

Antimikrobni učinak meda kestena i lipe na odabrane gram pozitivne bakterijske vrste

Oreški, Mario

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:109:135033>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



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

Mario Oreški

**ANTIMIKROBNI UČINAK MEDA KESTENA I LIPE NA ODABRANE GRAM
POZITIVNE BAKTERIJSKE VRSTE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, siječanj 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. 2013. godine
Mentor: izv. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović
Pomoć pri izradi: Vedran Gradvol, dipl. ing.

Antimikrobni učinak meda kestena i lipe na odabrane gram pozitivne bakterijske vrste
Mario Oreški, 2575/04

Sažetak: U radu je ispitan antibakterijski učinak meda kestena i lipe na odabrane gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus faecalis*. Istražen je anibakterijski učinak otopina meda koncentracija 20, 30, 45 i 60 %. Pripremljene otopine meda su zagrijane na 60 °C 30 minuta, 80 °C 10 minuta i 100 °C 5 minuta te im je određen antibakterijski učinak i izmjeren aktivitet vode. Najosjetljivija bakterijska vrsta je *Staphylococcus*, potom slijede *Listeria monocytogenes* i, najotporniji *Enterococcus faecalis*. Zagrijavanje otopina kestenovog meda ne utječe na njegov antibakterijski potencijal, dok se isti učinak meda lipe smanjuje. Inhibicija otopinama meda ovisi o primijenjenoj koncentraciji meda, što je veća koncentracija zone inhibicije su veće. Aktivitet otopina meda mijenja se zagrijavanjem. Više temperature uzrokuju veće smanjenje aktiviteta vode.

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

Rad sadrži: 54 stranice
16 slika
2 tablica
0 priloga
51 literaturnu referencu

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: 31. siječnja 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 November 23rd, 2013.
Mentor: Hrvoje Pavlović, PhD, associate prof.
Technical assistance: Vedran Gradvol, MSc, assistant

Antimicrobial effect of chestnut and linden honey on selected Gram positive bacteria
Mario Oreški, 2575/04

Summary: Antibacterial effect of chestnut and linden honey on selected Gram positive bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* was determined. Antibacterial effect of 20, 30, 45 and 60 % of honey solutions was tested. Honey solutions were heated at 60 °C 30 minutes, 80 °C 10 minutes and 100 °C 5 minutes and antibacterial effect, as well as water activity were measured. The most susceptible bacteria to inhibition by honey solutions was *Staphylococcus aureus*, followed by *Listeria monocytogenes* and, the most resistant, *Enterococcus faecalis*. Heating of chestnut honey has no effect on its antibacterial potential, while in linden honey this effect was reduced by heating. Inhibitory effect of honey solutions is dependent on its concentration; higher concentration produces higher inhibition of tested bacteria. Water activity of honey solutions is changed by heating. Higher temperature reduces the water activity value.

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

Thesis contains: 54 pages
16 figures
2 tables
0 supplements
51 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: January 31st 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.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Uporaba meda kroz povijest.....	4
2.2. Stvaranje meda	5
2.3. Kemijski sastav meda.....	6
2.3.1. Šećeri	6
2.3.2. Voda	7
2.3.3. Enzimi u medu	7
2.3.4. Kiseline	8
2.3.5. Mineralne tvari.....	8
2.3.6. Bjelančevine i aminokiseline	9
2.3.7. Vitamini	9
2.4. Svojstva meda	9
2.4.1. Kristalizacija meda	9
2.4.2. Fermentacija meda	10
2.4.3. Higroskopičnost meda i njegova specifična težina	11
2.4.4. Viskoznost meda.....	11
2.4.5. Organoleptička svojstva meda.....	12
2.5. Klasifikacija meda	13
2.5.1. Klasifikacija prema podrijetlu	13
2.5.1.1. Med kestena.....	14
2.5.1.2. Med lipe	15
2.5.2. Klasifikacija prema načinu proizvodnje	15
2.6. Čuvanje meda.....	16
2.7. Patvorenje meda	17

2.8. Opasnosti i izvori mikroorganizama u medu.....	18
2.9. Svojstva odabranih gram–pozitivnih bakterija.....	20
2.9.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.9.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	21
2.9.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	21
2.10. Antimikrobni učinak meda	22
2.10.1. Vodikov peroksid	23
2.10.2. Osmotski učinak.....	23
2.10.3. Kiselost meda	24
2.11. Antioksidacijska svojstva meda	24
2.12. Značaj meda u medicini i prehrani ljudi.....	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO	28
3.1. Zadatak	29
3.2. Materijali i metode	29
3.2.1.Kulture mikroorganizama.....	29
3.2.2. Priprema uzoraka meda	29
3.2.3. Određivanje antibakterijskog učinka uzoraka meda.....	30
3.3. Određivanje aktiviteta vode u uzrocima meda	30
3.4. Obrada rezultata	31
4. REZULTATI.....	32
4.1. Antibakterijski učinak meda	33
4.2. Aktivitet vode u uzorcima meda	39
5. RASPRAVA	43
6. ZAKLJUČCI	488
7. LITERATURA	50

1. Uvod

Med je trajan i gotovo nepokvarljiv prirodni proizvod medonosnih pčela. Višestoljetna iskustva narodne medicine o dragocjenim svojstvima meda i drugih pčelinjih proizvoda potvrđuju i mnogobrojna istraživanja suvremene znanosti. Priroda nam u medu daje jedan od svojih najdragocjenijih darova bogat sastojcima nužnim za normalan razvoj i funkcioniranje našeg organizma. Zahvaljujući svome iznimnom sastavu, med se od davnina smatrao svetom hranom i jednim od najvažnijih prirodnih lijekova za liječenje širokog spektra tegoba. Povijest upotrebe meda stara je koliko i povijest čovjeka te se u gotovo svakoj kulturi mogu pronaći dokazi o njegovom korištenju (Laktić i Šekulja, 2008.).

Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (NN 93, 2009.) med je definiran kao sladak, gust, viskozni, tekući ili kristaliziran proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele sakupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.

Iako med posjeduje karakteristična svojstva koja sprječavaju rast ili uništavaju većinu mikroorganizama, kao rezultat nepravilnog skladištenja ili preživljavanja spora patogenih bakterija otpornih na okolinu s visokom koncentracijom šećera, med može predstavljati i izvor opasnosti.

U ovom radu, ispitan je antibakterijski učinak kestenovog i lipovog meda na gram-pozitivne bakterije.

2. Teorijski dio

2.1. Uporaba meda kroz povijest

Uz sva razdoblja koja su pratila med i upotrebu meda kroz vrijeme, pčela kao njegov jedini proizvođač pratila je evoluciju čovjeka od najranijih vremena. Neki antropološki nalazi ukazuju na mogućnost da se med u prehrani počeo koristiti već prije 30 000 godina i to u plemenskim zajednicama na području današnje Ukrajine. Ipak, čvrsti dokazi su nešto novijeg datuma - oko 7 000 godina prije naše ere. Tadašnji ljudi sigurno su koristili med u prehrani. Do njega su dolazili uzimajući ga pčelama u prirodi, a tu aktivnost zabilježili su u spilji Cueva de la Arna pokraj španjolskog grada Valencije (Crane, 1983.).

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 (<http://www.coolinarika.com>, 2006.).

U Grčkoj je pčelarstvo bilo veoma razvijeno, a znanstveno pčelarstvo datira iz vremena Hipokrata i Aristotela. U svojim mnogobrojnim pisanim djelima, promatrajući život pčele, oni su iznijeli niz teorija o uzgoju pčela i ljekovitim svojstvima meda.

Dok su grčki pisci bili filozofi koje je malo ili nimalo zanimala praktična strana pčelarstva i sam uzgoj meda, Rimljani su bili praktičari. Pčelarstvo je tamo predstavljalo važan dio gospodarstva i u gospodarskim priručnicima posvećeno je toj djelatnosti puno prostora. U Rimu je proizvodnja meda donosila znatan profit pa je pčelarstvo bilo toliko rašireno da nije postojao posjed koji nije imao barem jedan pčelinjak. 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.

Povijest svjedoči kako se med od pamtivijeka koristio za dobivanje energije, snage, uklanjanje tegoba i očuvanje ljepote. Upotreba te visokovrijedne namirnice u svakodnevnoj prehrani ipak se bitno smanjila negdje od polovice 19. stoljeća. Masovna proizvodnja jeftinijeg sladila-šećera, istisnula je med iz svakodnevnih jelovnika. I danas se prilikom konzumiranja šećera i ostalih zamjenskih sladila, nažalost, zaboravlja na visokovrijedne nutritivne prednosti meda koje su nezamjenjive (Bauer i sur., 1999.; White, 1978.).

2.2. Stvaranje meda

Osnovna sirovina za proizvodnju meda je nektar kojega proizvode razne biljke pomoću žlijezda nektarija, na svojim cvjetovima ili izvan njih. Po kemijskom sastavu nektar je slatkasta mirisna tekućina koja sadrži 50-75% vode, šećere (saharoza, glukoza i fruktoza), mineralne tvari, bjelančevine, eterična ulja, vitamine itd. O vrsti biljke, klimatskim i drugim uvjetima ovisi odnos pojedinih šećera u nektaru. Specifična težina meda se kreće od 1,02 do 1,35, dok je pH vrijednost između 2,7 i 6,4. Pčelama najviše odgovara nektar koji posjeduje 50% šećera. Pčele radije sakupljaju nektar koji se sastoji od smjese, a ne samo od jednog šećera. Optimalna je temperatura za izlučivanje nektara između 10 i 30 °C, a vlažnost zraka najbolja je između 60 i 80%. Pretvaranje nektara u med je složen fiziološki, kemijski i fizikalni proces. U njemu sudjeluju sve radilice pčelinje zajednice.

Osim nektara, pčele skupljaju i slatke tvari s površine lišća i iglica. Te slatke tvari zovu se medljika. Medljiku neke biljne uši (rodovi *Aphidae* i *Lachnidae*) izbacuju iz svoga tijela kao višak hrane hraneći se sokovima biljke. Specifična težina mu je 1,0-1,3, dok je pH 5,1-7,9. Količina ugljikohidrata je velika i čine 90-95% suhe tvari. U medljici se nalazi niz šećera kao što su: saharoza, glukoza, fruktoza, maltoza, melicitoza, manosa i dr. Pčele ližu medljiku i prenose je u košnicu na daljnju obradu. Hoće li pčele skupljati medljiku, zavisi o nedostatku nektara u njihovom području letenja, količini medljike u prirodi, njenom kemijskom sastavu, atmosferskim uvjetima, jačini pčelinje zajednice, itd. (Laktić i Šekulja, 2008.).

Pčele usisavaju nektar i medljiku u medni mjehur i donose ga u košnicu. Obje šećerne tvari sadrže mnogo vode i nisu pogodne za skladištenje u stanicama saća. Stijenka mednog mjehura nije propusna za vodu. Iz tog razloga pčela ventilacijom uklanja suvišnu vodu prenošenjem nektara i medljike iz stanice u stanicu, a zatim pomoću enzima iz svojega tijela (invertaza) pretvara saharozu u glukozu i fruktozu. Posljedica ovih procesa je veća koncentracija šećera koja sprječava razvoj nekih mikroorganizama, a isto tako sprječava fermentacijske procese kod skladištenja meda. Nakon dozrijevanja, med ne bi smio sadržavati više od 20% vode. Pčele ga, zatim, u saću prevuku s voštanim poklopcem da bi ga što bolje sačuvale. Neposredno prije zatvaranja saća voštanim poklopcem, u svako saće pčela ubrizga mravlju

kiselinu iz žlijezdi ekstremiteta. Naime, mravlja kiselina služi kao dezinficijens. Iz tako spremljenog meda, nakon otvaranja poklopca i stavljanja saća u centrifuge dobiva se tekući med (Olaitan i sur., 2007.).

2.3. Kemijski sastav meda

U kemijskom pogledu med predstavlja složenu smjesu raznih djelotvornih tvari koje se u ljudskom organizmu vrlo dobro i brzo probavljaju te se gotovo u potpunosti i iskorištavaju. Unatoč velikom napretku znanosti i brojnim istraživanjima, med se ne može proizvesti industrijskim putem. Dakle, med je u potpunosti zadržao svojstva prave prirodne namirnice. Pri tome je značajno napomenuti kako se različiti toksini koji zagađuju naše namirnice (pesticidi, teški metali i sl.) kao posljedica razvoja poljoprivrede, industrije i automobilizma još uvijek u medu nalaze u količinama koje se praktično mogu zanemariti što medu daje izvanrednu vrijednost kao namirnice (Bauer i sur., 1999.).

2.3.1. Šećeri

Zreli med ostaje dulje vrijeme u tekućem stanju. To stanje ovisi o podrijetlu nektara te o količini vode, glukoze i fruktoze u njemu. Med koji sadrži više glukoze i ima krupne kristale kristalizira brže od onog koji sadrži više fruktoze i manje kristale. Med je koncentrirana otopina voćnog šećera – fruktoze (oko 38,2%), groždanog šećera – glukoze (oko 30,3%) i saharoze (1,3%). Med s više glukoze posjeduje veću specifičnu težinu od šećera s više fruktoze. Oko 90% sadržaja meda čine šećeri od kojih je najviše monosaharida. Ovisno o biljci od koje potječe med u njemu se mogu naći disaharidi i oligosaharidi. Sadržaj pojedinačnih šećera u medu mijenja se prilikom zrenja meda i tijekom skladištenja (White, 1978.).

2.3.2. Voda

Odmah iza ugljikohidrata, druga po količini, kao sastavni dio meda, nalazi se voda koja izravno utječe na kvalitetu meda, njegovu granulaciju i održivost. Količina vode u medu kreće se od 15 do 20%. Kontrola količine vode u medu je veoma važna jer veći postotak vode u medu može izazvati njegovo vrenje i učiniti ga neupotrebljivim u prehrani. Količina vode u medu ovisi o vremenu skupljanja meda, vrcanju, klimatskim uvjetima, jačini pčelinje zajednice, vlažnosti i temperaturi u košnici. Med je higroskopan pa se količina vode u njemu može mijenjati, što ovisi o vlazi zraka i načinu čuvanja. Fruktaza jače veže vodu nego što ju vežu glukoza i saharoza, pa prema tome možemo zaključiti kako je sposobnost fruktoze da veže vodu glavni uzročnik higroskopičnosti meda (Laktić i Šekulja, 2008.).

2.3.3. Enzimi u medu

Enzimi su jedni od najvažnijih tvari u medu jer imaju važnu ulogu pri stvaranju meda iz raznih vrsta nektara. To su tvari bjelanjčevinaste prirode koje ubrzavaju kemijske reakcije u živom organizmu i u biološkom materijalu. Med najčešće sadrži enzime invertazu, diastazu (amilazu), katalazu, kiselu fosfatazu i dr. (Bauer i sur., 1999.).

Invertaza u medu potječe iz nektara, a dijelom i od pčele. Pčelinje žlijezde izlučuju mnogo sline s velikim količinama invertaze. Ovaj enzim hidrolizira saharozu na glukozu i fruktozu, a razlaže i neke druge disaharide i trisaharide. Ako je paša jako obilna i ako je invertaza zbog toga prekratko vrijeme djelovala, hidroliza saharoze neće biti učinkovita. Optimalni uvjeti za djelovanje ovog enzima su pH 6,0 – 6,2 i temperatura 25-30 °C. Aktivnost invertaze izražava se u gramima saharoze koju za jedan sat razlaže invertaza sadržana u 100 grama meda (invertazni broj).

Dijastaza, koja se naziva još i amilaza, ima veliko značenje za kontrolu kvalitete meda. Kvalitetan med mora imati pokazatelj diastaze 8 jedinica po Gotheu. Dijastazni broj po Gotheu je jedan od glavnih pokazatelja prilikom kontrole kvalitete i prirodnosti meda. Kao mjera aktivnosti diastaze uzima se količina 1%-tne otopine škroba (cm³) koju za jedan sat razgradi

dijastaza sadržana u jednom gramu meda pri 40 °C. Aktivnost očitane dijastaze ne smije biti niža od 8. Dijastaza u medu osjetljiva je na njegovo zagrijavanje. Ona propada ako je temperatura zagrijavanja previsoka ili ako se med dugotrajno čuva u lošim temperaturnim uvjetima (Olaitan i sur., 2007.).

2.3.4. Kiseline

Med sadržava niz kiselina kao npr.: mravlju, oksalnu, limunsku, vinsku, mliječnu, jabučnu i dr. One i još neke druge kiseline potječu iz nektara, medljike i iz žlijezda pčela koje ih prerađuju. pH meda je između 2,7 i 6,4 i može se mijenjati. Na kiselost meda djeluje niz faktora kao što su vrsta biljaka od kojih potječu, dužina čuvanja, fermentacija meda i dr. Vrste meda tamnije boje su i kiselije, pa je tako med medljikovac nižeg pH od meda koji potječe od nektara. Ako med ima više soli natrija, kalija i kalcija, imat će i višu pH vrijednost. Iako je prisutnost kiselina u medu većinom pozitivno svojstvo jer pridonosi punoći njegova okusa, u medu je moguće naći i nepoželjne kiseline koje nastaju nakon fermentacije, odnosno nakon kvarenja meda (Katalinić i sur., 1968.).

2.3.5. Mineralne tvari

Za med je propisano da ne smije sadržavati više od 0,6% mineralnih tvari, osim kod medljikovca koji ih smije sadržavati do 1,2% (NN 93, 2009.). Dakle, u nektarnom medu ih ima manje nego u medljikovcu. To su najčešće kalij, kalcij, bakar, mangan, fosfor, željezo i silicij. Količina mineralnih tvari u medu ovisi o izvoru i obimu paše. One potječu iz tla i preko biljke dolaze u nektar. Onečišćen med prigodom vrcanja ili kondicioniranja može sadržavati veće količine mineralnih tvari od 0,6% (Belčić i sur., 1990.).

2.3.6. Bjelančevine i aminokiseline

Izvor bjelančevina u medu može biti nektar, ali i same pčele. Mnogi istraživači smatraju kako glavne količine bjelančevina u med dolaze iz žlijezda pčela prilikom prerade nektara u med i prilikom prerade medljike. Količina bjelančevina u medu kreće se od 0 do 1,67%. Medljikovac sadrži više bjelančevina od meda iz nektara. Obično su tamnije one vrste meda koje sadrže više bjelančevina i aminokiselina. Budući nektarne vrste meda sadržavaju manje količine nekih aminokiselina od medljikovca, prilikom kontrole kakvoće meda moguće je, prema količini nekih aminokiselina, prepoznati da li se radi o nektarnom medu ili o medljikovcu. Neke aminokiseline sudjeluju u stvaranju određene arome meda (Katalinić i sur., 1968.).

2.3.7. Vitamini

Izvori vitamina u medu su pelud i nektar. Ako se filtriranjem uklanja pelud, količina vitamina opada. Iako med sadrži neke vitamine, kao namirnicu ga ne bi mogli smatrati većim izvorom vitamina za potrebe čovjeka. Sadrži relativno veliku količinu vitamina B-grupe, provitamina A, K-vitamina te vitamina E. U izvornom medu-saću može se naći i mala količina vitamina C, koji se tokom daljnje manipulacije gubi u medu. Zbog toga je med u saću i vrijedan.

Osim navedenih spojeva, med sadrži još mnoštvo različitih tvari značajnih za naš organizam. Samo neki od njih su spojevi poput raznih enzima, hormona, pigmenata, voska, viših alkohola, inulina, dekstrina, raznih derivata klorofila, itd. (Olaitan i sur., 2007.).

2.4. Svojstva meda

2.4.1. Kristalizacija meda

Kristalizacija je svojstvo meda da prelazi iz tekućeg u kruto stanje pri čemu med ne gubi na svojoj kvaliteti. Do te pojave dolazi zbog toga što glukoza u medu pri određenoj temperaturi ne ostaje u viskoznom stanju, već dolazi do stvaranja kristala. Sklonost meda da kristalizira ovisi o stupnju koncentracije šećera u medu (omjer glukoza/fruktoza), odnosu glukoza/voda, udjelu

vode te temperaturi čuvanja. Najpovoljnija temperatura za kristalizaciju je 10-20 °C, a pri temperaturama iznad 27 °C i ispod 10 °C se rijetko događa. Ako med sadrži više fruktoze i vode, kristalizacija je sporija te može trajati i do nekoliko mjeseci. Pri tome nastaju veći kristali pravilnijeg oblika. Obrnut postupak prevođenja meda iz krutog u tekuće stanje pri povišenoj temperaturi, naziva se dekristalizacija. Temperatura zagrijanog meda ne smije biti viša od 40 °C jer u protivnom dolazi do njegove denaturacije. Med pretjeranim zagrijavanjem gubi neka poželjna svojstva kao što su: smanjenje enzimatske aktivnosti zbog termičke denaturacije enzima te gubitka hlapljivih komponenata (Belčić i sur., 1990.).

2.4.2. Fermentacija meda

Što je sadržaj vode u medu veći, to je mogućnost kristalizacije manja. Gušći med je zasićeniji glukozom od rjeđeg i zato skloniji kristalizaciji. U slučaju vrenja ili fermentacije vrijedi upravo suprotno pravilo – što je med rjeđi to je skloniji vrenju. Glavni izvor kvasaca u medu su nektar, tlo, pčele i zrak. Ako su uvjeti u medu povoljni za razmnožavanje kvašćevih gljivica, produkti njihova djelovanja su alkohol i ugljični dioksid. Alkohol, dalje, uz prisutnost kisika oksidira u octenu kiselinu i vodu. Med tada dobiva gorak okus i pjeni se. Na fermentaciju djeluje niz faktora, a glavni od njih su temperatura skladištenja meda i relativna vlaga zraka u skladištu. Optimalna temperatura za razvoj kvasaca je između 13 i 21 °C. Pri temperaturi od 11 °C fermentacija je onemogućena. Zbog toga je poželjno skladištenje meda na temperaturi od 8 do 10 °C. Kristalizirani med koji ima više vode skloniji je fermentaciji od meda koji je u tekućem stanju. Naime, glukoza prilikom kristalizacije ne veže svu vodu iz meda te višak slobodne vode omogućava razvoj kvasaca. Velika koncentracija vode u medu najpogodnija je za fermentaciju meda. Med u skladištima mora biti dobro zatvoren kako ne bi vezao vlagu. Ako je relativna vlaga u skladištu meda pri 66%, neće utjecati na povećanje vlage meda. No, ako je med skladišten pri relativnoj vlazi zraka 86%, za dvadesetak dana može dosegnuti sadržaj vode od 29% što je dovoljno za razvoj kvasaca (Bauer i sur., 1999.; Katalinić i sur., 1968.).

2.4.3. Higroskopičnost meda i njegova specijalna težina

Higroskopičnost je svojstvo nekih tvari da upijaju vlagu iz zraka. Fruktaza veže vodu jače nego što ju vežu glukoza ili saharoza, pa možemo reći da je sposobnost fruktoze da veže vodu glavni uzročnik higroskopičnosti meda. Pri 20 °C med privlači vlagu ako je relativna vlaga zraka iznad 60%. Higroskopičnost je i dobro i loše svojstvo. Dobro je za neke prerađivačke svrhe: kruh i kolači s medom postaju meki, u preradi duhana, žvakaćih guma i drugih proizvoda med čuva vlagu i ne dopušta neželjeno sušenje proizvoda. S druge strane, zbog nestabilne i nejednake vlažnosti med čini poteškoće u preradi jer mase i omjeri određeni u receptima postaju netočni.

Postotak vlage u medu u najužoj je vezi s težinom meda i o tom postotku ovisi tzv. specifična težina meda. Specifična težina neke tvari jest odnos njezine mase prema masi vode istog volumena. Med je gušći od vode, pa mu se specifična težina kreće od 1,420 do 1,440. Što je med rjeđi, litra meda je manje mase. Što je postotak vlage u zraku veći, specifična težina meda je manja.

Za mjerenje postotka vode u medu služe refraktometar i hidrometar. Refraktometar radi na principu loma svjetlosti kad prolazi kroz tekućinu (otopinu ili med). Otklon svjetlosti pokazuje postotak suhe tvari u medu. Hidrometar je uređaj sa staklenom cjevčicom i skalom. Što dublje uranja u med, to je med rjeđi, a samim time i postotak vode veći. Na skali cjevčice očitava se količina vode u medu (Katalinić i sur., 1968.).

2.4.4. Viskoznost meda

Viskoznost je unutarnje trenje između pojedinih slojeva tekućine. Med koji je gust i sporo teče visokog je viskoziteta. Viskozitet meda ovisi o temperaturi, postotku vode, omjeru groždanog prema voćnom šećeru, te o udjelu dekstrina i guma u medu. Med s većim postotkom vode ili s višom temperaturom postaje rjeđi i lakše teče; to je med niskog viskoziteta. Med se lakše miješa i cijedi kada je niskog viskoziteta, i stoga se prije miješanja i cijedenja zagrije. Groždani šećer je gušći i viskozniji od voćnog. Viskozitet meda postaje veći ako u njemu ima

dekstrina, guma i sličnih tvari. Zato je medljikovac, koji sadrži dekstrina i u kojemu je udio groždanog šećera veći od voćnog, viskozniji od cvjetnog meda (Belčić i sur., 1990.).

2.4.5. Organoleptičke osobine meda

Najvažnija organoleptička svojstva meda su boja, okus i miris. Ta svojstva ovise o biljnom podrijetlu meda, ali i o uvjetima prerade i čuvanja. Boja meda može biti gotovo bezbojna pa do tamnosmeđe. Boja ovisi i o količini bjelančevina, aminokiselina i drugih tvari koje sadrže dušik. Što je više tih tvari u medu, on je tamnije boje. Ako med karamelizira zbog previsoke temperature grijanja, postaje tamniji. Med može dobiti boju i od nekvalitetne ambalaže u kojoj se pohranjuje. Boja meda usko je povezana s njegovim okusom i aromom. Svjetlije vrste meda obično su blažeg okusa i blaže arome, a tamnije vrste oštrijeg su okusa i jače arome. Od naših vrsta meda najpoznatije svijetle vrste su: bagrem, djetelina, lipa, vrbolika i malina. Tamnije su vrste: livadni med, zlatošipka, metvica, vrijesak i mnoge druge. Boja meda određuje se kolorimetrijski.

Miris meda vezan je uz biljku od koje potječe. Tako kestenov, lipov i lavandin med posjeduju veoma jak miris. Mirisne tvari meda su: aldehidi, ketoni, esteri, alkoholi itd., i u medu koji se duže čuva ishlape. Isto tako ishlape ako se med grije na visokoj temperaturi. Gubitak mirisa meda može nam poslužiti kod ocjene njegove kvalitete. Za takav med možemo reći da je star ili je grijan na visokoj temperaturi.

Iako se kod nekih vrsta meda može osjetiti i gorkast okus (npr. kesten i neki medljikovci), u medu prevladava okus po slatkome. Sladak je, prije svega, zbog velike količine fruktoze u njemu koja je 2,5 puta slađa od glukoze i 1,5 puta od saharoze. Ovisno o omjeru tih šećera koje sadrže, nisu sve vrste meda jednako slatke. Uz još neke tvari koje djeluju na osjećaj slatkoće tu spadaju i tvari koje u svojoj molekuli imaju više alkoholnih –OH skupina (Olaitan i sur., 2007.).

2.5. Klasifikacija meda

Med nije industrijski proizvod nego prirodan izvor ugljikohidrata, i stoga je raznovrsnost jedno od njegovih glavnih svojstava. Prema Pravilniku o medu, med se klasificira uglavnom na dva načina: prema podrijetlu te prema načinu proizvodnje (NN 93, 2009.).

2.5.1. Klasifikacija prema podrijetlu

Prema podrijetlu, med se može podijeliti na cvjetni ili nektarni med i na medljikovac. Cvjetni med potječe od nektara iz cvjetova raznih biljaka, a u manjem dijelu iz tzv. izvancvjetnih nektarija, tj. iz pazušaca stabljike nekih biljki (npr. grahorice). Ovisno o biljci od koje potječe, cvjetni med se dijeli na mnogo vrsta. Ako se, po svom sastavu, sastoji pretežno od jedne vrste biljaka, tada ga nazivamo monoflorni med. Neki od primjera takvog meda su: bagremov, lipov, suncokretov, kestenov, lavandin, itd. Monoflorni med mora imati u netopljivom sedimentu najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste, ako to Pravilnikom nije drukčije određeno. Činjenica je da se monoflorni med ne sastoji od nektara jedne biljke, jer, u isto vrijeme, cvjeta više biljaka i dio meda tih biljaka pomiješan je s medom koji pretežno na tom području skupljaju pčele. Analizom peludi u monoflornom medu, kao i po nekim drugim svojstvima, može se ustanoviti o kojem se monoflornom medu radi te koja je pelud drugih biljaka (Chinou i Melliou, 2011.).

Med koji se sastoji od više vrsta nektara, dakle od više vrsta medonosnog bilja, jest polifloran. Primjer poliflornog meda jest livadni med. Metodom izrade preparata peludne analize može se odrediti sortnost meda te njegovo botaničko i geografsko podrijetlo. Uz organoleptičke i kemijske analize, peludna analiza je jedini kriterij za identifikaciju meda. Botaničko podrijetlo meda određuje se na temelju identifikacije i bojenja peludnih zrna nektarskog bilja. Prema organoleptičkim svojstvima, moguće je prepoznati botaničko podrijetlo meda. Geografsko podrijetlo određuje se količinom peludnih zrna pratećeg bilja čije se doba cvatnje podudara s cvatnjom nektarskog bilja. Količina peludnih zrna u medu ovisi o više faktora. Tako prašnici kestena daju veoma puno cvjetnog praha, odnosno, peludi, dok npr. ružmarin i lavanda ga daju veoma malo. Ako se poznaju vremena cvjetanja i medenja i

geografske rasprostranjenosti medonosnog i ostalog pratećeg bilja, moguće je sa sigurnošću odrediti radi li se o monoflornom ili poliflornom medu (Laktić i Šekulja, 2008.; Chinou i Melliou, 2011.).

Medljikovac je med dobiven uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka, što je njegova osnovna razlika od ostalih vrsta medova koji se dobivaju od nektara. Najcjenjeniji je med od crnogorične medljike (jelove i smrekove). Medna rosa ili medljika slatki je sok koji se pod određenim vremenskim uvjetima pojavljuje na jeli uslijed djelovanja zelene jelove uši koja buši slojeve iglica i dopire do sokova koji se nalaze u njihovoj unutrašnjosti, iskorištava ih, a mednu rosu izbacuje iz svojeg organizma. Pčele skupljaju mednu rosu i prerađuju ju u med. Osim što se razlikuje od drugih medova po tome što nije iz nektara, medljikovac posjeduje i mnogo kraće vrijeme kristaliziranja jer sadrži više minerala i glukoze (Belčić i sur., 1990.).

2.5.1.1. Med kestena

Kestenov med (*Castanea sativa L.*) se razlikuje od svih drugih vrsta meda. Njegova karakteristična tamno-crvenkasta boja i intenzivan okus koji je često i gorkast, čine ga lako prepoznatljivim. Proizvodnja kestenovog meda je vrlo zahtjevna zbog ograničenog područja paše pčela (šume kestena nisu toliko zastupljene kao druge kulture) te zbog vremenskih uvjeta u lipnju i srpnju (visoke temperature). Stoga je kestenov med potrebno vrcati što prije. Vrlo teško kristalizira, usprkos višem postotku peludi. Da bi med imao oznaku vrhunskog kestenovog meda, treba sadržavati najmanje 85% peludnih zrnaca kestena, što je puno više od prosjeka ostalih vrsti meda. 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.).

2.5.1.2. Med lipe

Lipov med (*Tilia platyphyllos*) je bistar, gotovo proziran, vrlo blagog mirisa i okusa. Konzumiranje lipova meda pridonosi olakšanju 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, primjenjuje se protiv bubrežnih bolesti i pomaže pri iskašljavanju kod prehlade. Cvjetanje lipe traje 15 do 20 dana, ovisno o vremenskim uvjetima. Nekad se dogodi da cvjetanje završi nakon samo tjedan dana što je vrlo nepouzdanost i otežava pašu pčela (<http://hr.wikipedia.org>, 2013.).

2.5.2. Klasifikacija prema načinu proizvodnje

- med u saću je med kojeg skladište pčele u stanicama svježeg 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 saćem ili med s dijelovima saća je med koji sadrži jedan ili više proizvoda svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenog isključivo od pčelinjeg voska;
- cijedeni med je med koji se dobiva ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla;
- vrcani med je med dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla;
- prešani med je med dobiven prešanjem saća bez legla, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45 °C;
- filtrirani med je med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi (NN 93, 2009).

Prije izuma vrcaljke med se skupljao na dva primitivna načina. Jedan je način bio cijedenje, a drugi muljanje meda. Kod prvog načina saće se s medom izreže i stavlja u sito u toploj prostoriji. Sito se stavlja na određenu posudu i med se u nju polagano cijedi. Taj se med, u stvari, ne razlikuje od vrcanog. Muljani med se dobije tako da se saće s medom stavi u

platnenu vreću i tijeskom pritišće u toploj okolini. On je lošijeg okusa i zamućen te neprikladan za tržište (Laktić i Šekulja, 2008.).

2.6. Čuvanje meda

Pročišćavanje, dekrystalizacija, skladištenje i punjenje u raznu ambalažu su tehnološke radnje koje, prema pravilima struke, treba dobro obaviti ako želimo sačuvati kvalitetu meda. Ako se iskaže potreba, skupljeno saće s medom stavlja se u prostoriju u koju se upuhuje topao zrak temperature 38 °C. Za 24 sata količina vode se može smanjiti za 2-3%. Pri centrifugiranju odnosno vrcanju meda, okviri s medom se u vrcaljkama okreću oko svoje osi te se pomoću nastale centrifugalne sile med iscijedi iz stanica saća. Vrcaljke su izrađene od aluminija ili pocinčanog lima. Izvana su valjkastog oblika, a u unutrašnjosti se nalaze košare u koje se stavljaju okviri s medom. Pogon koji pokreće vrcaljku može biti mehanički ili električni. Pri dnu vrcaljke se nalazi slavina za ispuštanje izvrcanog meda. Izvrcani med se ispušta preko sita tj. cjedila u posude. Cjedilo zadržava nečistoće (mrtve pčele, vosak) iz meda. Pri vrcanju većih količina meda ne koriste se cjedila jer oduzimaju previše vremena, već se med ostavi neko vrijeme da nečistoće isplivaju na površinu. Tada se one uklone, a med ostaje čist. Nakon centrifugiranja med se ostavi stajati dva dana na sobnoj temperaturi, a zatim se s vrha pokupi vosak (Laktić i Šekulja, 2008.).

Prije ili poslije med se kristalizira, a u takvom stanju nije pogodan za daljnju manipulaciju potrebnu da bi se doveo do kupca. Obično je pakiran u bačve od 300 kg i potrebno je upotrijebiti tehnološki postupak zagrijavanja da bi se takva bačva meda mogla isprazniti. Nikada ga ne smijemo zagrijavati iznad 40 °C jer, u protivnom, dolazi do njegove denaturacije. Med se može dekrystalizirati, odnosno prevesti u tekuće stanje na više načina. Jedan od načina je primjena vodene kupelji što je veoma pogodno za upotrebu kod manjih proizvođača meda. Tako u vodenoj kupelji s temperaturom od 40 °C 25 kg meda topimo dva dana. Smatra se kako je to najbolji način, jer sve kvalitetne tvari sadržane u medu, ako se pazi na temperaturu, ostaju sačuvane. U velikim sustavima za otapanje meda rabe se toplinske komore u koje se uz pomoć viličara ili nekih drugih sredstava ambalaža s kristaliziranim medom slaže na drvene podloške. Primjenom ove tehnologije kod temperature od 40 °C brzina topljenja je duža nego u vodenoj

kupelji, jer je zrak slabiji vodič topline nego voda. Postoje i, takozvani, potopni grijači, koji se stave u posude s kristaliziranim medom. Oni tope med i zbog težine padaju na dno posude. Za njih je karakteristično posjedovanje termostata koji regulira toplinu uređaja i ne dopušta stvaranje previsoke temperature, koja bi bila štetna za med.

Nakon centrifugiranja ili nakon dekrystalizacije med moramo čuvati u prostorijama koje nemaju jake mirise po benzinu, namirnicama, deterdžentima i nekim drugim kemijskim tvarima. Prostorija u kojoj se čuva/skladišti med mora imati temperaturu ispod 19 °C i relativnu vlažnost zraka oko 60%. Smatra se kako ona ne smije biti veća od 80%. Skladište mora biti prozračno te u njega ne smije ulaziti sunčeva svjetlost već mora biti u mraku (Bauer i sur., 1999.).

U slučaju da prilikom dekrystalizacije med tretiramo temperaturom višom od 40 °C, dolazi do smanjenja enzimatske aktivnosti zbog termičke denaturacije enzima i do gubitka hlapljivih komponenata. Također je moguće i pojačano stvaranje HMF-a (hidroksimetilfurfurala). Količina HMF-a i količina dijastaze mogu nam pokazati da je došlo do pregrijavanja meda ili da se radi o dugotrajnom skladištenju meda u lošim uvjetima. Međutim, ako se radi o odsutnosti ili veoma niskoj aktivnosti dijastaze, a velikoj količini HMF-a, može se smatrati kako je došlo do krivotvorenja meda nekim drugim sredstvima. HMF nastaje kada se oslobodi voda iz šećera u medu i on je najčešće produkt razgradnje fruktoze. Na koncu može se reći kako aktivnost enzima dijastaze i sadržaj HMF-a služe kao pokazatelj svježine i termičkog tretmana meda (Katalinić i sur., 1968.).

Za očuvanje kvalitete meda poželjno ga je pakirati u staklene, plastične ili posude od inoxa. Pakiranje u metalne posude je nepoželjno zbog mogućih interakcija sastojaka meda s materijalom posude (White, 1978.).

2.7. Patvorenje meda

Med je veoma kvalitetan proizvod u prehrani ljudi. Međutim, ako dobije neke neželjene primjese, gubi dio svojih kvalitetnih svojstava. Zbog toga je potrebno provoditi kontrolu njegove kvalitete, njegovih ljekovitih svojstava i pojavu patvorenja. Budući je med skuplji od šećera,

uvijek je bilo onih koji su nastojali iskoristiti tu činjenicu, kako bi se na lak način domogli velike zarade. Med se može patvoriti uglavnom na dva načina: bez pčela ili s pomoću pčela, u košnici. Najjednostavniji je način da se obični šećer otopi pomoću vode u gust sirup i pomiješa s prirodnim medom. Tako se poveća količina meda i šećer prodaje po višoj cijeni. Umjesto šećera može se uzeti groždani šećer (glukoza) koji u trgovinu dolazi u obliku gustog sirupa. I jedan i drugi falsifikat mogu se lako otkriti pomoću polariskopa. Prirodni cvjetni med optički je lijevo aktivan, a otopina šećera i glukoza je optički desno aktivna. Ako se cvjetnom medu doda izvjesna količina šećernog sirupa ili glukoze, polarizacija skreće udesno i patvoreni med postaje optički desno aktivan, čime se razlikuje od cvjetnog meda. Mnogo je teže ako se za patvorenje upotrijebi invertni šećer. On se otkriva pomoću anilin klorida. Čist med ostaje nepromijenjen, dok se patvoren oboji crveno.

Drugi način krivotvorenja je obilno prihranjivanje pčela šećernim sirupom. Pčele invertiraju sirup (saharoza se raspada na glukozu i fruktozu) i stavljaju ga u saće. Pčelar saće izvrci i tako dobiva med. Iako je takav med proizvod pčela, ne može se smatrati pravim medom jer u njemu se nalazi samo šećer, bez ostalih sastojaka prirodnog meda koje mu daju punu vrijednost. I takav se med može raspoznati. Pčele nikad ne uspiju svu dodanu saharozu invertirati do kraja. Ako uzorak sumnjivog meda pokazuje veći postotak saharoze nego što je obično ima med, postoji sumnja da je dobiven od šećera. Prepoznaje se i po tome što ne sadrži mineralne sastojke, a med patvoren s običnim šećernim sirupom ima i jako nisku kiselost (pH ispod 1) (Laktić i Šekulja, 2008.).

2.8. Opasnosti i izvori mikroorganizama u medu

Med je, zbog svojih fizikalnih svojstava i kemijskog sastava, nepovoljna sredina za rast mikroorganizama. No, ipak postoje i oni mikroorganizmi koji mogu preživjeti u uvjetima koji vladaju u medu (visoki osmotski tlak, kiselost i sl.) i od velike su važnosti u industriji prerade meda. Dijelimo ih u 3 kategorije:

- mikroorganizmi koji se obično nalaze u medu (određeni sojevi kvasaca i spora bakterija);

- mikroorganizmi koji utječu na sanitarnu ili komercijalnu kvalitetu (koliformi i kvasci);
- mikroorganizmi koji pod određenim uvjetima (npr. klijanje i rast u netermički obrađenom prehrambenom proizvodu) mogu uzrokovati određene bolesti (Snowdon i Cliver, 1996.).

Tablica 1 Rodovi mikroorganizama pronađeni u medu (Olaitan i sur., 2007.).

Bakterije	Kvasci	Plijesni
<i>Alcaligenes</i>	<i>Ascosphaera</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Debaromyces</i>	<i>Alihia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Betisia alvei</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Nematospora</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Oosporidium</i>	<i>Coniothecium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Pichia</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Peronosporaceae</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Peyronella</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Trichosporium</i>	<i>Triposporium</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Torula</i>	<i>Uredianaceae</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Ustilaginaceae</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>	
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Xanthomonas</i>		

Mikroorganizmi koji se nalaze u medu uključuju bakterije, kvasce i plijesni (White, 1978.). Prema načinu kontaminacije meda mikroorganizmima razlikujemo primarne i sekundarne izvore. Primarni izvori su pelud, probavni trakt pčela, prašina, zrak, zemlja i nektar. Mikroorganizmi pronađeni u saću su uglavnom bakterije i kvasci koji potječu od vanjskih izvora, nektara ili crijevne mikroflore odraslih pčela. Sekundarni izvor mikrobne kontaminacije su ljudi, oprema, vjetar, prašina i sl. Mogući je prijenos mikroorganizama u ekstrahirani med putem

zraka (u kući ili dok se med pakira) ili osoba koje rukuju hranom (kožne infekcije, kihanje ili fekalna kontaminacija) (Root, 1993.).

Iako zbog antimikrobnog djelovanja meda većina bakterija i drugih mikroorganizama ne može u njemu rasti i umnožavati se, postoje mikroorganizmi koji u takvim uvjetima mogu opstati. To su osmofilni kvasci, osmofilne plijesni i spore nekih bakterija. *Clostridium botulinum* je anaerobna, gram-pozitivna bakterija koja uzrokuje bolest botulizam. Uobičajeno se nalazi u tlu, prašini, a prirodni je stanovnik u probavnom sustavu čovjeka i životinja. Ova patogena bakterija je vrlo otporna i stvara opasne toksine. Na njezine spore ne djeluju kiseline, lužine, dezinficijensi pa ni visoka temperatura sve do 170 °C u suhom sterilizatoru ili 121 °C u autoklavu. Bolest nastaje samo kada se bakterija nađe u anaerobnom okruženju uz obilje ugljikohidrata i bjelančevina i gdje je pH vrijednost viša od 4,6. Tada se počinje razmnožavati i proizvoditi toksin koji je smrtonosan za gotovo sve živuće organizme. Odrasli ljudi s neoštećenim probavnim traktom i uz dobru mikrofloru u crijevima, onemogućuju razvoj i razmnožavanje *Clostridium botulinum*, dok djeca do jedne godine starosti nemaju dovoljno izgrađeni obrambeni sustav te je kod njih opasnost od zaraze velika. Smatra se kako je 10-15% od ukupne količine meda kontaminirano sporama *Cl. botulinum*, ali med je dovoljno kiseo i pun šećera pa kod odraslih ljudi ne dolazi do razmnožavanja bakterija i lučenja toksina (Midura i sur., 1979.).

2.9. Svojstva odabranih gram–pozitivnih bakterija

2.9.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija koja tvori zlatno – žute okrugle kolonije. Relativno je otporna na sušenje i toplinu te preživljava povećanu koncentraciju soli od 15% (Bhunja, 2008.). Prirodno stanište joj je koža i sluzokoža toplokrvnih životinja. Kod čovjeka se može pronaći u nosnoj sluznici, čak u 20 do 50% populacije. Također se može izolirati iz fecesa, a pronađena je i u prirodnom okolišu, zemlji, prašini, vodi i zraku (Adams i Moss, 2008.).

M. A. Barber je 1914. godine prvi zabilježio simptome zaraze koje uzrokuje ova bakterija tako što je konzumirao zaraženo mlijeko. Od tada, ona se detaljno proučava i smatra se jednom od najznačajnijih uzročnika trovanja hranom (Jay, 2000.). Najčešće uzrokuje infekcije kože, kirurških rana i opekotina. Putem krvotoka može se proširiti po organizmu te uzrokovati sepsu, upalu zglobova, pluća i gnojni meningitis (<http://www.zdravlje.hr>, 2005.).

2.9.2. *Enterococcus faecalis*

E. faecalis je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna, nepokretna bakterija. Fermentira glukozu bez proizvodnje plina i katalaza je negativna (<http://www.en.wikipedia.org>, 2013.). Prirodni je stanovnik crijevne mikroflore čovjeka i životinja, a uobičajeno se nalazi u tlu, vodi i biljkama (Owens, 2009.). Otporna je na više vrsta antibiotika i može prenijeti ovu otpornost i na druge mikroorganizme, što stvara veliki problem u bolničkoj sredini. Uz to, uzrokuju infekcije kirurških i drugih rana te mokraćnih puteva (McBride i sur., 2007.). U okoliš se unosi fecesom, ali najveći broj infekcija je posljedica prenošenja dodiranjem. Čovjek se često zarazi nakon kontakta sa životinjama, ukoliko ruke nakon kontakta nisu oprane ili preko medicinskog osoblja koja se ne pridržava higijenskih mjera (Owens, 2009.).

2.9.3. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna, katalaza pozitivna, oksidaza negativna, asporogena bakterija koja posjeduje flagele. Raste u širokom rasponu temperatura od 0 °C do 42 °C, dok je optimalna temperatura rasta između 30 °C i 35 °C (Adams i Moss, 2008.).

Prvi put ju je izolirao 1926. E. G. D. Murray iz zeca i od tada se smatrala patogenom samo za životinje, sve do kasnih sedamdesetih godina kada je uzrokovala trovanje hranom u Sjevernoj Americi. *Listeria monocytogenes* je prisutna svugdje u prirodi i može preživjeti uvjete koji uništavaju veći dio ostale populacije bakterija. Podnosi visok raspon pH vrijednosti od 4,1 do 9,6, koncentraciju soli od 10% i prisutnost antimikrobnih spojeva. Uzročnik je mnogih

bolesti: infekcije maternice, krvotoka i centralnog živčanog sustava, može uzrokovati spontani pobačaj i infekciju fetusa. U trudnica, koje su najosjetljivije u zdravoj populaciji, može uzrokovati meningitis i sepsu. Najčešće se prenosi dodirrom sa životinjama, preko zaražene hrane te u bolnicama gdje se nalaze novorođenčad (Bhunja, 2008.).

2.10. Antimikrobni učinak meda

Pčelinjem medu se već davno, uz hranjivu, pripisivala i ljekovita moć. Brojna istraživanja su pokazala kako med posjeduje antimikrobno djelovanje koje uništava ili inhibira rast nekih patogenih mikroorganizama (Allen i sur., 1991.; Molan, 1992.a, 1992.b; 1998.; Cooper i Molan, 1999.; Nzeako i Hamdi, 2000.; Chick i sur., 2001.). Dok neki istraživači smatraju kako glavno antimikrobno djelovanje vuče podrijetlo iz pčela, drugi pak vjeruju kako antimikrobna svojstva ovise o komponentama meda koje se odnose na floru iz koje je med dobiven (Bogdanov, 1997.). Med bi morao biti prirodna, neškodljiva tvar u kojoj nema antibiotika niti u tragovima. U analitičkim laboratorijima moguće je odrediti koji je med po sastavu dobre kvalitete, koji tek zadovoljava, te utvrditi koji je umjetni ili tzv. patvoreni za razliku od prirodnog meda. To je važno jer med stvoren bez sudjelovanja pčela ne posjeduje antimikrobno djelovanje (Bauer i sur., 1999.).

Tablica 2 Čimbenici koji pospješuju antimikrobni učinak meda (Snowdon i Cliver, 1996.).

1.	Visoki osmotski tlak; nizak aktivitet vode (a_w)
2.	Nizak pH – kisela okolina
3.	Glukoza oksidaza – stvara vodikov peroksid
4.	Nizak redoks potencijal zbog visokog udjela reducirajućih šećera
5.	Visok omjer ugljika prema dušiku
6.	Nizak sadržaj proteina
7.	Viskoznost
8.	Kemijski spojevi (pinocembrin, fenolne kiseline, terpeni, benzil-alkohol)

2.10.1. Vodikov peroksid

Prije se smatralo kako med djeluje dezinfekcijski i antimikrobno jer sprječava dodir sa zrakom ili zato što sadrži mravlju kiselinu koja onemogućava kvarenje, zatim zbog velike koncentracije monosaharida te enzima koji djeluju zajedno sa šećerima. U novije vrijeme u medu su otkrivene antibakterijske tvari osjetljive na svjetlo i toplinu, tzv. inhibini. Inhibini nastaju djelovanjem enzima glukoza-oksidaze koji dovodi do nakupljanja vodikovog peroksida (H_2O_2) koji s ostalim, djelomično još nepoznatim tvarima, osigurava antimikrobnu aktivnost meda. Budući enzimski ekstrakt iz žlijezda ždrijela pčela radilica, već i u najnižoj koncentraciji koči razvoj bakterija i daje visoke peroksidne vrijednosti, med mora nastati uz sudjelovanje pčela i nikako drugačije. Na količinu vodikovog peroksida u određenoj vrsti meda utječe količina enzima katalaze. Med s niskom koncentracijom katalaze ima visok sadržaj vodikova peroksida, što znači kako takav med posjeduje i jaču antibakterijsku aktivnost. Antimikrobna aktivnost meda se znatno smanjuje ako se med izloži utjecaju dnevne svjetlosti. Svjetlosne zrake razaraju enzim, a time se smanjuje ili čak prestaje stvaranje vodikovog peroksida. Stoga med treba čuvati na tamnom i hladnom mjestu, u posudama od tamnog stakla (Molan, 1992.; Bogdanov, 1997.).

2.10.2. Osmotski učinak

Med je prezasićena otopina šećera glukoze i fruktoze u kojoj na količinu vode otpada oko 15-21% masenih dijelova. Šećeri i voda se vežu međusobno tako da za opstanak mikroorganizama ostaje veoma malo molekula slobodne vode. Aktivitet vode predstavlja slobodnu vodu i u medu obično iznosi od 0,562 do 0,62. a_w je omjer parcijalnog tlaka para vode iznad neke tvari i tlaka para čiste vode pri danoj temperaturi i tlaku. Ako med sadrži manje od 17,1% vode, u njemu nije moguć život mikroorganizama. Taj efekt se tumači tako da visoki sadržaj šećera i niski sadržaj vode u medu izazivaju osmotski efekt i voda iz mikroorganizama izlazi u med. Proces traje sve dok se koncentracije s obje strane ne izjednače. Dakle, gubitak vode uništava mikroorganizme (Molan, 1992.).

2.10.3. Kiselost meda

Kiselost meda od 3,2 do 4,5 pH dovoljno je niska da djeluje inhibitorno na velik broj mikroorganizama. U više različitih istraživanja, neutralizacijom uzoraka sa 0,1 M NaOH, ispitivan je utjecaj pH na antimikrobnu aktivnost uzoraka meda. pH otopine meda tijekom istraživanja kretao se od 3,9 do 4,8. Nakon razrjeđivanja, pH uzorka lagano je porastao pri čemu se povećala aktivnost glukoza-oksidadze što je dovelo do stvaranja vodikovog-peroksida. Budući je optimalan pH ovog enzima u rasponu od 5,0 do 8,0, moglo se zaključiti kako neutralizacija meda ima utjecaj na aktivnost glukoza-oksidadze. Porastom koncentracije vodikovog peroksida raste i antimikrobna aktivnost uzorka (Baltrušaityte i sur., 2007.; Chick i sur., 2001.).

2.11. Antioksidacijska svojstva meda

Pod pojmom antioksidans podrazumijeva se svaka kemijska tvar koja prisutna *in vivo* u maloj koncentraciji sprječava oštećenje biološkog materijala slobodnim radikalima. Glavna karakteristika antioksidanasa je sposobnost "hvatanja", odnosno neutraliziranja slobodnih radikala. Antioksidansi djeluju tako da predaju jedan atom vodika slobodnom radikalu, koji se time stabilizira i prekida se lančana reakcija slobodnog radikala koji više ne uzima elektrone drugim molekulama, a novi radikal antioksidansa je stabiliziran svojom strukturom.

Slobodni radikali se neprestano stvaraju *in vivo* kao nusprodukti normalnih fizioloških i metaboličkih procesa u stanici, a unose se u organizam iz vanjskih izvora, poput dima cigareta, zagađenog zraka, djelovanja UV i ionizirajućeg zračenja, primjenom umjetnih gnojiva, insekticida i pesticida te hranom. Stvaranje slobodnih radikala može biti povećano i u stanjima stresa, te povećanog fizičkog i psihičkog napora. Slobodni radikali i druge reaktivne vrste kisika, primjerice peroksidni radikal-anion ($O^{2-}\cdot$), hidroksilni radikal ($OH\cdot$), vodikov peroksid (H_2O_2) i lipidni peroksidni radikal uključeni su u razvojne procese brojnih bolesti kao što su: astma, tumori, kardiovaskularne bolesti, katarakt, dijabetes, gastrointestinalne upalne bolesti, bolesti jetre, makularna degeneracija i drugi upalni procesi. Pridonose starenju stanica, mutagenezi, karcinogenezi i koronarnim bolestima srca, i to putem destabilizacije membrana, oštećenja DNK i oksidacije lipoproteina niske gustoće (LDL).

Antioksidansi iz hrane imaju veliku ulogu u zaštiti ljudskog zdravlja i prevenciji mnogih bolesti. U medu postoji velika količina sastojaka koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost, a najpoznatiji su:

- flavonoidi (krizin, pinocembrin, pinobanksin, kvercetin, kempferol, luteolin, galangin);
- fenolne kiseline (kava kiselina, kumarinska, ferulinska, elaginska, klorogenska, galna);
- enzimi (glukoza-oksidaze, katalaze i peroksidaze);
- askorbinska kiselina;
- karotenoidi;
- produkti Maillardovih reakcija.

Količina i tip tih antioksidansa najviše ovise o botaničkom i geografskom podrijetlu meda, dok proizvodnja, rukovanje i skladištenje imaju puno manji utjecaj. S obzirom na način proizvodnje meda, različite vrste meda imaju različiti profil flavonoida i fenolnih kiselina, ovisno o biljci koja je bila glavni izvor nektara. Antioksidacijska aktivnost je u međudodnosu sa sadržajem ukupnih fenola i bojom meda, pa, prema tome, tamniji med koji sadrži više ukupnih fenola, posjeduje i veću antioksidacijsku aktivnost. Fenolni spojevi u medu zapravo su flavonoidi i fenolne kiseline te med upravo zbog sadržaja raznolikih fenolnih spojeva predstavlja izvrstan i prirodan izvor antioksidanasa. Flavonoidi, osim antioksidacijskih svojstava, sadrže i ostala korisna svojstva kao što su protuupalna, antibakterijska, antialergijska, antiishemijska i antitumorska svojstva, te svojstvo inhibicije enzima koje je moguće zbog interakcije enzima sa ostalim dijelovima molekule flavonoida.

Organizam čovjeka posjeduje učinkovite obrambene antioksidacijske sustave za zaštitu od slobodnih radikala i ostalih reaktivnih vrsta kisika. Enzimski antioksidansi prvi su obrambeni mehanizam protiv slobodnih radikala te ih neutraliziraju već pri njihovom nastanku. Najpoznatiji među tim enzimima je superoksid-dismutaza, koji štiti DNK i lipide. Međutim, kako čovjek stari, tako se i produkcija tih enzima smanjuje te se nameće potreba za konzumacijom hrane bogate antioksidansima, među kojom se svakako nalazi i med (Khalil i sur., 2010.; Kolayli i sur., 2008.).

2.12. Značaj meda u medicini i prehrani ljudi

Još od davnina, med je sastavni dio raznih kozmetičkih proizvoda i nezaobilazni sastojak mnogih recepata u prehrani i medicini. Najčešće se konzumira u svom prirodnom stanju, u tekućem ili kristaliziranom obliku ili u saću. Danas se koristi kao začim i zaslađivač u različitim granama prehrambene industrije poput industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića, te kao dodatak aromi u mnogim tradicionalnim proizvodima i proizvodnji slastica (Ebisu i sur., 1988.).

Liječenje medom naziva se apiterapija, a popis njegovih ljekovitih djelovanja dugačak je. Možda i najpoznatije ljekovito svojstvo meda jest olakšavanje simptoma gripe i prehlade, odnosno bolesti respiratornog sustava, kao što su kašalj, bronhitis, upala grla te sinusa (Beck i Smedley, 1944.).

Laboratorijska istraživanja su pokazala da med može usporiti rast bakterija kao što su *E. coli* i *Salmonella*, a uspješno se bori protiv bakterija kao što su *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* koje su česte u bolnicama i liječničkim uredima (Molan i Brett, 1998.; Wadi i sur., 1987.).

Med je izvrstan pri liječenju rana jer djeluje kao antiseptik, smanjuje bol, a također izvlači otrove od ugriza ili uboda. Pri tome ima važnu ulogu kod liječenja rana inficiranih bakterijama otpornim na antibiotike (npr. meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*). Previjanjem otvorenih rana medom one brže zarastaju (Bergman i sur., 1983), a med pomaže i pri sprječavanju nastanka neugodnog mirisa kod rana inficiranih anaerobnim bakterijama (Efem, 1988.; 1993.; McInerney, 1990.; Subrahmanyam, 1991.; 2001.). Na opeklinu treba što je prije moguće nanijeti čisti med, kako bi se spriječilo stvaranje mjehura i omogućilo zacjeljenje kože bez ožiljka (Burlando, 1978.). Pri kožnim problemima, kao što su ispućana koža, osipi, svrbež, te razne kožne nečistoće, pomažu oblozi od meda.

U brojnim istraživanjima dokazan je pozitivan učinak meda na liječenje čireva želuca i ljudskih ekstremiteta (Blomfield 1973.; Kandil i sur., 1987.), kao i neizlječivih čireva kod dijabetičara (Efem, 1988.; Hutton, 1966.; Wadi i sur., 1987.; Ndayisaba i sur., 1993.; Somerfield, 1991.; Wadi i sur., 1987.; Wood i sur., 1997.).

Poznato je blagotvorno djelovanje meda kod problema s očima, mrežnice, konjuktivitisa, keratitisa (Popescu i sur., 1985.), a u Indiji se koristio općenito kao lijek protiv svih bolesti oka (Fotidar, 1945.; Imperato i Traore, 1969.).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Zadatak

Zadatak rada bio je ispitati antibakterijski učinak meda kestena i lipe na odabrane gram-pozitivne 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-pozitivne bakterije iz kolekcije kultura mikroorganizama Katedre za biologiju i mikrobiologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

Za izradu ovog rada, korištene su sljedeće bakterijske vrste:

Enterococcus faecalis

Listeria monocytogenes i

Staphylococcus aureus.

Kulture bakterija su regenerirane uzastopnim precijepljivanjem kroz tri dana, nakon inkubacije pri 37 °C na Tryptic Glucose Yeast Agar (TGY 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 $1,5 \times 10^8$ 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 TKG 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 naciepljene podloge u svaku sterilnu, praznu petrijevku zdjelicu. Nakon skrtnjavanja (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 µL pripremljene otopine meda. U svakoj zdjelici pripremljeno je po 4 rupice. 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

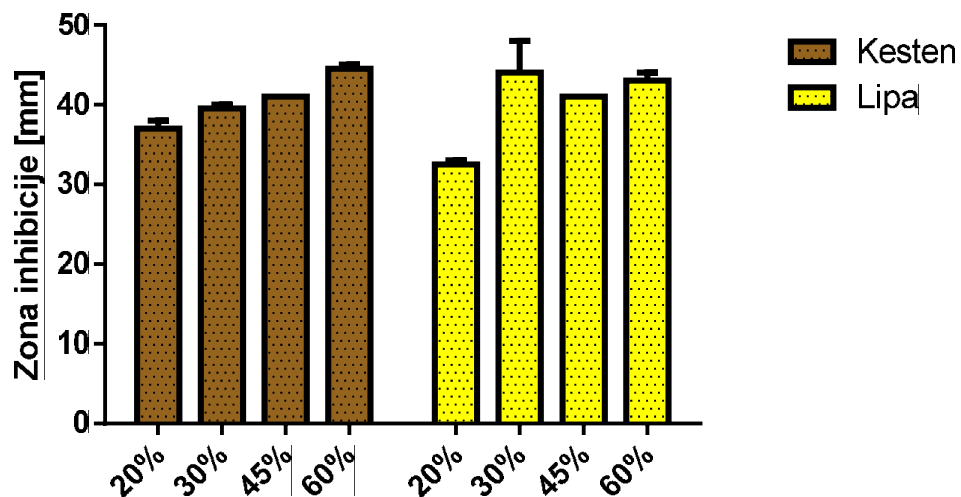
U svim analiziranim uzorcima meda (sve pripremljene otopine, nezagrijan i zagrijan med) određen je aktivitet vode pomoću pomoću Hygropalm AW1 (Rotronic Instrument Corp., SAD). U plastičnu posudicu se stavlja uzorak meda i postavlja u podložak te prekriva sandom. Nakon uspostavljanja ravnoteže, izmjereni aktivitet vode se očitava na ekranu uređaja. Prilikom mjerenja je važno osigurati konstantnu temperaturu.

3.4. Obrada rezultata

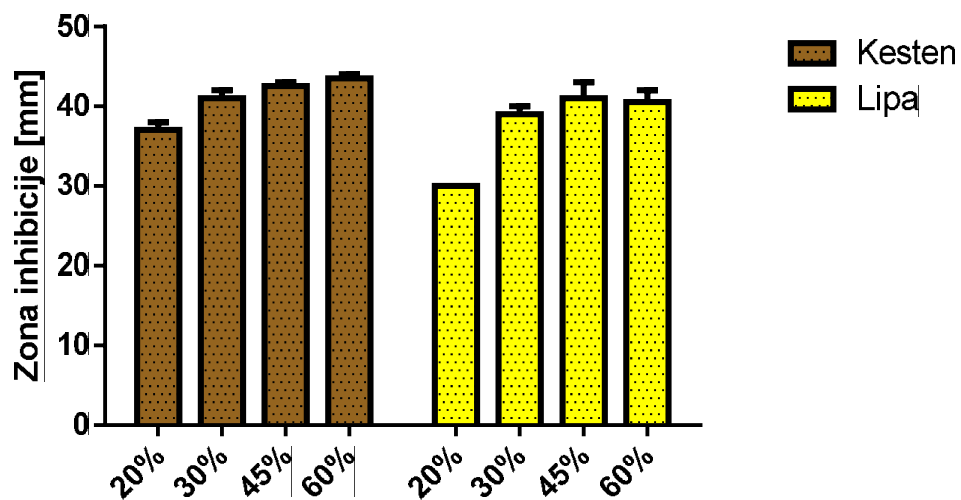
Rezultati rada su obrađeni uz pomoć računalnih programa Microsoft® Office Excel 2003 za Windows, Microsoft Corporation, Redmond, SAD i GraphPad Prism verzija 5.00 za Windows, GraphPad Software, San Diego, SAD.

4. Rezultati

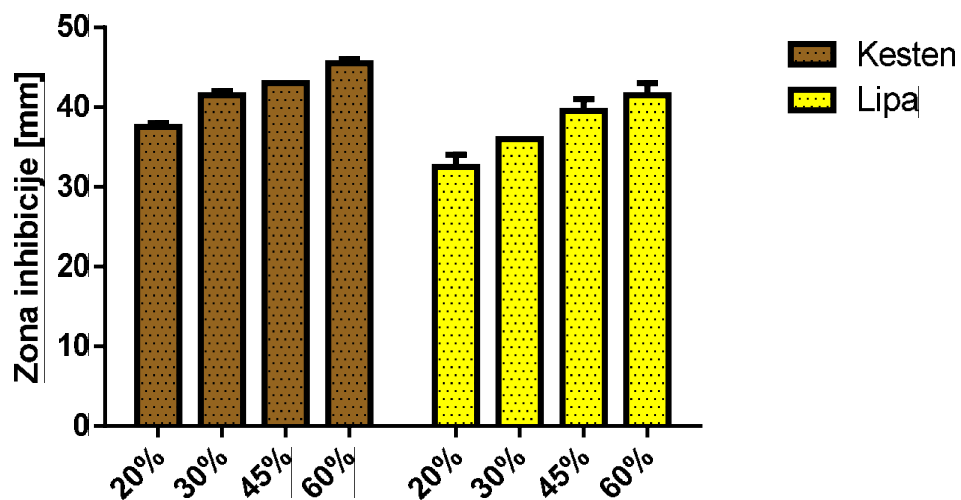
4.1. Antibakterijski učinak meda



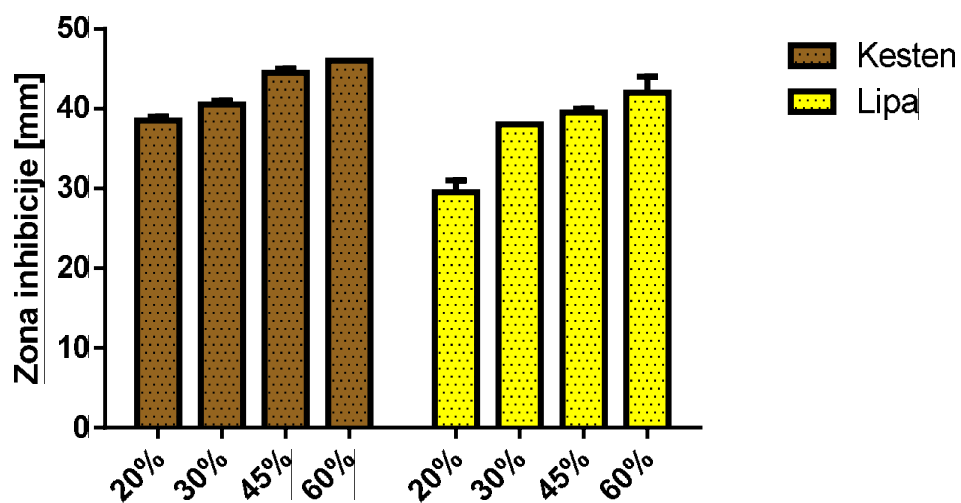
Slika 1 Antibakterijski učinak termički netretiranog meda kestena i lipe na bakteriju vrste *Staphylococcus aureus*



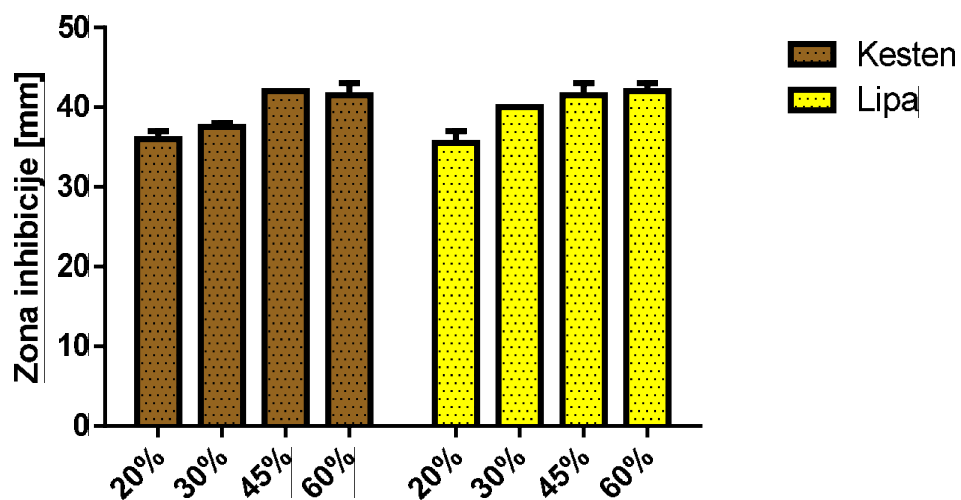
Slika 2 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 60 °C tijekom 30 minuta na bakteriju vrste *Staphylococcus aureus*



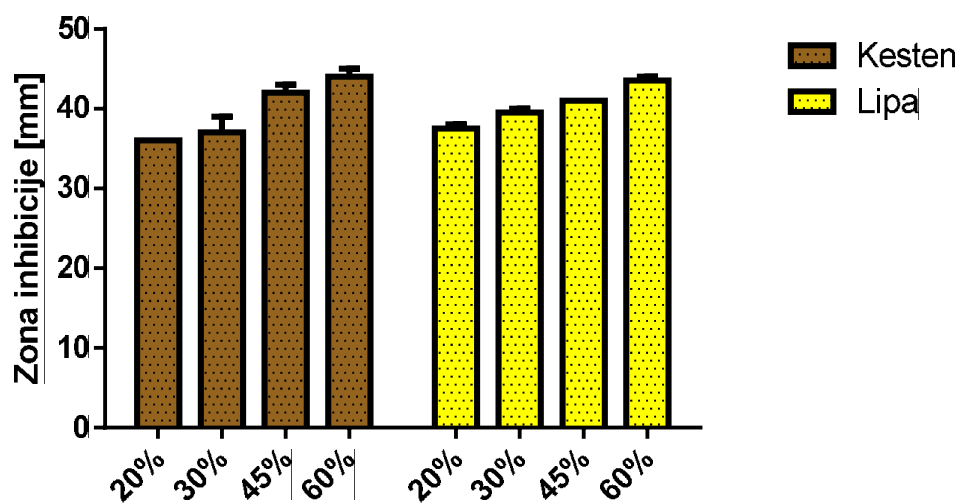
Slika 3 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 80 °C tijekom 10 minuta na bakteriju vrste *Staphylococcus aureus*



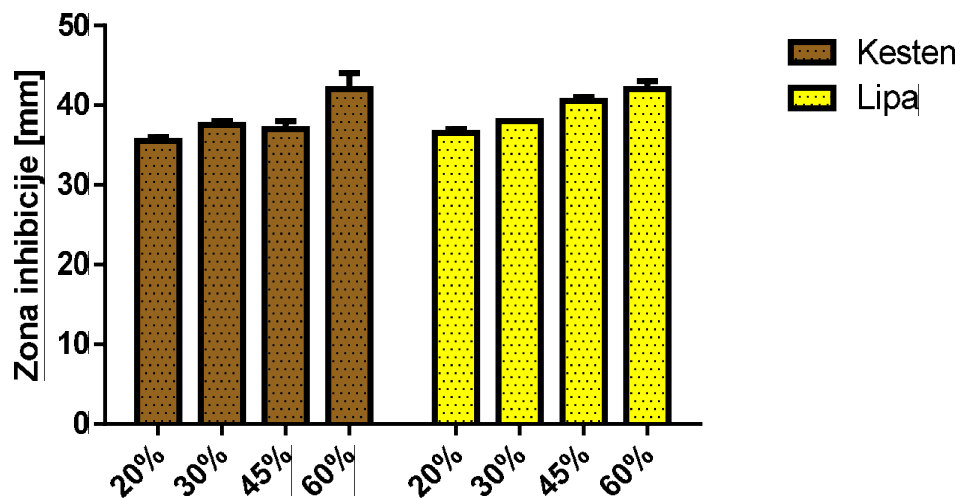
Slika 4 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 100 °C tijekom 5 minuta na bakteriju vrste *Staphylococcus aureus*



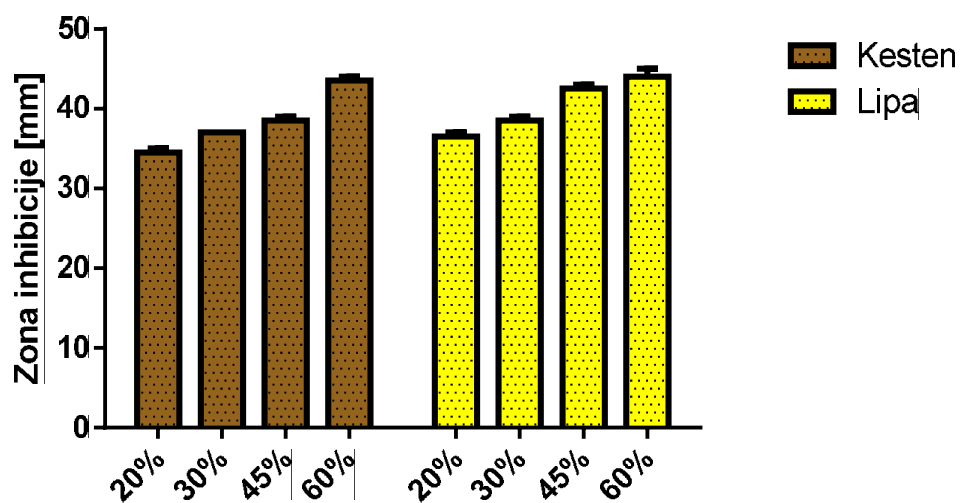
Slika 5 Antibakterijski učinak termički netretiranog meda kestena i lipe na bakteriju vrste *Listeria monocytogenes*



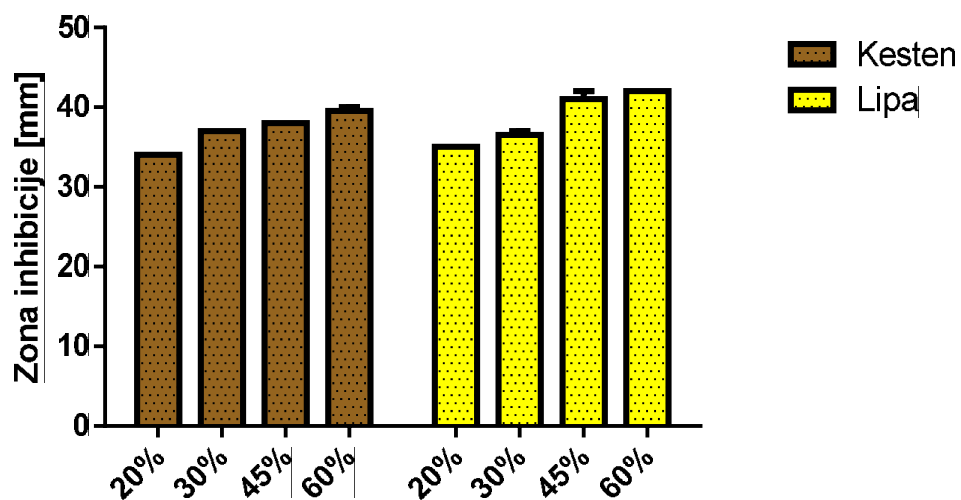
Slika 6 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 60 °C tijekom 30 minuta na bakteriju vrste *Listeria monocytogenes*



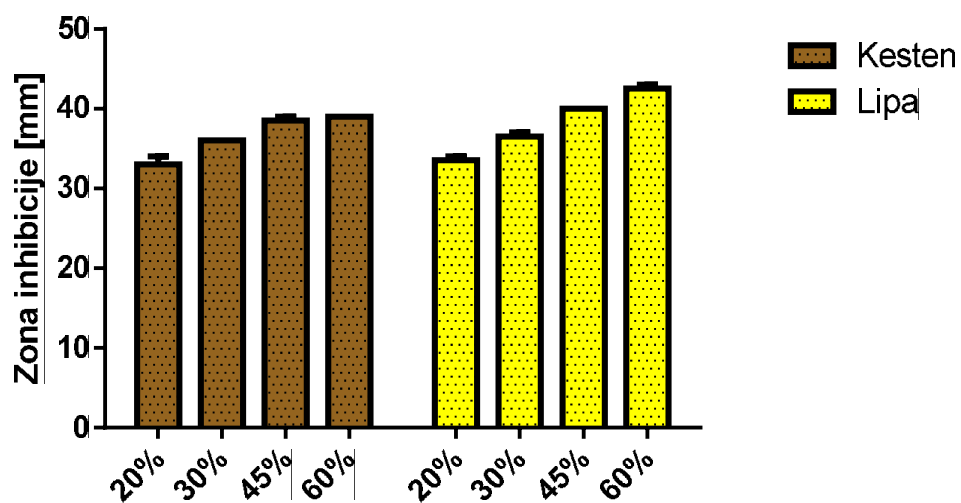
Slika 7 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 80 °C tijekom 10 minuta na bakteriju vrste *Listeria monocytogenes*



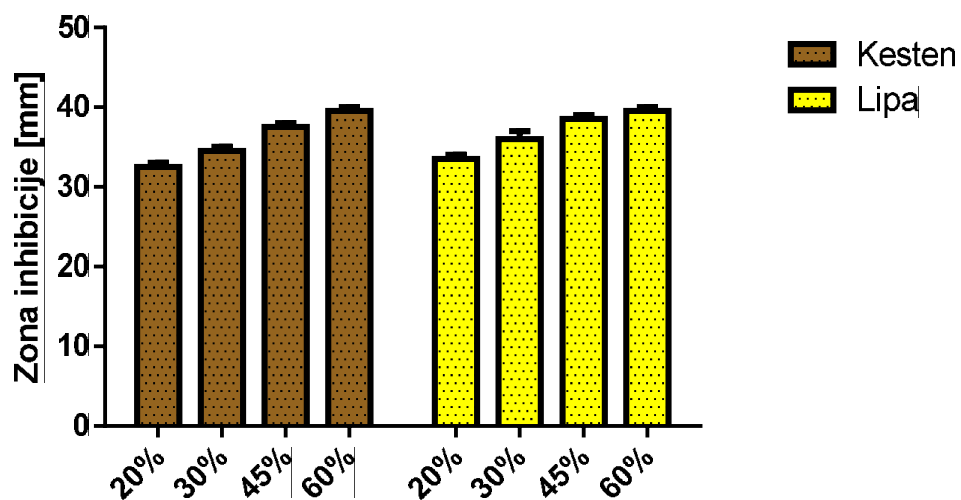
Slika 8 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 100 °C tijekom 5 minuta na bakteriju vrste *Listeria monocytogenes*



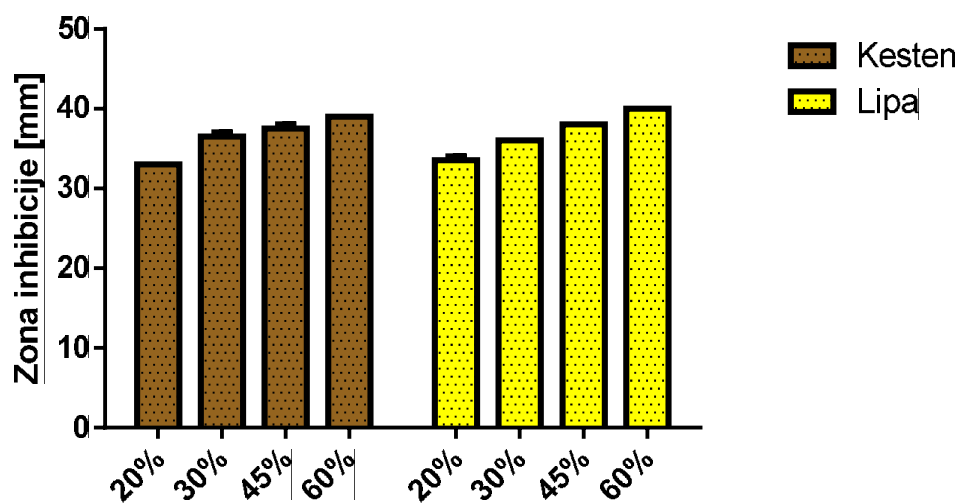
Slika 9 Antibakterijski učinak termički netretiranog meda kestena i lipe na bakteriju vrste *Enterococcus faecalis*



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

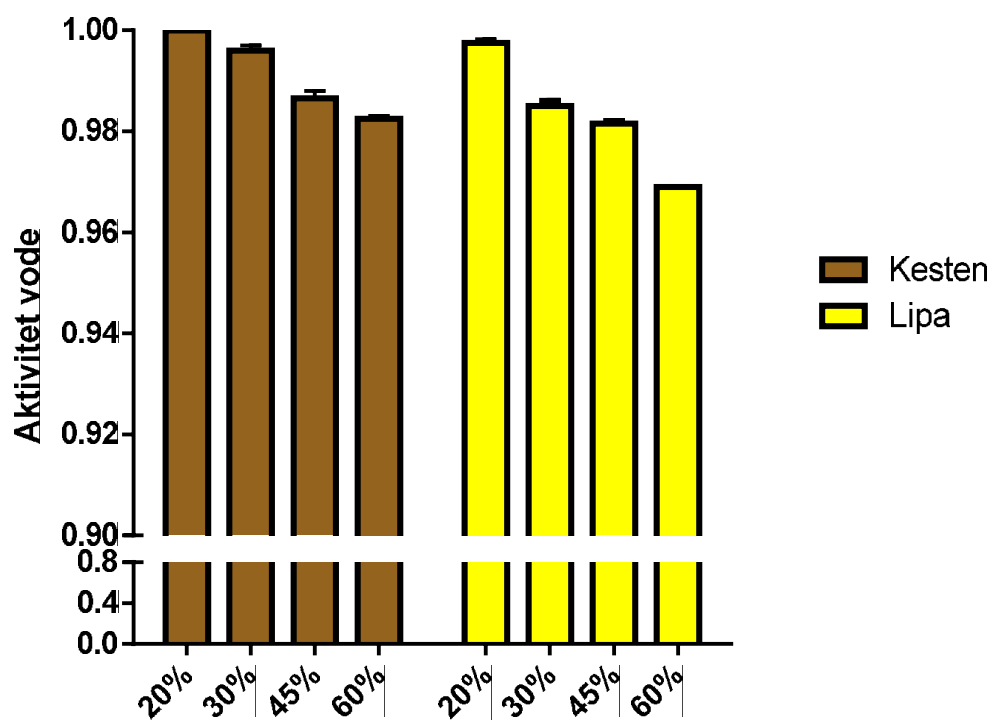


Slika 11 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 80 °C tijekom 10 minuta na bakteriju vrste *Enterococcus faecalis*

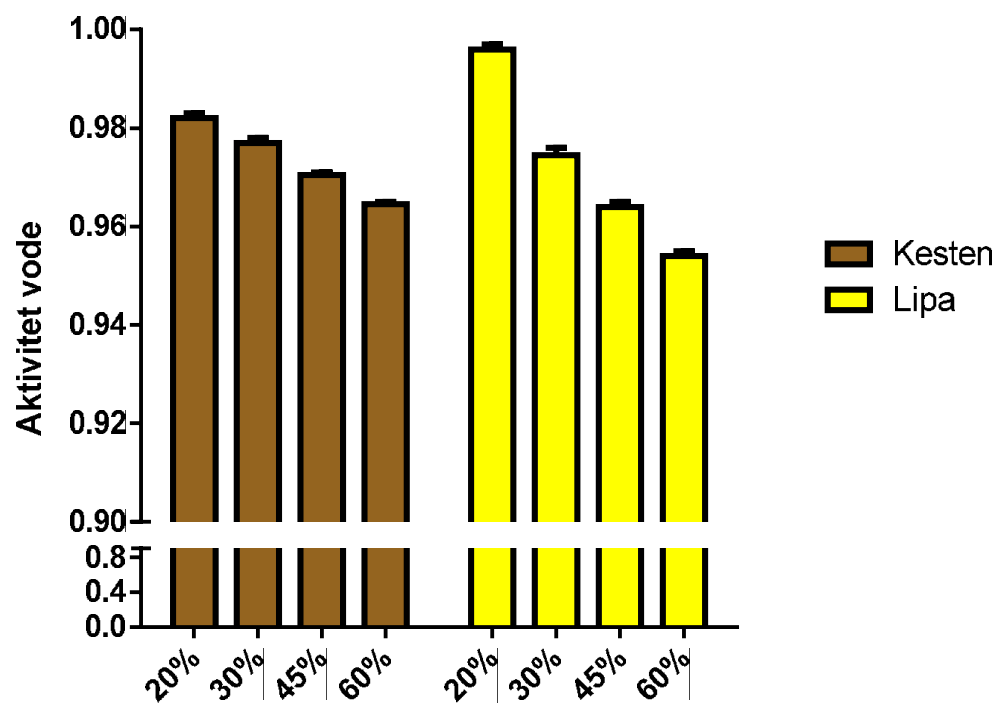


Slika 12 Antibakterijski učinak meda kestena i lipe termički tretiranog na 100 °C tijekom 5 minuta na bakteriju vrste *Enterococcus faecalis*

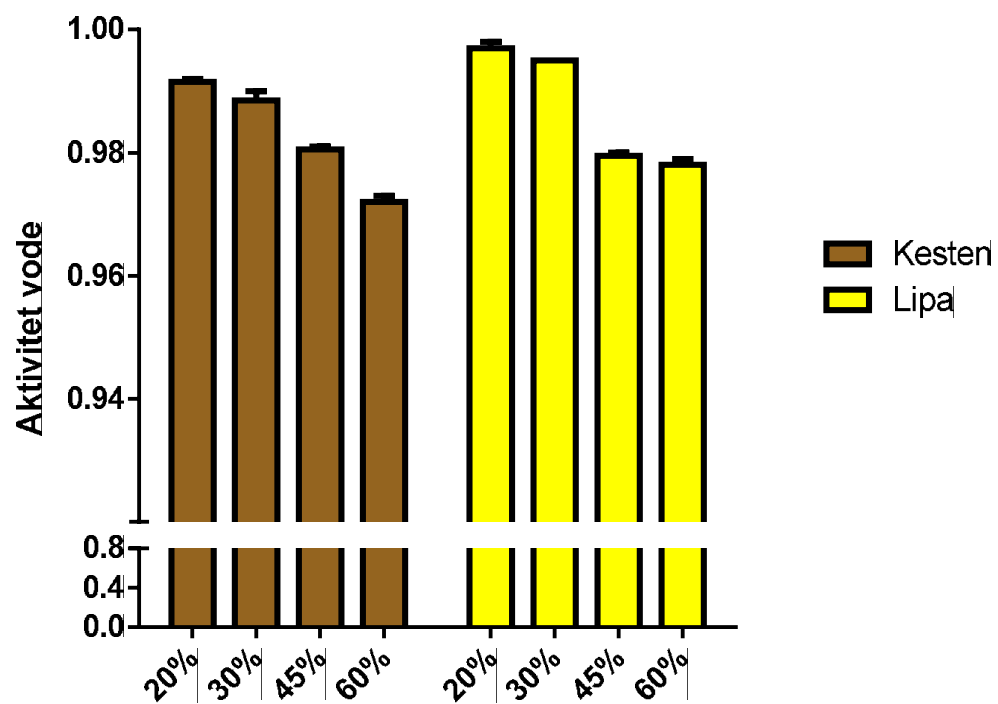
4.2. Aktivitet vode u uzorcima meda



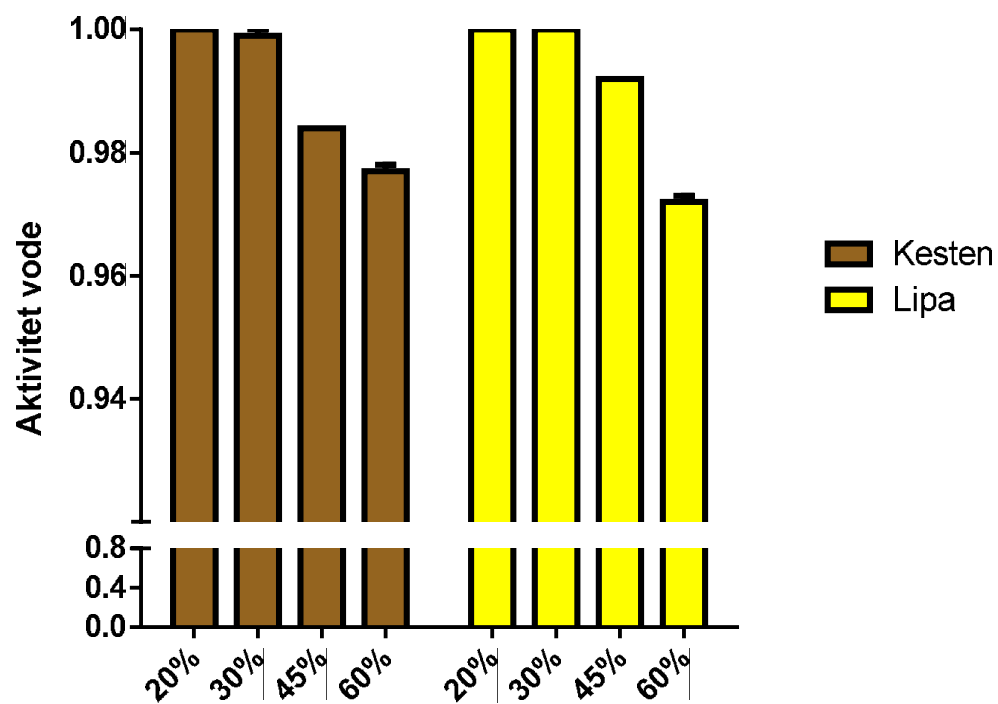
Slika 13 Aktivitet vode u nezagrijanom medu kestena i lipe



Slika 14 Aktivitet vode u medu kestena i lipe zagrijanom na 60 °C tijekom 30 minuta



Slika 15 Aktivitet vode u medu kestena i lipe zagrijanom na 80 °C tijekom 10 minuta



Slika 16 Aktivitet vode u medu kestena i lipe zagrijanom na 100 °C tijekom 5 minuta

5. Rasprava

Antibakterijski učinak kestenovog i lipovog meda na bakteriju vrste *Staphylococcus aureus* je prikazan **Slikama 1 - 4**. **Slika 1** prikazuje antibakterijski učinak kestenovog i lipovog meda koji nije termički tretiran (nativan med) na *S. aureus*. Iz prikazanog rezultata može se uočiti snažniji inhibitorni učinak meda kestena pri najnižoj koncentraciji (20 %) na test bakteriju koji iznosi oko 38 mm, za razliku od meda lipe pri istoj koncentraciji koji uzrokuje inhibiciju od 30 mm. Koncentracija od 30 % idu u prilog antibakterijskom učinku meda od lipe, koji inhibira ovu vrstu sa zonom inhibicije od 42 mm. U usporedbi meda kestena i lipe, med kestena kontinuirano snažnije inhibira bakteriju s porastom koncentracije, i najveći iznos inhibicije je pri koncentraciji od 60 %. Med lipe, pak, pokazuje određena odstupanja od ovog pravila, budući je najveći iznos inhibicije primijećen pri spomenutoj koncentraciji od 30 % (što je i najsnažniji rezultat ove vrste meda). Koncentracija od 45 % uzrokuje istovjetnu inhibiciju kao i ista koncentracija meda kestena, dok najveća koncentracija (60 %) uzrokuje nešto slabiju inhibiciju u usporedbi s medom kestena. Razlozi rasipanja rezultata mogu biti u samom sastavu meda, jer se razrjeđivanjem aktiviraju antimikrobni spojevi koji inhibiraju stanice, dok pri višim koncentracijama primarni antimikrobni učinak posjeduje visoka koncentracija šećera i osmotski tlak koji ona uzrokuje.

Zagrijavanje analiziranih vrsta meda na 60 °C tijekom 30 minuta (**Slika 2**) uzrokuje samo nešto slabiji antibakterijski učinak prema *S. aureus* pri čemu se ističe smanjen inhibitorni učinak meda lipe koncentracije 30 % (s 44 mm nativnog na 40 mm zagrijanog meda). Svi ostali uzorci su pokazali samo vrlo malo smanjenje zone inhibicije.

Snažnije zagrijavanje meda pri 80 °C tijekom 10 minuta (**Slika 3**) aktivira antibakterijski potencijal meda kestena prema *S. aureus* budući su zone inhibicije nešto veće u usporedbi s nativnim (netretiranim medom; **Slika 1**), pri čemu su zone inhibicije za 2 do 3 mm veće u usporedbi s nativnim uzorkom. S druge strane, med lipe je smanjenog antibakterijskog učinka, jer se, u ovom slučaju, dogodilo upravo suprotno, zone inhibicije su niže u usporedbi s nativnim uzorkom.

Najsnažnije zagrijavanje pri 100 °C tijekom 5 minuta (**Slika 4**) djeluje slično na antibakterijski učinak kestenovog meda na *S. aureus* pri čemu je 45 % otopina meda kestena

snažnije inhibitorno djelovala (za 4 mm), u usporedbi s nativnim uzorkom. Među lipe je ovim snažnijim zagrijavanjem smanjen inhibitorni učinak za 2 do 3 mm za svaku primijenjenu koncentraciju meda.

Antibakterijski učinak analiziranih vrsta meda na bakteriju vrste *Listeria monocytogenes* je prikazan **Slikama 5 – 8**. Usporedbom rezultata inhibicije *S. aureus* (**Slike 1 – 4**) može se uočiti kako je bakterija *L. monocytogenes* otpornija na djelovanje obiju vrsta meda stoga što inhibicija pri svim ispitanim koncentracijama meda iznosi za nekoliko mm manju vrijednost, u usporedbi s bakterijom *S. aureus*. Nativni (netretirani) med kestena (**Slika 5**) pri koncentracijama 20 i 30 % gotovo identično inhibira ovu bakterijsku vrstu, dok je isti slučaj moguće uočiti i pri višim koncentracijama (45 i 60 %). Porast koncentracije meda lipe u otopini povećava inhibiciju ove bakterije, ali se može uočiti kako, osim prve i najniže koncentracije od 20 %, ostale primijenjene koncentracije inhibiraju *L. monocytogenes* u gotovo istovjetnim vrijednostima. Ova razlika u zonama inhibicije posljedica je, najvjerojatnije, razlike u građi analiziranih bakterijskih vrsta.

Zagrijavanje otopina meda na 60 °C tijekom 30 minuta (**Slika 6**) povećava inhibiciju *L. monocytogenes* pri najvećoj ispitanoj koncentraciji meda kestena (60 %) te 20 i 60 % otopini meda lipe, u usporedbi s nativnim medom (**Slika 5**) za 2 – 3 mm.

Med kestena zagrijan na 80 °C tijekom 10 minuta (**Slika 7**) je u gotovo jednakom iznosu od 36 – 37 mm inhibirao *L. monocytogenes*, dok je najveće smanjenje inhibicije uočeno pri koncentraciji meda od 45 %. Na med lipe, zagrijavanje od 80 °C gotovo nije imalo učinak na promjenu veličine zone inhibicije.

Još snažnije zagrijavanje pri 100 °C uopće nema učinka na smanjenje inhibicije *L. monocytogenes* medom lipe (**Slika 8**), dok najveće smanjenje (3 mm) uočeno u uzroku meda koncentracije 45 %. Najvjerojatniji razlog tome je moguća stabilizacija antibakterijskih sastojaka meda pri višim koncentracijama šećera.

Posljednja istraжена bakterija u ovom radu je vrsta *Enterococcus faecalis* čije su zone inhibicije prikazane **Slikama 9 – 12**. Od svih bakterijskih vrsta, upravo se *E. faecalis* pokazao najotpornijom na antibakterijski učinak meda. Najveće zone inhibicije meda kestena i lipe pri najvišim koncentracijama ne prelaze više od 39 mm. Vrlo male razlike u zonama inhibicije porastom koncentracije meda kestena mogu se uočiti iz **Slike 9**. Razlika između najmanje (pri 20 %) i najveće zone inhibicije (60 %) iznosi 5 mm. Med lipe, također, inhibira slabije ovu bakterijsku vrstu, pri čemu se može uočiti kako gotovo i nema razlike u inhibiciji između otopina koncentracija 20 i 30 % te 45 i 60 %.

Zagrijavanje meda na 60 °C tijekom 30 minuta (**Slika 10**) ne utječe na smanjenje antibakterijskog učinka meda kestena i lipe, iako se može uočiti kako se povećanjem koncentracije meda lipe, povećava i antibakterijski učinak, što nije moguće primijetiti iz rezultata nativnog meda (**Slika 9**).

Med kestena i lipe, zagrijan pri 80 °C tijekom 10 minuta (**Slika 11**) je povećao zonu inhibicije rasta *E. faecalis* i to pri koncentraciji 30 % (za 2 mm) meda kestena te najvećim koncentracijama meda lipe (45 i 60 %; 3 mm).

Iako se zagrijavanjem ne očekuje povećanje inhibicije meda, to se upravo dogodilo zagrijavanjem meda pri 100 °C tijekom 5 minuta (**Slika 12**). Sve koncentracije meda kestena su pokazale za 1 – 2 mm veću zonu inhibicije rasta prema *E. faecalis*, iako je najveće povećanje zone inhibicije uočeno u uzorcima meda lipe viših koncentracija (45 i 60 %, za 4 do 5 mm).

Antibakterijski učinak meda može se značajno razlikovati u različitim bakterijskih vrsta, čak i među srodnih bakterija, kao što je to u ovom slučaju s gram pozitivnim vrstama. Zagrijavanje meda može negativno utjecati na neke hranjive sastojke meda ili vitamine koji su osjetljivi na primjenu više temperature, ali na antibakterijski učinak zagrijavanje djeluje čak i potencirajuće, uz veću zonu inhibicije istraženih bakterijskih vrsta.

Aktivitet vode je važan parametar, koji, u velikoj mjeri, utječe na rast mikroorganizama. Istražene bakterijske vrste su tipični predstavnici gram pozitivnih bakterija i, stoga, otporniji na povećani aktivitet vode. Aktivitet vode u uzrocima meda (nativnom i zagrijavanom) prikazan je **Slikama 13 – 16**. Aktivitet vode u nezagrijanom medu kestena i lipe (**Slika 13**) se kontinuirano smanjuje, što je logično, uslijed sve veće koncentracije šećera. Početni aktivitet vode 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 14**), ali i na med lipe (osim najniže koncentracije od 20 %). Ovo smanjenje aktiviteta vode je izrazitije u usporedbi s uzrocima zagrižanim na 80 °C tijekom 10 minuta (**Slika 15**) 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. Vjerojatno je to posljedica interakcije sastojaka meda i vremena izlaganja višoj temperaturi.

6. Zaključci

Iz rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Med kestena djeluje snažnije inhibitorno na bakteriju vrste *Staphylococcus aureus* u usporedbi s medom lipe. Zagrijavanje meda na temperature 60 °C tijekom 30 minuta, 80 °C tijekom 10 minuta i 100 °C tijekom 5 minuta djeluje na smanjenje inhibicije meda lipe, dok na med kestena nema učinka.
2. Bakterija *Listeria monocytogenes* je podjednako inhibirana medom kestena i lipe. Inhibitorni učinak meda lipe je smanjen zagrijavanjem.
3. *Enterococcus faecalis* je podjednako inhibiran medom kestena i lipe, bez obzira na primijenjen termički tretman.
4. Bakterija vrste *Enterococcus faecalis* je najotpornija na ispitane vrste meda, slijede *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*.
5. Inhibicija medom ovisi o primijenjenoj koncentraciji meda. Veće koncentracije (45 i 60 %) uzrokuju veću inhibiciju istraženih bakterijskih vrsta.
6. Aktivitet vode otopina meda mijenja se zagrijavanjem. Pri višoj temperaturi zagrijavanja dolazi do većeg smanjenja aktiviteta vode.

7. Literatura

- Adams MR, Moss MO: *Food microbiology*. RSC Publishing, Cambridge, 2008.
- Allen KL, Molan PC, Reid GM: A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43:817–822, 1991.
- Baltrušaityte V, Rimantas 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.
- Bauer Lj, Biškupić I, Brkan B, Dekanović I, Dolenec Dravski M, Domačinović V, Kvočić K, Matijaško N, Matković Mikulčić K, Milković B, Olić R, Pavlek Močan M, Sulimanović Đ, Zeba Lj: *Med: pčelarenje i običaji*. Pučko otvoreno učilište, Zagreb, 1999.
- Beck BF, Smedley D: *Honey and Your Health*. McBride, New York, 1944.
- Belčić J, Katalinić J, Loc D, Lončarević S, Peradin L, Sulimanović Đ, Šimić F, Tomašec I: *Pčelarstvo*. VII. dopunjeno izdanje, Znanje, 1990.
- Bergman A, Yanai J, Weiss J, Bell D, David MP: Acceleration of wound healing by topical application of honey. An animal model. *The American Journal of Surgery* 145:374-376, 1983.
- Bhunja AK: *Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis*. Springer, New York, 2008.
- Blomfield R: Honey for decubitus ulcers. *Journal of the American Medical Association* 224:905, 1973.
- Bogdanov S: Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Federal Dairy Research Institute, Bee Department* 30:748-753, 1997.
- Burlando F: The therapeutic effect of honey on burns. *Minerva Dermatological* 113:699-706, 1978.
- Chick H, Shin HS, Ustunol Z: Growth and acetic production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *Journal of Food Science* 66:478-481, 2001.
- Chinou I, Melliou E: Chemical constituents of selected unifloral Greek bee-honeys with antimicrobial activity. *Food Chemistry* 129:284–290, 2011.
- Cooper RA, Molan PC, Harding KG: Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of Medicine* 92:283-285, 1999.
- Crane B: *A book of honey*. Oxford University Press, Oxford UK, 1983.

- Ebisu T, Maeda N, Matsubara H, Kato K: Honey powder composition as additives for foods and Pharmaceuticals. *Japanese Patent Number* 63:157–943, 1988.
- Efem SEE: Clinical observations on the wound healing properties of honey. *British Journal of Surgery* 75:679-681, 1988.
- Fotidar MR, Fotidar SN: 'Lotus' honey. *Indian Bee Journal* 7:102, 1945.
- <http://hr.wikipedia.org/wiki/med/> [16.9.2013.]
- Hutton DJ: Treatment of pressure sores. *Nursing Times* 62:1533-1534, 1966.
- Imperato PJ, Traore D: Traditional beliefs about measles and its treatment among the Bambara of Mali. *Tropical and Geographical Medicine* 21:62-67, 1969.
- Jay JM: *Modern food microbiology*. Aspen publishers, Inc., Gaithersburg, 2000.
- Jeffrey AE, Echazarreta CM: Medical uses of honey. *Review of Biomedical Engineering* 7:43-49, 1996.
- Kandil A, El-Banby M, Abdel-Wahed K, Abou-Sehly G, Ezzat N: Healing effect of true floral and false nonfloral honey on medical wounds. *Journal of Drug Research* 17:71-75, 1987.
- Katalinić J, Loc D, Lončarević S, Peradin L, Simić F, Tomašec I: *Pčelarstvo*. Nakladni zavod Znanje, Zagreb, 1968.
- Khalil MI, Sulaiman SA, Boukraa L: Antioxidant Properties of Honey and its Role in Preventing Health Disorder. *The Open Nutraceuticals Journal* 3:6-16, 2010.
- Kolayli S, Aliyazicioglu R, Ulusoy E, Karaoglu S: Antioxidant and Antimicrobial Activities of Selected Turkish Honeys. *Journal of Biology and Chemistry* 36:163-172, 2008.
- Laktić Z, Šekulja D: *Suvremeno pčelarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 2008.
- McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering RC Jr, Gilmore MS: *Genetic diversity among Enterococcus faecalis*, 2007.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1899230/> [10.10.2013.]
- McInerney RJF: Honey - a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine* 83:127, 1990.
- Midura TF, Snowden S, Wood RM, Arnon SS: Isolation of *Clostridium botulinum* from Honey. *Journal of Clinical Microbiology* 282-283, 1979.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu*. 2011. <http://www.mps.hr/default.aspx?id=6337>, [02.09.2013.]

- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o medu*. Narodne novine, 93, 2009.
- Molan P, Brett M: Honey has potential as a dressing for wounds infected with MRSA. *The Second Australian Wound Management Association Conference*, Brisbane, Australia, 18-21 March, 1998.
- Molan PC: The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* 73:59-76, 1992.
- Ndayisaba G, Bazira L, Habonimana E, Muteganya D: Clinical and bacteriological results in wounds treated with honey. *The Journal of Orthopaedic Surgery* 7:202-204, 1993.
- Nemeth Blažić T: *Staphylococcus aureus*, 2005.
<http://www.zdravlje.hr/clanak.php?id=12813&> [03.08.2013.]
- Nzeako BC, Hamdi J: Therapeutic potential of honey on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Oman Medical Journal* 16:13-16, 2000.
- Olaitan PB, Adeleke OE, Ola IO: Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Science* 7:159-165, 2007.
- Owens C: *Causes of Enterococcus faecalis*, 2009.
http://www.ehow.com/about_5049804_causes-enterococcus-faecalis.html
 [10.8.2013.]
- Popescu MP, Palos E, Popescu F: Study of the efficiency of biological therapy with honey bee products in some palpebral and conjunctival affections in terms of clinical-functional changes. *Revista de Chirurgie Oncologie Radiologie O.R.L. Oftalmologie Stomatologie Seria Oftalmologie* 29:53-61, 1985.
- Rodek V: *Med-nektar bogova*. 2006. <http://www.coolinarika.com/magazin/clanak/med-8211-nektar-bogova/> [05.06.2013.]
- Root AI: *ABC and XYZ of Bee Culture*. A.I. Root Company, Medina, Ohio, 1993.
- Schocken-Iturrino RP, Carneiro MC, Kato E, Sorbara JOB, Rossi OD, Gerbasi LER: Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *Immunology and Medical Microbiology* 24:379-382, 1999.
- Snowdon JA, Cliver DO: Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31:1-26, 1996.
- Somerfield, S. D: Honey and healing. *Journal of the Royal Society of Medicine* 84:179, 1991.

- Subrahmanyam M, Hemmady A, Pawar SG: Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. *Annals of Burns of Fire Disasters* 16:22-26, 2001.
- Subrahmanyam M: Topical Application of Honey in Treatment of Burns. *British Journal of Surgery* 78:497-498, 1991.
- Wadi M, Al-Amin H, Farouq A, Kashef H, Khaled SA: Sudanese bee honey in the treatment of suppurating wounds. *Arab Medico* 3:16-18, 1987.
- White JW, Jr.: Honey. *Advances in food research* 24:287-374, 1978.
- Wood B, Rademaker M, Molan PC: Manuka honey, a low cost leg ulcer dressing. *New Zealand Medical Journal* 110:107, 1997.