Antibakterijski učinak meda kestena i lipe na odabrane gram negativne bakterijske vrste

Balicki, Blanka

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:041620

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Blanka Balicki

ANTIBAKTERIJSKI UČINAK MEDA KESTENA I LIPE NA ODABRANE GRAM NEGATIVNE BAKTERIJSKE VRSTE

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

diplomski rad

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

Znanstveno područje: **Biotehničke znanosti**
Znanstveno polje: **Prehrambena tehnologija**
Nastavni predmet: **Mikrobiologija hrane**

Tema rada je prihvaćena na II. sjednici Odbora za završne i diplomske ispite održanoj 23. 11. 2012. godine

Mentor: **izv. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović**
Pomoć pri izradi: **Vedran Gradvol, dipl. ing.**

Antibakterijski učinak meda kestena i lipe na odabrane gram negativne bakterijske vrste

Blanka Balicki, 2589/04

Sažetak: Ispitan je antibakterijski učinak meda kestena i lipe na odabrane gram negativne bakterije: *Escherichia coli*, *Salmonella agona*, *S. enteritidis*, *S. infantis* i *Yersinia enterocolitica*. Ispitane su koncentracije meda od 20, 30, 45 i 60 %. Pored toga, otopine meda su termički tretirane 30 minuta na 60°C, 10 minuta na 80°C te 5 minuta na 100°C nakon čega je određen antibakterijski učinak i izmjeren aktivitet vode. Med kestena i lipe uzrokuje djelomičnu inhibiciju rasta *E. coli*, uz snažniji učinak meda lipe. Med lipe snažnije inhibira *S. agona* i *S. enteritidis*, dok med kestena jače djeluje na *S. infantis*. Obje vrste meda nisu inhibirale bakteriju bakteriju *Yersinia enterocolitica*, bez obzira na primijenjenu koncentraciju. Snažniju inhibiciju rasta uzrokuju veće koncentracije meda. Aktivitet vode meda se smanjuje zagrijavanjem meda.

Ključne riječi: **med kestena i lipe, antibakterijski učinak, aktivitet vode, zagrijavanje**

Rad sadrži: **51 stranica**
20 slika
1 tablica
0 priloga
45 literaturne reference
Jezik izvornika: **hrvatski**

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. **izv. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban – predsjednik**
2. **izv. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović – mentor**
3. **doc. dr. sc. Lidija Lenart – član**
4. **doc. dr. sc. Dajana Gašo Sokač – zamjena člana**

Datum obrane: **26. rujna 2014. godine**

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 in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Microbiology
Subdepartment of Microbiology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Food microbiology

Thesis subject was approved by the Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no II. held on 23rd of November, 2012.

Mentor: Hrvoje Pavlović, PhD, assoc. prof.
Technical assistance: Vedran Gradvol, MSc, assistant

Antibacterial effect of chestnut and linden honey on selected Gram negative bacteria
Blanka Balicki, 2589/04

Summary: Antibacterial effect of chestnut and linden honey on selected Gram negative: *Escherichia coli*, *Salmonella agona*, *S. enteritidis*, *S. infantis* i *Yersinia enterocolitica*. Antibacterial effect of 20, 30, 45 and 60 % of honey solutions was tested. Solutions were heated at 60°C for 30 minutes, 80°C for 10 minutes and 100°C for 5 minutes and antibacterial effect, as well as water activity were measured. *E. coli* was only partially inhibited by chestnut or linden honey, while later was more potent in inhibitory effect. Linden honey caused wider inhibition zones to *S. agona* and *S. enteritidis*, while the effect was opposite to *S. infantis*. To bacteria *Y. enterocolitica* both honey samples had no inhibitory effect regardless to concentration applied. Higher honey concentrations yield higher inhibition zones. Water activity of tested honey samples is reduced by heating.

Key words: chestnut and linden honey, antibacterial effect, water activity, heating

Thesis contains: 51 pages
20 figures
1 table
0 supplements
45 citations

Original in: Croatian

Defense committee:
1. Nela Nedić Tiban, PhD, assoc. prof. – chair
2. Hrvoje Pavlović, PhD, assoc. prof. – supervisor
3. Lidija Lenart, PhD, assist. prof. – member
4. Dajana Gašo Sokač, PhD, assist. prof. – stand in

Defense date: 26th of September, 2014.

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

SADRŽAJ

1.UVOD ..... POGREŠKA! KNJIŽNA OZNAKA NIJE DEFINIRANA.

2. TEORIJSKI DIO ..... POGREŠKA! KNJIŽNA OZNAKA NIJE DEFINIRANA.

2.1. Uporaba meda kroz povijest ..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.

2.2. Fizikalna svojstva meda ..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.

2.3. Klasifikacija meda **7**

2.3.1. Monoflorni med **7**

2.3.1.1. Med kestena **8**

2.3.1.2. Med lipe **8**

2.3.2. Poliflorni med ..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.

2.3.2.1. Cvjetni med ..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.

2.3.3. Medljikovac ..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.

2.3.4. Klasifikacija meda prema pakiranju i procesiranju Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.

2.4. Čuvanje meda **10**

2.5. Razlikovanje i patvorenje meda **10**

2.6. Kvaliteta meda i indikatori kvalitete **11**

2.7. Značaj meda u medicini i prehrani ljudi **12**

2.8. Med kao izvor opasnosti **13**

2.8.1. Mikroorganizmi, kvliteta i sigurnost meda **14**

2.8.1.1. Izvori mikroorganizama **15**

2.8.1.2. Plijesni **16**

2.8.1.3. Bakterije **16**

2.8.1.4. Drugi mikroorganizmi **17**

2.8.1.5. Kontrola prisutnosti broja mikroorganizama **17**

2.8.1.5.1. Učinak procesiranja na mikroorganizme u medu **19**

2.8.2. Toksični spojevi u medu **20**

2.9. Antimikrobni učinak meda **20**

2.10. Svojstva odabranih gram-negativnih bakterija **22**

Escherichia coli **.....22**

Salmonella **.....23**

Yersinia enterocolitica **.....24**

3. EKSPERIMENTALNI DIO .....POGREŠKA! KNJIŽNA OZNAKA NIJE DEFINIRANA.**5**

3.1. Zadatak..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**6**

3.2. Materijali i metode ..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**6**

3.2.1. Kulture mikroorganizama ..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**6**

3.2.2. Priprema uzoraka meda..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**6**

3.2.3. Određivanje antibakterijskog učinka uzoraka meda Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**7**

3.3. Određivanje aktiviteta vode u uzorcima meda ..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**7**

3.4. Obrada rezultata..... Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**8**

4. REZULTATI 29

4.1. Antibakterijski učinak meda 30

4.1. Aktivitet vode u uzorcima meda 38

5. RASPRAVA.....41

6. ZAKLJUČCI 45

7. LITERATURA 47

1. Uvod

Od davnih vremena čovjek je poznavao med i cijenio njegovo hranjivo svojstvo. Med se nije upotrebljavao samo kao namirnica već i kao sredstvo za konzerviranje, u vjerskim obredima i kao lijek. Moderna medicina danas pridaje sve više važnosti medu kao vrijednoj namirnici, i to prvenstveno za prehranu nedonoščadi, dojenčadi, djece i omladine, sportaša. Med je jedan od rijetkih namirnica koja se umjetnim putem ne da proizvesti (Odobašić, 2006.).

Pod medom podrazumijevamo gustu, slatku, sirupastu ili kristalnu tvar blijedožute do tamnosmeđe boje, specifičnog mirisa i okusa (Odobašić, 2006.).

Med je produkt pčela medarica (*Apismellifera*) koje sakupljaju nektar, probavljaju ga i skladište u saće, gdje sazrijeva. Prikupljeni nektar pčele prenose u mednom mjehuru, koji može sadržavati i do 60 µl tekućine. Jedan dio nektara pčele koriste za proizvodnju vlastite energije koja im je potrebna za prevaljivanje velikih udaljenosti, jedan dio se sprema za hibernaciju (Naef i sur., 2004.). Pri povratku u košnicu, pčele ispuštaju nektar u voštane stanice u obliku saća. Višak vode isparava unutar košnice uz pomoć pčela koje mašući svojim krilima pospješuju isparavanje vode (Olaitan i sur., 2007.). Za proizvodnju 1 kg meda potrebno je da pčele u košnicu donesu 120 do 150 000 svojih tovara nektara. Da bi sakupile tu količinu, moraju posjetiti oko 10 milijuna cvjetova i prijeći put od 360 000 do 450 000 kilometara (Hardi, 2005.).

Jedno od najvažnijih svojstava meda je da on djeluje bakteriostatsko ili baktericidno, to jest da sprečava rast i razmnožavanje pojedinih bakterija ili da ih ubija. Tome svjedoče brojna istraživanja (Halawani i Shohayeb, 2011.; Molan, 1992.; Baltrušaityte i sur., 2007.; Cooper, Molan i Harding, 1999.; Miorin i sur.,2003.).

Antimikrobna svojstva meda poznata su već tisućama godina. Med se proučava da se razjasni koje su njegove komponente odgovorne za antimikrobno djelovanje na patogene mikroorganizme kao što su *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*i *Staphylococcus aureus*. Faktori koji utječu na antimikrobno djelovanje meda su vodikov peroksid, visok osmotski tlak, kiselost, aromatske kiseline i fenolni sastojci (Lee i sur., 2008.).

U ovom radu, ispitan je antimikrobni učinak meda kestena i lipe na odabrane gram – negativne bakterijske vrste.

2. Teorijski dio

Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (NN 20, 2000.) definira med kao sladak, gusti, viskozni, tekući ili kristalizirani 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 sazriju. Med sadrži šećere, prije svega glukozu i fruktozu, te saharozu, maltozu i druge polisaharide (uključujući i dekstrine), zatim bjelančevine, aminokiseline, enzime, organske kiseline, pelud, mineralne i druge tvari. Boja meda može varirati od vrlo svijetlih do tamnijih nijansi. Med može biti tekuće ili kremaste konzistencije, djelomice ili potpuno kristaliziran.

2.1. Uporaba meda kroz povijest

Med je jedinatvar za zaslađivanje koja može biti skladištena i korištena upravo onakva kakva se koristi u prirodi. Povijest ovog jedinstvenog zaslađivača seže daleko u prošlost. Isprva, med se koristio kao ceremonijalni materijal i kao medicinsko pomagalo (White, 1978.).

Povjesničari smatraju da su prvi počeci uzgoja pčela na prostorima Dalekog Istoka, dok se o organiziranom, pravom pčelarstvu može govoriti već od oko 2 400. prije Krista, na području starog Egipta. U Egiptu, med je bio vrlo skupocjen i cijenjen, i to ne samo kao vrijedna namirnica i sredstvo za zaslađivanje svih vrsta jela, već se koristio i u religijske svrhe (Rodek, 2006.).

I u drugim drevnim kulturama, primjerice u Perziji, med se, osim za hranu i liječenje, koristio kao dar bogovima te kao sredstvo plaćanja. Uz to, Asirci su ga koristili kao oružje. Bacali su košnice pune pčela među neprijateljsku vojsku, izazvavši na taj način paniku u protivničkim redovima (Rodek, 2006.).

U Grčkoj je med slovio kao vrlo hranjiva namirnica i važno sredstvo za uklanjanje mnogih zdravstvenih poteškoća i bolesti. Filozof i liječnik Hipokrat je preporučivao med za skidanje vrućice, za zacjeljivanje različitih ozljeda ili liječenje gnojnih rana. Pčelarstvo je bilo rašireno i u antičkom Rimu, u kojem je postojalo zanimanje „njegovatelj pčela“ koji je bio zadužen za njihov uzgoj. Jednako kao i u Grčkoj, i u Rimu je med slovio kao univerzalno sredstvo za liječenje, a preporučivao se i kao afrodizijak te koristio protiv depresije (Rodek, 2006.).

Tek era Grka i Rimljana donosi upotrebu meda kao hrane. Tako je i ostalo, do unazad

100 godina kad je med zamijenjen industrijskim šećerom, koji se dobiva od šećerne trske i šećerne repe (White, 1978.).

Komercijalna proizvodnja meda je bila omogućena sredinom 19. stoljeća izumom pokretne košnice i centrifugalnim ekstraktorom za izdvajanje meda. Pčelarstvo se uvelike promijenilo u ovom stoljeću, od nekoliko košnica koje je imala svaka obiteljska farma za svoje potrebe, do današnje proizvodnje (White, 1978.).

2.2. Fizikalna svojstva meda

Svojstva meda kao proizvoda pčela medarica ovise o vrsti biljke od koje se prikupio nektar, klimatskim uvjetima, okolišu i o samim pčelama (White, 1978.).

Udio vlage u medu ovisi o klimatskim uvjetima tijekom sezone, stupnju zrelosti koje je med dosegao u košnici, tehnikama procesiranja i uvjetima skladištenja. Ovo svojstvo je od velike važnosti za kvalitetu meda tijekom skladištenja (Lazarević i sur., 2012.). Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (NN 20, 2000.) med koji se stavlja na tržište mora udovoljavati uvjetu da ne sadrži više od 20% vode.

Med dobiven od cvjetova uglavnom sadrži 0,1 – 0,3% udjela minerala, dok med medljikovac može sadržavati i do 1%. Ranije, udio minerala je bio jedan od svojstava kvalitete meda, dok je danas to zamijenjeno određivanjem električne vodljivosti. Najvažniji element pronađen u medu je kalij, koji zauzima čak trećinu od ukupne količine minerala u medu. Nekoliko istraživanja je pokazalo da sadržaj elemenata u tragovima u medu ovisi uglavnom, o botaničkom podrijetlu meda, svijetle vrste meda sadrže manje elemenata nego tamnije vrste. Elementi u tragovima koji se mogu naći u medu su Mg, Ca, Al, Fe, Mn, Zn, B, Cu,Co, Cr, Ni, Cd i P (Bogdanov, 2009.).

Električna vodljivost ovisi o mineralima, organskim kiselinama i proteinima sadržanim u medu. Budući da su minerali u medu dospjeli primarno preko peluda, njihov sadržaj ovisi, dakako, o količini peluda u medu. Električna vodljivost je parametar koji se često koristi u kontroli kvalitete i može se smatrati kao valjan kriterij za određivanje botaničkog podrijetla meda. Isto tako, električna vodljivost je kriterij za razlikovanje cvjetnog meda od meda medljikovca (Lazarević i sur., 2012.).

Kiselinski sadržaj meda je relativno nizak, ali je važan za okus meda. Glavna kiselina koja se nalazi u medu je glukonska kiselina, produkt oksidacije glukoze enzimom glukoza-

oksidaza. U manjim količinama su nađene jabučna, limunska, octena, jantarna, mliječna kiselina. Većina medova su kiseli, što znači da imaju pH vrijednost manju od 7. pH cvjetnog meda se kreće između 3,3 i 4,6. Iznimka je kestenov med sa relativno visokom pH vrijednošću od 5 do 6. Med medljikovac je više pH vrijednost, ona varira između 4,5 i 6,5 (Bogdanov, 2009.). Minimalne pH vrijednosti za rast nekih patogenih vrsta bakterija su: *Escherichia coli* (4,3), *Salmonella* spp. (4,0), *Pseudomonas aeruginosa* (4,4), *Streptococcuspyogenes* (4,5) (Olaitan i sur., 2007.).

Jedan od važnih fizikalnih svojstava meda je viskoznost. Viskoznost meda ovisi o mnogim svojstvima, prvenstveno o sastavu meda i količini vode. Med posjeduje visoku viskoznost (1,36 Ns/m² pri 25˚C). Viskoznost je važan tehnički parametar prerade meda jer smanjuje protok tijekom procesa ekstrakcije, filtracije, miješanja i pakiranja u ambalažu (Olaitan i sur., 2007.).

Jednako važno fizikalno svojstvo je kristalizacija meda. Proces kod meda u kojem on poprima polučvrsto ili čvrsto stanje naziva se kristalizacija. Kristalizacija meda javlja se jer je med prezasićena otopina glukoze koja u sastavu sadrži preko 70% prirodnih šećera i nešto manje od 20% vode. Omjer prirodnih šećera uvelike ovisi o brzini kristalizacije u idealnim uvjetima. Nije svejedno ima li određena vrsta meda više prirodnog glukoznog ili fruktoznog šećera. Sama brzina kristalizacije mednih vrsti raste kada raste i sadržaj glukoze. Proces kristalizacije meda obično započinje u roku od tjedan ili mjesec dana od vađenja, u vrlo rijetkim slučajevima čak i isti dan nakon njegova vađenja. Pravilno skladištenje vrcanog ili na neki drugi danas dostupan način vađenog meda jedan je od preduvjeta da se postupak izbjegne ili produži.Iako se često pogrešno smatra kako niske temperature potiču kristalizaciju, to nije tako. Tako bilježimo kako stalne temperature skladištenja ispod 10°C produžuju, pa možemo reći i da su idealne za sprječavanje kristalizacije meda. Umjerenije temperature koje se kreću od 10 – 21°C u pravilu potiču kristalizaciju meda, dok tople prostorije u kojima se med skladišti od 21 – 27°C produžuju proces kristaliziranja, ali donekle degradiraju med i njegova svojstva. Kako temperatura prostorije raste iznad 27°C kristalizacija se sprječava, ali se javlja suprotan učinak od onog koji želimo u medu. Naime, skladištenje na temperaturama iznad 27°C ovisno o povećanju postotka temperature, potiče kvarenje meda uz pojavu fermentacije (http://pcelar.hr, 2011.).

Higroskopičnost je svojstvo meda koje opisuje sposobnost meda da apsorbira i zadržava vlagu iz okoliša. Tijekom procesa skladištenja higroskopnost meda može predstavljati problem, pojavljuju se poteškoće pri očuvanju i skladištenju meda. Normalni med, s udjelom

vode manjim od 18,8 %, upija vlagu iz zraka kad atmosferska relativna vlažnost prelazi 60% (Olaitan i sur., 2007.).

Boja meda razlikuje se od jasne i bezbojne do tamnožute ili crne. Boja ovisi o botaničkom podrijetlu, starosti i uvjetima skladištenja. Transparentnost i jasnoća ovise o količini suspendiranih čestica kao što je pelud. Manje uobičajene boje meda su svijetložuta (suncokret), crvenkasti tonovi (kesten), sivkasti (eukaliptus) i zelenkasti (medljikovac) (Olaitan i sur., 2007.).

2.3. Klasifikacija meda

Pravilnik o medu (NN 93, 2009.) klasificira med prema podrijetlu i prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja. Prema podrijetlu može biti cvjetni ili nektarni med i medljikovac ili medun. Prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja može biti:

- **Med u saću**: med kojeg skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća.
- **Med sa saćemili med s dijelovima saća**: med koji sadrži jedan ili više proizvoda svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenog isključivo od pčelinjeg voska.
- **Cijeđeni med**: med koji se dobiva ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla.
- **Vrcani med**: med dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla.
- **Prešani med**: med dobiven prešanjem saća bez legla, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45°C.
- **Filtrirani med**: med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi.

2.3.1. Moniflorni med

Monoflorni med jest med napravljen od nektara isključivo jedna vrste cvijeta. Prema pravilniku o medu (NN 93, 2009.) monoflorni med u netopivom sedimentu mora sadržavati najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste.

2.3.1.1. Med kestena

Kestenov (*Castaneasativa* L.) med je taman, a tamna boja ovisi o podneblju i godini;posjeduje karakterističan, pomalo gorak okus. Visok udio fenola u sastavu (Kolayali i sur,. 2008.) mu daje prepoznatljiv miris. Sadrži veliku količinu mineralnih tvari i jedan je od medova s najvećom količinom peluda u sastavu. Zbog svojih svojstava povoljno djeluje na cijeli probavni sustav. Potiče rad crijeva, olakšava rad preopterećene jetre i žuči te štiti želučanu i crijevnu sluznicu. Kestenov med preporučuje se protiv bolesti probavnih organa: želuca, dvanaesnika, žuči i jetre (http://hr.wikipedia.org, 2013.). Vjeruje se da je kestenov med narodni lijek za astmu i bolesti dišnog sustava. Kestenov med sadrži jedan promjenjiv sastojak, 3-aminoacetofenon, koji služi kao marker za identifikaciju vrste meda (Küçük i sur., 2005.). Med kestena se smatra kao jedan od najukusnijih i najkvalitetnijih vrsta meda (Castro-Vasquez i sur., 2010.).

2.3.1.2. Med lipe

Lipov (*Tiliaplatyphyllos*) med je bistar, gotovo proziran, ugodna mirisa i vrlo blaga okusa. Konzumiranje lipova meda donosi olakšanje kod prehlada, upala dišnih i probavnih organa te nekih bubrežnih oboljenja. Veliko značenje ima u izbacivanju štetnih tvari iz organizma jer pospješuje metabolizam. Med od lipe smiruje grčeve, promjenjuje se protiv bubrežnih bolesti i pomaže pri iskašljavanju kod prehlade (http://hr.wikipedia.org, 2013.).

2.3.2. Poliflorni med

Poliflorni med je med dobiven od nektara različitih vrsta cvjetova. Okus takvog meda može varirati od godine do godine, a aroma može biti manje ili više intenzivna, ovisi koja vrsta cvjetnog nektara prevladava u medu (http://hr.wikipedia.org, 2013.). Jedan od najpoznatijih poliflornih vrsta meda je livadski med, koji zbog svojih raznovrsnih sastojaka povoljno utječe na djecu u razvoju, starije osobe ili sportaše, kojima daje dodatnu energiju.

2.3.2.1. Cvjetni med

Cvjetni med je proizvod što ga pčele proizvode od nektara medonosnih biljaka. Cvjetno podrijetlo meda značajno utječe na organoleptički karakter, biološku i ekonomsku vrijednost meda. Upravo radi tih značajki, vrlo je važno naći vjerodostojne tehnike za provjeru izvora za svaku vrstu meda. Cvjetno podrijetlo meda može se odrediti analizom peluda (Melliou i Chinou, 2011.).

2.3.3. Medljikovac

Medljika ili medna rosa je slatka tvar koja se pojavljuje periodično, u određenim vremenskim intervalima, na lišću pojedinog zimzelenog i listopadnog drveća, najčešće na listu bora, jele, smreke, vrbe, hrasta, pitomog kestena i dr. Medljiku proizvode neki kukci, najviše lisne uši. Pčele rado sakupljaju medljiku sa lišća, odnose je u košnicu i od nje spravljaju medljikovac. Medljikovac se razlikuje po svojstvima i po kemijskom sastavu od meda koji potiče od nektara sakupljenog s cvjetova medonosnog bilja. Sadrži znatno više mineralnih tvari. Medljikovac se, kao i cvjetni med, razlikuje po kvalitetu, boji, ukusu, vremenu kristalizacije itd., što zavisi, u prvom redu, od vrste drveća s kojeg se sakuplja medljika i od vrste kukaca koji je proizvode (http://www.pcelica.co.rs, 2013.).

2.3.4. Klasifikacija meda prema pakiranju i procesiranju

Općenito, med se pakira u svom poznatom, tekućem obliku. Ipak, med se može prodavati i u drugim oblicima i može biti podvrgnut raznim metodama procesiranja.

- Kristalizirani med je med u kojem se glukozni sadržaj spontano kristalizira, također se naziva i granulirani med. Med koji je kristaliziran može lako biti vraćen u tekuće stanje zagrijavanjem u toploj vodi pri 49°C.
- Pasterizirani med je med koji je zagrijavan u pasterizatoru na temperaturi 71,7°C ili više. Pasterizacija uništava stanice kvasca u medu. Ipak, pretjerano zagrijavanje utječe na boju, okus i miris meda.
- Sirovi med je med koji se nalazi u košnici, naziva se još i „minimalno procesiran“ med.
- Iscijeđeni med je med koji se protiskuje kroz mrežasti materijal zbog uklanjanja komadića voska, propolisa i drugih zagađenja. U medu ostaje pelud, minerali i vrijedni enzimi.
- Filtrirani med je med dobiven finom filtracijom pod tlakom, iz meda se uklanjaju sve čvrste tvari i granule peluda.
- Kremasti med je prirodni med, bez dodataka stranih tvari. Dobiva se kontroliranom kristalizacijom tekućeg meda. Kremasta se konzistencija postiže jednostavnim miješanjem, čime su očuvana sva prirodna svojstva. Postignuta konzistencija uvijek ostaje takva što olakšava korištenje jer med ne curi te se, kao takav, koristi kao namaz.
- Suhi med je med kojemu je uklonjena sva voda i dobiju se potpuno čvrste, neljepljive granule. Suhi med se obično koristi kao ukras desertima.

- Med u saću je med koji se još uvijek nalazi u saću s voskom (http://hr.wikipedia.org, 2013.).

2.4. Čuvanje meda

Med se treba čuvati u čistim, suhim i tamnim prostorijama s dobrim provjetravanjem. Posude u kojima se čuva med se moraju moći zatvoriti jer ako se med čuva u vlažnoj prostoriji, upija vlagu, te se povećava količina vode koja može dovesti do vrenja. Zreli med, ako se ispravno čuva, može ostati nepromijenjen godinama. Med se može čuvati u svakoj posudi koja je namijenjena za prehrambene proizvode, kao što su metalna burad, aluminijske posude, plastične ili staklene posude (http://suprs.info, 2012.). Relativna vlažnost zraka u prostorijama u kojima se čuva med bi trebala biti između 60% i 80%. Med treba biti zaštićen od oksidacije i temperaturne degradacije. Najpovoljnija temperatura za čuvanje u skladištima je 17 – 19°C. Med zapečaćen u saće stanica smatra se idealnim oblikom za čuvanje (http://hr.wikipedia.org, 2013.). Nakon dugog skladištenja, med je zbog visoke koncentracije glukoze i fruktoze podložan promjenama. Moguća je promjena boje meda, odnosno, on potamni (White, 1978.).

2.5. Razlikovanje i patvorenje meda

U dokazivanju autentičnosti meda uzimaju se u obzir dva aspekta. Prvi je autentičnost u pogledu proizvodnje meda, a drugi autentičnost u odnosu na označavanje i vrstu meda: geografsko i botaničko podrijetlo, „prirodni“, „organski“ (ekološki), „sirovi“ i „nezagrijavani“ med. Med je oduvijek bio predmet patvorenja, budući je prirodni proizvod, relativno visoke cijene i ograničene opskrbe. Može se patvoriti na dva načina, bez pčela ili pomoću pčela. Ako se za patvorenje koriste pčele, patvoreni proizvod je „šećerni med“. Šećerni med se dobiva kada se pčele prihranjuju velikim količinama šećernog sirupa. Sredstva za patvorenje meda su ugljikohidrati: invertni šećer, škrobni sirupi, saharoza, škrob, dekstrin, melasa, itd. Med se patvori i s tvarima koje mu povećavaju masu ili volumen, kao što su voda, šećer, melasa, škrobni sirup (Nedić Tiban, 2005.).

Nedić Tiban (2005.) je u svom radu, Primjena diferencijalne motridbenekolorimetrije za utvrđivanje patvorenja meda, analizirala uzorke nekoliko monoflornih vrsta meda – bagrema, kadulje, kestena i livade, kao i poliflornih vrsta meda. Analiziran je kemijski sastav, boja, određivani su reološki parametri i termičko ponašanje meda pri niskim i visokim

temperaturama. Uzorcima meda je kao sredstvo za patvorenje dodan fruktozni sirup u udjelima od 5, 10 i 20%. Statistička obrada podataka dobivenih termičkom analizom pokazala je statistički značajne razlike u patvorenim uzorcima meda. Mjerenje boje i određivanje reoloških svojstava patvorenih uzoraka meda poslužili su kao dodatne metode za utvrđivanje patvorenja meda.

2.6. Kvaliteta meda i indikatori kvalitete

Kvaliteta meda ovisi o nekoliko faktora: sadržaju vode, okusu i aromi, mirisu, konzistenciji i bistrini. Kvalitetan med bi trebao imati udio vode <18,6%, iako se Pravilnikom određuje udio vode do 20%. Okus i aroma meda ovise o vrsti meda, ali on ne bi trebao sadržavati okus dima, fermentacije ili ostataka kemikalija. Konzistencija meda određuje se jednostavnim testom, zreli, visokokvalitetni med pri 20°C treba teći niz ravnu plohu jednoliko, bez razdvajanja u pojedinačne kapi. Isto tako, izliveni med bi trebao oblikovati male slojeve, koje se jako brzo stope, što je rezultat male viskoznosti. Kvalitetan med ima dobru bistrinu, ipak, može sadržavati tragove peluda, u količini koja ne utječe na bistrinu meda.

Električna vodljivost je parametar koji se često koristi u kontroli kvalitete i može se smatrati kao valjan kriterij za određivanje botaničkog podrijetla meda. Isto tako, električna vodljivost je kriterij za razlikovanje cvjetnog meda od meda medljikovca (Lazarević i sur., 2012.).

Važan čimbenik kvalitete je i mikrobiološka kvaliteta. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08, 156/08, 89/10) navodi mikroorganizme koje subjekti u poslovanju hranom moraju provjeriti prije stavljanja proizvoda na tržište. Tablica 1 prikazuje mikroorganizme koje možemo pronaći u medu. Granične vrijednosti preporučenih mikroorganizama za med su:

1) Aerobne mezofilne bakterije: $<10^4$ CFU/g
2) *Enterobacteriaceae*: $<10^2$ CFU/g
3) Sulfitreducirajućeklostridije: <10 CFU/g
4) Kvasci i plijesni: $<10^2$ CFU/

Tablica 1 Mikroorganizmi prisutni u medu (Snowdon i Cliver, 1996.)

Bakterije	Kvasci	Plijesni

Alcaligens	*Ascosphaera*	*Aspergillus*
Bacillus	*Debaromyces*	*Atichia*
Bacteridium(sic)	*Hansenula*	*Bettsiaalvei*
Bacterium(sic)	*Lipomyces*	*Cephalosporium*
Brevibacterium	*Nematospora*	*Chaetomium*
Clostridium	*Oosporidium*	*Coniothecium*
Enterobacter	*Pichia*	*Hormiscium*
Escherichia coli	*Saccharomyces*	*Penicillium*
Flavobacterium	*Schizosaccharomyces*	*Peronsporaceae*
Klebsiella	*Trichosporium*	*Peyronella*
Micrococcus	*Torula*	*Triposporium*
Neisseria	*Torulopsis*	*Urediancеae*
Proteus	*Zygosaccharomyces*	*Ustilaginaceae*
Pseudomonas		
Xanthomonas		

2.7. Značaj meda u medicini i prehrani ljudi

Med je drevni lijek za liječenje inficiranih rana, koji je nedavno ponovno otkriven, pogotovo u dijelu medicine gdje konvencionalna, moderna terapeutska sredstva nisu bila od pomoći. Prvi pisani dokument o medu, Sumerski zapisi, datiraju u davnu 2100.-2000. godinu prije Krista i spominju med kao lijek i mast. Aristotel je spominjao svijetli med kao dobar lijek za upaljene oči i gnojne rane (Mandal i Mandal, 2011.).

Med učinkovito djeluje na zacjeljivanje rana jer nije iritantan, nije otrovan, sterilan je ili s vrlo niskim brojem mikroorganizama, djeluje baktericidno, i lako se primjenjuje. Tretiranje rana sa medom donosi bakterijsku sterilnost unutar 7 – 10 dana i pomaže zarastanje tkiva. Pacijenti kojima su se nakon operacije rane previjale čistim medom dva puta dnevno, brže su se oporavljali i rane su postale sterilne nakon 3 – 6 dana. Proučavanjem kulture bakterija

koje su se izolirale iz rana pokazala su da je med inhibirao rast bakterija, čak ih je i uništio (Jeffrey i Echazareta, 1996.).

Istraživanje koje su proveli Nasuti i sur. (2006.) pokazalo je kako med posjeduje antioksidativno i protuupalno djelovanje kod bolesti poput gastritisa i želučanih čireva. Med smanjuje izlučivanje želučanih kiselina, a želučani čirevi su bili uspješno liječeni uporabom meda kao dodatka prehrani (Jeffrey i Echazareta, 1996.).

Antioksidativna svojstva meda su rezultat prisustva antioksidativnih sastojaka kao što su vitamin C, flavonoidi, monofenoli i polifenoli. Ti antioksidativni sastojci imaju veliku ulogu u sprečavanju raka, kardiovaskularnih bolesti, upalnih poremećaja, neuroloških oboljenja, oporavka od rana, infekcijskih bolesti i starenja (Khalil, Sulaiman i Boukraa, 2010.).

Propolis se koristi u stomatologiji, gastroenterologiji, u liječenju lezija na koži, otorinolaringologiji i kod liječenja dišnih bolesti (Bogdanov, 2011.).

Otrov pčela se koristi protiv artritisa i različitih bolesti neurološkog sustava kao što su multipla skleroza, Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest i upala živčanog sustava (Bogdanov, 2011.).

Med je najstarija vrsta zaslađivača u ljudskoj prehrani. Time je određena i njegova primjena u prehrani, a prvenstveno u pripremi slastica. Za razliku od šećera, med ima daleko vrjedniji nutritivni sastav, ali i više kalorija. Naime, 1 žlica meda donosi 64 kcal, dok 1 žlica šećera daje 46 kcal. U Europi se med osobito koristi kod pripreme božićnih kolača i kolačića, a u nas medenjaka i paprenjaka. Razlog tome je taj da božićni kolači trebaju stajati duže vrijeme, pa je med u datim uvjetima idealan sastojak jer, osim što daje aromu, upija i zadržava vlagu, pa tako kolači dulje ostaju svježi (www.coolinarka.com, 2013.).

2.8. Med kao izvor opasnosti

Zbog svojih prirodnih svojstava i kontrolnih mjera u industriji meda, med je proizvod sa minimalnim brojem i vrstama mikroorganizama. Većina mikroorganizama koji se mogu pronaći u medu su posljedica nekvalitetna obrada meda, ti mikroorganizmi mogu pod određenim uvjetima uzrokovati bolesti ljudi (Snowdon i Cliver, 1996.).

Prema istraživanju Gomesa i sur. (2010.) u medu su pronađene niske razine aerobnih mezofilnih bakterija, plijesni i kvasaca. Nisu pronađeni mikroorganizmi koji su važni za

sanitarnu kvalitetu, fekalne koliformne bakterije, niti mikroorganizmi koji su važni za sigurnu uporabu meda, sulfitreducirajućeklostridije i salmonele.

Mikroorganizmi oko kojih se treba zabrinuti, a mogu se pronaći u medu su: plijesni, kvasci i bakterije koje proizvode spore. Plijesni i kvasci su odgovorni za fermentaciju meda, kada je udio vode u medu viši od 21%. *Penicillium* i *Mucor*su plijesni koji se, obično, nalaze u medu (Kačaniova i sur., 2009.).

Med je jedina vrsta hrane za koju se može dokazati kako je izvor *Clostridium botulinum*, bakterije odgovorne za botulizam novorođenčadi, budući su spore *C. botulinum* prirodno prisutne u medu (Midura, 1996.).

Med proizveden od cvjetova oleandra, rododendrona i planinske lovorike može sadržavati neke toksične sastojke. Simptomi trovanja su vrtoglavica, slabost, mučnina i povraćanje (http://en.wikipedia.org, 2013.).

2.8.1. Mikroorganizmi, kvaliteta i sigurnost meda

Različiti mikroorganizmi mogu utjecati na kvalitetu i sigurnost meda. Republika Hrvatska je u ožujku 2011. izdala 3. izmijenjeno izdanje Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu, kojim se utvrđuju mikrobiološki kriteriji za određene mikroorganizme.

Radi svojih karakterističnih svojstava med posjeduje antibakterijski učinak na bakterije, od kojih su mnoge patogene, što znači da med ili sprečava rast ili ima baktericidno djelovanje (Bogdanov, 2011.).

Mikroorganizmi važni za industriju prerade meda su oni koji su sposobni preživjeti u uvjetima visoke koncentracije šećera i kiseline i preživjeti antimikrobna svojstva meda.

Takvi mikroorganizmi mogu se podijeliti na tri vrste:

- Mikroorganizmi koji se prirodno nalaze u medu (određeni sojevi kvasaca i spora bakterija)
- Mikroorganizmi koji utječu na sanitarnu ili komercijalnu kvalitetu (koliformne bakterije i kvasci)
- Mikroorganizmi koji pod određenim uvjetima (npr. klijanje i rast u termički neobrađenoj hrani) mogu uzrokovati određene bolesti (Snowdon i Cliver, 1996.).

2.8.1.1. Izvori mikroorganizama

U medu su dva izvora kontaminacije mikroorganizmima: primarni i sekundarni. Primarni izvor uključuje pelud, probavni trakt pčela, zrak, prašinu, zemlju i nektar. Sekundarni izvori su oni nastali preradom meda, tj. ljudski faktor, osobe koje rukuju hranom, križna kontaminacija, oprema, ambalaža. Primarne izvore kontaminacije je teško kontrolirati, a sekundarni izvori kontaminacije meda mogu se vrlo lako kontrolirati dobrom proizvođačkom praksom (Snowdon i Cliver, 1996.).

Pelud je glavni izvor mikroorganizama u probavnom putu pčela. Pored peludi, na probavnu mikrofloru pčela utječe starost pčela, godišnje doba i geografsko podrijetlo, iako postoje vrste mikroorganizama koje su stalno prisutne. Prevladavaju gram – varijabilne bakterije, *Bacillus* spp, *Enterobactericeace*, plijesni i kvasci. Gram – varijabilne bakterije su najčešći crijevni mikroorganizmi u odraslih pčela i pčele matice. Također su izolirane i iz larvi i njihovog izmeta, cvjetnog peluda, čak i iz nekoliko uzoraka meda. Riječ je o vrstama roda *Bacterium*i *Achromobacter*. Gram – negativne bakterije roda *Enterobacteriaceae* pronađeni u pčelama medaricama su *Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes* i *Klebsiellapneumoniae*. Najčešće vrste plijesni nađene u pčelama su vrste roda *Penicillium* i *Aspergillus*. Ne sadrže sve pčele plijesan, njihov sadržaj ovisi od kolonije do kolonije (Gillian, 1997.).

Prema istraživanju (Kačaniova i sur., 2009.) mikroflore košnice, mikroskopske gljivice pronađene u košnici su *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. i *Penicillium* sp.

Zrak i prašina su važni izvori mikroorganizama roda *Bacillus, Clostridium* i *Micrococcus*. Kvasci *Saccharomyces* i *Torula* mogu se naći u šećeru s visokim sadržajem vlage. *Bacillus, Clostridium, Pseudomonas* i *Pshychrobacter* su bakterije koje se najčešće mogu naći u tlu. Košnica i nektar, kao primarni izvori mikrobiološke kontaminacije meda mogu biti izvor spora bakterija u medu (Snowdon i Cliver, 1996.).

Dobra proizvođačka praksa je važna za kontrolu mikroorganizama u hrani, uključujući i med. Kontaminirana oprema može biti izvor onečišćenja kvascima, zrak prilikom pakiranja meda, osobe koje rukuju medom mogu imati različite kožne infekcije, kihanje i fekalna kontaminacija. Postoji još križna kontaminacija koja dolazi, uglavnom, od životinja ili životinjskih proizvoda i kontaminacije opremom, koje uključuju ostatke hrane i vode. Isto tako, podovi, stropovi i zidovi mogu biti izvor mikroorganizama koji kontaminiraju hranu. Da bi se spriječile sekundarne kontaminacije potrebno je dosljedno provoditi sve kontrolne mjere prilikom procesiranja hrane (Snowdon i Cliver, 1996.).

2.8.1.2. Plijesni

Tragovi plijesni u medu se povezuje s crijevnim sadržajem pčela, košnice i okolinom u kojoj se pčele hrane. U crijevima ličinki pčela otkrivene su plijesni roda*Aspergillus*. Visok udio plijesni može biti pokazatelj onečišćenja meda putem pčela, prilikom potrage za hranom ili prilikom procesiranja hrane. Uvjeti u košnici imaju posjeduju utjecaj na mikrobiološku kvalitetu i zdravstvenu ispravnost meda. Isto tako, pljesnivi okviri za saće mogu biti izvor plijesni u medu (Snowdon i Cliver, 1996.).

Plijesni roda *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Penicillium* i *Peyronelia*su izolirane iz izmeta pčelinjih ličinki (Gilliam i Prest, 1987.). Niski sadržaj plijesni u medu ukazuje da plijesni mogu preživjeti ali nemaju tendenciju rasta u medu (Snowdon i Cliver, 1996.).

2.8.1.3. Bakterije

U znanstvenoj literaturi vrlo je mali broj bakterija koji se mogu pronaći u medu, uz iznimku *Clostridium botulinum*. Većina istraživanja o bakterijama u medu govore o načinu unosa vegetativnih patogenih mikroorganizama u medu, a koji nisu uobičajeno prisutni u medu (Snowdon i Cliver, 1996.).

Sackett (1919.) u svom istraživanju govori o tome da su pčele mogući prenosioci patogenih mikroorganizama, koje slučajno prenesu iz ljudskog izmeta i unesu ih u med. Dokazao je da 10 vrsta crijevnih bakterija koje su nacijepljene na med prežive samo nekoliko sati ili dana. Otopina s manje od 50% meda u vodi produžuje život bakterija, ali nikada duže od 40 dana. Zaključio je kako med može biti nositelj bakterija koje uzrokuju različite bolesti: tifusne groznice, dizenterije i raznih infekcija crijeva (Snowdon i Cliver, 1996.).

Istraživanje (Tysset i Durand, 1973.) gram – negativnih bakterija u medu je dalo slične rezultate kao što su i Sackettovi (1919). Bakterije u medu izgube vijabilnost u roku od 8 do 34 dana (ovisno o vrsti bakterije).

U istraživanju Tysseta i sur. (1979.) utvrđeno je da bakterijske vrste *Mycobacterium* na 20°C preživljavaju 26 do 77 dana, uključujući i vrstu bakterije odgovornu za tuberkulozu.

Bakterije roda *Staphylococcus* se rijetko pojavljuju u medu, čak i ako postoje, neće preživjeti procesiranje meda i rast je malo vjerojatan (Snowdon i Cliver, 1996.).

Midura i sur. (1979.) su u svom istraživanju meda kao izvora *Clostridium botulinum* dokazali da je u svim slučajevima botulizma novorođenčadi tip toksina koji je izoliran iz meda isti kao i onaj izoliran iz stolice bolesnog djeteta. Izolaciju *C.botulinum* morali su provoditi na drugačiji način od uobičajenog zbog viskoznosti i visokog sadržaja šećera.

Zaključak je da vegetativni oblici patogenih bakterija nikad nisu pronađeni u medu, a ako se i uvedu u med, mogu preživjeti samo kratko vrijeme (nekoliko tjedana), osim ako je med skladišten na hladnijim temperaturama. Na mikrobiološko preživljavanje bakterija velik utjecaj ima vrsta meda i udio vode u medu (Snowdon i Cliver, 1996.).

2.8.1.4. Drugi mikroorganizmi

U medu je, osim kvasaca, plijesni i bakterija moguće pronaći i druge mikroorganizme. U medu medljikovcu se mogu pronaći alge, kao i u sedimentima meda, kod visoke relativne vlažnosti. Neki ljudski crijevni virusi, kao što je hepatitis A, mogu preživjeti u medu, tj. podnose suhe uvijete, ali njihov broj opada s povišenjem temperature i s vremenom. Budući je ljudski izmet glavni izvor crijevnih virusa, vrlo je važno imati određene kontrolne mjere pri procesiranju hrane (Snowdon i Cliver, 1996.).

2.8.1.5. Kontrola prisutnosti broja mikroorganizama

Svojstva namirnica kao što su: pH, vlaga, oksidacijsko-redukcijski potencijal, hranjive tvari i antimikrobni sastojci znatno utječu na rast mikroorganizama. Med ima mnoga svojstva koja ga čine bakteriostatskim ili bakteriocidnim. Ipak, najveći utjecaj u određivanju prisutnosti organizama koje se prenose hranom imaju temperatura skladištenja, relativna vlažnost zraka i koncentracija plinova u okolini (Snowdon i Cliver, 1996.).

Kontrola sadržaja vlage i temperature skladištenja su dva primjera industrijske kontrole rasta mikroorganizama u medu. Te zaštitne značajke nestaju kada se med razrijedi ili se koristi kao sastojak hrane (Snowdon i Cliver, 1996.).

Pčele također pridonose kontroli prisutnosti broja mikroorganizama u medu. Šećer koji prikupljaju u nektaru su uglavnom velike molekule saharoze. Pčele enzimom invertazomkidaju molekule saharoze na fruktozu i glukozu uz isparavanje vode. Time čine med prekoncentriranim za rast i razvoj kvasaca i drugih mikroorganizama (Olaitan i sur., 2007.).

Kontrola nad izlaganjem meda mikroorganizmima prije prikupljanja gotovo i da ne postoji. Kontrola kvalitete zraka, prašine, zemlje i cvijeća ili materijala koje pčele prenose nije realno provediva. Praksa održavanja pčela zdravima ima pozitivan utjecaj na broj i vrstu mikroorganizama u medu, kao što nepovoljni uvjeti u košnici imaju negativan utjecaj. Dobra pčelarska praksa može održati niski broj mikroorganizama u medu (Snowdon i Cliver, 1996.).

Određeni mikroorganizmi koji potječu od sisavaca, posebno od ljudi, mogu uzrokovati bolesti ako se unesu u organizam putem hrane. Takvi mikroorganizmi prenose se kožnom infekcijom, nedovoljnom sanitarnom praksom ili putem fekalija. Tla kontaminirana ovim vrstama mikroorganizama mogu neizravno prenositi bolesti. Patogeni mikroorganizmi nikada nisu pronađeni u prirodnom medu i ne mogu dugo preživjeti pri 20°C, međutim, moguć je dugotrajni opstanak ako je med pohranjen na temperaturama ispod 10°C (Snowdon i Cliver, 1996.).

Izbjegavanje povećanja vlage povećava stabilnost meda. Isto tako, važno je ograničiti kontaminaciju meda tijekom i poslije procesiranja. Oprema za procesiranje koja dolazi u kontakt s medom mora biti učinkovito očišćena i sanitizirana poslije svake upotrebe, a okoliš u proizvodnji se mora održavati u uvjetima koji ograničavaju prolazak mikroorganizama u proizvod (Sperber i Doyle, 2009.).

Za inaktivaciju mikroorganizama koriste se različite kombinacije vremena i temperature. Spore se teško inaktiviraju u medu, jer se invazivnom toplinskom obradom uništavaju organoleptička svojstva meda. Komercijalni med se grije na 71°C kroz 30 minuta, čak i poslije ovakve obrade, određeni mikroorganizmi se mogu pronaći u medu (Snowdon i Cliver, 1996.).

Vrlo važnu ulogu u kontroli broja mikroorganizama ima i aseptičko pakovanje nakon što je med pravilno obrađen. I ostali fizikalni procesi kao što su zračenje ili ultrafiltracija mogu uništiti mikroorganizme u medu (Snowdon i Cliver, 1996.).

2.8.1.5.1. Učinak procesiranja na mikroorganizme u medu

Kad je izvađen, sirovi med sadrži strane tvari kao što su pelud, komadići voska, male količine kvasaca otpornih na šećer i kristale glukoze. On je kao takav sklon fermentaciji, osim

ako je udio vlage ispod 17%; većina medova će s vremenom kristalizirati ako se ne provedu potrebne radnje koje bi spriječile kristalizaciju. Procesiranje meda uključuje kontrolirano zagrijavanje da bi se uništili kvasci i otopili kristali glukoze. Zagrijavanje se kombinira sa finim cijeđenjem ili tlačnom filtracijom (White, 1978.).

Nakon što je izvađen i profiltriran, med se podvrgava toplinskoj obradi kako bi se smanjila razina vlage i uništili kvasci. Iako tretiranje toplinom može učinkovito smanjiti vlagu, smanjiti i odgoditi kristalizaciju te uništiti stanice kvasaca u potpunosti, ono može dovesti do pogoršanja kvalitete proizvoda. Grijanje povećava razinu hidroksimetilfurfurala (HMF). Najveća zakonska dopuštena granica HMF je 40mg/kg. Enzimi u medu su također osjetljivi na toplinu i tako služe kao pokazatelj kvalitete. Glavni enzimi uključuju invertazu (α-glukozidazu), dijastazu (α-amilazu) i glukoza-oksidazu. To su nutritivno važni enzimi. Aktivnost enzima općenito se mjeri kao djelatnost dijastaze i izražava se kao broj dijastaze (DN). Minimum DN u prerađenom medu iznosi 8 (http://www.hielscher.com, 2013.).

Tipična obrada meda toplinom zahtjeva zagrijavanje na 70°C 30 min. Filtriranje meda kroz filtar sa porama veličine 150μm dobije se procijeđeni med a filtrirani med prolazi kroz pore veličine 1μm. Procesi grijanja i filtriranja smanjuju ili eliminiraju mnoge mikroorganizme. Dodatno tretiranje meda ovisi o hrani s kojom je med u kombinaciji. Med je proizvod koji je većinom bez mikroorganizama, a oni mikroorganizmi koji i mogu biti prisutni u medu vjerojatno će biti prisutni u vrlo niskom broju (Snowdon i Cliver, 1996.).

Zbog ograničenja toplinske obrade istražuju se netoplinske analize, kao npr. mikrovalno zračenje, infracrveno grijanje, ultrafiltracija i ultrazvučna obrada.

Ultrazvučna obrada je djelotvorno sredstvo za uništavanje nepoželjnih komponenti, kao što su kristali i stanice kvasaca u medu. Kao netoplinska obrada izaziva niži rast HMF i bolje zadržavanje enzima dijastaze, arome i okusa meda. Ultrazvučna obrada se provodi na značajno nižim temperaturama, oko 35°C i traje 30 sekundi. Takav način obrade na frekvenciji 20 kHz u potpunosti pretvara kristalizirani med u tekući (http://www.hielscher.com, 2013.).

2.8.2. Toksični spojevi u medu

Različite biljke mogu sintetizirati toksične organske spojeve, od kojih su mnogi značajnog psihološkog utjecaja, a neki od njih mogu se pronaći i u medu.

Nevjerojatna činjenica je da, iako se pčele hrane na vrlo velikom području, vrlo je mali sadržaj toksičnih spojeva u medu. Najpoznatiji toksin je onaj u medu *Ericacae*(*Rhododendron, Azalea, Andromeda, Kalmia*spp.). U literaturi se mogu naći Ksenofonovi opisi masovnog trovanja na ekspediciji na Cipar 401.g. prije Krista, koje je posljedica konzumiranja meda rododendrona (White, 1978.). Med rododendrona je proizvod pčela koje se hrane nektarom s cvjetova roda *Rhododendron*. Takav med je poznat pod nazivom „ludi med“ ili „otrovni med“. Rododendron raste na području planina regije istočnog Crnog mora u Turskoj, Japanu, Nepalu i Brazilu. Iako otrovan, takav med se koristi u regiji Crnog mora kao alternativna medicina za tretiranje različitih poremećaja (Silici i sur, 2010.). Ostala područja koja su poznata po slučajevima trovanja medom *Ericacae*su područja bivšeg SSSR, istočni i sjeverozapadni SAD i Japan (White, 1978.).

Otrovni med se također može dobiti kada su pčele u blizini tutu grmlja (*Corianiaarborea*) i vinskih skakavaca (*Scolypopaaustralis*) koji se većinom nalaze samo u Novom Zelandu. Pčele sakupljaju mediljiku koju proizvode vinski skakavci koji se hrane tutu grmljem. Na taj način otrov tutindospjeva u med. Simptomi trovanja tutinom su povraćanje, vrtoglavica, ukočenost, koma i grčevi (http://en.wikipedia.org, 2013.).

Ostali toksični medovi su med od bunike (*Daturametel*), *DaturaStramonium*i *Hyoscyamusniger*, od žutog jasmina (*Jessamine*) i zimzelenog raslinja (White, 1978.).

2.9.Antimikrobni učinak meda

Med je važan i jedinstveni prehrambeni proizvod koji sadrži bioaktivne spojeve proizašle iz pčela i biljaka. Brojna su istraživanja pokazala kako med posjeduje antimikrobna svojstva koja uništavaju ili inhibiraju rast nekih patogenih vegetativnih mikroorganizama. Jedinstveni sastav meda doprinosi njegovim antimikrobnim svojstvima, ipak, njegov antibakterijski učinak nije do kraja istražen (Baltrušaityte i sur., 2007.).

Med inhibicijski djeluje na oko 60 vrsta bakterija, uključujući aerobe i anaerobe, gram – pozitivne i gram – negativne bakterijske vrste. Isto tako ima i antifungalni učinak na neke kvasce i vrste *Aspergillus* i *Penicillium* (Olaitan i sur., 2007.).

Iako su neki istraživači zaključili kako med od određenih biljaka posjeduje bolja antibakterijska svojstva od drugih, nema dovoljno dokaza za opravdanje te tvrdnje. Neke tvrdnje su bazirane na podacima vrlo malog broja uzoraka, a druga istraživanja pokazuju da postoje različite antimikrobne aktivnosti meda koji potječe od istog cvjetnog uzorka. Dokazano je da medljikovac iz šuma na planinama regije Centralne Europe posjeduje visoku antimikrobnu aktivnost. Isto tako, imed slatkog kestena i lipe je pokazao visoku antimikrobnu aktivnost. Još jedan tamni med, manuka, iz Novog Zelanda je pokazao visoku razinu aktivnosti (Molan, 1992.).

U najopsežnijem pregledu antibakterijskih svojstava u medu koje je objavio Molan (1992.) opisuju se glavni čimbenici antibakterijskih svojstava.

Glavni čimbenici koji utječu na antibakterijsku aktivnost meda:

- **Kiselost (pH)**: jedno od karakterističnih svojstava meda je kiselost, s vrijednostima pH između 3,2 i 4,5, koje su dovoljno niske da inhibiraju patogene vrste. Minimum pH vrijednosti za rast uobičajenih patogenih vrsta su: *E.coli* (4,3), *Salmonella* spp(4,0), *Pseudomonas aeruginosa*(4,4), *Streptococcuspyogenes*(4,5). U nerazrijeđenom medu kiselost je važan antibakterijski faktor (Olaitan i sur., 2007.). pH meda lagano raste ako se med razrijedi. Razrjeđivanje može imati kompleksan utjecaj na med, jer može povećati aktivnost glukoza-oksidaze, što dovodi do stvaranja vodikova peroksida i glukonske kiseline, kao i razrjeđivanje drugih organskih kiselina prisutnih u medu (Baltrušaityte i sur., 2007.).

- **Osmotski efekt**: Med je zasićena otopina (84%) dva monosaharida, fruktoze i glukoze. Jaka interakcija ove dvije šećerne otopine ostavlja vrlo malo molekula vode dostupnih za mikroorganizme. Slobodna voda se mjeri kao aktivitet vode (a_w). Vrijednost aktiviteta vode za med je od 0,562 do 0,62. Aktivnost vode u čistom medu je preniska za rast mikroorganizama, ali ako se med razrijedi vodom, on gubi svoju nisku a_w i time više ne posjeduje antimikrobna svojstva (Olaitan i sur., 2007.).

- **Vodikov peroksid**: Enzimska proizvodnja vodikovog peroksida se događa putem glukoza-oksidaze, enzima prisutnog u medu. Glukoza-oksidaza postaje aktivna samo u razrijeđenoj otopini meda i za reakciju joj je potreban kisik. Također je aktivna samo kad je kiselost meda neutralizirana tjelesnim tekućinama.

  Reakcija glukoza-oksidaze:

  $C_6H_{12}O_6 + H_2O + O_2 \rightarrow C_6H_{12}O_7 + H_2O_2$

Iako su slobodni radikali prirodan bioprodukt metabolizma, oni uzrokuju oštećenje stanica i kidaju strukturu DNK. Antioksidansi vežu ove opasne molekule, sprečavajući njihov opasan rad. Suprotno sintetičkim, med je prirodan proizvod koji nema štetne posljedice na zdravlje. Mnogi sastojci meda posjeduju antioksidacijska svojstva: vitamin C, fenolni sastojci, katalaza, peroksidi, enzim glukoza-oksidaza. Antioksidacijska svojstva meda mogu djelovati i kao antidepresivi tijekom emotivnog, fizičkog ili intelektualnog stresa (Khalil i sur., 2010.).

- **Ostali sastojci**: Med istog cvjetnog izvora sadrži razne antibakterijske tvari, koje proizvode određene vrste biljaka, koje u nekim slučajevima imaju veliku ulogu u antibakterijskom djelovanju meda. Te tvari su: pinocembrin (flavonoid koji ima visoku koncentraciju u propolisu), lizozimi, kiseline (fenolne i dr.), terpeni i benzilni alkohol (Molan, 1992.).

Postoje mnogobrojna istraživanja o antibakterijskom učinku meda, i bakteriostatskom i baktericidnom. Baktericidna aktivnost meda protiv *E.coli* s 17% otopinom meda je počela nakon 24h, a s 9% otopinom tek nakon 48h. Za bakteriju *Staphylococcus aureus* je bilo potrebno 24h s 33% otopinom meda, 48h s 25% otopinom meda a 96h s 9% otopinom meda. Istraživanje je pokazalo kako su gram – pozitivne bakterije manje otporne na učinak meda, 20% otopina meda je počela baktericidno djelovati već nakon 1h, a bakterije su potpuno uništene nakon 3 – 24h. Gram – negativne bakterijske vrste su otpornije na antimikrobni učinak meda, 20% otopina je počela djelovati nakon 4 do 6h,a potpuno uništenje je slijedilo nakon 48h (Molan, 1992.).

Veliki utjecaj na antibakterijsko djelovanje meda posjeduje toplina, svjetlost, kisik, procesiranje i skladištenje. Med s visokom aktivnošću vodikovog peroksida osjetljiv je na toplinu i svjetlost jer oni inaktiviraju enzime koji stvaraju vodikov peroksid (Molan, 1992.).

2.10. Svojstva odabranih gram – negativnih bakterija

Escherichia coli

E. coli je gram – negativna, fakultativno anaerobna, asporogena, štapićasta bakterija koja pripada porodici *Enterobacteriaceae.* Biokemijski je vrlo aktivna: fermentira laktozu, posjeduje lizindekarboksilazu, proizvodi indol, ne proizvodi H_2S, negativan je Voges–Proskauerov test i ne raste na podlozi s citratom (Bhunia, 2008.).

Ova vrsta bakterija je kratki štapić duljine 2 – 6 μm, širine 1 – 3 μm. Većina je sojeva pokretna i posjedujeperitrihijalneflagele, a neki sojevi imaju jače izraženu kapsulu. Dobro raste na običnim podlogama. Nakon inkubacije od 18h na hranjivom agaru stvara okrugle, lagano konveksne glatke kolonije. Mezofilna je bakterija s optimalnom temperaturom rasta 35–37°C no, podnosi i temperature ispod 0°C, a 60°C je ubija nakon 15 minuta (Perković i sur., 1995.).

E. coli je prvi izolirao Escherich 1885.godine iz stolice djece i nazvao ju je *Bacterium coli commune* želeći istaknuti crijevni sustav ljudi i životinja kao glavno stanište te bakterije. *E. coli* je široko rasprostranjena kao crijevni parazit sisavaca i ptica, ali ne živi samostalno u prirodi. Dio je normalne crijevne flore, ali može biti povezana s infekcijom gotovo svakog organa i tkiva. Najčešće su crijevne infekcije izazvane enteropatogenim, te infekcije mokraćnih puteva uzrokovane uropatogenim sojevima. Antimikrobno liječenje crijevnih infekcija obično nije potrebno, jer se radi o blažim infekcijama,te bi antibiotici mogli još više poremetiti crijevnu floru. U liječenju infekcija mokraćnih puteva daju se antibiotici koji se izlučuju urinom, i to prema rezultatu testa osjetljivosti (Perković i sur., 1995.).

Salmonella

Salmonele pripadaju porodici *Enterobacteriaceae.* To su gram – negativne, asporogene, štapićaste, fakultativno anaerobne, katalaza pozitivne, oksidaza negativne, pokretljive bakterije. Optimalna temperatura za rast im je 37°C, a mogu rasti u rasponu temperatura od 5°C do 45°C (Bhunia, 2008.).

Po svojem obliku i veličini, salmonele su kao i ostale enterobakterije štapićaste strukture duljine 0,5 – 3 μm, širine 1 – 3 μm. Na krutim podlogama rastu u nježnim, prozirnim sivkastim kolonijama promjera 2 – 3 mm, koje su obojene ovisno o diferencijalnoj tvari u podlozi, a ako u podlozi ima željeza, tada su crnog centra od željeznog sulfida, koji nastaje spajanjem sumporovodika što ga stvaraju salmonele i željeza u podlozi (Perković i sur., 1995.).

Salmonele su crijevni paraziti kralježnjaka, patogeni za čovjeka i mnoge životinjske vrste. Vrlo su otporne na štetne utjecaje okoline, te mogu dugo preživjeti izvan organizma domaćina, u vodi i u tlu, kamo dospijevaju životinjskim ili ljudskim izmetom. Najčešći izvor zaraze su životinje, koje se kontaminiraju fekalnim sadržajem prilikom klanja. Nakon preboljele infekcije bilo kojeg tipa čovjek može kraće ili duže vrijeme biti kliconoša salmonela. Salmonele ulaze u ljudski organizam putem probavnog sustava i uzrokuju tri tipa bolesti: gastroenteritis, crijevnu groznicu i sindrom sepse. Gastroenteritisi se uglavnom ne liječe

antibioticima, nego samo potpornom terapijom, nadoknadom tekućine i elektrolita. Crijevne groznice i septički sindrom zahtijevaju uz potpornu, i antimikrobnu terapiju (Perković i sur., 2005.).

Yersinia enterocolitica

Yersinia enterocolitica također pripada porodici *Enterobacteriaceae.* To je gram – negativna, asporogena, fakultativno anaerobna štapićasta bakterija. Optimalna temperatura za njen rast je 25°C, no može rasti i na +4°C. Većina izolata stvara indol i dekarboksiliraornitin (Perković i sur., 2005.).

Y. enterocolitica je, kao i ostale enterobakterije, štapićaste strukture duljine 0,5 – 3 μm, širine 1 – 3 μm. Na hranjivom agaru, nakon 24 sata pri temperaturi od 37°C porastu kolonije od 1 – 2 mm, sjajne površine, uzdignutog središta; tijekom slijedeća 24 sata inkubacije pri 22°C povećavaju se. Temperatura od 60°C uništava jersinuju tijekom 30 min (Perković i sur., 2005.).

Primarno se nalazi kod divljih životinja, kao i kod domaćih životinja (svinje, ovce, krave) koje su izvor zaraze. Jersinija fekalijama dospijeva u vanjsku sredinu pri čemu se kontaminiraju životne namirnice. Infekcija nastaje preko kontaminirane hrane koja nije prethodno termički obrađena. Može se i prenijeti preko kontaminiranih ruku poslije kontakta s domaćim životinjama, ali se ne prenosi od oboljelog čovjeka. Jersinoza je akutno infektivnabolest koja dovodi do pojave gastroenterokolitisa s krvavim proljevom. Najčešće obolijevaju djeca i mladi. Kod lakih subkliničkihoblika bolesti preporučuje se samo dijeta, a kod težih oblika terapija se sastoji od nadoknade tekućine i elektrolita, kao i liječenje antibioticima (http://stetoskop.info, 2013.).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Zadatak

Zadatak rada bio je ispitati antibakterijski učinak meda kestena i lipe na odabrane gram-negativne bakterije. Nadalje, zadatak je bio i ispitati učinak zagrijavanja pri temperaturama od 60 °C (30 minuta), 80 °C (10 minuta) i 100 °C (5 minuta) na antibakterijska svojstva.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Kulture mikroorganizama

Kulture mikroorganizama korištene u ovom radu su gram-negativne bakterije iz kolekcije kultura mikroorganizama Katedre za biologiju i mikrobiologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

Za izradu ovog rada, korištene su sljedeće bakterijske vrste:

Escherichia coli

Salmonella agona

Salmonella enteritidis

Salmonella infantis i

Yersinia enterocolitica.

Kulture bakterija su regenerirane uzastopnim precjepljivanjem kroz tri dana, nakon inkubacije pri 37 °C na TrypticGlucoseYeast Agaru (TGK agar, Biolife, Italija).

3.2.2. Priprema uzoraka meda

Med korišten za izradu ovog rada je doniran iz tvrtke Apipharma d.o.o. Našice. Za određivanje antibakterijskog učinka, med je razrijeđen sterilnom demineraliziranom vodom (20, 30, 45 i 60 % w/w). Razrijeđen med je upotrijebljen za ispitivanje antibakterijskog učinka (nezagrijan) ili je zagrijavan u vodenoj kupelji određeno (željeno) vrijeme.

3.2.3. Određivanje antibakterijskog učinka uzoraka meda

Antibakterijski učinak meda, saharoze i invertnog šećera je provedeno s regeneriranim bakterijskim kulturama. Nakon regeneracije, pripremljena je suspenzija stanica bakterijske kulture koncentracije stanice od $1{,}5\times10^8$ stanica u mL (usporedbom s 0,5 McFarland standardom). Razrjeđivanjem suspenzije, pripremljena je suspenzija konačnog broja stanica 1×10^6 u mL koja je korištena za određivanje antibakterijskog učinka ispitanih uzoraka. U tikvicu s pripremljenim TGK agarom (steriliziranim i ohlađenim na 50 °C u vodenoj kupelji) prenesen je inokulum bakterijske kulture kako bi dobili konačnu koncentraciju od 1×10^6 stanica u mL podloge. Podloga je homogenizirana pažljivim mućkanjem. Pomoću sterilne epruvete volumena 50 mL, preneseno je po 20 mL nacijepljne podloge u svaku sterilnu, praznu petrijevu zdjelicu. Nakon skrutnjavanja (hlađenja), u podlozi su izbušene rupice (sterilnim bušačem za čepove) promjera 5 mm. Sterilnom pincetom su izvađeni agarni čepovi i dobivena rupica je ispunjena sa 100 □L pripre
pripremljeno je po 5 rupica. Svaka analiza je napravljena u paralelama.

Nakon punjenja, zdjelice su ostavljene u hladnjaku 30 minuta kako bi uzorak difundirao u podlogu, potom su inkubirane pri 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, izmjerene su zone inhibicije koje mogu biti:

potpune = oko rupice nema porasta bakterijske kulture (nezamućena podloga) i

djelomične = oko rupice, u zoni difuzije uzorka porast bakterijskih stanica je slabiji, u usporedbi s ostatkom podloge gdje uzorak nije mogao difundirati.

3.3. Određivanje aktiviteta vode u uzorcima meda

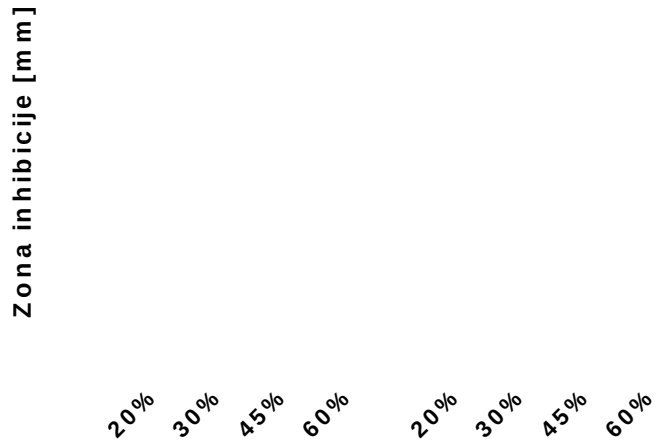
U svim analiziranim uzorcima meda (sve pripremljene otopine, nezagrijan i zagrijan med) određen je aktivitet vode pomoću pomoću HygropalmAW1 (Rotronic Instrument Corp., SAD). U plastičnu posudicu se stavlja uzorak meda i postavlja u podložak te prekriva sondom. Nakon uspostavljanja ravnoteže, izmjereni aktivitet vode se očitava na ekranu uređaja. Prilikom mjerenja je važno osigurati konstantnu temperaturu.

3.4. Obrada rezultata

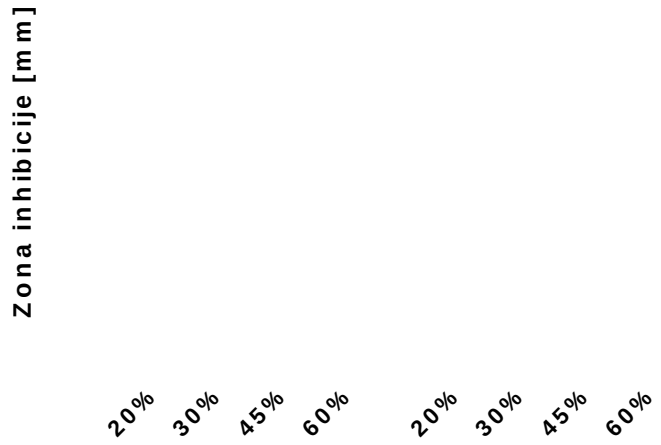
Rezultati rada su obrađeni uz pomoć računalnih programa Microsoft® Office Excel 2003 za Windows, Microsoft Corporation, Redmond, SAD i GraphPad Prism verzija 5.00 za Windows, GraphPad Software, San Diego, SAD.

4. Rezultati

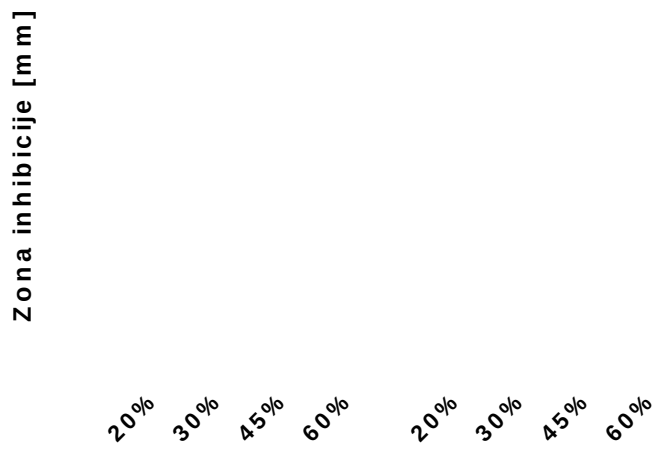
4.1. Antibakterijski učinak meda



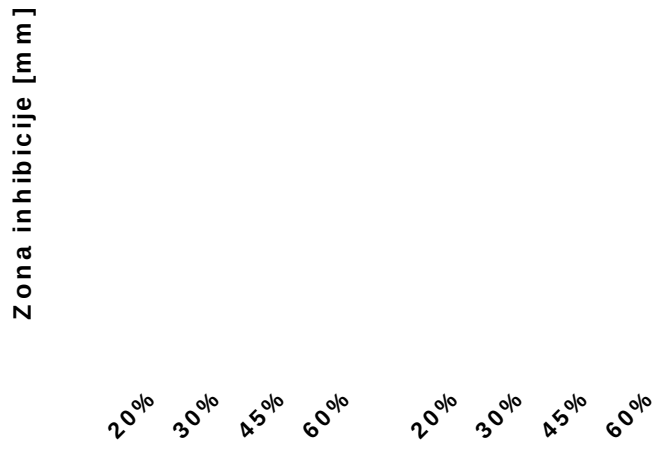
Slika 1 Antibakterijski učinak termički netretiranog meda kestena i lipe na bakteriju vrste *Escherichia coli*



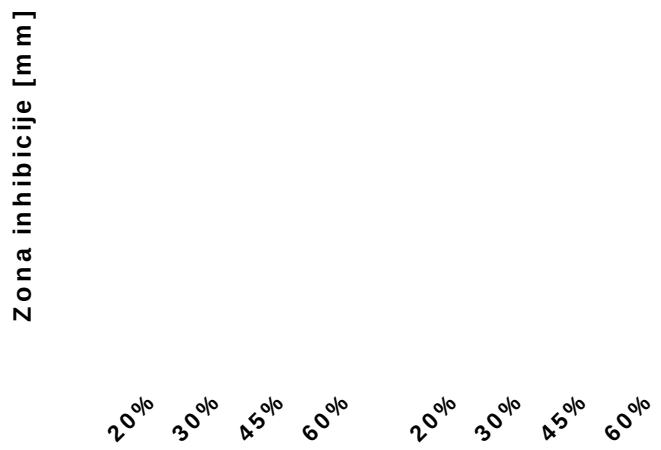
Slika 2 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 60 °C tijekom 30 minuta na bakteriju vrste *Escherichia coli*



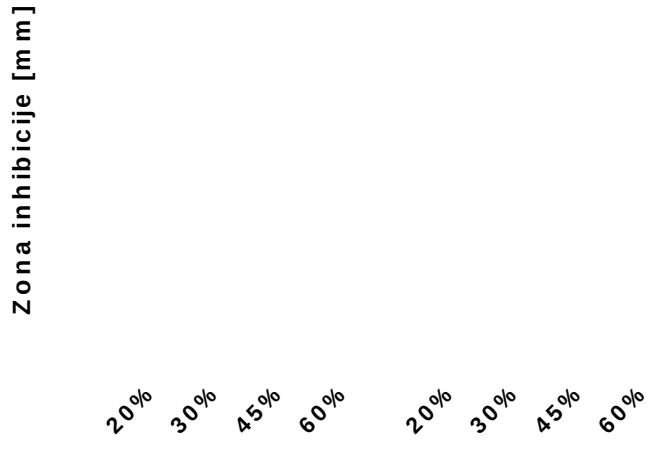
Slika 3 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 80 °C tijekom 10 minuta na bakteriju vrste *Escherichia coli*



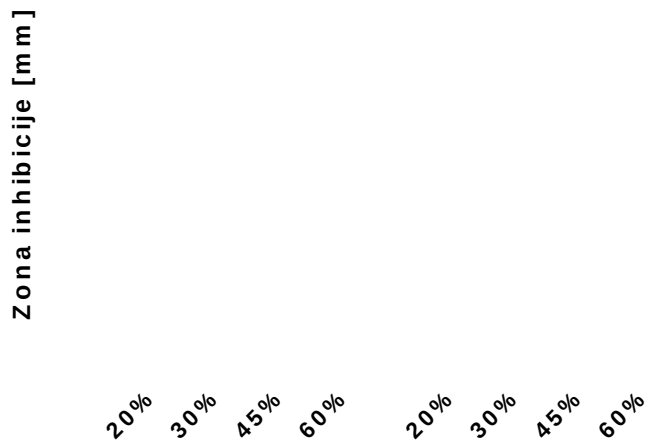
Slika 4 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 100 °C tijekom 5 minuta na bakteriju vrste *Escherichia coli*



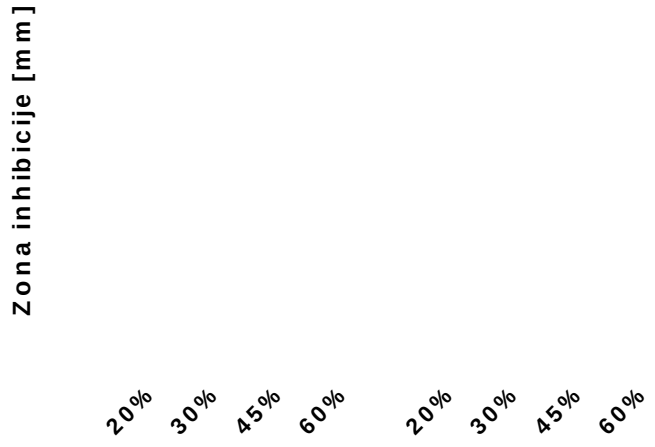
Slika 5 Antibakterijski učinak termički netretiranog meda kestena i lipe na bakteriju vrste *Salmonella agona*



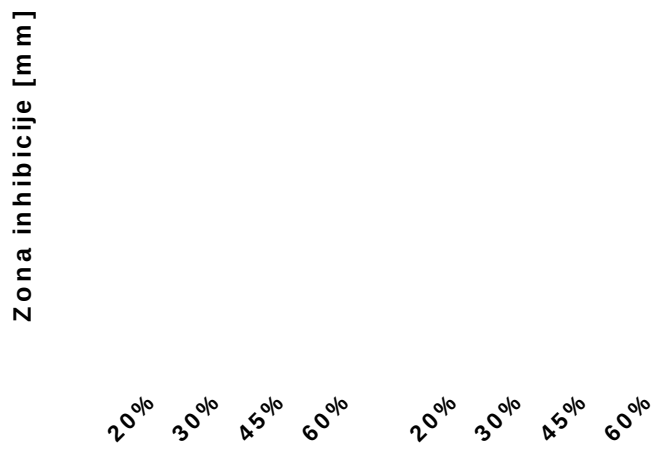
Slika 6 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 60 °C tijekom 30 minuta na bakteriju vrste *Salmonella agona*



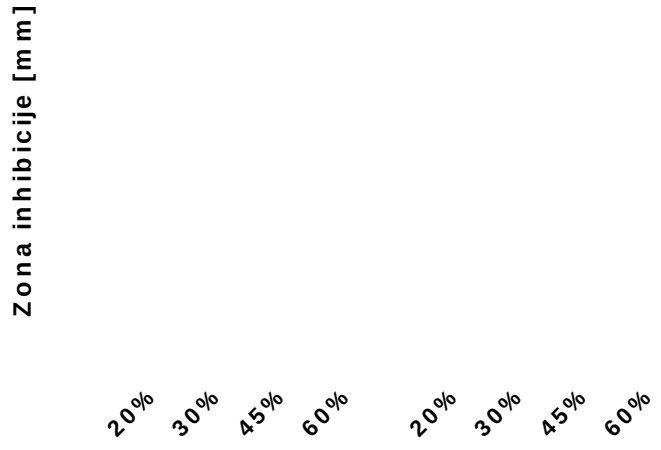
Slika 7 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 80 °C tijekom 10 minuta na bakteriju vrste *Salmonella agona*



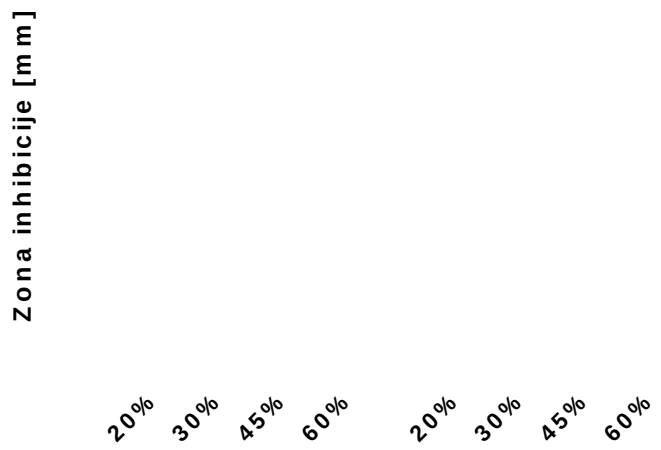
Slika 8 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 100 °C tijekom 5 minuta na bakteriju vrste *Salmonella agona*



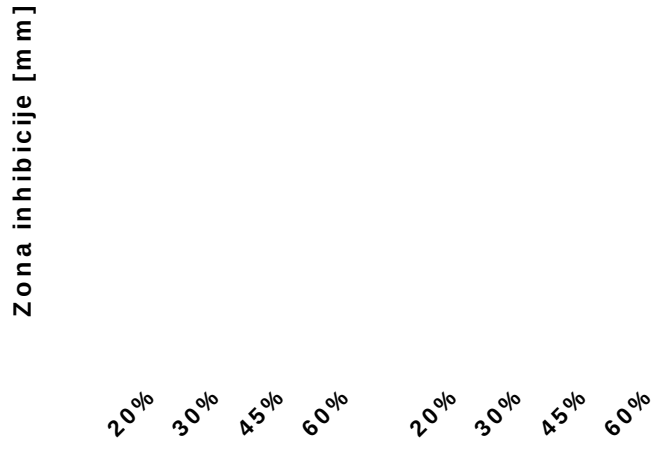
Slika 9 Antibakterijski učinak termički netretiranog meda kestena i lipe na bakteriju vrste *Salmonella enteritidis*



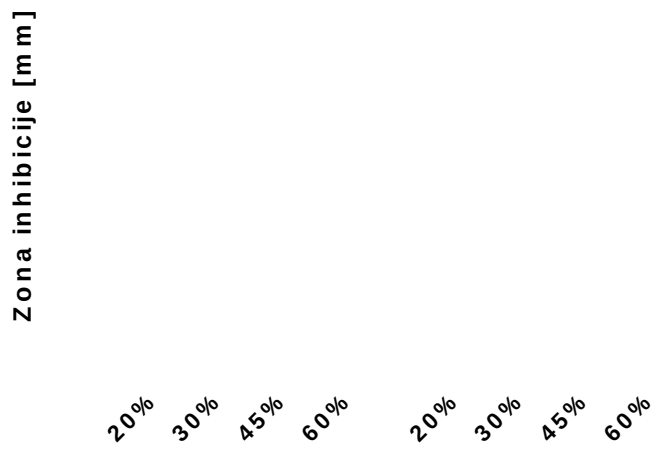
Slika 10 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 60 °C tijekom 30 minuta na bakteriju vrste *Salmonella enteritidis*



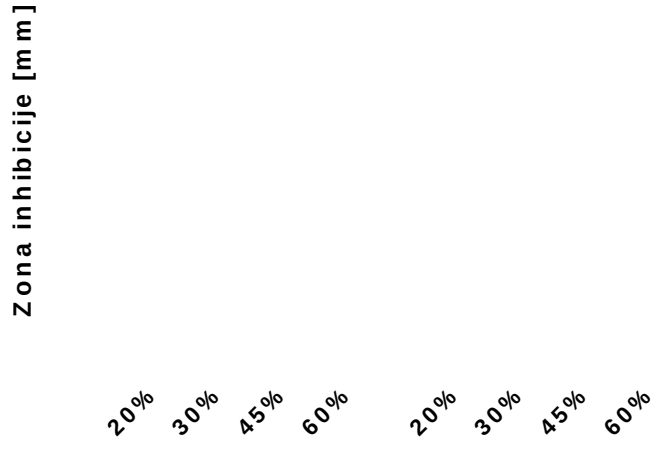
Slika 11 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 80 °C tijekom 10 minuta na bakteriju vrste *Salmonella enteritidis*



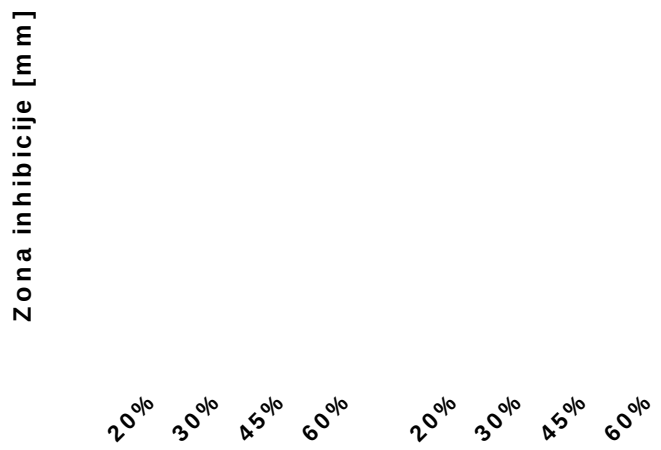
Slika 12 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 100 °C tijekom 5 minuta na bakteriju vrste *Salmonella enteritidis*



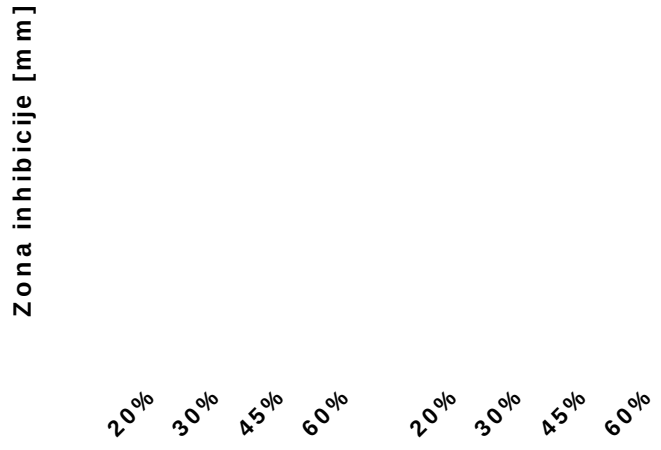
Slika 13 Antibakterijski učinak termički netretiranog meda kestena i lipe na bakteriju vrste *Salmonella infantis*



Slika 14 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 60 °C tijekom 30 minuta na bakteriju vrste *Salmonella infantis*

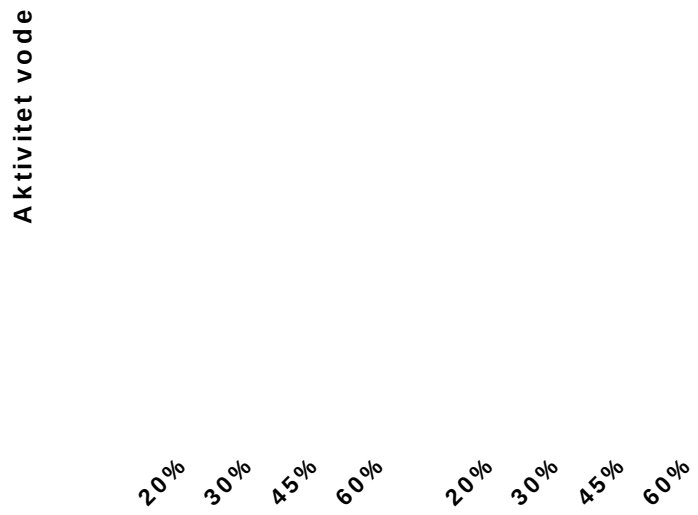


Slika 15 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 80 °C tijekom 10 minuta na bakteriju vrste *Salmonella infantis*

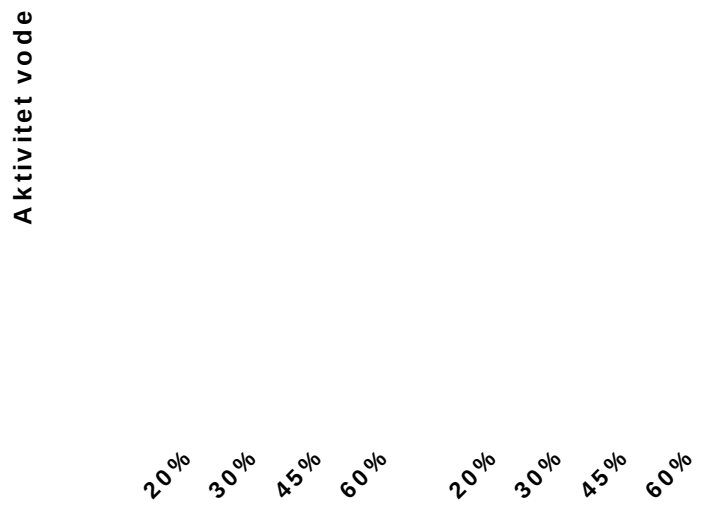


Slika 16 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 100 °C tijekom 5 minuta na bakteriju vrste *Salmonella infantis*

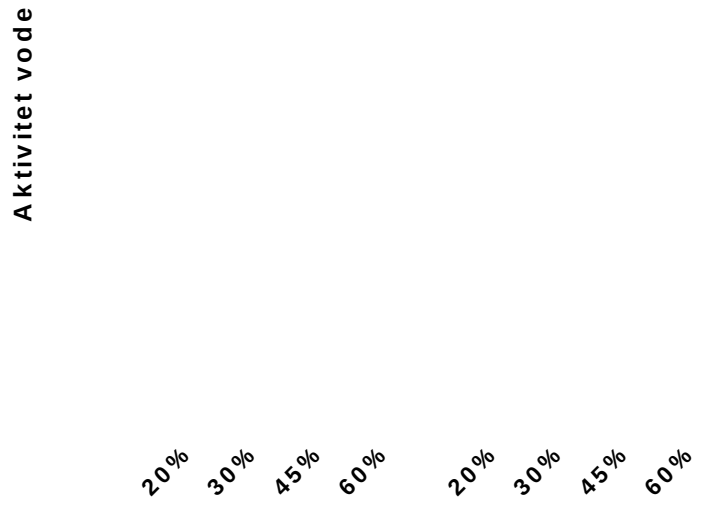
4.2. Aktivitet vode u uzorcima meda



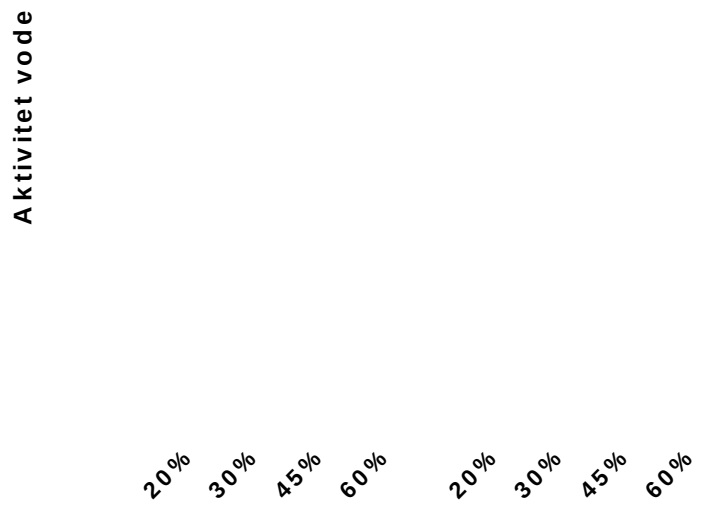
Slika 17 Aktivitet vode u nezagrijanom medu kestena i lipe



Slika 18 Aktivitet vode u medu kestena i lipe zagrijanom na 60 °C tijekom 30 minuta



Slika 19 Aktivitet vode u medu kestena i lipe zagrijanom na 80 °C tijekom 10 minuta



Slika 20 Aktivitet vode u medu kestena i lipe zagrijanom na 100 °C tijekom 5 minuta

5. Rasprava

Antibakterijski učinak meda kestena i lipe na gram negativnu bakteriju *Escherichia coli* prikazan je **Slikama 1 – 4**. Antibakterijski učinak na ovu bakterijsku vrstu termički netretiranog meda prikazan je **Slikom 1.** U svim rezultatima antibakterijskog učinka obje ispitane vrste meda na bakteriju *E. coli* može se uočiti djelomična zona inhibicije, što je različito u usporedbi s ostalim ispitanim bakterijskim vrstama. Djelomična zona inhibicije predstavlja zonu oko agarnih rupica ispunjenih analiziranim uzorcima u kojoj se nalaze porasle kolonije test mikroorganizma, dakle koncentracija uzorka koji je difundirao kroz agar nije dovoljna za potpunu inhibiciju ili izostanak rasta stanica (koje rastu u obliku kolonija koje čine podlogu jednolično zamućenom). Međutim, u usporedbi s ostalim dijelom hranjive podloge (agara) nacijepljenog test bakterijom, porast je manji, tj. moguće je uočiti i pojedinačne kolonije, što nije moguće vidjeti u zoni u kojoj nema difuzije analiziranog uzorka (jednolično je zamućena). To znači kako je određeni broj stanica inhibiran u rastu ili je uništen, dok su se ostale stanice prilagodile ovim nepovoljnim uvjetima te uspjele preživjeti i umnožiti se u vidljive kolonije koje zamućuju hranjivu podlogu. Zona djelomične inhibicije nije toliko jasno vidljiva, kako kada se radi o zoni potpune inhibicije rasta, gdje je lako uočiti oštar prijelaz iz područja bez rasta stanice, u područje gdje je koncentracija ispitivanog spoja toliko niska da se stanice umnožavaju bez poteškoća. Stoga je samo mjerenje zone djelomične inhibicije veći problem, uz veće subjektivne pogreške analitičara.

Iz rezultata prikazanih **Slikama 1 – 4** moguće je uočiti linearni porast inhibicijskog učinka otopina meda, pri čemu više koncentracije djeluju i više inhibitorno na bakteriju *E. coli.* Vrlo su male razlike između različitih koncentracija meda kestena, što se može pripisati i pogrešci tijekom mjerenja, jer je djelomičnu zonu inhibicije teže izmjeriti, budući nema oštrog ruba nakon kojeg stanice počinju rasti. Ipak, najveći iznos zone djelomične inhibicije je uočen u netretiranom medu (26 mm), dok je najniži (23 mm) primijećen u medu kestena tretiranom na 80°C/10 minuta. Za razliku od meda kestena, med lipe je u svim uvjetima (termički netretiranim te zagrijavanim) djelovao nešto više inhibitorno (zone inhibicije su uvijek veće za 2 do 3 mm), iako niti ovdje nije uočena potpuna inhibicija rasta stanica. Inhibitorni učinak linearno raste porastom koncentracije meda u pripremljenoj otopini, uz iznimke meda lipe tretiranom na 80 i 100°C (**Slike 3** i 4) gdje se inhibitorni učinak ove dvije koncentracije gotovo izjednačuje. Ovo je, vjerojatno, posljedica razgradnje sastojaka koji inhibiraju rast bakterija djelovanjem temperature od 100°C.

U ostalih bakterijskih vrsta (iako, kada se radi o bakterijama roda *Salmonella*, radi se o ispitanim podvrstama), uz iznimku bakterije *Yersinia enterocolitica*, utvrđena je potpuna inhibicija rasta, tj. u zoni difuzije meda nije porasla niti jedna stanica oblikujući okom vidljivu koloniju.

Inhibicija rasta *Salmonella agona* je prikazana **Slikama 5 – 8**. Ujednačeni rezultati zone inhibicije meda kestena se mogu uočiti iz priloženih rezultata, gdje se može uočiti veća osjetljivost ove bakterije, u usporedbi s bakterijom *E. coli* (najčešće 28 mm u usporedbi s 23 do 26 mm kod *E. coli*). Pojedini rezultati odskaču od linearnog odnosa, što se može uočiti iz **Slike 7** gdje se najveća koncentracija meda kestena (60 %) i najniža koncentracija meda lipe (20 %) značajno razlikuju, u usporedbi s ostalim rezultatima. Nije uočeno značajnije smanjenje inhibicije zagrijavanjem meda kestena. S druge strane, med lipe je, u gotovo svim uvjetima uzrokovao veću inhibiciju test bakterije, što se posebno može uočiti iz rezultata prikazanih **Slikom 5** gdje najveća koncentracija uzrokuje i najveću zonu inhibicije rasta (33 mm). Zagrijavanje meda lipe uzrokuje i smanjenje zone inhibicije s 33 na 23 mm pri 80°C. Ovaj učinak nije uočen pri višoj temperaturi (100°C/5 minuta) što (29 mm) što upućuje na prisutnost inhibitornih spojeva koji se razgrađuju dužim zagrijavanjem (dužim od 5 minuta).

Izostanak učinka zagrijavanja meda kestena (**Slike 9 – 12**) na bakteriju *S. enteritidis* se lako može primijetiti iz priloženih rezultata, budući se oni, neovisno o temperaturi i vremenu trajanja, razlikuju u 1 mm. Svakako je potrebno napomenuti kako je ispitivanje antibakterijskog učinka provedeno u paralelama, sa po 4 agarne rupice, tj. 8 rezultat po analiziranom uzorku meda, kako bi se izbjegla eksperimentalna pogreška. Linearni učinak porasta koncentracije meda se lako može uočiti iz priloženih rezultata, pri čemu najviša koncentracija uzrokuje i najveću zonu inhibicije rasta *S. enteritidis*. I u ovom slučaju, med lipe je uzrokovao i najveću inhibiciju rasta test bakterije, što je posebno uočljivo iz **Slika 9 – 11** gdje, pri najvećim koncentracijama med lipe inhibira za 5 ili više milimetara bakteriju *S. enteritidis*, u usporedbi s medom kestena.

Iako su, u ovom radu, ispitane 3 „vrste“, tj. soja salmonela, što znači kako su ove bakterije evolucijski vrlo bliske, ipak se mogu uočiti razlike u inhibitornom učinku meda. Rezultati inhibicije na *S. intantis* (**Slike 13 – 16**) sugeriraju kako je med kestena snažniji u uzrokovanju inhibitornog učinka, u usporedbi s medom lipe, što nije slučaj u niti jednoj analiziranoj bakterijskoj vrsti. Ovakav rezultat se posebno može uočiti u uzorcima termički netretiranog meda (**Slika 13**) i meda zagrijanog na 60°C (**Slika 14**), dok se zagrijavanjem na više temperature ovakav rezultat mijenja u korist meda lipe (**Slike 15** i **16**). Najveća odstupanja od linearnog učinka inhibicije su primijećena u medu kestena koncentracije 20 % zagrijanog na 60°C (**Slika 14**), te meda lipe zagrijanog na 80°C (**Slika 15**), dok se u ostalim uzorcima inhibicija odvija linearno. Zanimljivo je primijetiti kako su zone inhibicije bakterije jednake pri koncentracijama 45 i 60 % meda kestena zagrijanog na 60°C tijekom 30 minuta (**Slika 14**).

Zadnja bakterijska vrsta koja je upotrijebljena u ovom radu je vrsta *Yersinia enterocolitica*. Kao i ostale istražene bakterije, i ova vrsta pripada porodici *Enterobacteriaceae*, dakle, radi se o srodnim bakterijama. Međutim, za razliku od svih ostalih bakterija, na *Y. enterocolitica* nije uočen antibakterijski učinak meda, niti u jednoj ispitanoj koncentraciji, uključujući i najveću – 60 % bez obzira radi li se o medu kestena ili lipe. Rezultat upućuje na potencijalan problem ukoliko ova bakterija dospije, kao kontaminant, u namirnice niskog aktiviteta vode. U tim uvjetima (ako se radi o povećanom osmotskom tlaku, kao kod meda ili otopina šećera) stanice mogu preživjeti i umnožavati se u velikim brojevima te uzrokovati infekcije potrošača.

Antibakterijski učinak meda može se značajno razlikovati u različitih bakterijskih vrsta, čak i među srodnih bakterija, kao što je to u ovom slučaju s gram negativnim vrstama (posebno roda *Salmonella*). Zagrijavanje meda može negativno utjecati na neke hranjive sastojke meda ili vitamine koji su osjetljivi na primjenu više temperature. Zagrijavanje smanjuje zonu inhibicije rasta analiziranih bakterija, ali ne u značajnoj mjeri.

Aktivitet vode je važan parametar, koji, u velikoj mjeri, utječe na rast mikroorganizama. Istražene bakterijske vrste su tipični predstavnici gram negativnih bakterija i, stoga, relativno osjetljivi na povećani aktivitet vode. Aktivitet vode u uzrocima meda (nativnom i zagrijavanom) prikazan je **Slikama 17** – **20**. Aktivitet vode u nezagrijanom medu kestena i lipe (**Slika 17**) se kontinuirano smanjuje, što je logično, uslijed sve veće koncentracije šećera. Početni aktivitet vod uzoraka 20 % otopina meda je oko 1 i pada oštrije u medu lipe (do 0,97) u usporedbi s medom kestena (0,98) pri najvećim koncentracijama od 60 %. Zagrijavanje na 60 °C tijekom 30 minuta najizrazitije djeluje na med kestena (**Slika 18**), ali i na med lipe (osim najniže koncentracije od 20 %). Ovo smanjenje aktiviteta vode je izrazitije u usporedbi s uzrocima zagrijanim na 80 °C tijekom 10 minuta (**Slika 19**) gdje se može uočiti puno niži pad ove vrijednosti, u usporedbi sa zagrijavanjem pri 60 °C. Najsnažniji termički tretman od 100 °C tijekom 5 minuta smanjuje aktivitet otopina meda kestena 45 i 60 %, dok, istovremeno, povećava aktivitet vode svih (osim najveće koncentracije) koncentracija meda lipe (**Slika 20**). Vjerojatno je to posljedica interakcije sastojaka meda i vremena izlaganja višoj temperaturi.

6.Zaključci

Iz rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Med kestena i lipe uzrokuje djelomičnu inhibiciju bakterije *Escherichia coli.* Med lipe djeluje snažnije inhibitorno, u usporedbi s medom kestena, pri čemu zagrijavanje meda ne djeluje na zone inhibicije rasta.

2. Bakterija *Salmonella agona* je snažnije inhibirana medom lipe, pri čemu zagrijavanje utječe na smanjenje zone inhibicije rasta test bakterije. Obje vrste meda uzrokuju potpunu inhibiciju rasta oko zone difuzije meda.

3. Na bakteriju *Salmonella enteritidis* zagrijavanje obje vrste meda nema učinka na primjenu potpune zone inhibicije rasta. Med lipe, u svim primijenjenim koncentracijama, djeluje snažnije inhibitorno, u usporedbi s medom kestena.

4. Med kestena pri (netretiran i zagrijan na 60°C) djeluje snažnije inhibitorno na *Salmonella infantis*, u usporedbi s medom lipe, ali se ovaj učinak gubi zagrijavanjem pri višim temperaturama u korist meda lipe. Obje vrste meda uzrokuju potpunu inhibiciju rasta.

5. Na bakteriju vrste *Yersinia enterocolitica* obje vrste meda, bez obzira na termički tretman, nisu uzrokovale inhibiciju rasta.

6. Inhibicija medom ovisi o primijenjenoj koncentraciji meda. Veće koncentracije (45 i 60 %) uzrokuju veću inhibiciju istraženih bakterijskih vrsta.

7. Aktivitet vode otopina meda mijenja se zagrijavanjem. Pri višoj temperaturi zagrijavanja dolazi do većeg smanjenja aktiviteta vode.

7. Literatura

1. Baltrušaityte V, Rimantsa Venskutonis P, Čeksteryte V: Antibacterial activity of Honey and Beebread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis. Food Technology and Biotechnology* 45:201-208, 2007.

2. Bhunia AK: *Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis.* Springer, New York, 2008.

3. Bogdanov S: *Book of honey, Chapter 5: Honey Composition.* Bee Product Science, 2009. http://www.bee-hexagon.net/en/protected-sid-NUNvbXBvc2l0aW9uSG9uZXkucGRm.htm [15.7.2013.]

4. Bogdanov S: Functional and Biological Propertis oft he Bee Products: a Review. *Bee Products Science,* 2011. http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/BeeProductsFunctional.pdf [9.7.2013.]

5. Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, de Torres D, Pérez-Coello MS: Effect of geographical origin on the chemical and sensory characterostics of chestnut honeys. *Food Research International* 43:2335-2340, 2010.

6. Cooper RA, Molan PC, Harding KG: Antibacterial activity of honey against strains of *Staphilococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of medicine* 92:283-285, 1999.

7. Gillian M: Indetification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters* 155:1-10, 1997.

8. Gomes S, Dias LG, Moreira LL, Rodrigues P, Estevinho L: Physicochemical, microbiological and antimicrobal properties of comercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 48:544-548, 2010.

9. Halawani E i Shohayeb M: Survey of the antibacterial activity of Saudi and some international honeys. *Journal of Microbiology and Antimicrobials,* 3:94-101, 2011.

10. Hardi J: *Poznavanje sirovina animalnog porijekla*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2005.

11. Jeffrey AE, Echazarreta CM: Medical uses of honey. *Review of Biomedical Engineering* 7:43-49, 1996.

12. Jersinoza. http://stetoskop.info/Yersinia-enterolotica-1868-s2-sickness.htm [17.7.2013.]

13. Kačainova M, Melich M, Knazovicka V, Haščik P, Sudzinova J, Pavličova S, Čubon J: The indicator microorganisms value in relation to primary contamination of honey. *Zootehnie si Biotehnologii* 42:159-166, 2009.

14. Khalil MI, Sulaiman SA, Boukraa L: Antioxidant Property of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. *The Open Nutraceuticals Journal* 3:6-16, 2010.

15. Kolayali S, Aliyazicioğlu R, Ulusoy E, Karaoğlu S: Antioxidant and Antimicrobala Activities of Selected Turkich Honeys. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 36:163-172, 2008.

16. Küçük M, Kolayali S, Karaoğlu S, Ulusoy E, Baltaci S, Candan F: Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry* 100:526-534, 2007.

17. Lazarević KB, Andrić F, Trifković J, Tešić Ž, Milojković-Opsenica D: Characterization of Serbian unifloral honey according to their physicochemical parameters. *Food Chemistry* 132:2060-2064, 2012.

18. Lee H, Churey JJ, Worobo RW: Antimicrobal activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *International Journal of Food Microbiology* 126:240-244, 2008.

19. Mandal MD, Mandal S: Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 154-160, 2011.

20. Med: http://hr.wikipedia.org/wiki/med/ [12.7.2013.]

21. Medljikovac: http://www.pcelica.co.rs/proizvodi/med/vrste/medljikovac.php [9.7.2013]

22. Melliou E, Chinou I: Chemical constituents of selected unifloral Greek bee-honeys with antimicrobal activity. *Food Chemistry* 129:284-290, 2011.

23. Midura TF: Update:Infant Botulism. *Clinical Microbiology Reviews* 2:119-125, 1996.

24. Midura TF, Snowden S, Wood RM, Arnon SS: Isolation of *Clostridium botulinum* from Honey. *Journal of Clinical Mocrobiology* 2:282-283, 1979.

25. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda. Narodne novine 20, 2000. http://www.poslovni-savjetnik.com/node/16833 *[13.7.2013.]*

26. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Vodič o mikrobiološkim kriterijima za hranu.* 2011. http://www.mps.hr/default.aspx?id=6337 [13.6.2011.]

27. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: Pravilnik o medu. Narodne novine 93, 2009. http://www.mps.hr/default.aspx?id=6431 *[13.7.2013.]*

28. Miorin PL, Levy NC Jr, Custadio AR, Bretz WA, Marucci MC: Antibacterial activity of honey and *Tetragnostica angustula* against *Staplylococcus aureus. Journal of Applied Microbiology* 95:913-920, 2003.

29. Molan PC: The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency oft he antibacterial activity. *Bee World* 73:59-76, 1992.

30. Naef R, Jaquier A, Velluz A, Bachofen B: From the Linden Flower to Linden Honey – Volatile Constituents of Linden Nectar, the Extract of Bee-Stomach and Ripe Honey. U *Chemistry&Biodiversity*, str. 1870-1879. Verlag Helvetica Chimica Acta AG, Zürich, 2004.

31. Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni G, Cantalamessa F: Antioxidative and gastroprotective avtivities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. *Nutricion Research* 26.130-137, 2006.

32. Nedić Tiban N: Primjena diferencijalne motridbene kalorimetrije za utvrđivanje patvorenja meda. *Doktorska disertacija.* Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2005.

33. Odobašić S: Uporaba meda u pekarstvu. *Hrvatski pekar,* 86:28-31, 2006.

34. Olaitan PB, Adeleke OE, Ola IO: Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Scienece,* 7:159-165, 2007.

35. Perković D, Ramljak-Šešo M, Tambić T: *Enterobacteriacaea.* U *Medicinska bakteriologija i mikologija.* Prehrambeno tehnološki inžinjering, Zagreb, 1995.

36. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 74/08, 156/08, 89/10.

37. Rodek V: *Med-nektar bogova.* 2006. http://www.coolinarka.com/magazin/clanak/med-8211-nektar-bogova/ [15.7.2013.]

38. Savez udruženja pčelara Republike Srpske: http://www.suprs.info/2012/06/12/cuvanje meda/ [13.7.2013.]

39. Silici S, Sagdic O, Ekici L: Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobal activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chemistry* 121:238-243, 2010.

40. Snowdon JA, Cliver DO: Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31:1-26, 1996.

41. Sperber WH, Doyle MP: *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverage.* Springer, New York, 2009.

42. Udruga pčelara Pčelar. http://www.pcelar.hr/index.php?option=com_content&view=article&id=111:kristalizacija-meda&catid=35:zanimljivosti-oko.nas&Itemid=58 [17.7.2013.]

43. Ultrazvučna obrada meda. http://www.hielscher.com/hr/honey_01.htm [27.7.2013.]

44. Značaj meda u prehrani ljudi: http://www.coolinarka.com/namirnica/med [15.7.2013.]

45. White JW Jr.: Honey. U *Advences in food research.* Academic Press, Inc., Philadelphia, Pennsylvania, 1978.