav matične mliječi proizvedene u Republici Hrvatskoj i provjerila kvaliteta iste u odnosu na preporučene vrijednosti. U tu svrhu određen je udio vode, bjelančevina, sastav i udio ugljikohidrata, udio 10-HDA, pH te ukupna kiselost svježe matične mliječi.

3.2. UZORCI

Za potrebe izrade diplomskog rada prikupljeno je 13 uzoraka svježe matične mliječi od pčelara sa područja istočne Hrvatske. Uzorci su prikupljeni u staklene bočice, a prikupljeno je 10 g svakog uzorka. Uzorci su nakon prikupljanja smrznuti i u laboratorij dostavljeni u smrznutom stanju. Uzorci su prikupljeni tijekom svibnja 2018. godine i skladišteni u zamrzivaču do analize koja je provedena tijekom lipnja 2018. godine.

3.3. METODE

Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika matične mliječi provedeno je prema metodama opisanim u međunarodnoj normi za kvalitetu matične mliječi (ISO, 2016). Sve analize provedene su u dva ponavljanja.

3.3.1. Određivanje udjela vode liofilizacijom

U prethodno osušene i izvagane staklene epruvete izvagano je 1,00 g (± 1 mg) matične mliječi, te su uzorci u epruvetama smrznuti na -80 °C u zamrzivaču za ultraduboko zamrzavanje. Smrznuti uzorci postavljeni su u liofilizator, a postupak liofilizacije proveden do konstantne mase. Udio suhe tvari izračunat je prema formuli **(1)**:

$$\text{udio suhe tvari (\%)} = \frac{100 \cdot (m_1 - m_0)}{m} \quad \mathbf{(1)}$$

m_1 - masa epruvete sa uzorkom nakon liofilizacije [g]

m_0 - masa prazne epruvete [g]

m - masa uzorka [g]

Udio vode u uzorcima matične mliječi izračunat je prema formuli **(2)**:

$$\text{udio vode}(\%) = 100 - \text{udio suhe tvari}(\%) \quad (2)$$

3.3.2. Određivanje udjela bjelančevina

Udio bjelančevina određen je indirektno iz količine dušika metodom po Kjeldahl-u. Izvagano je 0,50 g (± 1 mg) matične mliječi te je proveden postupak vlažnog spaljivanja, destilacije i titracije.

Udio bjelančevina u matičnoj mliječi izračunat je prema formuli **(3)**:

$$\text{udio bjelančevina}(\%) = \frac{(V_s - V_b) \cdot M \cdot 14,01}{m \cdot 10} \cdot 6,25 \quad (3)$$

V_s – volumen 0,1 mol/L HCl utrošen za titraciju uzorka [mL]

V_b – volumen 0,1 mol/L HCl utrošen za titraciju slijepo probe [mL]

M – koncentracija otopine HCl [mol/L]

m – masa uzorka [g]

3.3.3. Određivanje pH i ukupne kiselosti

Izvagano je 1,00 g (± 1 mg) uzorka matične mliječi, te otopljen u 75 mL destilirane vode. Otopini matične mliječi izmjeren je pH. Ukupna kiselost određena je titracijom otopine uzorka sa 0,1 M NaOH do pH 8,3. Ukupna kiselost izračunata je prema formuli **(4)**:

$$\text{ukupna kiselost (mL 1M NaOH/100g)} = \frac{V \cdot c \cdot 100}{m} \quad (4)$$

V - volumen 0,1 M NaOH utrošen za titraciju [mL]

c – množinska koncentracija otopine NaOH [M]

m – masa uzorka [g]

3.3.4. Određivanje udjela 10-HDA

Udio 10-HDA u matičnoj mliječi određen je metodom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC) s detektorom s nizom dioda. Priprema uzoraka matične mliječi provedena je prema

propisu B2 međunarodne norme za matičnu mliječ, HPLC-UV metoda uz interni standard (ISO, 2016). HPLC analiza provedena je na koloni Inertsil ODS-3V proizvođača GL Science, dimenzija 250 mm x 4,6 mm, koja je punjena česticama veličine 5 μ m, pri temperaturi kolone od 35 °C. Odjeljivanje je izvršeno izokratnim eluiranjem uz brzinu protoka pokretne faze od 1 mL/min, a volumen injektiranja iznosio je 10 μ L. Kao pokretna faza korištena je otopina metanol:voda, u omjeru 55:45, uz dodatak fosforne kiseline kako bi se podesio pH pokretne faze na 2,5. Identifikacija 10-HDA izvršena je prema vremenu zadržavanja i usporedbom apsorpcijskog spektra u uzorcima sa spektrom standardne otopine 10-HDA, dok je kvantifikacija izvršena metodom interne kalibracije. Kao interni standard korišten je metil-4-hidroksibenzoat (Sigma-Aldrich, SAD), čistoće \geq 99,0%, a za pripremu standardnih otopina pri izradi kalibracijske krivulje korišten je standard 10-HDA (Cayman Chemicals, SAD), čistoće \geq 99,0 %. Rezultati su izraženi je kao postotak 10-HDA u matičnoj mliječi (%).

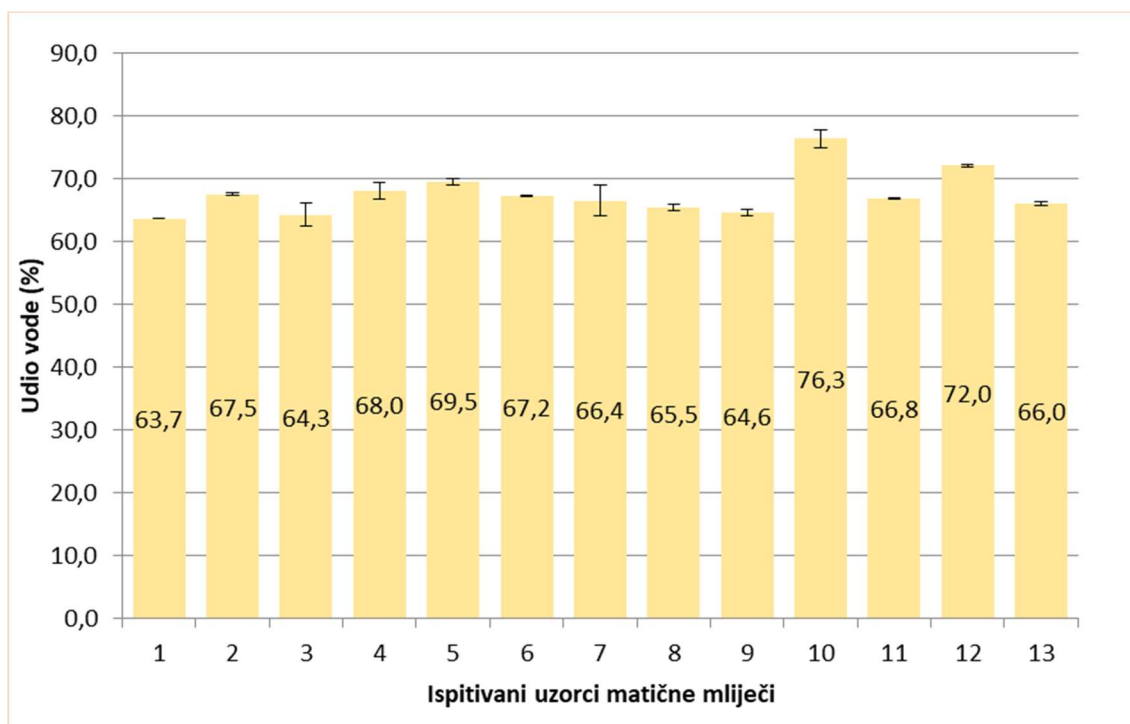
3.3.5. Određivanje sastava i udjela ugljikohidrata

Sastav i udio ugljikohidrata određen je metodom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC) s detektorom indeksa loma. Provedena je identifikacija i kvantifikacija glukoze, fruktoze i saharoze u uzorcima svježe matične mliječi. Priprema uzoraka provedena je prema međunarodnoj normi (ISO, 2016). Za odjeljivanje glukoze, fruktoze i saharoze korištena je kolona XBridge Amide (Waters, SAD), dimenzija 4,6 x 150 mm, koja je punjena česticama veličine 3,5 μ m, pri temperaturi kolone od 30 °C. Odjeljivanje je izvršeno izokratnim eluiranjem uz brzinu protoka pokretne faze od 1 mL/min, a volumen injektiranja iznosio je 10 μ L. Pokretna faza bilaje otopina acetonitril:voda u omjeru 75:25, uz dodatak 2% trietilamina. Identifikacija odijeljenih komponenti izvršena je prema vremenu zadržavanja dok je kvantifikacija izvršena metodom vanjske kalibracije. Standardne otopine fruktoze (\geq 99 %, Sigma-Aldrich, SAD) i glukoze (\geq 99,5 %, Sigma-Aldrich, SAD) pripremljene su u koncentracijama od 0,5 % do 8 %, a koncentracije saharoze (\geq 99,5 %, Sigma-Aldrich, SAD) od 0,5 % do 5 %. Udio ugljikohidrata izražen je kao postotak pojedinačnog ugljikohidrata u matičnoj mliječi (%).

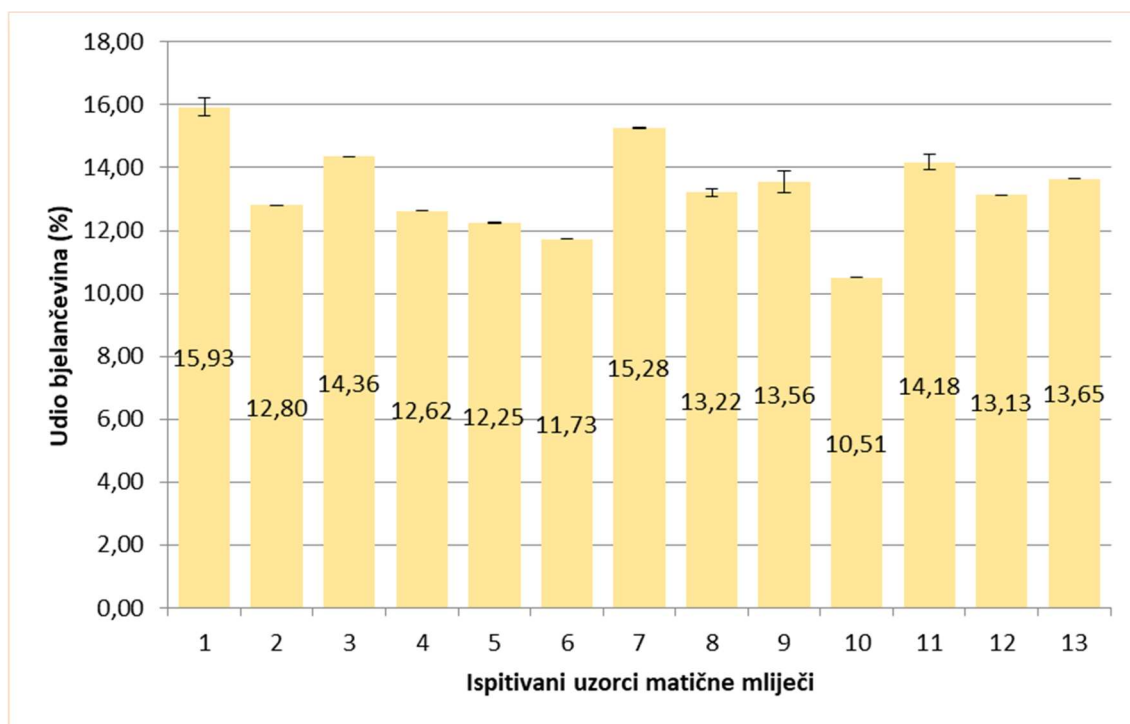
4. REZULTATI

Tablica 4 Fizikalno-kemijske karakteristike trinaest ispitivanih uzoraka matične mliječi sa područja istočne Hrvatske

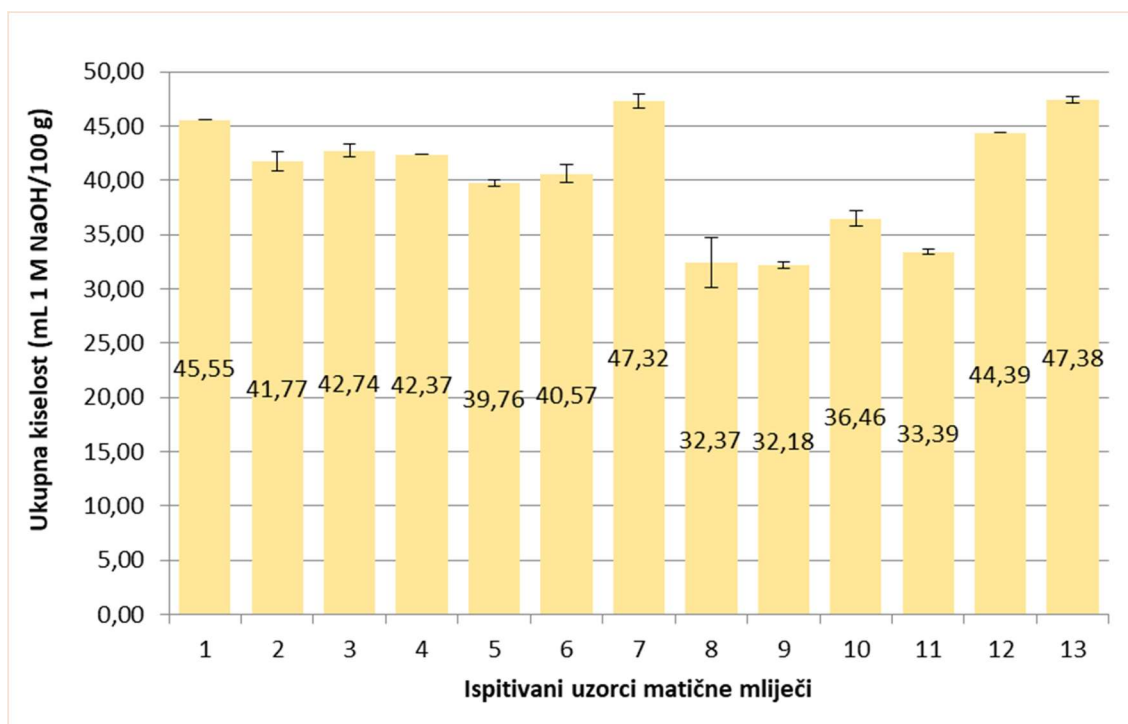
KARAKTERISTIKA	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	Standardno odstupanje	Preporuke norme ISO 12824:2016
Udio vode (%)	63,7	76,3	67,5	3,5	62,0 - 68,5
Udio bjelančevina (%)	10,51	15,93	13,32	1,44	11 - 18
Ukupna kiselost (ml 1 M NaOH/100 g)	32,18	47,38	40,48	5,38	30,0 - 53,0
Udio 10-HDA (%)	1,65	3,88	2,75	0,68	min 1,4
Udio fruktoze (%)	2,82	5,82	4,29	0,99	2-9
Udio glukoze (%)	2,56	6,36	4,63	1,11	2-9
Udio saharoze (%)	0,70	4,46	2,14	1,07	<3,0
pH	3,98	4,21	4,05	0,08	-



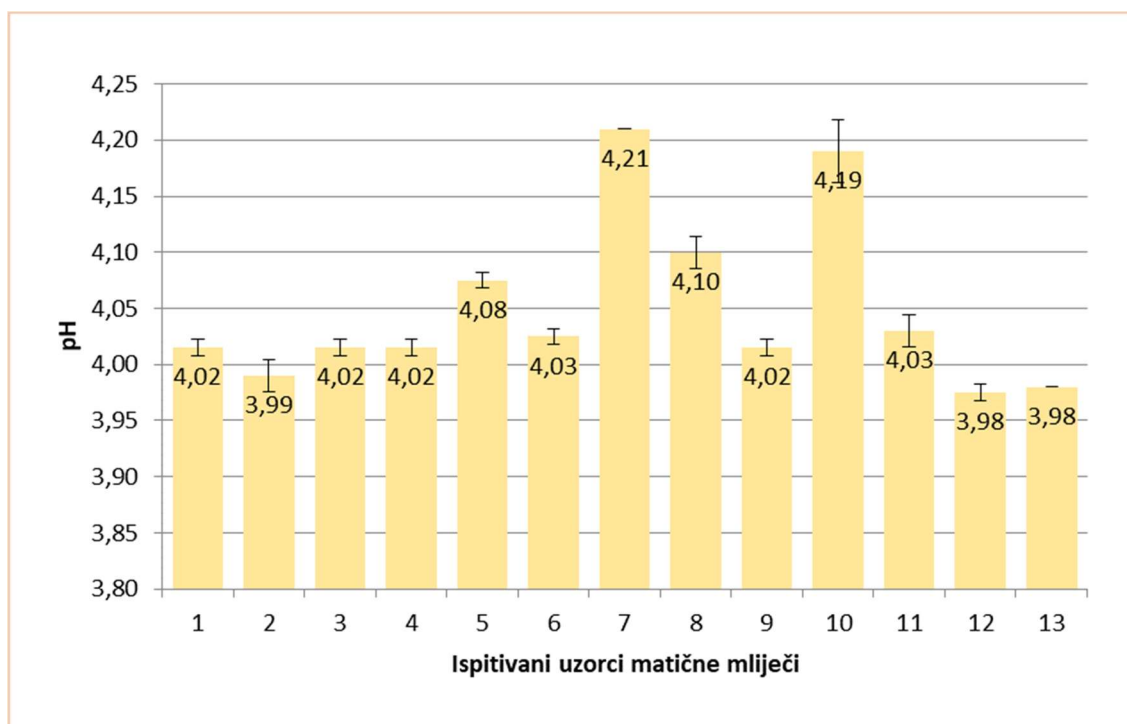
Slika 2 Udio vode (%) u ispitivanim uzorcima matične mliječi



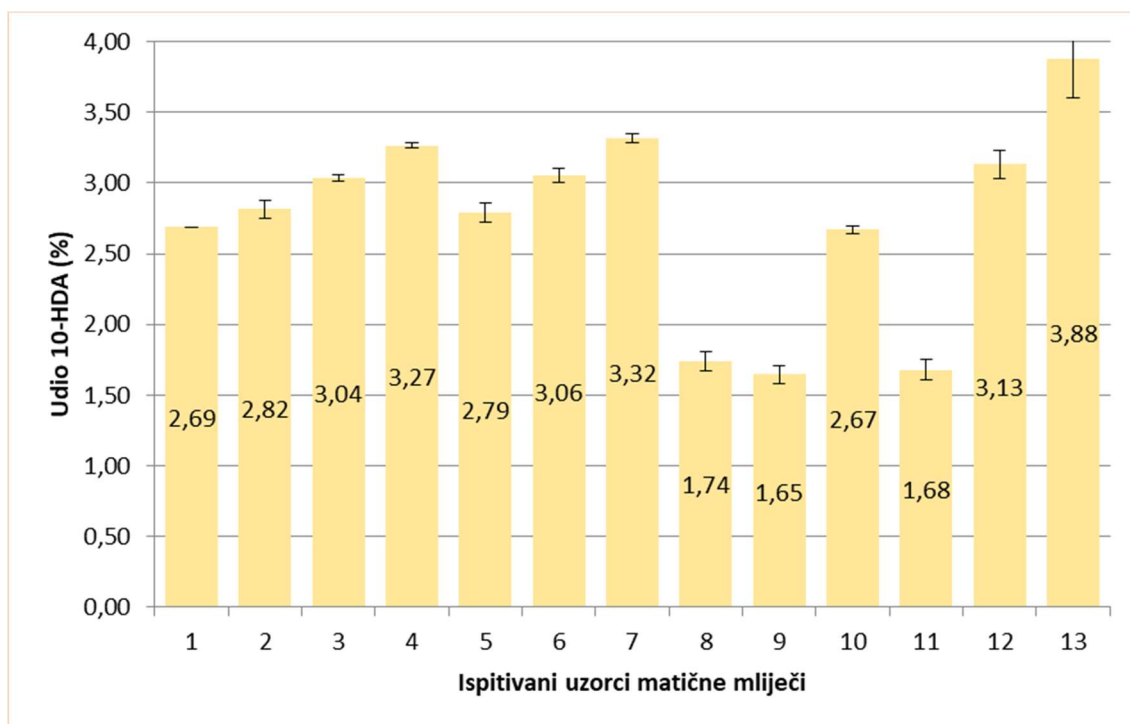
Slika 3 Udio bjelančevina (%) u ispitivanim uzorcima matične mliječi



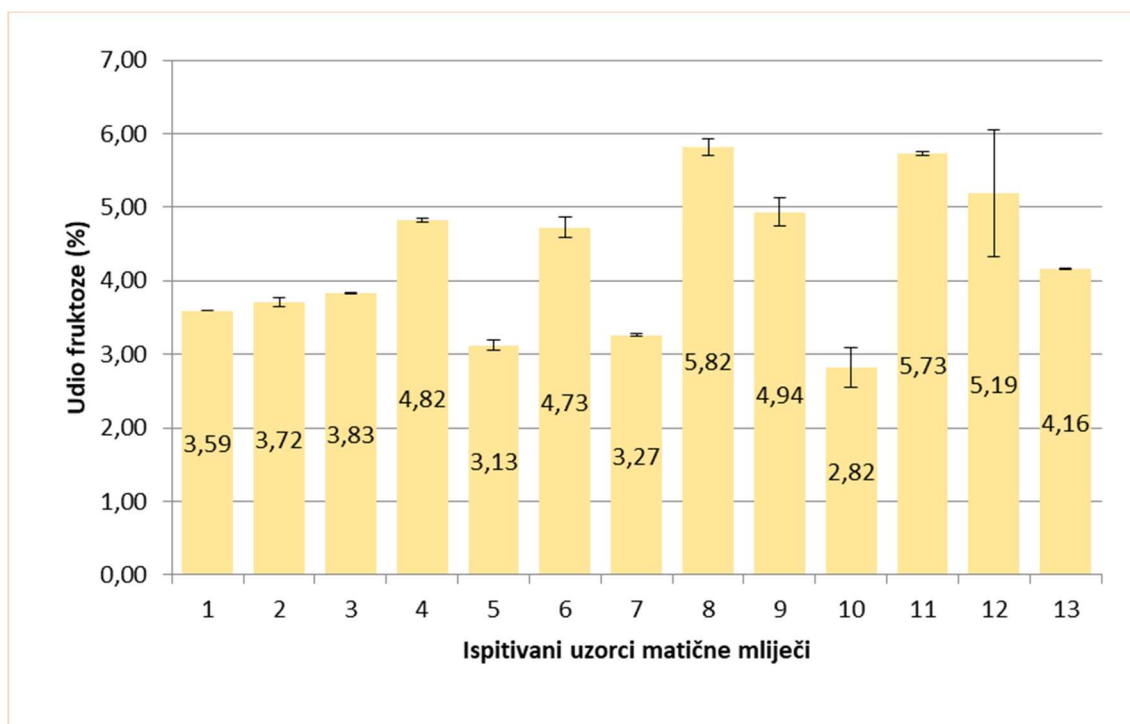
Slika 4 Ukupna kiselost (mL 1 M NaOH/100 g) u ispitivanim uzorcima matične mliječi



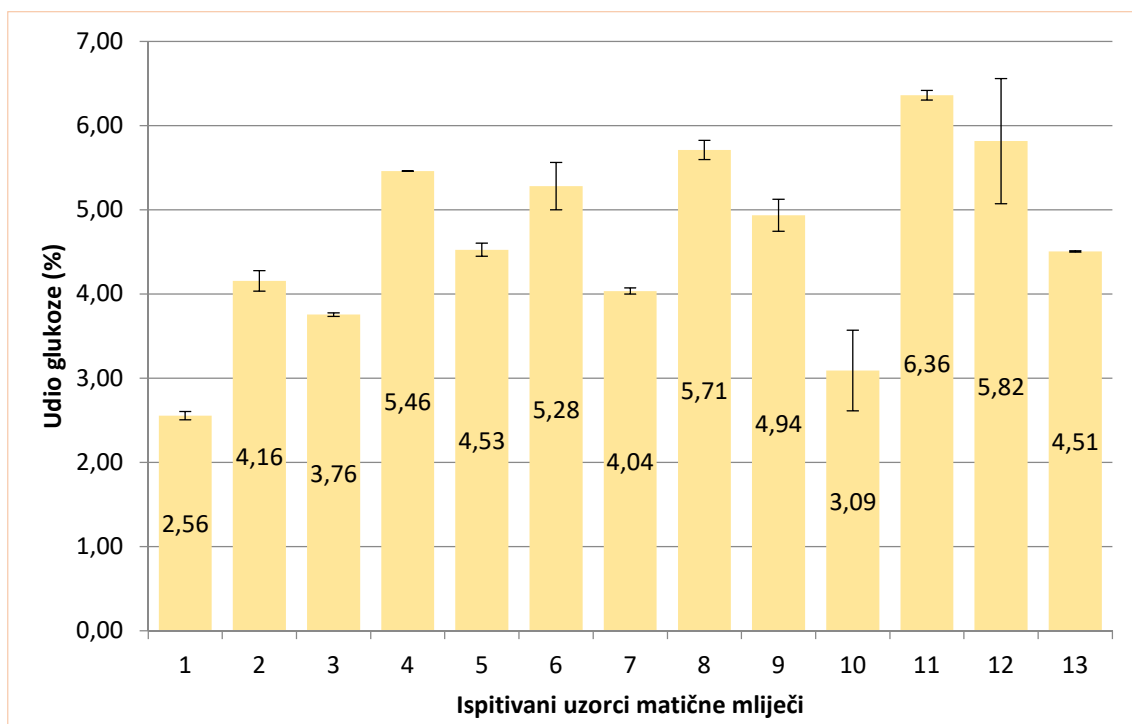
Slika 5 pH vrijednost u ispitivanim uzorcima matične mliječi



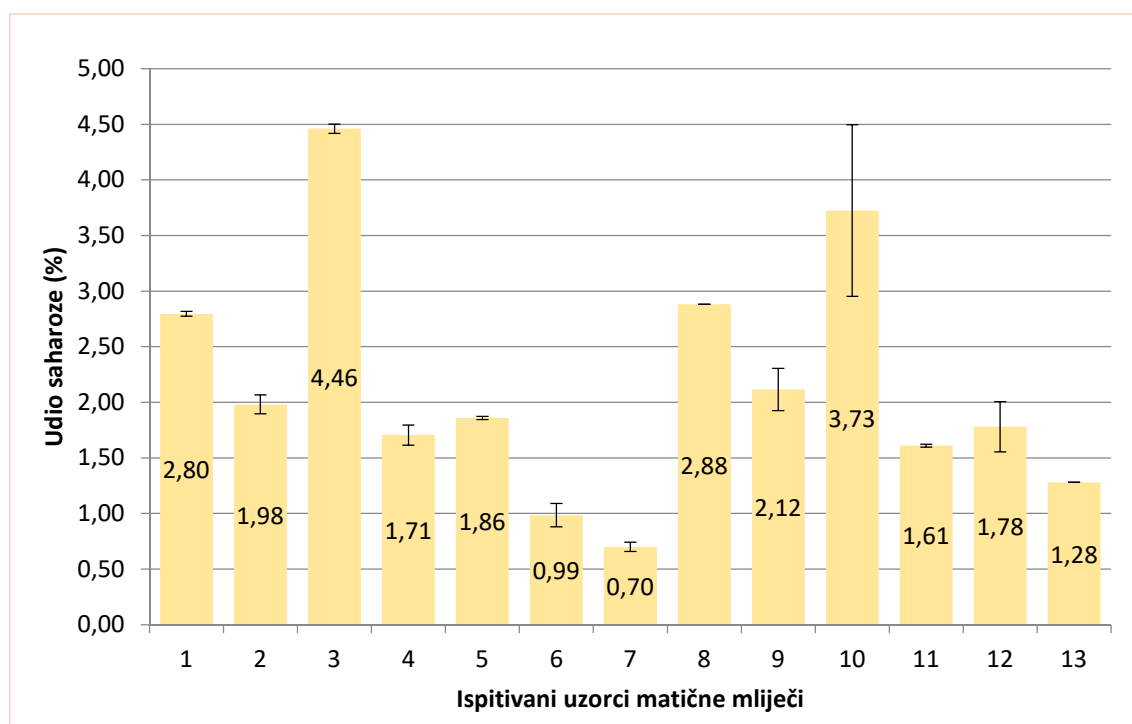
Slika 6 Udio 10-HDA (%) u ispitivanim uzorcima matične mliječi



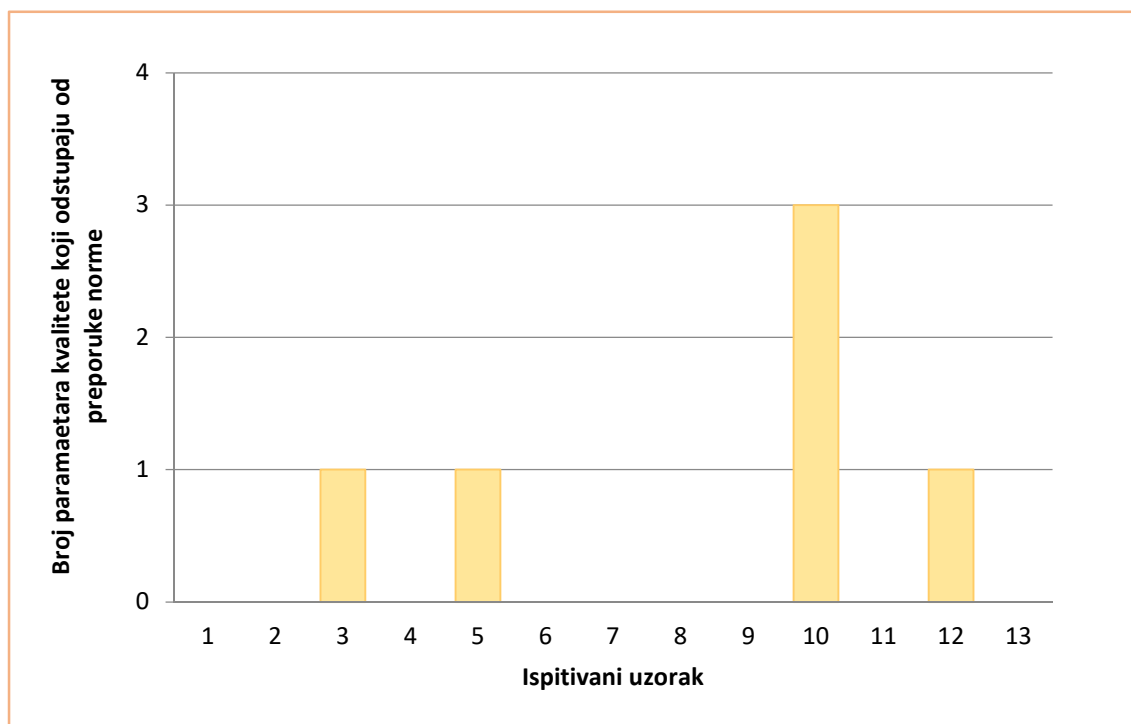
Slika 7 Udio fruktoze (%) u ispitivanim uzorcima matične mliječi



Slika 8 Udio glukoze (%) u ispitivanim uzorcima matične mliječi



Slika 9 Udio saharoze (%) u ispitivanim uzorcima matične mliječi



Slika 10 Broj parametara kvalitete koji odstupaju od preporuka norme ISO 12824:2016 po ispitivanom uzorku

5. RASPRAVA

Prema zadatku diplomskog rada provjerena je kvaliteta svježe matične mliječi proizvedene u Republici Hrvatskoj, a dobivene vrijednosti uspoređene su sa preporučenim vrijednostima međunarodne norme te dostupnim literaturnim podacima.

Udio vode u ispitivanim uzorcima matične mliječi kretao se od 63,7% do 76,3% (**Tablica 4**). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju sukladni su s dostupnim podacima drugih autora (Sabatini i sur., 2009; Balkanska i Kashamov, 2011; Bärnuțiu i sur., 2012; Yavuz i Gürel, 2017). Usporedbom dobivenih rezultata (**Tablica 4**) sa preporukama međunarodne norme ISO 12824:2016 (ISO, 2016) prema kojoj se udio vode u matičnoj mliječi kreće od 62,0% do 68,5% vidljivo je da dio uzoraka ima veći udio vode od maksimalno preporučene vrijednosti. Na **Slici 2** na kojoj su prikazani pojedinačni rezultati može se vidjeti da se radi o uzorcima 5 (udio vode 69,5%), 10 (udio vode 76,3%) i 12 (udio vode 72,0%). Veći udio vode od preporučenih vrijednosti objavili su autori Yavuz i Gürel (2017) koji su ispitivali svježnu matičnu mliječ sa turskog tržišta te zabilježili povećan udio vode ($> 70\%$) u 6 od 13 ispitivanih uzoraka, te Kolayli i sur. (2016) u čijem je istraživanju udio vode veći od 70% imalo 4 od 18 ispitivanih uzoraka svježe matične mliječi prikupljene od pčelara sa područja Anatolije. Varijacije u udjelu vode ovise o vremenu prikupljanja matične mliječi budući da je zabilježen niži udio vode od 60% pri prikupljanju 24 h nakon premještanja ličinki zbog kraćeg proizvodnog razdoblja, koji se povećava do 72 h nakon premještanja, a zatim opada jer pčele koriste dio vode (Zheng i sur., 2011; Kanelis i sur., 2015).

Udio bjelančevina u ispitivanim uzorcima iznosio je od 10,51% do 15,93% (**Tablica 4**). Usporedbom sa preporukama međunarodne norme (ISO, 2016) koja navodi raspon udjela bjelančevina od 11,0% do 18,0%, vidljivo je kako uzorak 10 (**Slika 3**) ima neznatno niži udio bjelančevina (10,51%) dok su vrijednosti ostalih uzoraka u skladu su preporukom norme. Niže vrijednosti udjela bjelančevina zabilježili su Sabatini i sur. (2009) u iznosu od 9% do 18%, zatim Kanelis i sur. (2015) za grčku matičnu mliječ (10,5 do 21,0 %) te Yavuz i Gürel (2017) za tursku ($10,65 \pm 0,12\%$). Messia i sur. (2005) zabilježili su kontinuirano smanjenje udjela bjelančevina tijekom prikupljanja matične mliječi u periodu od tri dana. Rezultati udjela bjelančevina ostalih 12 ispitivanih uzoraka u skladu su s literaturnim podacima drugih autora (Balkanska i Kashamov, 2011; Wytrychowski i sur., 2013; Bärnuțiu i sur., 2012; Mureșan i sur., 2016).

Kiselost matične mliječi potječe od organskih kiselina. U analiziranim uzorcima pH je iznosio od 3,98 do 4,21 (**Tablica 4**), a ukupna kiselost od 32,18 do 47,38 mL 1 M NaOH/100 g. Ukupna kiselost je u skladu s preporukama norme (30,0 do 53,0 mL 1 M NaOH/100 g) kako je vidljivo iz **Tablice 4** te **Slike 4**. Navedeni parametar kvalitete relativno je konstantan neovisno o vremenu prikupljanja (Zheng i sur., 2011) te geografskom podrijetlu matične mliječi, što potvrđuju istraživanja drugih autora (Sabatini i sur., 2009; Balkanska i Kashamov, 2011). Preporučene pH vrijednosti matične mliječi nisu navedene u međunarodnoj normi za kvalitetu matične mliječi (ISO, 2016), a dobiveni rezultati (**Slika 5**) u ovom istraživanju u skladu su s literaturom (Popescu i sur., 2009; Sabatini i sur., 2009; Balkanska i Kashamov, 2011).

Nezasićena masna kiselina 10-HDA predstavlja najvažniji parametar kvalitete i autentičnosti matične mliječi budući da je ova masna kiselina karakteristična za matičnu mliječ i ne nalazi se nigdje drugdje u prirodi. Međutim, u posljednje vrijeme dostupni su postupci sinteze ove masne kiseline (Zhong i Wu, 2014) te se stoga ovaj parametar ne može koristiti kao jedini pokazatelj autentičnosti matične mliječi. U ispitivanim uzorcima svježe matične mliječi udio 10-HDA iznosio je od 1,65% do 3,88% (**Tablica 4, Slika 6**), što je u skladu s preporukom norme (ISO, 2016) koja navodi minimalan udio 10-HDA u matičnoj mliječi od 1,4%. S obzirom na navedeno, može se zaključiti kako je matična mliječ sa područja istočne Hrvatske ispitivana u ovom radu autentična i svježna. Istraživanje koje su proveli Kanelis i sur. (2015) pokazalo je da se u uzorcima grčke matične mliječi udio 10-HDA kretao u rasponu od 0,8% do 6,5%, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, uz opasku da su rasponi intervala vrijednosti hrvatskog 10-HDA upola kraći u odnosu na grčki 10-HDA. Podaci o hrvatskoj matičnoj mliječi dostupni su samo za ovaj fizikalno-kemijski parametar kvalitete za koji su Flanjak i sur. (2017) objavili vrijednosti između 1,65% i 3,78%.

Udio i sastav ugljikohidrata značajan je za utvrđivanje krivotvorenja matične mliječi, naročito udjeli monosaharida glukoze i fruktoze jer su najzastupljeniji s iznosom od 80%, u odnosu na ostale ugljikohidrate (Daniele i Casabianca, 2012; Wytrychowski i sur., 2013). Osim toga, isti autori navode da udio di- i trisaharida može biti dobar parametar za kontrolu autentičnosti matične mliječi. Naime, povećani udio saharoze može biti posljedica prihrane pčela sirupima proizvedenim iz šećerne repe ili trske, a povišen udio maltoze i maltotrioze uočen je kod prihrane pčela šećernim sirupima proizvedenim iz žitarica ili kukuruza (Daniele i Casabianca,

2012; Wytrychowski i sur., 2013). Udio fruktoze u ispitivanim uzorcima u rasponu je od 2,82% do 5,82%, a glukoze od 2,56% do 6,36% (**Tablica 4, Slike 7-8**). Dobivene vrijednosti nalaze se unutar preporučenih (2% – 9%) za udio fruktoze i glukoze navedene u međunarodnoj normi za kvalitetu matične mliječi (ISO, 2016). Udjeli fruktoze i glukoze dobiveni u ovom istraživanju u skladu su sa rezultatima za francusku matičnu mliječ (Daniele i Casabianca, 2012) te grčku matičnu mliječ (Kanelis i sur., 2015) čije se vrijednosti kreću od 2% do 7,3% za udio fruktoze te 2,4% - 8,0% za udio glukoze. Prema Sabatini i sur. (2009) odnosno prema podacima koje je prikupila međunarodna komisija za med (IHC) udio glukoze u matičnoj mliječi može biti i do 13%. Saharoza je uvijek prisutna u matičnoj mliječi dok njezin udio može značajno varirati, zbog prihrane šećernim sirupima (Sabatini i sur., 2009). Osim povećanog udjela saharoze, u uzorcima matične mliječi dobivene od pčela koje su prihranjivane šećernim sirupima zabilježen je smanjeni udio fruktoze i glukoze oko 1 - 2% u odnosu na matičnu mliječ dobivenu od pčela koje su hranjene samo prirodnom hranom; medom, peludi i nektarom (Kanelis i sur., 2015). Udio saharoze kao najznačajnijeg disaharida u ispitivanim uzorcima svježe matične mliječi iznosio je od 0,70% do 4,46% (**Tablica 4**). Kako je vidljivo na **Slici 9** koja prikazuje udjele saharoze u pojedinačnim ispitivanim uzorcima matične mliječi, veće vrijednosti od maksimalno preporučenih 3% (ISO, 2016) imaju dvaju uzoraka, uzorak 3 u iznosu od 4,46%, te uzorak 10 u iznosu od 3,73%. Kod istih uzoraka dobivene su i niže vrijednosti udjela fruktoze i glukoze, što je u skladu s literaturom (Kanelis i sur., 2015). Kako su naveli sami pčelari, oba uzorka dobivena su od pčela koje su u vrijeme proizvodnje matične mliječi prihranjivana šećernim sirupima te su ove vrijednosti udjela saharoze bile očekivane.

Gledajući ukupno kvalitetu ispitivanih uzoraka matične mliječi i uspoređujući dobivene vrijednosti sa preporukama međunarodne norme (ISO, 2016) može se zaključiti da su prikupljeni uzorci svježe matične mliječi bili u skladu sa preporukama za sljedeće parametre: ukupnu kiselost, udio fruktoze i glukoze, te udio 10-HDA. Na **Slici 10** prikazana su odstupanja od preporučenih vrijednosti (ISO, 2016) po ispitivanom uzorku. Četiri uzorka (uzorak 3, 5, 10 i 12) imala su vrijednosti ispitivanih fizikalno-kemijskih parametara izvan preporučenih vrijednosti. Iako navedeni uzorci nisu u skladu sa preporukama međunarodne norme (ISO, 2016), dobivene vrijednosti usporedive su sa dostupnim literaturnim podacima za svježu matičnu mliječ iz različitih zemljopisnih područja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Uzorci svježe matične mliječi prikupljeni na području istočne Hrvatske u skladu su sa preporukama međunarodne norme za kvalitetu za sljedeće parametre: ukupnu kiselost, udio fruktoze i glukoze, te udio 10-HDA.
- Odstupanje od preporuka norme zabilježeno je kod četiri analizirana uzorka i to za udio vode, bjelančevina i saharoze. Međutim, dobiveni podaci u skladu su sa dostupnim literaturnim podacima.
- Udio 10-HDA, parametra koji se smatra najznačajnijim pokazateljem autentičnosti matične mliječi, u svim ispitivanim uzorcima svježe matične mliječi bio je iznad minimalne preporučne vrijednosti od 1,4%.
- Kvaliteta matične mliječi sa područja istočne Hrvatske pokazala se zadovoljavajućom jer je većina uzoraka bila u skladu sa preporukama norme za kvalitetu matične mliječi i dostupnim literaturnim podacima.

7. LITERATURA

- Balkanska R, Kashamov B: Composition and physico-chemical properties of lyophilized royal jelly. *Uludag Bee Journal* 11(4):114-117, 2011.
- Bărnuțiu LI, Mărghitaș L, Dezmirean DS, Mihai CM, Bobiș O: Chemical composition and antimicrobial activity of royal jelly-Review. *Animal Science and Biotechnologies*, 44:67-72, 2011.
- Bărnuțiu LI, Mărghitaș L, Dezmirean DS, Bobiș O, Bonta V, Pavel C: Preliminary study on chemical composition of fresh royal jelly from Transylvania. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 69(1-2):36-40, 2012.
- Ciulu M, Roberta F, Floris I, Nurchi VM, Panzanelli A, Pilo MI, Spano N, Sanna G: Determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in royal jelly by a rapid reversed phase HPLC method. *Analytical Methods*, 5:5010-5013, 2013.
- Daniele G, Casabianca H: Sugar composition of French royal jelly for comparison with commercial and artificial sugar samples. *Food Chemistry*, 134:1025-1029, 2012.
- Dimou M, Tananaki C, Goras G, Karazafiris E, Thrasyvoulou A: Melissopalynological analysis of royal jelly from Greece. *Grana*, 52(2):106-112, 2013.
- Ferioli F, Marcazzan GL, Caboni MF: Determination of (E)-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly: A comparison between a new CZE method and HPLC. *Journal of Separation Science*, 30:1061-1069, 2007.
- Flanjak I, Jakovljević M, Kenjerić D, Cvijetić Stokanović M, Primorac Lj, Bilić Rajs B: Determination of (2E)-10-hydroxydec-2-enoic acid in Croatian royal jelly by high-performance liquid chromatography. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 9(2):152-157, 2017.
- Furusawa T, Arai Y, Kato K, Ichihara K: Quantitative analysis of apisin, a major protein unique to royal jelly. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016: 5040528, 2016.

- Hu F, Bíliková K, Casabianca H, Daniele G, Espindola S, Feng M, Guan C, Han B, Krištof Kraková T, Li J, Li L, Li X, Šimúth J, Wu L, Wu Y, Xue X, Xue Y, Yamaguchi K, Zeng Z, Zheng H, Zhou J: Standard methods for *Apis mellifera* royal jelly. *Journal of Apicultural Research*, 58(2):1-68, 2017.
- GloryBee Royal Jelly: *Crown jewel of the beehive*, 2018. <https://glorybee.com/blog/royal-jelly-crown-jewel-of-the-beehive/> [26.02.2019.]
- Garcia-Amoedo LH, de Almeida-Muradian LB: Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. *Química Nova*, 30(2):257-259, 2007.
- ISO, International Standards Organisation: *Royal jelly-Specifications*. ISO 12824:2016. Kanelis D, Tananaki C, Liolios V, Dimou M, Goras G, Rodopoulou MA, Karazafiris E, Thrasyvoulou A: A suggestion for royal jelly specifications. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66:275-284, 2015.
- Kolayli S, Sahin H, Can Z, Yildiz O, Malkoc M, Asadov A: A member of complementary medicinal food: Anatolian royal jellies, their chemical compositions, and antioxidant properties. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 21(4):NP43-NP48, 2016.
- Messia MC, Caboni MF, Marconi E: Storage stability assessment of freeze-dried royal jelly by furosine determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4440-4443, 2005.
- Mureşan CI, Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Bobiş O, Bonta V, Zacharias I, Mărgăoan R, Paşca C: Quality parameters for commercialized royal jelly. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 73(1):1-8, 2016.
- Oršolić N: Učinkovitost biološki aktivnih sastavnica matične mliječi: analiza i standardizacija. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64:445-461, 2013.
- Popescu O, Mărghitas LA, Bobiş O, Stanciu O, Bonta V, Moise A, Dezmirean DS: Sugar profile and total proteins content of fresh royal jelly. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 66(1-2):265-269, 2009.

- Wytrychowski M, Chenavas S, Daniele G, Casabianca H, Batteau M, Guibert S, Brion B: Physicochemical characterisation of French royal jelly: Comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29:126–133, 2013.
- Yavuz İ, Gürel F: Chemical properties of the royal jellies in Turkish markets. *Mediterranean agricultural sciences*, 30(3):281-285, 2017.
- Stocker A, Rossman A, Kettrup A, Bengsch E : Detection of royal jelly adulteration using carbon and nitrogen stable isotope ratio analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20:181-184, 2005.
- Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, Almeida-Muradian LB: Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science*, 1(1):1-6, 2009.
- Zheng H-Q, Hu F-L, Dietemann V: Changes in composition of royal jelly harvested at different times: consequences for quality standards. *Apidologie*, 42(1):39-47, 2011.
- Zong Q-S, Wu J-Y: A new approach to the synthesis of royal jelly acid. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(3):399-401, 2014.