

# Enzimi u medu i njihove reakcije

---

**Kukec, Lara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:292412>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-19**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Lara Kukec

# **Enzimi u medu i njihove reakcije**

Završni rad

Osijek, 2024

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Lara Kukec

## **Enzimi u medu i njihove reakcije**

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2024

Naziv sveučilišta: **Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju**

Naziv studija: **Sveučilišni prijediplomski studij Kemija**

Znanstveno područje: **Prirodne znanosti**

Znanstveno polje: **Kemija**

Znanstvena grana: **Biokemija**

## **Enzimi i medu i njihove reakcije**

**Lara Kukec**

**Rad je izrađen na: Sveučilište u Osijeku – Odjel za kemiju**

**Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik**

**Sažetak:** U ovom završnom radu istražuju se enzimi prisutni u medu, s posebnim naglaskom na njihovu katalitičku aktivnost i utjecaj na kvalitetu meda. Proučavaju se metode određivanja enzimске aktivnosti, kao i utjecaj skladištenja i obrade meda na očuvanje te aktivnosti. Da bi se u potpunosti razumjela važnost enzima, potrebno je poznavati cjelokupan kemijski sastav meda, reakcije koje se u njemu odvijaju te njihove produkte, koji zajedno s enzimima oblikuju njegovu kakvoću. U fokusu su enzimi poput invertaze, dijastaze, katalaze i glukoza-oksidge, čije su specifične funkcije i reakcije detaljno analizirane, uzimajući u obzir uvjete djelovanja poput temperature, pH, obrade i skladištenja meda. Pregledom dostupne literature, istaknuta je ključna uloga enzima u očuvanju kvalitete i trajnosti meda. Također, razmatraju se metode za analizu enzimске aktivnosti i faktori koji utječu na njihovu stabilnost.

**Ključne riječi:** invertaza, dijastaza, glukoza oksidge, katalaza, aktivnost enzima

**Jezik izvornika:** hrvatski jezik

**Završni rad obuhvaća:** 30 stranica, 4 slike, 1 tablicu, 30 literaturnih navoda

**Rad prihvaćen:** 23.09.2024.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:**

1. doc. dr. sc. Olivera Galović, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica
3. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, članica
4. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek

Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Undergraduate study programme in Chemistry**

Scientific area: **Natural sciences**

Scientific field: **Chemistry**

Scientific branch: **Biochemistry and medicinal chemistry**

### **Enzymes in honey and their reactions**

**Lara Kukec**

**The paper was created on: Department of Chemistry**

**Supervisor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik**

**Abstract:** In this final paper, enzymes present in honey are studied, with a particular focus on their catalytic activity and their impact on honey quality. The methods for determining enzyme activity are examined, as well as the effects of storage and processing of honey on the preservation of this activity. To fully understand the importance of enzymes, it is essential to be familiar with the complete chemical composition of honey, the reactions that occur within it, and their products, which, together with enzymes, shape its overall quality. The focus is on enzymes such as invertase, diastase, catalase, and glucose oxidase, whose specific functions and reactions are thoroughly analyzed, considering conditions like temperature, pH, processing, and honey storage. Through the analysis of available literature, the critical role of enzymes in maintaining honey's quality and longevity is highlighted. Additionally, methods for analyzing enzyme activity and the factors influencing their stability are considered.

**Keywords:** invertase, diastase, glucose oxidase, catalase, enzyme activity

**Original language:** Croatian language

**Thesis includes:** 30 pages, 4 figures, 1 table, 30 references

**Thesis accepted:** 23.09.2024.

**Reviewers:**

1. Assist. Prof. Olivera Galović, PhD, chair
2. Assoc. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD, supervisor and member
3. Assoc. Prof. Elvira Kovač-Andrić, PdD, member
4. Assoc. Prof. Vlatka Gvozdić, substitute member

**Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek**

**Repository of the Department of Chemistry, Osijek**

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Osnovne karakteristike meda .....	3
2.1. Prezasićenost i kristalizacija.....	4
2.2. Viskoznost .....	4
2.3. Boja .....	5
2.4. Kiselost i pH .....	5
2.5. Higroskopnost .....	6
2.6. Aroma .....	6
2.7. Antimikrobna svojstva .....	7
3. Kemijski sastav meda .....	8
3.1. Šećeri u medu .....	9
3.2. Minerali i vitamini .....	9
3.3. Hlapljive komponente .....	10
3.4. Mikrobiološki sastav .....	10
3.4.1. Bakterije .....	10
3.4.2. Kvasci .....	11
3.5. Zagađivači i otrovni spojevi.....	11
4. Enzimi u medu .....	12
4.1. Invertaza .....	14
4.2. Dijastaza .....	15
4.3. Glukoza-oksidaza .....	15
4.4. Katalaza .....	16
4.4.1. Razgradnja vodikova peroksida .....	16
4.5. Proteaze .....	18
5. Neenzimske reakcije u medu.....	19
5.1. Maillardova reakcija.....	19
5.1.1. 5-Hidroksimetil furfural.....	20
6. Uloga enzima u kvaliteti meda .....	21
6.1. Parametri kvalitete meda .....	21
6.2. Metode za određivanje aktivnosti enzima.....	23
6.2.1. Aktivnost dijastaze.....	24
6.2.2. Aktivnost invertaze .....	24
6.3. Utjecaj skladištenja i obrade na enzime meda .....	25
7. Zaključak .....	28
8. Popis literature .....	29

## 1. Uvod

Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (NN 53/2015: Pravilnik o medu), med je sladak, gust, viskozni, tekući ili kristaliziran proizvod što ga medonosne pčele proizvode od nektara cvjetova medonosnih biljaka ili od medne rose, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari i odlažu u stanice saća da sazrije. Različite vrste meda razlikuju se po svom sastavu u ovisnosti o biljnom i zemljopisnom podrijetlu, klimatskim uvjetima, pasmini pčela te vještini samog pčelara [1].

Sav med počinje s nektarom. Za razliku od meda nektar sadrži oko 80 % vode te se opisuje kao vrlo rijetka i bezbojna otopina znatno manje slatka od meda. Također se razlikuje u kemijskom sastavu. Korištenjem enzima, pčele mogu pretvoriti složene šećere u nektaru u jednostavnije šećere. Zbog toga se med lakše probavlja od običnog bijelog šećera. Tajno oružje pčela medarica je njihova sposobnost da složene šećere iz nektara cvijeća pretvore u jednostavne šećere. Taj proces zove se hidroliza. Da bi se saharoza kemijski hidrolizirala u glukozu i fruktozu, potrebno je primijeniti kiseli katalizator uz zagrijavanje reakcije ili odgovarajući enzim. To je složen proces u laboratoriju, no kad je riječ o kemiji meda, pčele i njihovi enzimi mnogo su učinkovitije od znanstvenika. Fruktoza i glukozu se strukturno razlikuju te je fruktoza znatno slađa od glukoze.. Med je također malo slađi od bijelog šećera jer sadrži više fruktoze [2].

Med se uglavnom sastoji od šećera i vode. Biomedicinske aktivnosti meda su posljedica njegovih manje zastupljenih sastojaka koji uključuju proteine, aminokiseline, organske kiseline, vodikov peroksid, fenolne kiseline, flavonoide, minerale, vitamine i enzime. Glavni enzimi koje se nalaze u medu su dijastaze, koje pretvaraju škrob u maltozu, invertaze koje razgrađuju saharozu, glukozu oksidaze koje proizvode vodikov peroksid i katalaze koje reguliraju razinu vodikovog peroksida. Većina enzima potječe iz hipofaringealnih žlijezda pčela, jedino katalaza potječe iz peludi. Proteini matične mliječi također se proizvode u žlijezdama slinovnicama. Ovi proteini se obično nalaze u matičnoj mliječi, kojom se hrane ličinke kako bi se potaknuo njihov rast, ali često završe i u medu [2, 3].

Aktivnost enzima dijastaze i invertaze u medu, izravno je povezana s uvjetima zagrijavanja i skladištenja, jer su enzimi vrlo osjetljivi na visoke temperature i produljeno skladištenje. Zagrijavanje meda iznad određene temperature značajno smanjuje njihovu aktivnost, što može dovesti do gubitka kvalitete meda i njegovih nutritivnih svojstava. Pritom

se povećava koncentracija 5-hidroksimetilfurfurala koji nastaje kao nusproizvod Maillardove reakcije i razgradnje šećera. Njegova prisutnost se smatra pokazateljem toplinske degradacije meda te se njegova visoka koncentracija povezuje s gubitkom svježine. Optimalni uvjeti skladištenja, poput niske temperature i zaštite od svjetlosti, mogu usporiti smanjenje enzimske aktivnosti, dok nepravilno skladištenje potiče nepoželjne kemijske reakcije koje smanjuju nutritivnu vrijednost meda [13].

Enzimi, iako je njihov udio u medu izrazito nizak u usporedbi s ostalim komponentama meda, imaju veliku važnost. Cilj ovog rada je upoznati se s enzimima u medu i reakcijama koje oni kataliziraju. Med je poznat većini ljudi, no manjina njih zna da velik utjecaj na mnoga njegova svojstva i sastav imaju upravo enzimi. Spoznaja o pažljivom skladištenju i baratanju medom može unaprijediti njegovu kvalitetu nenarušavajući njegova ljekovita, nutritivna i antibakterijska svojstva.



## 2. Osnovne karakteristike meda

Med je složen prirodni proizvod koji se najvećim udjelom sastoji od šećera i vode, te dodatno manjih količina enzima, vitamina, minerala i aminokiselina. Njegova boja varira ovisno o vrsti cvijeta iz kojeg je nektar sakupljen, dok okus može biti blag ili intenzivniji. Zbog viskoznosti može biti težak za rukovanje, ali mu to daje specifičnu teksturu. Med je higroskopan, što znači da lako upija vlagu iz zraka, a njegova kiselost, koja se kreće između pH 3.2 i 4.5, pomaže inhibirati rast nekih mikroorganizama. Također, može doći do kristalizacije jer sadrži velik udio glukoze, što ga čini čvrstim. Ima vrlo dug rok trajanja zbog svoje kemijske strukture i prirodnih sastojaka, te se koristi u tradicionalnoj medicini zbog svojih antibakterijskih i protuupalnih svojstava. Sve ove karakteristike čine med ne samo popularnim zaslađivačem, već i hranjivim i ljekovitim proizvodom koji pridonosi zdravlju [3].

U fizikalna svojstva meda ubrajaju se kristalizacija, viskoznost, higroskopnost, električna vodljivost, optička svojstva, indeks refrakcije i specifična masa koja su ujedno usko povezana sa kemijskim sastavom meda. Pojedini sastojci meda utječu na jedno određeno fizikalno svojstvo ili istovremeno na nekoliko njih [1].

## 2.1. Prezasićenost i kristalizacija

Med se smatra prezasićenom otopinom, a prezasićena otopina je ona otopina koja sadrži veću količinu otopljene tvari nego što to odgovara topljivosti te tvari na danoj temperaturi [7].

U medu toplina, enzimi ili drugi kemijski agensi mogu povećati količinu otopljene tvari. Kao i svaka prezasićena otopina, med ima tendenciju kristalizirati. Kristalizacija se događa kada se dugi lanci glukoze iz polisaharida razgrađuju. Molekule glukoze počinju se međusobno lijepiti na čestici prašine ili peludi. Kristali glukoze se tada skupljaju na dnu posude. Problem kristalizacije se očituje u odvajanju glukoze iz meda čime preostala tekućina sadrži veći postotak vode. Kvasci trebaju vodu za aktivaciju svojih metaboličkih procesa. U suhom okruženju, kvasci ne mogu fermentirati šećere jer im nedostaje potrebna tekućina za rast i aktivnost. Zato med koji kristalizira može brže fermentirati nego med koji nije kristaliziran. Temperatura može utjecati na kristalizaciju. Med je najbolje čuvati na temperaturi iznad 10°C. Istraživači su također zaključili da je med uklonjen iz saća i obrađen pomoću ekstraktora i pumpi, skloniji kristalizaciji od meda koji je ostao u saću, zbog finih čestica koje služe kao jezgra za početak stvaranja kristala. Drugi čimbenici koji pridonose kristalizaciji su prašina, mjehurići zraka i pelud u medu. Kristalizacija nije uvijek loša. Kremasti med ovisi o kontroliranoj kristalizaciji. Dok prirodna kristalizacija stvara zrnate kristale, kontrolirana kristalizacija stvara glatki i kremasti proizvod [2].

## 2.2. Viskoznost

Zbog svoje prezasićenosti i niskog sadržaja vode med je izrazito viskozan. Viskoznost je unutarnje trenje pri strujanju fluida zbog različite brzine gibanja njegovih slojeva. Viskoznost uzrokuje međumolekulske kohezijske sile u fluidu i adhezijske sile između fluida i krutoga tijela kroz koje se ili oko kojeg se odvija strujanje. Slojevi fluida uz stijenke posude usporavaju brže slojeve iz ostalih dijelova posude [8].

To znači da je med prilično gust po konzistenciji i ponekad čvrst. Viskoznost je jedna od najvažnijih fizikalnih i osjetilnih karakteristika meda, koja utječe na kvalitetu proizvoda, kao i na dizajn opreme za obradu meda. Važnost ovog parametra u procesnom inženjeringu ključna je u svim fazama proizvodnje meda, počevši od ekstrakcije meda iz saća, cijedenja,

miješanja različitih vrsta meda, pumpanja, obrade i pakiranja. Na viskoznost meda utječu temperatura, sadržaj vlage te prisutnost kristala i koloida u proizvodu. Brojni su istraživači proučavali viskoznost meda kao funkciju temperature pri specifičnom sadržaju vlage te zaključili da viskoznost meda varira ovisno o temperaturi, sadržaju vlage i botaničkom podrijetlu. Utvrđeno je da med od bora i jele ima znatno veću viskoznost od meda timijana, pamuka i suncokreta na istoj temperaturi i pri istom sadržaju vlage [9].

### **2.3. Boja**

Toplina i kristalizacija mogu utjecati na boju meda. Kristali u medu uzrokuju da med izgleda svjetlije. Zbog toga je kremasti med svjetlije boje. U prirodi je boja meda rezultat vrste cvjetnog nektara od kojeg je med proizveden, stoga će med prikupljen u jesen biti različite boje od onog prikupljenog u proljeće, jer različito cvijeće cvjeta u različitim razdobljima godine. Med se može klasificirati u sedam kategorija boje: vodeno bijeli, ekstra bijeli, bijeli, ekstra svijetlo-jantarni, svijetlo-jantarni, jantarni i tamno jantarni. Svjetlije boje meda najčešće imaju blaži okus od tamnijih vrsta meda [5].

### **2.4. Kiselost i pH**

Poznato je da se u medu nalazi niz organskih kiselina, uključujući octenu, maslačnu, limunsku, mravlju, glukonsku, mliječnu, jabučnu, pirolutaminsku i sukcinusku kiselinu. Njihova prisutnost može se koristiti za opisivanje botaničkog porijekla meda. Sadržaj kiseline u medu je relativno nizak, ali važan za okus meda. Većinu kiselina dodaju pčele. Glavna organska kiselina u medu je glukonska kiselina, koja nastaje djelovanjem enzima glukoza-oksidadaze na glukozu. Glukonska kiselina ima svojstva koja pojačavaju okus meda. Većina vrsta meda je kisela, što znači da im je pH vrijednost manja od 7. pH cvjetnih vrsta medova varira između 3.3 i 4.6. Iznimka je kestenov med s relativno visokom pH vrijednošću od 5 do 6. Medljikavi medovi, zbog većeg sadržaja minerala, imaju višu pH vrijednost, koja varira između 4.5 i 6.5. Med je pufer, što znači da se njegova pH vrijednost znatno ne mijenja dodavanjem malih količina kiselina i baza. Puferna sposobnost rezultat je sadržaja fosfata, karbonata i drugih mineralnih soli. Nizak pH meda inhibira prisutnost i rast mikroorganizama te ga čini kompatibilnim s mnogim prehrambenim proizvodima [3, 5].

## 2.5. Higroskopnost

Med je higroskopan. Higroskopne tvari su čvrste ili tekuće tvari koje upijaju i zadržavaju vodu iz svoje okoline [10].

Ako ostane nepokriven, med će početi skupljati vlagu iz zraka. Ova dodatna vlaga u medu omogućit će kvascu da započne proces fermentacije. Med ima nizak sadržaj vlage, što pomaže njegovom očuvanju, ali ako sadržaj vlage poraste iznad 25 %, početak će fermentirati. Zato se skuplja zapečaćeni med iz košnice. On ima niži sadržaj vlage i znatno je manja vjerojatnost da će fermentirati [3].

## 2.6. Aroma

Med sadrži raznoliku skupinu bioaktivnih tvari, ima atraktivna kemijska svojstva i prepoznatljiv okus i aromu, što ga često čini prvim izborom u kontekstu zaslađivača. Aroma meda je jedno od njegovih najprepoznatljivijih obilježja te potrošači često biraju proizvode od meda na temelju arome. Hlapljivi sastavi glavni su faktori odgovorni za aromu, koji, zajedno s drugim čimbenicima, poput okusa i fizičkih svojstava, doprinose ukupnom okusu meda. Oni određuju specifične karakteristike uzoraka meda te time utječu na preferencije potrošača među raznim vrstama meda. Općenito, med se klasificira prema cvjetnom izvoru nektara od kojeg je proizveden. Različiti okusi i aromatične karakteristike otkrivene su među različitim vrstama meda, isključivo zbog njihovog različitog podrijetla i karakterističnog hlapljivog sastava. Analiza ekstrakta arome pokazala je da su karakteristične komponente arome heljadinog meda 3-metilbutanal, 3-hidroksi-4,5-dimetilfuran-2(5H)-on dok su markeri meda od lipe 4-terc-butilfenol, neidentificirani izomer etil-metilfenola, 1-metoksi-4-(prop-2-en-1-il)benzen, (1R,2S,5R)-2-izopropil-5-metilcikloheksanol, 1-izopropenil-4-metilbenzen, 1-(4-metilfenil)etanon, 2-hidroksi-p-mentan-8-ol, 5-izopropil-2-metilfenol, 5-metil-2-(propan-2-il)fenol [11].

## 2.7. Antimikrobna svojstva

Većina antibakterijske aktivnosti medova posljedica je prisutnosti vodikovog peroksida, visokog udjela šećera i niskog pH koji se pripisuje prisutnosti organskih kiselina u medu, poput glukonske kiseline. Medovi koji proizvode vodikov peroksid koriste se u oblogama za rane i opekline, bilo samostalno ili u kombinaciji s drugim lijekovima [11].

U trendu korištenja antimikrobnih spojeva iz prirodnih i obnovljivih izvora, prirodni antimikrobni spojevi, posebno oni prisutni u hrani i s potencijalnim biomedicinskim primjenama. Antibakterijska svojstva meda dobro su literaturno opisana. Vodikov peroksid glavni je spoj odgovoran za antibakterijsko djelovanje meda. Vodikov peroksid je snažan antimikrobni agens koji se proizvodi tijekom oksidacije glukoze, katalizirane djelovanjem enzima glukoza oksidaze. Koncentracija vodikovog peroksida u medu određena je brzinom njegove proizvodnje glukoza oksidazom i njegovom razgradnjom pomoću katalaze. Razina vodikovog peroksida može značajno varirati između različitih vrsta meda. U istraživanju K. Brudzynski i sur. 2011. godine ispitala se uloga vodikova peroksida u antibakterijskoj aktivnosti meda te vodikov peroksid, pokazuje snažno antimikrobno djelovanje. Istraživanje je utvrdilo da koncentracija  $H_2O_2$  u medu varira, a med s višim razinama  $H_2O_2$  ima jače antibakterijsko djelovanje na *Escherichiu coli*, dok *B. subtilis* pokazuje otpornost, sugerirajući da su za djelovanje meda odgovorni i drugi spojevi ili fizičke karakteristike. Ispitivanje je također pokazalo da  $H_2O_2$  iz meda može uzrokovati degradaciju bakterijske DNA što dovodi do smrti stanice. Unatoč prisutnosti antioksidansa koji bi mogli smanjiti oksidativni stres, zaključeno je da interakcija između  $H_2O_2$  i drugih spojeva u medu povećava njegov antimikrobni učinak. Istraživanje prikazuje antibakterijski mehanizam meda i ulogu vodikova peroksida u inhibiciji rasta i uništavanju bakterija [11].

### 3. Kemijski sastav meda

Med je hranjiva hrana od ekonomskog značaja širom svijeta i najvažniji je primarni proizvod pčelarstva, koji čovječanstvo koristi od davnina. U pogledu podrijetla, med se može klasificirati kao cvjetni, necvjetni ili miješani. Stoga postoji razlika u kemijskom sastavu između medova. Više od 600 spojeva identificirano je kao hlapljivi sastojci meda iz različitih kemijskih obitelji, koji potječu iz raznih biosintetskih puteva. Hlapljivi organski spojevi mogu potjecati iz biljnog ili nektarskog izvora, iz transformacije biljnih spojeva metabolizmom pčela, iz zagrijavanja ili rukovanja tijekom obrade i skladištenja meda, ili iz mikrobiološke ili okolišne kontaminacije [3, 5].

Biomedicinske aktivnosti meda su posljedica njegovih manje zastupljenih sastojaka, koji uključuju proteine, aminokiseline, organske kiseline, dikarbonilne molekule, vodikov peroksid, fenolne kiseline, flavonoide i enzime. Iako su prisutni u malim količinama, oni igraju značajnu ulogu u proizvodnji meda [3, 5].

Voda je drugi najvažniji sastojak meda. Njezin sadržaj je ključan jer utječe na skladištenje meda. Konačni sadržaj vode ovisi o brojnim okolišnim čimbenicima tijekom proizvodnje, kao što su vrijeme i vlažnost unutar košnica, ali i o uvjetima nektara te postupku obrade meda tijekom ekstrakcije i skladištenja. Organske kiseline čine 0.57 % meda i uključuju glukonsku kiselinu, koja je nusproizvod enzimske razgradnje glukoze. Organske kiseline odgovorne su za kiselost meda i značajno doprinose njegovom karakterističnom okusu. Minerali su prisutni u medu u vrlo malim količinama (0.17 %), pri čemu je kalij najzastupljeniji. Ostali minerali uključuju kalcij, bakar, željezo, mangan i fosfor. Prisutni su i dušični spojevi, među kojima se enzimi podrijetlom iz sline radnih pčela, koji imaju važnu ulogu u formiranju meda. Vitamini C, B te B2 kompleks poput riboflavina, nikotinske kiseline i B6 također su prisutni [3, 5, 21].

### 3.1. Šećeri u medu

Šećeri su glavni sastojci meda te čine oko 95 % suhe mase meda, a najveći udio šećera u medu otpada na monosaharide fruktozu i glukozu. Osim toga, otkriveno je još oko 25 različitih šećera. Glavni oligosaharidi u medu cvjetnog podrijetla su disaharidi: saharoza, maltoza, turanoza i erloza. Medljikovi medovi također sadrže i trisaharide melezitozu i rafinozu. Izolirane su i male količine tetrasaharida i pentasaharida. Omjer dvaju monosaharida, fruktoze i glukoze, koristan je za klasifikaciju uniflornih medova. S druge strane, spektar manjih šećera ne razlikuje se značajno u različitim cvjetnim medovima. To je zbog činjenice da su oligosaharidi uglavnom produkt invertaze iz meda. Postoje značajne razlike u šećernom spektru cvjetnih i medljikovitih medova, pri čemu oni sadrže veće količine oligosaharida, prvenstveno trisaharide melezitozu i rafinozu, koji su odsutni u cvjetnom medu. Razlikovanje između različitih vrsta medljikovih medova je teško. Sastav šećera može se odrediti različitim kromatografskim metodama, pri čemu je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC), najčešće korištena metoda [3].

### 3.2. Minerali i vitamini

Med cvjetnog podrijetla ima sadržaj minerala uglavnom između 0.1 i 0.3 %, dok kod medljikovih medova može doseći 1 % ukupnog sadržaja. U prošlosti je sadržaj minerala bio određen kao kriterij kvalitete meda. Danas je ovo mjerenje zamijenjeno određivanjem električne vodljivosti. Med sadrži različite količine mineralnih tvari, u rasponu od 0.02 do 1.03 g/100 g. Glavni element koji se nalazi u medu je kalij, uz mnoge druge elemente. Kalij, s prosječno oko jedne trećine ukupnog sadržaja, je glavni mineralni element, ali postoji širok raspon elemenata u tragovima, poput kalcija, magnezija, natrija i željeza te vitamini C i B kompleksa. Nekoliko istraživanja je pokazalo da sadržaj elemenata u tragovima u medu uglavnom ovisi o botaničkom podrijetlu meda, pri čemu svijetli cvjetni medovi imaju niži sadržaj od tamnijih medova, poput medljikovog, kestenovog i vrijeskovog meda. Moguće je razlikovati različite uniflorne medove određivanjem različitih elemenata u tragovima [3].

### 3.3. Hlapljive komponente

Hlapljive tvari meda su spojevi odgovorni za aromu meda. Istraživanje hlapljivih tvari u medu započelo je početkom 1960-ih. Nedavno je, proučavanjem hlapljivih tvari izoliranih iz cvjetova i pripadajućeg unifloralnog meda, otkriveno da većina hlapljivih spojeva vjerojatno potječe od biljke, ali neke od njih dodaju pčele. Budući da se uniflorni medovi razlikuju po svojim senzornim svojstvima, vjerojatno je da će analiza hlapljivih spojeva omogućiti klasifikaciju uniflornih medova. Fenolne kiseline i polifenoli su sekundarni biljni metaboliti. Ovi spojevi koriste se kao kemotaksonomski markeri u sistematici biljaka te su predloženi kao mogući markeri za određivanje botaničkog podrijetla meda. Utvrđene su značajne razlike u sastavu i sadržaju fenolnih spojeva između različitih monofloralnih medova. Tamniji medovi sadrže više derivata fenolnih kiselina, ali manje flavonoida nego svjetliji medovi. Pokazano je da se većina od proučavanih devet europskih unifloralnih medova može razlikovati prema njihovom tipičnom flavonoidnom profilu. Uzorci meda također sadrže varijabilne količine fenolnih spojeva porijeklom iz propolisa, koji nisu bili korisni za određivanje botaničkog podrijetla. Sve u svemu, određivanje flavonoidnih obrazaca korisno je za klasifikaciju nekih, ali ne svih unifloralnih medova [3].

### 3.4. Mikrobiološki sastav

Uz svoje osnovne komponente, med u svom sastavu sadrži i bakterije i kvasce. Taj sastav je bitan za određivanje kvalitete meda te uvelike odlučuje o načinu pohrane meda.

#### 3.4.1. Bakterije

Med je vrlo koncentrirana otopina šećera s visokim osmotskim tlakom, što onemogućuje rast bilo kakvih mikroorganizama. Sadrži manje mikroorganizama u usporedbi s drugom prirodnom hranom, osobito nema opasnih vrsta *Bacillus* bakterija. Med sadrži *Bacillus* bakterije koje uzrokuju opasne bolesti pčela, ali one nisu toksične za ljude. Zbog toga, kako bi se spriječile bolesti pčela, med se ne bi trebao odlagati na otvorena mjesta gdje ga pčele mogu lako pronaći. Postoje mnogi drugi patogeni koji se prenose putem hrane. Bakterije koje izazivaju najveću zabrinutost su *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella spp.* Nijedan od tih organizama nije otkriven u medu niti je povezan s bolestima nakon konzumacije meda. *Clostridium botulinum* je patogen koji izaziva najveću zabrinutost



u medu jer je povremeno povezan s infantilnim botulizmom. Ovaj sindrom nastaje kada se crijeva dojenčeta koloniziraju bakterijom *C. botulinum* koja, nakon što se proguta u obliku spore, klija, razmnožava se i proizvodi toksin koji putem krvotoka dospijeva do središnjeg živčanog sustava, uzrokujući mlitavu paralizu. Prvi put je prisutnost spora *C. botulinum* u medu zabilježena 1976. godine. Od tada su provedene mnoge studije meda diljem svijeta. U nekim od njih nije pronađen *botulinum*. Neke zdravstvene vlasti su dale upozorenje da se med ne daje dojenčadi do jedne godine starosti. Većina zemalja smatra da takvo upozorenje nije potrebno jer on nije jedini izvor ovih spora te se one mogu pronaći u bilo kojoj prirodnoj hrani [3, 4].

### **3.4.2. Kvasci**

Med prirodno sadrži različite osmotski otporne kvasce koji mogu uzrokovati nepoželjnu fermentaciju. Osmotski otporni kvasci osobito se razvijaju u medovima s visokim sadržajem vlage. Lochhead je 1933. godine sažeo istraživanja o odnosu sadržaja vlage i fermentacije na 319 uzoraka meda. Dovedeni su zaključci da neke vrste meda, poput uljane repice, suncokreta i medovi iz tropskih zemalja, imaju viši sadržaj osmotski otpornih kvasaca i manje su stabilni od drugih medova s normalnim brojem kvasaca. Fermentacija meda je nepoželjna. Najlakši način kontrole je sakupljanje meda s niskim udjelom vlage. Također, med treba čuvati u hermetički zatvorenim posudama. Kontrola fermentacije provodi se određivanjem broja kvasaca, sadržaja etanola i glicerina [3].

### **3.5. Zagađivači i otrovni spojevi**

Med može biti kontaminiran iz okoliša kao i svaka druga hrana. Najčešće je kontaminiran teškim metalima, pesticidima i antibioticima. Razine kontaminacije koje su pronađene ne predstavljaju zdravstvenu opasnost. Glavni problem danas je kontaminacija antibioticima, koji se koriste protiv bolesti pčelinjeg legla. U Europskoj uniji uporaba antibiotika nije dopuštena, stoga med koji sadrži antibiotike također nije dopušten na tržištu. Nekoliko biljaka proizvodi nektar koji sadrži toksične tvari koje se nalaze u različitim vrstama meda, a potencijalna intoksikacija ovim tvarima znanstveno je istražena. Slučajevi trovanja medom vrlo su rijetki. Uglavnom se odnose na osobe iz dijelova Kavkaza, Turske, Novog Zelanda, Australije, Japana, Nepala, Južne Afrike i Sjeverne i Južne Amerike. Otrovnost biljke su poznate pčelarima, stoga se med koji može sadržavati otrovne tvari ne plasira na tržište [3].

## 4. Enzimi u medu

Enzimi su biološki katalizatori, tvari koje izrazito ubrzavaju biokemijske procese u živim organizmima. Enzimi su proizvodi žive stanice, a po kemijskoj su prirodi bjelančevine, iako među njima ima i katalitičkih ribonukleinskih kiselina. Reakcije koje kataliziraju su reakcije oksidacije i redukcije, prijenos skupina atoma, hidrolitičke reakcije, reakcije izomerizacije, reakcije eliminacija skupina atoma uz nastanak dvostruke veze i reakcije stvaranja kovalentne veze uz istodobnu hidrolizu adenozin-trifosfata. Spojevi na koje enzim djeluje nazivaju se njegovim supstratima. Enzimske su reakcije  $10^6$  do  $10^{12}$  puta brže od ne kataliziranih i barem tisuću puta brže od reakcija kataliziranih kemijskim katalizatorima. One se zbivaju pod fiziološkim uvjetima, dok kemijska kataliza često zahtijeva ekstremne uvjete temperature, tlaka i koncentracije vodikovih iona. Enzimi pokazuju visoku specifičnost prema svojim supstratima, a to omogućuje da se važni biološki procesi, poput sinteze velikih molekula bjelančevina ili nukleinskih kiselina, odvijaju gotovo bez pogreške. Aktivnost pojedinih enzima koče njihovi specifični inhibitori, a pojačavaju je aktivatori. Neki enzimi mogu djelovati samo u prisutnosti kofaktora. To mogu biti ioni metala ili pak neke organske molekule koenzimi [14].

Med može sadržavati brojne različite enzime. Neki od njih unose pčele, dok se neki nalaze u nektaru. Kao i kod većine aspekata meda, različiti izvori nektara i meda imaju vrlo različitu enzimsku aktivnost. Od svih enzima u medu, najviše pažnje dobili su dijastaza i invertaza. Pčele ih unose u med, ali njihova prisutnost u svježem medu može varirati. Smatra se da na njihovu prisutnost utječu sastav i koncentracija nektara, starost pčela i intenzitet protoka nektara. Primjerice, intenzivan protok nektara s visokom koncentracijom obično rezultira niskim vrijednostima aktivnosti dijastaze i invertaze. Pčele medarice ne skupljaju samo nektar, već ga kemijski mijenjaju. U svojim žlijezdama slinovnicama proizvode enzim zvan invertaza. Ovi enzimi ne troše se tijekom reakcije, pa se mogu koristiti iznova i iznova. Nakon što pčela sakupi nektar, dodaje invertazu. Ovaj enzim pomaže pretvoriti saharozu u glukozu i fruktozu. Što označava početak stvaranja meda. Drugi enzimi također pomažu da med ima bolji okus. Dijastaza je enzim koji pomaže razgraditi amilozu u glukozu. Glukoza se lakše probavlja i ona čini med slađim. Drugi enzim, glukoza-oksidaza, zatim razgrađuje glukozu i stabilizira pH meda. Katalaza pretvara vodikov peroksid u vodu i kisik, čime se smanjuje sadržaj vodikovog peroksida. Kao i svaki dobar kemičar, pčele slijede protokol kako bi napravile med. Pčele skupljačice usisavaju nektar pomoću rilca. Zatim dodaju invertazu

dok prenose nektar. Ova invertaza počinje razgrađivati saharozu u glukozu i fruktozu u želucu za med. Zatim skupljačice prenose nektar u košnicu, gdje se dodaju dodatni enzimi. Taj proces dodavanja enzima nastavlja se svaki put kad neka pčela preuzme nektar. Pčele u košnici ponovno konzumiraju nektar tijekom razdoblja od 20 minuta, što dodatno razgrađuje šećere. Kada nektar sadrži oko 20 % vode, polaže se na saće, gdje ga pčele ventiliraju kako bi ubrzale proces isparavanja i dodatno zgusnule med. Pčele prestaju kada koncentracija vode bude između 17-18 % te ga premještaju na mjesto za skladištenje [2,3,5].

## 4.1. Invertaza

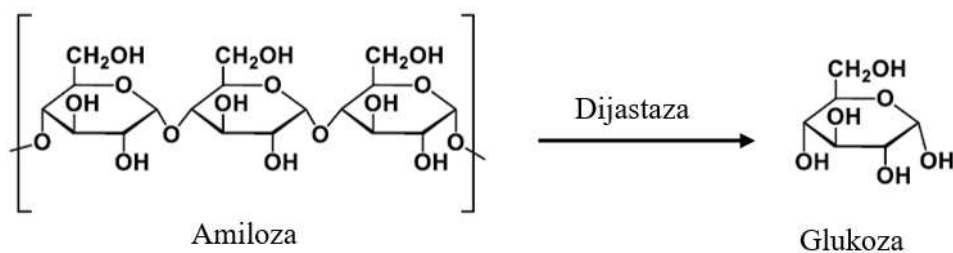
Invertaza ili beta-fruktofuranosidaza je globularni protein koji hidrolizira saharozu u živim organizmima. Ovaj enzim je široko rasprostranjen u biosferi, osobito u pekarskom kvascu i biljkama. Zanimljiv je enzim koji se široko koristi u industrijskim procesima, no još uvijek nisu objavljene sveobuhvatne informacije o tom enzimu. Ugljikohidrati su jedna od najzastupljenijih vrsta makromolekula koje proizvode različiti organizmi. Ove polimerne strukture imaju brojne uloge u stanici, ali njihova najvažnija uloga je primarni izvor energije. Sintaza saharoze je nepovratan proces te se saharoza može koristiti kao izvor energije samo u prisutnosti enzima koji ju razgrađuje. Taj esencijalni enzim, invertazu proizvode biljke, bakterije, gljive i neki životinjski organizmi. Smjesa nastala djelovanjem invertaze poznata je kao invertni šećer, a sastoji se od jednakih omjera D-glukoze i D-fruktoze. To je enzim koji može razgraditi  $\alpha$ -1,4-glikozidnu vezu između D-glukoze i D-fruktoze u saharozi i prenijeti  $\alpha$ -D-O-fruktofuranosidni ostatak na supstratni akceptor što prikazuje slika 1. Stoga invertaza djeluje kao hidrolitički enzim, ali također ima transferaznu aktivnost, osobito pri visokim koncentracijama saharoze. Prvi pokušaji izolacije invertaze napravljeni su iz kvasca. Ovaj se enzim izlučuje iz hipofaringealnih žlijezda pčela, a njegova aktivnost doseže vrhunac dok med zri. Neka istraživanja koristila su aktivnosti invertaze kao parametra kvalitete za predviđanje cvjetnog podrijetla uzoraka meda primjenom kemometrijske analize [13].



**Slika 1.** Prikaz reakcije razgradnje saharoze na glukozu i fruktozu djelovanjem enzima invertaze [15].

## 4.2. Dijastaza

Dijastaza ili  $\alpha$ -amilaza je jedan od glavnih enzima u medu. Dijastaza je odgovorna za pretvaranje nektarnih polisaharida amiloze u glukozu što prikazuje slika 2. Ovi enzimi, između ostalog, služe kao parametri kvalitete meda i indikatori za procjenu uvjeta skladištenja meda. Njihova je uloga razgradnja složenih ugljikohidrata poput škroba u manje šećere, koji se lakše metaboliziraju. Pčele dodaju dijastazu nektaru tijekom hranjenja, iako nije jasno zašto se ova funkcija razvila budući da u nektaru nema škroba. Pčele nemaju način ukloniti dijastazu nakon što je dodana pa ona završi u nastalom medu, gdje se očuva kroz duže vremensko razdoblje. To je prvi put otkriveno u Njemačkoj 1910. godine. Ubrzo nakon toga, uočeno je da se dijastaza deaktivira zagrijavanjem, te se može koristiti kao neizravna mjera svježine uzorka meda [13].



*Slika 2.* Prikaz razgradnje amiloze na glukozu djelovanjem enzima dijastaze [15].

## 4.3. Glukoza-oksidadaza

Enzim glukoza oksidaza, je važan oksidoreduktazni enzim s mnogim značajnim ulogama u biološkim procesima. Smatra se idealnim zbog brzog mehanizma djelovanja, visoke stabilnosti i specifičnosti. Glukoza-oksidaza katalizira pretvorbu glukoze u glukonsku kiselinu i vodikov peroksid u prisutnosti molekularnog kisika. Trenutno je poznato da ovaj enzim proizvode samo gljive i insekti. Njena aktivnost uvelike varira među različitim vrstama meda. Čini se da je njena aktivnost povezana s određenim izvorima meda, primjerice, medljikovac obično ima visoku razinu aktivnosti. Aktivnost glukoza-oksidade se smanjuje pod utjecajem topline, svjetlosti i drugih oblika energije poput mikrovalova. Neki medovi gube aktivnost ovog enzima čak i uz male količine vidljive svjetlosti, dok se u drugima može zadržati ta aktivnost čak i pri izlaganju jakom sunčevom svjetlu. [16].

## 4.4. Katalaza

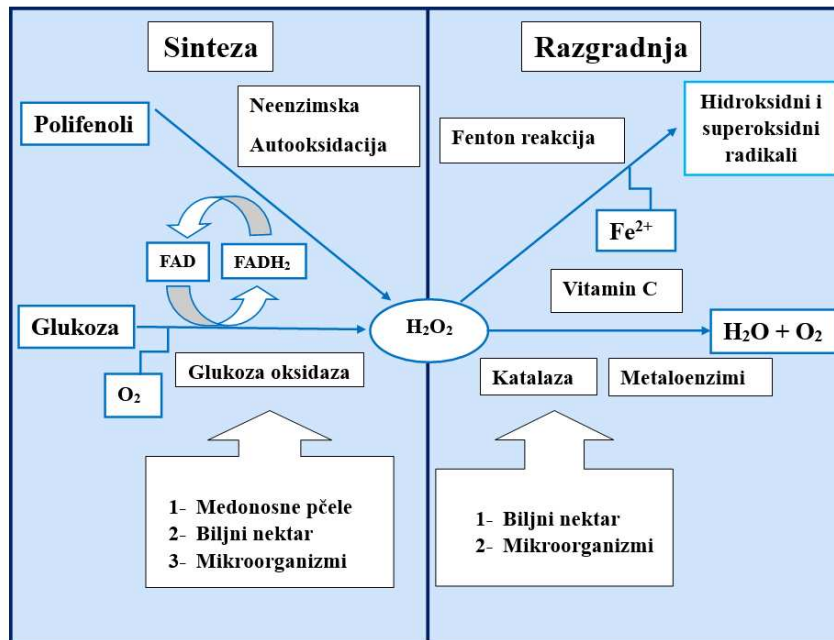
Katalaza je zabilježena u nekim vrstama meda te njena prisutnost potječe iz nektara, odnosno iz biljnih izvora. Katalaza razgrađuje vodikov peroksid pa će njena prisutnost smanjiti antibakterijsko djelovanje koje nastaje kao rezultat aktivnosti glukoza-oksidge. Varijabilnosti u proizvodnji vodikova peroksida ovisi o prisutnosti ili odsutnosti katalaze u nektaru određene biljne vrste. Aktivnost katalaze u medu djelomično se pripisuje i kvascima te drugim mikroorganizmima. Katalaza regulira aktivnost glukoza-oksidge u medu, čime kontrolira ravnotežu vodikova peroksida te je njeno djelovanje prikazano na drugom dijelu slike 3. Aktivnost katalaze varira ovisno o botaničkom podrijetlu meda [13].

### 4.4.1. Razgradnja vodikova peroksida

Vodikov peroksid nastaje kao produkt oksidacije glukoze putem glukoze-oksidge i nekatalitičke autooksidacije polifenola. Glukoza-oksidge katalizira pretvorbu glukoze u glukonsku kiselinu i vodikov peroksid, koristeći molekularni kisik i vitamin B2 kao kofaktore. Vodikov peroksid se u medu razgrađuje putem enzimske i neenzimske reakcije. Glavni katabolički enzim vodikovog peroksida je katalaza ovisna o  $Fe^{3+}$ , koja katalizira pretvorbu dviju molekula vodikova peroksida u dvije molekule vode i jednu molekulu kisika [13,19].

Ostali enzimi koji sadrže metale, metaloenzimi, sposobni su pretvoriti vodikov peroksid u vodu slijedeći drugačiji mehanizam djelovanja. Metaloenzimi uključuju peroksidaze i superoksid-dismutazu. Neenzimske reakcije odgovorne za razgradnju vodikovog peroksida su reakcije vitamina C i Fentonove reakcije. Vitamin C donira dva protona i dva elektrona vodikovom peroksidu, reducirajući ga u vodu i kisik. Dodatak vitamina C uzorcima meda vodi do smanjenja razine vodikovog peroksida, što potvrđuje pretpostavku da vitamin C razgrađuje vodikov peroksid. Druga neenzimska reakcija koja smanjuje vodikov peroksid u medu je Fentonova reakcija. Fentonove reakcije uključuju reakciju vodikovog peroksida s  $Fe^{2+}$  ili polifenolima kako bi se proizvodili hidroksidni ioni, kisik i hidroksidni i superoksidni radikali. Hidroksidni i superoksidni slobodni radikali doprinose antibakterijskoj aktivnosti meda zbog svog snažnog oštećujućeg učinka na bakterijske stanice i DNA [13,19].

Proizvodnja vodikovog peroksida u medu utječe na njegovu koloidnu strukturu, koja je rezultat interakcija između makromolekula. Makromolekule u medu koje sudjeluju u formiranju koloidne strukture uključuju oligosaharoze, proteine i polifenole. Koloidi meda su kompaktni i stabilni, s više slojeva, karakterizirani su vodikovim peroksidom te antibakterijskim i antioksidativnim aktivnostima. Koloidna struktura meda povećava se u tamnim i srednje tamnim medovima, dok nije karakteristična za svijetle medove [13,19].



**Slika 3.** Prikaz sinteze vodikova peroksida uz djelovanje enzima glukoza-oksidaze i razgradnje uz djelovanje enzima katalaze [13].

## 4.5. Proteaze

Proteaze su odgovorne za razgradnju proteina kako bi se dobile aminokiseline i kratki peptidi, ovisno o tipu proteaze. Prema preferenciji supstrata, proteaze se klasificiraju kao endopeptidaze i egzopeptidaze. Uzorci monofloralnog meda sadrže serinske proteaze koje doprinose njegovoj kvaliteti i biološkim aktivnostima. Hrvatska studija izvijestila je o prisutnosti tri serinske proteaze u medu: tripsin, kimotripsin i elastaza. Tripsin razgrađuje peptidne veze na karboksilnim krajevima arginina i lizina. Mjesta cijepanja kimotripsina su nakon karboksilnih skupina aromatskih aminokiselina tirozina, fenilalanina i triptofana te leucina. Elastaza je povezana s razgradnjom peptidnih veza koje su formirane od kratkih alifatskih aminokiselina poput glicina, alanina i valina. Glavni proizvodi proteaza u medu su kratki peptidi koji djeluju kao antioksidansi, antitumorski i antimikrobni spojevi [13].

Alaerjani i sur. objavili su rezultate kojima dokazuju prisutnost kratkih peptida u uzorcima meda iz Saudijske Arabije. Analizirali su pet uzoraka meda koristeći tekućinsku kromatografiju u kombinaciji s masenom spektrometrijom, (engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, MC-LS), i zaključili da kratki peptidi u uzorcima meda cvjetnog podrijetla ovise o uvjetima skladištenja. Aminokiseline i njihovi nizovi u kratkim peptidima odgovorni su za njihovu aktivnost. Kratki peptidi koji sadrže cistein, metionin, tirozin, lizin, histidin i triptofan poznati su kao antioksidansi. Kratki peptidi bogati hidrofobnim aminokiselinama poput glicina, alanina, valina, leucina i izoleucina, aktivni su antimikrobni peptidi zbog svoje sposobnosti da narušavaju plazmatsku membranu mikroba. Kratki i ciklični peptidi aktivni su kao antitumorski, antimikrobno, antioksidativno ovisno o sadržaju i sekvencama aminokiselina [13].



## 5. Neenzimske reakcije u medu

Dokazano je da se di- i oligosaharidi u medu formiraju putem neenzimske transglikozilacije. Reakcije transglikozilacije u medu potiču visoka koncentracija šećera, nizak postotak vlage i kisela sredina. Disaharidi koji nastaju putem transglikozilacije su maltoza, izomaltoza, inulobioza, soforoza i gentioza, dok oligosaharidi uključuju 1-kestoza, melezitozu i panozu. Oligosaharidi se klasificiraju u četiri klase prema svojim strukturnim jedinicama: maltoligosaharidi, fruktooligosaharidi, hitanoligosaharidi i galaktooligosaharidi. Oligosaharidi u medu djeluju kao prebiotičke molekule. Prebiotici su neprobavljive tvari koje imaju funkcionalne učinke na gastrointestinalni trakt životinja stimulirajući rast crijevne flore. Crijevna flora može fermentirati oligosaharide, što dovodi do smanjenja pH, proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina te smanjenja apsorpcije masti i proizvodnje amonijaka [13,17].

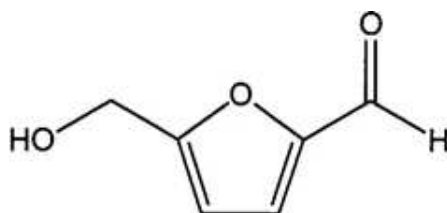
### 5.1. Maillardova reakcija

Zagrijavanje meda također može uzrokovati kemijske promjene. Maillardova reakcija povezana je s reakcijama šećera i aminokiselina u vodi te je odgovorna za tamnjenje hrane tijekom procesa zagrijavanja. Definira se kao interakcija između karbonilnih skupina šećera i skupina aminokiselina, proteina ili drugih dušikovih spojeva koja dovodi do stvaranja smeđih spojeva poznatih kao melanoidini. Maillardova reakcija ima tri faze: ranu, srednju i završnu fazu. U ranoj fazi kombinacija šećera i amino skupina dovodi do stvaranja kompleksa šećera i aminokiselina poput N-(1-deoksi-1-fruktozil) fenilalanina, koji je pronađen u uzorcima zagrijanog bagremovog meda. U srednjoj ili intermedijarnoj fazi, produkti rane faze se razgrađuju na različite spojeve, uključujući amino aldoze i ketoze. Amino aldoze se dalje razgrađuju u deoksidikarbonile i enediolne spojeve, dok se amino ketoze pretvaraju u 2-amino-2-deoksi-aldoze kroz pregradnju. Reakcije intermedijarne faze kataliziraju se kiselinama. Još jedan produkt intermedijarne faze Maillardove reakcije je 5-hidroksimetil furfural. Glukoza se pretvara u fruktofuranozu putem izomerizacije, a fruktofuranozu prolazi kroz tri dehidracije i enolizaciju kako bi se dobio 5-hidroksimetil furfural. Završna faza reakcije povezana je sa stvaranjem melanoidnih polimera, koji nastaju iz fragmenata šećera, amino proizvoda, polifenola, kinona i proteina. Općenito, melanoidini su povezani s tamnjenjem hrane. Maillardovu reakciju induciraju različiti čimbenici poput aktivnosti vode, početnog pH, amino skupina, kisika, temperature šećera i vremena zagrijavanja. Mnoga

istraživanja su izvijestila da proizvodi reakcije djeluju kao antioksidativni i antibakterijski agensi [13].

### 5.1.1. 5-Hidroksimetil furfural

5-hidroksimetil furfural (engl. *5-hydroxymethylfurfural*, HMF), je organski ciklički spoj koji se sastoji od šest ugljikovih atoma i aldehidne i hidroksimetilne funkcionalne grupe. Prsten strukture je centriran na furanskim dijelovima, dok su dvije funkcionalne grupe povezane na drugoj i petoj poziciji što prikazuje slika 4. To je čvrsta, žuta tvar koja ima nisku topljivost, ali je vrlo topljiva u vodi. Smatra se najvažnijim intermedijarnim proizvodom koji nastaje tijekom degradacije reduciranih šećera uz pomoć kiseline putem Maillardove reakcije. Formira se iz reduciranih šećera u medu i raznim obrađenim namirnicama te nastaje neenzimatski tijekom obrade hrane ili dugotrajnog skladištenja meda. Prisutnost jednostavnih šećera, mnogih kiselina i minerala u medu može dodatno povećati u njegovoj proizvodnji. Priznat je kao parametar koji utječe na svježinu meda i indikator kvalitete meda. Njegova koncentracija raste tijekom obrade i starenja meda, u drugom slučaju spoj izostaje ili se nalazi u jako malim količinama. Med čuvan na niskim temperaturama ili pod svježim uvjetima ima niske ili minimalne koncentracije HMF-a, dok stari med čuvan na relativno višim ili srednjim temperaturama ima visoke koncentracije. Osim uvjeta skladištenja, korištenje metalnih spremnika i cvjetni izvori meda su ključni faktori koji utječu na razine HMF-a. Viša koncentracija ukazuje na loše uvjete skladištenja, prekomjerno zagrijavanje meda ili oboje [13, 18].



**Slika 4.** Strukturni prikaz 5-hidroksimetil furfurala [18].

## **6. Uloga enzima u kvaliteti meda**

Uloga enzima u kvaliteti meda ključna je za razumijevanje njegovih svojstava i zdravstvenih koristi. Enzimi u medu, poput glukoza-oksidaze i diastaze, doprinose ne samo njegovoj slatkoći i teksturi, već i njegovoj stabilnosti i nutritivnoj vrijednosti. Kvaliteta meda ovisi o različitim ekološkim faktorima, kao što su klima, nadmorska visina i botanička raznolikost, kao i o uvjetima obrade i skladištenja. Sadržaj glukoze i fruktoze, zajedno s omjerom ostalih sastojaka, izravno utječu na viskoznost, kristalizaciju i opću stabilnost meda [22].

### **6.1. Parametri kvalitete meda**

U određivanju kvalitete meda koriste se parametri poput proizvodnih i okolišnih uvjeta, sastojaka u medu, broja diastaze, aktivnosti invertaze, aktivnosti glukoza-oksidaze, razine HMF-a, koncentracije prolina i fenilalanina, razine vlage, pH vrijednosti, električne vodljivosti i sadržaja pepela. Neke vrijednosti određenih tvari u medu opisuje tablica 1. Geografsko podrijetlo i botanička raznolikost također utječu na kvalitetu meda. Promatrajući ove parametre, može se razlikovati svježiji med od meda koji je dugo pohranjen ili je podvrgnut toplinskoj obradi. Toplinska obrada se primjenjuje iz razloga kao što su duži rok trajanja, bistriji izgled, usporavanje kristalizacije, smanjenje viskoznosti, izbjegavanje neposredne fermentacije i uništavanje mikroorganizama. Međutim, u tom procesu, sastojci mede, posebno enzimi, negativno su pogođeni i gube svoju aktivnost. Formira se HMF, koji je štetan spoj, a antioksidativna aktivnost meda mijenja se ovisno o botaničkom podrijetlu, čime se gubi njegova svježina. Stoga se toplinska obrada meda treba provoditi pažljivo. Međunarodna komisija za med navodi da se med treba zagrijavati na maksimalno 40 °C kako bi se spriječila kristalizacija. Dva najvažnija kriterija koja se koriste za procjenu kvalitete i svježine meda su broj diastaza i količina HMF-a u medu. Stoga, ove vrijednosti trebaju biti određene nakon što je med obrađen i pohranjen [22].

**Tablica 1.** Kriteriji sastava meda prema Pravilniku o medu prilog 2 (2015) [30].

<b>Značajka</b>	<b>Med / 100g</b>
Glukoza + fruktoza	60 g
Saharoza	5 g
Voda	20%
Tvari netopive u vodi	0.1 g
Električna vodljivost	0.8 mS/cm
Slobodne kiseline	50 mEq
Aktivnost dijastaze (po Shadeu)	8
HMF	40 mg

Broj sastojaka u medu varira ovisno o ekološkim čimbenicima poput klime, nadmorske visine, sezone proizvodnje, flore i botaničke raznolikosti, kao i o uvjetima obrade i skladištenja. Kemijski sadržaj meda utječe na njegovu fluidnost i sadržaj vlage. Prema Hrvatskom pravilniku o medu i 2015. godine, ukupna količina glukoze i fruktoze općenito u medu mora biti najmanje 60 g/100 g, dok količina saharoze ne smije prelaziti 5 g/100 g, jer količina saharoze predstavlja važan indikator kvalitete meda, pokazujući prisutnost dodanih šećera što nam prikazuje tablica 1. Med ima tendenciju kristalizacije, a faktori poput temperature okoline, sastava meda i viskoznosti igraju ključnu ulogu u ovom procesu. Inicijacija kristalizacije ovisi o omjerima glukoze i vode te fruktoze i glukoze. Ako je omjer glukoza/voda ispod 1.7 i fruktoza/glukoza iznad 1.33 produžuje se vrijeme kristalizacije. Povećanje kvasca i fermentacija u medu mogu se dogoditi ako omjer glukoze opada u kristaliziranom medu. Vlažnost iznad 20% također utječe na fermentaciju te se med mora skladištiti u zatvorenim posudama kako bi se spriječilo kvarenje. Sadržaj enzima u medu ovisi i o fiziološkom razdoblju kolonije, vremenu i količini sakupljenog nektara te potrošnji peludi. Iako su prisutni u malim količinama, enzimi su među najvažnijim sastojcima meda jer kataliziraju pretvorbu nektara u med. Aktivnost katalaze podložna je klimatskim i pH uvjetima, dok se kiselinska fosfataza može koristiti kao marker botaničkog podrijetla meda. Enzim dijastaza, koji se miješa u med tijekom sazrijevanja nektara, također je važan indikator kvalitete. Broj dijastaze mjeri se kao količina škroba razgrađenog pomoću amilaznih enzima u 100 g meda za 1 sat na temperaturi od 38-40 °C. Visoka aktivnost invertaze i glukoza-oksidadaze ukazuje na svježinu meda. Toplinska obrada smanjuje aktivnost ovih enzima, što dovodi do gubitka svježine i formacije kancerogenih proizvoda poput HMF-a, što je naposljetku negativno za zdravlje. Kako bi se očuvala svježina meda i spriječili negativni učinci, važno je pažljivo upravljati procesima obrade i skladištenja, čime se osigurava maksimalna kvaliteta ovog vrijednog proizvoda [22].

## 6.2. Metode za određivanje aktivnosti enzima

Enzimi kataliziraju brojne biokemijske reakcije u tijelu i zajedno s transporterima i receptorima upravljaju gotovo svim fiziološkim procesima. Mjerenje aktivnosti enzima, bilo unutar ili izvan organizma, izuzetno je važno jer prostorne i vremenske promjene u aktivnosti enzima mogu biti povezane s prirodnim i patološkim procesima. Metode za određivanje aktivnosti enzima uključuju spektrofotometriju koja mjeri promjene apsorbancije svjetlosti povezane s koncentracijom produkta reakcije, fluorescentne metode koje koriste fluorescentne signale, kromatografske metode poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, za analizu kompleksnih smjesa, potrošnju i za mjerenje promjena koncentracije supstrata tijekom reakcije te kinetičke analize koje istražuju brzinu reakcije pod različitim uvjetima [26].

Specifične metode za određivanje aktivnosti enzima dijastaze uključuju metodu s jodom, koja mjeri oslobađanje glukoze ili maltodekstrina iz škroba, i metodu s 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom, (engl. *3,5-dinitrosalicylic acid*, DNSA), koja se koristi za mjerenje koncentracije šećera. Različite metode se koriste za određivanje broja dijastaze. Jedna od tih metoda je enzimatsko-spektrofotometrijska metoda koja koristi Phadebas test tablete. Kao supstrat se koriste tablete umreženog, plavo obojenog škroba, a kako enzim u medu razgrađuje škrob, plava boja se oslobađa u otopinu, te se njezina apsorbancija mjeri i korelira s pokazateljem kvalitete [26].

Za invertazu se koristi metoda sa saharozom, koja mjeri oslobađanje glukoze i fruktoze, često uz pomoć spektrofotometrije ili kromatografije. Katalaza se određuje mjerenjem brzine razgradnje vodikovog peroksida spektrofotometrijskim putem, dok se aktivnost glukoza-oksidadze mjeri stvaranjem vodikova peroksida tijekom oksidacije glukoze [26].

Još neke metode su optičke, magnetsko-rezonantne, maseno-spektrometrijske i metode fizičkog uzorkovanja. Također se istražuju kemijske i fizičke sonde, koje omogućuju mjerenje aktivnosti enzima u biokemijskim i neurokemijskim primjenama. Iako imaju značajnu biološku ulogu u proizvodnji meda, korist ovih enzima za ljude nadilazi sam proces proizvodnje. Zbog njihove osjetljivosti na temperaturu i pH vrijednost, kao i eventualnog propadanja tijekom vremena, mjerenje aktivnosti ovih enzima može poslužiti kao pokazatelj kvalitete meda. Svježiji med imaće veću razinu enzimске aktivnosti [26].

### 6.2.1. Aktivnost dijastaze

Aktivnost dijastaze u medu ključna je za spoznaju njegove kvalitete, jer enzim dijastaza razgrađuje škrob u kraće lance šećera, a njezina prisutnost ukazuje na svježinu meda te eventualne nepravilnosti u skladištenju ili zagrijavanju. Rezultati istraživanja izražavaju aktivnost dijastaze u Shade jedinicama po gramu meda i nazivaju se dijastaznim brojem (engl. *Diastatic Number*, DN). Istraživanje je usporedilo dvije metode mjerenja dijastaze, a to su poljski standard i Phadebas test, pri čemu je utvrđena visoka korelacija između rezultata. Svi uzorci meda zadovoljili su regulatorne zahtjeve EU ( $DN > 8$ ), pri čemu je najveća aktivnost  $\alpha$ -amilaze zabilježena u cvjetnom medu pohranjenom na 4 °C, dok je skladištenje na sobnoj temperaturi blago smanjilo DN. Najniže vrijednosti DN-a zabilježene su u multifloralnom medu, što ukazuje na utjecaj toplinske obrade ili skladištenja. Phadebas metoda preporučena je kao pouzdana za mjerenje dijastaze, a daljnja istraživanja potrebna su kako bi se bolje razumjeli učinci skladištenja na aktivnost enzima [23].

### 6.2.2. Aktivnost invertaze

Invertaza je ključni enzim u medu koji pretvara saharozu u glukozu i fruktozu, što doprinosi procesu sazrijevanja meda. Iako se uglavnom povezuje s aktivnošću kvasca, invertaza prisutna u medu potječe od pčela, koje je izlučuju kako bi poboljšale preradu nektara. Aktivnost ovog enzima u medu ovisi o različitim čimbenicima poput vrste meda i koncentracije vodikovih iona. U istraživanju koje su proveli Nelson i Cohn, invertaza iz meda analizirana je kroz nekoliko eksperimenata s ciljem razumijevanja njenog ponašanja u različitim uvjetima. Nelson i Cohn su istraživali brzinu hidrolize saharoze u prisustvu invertaze iz meda, fokusirajući se na različite koncentracije vodikovih iona u usporedbu s invertazom iz kvasca. Pokazalo se da hidroliza saharoze mednom invertazom započinje većim rastom brzine reakcije nego što je to slučaj kod kvasca, nakon čega slijedi postupni pad brzine. Ova specifičnost reakcije razlikuje invertazu u medu od one iz kvasca, što ukazuje na složeniju dinamiku enzimske aktivnosti u medu. Istraživači su koristili nekoliko uzoraka meda različitog podrijetla, uključujući vrste poput bijele djeteline i heljde, kako bi izolirali invertazu. Proces izolacije uključivao je taloženje invertaze pomoću etanola, filtriranje te dodatne metode bistrenja uzoraka. Bilo je izazovno postići čistu otopinu enzima, ali je konačno postignuta jasna i aktivna invertaza iz heljdinog meda. Eksperimenti su zatim

provedeni s različitim koncentracijama saharoze i pri različitim pH vrijednostima kako bi se ispitala aktivnost invertaze. Rezultati su pokazali da aktivnost invertaze u medu ovisi o razini kiselosti i vremenu reakcije, dok hidroliza saharoze nije u potpunosti odgovarala monomolekularnoj kinetičkoj jednadžbi koja se često koristi za opisivanje ovih procesa. Pokazalo se da je invertaza u medu stabilna unutar određenih pH raspona, a njena aktivnost varira ovisno o vrsti meda iz kojeg je izolirana. Ova su istraživanja doprinijela razumijevanju enzimske aktivnosti invertaze u medu te otvorila vrata daljnjim istraživanjima o njenoj potencijalnoj primjeni kao parametra kvalitete meda, iako to nije standardizirano u svim međunarodnim normama za procjenu meda [24].

Invertaza na temperaturama višim od sobne temperature gubi svoju aktivnost polako do 50 °C, dok je iznad 50 °C gubitak aktivnosti znatno brži. Stoga, toplinska obrada meda uzrokuje da ovaj enzim postane neaktivan, a med gubi svježinu. U jednoj od metoda korištenih za mjerenje aktivnosti invertaze u medu, p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid (pNPG) se koristi kao supstrat. Invertaza razgrađuje pNPG u glukozu i p-nitrofenol. Apsorbancija se mjeri na 400 nm. Rezultati se izražavaju kao jedinica invertaze ili broj invertaze (engl. *Invertase Number*, IN) . Što je veća aktivnost invertaze, med se interpretira svježijim [24, 25].

### **6.3. Utjecaj skladištenja i obrade na enzime meda**

Med se može obrađivati na više načina. Tipovi obrade su termalna, mikrovalna, infracrvena, ultrazvučna i obrada membranama. Postoje različiti načini skladištenja kao što su određena temperatura na kojoj se med čuva, količina svjetlosti u prostorijama gdje se čuva te spremnici u kojem se med čuva. Svi ti čimbenici imaju utjecaj na enzime meda i njegovu kvalitetu [27, 28, 29].

Termalna obrada meda uključuje postupke poput cijedenja, filtracije i zagrijavanja na određene temperature kako bi se uništile stanice kvasca i očuvala kvaliteta meda. Konvencionalni proces obrade obično podrazumijeva zagrijavanje filtriranog meda na 60–65°C tijekom 25–30 minuta, nakon čega slijedi brzo hlađenje. Istraživanja su pokazala da zagrijavanje na temperaturama od 63, 65 i 68°C tijekom određenih vremenskih intervala može potpuno uništiti kvasne stanice. Međutim, iako termalna obrada pomaže u smanjenju mikroorganizama i poboljšanju stabilnosti meda, može negativno utjecati na njegovu kvalitetu. Kontrolirano zagrijavanje može smanjiti aktivnost enzima, poput diastaze i

invertaze. Visok sadržaj HMF-a, koji se povećava pri prekomjernom zagrijavanju, također ukazuje na prekomjernu obradu i može utjecati na okus i svježinu meda. Različite vrste meda reagiraju različito na termalne tretmane, što dovodi do značajnih razlika u očuvanju kvalitete. Zato je važno pažljivo kontrolirati vrijeme i temperaturu tijekom termalne obrade. [27, 28, 29]

Minimalna aktivnost dijastaze iznosi 8. Ne postoji zakonski zahtjev za minimalnu aktivnost invertaze, vjerojatno zbog njezine osjetljivosti na temperaturu. Kada se med industrijski obrađuje, aktivnost invertaze drastično opada, često do 0. Tijekom skladištenja obje aktivnosti opadaju, što sugerira da su enzimi skloni starenju i denaturaciji. Optimalni pH za invertazu je 6, a za dijastazu 4.6 te odstupanja od ovih vrijednosti mogu smanjiti enzimsku aktivnost. [27, 28].

Med ima visoku viskoznost, što stvara probleme u rukovanju. Zagrijavanjem meda do 30 °C dolazi do brzog smanjenja viskoznosti, nakon čega se promjene usporavaju. Glukoza kristalizira u medu, a metode za zaustavljanje kristalizacije uključuju skladištenje na niskim temperaturama, toplinsku obradu, filtraciju i punjenje na višim temperaturama. Mikrovalna obrada može se učinkovito koristiti za toplinsku obradu meda, jer omogućava brzo zagrijavanje kako bi se postigli željeni rezultati za dugotrajno skladištenje. Infracrvena obrada nije tako brza kao mikrovalna, ali se željeni rezultati postižu u relativno kraćem vremenu od 3 do 4 minute, što nudi prednosti u odnosu na konvencionalnu metodu [27, 28].

Ultrazvučna obrada može eliminirati postojeće kristale i spriječiti daljnju kristalizaciju, što je potvrdio Kaloyereas 1955. godine, kada je upotrijebio valove frekvencije 9 kHz za usporavanje kristalizacije i uništavanje kvasaca. Liebl je unaprijedio ovu metodu korištenjem ultrazvuka od 18 kHz, čime je značajno smanjio vrijeme na manje od 30 sekundi, uz zadržavanje arome i okusa meda. U istraživanju Thrasyvoulou i suradnika, uzorci su se ukapljivali brže uz niže temperature, uz minimalno povećanje HMF-a. Ova metoda pokazuje prednost u očuvanju kvalitete meda u odnosu na tradicionalno zagrijavanje, smanjuje broj kvasaca i produžava rok trajanja tekućeg stanja meda, čineći je ekološki prihvatljivijom alternativom konvencionalnim tehnikama obrade te nemaju loš utjecaj na enzime [29].

Obrada meda membranama je atermalni proces i alternativni pristup konvencionalnim procesima. Teško je potpuno uništiti mikroorganizme prisutne u medu toplinskim metodama obrade te ona rezultira smanjenjem enzimске aktivnosti. Prednosti obrade meda membranama su odsustvo mutnoće i granulacije proizvoda, smanjena viskoznost, komercijalno sterilni proizvod i kvaliteta. Postoje dva tipa: ultrafiltracijske, (engl. *Ultrafiltration*, UF), i



mikrofiltracijske, (engl. *Microfiltration*, MF) membrane. UF membrane imaju manje porozne veličine i koriste se za uklanjanje mikroorganizama, bakterija i proteina iz meda, čime se osigurava mikrobiološka sigurnost proizvoda. Ovaj proces može dovesti do gubitka poželjnih enzima poput amilaze, invertaze i glukoza oksidaze. MF membrane imaju veće porozne veličine i koriste se za uklanjanje većih čestica, uključujući kvasce i suspendirane tvari, što poboljšava kvalitetu i stabilnost meda bez značajnog utjecaja na enzimsku aktivnost. UF membrane osiguravaju mikrobiološku sigurnost meda, MF membrane omogućuju zadržavanje veće količine enzima, čime je očuvana nutritivna vrijednost meda [29].

## 7. Zaključak

Med je jedinstvena prirodna tvar koja se odlikuje brojnim hranjivim svojstvima i zdravstvenim prednostima. Sadrži visok udio šećera, prvenstveno fruktoze i glukoze, uz značajnu količinu vode i druge hranjive tvari, uključujući vitamine, minerale i enzime. Njegov sastav varira ovisno o botaničkom izvoru i okolišnim uvjetima, što doprinosi raznolikosti okusa i kvalitete meda. Osim što je prirodni zaslađivač, med ima i važne nutritivne i medicinske osobine, uključujući antioksidativno, antibakterijsko i protuupalno djelovanje.

Od osnovnih reakcija koje se događaju u medu pa sve do boje su zaslužni enzimi. Enzimi poboljšavaju nutritivne osobine meda, igraju važnu ulogu u očuvanju njegovog okusa i arome čime doprinose njegovoj jedinstvenosti kao prirodnog proizvoda. Glavni enzimi koji su prisutni u medu uključuju inverzu, dijastazu, glukoza-oksidadu i katalazu. Ovi enzimi pomažu u razgradnji složenih šećera u jednostavne, što doprinosi slatkoći i lakoj probavljivosti meda. Glukoza oksidaza pridonosi stvaranju vodikova peroksida što daje medu njegova antibakterijska svojstva.

Enzimi u medu, poput dijastaze i invertaze, od izuzetne su važnosti za njegovu kvalitetu, stabilnost i prehrambene vrijednosti. Invertaza je odgovorna za razgradnju saharoze u jednostavne šećere poput glukoze i fruktoze, što izravno utječe na slatkoću i konzistenciju meda. Dijastaza katalizira razgradnju škroba i drugih polisaharida, pridonoseći čistoći i antioksidacijskoj aktivnosti meda. Aktivnost ovih enzima podložna je promjenama tijekom skladištenja, osobito uslijed utjecaja temperature i vlage. Kod nepravilnog skladištenja ili prekomjerne toplinske obrade, dolazi do smanjenja aktivnosti enzima, što rezultira degradacijom kvalitete meda te dolazi do promjena u okusu, boji i nutritivnom sastavu.

Razumijevanje enzimske aktivnosti u medu i pažljivo praćenje uvjeta skladištenja ključno je za očuvanje njegovih organoleptičkih i nutritivnih svojstava. Korištenje modernih tehnologija u preradi meda, poput membranskih filtracija i ultrazvuka, moglo bi omogućiti očuvanje enzima te time povećati nutritivnu vrijednost i zdravstvene koristi meda. Razumijevanje kemijskih procesa i enzimske dinamike u medu ključno za osiguravanje njegovih optimalnih svojstava.

## 8. Popis literature

1. M. Hasija, Primjene antioksidacijske aktivnosti ovisno o dužini skladištenja meda: Vrste meda. 2019. URL: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:492327> (22. 09 .2024.)
2. S. Riddle, The chemistry of honey. 2016. URL: <https://www.beeculture.com/the-chemistry-of-honey/> (22. 09. 2024.)
3. S. Bogdanov, The Honey Book: *Honey composition*, Zhejiang, Bee Product Science, **2011**.
4. D. O. Cliver, Honey, Human Pathogens, and HACCP, *D. F. E. Sanit.* **2000**, 20, 237-316
5. C. E. Manyi-Loh, R. N. Ndip, A. M. Clarke, Volatile compounds in honey: A review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12, 9514-32.
6. H. Tian, Y. Shen, H. Yu, C. Chen, Aroma features of honey measured by sensory evaluation, gas chromatography-mass spectrometry, and electronic nose. *Int. J. Food Prop.* **2018**, 1, 1755–1768.
7. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. URL: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/otopina> (22. 09 .2024.)
8. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. URL: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/viskoznost> (22 .09 .2024.)
9. S. Yanniotis, S. Skaltsi, S. Karaburnioti, Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. *J. F. S .* **2006**, 72, 372-377
10. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. URL: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/higroskopne-tvari> (22. 09 .2024.)
11. F. C. Bizerra, P. I. Da Silva Jr. , M. A. F. Hayashi, Exploring the antibacterial properties of honey and its potential, *Front. Microbiol.* **2012**, 3.
12. K. Brudzynski, K. Abubaker, L. St-Martin, A. Castle, A. Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Front. Microbiol.* **2011**, 2.
13. W. M. A. Alaerjani, S. Abu-Melha, R. M. H. Alshareef, B. S. Al-Farhan, H. A. Ghramh, B. M. A. Al-Shehri, M. A. Bajaber, K. A. Khan, M. M. Alrooqi, G. A. Modawe, M. E.A. Mohammed, Biochemical Reactions and Their Biological Contributions in Honey, *Molecules*, **2022**, 15.
14. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. URL: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/enzimi> ( 22. 09. 2024.)
15. T. H. E. Janini, The Chemistry of honey. 2014. URL: <https://u.osu.edu/beelab/chemistry-of-honey/> (22. 09. 2024.)

16. J. A. Bauer, M. Zámocká, J. Majtán, V. Bauerová-Hlinková, Glucose oxidase, an enzyme "Ferrari": Its structure, function, production and properties in the light of various industrial and biotechnological applications. *Biomolecules*. **2022**, 3 ,472.
17. S. P. Silva, A. S. P. Moreira, M. do R. M. Domingues, D.V. Evtuguin, E. Coelho, M. A. Coimbra, Contribution of non-enzymatic transglycosylation reactions to the honey oligosaccharides origin and diversity. *P. A. C.* **2019**, 5, 1033-1043.
18. U. M. Shapla, Md. Solayman, N. Alam, Md. I. Khalil, S. H. Gan, 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chem. Cent. J.* **2018**, 12, 18.
19. A. Guttentag, K. Krishnakumar, N. Cokcetin, E. Harry, D. Carter, Factors affecting the production and measurement of hydrogen peroxide in honey samples. *Access. Microbiol.* **2021**, 3.
20. T. Nagai, N. Kai, Y. Tanoue, N. Suzuki, Chemical properties of commercially available honey speaces and the functional properties of caramelization and Maillard reaction product derived from these honey speaces. *J. Food. Sci. Technol.* **2018**, 55.
21. P. B. Olsitsn, O. E. Adeleke, I. O. Ola, Honey: a reservoir from michroorganism and an inhibitory agent for microbes. *Afr. Health Sci.* **2007**,3, 159-165.
22. I. Yapici, E. Izol, I. Gulcin. Safety of bee products: *The role of enzymes in honey quality*, Ankara, Orient publications, **2023**.
23. J. Kuc, A. Grochowalski, M. Kostina, Determination of the diastaze activity in honeys. *Techtrans.* **2017**, 1, 29-35.
24. J. M. Nelson, D. J. Cohn, Invertase in Honey, *Department of chemistry.* **1924**.
25. H. Manoochehri, N. Fayazi Hosseini, M. Saidijam, M. Taheri, H. Rezaee, F. Nouri, A review on invertase: its potentials and applications. *Biocatal Agric Biotechnol.* **2020**, 25.
26. Y. Ou, R. E. Wilson, S. G. Weber, Methods of Measuring Enzyme Activity Ex vivo and In vivo. *HHS Author Manuscripts.* **2018**, 1, 509-533.
27. H. Scepankova, J. Majtan, L. M. Estevinho, J. A. Saraiva, The high preassure preservation of honey: A comparative study on Quality changes during storage. *Foods.* **2024**, 7, 989.
28. R. Subramanian, H. U. Hebber, N. K. Rastogi, Processing of Honey: A Review. *Int. J. Food Prop.* **2007**, 10, 127-143.
29. G. Manickavasagam, M. Saaid, V. Lim, Impact of prolonged storage on quality assessment properties and constituents of honey: A systematic review. *J. F. S.* **2024**, 89, 811-833.

30. Ministarstvo poljoprivrede, Pravilnik o medu: Prilog 2, 2015. URL:  
<https://faolex.fao.org/docs/pdf/cro160609.pdf> (pristupljeno 22. 09. 2024.)