

Proces transformacije pčelinje peludi u pčelinji kruh

Bošković, Kristian

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:502970>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**PROCES TRANSFORMACIJE PČELINJE PELUDI U
PČELINJI KRUH**

DIPLOMSKI RAD

Kristian Bošković

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda i agroturizam

**PROCES TRANSFORMACIJE PČELINJE PELUDI U
PČELINJI KRUH**

DIPLOMSKI RAD

Kristian Bošković

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Lidija Svečnjak

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Kristian Bošković**, JMBAG 0178111448, rođen 24.11.1994. u Supetru, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

PROCES TRANSFORMACIJE PČELINJE PELUDI U PČELINJI KRUH

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Kristian Bošković**, JMBAG 0178111448 , naslova

PROCES TRANSFORMACIJE PČELINJE PELUDI U PČELJINJI KRUH

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|-----------------------------------|--------|-------|
| 1. | izv. prof. dr. sc Lidija Svečnjak | mentor | _____ |
| 2. | prof. dr. sc. Dragan Bubalo | član | _____ |
| 3. | prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka | član | _____ |

Zahvala

Prvenstveno bih se zahvalio svojoj mentorici na iznimnom razumijevanju i pomoći prilikom izrade ovog rada. Također bih zahvalio svim dragim ljudima, obitelji, prijateljima, kao i profesorima koji su me poticali i bodrili tijekom studiranja.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Cilj rada	1
2.	Pregled literature	2
2.1.	Pčelinja pelud	2
2.2.	Važnost peludi za pčelinju zajednicu	3
2.3.	Botaničko podrijetlo i kemijski sastav pčelinje peludi	4
2.4.	Skladištenje pčelinje peludi u stanice saća	5
	2.4.1. Dimenzije stanica saća	6
	2.4.2. Proces transformacije pčelinje peludi u pčelinji kruh	7
2.5.	Pčelinji kruh	8
	2.5.1. Kemijski sastav i nutritivna svojstva pčelinjeg kruha	9
	2.5.2. Organoleptička svojstva pčelinjeg kruha	11
	2.5.3. Skupljanje i čuvanje pčelinjeg kruha	11
	2.5.4. Pčelinji kruh kao hrana (dodatak prehrani)	12
2.6.	Analiza pčelinje peludi i pčelinjeg kruha	13
	2.6.1. Klasične fizikalno-kemijske i mikroskopske metode	14
	2.6.2. Instrumentalne analitičke metode	15
3.	Materijali i metode	17
3.1.	Pokusni dizajn i uzorkovanje	17
3.2.	Prikupljanje uzoraka pčelinje peludi	17
3.3.	FTIR-ATR analiza pčelinje peludi	19
3.4.	Uzorkovanje saća i utvrđivanje dubine skladištenja pčelinjeg kruha	21
3.5.	Prikupljanje i spektralna analiza uzoraka pčelinjeg kruha	21
3.6.	Obrada i analiza spektralnih podataka	22
4.	Rezultati i rasprava	23
4.1.	Rezultati analize dubine stanica saća	23
4.2.	Rezultati spektralne analize	25
	4.2.1. Rezultati spektralne analize pčelinje peludi.....	25
	4.2.2. Spektralne varijacije između uzoraka pčelinjeg kruha na razini zajednice	28
	4.2.3. Komparativne spektralne razlike između pčelinje peludi i pčelinjeg kruha	30
5.	Zaključak	35
6.	Popis literature	36
7.	Prilozi	43
	Životopis	47

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Kristian Bošković**, naslova

PROCES TRANSFORMACIJE PČELINJE PELUDI U PČELINJI KRUH

Transformacija pčelinje peludi u pčelinji kruh predstavlja složen biokemijski proces koji omogućuje konzerviranje i očuvanje hranidbene vrijednosti peludi. Cilj je ovog rada bio utvrditi dubinu stanica saća do koje pčele skladište pelud te promjene u kemijskom sastavu peludi od početne sirovine (pčelinja pelud) do finalnog proizvoda (pčelinji kruh). Istraživanje je provedeno na pčelinjaku Agronomskog fakulteta na tri pokusne pčelinje zajednice, pri čemu je svježa pčelinja pelud prikupljena korištenjem vanjskog skupljača peludi, dok je pčelinji kruh prikupljen izravno iz stanica saća. Paralelno s navedenim uzorkovanjem, provedena su mjerenja dubine praznih stanica saća i onih s peludnim sadržajem, korištenjem pomičnog mjerila. Rezultati su pokazali kako pčele skladište pčelinju pelud do prosječno $\frac{3}{8}$ dubine stanica saća, dok je prosječna dubina praznih stanice saća iznosila 11 mm. Rezultati spektralne analize pokazali su kako se varijacije u kemijskom sastavu multiflorne pčelinje svježe peludi i pčelinjeg kruha primarno očituju u višem udjelu vode koji je utvrđen u pčelinjem kruhu te kemijskim promjenama u sastavu i sadržaju ugljikohidrata, što potvrđuje kako se pčelinja pelud uspješno konzervira, a pritom sastav nije značajno promijenjen.

Ključne riječi: pčelinja pelud, pčelinji kruh, dubina stanica saća, FTIR-ATR spektroskopija

Summary

of the master's thesis student **Kristian Bošković**, entitled

BEE POLLEN-TO-BEE BREAD TRANSFORMATION PROCESS

The transformation of bee pollen into bee bread is a complex biochemical process that enables the preservation of the nutritional value of the bee pollen. The aim of this study was to determine the depth of the honeycomb cells to which the bees store pollen and the changes in the chemical composition of the pollen from the initial raw material (bee pollen) to the final product (bee bread). The research was carried out at Faculty of Agriculture on three experimental bee colonies, where fresh bee pollen was collected using a front-mounted pollen traps, while bee bread was manually extracted from the comb cells. In parallel with the mentioned sampling, the depth of empty comb cells and those with pollen content were measured using a caliper. The results showed that bees store bee pollen up to an average of $\frac{2}{3}$ of the depth of the cell, while the average depth of the empty cell was 11 mm. The results of the spectral analysis showed that variations in the chemical composition of fresh multifloral bee pollen and bee bread are primarily manifested in the higher water content found in bee bread, and chemical alterations in the composition and content of carbohydrates, which confirms that bee pollen is successfully preserved, while the composition has not been changed significantly.

Keywords: bee pollen, bee bread, comb cells depth, FTIR-ATR spectroscopy

1. Uvod

Pelud predstavlja glavni izvor bjelančevina za pčele. Pčele prikupljaju pelud s različitih biljnih vrsta te je na goljenicama stražnjih nogu (pčelinja pelud) prenose do košnice i unose u stanice saća utiskujući je do prosječno $\frac{2}{3}$ dubine stanica (Quinby 2008.).

Pelud sadrži u prosjeku 22,7 % bjelančevina, od čega čak 10,4 % esencijalnih aminokiselina, dok je udio ugljikohidrata oko 30,8% (Komosinska-Vassev i sur. 2015.). Sve to čini pelud dobro izbalansiranom hranom za pčelinju zajednicu. Upravo zbog svog sastava, svježja pčelinja pelud je podložna brzom degradaciji te su pčele razvile mehanizam konzerviranja iste. Transformacija pčelinje peludi u pčelinji kruh odvija se u stanicama saća gdje pritom radilice u pčelinju pelud dodaju med, nektar te enzime žlijezda slinovnica. Dodavanjem meda i enzima od strane radilica, dolazi do mliječno-kisele fermentacije pod utjecajem bakterija iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* te kvasaca iz roda *Sacharomices* pri čemu se mijenja kemijski sastav pčelinje peludi i nastaje pčelinji kruh. Taj proces predstavlja složen biokemijski proces koji omogućuje konzerviranje i očuvanje hranidbene vrijednosti peludi.

Komparativna istraživanja kemijskog sastava pčelinje peludi i pčelinjeg kruha pokazala su kako je udio bjelančevina, masti i vode u pčelinjoj peludi viši, no dostupnost nutrijenata iz pčelinjeg kruha je viša, posebice u ljudskoj prehrani (Mayde i sur. 2020.). Također je utvrđeno kako je antioksidativni kapacitet pčelinjeg kruha viši u odnosu na pčelinju pelud (Mayda i sur. 2020.). Giampieri i sur. (2022.) navode kako se pčelinja pelud odlikuje višim udjelom ugljikohidrata, no udio vode, bjelančevina, masti te pepela je veći u pčelinjem kruhu.

Transformacija pčelinje peludi u pčelinji kruh predstavlja složen biokemijski proces koji omogućuje konzerviranje i očuvanje hranidbene vrijednosti peludi. Mnogo je dostupnih istraživanja na temu sastava pčelinje peludi i pčelinjeg kruha individualno, no u dostupnoj znanstvenoj literaturi nema podataka o simultanom komparativnom istraživanju cjelokupnog kemijskog sastava pčelinje peludi i pčelinjeg kruha, odnosno pozadinskim mehanizmima kemijske prijetvorbe pčelinje peludi u pčelinji kruh.

1.1. Cilj rada

Cilj je ovog rada bio utvrditi dubinu stanica saća do koje pčele skladište pelud te promjene u kemijskom sastavu peludi od početne sirovine (pčelinja pelud) do finalnog proizvoda (pčelinji kruh).

2. Pregled literature

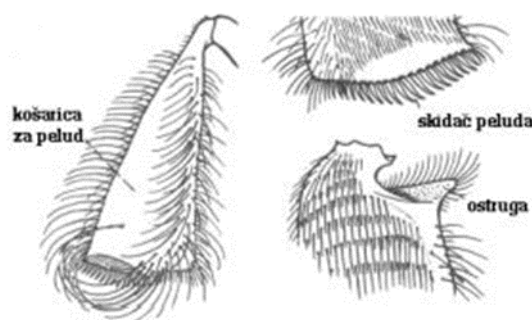
2.1. Pčelinja pelud

Peludno zrnce kao proizvod samih muških gameta na biljkama zaslužno je za oplodnju cvjetova te posljedično stvaranje biljnog sjemena. Skup prašnika naziva se andrecej, a znanost koja se bavi poučavanjem peludi naziva se palinologija. Svako peludno zrnce određene biljke je specifičnog oblika i građe te se prema tome može mikroskopski odrediti od koje biljne vrste potječe.

Radilice (skupljačice) medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) pomoću svojih specifičnih i specijaliziranih organa, kao što su posebne košarice (*curbicula*) na goljenici stražnjih nogu, skupljaju pelud za potrebe svoje zajednice. Te se košarice često nazivaju i „peludne košarice“ iako ih pčele koriste i za skupljanje smolastih i balzamskih tvari, bitnih sastavnica za proizvodnju propolisa.

Kao i kod svih kukaca, tijelo pčele je sastavljeno od tri dijela: glave, prsišta i zatka, a na prsištu je usađeno tri para nogu. Na goljenici stražnjih para nogu s vanjske strane nalazi se udubljenje s dlačicama koje se zove peludna košarica u koju pčela utiskuje pelud prilikom skupljanja iste, a pri dnu goljenice nalazi se i red dlačica koje služe za skupljanje peludi, a zove se peludni češalj (Kezić i sur. 2014.).

Prilikom skupljanja peludi radilica na svoje tijelo nanese podosta peludi, te čisteći prednjim nogama rilce, glavu i dio prsišta skuplja pelud te je pritom vlaži medom ili nektarom čime pelud postaje ljepljiva. Ovako skupljenu pelud radilica prebacuje s prednjih nogu na srednje, a sa srednjih na stražnje noge čime se navlažena pelud miješa i sa suhom koja se nalazi na stražnji nogama. Pri prijenosu peludi s unutrašnjih peludnih četki u peludne košarice, radilica struže unutrašnji dio peludne četke s peludnim češljem suprotne noge čime prebacuje pelud s peludne četke u ostrugu suprotne stražnje noge. Peludni češalj i zupci koji se nalaze na ostruzi zadržavaju pelud te tako nakupljenu pelud potiskuju u košaricu (slika 2.1.) (Kezić i sur. 2014.). Tako prikupljenu pelud radilica pohranjuje u stanice saća.



Slika 2.1. Bitni dijelovi stražnjih nogu namjenjeni za skupljanje peludi

Izvor: Kezić i sur. (2014.)

Broj peludnih zrnaca skupljenih u košaricama kreće se od stotine do tisuću, a s dodatkom sline i nektara radilice tvore peludne kuglice (peludni teret) veličine od 1,4 – 4 mm (slika 2.1.1.) (Saavedra i sur. 2013.).



Slika 2.1.1. Peludne košarice s prikupljenom peludi

Izvor: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/IN868>

Prema pojednostavljenoj definiciji, pčelinja pelud je hrana koja je proizvod pčela, a služi kao izvor hranjivih tvari za razvoj i održavanje zajednice (Saavedra i sur. 2013.). Utvrđeno je kako pčele skupljačice prikupljanju pelud prema mirisu i konfiguraciji cvjetova, radije nego prema nutritivnoj vrijednosti peludi. Tipična zajednica od 20 000 jedinki prikupi oko 57 kg peludi godišnje, a jedna radilica može prenijeti pelud koja čini do 35 % njene mase (Ellis i sur. 2010.).

2.2. Važnost peludi za pčelinju zajednicu

Pčelinja potreba za nutrijentima je vrlo slična onoj ljudskoj; za normalan rad metabolizma trebaju osigurati optimalne količine bjelančevina, ugljikohidrata, masti, minerala, vitamina i vode. Nektar, kojeg medonosna pčela kemijskim procesima skladišti u obliku meda, glavni je izvor ugljikohidrata. Pelud u formi pčelinjeg kruha je glavni izvor bjelančevina, masti i vitamina, a neophodna je za uzgoj legla te razvoj mladih pčela (Ellis i sur. 2010.). Mlade pčele radilice konzumiraju preko 80 % uskladištene peludi kako bi zadovoljile potrebe za tjelesni razvoj (Crailsheim 1991.; Naiem 1999.). Prema Haydak (1970.) mlade radilice zahtijevaju velike količine peludi da bi razvile podždrijelne žlijezde koje izlučuju matičnu mliječ te stvorile potrebne rezerve u organizmu koje su im potrebne za kasniju ulogu hraniteljica, graditeljica i skupljačica.

2.3. Botaničko podrijetlo i kemijski sastav pčelinje peludi

Pelud sadrži muške spolne stanice te mu je glavna svrha oplodnja ženskih spolnih stanica, a taj proces nazivamo oprašivanje. Pelud nalazimo na prašnicima svih cvjetova, a skup svih prašnika jednog cvijeta nazivamo andrecej. Oprašivanje se najčešće odvija pomoću vjetra, vode i različitih vrsta kukaca, a medonosne pčele imaju poseban značaj u oprašivanju biljnih kultura (Bogdanov 2016.). Navodi se kako su upravo medonosne pčele oprašivanjem izravno utjecale na 9,5 % ukupne poljoprivredne proizvodnje koja se koristi za prehranu ljudi, što čini vrijednost od 153 milijarde eura (Gallai i sur. 2009.).

Peludna zrnca su izvor velikih morfoloških varijacija između biljnih vrsta te kao takva nisu pod vanjskim utjecajima nego su izvor isključivo genetskih karakteristika biljne vrste, što čini svako peludno zrnce unikatnim primjerkom (Barth i sur. 2022.). Kao što je navedeno u prethodnom poglavlju, glavni sastav peludi su bjelančevine koje čine većinski udio, zatim slijede ugljikohidrati, masti, minerali, vitamini i voda. Anjos i sur. (2017.) navode kako se prosječan udio vode u svježoj pčelinjoj peludi kreće od 3,4 do 6,1 %. U tablici 2.3. prikazan je prosječan sastav osušene pčelinje peludi.

Tablica 2.3 Sastav osušene pčelinje peludi

Sastavnica	(g/100 g)
Ugljikohidrati	13 – 55
Bjelančevine	10 – 40
Prehrambena vlakna	0,3 – 20
Masti	1 – 13
Pepeo	2 – 6
Ostalo	2 – 5
Makroelementi	(mg/kg)
Kalij	4 000 – 20 000
Fosfor	800 – 6 000
Kalcij	200 – 3 000
Magnezij	200 – 3 000
Mikroelementi	(mg/kg)
Cink	30 – 250
Željezo	11 – 170
Mangan	20 – 110
Bakar	2 – 16
Vitamini	(mg/kg)
Vitamin C	70 – 560
Vitamin A (retinol)	10 – 200
Vitamin E (tokoferoli)	40 – 320
Niacin	40 – 110
Vitamin B2 (riboflavin)	6 – 20
Pantotenska kislina	5 – 20

Vitamin B1 (tiamin)	6 – 13
Folna kislina (folat)	3 – 10
Vitamin B6 (piridoksin)	2 – 7
Biotin	0,5 – 0,7

Izvor: Campos i sur. (2008.)

2.4. Skladištenje pčelinje peludi u stanice saća

Postupak skladištenja peludi započinje pri samom procesu skupljanja peludi s prašnika. Skupljenoj peludi s prašnika pčele dodaju nektar kojeg čuvaju u svom probavnom sustavu (mednom mjevuru) da bi napravili kompaktnu smjesu koju mogu prenijeti u košnicu, a da se ne raspadne. Nakon što pčela skupljačica prikupi dovoljno peludi u košaricama stražnjih nogu, vraća se u košnicu te dolazi do postupka odlaganja peludi u stanice saća. Pri tome im pomažu kućne pčele koje čeljustima i prednjim nogama pomažu dodatno utisnuti pelud prikupljenu od skupljačica u stanice saća (Kezić i sur. 2014.). U literaturi se uobičajeno navodi kako pčele skladište pelud u stanice saća do dubine od otprilike $\frac{3}{4}$ stanice (Barene i sur. 2014.; Ivanišová i sur. 2015.), dok neki autori navode kako uskladištena pelud u stanicama zauzima oko $\frac{2}{3}$ stanice (Quinby 2008.).

Kako bi održala svoja nutritivna svojstva prikupljena pelud treba biti ispravno uskladištena, a u tu svrhu pčele je pri utiskivanju u stanice saća dodatno obogaćuju medom i/ili nektarom te enzimima iz žlijezda slinovnica, a skladište je u stanice saća kojima imaju pristup sve odrasle radilice (Carroll i sur. 2017.). Na slici 2.4. je prikazano saće s pčelinjim kruhom, pri čemu se može vidjeti više različitih nijansi zbog različitog botaničkog podrijetla peludi te stadija mliječno-kisele fermentacije.



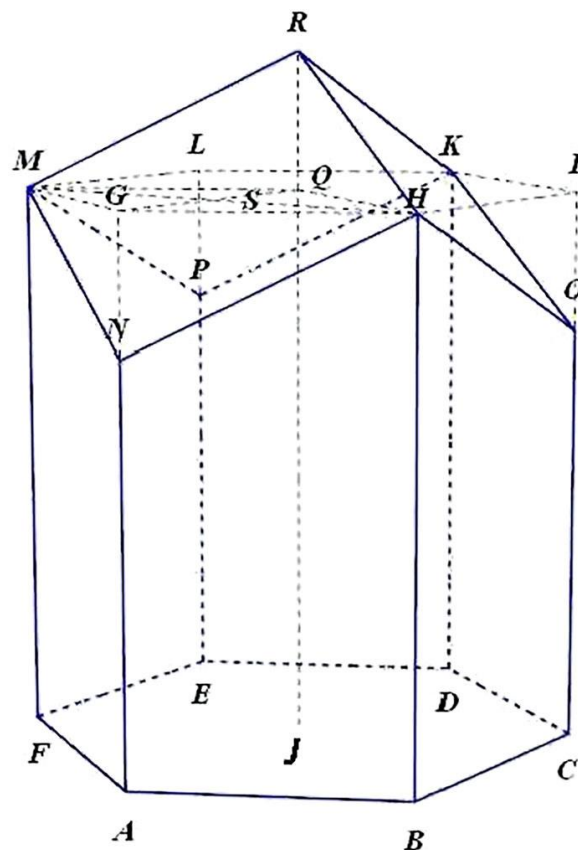
Slika 2.4. Stanice saća sa pčelinjim kruhom

Izvor: Anderson (2022.)

2.4.1. Dimenzije stanica saća

Pčelinje saće je sastavljeno od mnogobrojnih stanica, oblika šesterostranog valjka dok je dno sastavljeno od tri plohe u obliku romba. Širina stanice kreće se od 2,25 – 2,75 mm, dubine od 10 – 11 mm te je debljina stanica otprilike 0,75 mm (Huber 1814.; Cowan 1896.; Martin 1966.). Prema Darchenu (1954.) način gradnje stanica koje su zbijene i paralelne jedna uz drugu te oblika šesterostranog valjka omogućavaju maksimalnu iskorištenost prostora, a da pritom ne smanjuju mobilnost pčela unutar zajednice. Takav fenomen je i opisan, a naziva se Darchenovo pravilo paralelizma.

Prema Svečnjak i sur. (2019.) mjerenje dubine stanica saća može se provesti na više načina, a odabir metode ovisi o svrsi istraživanja. Tako se mjerenje može provesti na 3 načina (slika 2.4.1.): mjerenjem najdublje točke u stanici (J-R), mjerenjem najkraćih postranih točaka u stanici (C-O; A-N; E-L) i/ili mjerenjem najdubljih postranih točaka (B-H; D-K; E-P). Kao mjerni alat najjednostavnije je koristiti pomično mjerilo zbog preciznosti.



Slika 2.4.1. Prikaz stanice saća s mogućim točkama mjerenja dubine stanice
Izvor: Huber (1814.)

2.4.2. Proces transformacije pčelinje peludi u pčelinji kruh

Da bi zadržala hranjiva svojstva, pelud pohranjena u stanicama saća prolazi kroz složen proces konzerviranja. Prilikom utiskivanja peludi u stanice saća radilice peludi dodaju probavne enzime te med. Radilice dodatkom meda na prikupljenu pelud ujedno štite i od kisika što omogućava kasniju fermentaciju (Barene i sur. 2014.). Navodi se kako enzimi žlijezde slinovnice, poput amilaze, zatim bakterije te pojedini kvasci imaju najveći utjecaj u procesu fermentacije, odnosno nastajanja pčelinjeg kruha (Didaras 2020.; Gilliam 1979.; Vásquez 2009.).

U mikrobiološkoj analizi svježe i tek uskladištene peludi pronađeno je 5 koljena bakterija; *Proteobacteria* (48 %), *Firmicutes* (44 %), *Bacteroidetes* (4 %), *Actinobacteria* (3 %), i *Cyanobacteria* (0.1 %), dok je ustanovljeno 26 različitih rodova bakterija, a najveći broj čine *Lactobacillus* (2-76 %), *Pseudomonas* (5-42 %) i *Acinetobacter* (1-25 %) (Friedle i sur. 2021.). Poznato je kako upravo Gram-pozitivne bakterije iz roda *Lactobacillus* razgrađuju ugljikohidrate u mliječnu kiselinu, što je ključan proces u konzerviranju pčelinje peludi.

2.4.2.1. Mliječno-kisela fermentacija i posljedične promjene u kemijskom sastavu

Mliječno-kisela fermentacija je anaeroban proces prilikom kojeg se razgrađuju ugljikohidrati kako bi se proizvela energija u obliku ATP-a, a kao nusprodukt ovog procesa nastaje mliječna kiselina po čemu je i dobila ime. Bakterije iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* pronađene su u probavnom sustavu pčele, pčelinjoj peludi i pčelinjem kruhu, a navodi se kako bakterije iz roda *Lactobacillus* čine dominantnu mikrobiotu u medu (90,9 %), pčelinjoj peludi (74,6 %), pčelinjem kruhu (74,6 %) i matičnoj mliječi (93,3 %) (Asama i sur. 2015.). Bakterije iz roda *Bifidobacterium* su manje zastupljene, pronađene su u probavnom sustavu medonosne pčele, a pomažu pri razgradnji polisaharida (Chen i sur. 2021.). Prilikom utiskivanja pčelinje peludi u stanicu saća, radilice prenose enzime na pčelinju pelud koji također utječu na proces fermentacije, odnosno od izuzetne su važnosti zbog razgradnje eksine (vanjske stijenke peludi) koja je sastavljena od sporopolenina (Atkin i sur. 2011.).

Prema Mărgăoan i sur. (2020.) proces mliječno-kisele fermentacije uzrokuju bakterije *Pseudomonas* spp. i *Lactobacillus* spp. i kvasci *Saccharomyces* spp., a sam proces traje otprilike sedam dana nakon razvoja mliječno-kiselih bakterija, kvasaca, produkata indola bakterije *Escherichia* spp. i pojedinih aerobnih bakterija. Isti autori navode kako prva faza traje otprilike dvanaest sati tijekom koje je prisutna pojačana aktivnost heterotrofnih mikroorganizama te kvasaca koji razgrađuju ugljikohidrate. U drugoj fazi anaerobne bakterije pojačavaju svoju aktivnost koristeći nutrijente proizvedene od heterotrofnih mikroorganizama te kvasaca pri čemu dolazi do sniženja pH vrijednosti, te u trećoj fazi dolazi do nestanka *Streptococcus* spp. te rasta mliječno-kiselih bakterija *Lactobacillus* spp. U zadnjoj fazi, koja započinje krajem sedmog dana, mliječno-kisele bakterije te pojedini kvasci

umiru zbog nastanka mliječne kiseline, a pH vrijednost pada na pH = 4, što čini pčelinju pelud gotovo mikrobiološki sterilnom (Khalifa i sur. 2020.).

U istraživanju koje je proveo Gilliama (1979.) utvrđeno je 25 vrsta kvasaca u pčelinjoj peludi i kruhu, a od toga je šest utvrđeno u pčelinjem kruhu, dok je ostalih 19 utvrđeno u pčelinjoj peludi. Najviše su detektirani sljedeći kvasci: *Torulopsis magnoliae*, *Cryptococcus flavus* i *Cryptococcus albidus* var. *albidus* i *diffluens*.

Kieliszek i sur. (2018.) navode kako se dominantna skupina mikroorganizama u pčelinjem kruhu nakon fermentacije sastoji od gljivica i spora *Bacillus* spp., a navode i kako gljivice mogu negativno utjecati na pčelinji kruh te promijeniti njegovu hranidbenu vrijednost, no te iste bakterije i gljivice imaju sposobnost proizvodnje enzima, vitamina, protubakterijskih tvari, masti te organskih kiselina koji mogu dugoročno pridonijeti stabilnosti pčelinjeg kruha. DeGrandi-Hoffman i sur. (2013.) navode kako *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* imaju inhibicijsku sposobnost sprječavanja pojave 'loših' bakterija poput *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, te sojeva Gram-negativnih bakterija *Escherichia coli* i *Campylobacter jejuni*.

2.5. Pčelinji kruh

Od davnina su poznati mnogi pčelinji proizvodi (med, pčelinji vosak, pčelinja pelud, matična mliječ, propolis i pčelinji otrov), no pčelinji kruh je relativno novi proizvod na tržištu te zbog svojih nutritivnih i ljekovitih svojstava postaje sve popularniji među potrošačima. Taj je proizvod mješavina peludi, meda i bakterija mliječne kiseline te kao takav služi za prehranu pčelinje zajednice, a posebice je značajan kao glavni izvor bjelančevina (Bakour i sur. 2019.). Također je okarakteriziran kao puno kvalitetniji izvor nutrijenata od sirove pčelinje peludi, lakše je probavljiv te bogatiji dostupnim kemijskim elementima (Kieliszek i sur. 2018.). Na slici 2.5. je prikazan tipičan izgled pčelinjeg kruha izvađenog iz stanica saća.



Slika 2.5. Pčelinji kruh
Izvor: Kieliszek i sur. (2018.)

2.5.1. Kemijski sastav i nutritivna svojstva pčelinjeg kruha

Sastav pčelinje peludi i pčelinjeg kruha je sličan, no nije i isti; dodani enzimi u pčelinjem kruhu čine ga dostupnijima za apsorpciju, a sadrži i više ugljikohidrata (Kieliszek i sur. 2018.). Prosječan sastav pčelinjeg kruha čini voda u udjelu od 11,40 % – 15,90 %, ugljikohidrati od 13 – 55 %, bjelančevine 14,80 % – 24,30 %, masti 5,90 % – 11,5 % te pepeo 1,90 % – 2,50 % (Kaplan i sur. 2016.). Najvažniji sastavnica pčelinjeg kruha su bjelančevine; prema Urcan i sur. (2017.) količina bjelančevina varira između 14,1 g – 37,3 g / 100 g suhe tvari. Najzastupljenije aminokiseline u pčelinjem kruhu su glutamin, asparagin, prolin, arginin, valin, histidin, leucin, izoleucin, lizin, metionin, triptofan, fenilalanin, treonin, cistein, tirozin, alanin, glicin i serinin (Urcan i sur. 2017.). U istraživanju Mohammad i sur. (2020.) utvrđeno je kako su arginin i fenilalanin bile najzastupljenije aminokiseline u pčelinjem kruhu.

Podrijetlo aminokiselina je u najvećoj mjeri od nektara, medne rose te peludi, a u manjoj mjeri i od pčelinjih izlučevina. Botanički sastav pčelinjeg kruha, kao i drugih pčelinjih proizvoda, može se utvrditi upravo zbog prisustva određenih aminokiselina (Bakour i sur. 2019.). Udio prolina i glutaminske kiseline u pčelinjem kruhu izravno je povezana s kvalitetom pčelinje peludi pa tako koncentracija glutaminske kiseline viša od 20 mg/g ukazuje na svježinu, dok nizak udio prolina ukazuje na starost pčelinjeg kruha (Dominguez - Valhondo i sur. 2011.).

Od ugljikohidrata u pčelinjem kruhu, najviši je udio fruktoze čija prosječna količina iznosi oko 11,8 g / 100 g. Druga po zastupljenosti je glukoza čija je prosječna količina 5,7 g / 100 g, a zatim slijedi trehaloza s udjelom od 0,92 g / 100 g (Bakour i sur. 2019.). Prema Stanciu i sur. (2009.) zastupljenost saharoze je 0,12 %, a njena manja zastupljenost je rezultat procesa hidrolize u glukozu i fruktozu tijekom mliječno-kisele fermentacije peludi, pri kojoj nastaje pčelinji kruh, dok ostali manje zastupljeni ugljikohidrati čine udio od 1,82 % (trehaloza, turanoza i izomaltoza).

U pčelinjem je kruhu pronađeno ulupno 25 masnih kiselina, a frakcija masnih kiselina se sastoji od 11 nezasićenih i 14 zasićenih. Najveći udio čine arahidonska (0,5 - 23,2 mg / 100 g), palmitinska (0,6 – 10,4 mg / 100 g) i linolna kiselina (0,1 – 14,2 mg / 100 g) (Bakour i sur. 2019.). Bogati mineralni sastav pčelinjeg kruha čine kalcij, magnezij, fosfor, željezo, natrij, kalij, aluminij, mangan, sumpor i bakar, a navodi se kako je kalij pronađen u najvećoj koncentraciji (338 mg / 100 g), a prema zastupljenosti ga slijede fosfor (251 mg / 100 g) i kalcij (198 mg / 100 g) (Campos 2008.). Isti autori navode kako je količina željeza (121,99 mg / kg) i cinka (44,09 mg / kg) također vrlo visoka u pčelinjem kruhu.

Od vitamina u pčelinjem kruhu je utvrđena askorbinska kiselina (vitamin C), pantotenska kiselina (vitamin B5), niacin (vitamin B3), pirodoskin (vitamin B6) i inozitol (vitamin B8) (Loper i sur. 1980.).

Istraživanjem Sobrala i sur. (2017.) utvrđena su 32 flavonoida u pčelinjem kruhu, a najviše je derivata flavanol glikozida, kvercetina, kempferola, miricetina, izorhamnetina. Pascoal i sur.(2014.) navode kako udio flavonoida u pčelinjem kruhu varira od 3,7 do 10,10

mg / g. Što se tiče udjela fenolnih spojeva, navodi se kako pčelinji kruh sadrži galnu, protokatehuidnu, salicilnu, kavenu, vaniličnu, klorogensku, p-kumarinsku i ružmarinsku kiselinu, te miricetin, luteolin, kvercetin i kemferol (Dranca i sur. 2020.). U istraživanju koje su proveli Bayram i sur. (2021.) utvrđeno je ukupno 23 fenolnih spojeva u pčelinjem kruhu, a najveći udio su činili kvercetin, kamferol i galna kiselina.

Enzimi pronađeni u pčelinjem kruhu uključuju amilazu, fosfatazu te glukoza oksidazu (Salazar-González i sur. 2016.). Amilaza hidrolizira škrob, fosfataze kataliziraju hidrolizu fosfatnih monoestera, dok glukoza oksidaza katalizira oksidaciju glukoze u vodikov peroksid i D-glukono- δ -lakton. U Tablici 2.5.1. prikazan je prosječan sastav pčelinjeg kruha.

Tablica 2.5.1. Prosječan sastav pčelinjeg kruha

Komponente	g/100 g pčelinjeg kruha
Masti	1,90 \pm 0,06
Bjelančevine	19,96 \pm 0,08
Pepeo	3,32 \pm 0,08
Ugljikohidrati	74,82 \pm 0,04
Energija	396,2 \pm 0,4
Organske kiseline	g/100 g pčelinjeg kruha
Oksalna kiselina	0,383 \pm 0,004
Ugljikohidrati	g/100 g pčelinjeg kruha
Fruktoza	11,8 \pm 0,6
Glukoza	5,7 \pm 0,4
Trehaloza	0,92 \pm 0,01
Ukupno ugljikohidrati	18 \pm 1
Makroelementi	mg/100 g pčelinjeg kruha
Ca	198 \pm 4
Fe	27,3 \pm 0,3
K	338 \pm 8
Mg	61 \pm 2
Na	14,2 \pm 0,1
Zn	3,31 \pm 0,04
P	251 \pm 4
Mn	2,6 \pm 0,1
Mikroelementi	μg/100 g pčelinjeg kruha
Cd	5,4 \pm 0,1
Co	38 \pm 0,1
Cu	700 \pm 20
Ni	26 \pm 6
Se	9 \pm 1
Pb	7 \pm 2

Izvor: Bakour i sur. (2019.)

2.5.2. Organoleptička svojstva pčelinjeg kruha

Boja pčelinjeg kruha je raznolika, a na boju najviše utječe samo botaničko podrijetlo prikupljene pčelinje peludi koja je najčešće mješavina peludi više biljnih vrsta (multiflorna pelud). Pelud u prirodi pronalazimo u različitim bojama, od gotovo bijele, žute, narančaste i jarkocrvene do sive i gotovo crne, no pčelinji kruh nakon pohranjivanja u stanice saća, dodatka meda i enzima te posljedične fermentacije mijenja izvornu boju te je ona više-manje ujednačena, od tamno žute do tamno smeđe. Okus koji je specifičan i oštar, dolazi od mješavine peludi različitih biljnih vrsta s koje je pelud prikupljena od strane pčela skupljačica, a zbog niske pH vrijednosti od 4,4, pčelinji kruh ima kiselkasti okus (Dranca i sur. 2020.). Anderson i sur. (2014.) navode kako fermentirana pčelinji kruh najčešće ima jantarnu boju te bogatu cvjetnu i citrusnu aromu.

2.5.3. Skupljanje i čuvanje pčelinjeg kruha

Nakon što dođe do potrebe za skupljanjem, odnosno vađenja pčelinjeg kruha iz stanice saća, treba odabrati okvir koji sadrži najviše pčelinjeg kruha zbog same praktičnosti cjelokupnog postupka. Postoje razni načini skupljanja, no najčešći je ručni kojim se reže saće te se pomoću pincete ili špatule skuplja pčelinji kruh te pohranjuje u staklene posudice za čuvanje.

Prema Akhmetova i sur. (2012.) postoje razne tehnike skupljanja pčelinjeg kruha, kao što su namakanje saća u vodi, ručno izvlačenje uz pomoć vibracija, sušenje te izvlačenje pomoću vakuuma, smrzavanje i skupljanje te mrvljenje saća i odvajanje (filtriranje) ostataka voska od pčelinjeg kruha. Nažalost, sve navedene tehnike imaju mnogo nedostataka; namakanjem u vodi dolazi do mogućnosti rasipanja te kvarenja pčelinjeg kruha, a ostale tehnike zahtijevaju puno ručnog rada i utrošenog vremena. Lebedev (2005.) navodi kao najefikasniji način prikupljanja pčelinjeg kruha tehnologiju koja uključuje četiri faze: sušenje, rezanje saća na manje komade, filtriranje sadržaja te sterilizacija produkta. Nakon što se izvadi okvir sa saćem, ostavlja se sušiti na temperaturi od 40 °C 8 – 10 sati, dok udio vode ne padne na 14 – 15 %. Nakon ove faze materijal se stavlja na sušenje u vakuumu pri istoj temperaturi u vremenu od 5 – 7 sati gdje udio vode pada na 10 %. U ovoj fazi pčelinji kruh postaje krući što olakšava njegovo izvlačenje iz stanica saća. Osušeno saće se zatim hladi na – 1 °C te se melje na čestice veličine 4,9 – 5 mm što omogućuje odvajanje saća od pčelinjeg kruha. Nakon toga se filtrira u specijaliziranom stroju (primjerice stroju za čišćenje sjemena) pri čemu se koristi zrak te perforirane ploče od 2,6 mm, a time uklanja vosak. Dobiveni pčelinji kruh u zadnjoj fazi ide na sterilizaciju gama zračenjem te plinskom smjesom metilena i etilen-oksida. Nakon ovog postupka dolazi do izazova kako pohraniti pčelinji kruh da bi se održala kemijska stabilnost i mikrobiološka ispravnost koji su vrlo važan čimbenik.

O samom čuvanju pčelinjeg kruha nema puno dostupne literature, no postoji istraživanje koje opisuje nekoliko metoda čuvanja te prednosti istih. Prema Smati (2022.) pčelinji kruh se može čuvati više mjeseci ako je ispravno odrađen postupak fermentacije u

saću pri idealnoj vlažnosti i temperaturi od 35 – 36 °C. Uvjeti procesa fermentacije i visoke razine mliječne kiseline, kao i drugih metabolita, dugoročno pozitivno utječu na čuvanje te sprječavaju ubrzano narušavanje nutritivne vrijednosti.

U istraživanju Combeya (2017.) su testirane tri metode čuvanja pčelinjeg kruha: pohranjivanje pri nižim temperaturama, zamrzavanje te sušenje u pećnici. Udio vode kao bitan čimbenik očuvanja pčelinjeg kruha je bio najniži kod procesa sušenja (6,50 %), dok je kod čuvanja u zamrznutom stanju bio značajno viši (15 – 25 %). Što se tiče udjela bakterija, sušeni pčelinji kruh je imao najmanji udio, dok su druga dva postupka rezultirala dvostruko većom koncentracijom. Boja je ostala ista kod procesa zamrzavanja, dok je kod sušenog pčelinjeg kruha postala tamnosmeđa, a okus je bio isti kod sva tri postupka (Combey 2017.). S obzirom na povećani trend potražnje za ovim proizvodom, potrebna su daljnja istraživanja i optimizacija postupka čuvanja pčelinjeg kruha.

2.5.4. Pčelinji kruh kao hrana (dodatak prehrani)

Zbog sve većeg trenda „zdrave prehrane“, pčelinji kruh postaje sve zanimljiviji dodatak prehrani zbog brojnih blagodati za organizam. Značaj ovog pčelinjeg proizvoda krije se u njegovoj nutritivnoj vrijednosti, prisustvu visoke količine bjelančevina, vitamina te fenolnih spojeva koji su izvor prirodnih protuoksidansa, a najveći utjecaj na sastav ima flora regije iz koje je prikupljen te ispravno vrijeme skupljanja pčelinjeg kruha (Ivanišová i sur. 2015.). Minerali čine veliki udio, a navode se velike količine željeza, fosfora, kobalta i kalcija te kako je pčelinji kruh jedna od najbogatijih namirnica selenom. Od vitamina najviše je A, B1, B2, B3, B6, B12, C, E, D, K i H (Karaman, 2019.).

Zbog fenolnih kiselina te flavonoida, pčelinji kruh ima posebnu protuoksidativnu aktivnost koja je ključna u zaštiti stanica (Urcan i sur. 2017.). Istraživanja su pokazala kako pčelinji kruh povoljno utječe na obnavljanje jetre kod ovisnika o alkoholu, kroničnog hepatitisa, a uspješno pomaže u regulaciji masti u organizmu te ima povoljan učinak na imunosni sustav pacijenata koji boluju od artritisa, kardiovaskularnih bolesti te dijabetesa (tip dva)(Urcan i sur. 2017.).

U tablici 2.5.4. navedeni su udijeli skupine nutrijenata u pčelinjoj peludi i pčelinjem kruhu te potrebne dnevne količine (eng. *Recommended Dietary Allowances*, RDA) za čovjeka, iz čega se može zaključiti kako ova dva pčelinja proizvoda pokrivaju dnevnu potrebu unosa navedenih nutrijenata.

Tablica 2.5.4. Udio nutrijenata u pčelinjoj peludi i kruhu te preporučeni dnevni unos (RDA) za čovjeka

Sastavnica / nutrijent	Pčelinja pelud (%)	Pčelinji kruh (%)	RDA za 15g (%)
Bjelančevine	7 – 40	14 – 37	5 – 22
Ugljikohidrati	24 – 60	24 – 34	1 – 4,6
Mliječna kiselina	0,56	3,2	–
Masti	1 – 18	6 – 13	0,1 – 4
Celuloza	3,7	2,7	–
Flavonoidi	0,2 – 0,7	nema podataka	0,03
Vitamini	0,02 – 0,7	nema podataka	2,70
Nukleinska kiselina	0,6 – 4,8	nema podataka	–
pH	3,8 – 6,3	4,3	–

Izvor: Kieliszek i sur. (2018.)

2.6. Analiza pčelinje peludi i pčelinjeg kruha

Analiza pčelinje peludi započinje prikupljanjem svježe peludi na način da se na košnicu postave skupljači peludi, posebno perforirane ploče koja omogućavaju prolazak pčela radilica, no ne i peludi skupljene na košaricama stražnjih nogu prilikom čega se pelud iz košarica odvaja te skuplja u posude. Pri skupljanju peludi navodi se kako bi trebalo ostaviti dio leta bez skupljača peludi kako bi pčele mogle i dalje nesmetano unositi pelud, a što pomaže optimalnom pohranom peludi bez narušavanja hranidbene potrebe zajednice (Hooveri i Ovinge 2018.). Uobičajeno se pomoću skupljača peludi prikuplja multiflorna pčelinja pelud koja se po potrebi (ovisno o cilju istraživanja) može razdvojiti prema boji, odnosno botaničkom podrijetlu, kako bi se dobili uzorci uniflorne pčelinje peludi (Slika 2.6.). Za uzimanje uzoraka pčelinjeg kruha potrebno je izvaditi saće iz košnice te ručno prikupiti uzorke iz stanica saća. Cilj istraživanja ujedno određuje i adekvatnu metodu analize. Metode za istraživanje pčelinje peludi su standardizirane i obuhvaćaju niz klasičnih fizikalno-kemijskih i instrumentalnih analitičkih alata (Campos i sur. 2021.), a mnoge od njih su primijenjive i na analizu pčelinjeg kruha.



Slika 2.6. Uzorci različitih vrsta uniflorne pčelinje peludi
Izvor: Svečnjak (2021.)

2.6.1. Klasične fizikalno-kemijske i mikroskopske metode

Klasičnim fizikalno-kemijskim analizama najčešće se istražuje udio vode u uzorcima, količina ugljikohidrata, bjelančevina, masti, minerala i vitamina. U svrhu utvrđivanja botaničkog podrijetla pčelinje peludi provodi se peludna analiza (mikroskopiranje peludnih zrnaca u sedimentu uzoraka). Uobičajeno je kod analize botaničkog podrijetla pčelinje peludi, od skupljene pčelinje peludi (minimalno 10 – 25 uzoraka) potrebno napraviti jedinstveni uzorak od prikupljenih peludnih tereta na način da se izmiješaju s dodatkom 70 % -tnog etanola (10 ml). Nadalje, uzorci se centrifugiraju (3 minute na 1500 okretaja / minuti), a dobivenom sedimentu se ponovno dodaje etanol i ponavlja se centrifugiranje. Zatim se dodaje 5 ml smjese vode i glicerina (1:1) nakon čega se protresu te ostave 30 minuta. Uzorci iz epruveta se izmiješaju te ostave na papiru koji apsorbira višak tekućine te se uzorci prikupe na predmetno stakalce i dodaje im se glicerol i želatina kako bi olakšala mikroskopska identifikacija peludnih zrnaca (Barth i sur. 2022.). Uz klasično mikroskopiranje svjetlosnim mikroskopom, pčelinja se pelud može istraživati i sofisticiranijim mikroskopskim tehnikama, kao što su transmisijski elektronski mikroskop (eng. *transmission electron microscope* - TEM) i pretražni elektronski mikroskop (eng. *scanning electron microscope* - SEM) koji omogućuje trodimenzionalni prikaz peludnih zrnaca (Campos i sur. 2008.).

2.6.2. Instrumentalne analitičke metode

Instrumentalne analize se mogu podijeliti na kvalitativne, u koje spada kromatografija, elektroforeza te spektroskopija i elektrodni potencijal, te na kvantativne metode koje obuhvaćaju spektrometriju koja mjeri svojstva prema koncentraciji, a često se koriste iste instrumentalne analize za kvalitativna i kvantativna istraživanja (Diamant i Girard 2000.).

Campos i sur. (2021.) navode kako se korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC; *diode-array detection*, DAD) može brzo i efikasno identificirati fenole i polifenole u pčelinjoj peludi i pčelinjem kruhu. Spomenuti autori navode i metodu analize korištenjem tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (eng. *Liquid chromatography-mass spectrometry*, LC/MS) s kojom se mogu utvrditi detaljni profili fenola u pčelinjoj peludi. Također, navode i brojne klasične fizikalno-kemijske metode kojima se određuje sadržaj bjelančevina, ugljikohidrata i masti u pčelinjoj peludi, te standardizirane metode za analizu sadržaja vitamina i minerala.

Često se pri istraživanju pčelinje peludi koristi kombinacija fizikalno-kemijskih i instrumentalnih analitičkih metoda kako bi se provela što detaljnije kemijska karakterizacija uzoraka. Tako su primjerice u okviru svog istraživanja Prđun i sur. (2021.) koristili metode mjerenja udjela vode u peludi pomoću vakuumske sušionike, udjela pepela gravimetrijskom metodom, udio bjelančevina određen je pomoću Kjeldahl metode, ekstrakcija ukupne količine masti prema Soxhletu, determinacija udio ugljikohidrata pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC), ekstrakcija i identifikacija hlapljivih spojeva pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi u kombinaciji s plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (eng. *Headspace- solid phase microextraction / gas chromatography-mass spectrometry*, HS-SPME/GC-MS), dok je utvrđivanje cjelokupnog kemijskog sastava pčelinje peludi temeljem kemijskog *fingerprintinga* provedeno metodom infracrvene spektroskopije (eng. *infrared spectroscopy*, IR).

2.6.2.1. Infracrvena spektroskopija

Prema definiciji spektroskopija je interakcija tvari s elektromagnetskim zračenjem, a koristi se pri detekciji i identifikaciji materije, atoma i molekula (El-Azazy 2018.). Infracrvena spektroskopija spada u instrumentalnu analitičku metodu koja služi za detekciju funkcionalnih skupina prisutnih u molekulama, a pritom koristi područje spektra elektromagnetskog zračenja u rasponu od od 0,8 do 1000 μm (800 nm – 1mm). Spektri dobiveni ovom analizom rezultat su periodičnih gibanja atomskih jezgri unutar molekula, jezgre se kreću zajedno ili odvojeno pravocrtnom linijom te se pritom rotiraju, vibriraju i pomiču. Spektri dobiveni ovom tehnikom prikazuju apsorbirano IR zračenje kao funkciju valnih duljina, a apsorbira se samo svjetlo čija je frekvencija identična onoj frekvenciji

vibracija veza u molekuli. Čimbenici koji određuju apsorpcijski položaj su masa atoma u molekuli, vrsta vibracije te jačina intramolekulskih veza (Workman i Weyer 2007.). Veličine koje se koriste u infracrvenoj spektroskopiji su valna duljina, frekvencija i valni broj. Valni broj predstavlja recipročnu vrijednost valne duljine, a mjerna jedinica za valni broj je cm^{-1} . Infracrveno spektralno područje prema valnom broju pokriva područje od 12500 do 10 cm^{-1} , a sastoji se od bliskog, srednjeg i dalekog infracrvenog područja. Pri analizi organskih i bioloških uzoraka najčešće se koristi srednja infracrvena spektroskopija, odnosno analiza uzoraka u spektralnom području od 4000 do 400 cm^{-1} .

U analitici bioloških uzoraka posebice se ističe infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (eng. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR) s ATR (eng. *attenuated total reflectance*, ATR; prigušena totalna refleksija) tehnikom snimanja spektara. FTIR podrazumijeva IR spektroskopiju u srednjem infracrvenom dijelu spektra, a prednosti ove metode se očituju u jednostavnosti, nedestruktivnosti i brzini snimanja spektara. Razlika naspram konvencionalne infracrvene spektroskopije je u dodatku algoritma Fourierove transformacije koji svaku periodičku funkciju zapisuje kao sumu sinusa različitih amplituda, faza i frekvencija, dok ATR tehnika koristi materijale visokog indeksa loma svjetlosti (primjerice cinkov selenid, germanij, dijamant) pri čemu IR zrake padaju na uzorak pod određenim kutom te se skoro u potpunosti reflektiraju (Berthomieu i sur. 2009.). Ova tehnika snimanja IR spektra znatno pojednostavljuje spektralnu analizu, a za analizu je ujedno dostatna mala količina uzorka (~ 0,05 g) što predstavlja značajnu prednost u odnosu na druge instrumentalne analitičke alate.

3. Materijali i metode

3.1. Pokusni dizajn i uzorkovanje

Istraživanje je provedeno na pokusnom pčelinjaku Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Zavod za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju). Uzorci pčelinje peludi prikupljeni su pomoću vanjskog skupljača peludi iz tri pokusne pčelinje zajednice (K1, K2 i K3) sive pčele (*Apis mellifera carnica* Pollman 1879.) koje su bile smještene u u Langstroth-Roothove (LR) košnice. Iz istih pokusnih pčelinjih zajednica izoliran je po jedan okvir s uskladištenim pčelinjim kruhom (dva tjedna nakon uzorkovanja pčelinje peludi) te su prikupljeni individualni uzorci pčelinjeg kruha izravno iz stanica saća. Uzorci su pohranjeni u prikladnu ambalažu te čuvani na -18 °C do spektralne analize. Uz navedeno, prije ekstrakcije pčelinjeg kruha iz stanica, provedena su mjerenja dubine stanice saća (praznih stanica te stanica s uskladištenim pčelinjim kruhom) s ciljem utvrđivanja prosječne dubine stanica do koje pčele pohranjuju peludni sadržaj.

3.2. Prikupljanje uzoraka pčelinje peludi

U svibnju 2021. godine postavljeni su skupljači peludi na tri pokusne pčelinje zajednice, a skupljači su ostavljeni na letu košnice naredna 24 sata. U pokusu su korišteni vanjski skupljači peludi (skupljači peludi postavljeni na letu košnice) (Slika 3.2.1.) koji ustvari predstavljaju perforiranu zapreku koja sprječava unos peludnog tereta u košnicu te omogućuje skupljanje svježe pčelinje peludi iz ladice koja je postavljena ispod skupljača peludi. Uzorci multiflorne pčelinje peludi (Slika 3.2.2.) prikupljeni su iz sve tri pokusne pčelinje zajednice (K1, K2 i K3).



Slika 3.2.1. Vanjski skupljač peludi na letu košnice



Slika 3.2.2. Multiflorna pčelinja pelud prikupljena iz pokusne pčelinje zajednice K1

U svrhu pripreme uzoraka pčelinje peludi za spektralnu analizu, prikupljeni uzorci multiflorne pčelinje peludi ($n = 3$) su usitnjeni i homogenizirani pomoću laboratorijskog porculanskog tarionika (Slika 3.2.3.) te čuvani na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ u Eppendorf tubama (1 mL) do spektralne analize (Slika 3.2.4.).



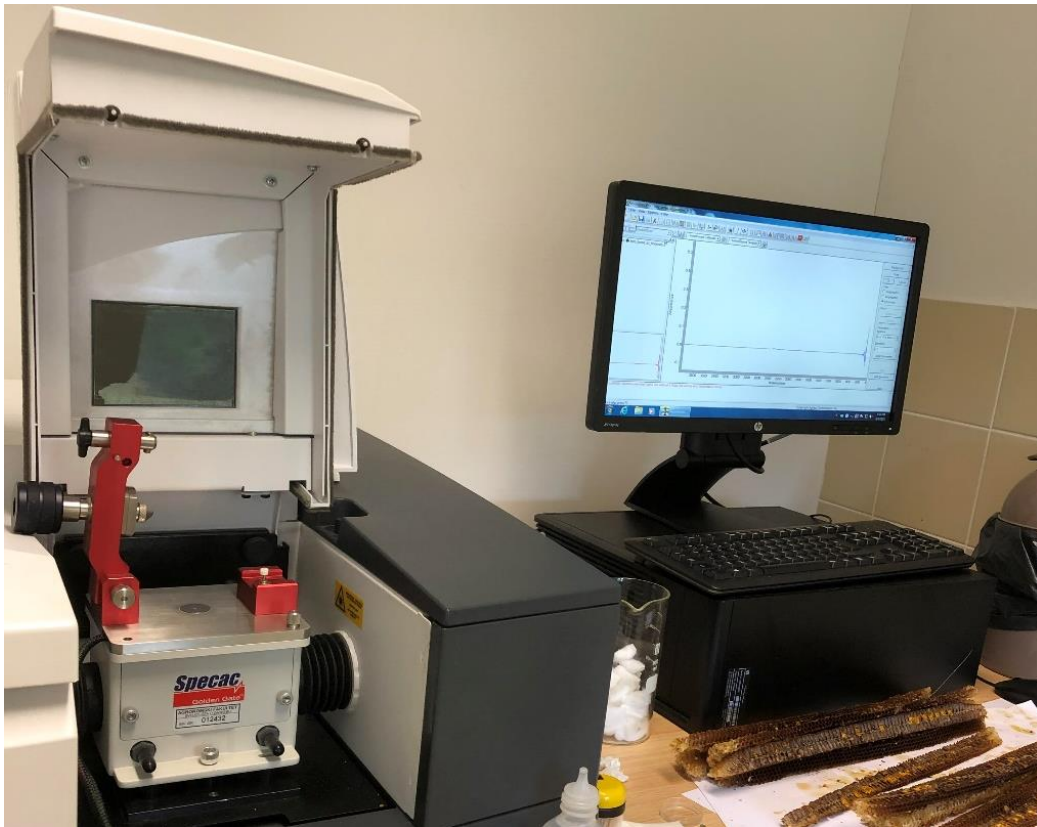
Slika 3.2.3. Priprema pčelinje peludi za spektralnu analizu (homogenizacija uzorka pčelinje peludi pomoću tarionika)



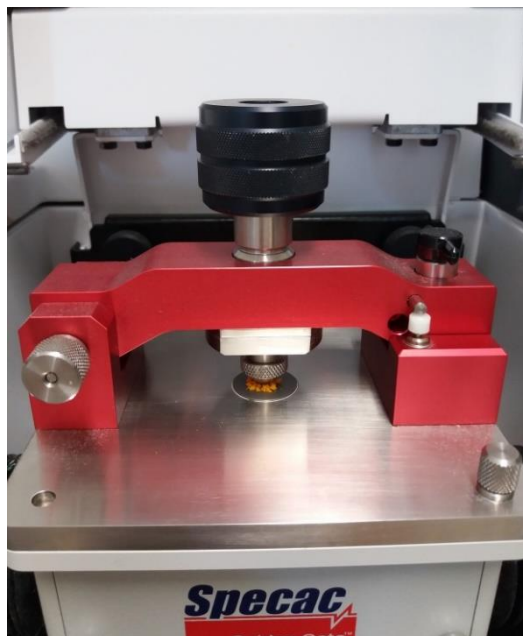
Slika 3.2.4. Uzorci izvorne pčelinje peludi u staklenci i homogenizirane pčelinje peludi u Eppendorf tubama (1 mL)

3.3. FTIR-ATR analiza pčelinje peludi

Uzorci pčelinje peludi snimljeni su FTIR spektrometrom Cary 660 (spektralno područje: $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) s jednorefleskijskim dijamantnim Golden Gate ATR instrumentalnim dodatkom (Specac) (Slika 3.3.1.) sukladno metodologiji koju su opisali Prđun i sur. (2021.). Apsorpcijski spektri pčelinje peludi snimljeni su pri sobnoj temperaturi od $24 \pm 2^\circ\text{C}$ te spektralnoj rezoluciji od 4 cm^{-1} . Svaki spektar snimljen je kao razlika spektra uzorka i ATR kristala bez uzorka, a za svaki spektar je prikupljeno 32 snimaka. Uzorci homogenizirane pčelinje peludi su postavljeni na dijamant ATR ploče te pritisnuti dodatnim instrumentalnim dodatkom sa safirnim kristalom kako bi se omogućilo formiranje tankog sloja uzorka i snimanje IR spektra istog (Slika 3.3.2.).



Slika 3.3.1. FTIR spektrometar Cary 660 s dijamantnim ATR instrumentalnim dodatkom



Slika 3.3.2. Uzorak homogenizirane multiflorne pčelinje peludi između dijamantnog i safirnog kristala ATR elementa

Nakon analize pojedinog uzorka, ATR kristal je očišćen destiliranom vodom te prebrisan pamučnim materijalom kako bi se spriječila kontaminacija narednog uzorka. Snimljeni spektri uzoraka pčelinje peludi pohranjeni su u BSC formatu te kasnije konvertirani u SPC format koristeći softverski paket Resolutions Pro (Agilent Technologies) koji je prikladan za daljnju obradu i analizu spektralnih podataka.

3.4. Uzorkovanje saća i utvrđivanje dubine skladištenja pčelinjeg kruha

Iz tri pokusne pčelinje zajednice izdvojili su se okviri sa saćem u kojem je bio uskladišten pčelinji kruh, te se saće prerezalo na način da se u stanicama saća vidi ispunjenost pčelinjim kruhom. Korištenjem pomičnog mjerila utvrdila se dubina do koje je pohranjen pčelinji kruh sukladno metodologiji Svečnjak i sur. (2019.), a pritom je odabrana metoda mjerenja najdublje točke u stanici. Uz mjerenje stanica ispunjenih pčelinjim kruhom, izmjerila se i dubina praznih stanica kako bi se moglo utvrditi do koje prosječne dubine pčele skladište pčelinji kruh.



Slika 3.4. Presjek stanica saća s vidljivim uskladištenim pčelinjim kruhom

3.5. Prikupljanje i spektralna analiza uzoraka pčelinjeg kruha

Okviri iz tri pokusne pčelinje zajednice s uskladištenim pčelinjim kruhom su (Slika 3.5.) bili prerezani poprečno kako bi se jednostavnije mogao izvaditi pčelinji kruh iz stanica saća, a pri tome je korišten običan nazubljeni nož. Korištenjem pincete ekstrahirani su uzorci pčelinjeg kruha iz pojedinih stanica saća. Iz svake pokusne zajednice prikupljeno je ukupno 35 uzoraka pčelinjeg kruha ($n = 35$).



Slika 3.5. Pčelinji kruh u stanicama saća

Ukupno 105 uzoraka pčelinjeg kruha iz tri pokusne pčelinje zajednice analizirano je metodom FTIR-ATR spektroskopije kako je opisano u poglavlju 3.3. FTIR-ATR analiza pčelinje peludi (prema istom postupku kao i kod snimanja apsorpcijskih spektara pčelinje peludi).

3.6. Obrada i analiza spektralnih podataka

Kvalitativna analiza FTIR-ATR spektara pčelinje peludi i pčelinjeg kruha provedena je s ciljem asignacije apsorpcijskih vrpca odgovarajućim vibracijama funkcionalnih skupina molekula u uzorku, a navedeno je provedeno koristeći softverski paket za kvalitativnu analizu spektralnih podataka Spectragryph (version 1.2.16.1). Daljnja obrada spektara provedena je pomoću programskog paketa za analizu i grafički prikaz spektralnih podataka Origin 8.1. (OriginLab, version 8.1.).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati analize dubine stanica saća

U tablici 4.1.1. prikazana je deskriptivna statistika (prosječna, minimalna i maksimalna vrijednost te standardna devijacija) za dubinu praznih stanica saća (prazne stanice; n = 30), a u tablici 4.1.2. dubina stanica saća s uskladištenom peludi (ispunjene stanice; n = 100) koja je utvrđena tri tjedna nakon mjerenja dubine praznih stanica saća u sve tri pokusne zajednice (K1, K2 i K3). Cjelokupna tablica s podacima o izmjenjenim vrijednostima individualnih stanica saća nalazi se u Prilogu ovog rada.

Iz tablice 4.1.1. je razvidno kako je prosječna dubina praznih stanica saća iznosila 10,99 mm za pokusnu zajednicu K1, zatim 11,01 mm za K2 te 11,01 mm za K3 zajednicu. Minimalna dubina stanica saća na pokusnom okviru iz K1 zajednice bila je 9,71 mm, K2 8,97 mm te K3 9,37 mm, dok je maksimalna dubina stanica saća u pokusnoj zajednici K1 iznosila 12,05 mm, K2 11,98 i K3 12,36 mm. Standardna devijacija za K1 zajednicu iznosila je 0,57 mm, za K2 0,81 mm, dok je za te za stanice saća iz K3 zajednice iznosila 0,79 mm.

Utvrđene prosječne vrijednosti dubine praznih stanica saća u tri pokusne pčelinje zajednice pokazale su veliku sličnost, a najveće razlike su primijećene pri minimalnoj vrijednosti te standardnoj devijaciji. Najveća minimalna vrijednost zapažena je u stanicama saća iz K1 zajednice (9,71 mm), dok je najmanja utvrđena kod stanica iz K2 zajednice (8,97 mm), što čini razliku od 0,74 mm. Analizom maksimalnih vrijednosti utvrđeno je kako je zajednica K3 imala najdublju stanicu saća od 12,36 mm, dok je najniža maksimalna vrijednost dubine stanica saća utvrđena u pčelinjoj zajednici K1 te je iznosila 12,05 mm, što je neznatna razlika od svega 0,29 mm. Standardnom devijacijom utvrđeno je prosječno odstupanje od prosjeka koje je u K1 zajednici iznosilo 0,57 mm, u K2 0,81 mm te u K3 zajednici 0,79 mm. Može se zaključiti da su vrijednosti dubine stanica saća u pčelinjoj zajednici K2 najviše odstupali od prosječne vrijednosti.

Tablica 4.1.1. Deskriptivna statistika za dubinu praznih stanica saća (n = 30 / pokusnoj zajednici)

PARAMETAR	POKUSNA ZAJEDNICA		
	K1	K2	K3
Prosječna vrijednost (mm)	10,99	11,01	11,01
Minimalna vrijednost (mm)	9,71	8,97	9,37
Maksimalna vrijednost (mm)	12,05	11,98	12,36
Standardna devijacija (mm)	0,57	0,81	0,79

Kako je prikazano u tablici 4.1.2., prosječna dubina stanica saća ispunjenih peludnim sadržajem (pčelinjim kruhom) kretala se od 7,38 mm za pokusnu zajednicu K1, 8,14 mm za K2, do 8,02 mm koja je utvrđena u pokusnoj zajednici K3. Minimalna dubina stanica saća s peludnim sadržajem iznosila je je 5,19 mm u K1 zajednici, 5,25 mm u K2 te 5,20 mm u K3 zajednici, dok je maksimalna dubina stanica saća u K1 zajednici iznosila 10,26 mm, K2 zajednici 10,71 mm, a K3 zajednici 9,72 mm. Analizom standardne devijacije utvrđeno je kako je za K1 zajednicu prosječno odstupanje od prosjeka bilo 1,19 mm, za K2 1,09 mm, a za K3 zajednicu 1,00 mm. Najveća odstupanja zapažena su u prosječnoj i maksimalnoj vrijednosti dubine stanica saća ispunjenih peludnim sadržajem te standardnoj devijaciji. Razlika prosječnih vrijednosti bila je najveća između K1 i K2 zajednice, a iznosila je 0,76 mm. Analizom maksimalnih vrijednosti utvrđeno je najveća razlika između K2 i K3 zajednica koja je iznosila je 0,99 mm. Standardna devijacija u K1 zajednici iznosilo je 1,19 mm, u K2 1,09 mm, a u K3 1,00 mm. Može se zaključiti kako su vrijednosti dubine stanica saća do koje pčele skladište pčelinji kruh u pčelinjoj zajednici K1 najviše odstupale od prosječne vrijednosti.

Tablica 4.1.2. Deskriptivna statistika za dubinu stanica saća ispunjenih peludnim sadržajem (n = 100 / pokusnoj zajednici)

PARAMETAR	POKUSNA ZAJEDNICA		
	K1	K2	K3
Prosječna vrijednost (mm)	7,38	8,14	8,02
Minimalna vrijednost (mm)	5,19	5,25	5,20
Maksimalna vrijednost (mm)	10,26	10,71	9,72
Standardna devijacija (mm)	1,19	1,09	1,00

Usporedbom prosječnih vrijednosti dubine praznih stanica saća (K1 = 10,99 mm) i dubine stanica sa peludnim sadržajem (K1 = 7,38 mm) utvrđeno je kako su pčele u pokusnoj zajednici K1 skladištile pelud do prosječne dubine od $\frac{2}{3}$ stanice. Prosječna dubina praznih stanica saća iz K2 zajednice iznosila je 11,01 mm, dok je dubina stanica sa pčelinjim kruhom bila 8,14 mm; iz navedenog proizlazi kako je u ovoj pokusnoj zajednici prosječna dubina do koje su pčele skladištile pelud bila $\frac{3}{4}$ dubine stanice. Isto je zapaženo u slučaju K3 zajednice u kojoj je prosječna vrijednost dubine praznih stanica iznosila 11,01 mm, dok je ona s peludnim sadržajem iznosila 8,02 mm.

Ivanišová i sur. (2015.) navode kako prosječna količina uskladištene peludi u stanicama zauzima $\frac{3}{4}$ stanice, dok Quinby (2008.) navodi da uskladištena pelud u stanicama zauzima oko $\frac{2}{3}$ stanice. Kada se navedene vrijednosti projiciraju na primjer prosječne vrijednosti dubine praznih stanica saća dobivene u ovom istraživanju (prosječna vrijednost temeljem tri pokusne zajednice = 11,00 mm), dubina do koje se skladišti pelud u slučaju $\frac{2}{3}$ iznosila bi 7,33 mm, a u slučaju $\frac{3}{4}$ 8,25 mm, što čini neznatnu razliku od 0,92 mm. Također, valja istaknuti kako je prosječna vrijednost dubine stanica saća ispunjenih peludnim sadržajem temeljem mjerenja u sve tri pokusne zajednice iznosila 7,85 mm što ustvari

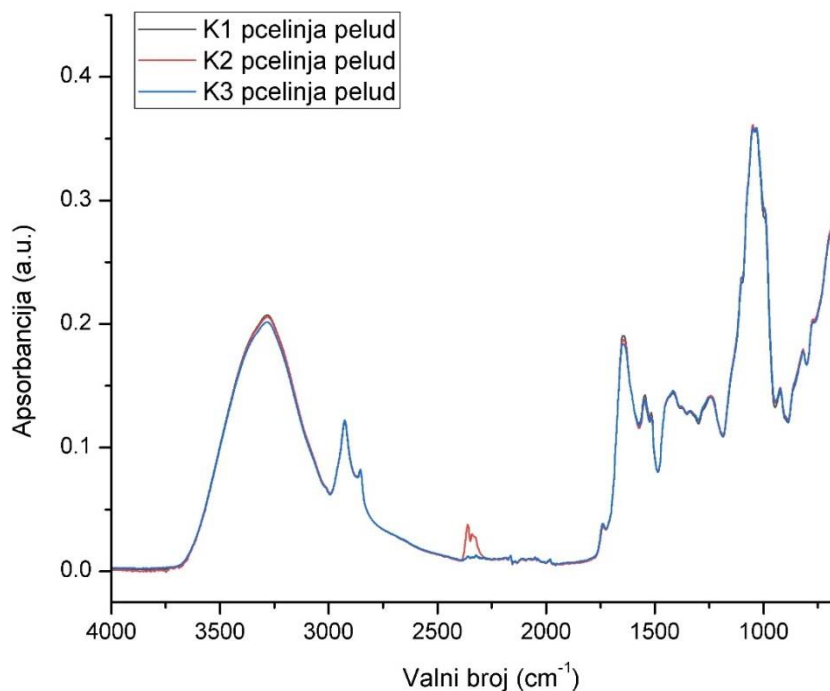
predstavlja srednju vrijednost prethodno spomenutog izračuna temeljenog na $\frac{2}{3}$ vs. $\frac{3}{4}$. Iz svega navedenog može se zaključiti kako podaci dobiveni ovim istraživanjem generalno potvrđuju navode iz literature.

Seeley i Morse (1976.) navode kako prosječna dubina praznih stanica koje medonosne pčele koriste za pohranjivanje peludi i meda iznosi 11,00 mm što je u potpunosti u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju (K1 = 10,99 mm; K2 = 11,01 mm; K2 = 11,01 mm; prosječna vrijednost K1-K3 = 11,00 mm).

4.2. Rezultati spektralne analize

4.2.1. Rezultati spektralne analize pčelinje peludi

Na Grafikonu 4.2.1. su prikazani srednji FTIR-ATR spektri uzoraka multiflorne pčelinje peludi iz pokusnih zajednica (K1, K2, K3). Rezultati kvalitativne spektralne analize spomenutih uzoraka pčelinje peludi pokazali su kako sva tri uzorka odražavaju slične integralne spektralne značajke, a te su razlike bile neznatne u području „otiska prsta“ (1800 – 700 cm^{-1}). Prikazani spektri ukazuju kako nema značajnih razlika u osnovnom kemijskom sastavu prikupljenih uzoraka, što je i bilo očekivano s obzirom da su se pokusne zajednice nalazile na istoj lokaciji. U daljnjem su tekstu temeljem kvalitativne analize spektralnih podataka opisane sastavnice pčelinje peludi općom asignacijom pripadajućih temeljnih molekulskih vibracija.



Grafikon 4.2.1. FTIR-ATR spektri multiflorne pčelinje peludi prikupljene iz tri pokusne pčelinje zajednice (K1, K2, K3)

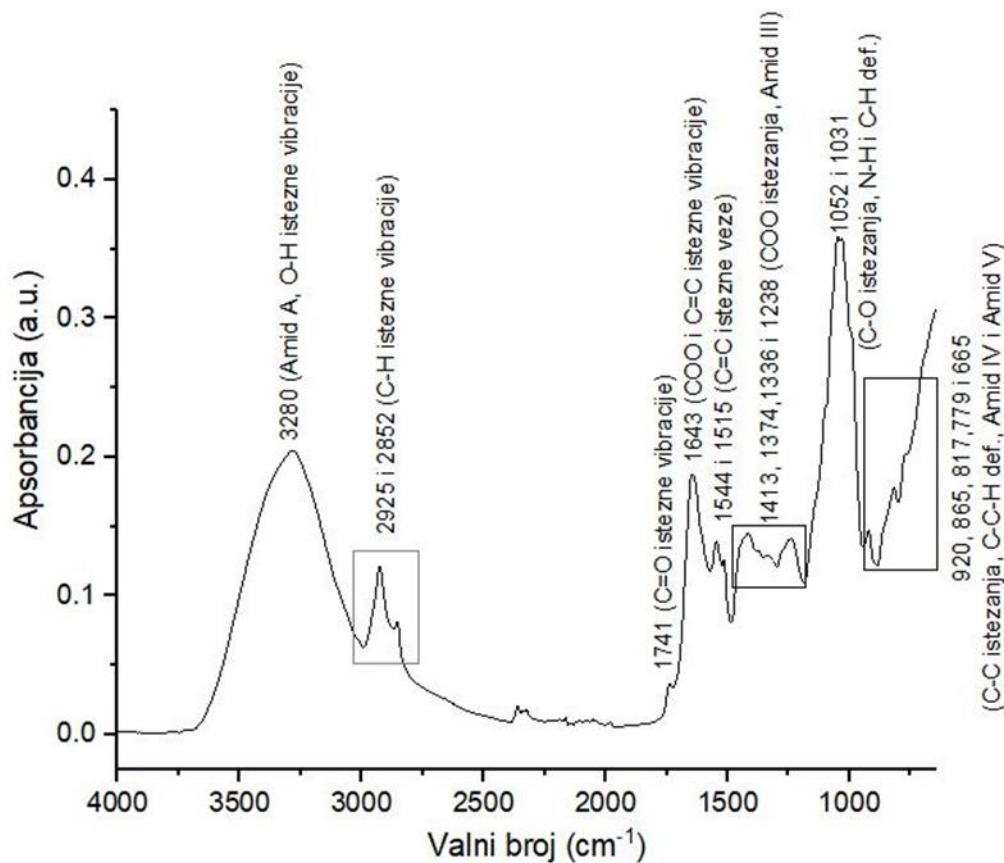
4.2.1.1. Karakterističan FTIR-ATR spektar pčelinje peludi

Karakterističan FTIR-ATR spektar pčelinje peludi karakterizira široka apsorpcija koja je vidljiva u spektralnom području od 3600 do 3000 cm^{-1} maksimum apsorpcije pri 3280 cm^{-1} koji pripada N–H isteznim vibracijama bjelančevina (amid A vrpca), te O–H isteznim vibracijama ugljikohidrata, kao što su glukoza, fruktoza i saharoza. Apsorpcijska vrpca srednjeg intenziteta pri 2925 cm^{-1} i nešto slabijoj vrpci pri 2852 cm^{-1} odgovaraju isteznim vibracijama alifatskih C–H skupina koje se mogu opisati kao nespecifične jer takve istezne vibracije odgovaraju molekularnim vibracijama brojnih sastavnica pčelinje peludi, kao što su masti, masne kiseline, ugljikohidrati i celuloza (Prđun i sur. 2021.).

Spektralno područje između 1800 cm^{-1} i 700 cm^{-1} naziva se područje „otiska prsta“ (eng. *fingerptint region*), a u tom se području nalaze brojne apsorpcijske vrpce. Apsorpcijska vrpca koja se nalazi na 1741 cm^{-1} , pripada esterskim vezama molekula masti, a nastaje isteznim vibracijama C=O skupina. Zapažena apsorpcijska vrpca srednjeg intenziteta na 1643 cm^{-1} pripada vibracijama funkcionalnih skupina vode, masti i bjelančevina (preklapanje vrpce), dok su vrpce na 1544 cm^{-1} i 1515 cm^{-1} povezane s aromatskim strukturama masti (C=C istezne vibracije). Vrpce s apsorpcijskim maksimumom na 1413 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} i 1336 cm^{-1} pripisuju se COO^- isteznim vibracijama bočnih lanaca bjelančevina, dok je na 1238 cm^{-1} smještena amid III vrpca koju čine C–N istezne vibracije (30 %), N–H deformacijske vibracije (30 %), C–O istezne vibracije (10 %) i O=C–N deformacijske vibracije (10 %) (Socrates 2004.). U ovom se spektralnom području vrpce bjelančevina preklapaju s manje intenzivnim molekulskim vibracijama šećera, odnosno glukoze i fruktoze (Prđun i sur. 2021.).

Najistaknutije apsorpcijske vrpce u FTIR-ATR spektru pčelinje peludi opažene su u spektralnom području između 1170 i 950 cm^{-1} . Najintenzivnije apsorpcijske vrpce uočene u spektru pčelinje peludi koje se pojavljuju na 1052 i 1032 cm^{-1} pripisuju se brojnim preklapajućim signalima šećera i proteina, ali najznačajnije su C–O istezne vibracije s maksimumom apsorpcije na 1052 cm^{-1} koje su pripisane fruktozi, te na 1032 cm^{-1} koje se pripisuju glukozi (Svečnjak i sur. 2017.). U ovom spektralnom području pojavljuju se i manje intenzivni signali koji proizlaze iz N–H i C–H deformacijskih vibracija proteina. Manje intenzivna apsorpcija koja se javlja na 993 cm^{-1} karakteristična je za glikozidne veze saharoze (Socrates 2004.).

U krajnjem dijelu spektra od 950 cm^{-1} do 750 cm^{-1} nalazi se pet manje intenzivnih apsorpcija od kojih vrpce na 920 cm^{-1} i 865 cm^{-1} pripadaju skeletnim C–C isteznim vibracijama monosaharida (glukoze i fruktoze). Vrpce na 818 cm^{-1} i 779 cm^{-1} pripadaju deformacijskim C–C–H vibracijama fruktoze, dok posljednja vrpca na 665 cm^{-1} pripada O=C–N skupini (amid IV vrpca) (Socrates, 2004.; Kong i Yu 2007.; Max i Chapados 2007.; Wang i sur. 2010.).

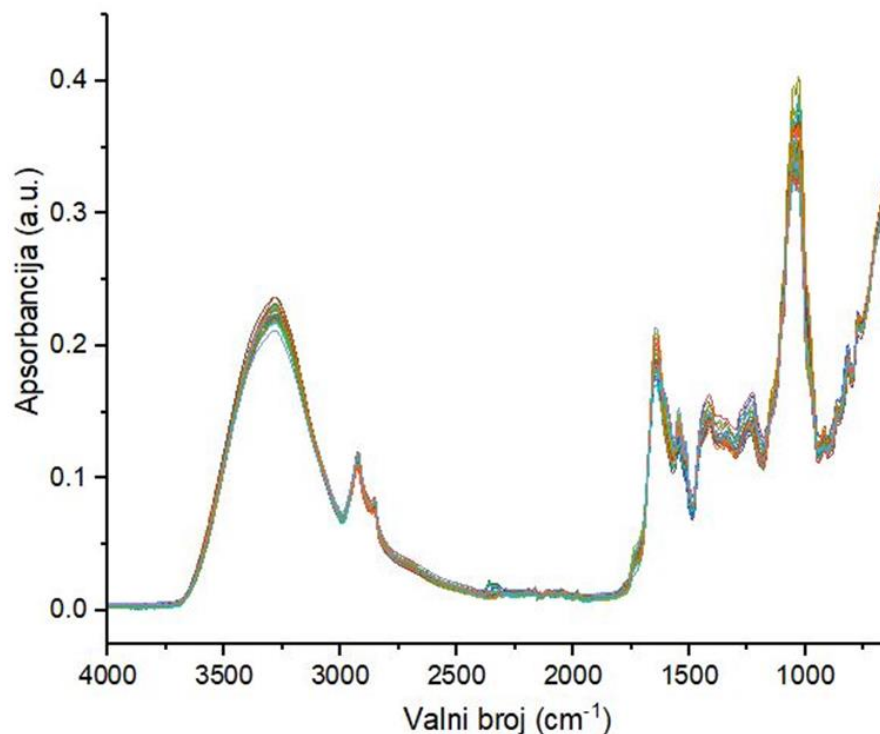


Grafikon 4.2.1.1. Karakterističan FTIR-ATR spektar pčelinje peludi (srednji spektar; K1 – K3) s asignacijom pripadajućih molekulskih vibracija (spektralno područje: 3600 – 600 cm⁻¹)

Spektralne značajke i integralni spektralni profil multiflorne pčelinje peludi odgovarara rezultatima prethodnih istraživanja pčelinje peludi metodom FTIR-ATR spektroskopije koje su proveli Anjos i sur. (2017.) i Prđun i sur. (2021.). Potrebno je spomenuti i istraživanje Anjos i sur. (2017.) koji su prvi prikazali FTIR-ATR spektar pčelinje peludi te potvrdili kako je upravo ova metoda vrlo korisna u utvrđivanju ukupnog kemijskog sastava pčelinje peludi, kao i ostalih pčelinjih proizvoda. No, u ovom članku je prezentirana nepotpuna asignacija pojedinih vrpca pčelinje peludi, što je i utvrđeno u spomenutom istraživanju od Prđun i sur. (2021.). Tako su prikazane apsorpcijske vrpce između 1700 cm⁻¹ i 1500 cm⁻¹ koje su karakterizirane kao celuloza i bjelančevine, no istraživanjem Prđun i sur. (2021.) utvrđeno kako je celuloza u uzorku pčelinje peludi ne može imati značajan doprinos zbog svoje neznatne količine u sastavu.

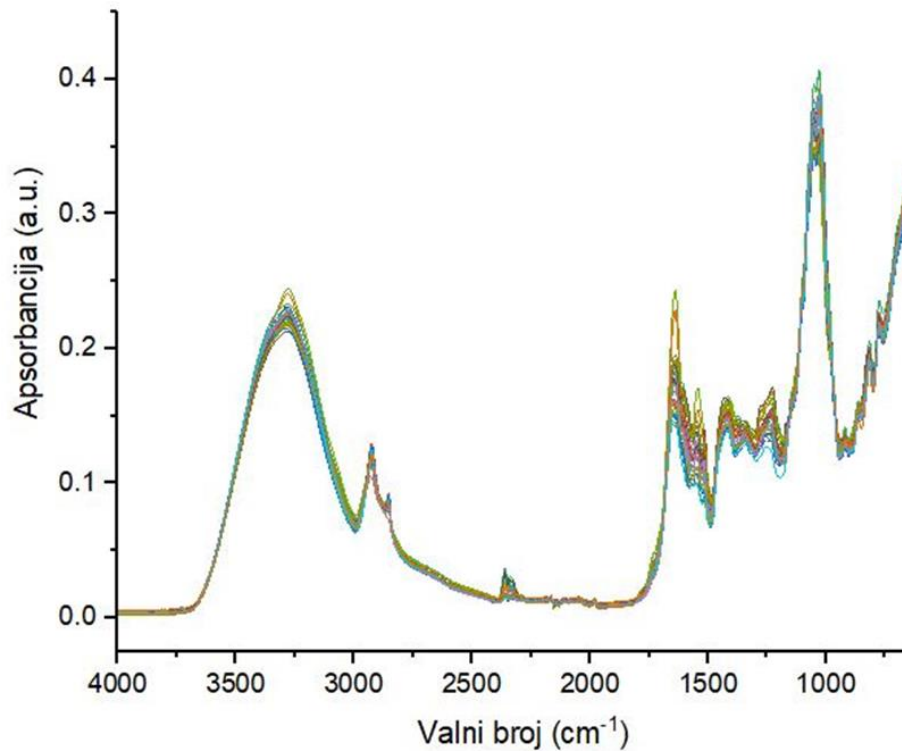
4.2.2. Spektralne varijacije između uzoraka pčelinjeg kruha na razini zajednice

Grafikon 4.3.1. prikazuje spektralne varijacije uzoraka pčelinjeg kruha (K1 – K35) prikupljenih iz individualnih stanica saća iz K1 pokusne zajednice (n = 35). Iz prikazanih spektara razvidno je kako postoje razlike u spektralnim profilima, a zapažene spektralne varijacije ukazuju na različit kemijski sastav analiziranih uzoraka. Manje razlike utvrđene su u području isteznih vibracija hidroksilnih skupina vode i ugljikohidrata s apsorpcijskim maksimumom na 3284 cm^{-1} te minimumom na 3280 cm^{-1} , a jednake su razlike uočene i u spektralnom području od 1637 cm^{-1} do 1631 cm^{-1} koje je povezano s preklapajućim efektima molekula vode, masti i bjelančevinama. Promjene u intenzitetu apsorpcije vrpce indikativnih za bočne lance bjelančevina (na 1413 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} i 1336 cm^{-1}) i aromatske strukture masti (1544 cm^{-1} i 1515 cm^{-1}) su također uočene. Najistaknutije spektralne varijacije u analiziranih uzorcima pčelinjeg kruha zapažene su u području molekularnih vibracija fruktoze (na 1052 cm^{-1}) i glukoze (na 1032 cm^{-1}). Ove se razlike mogu povezati sa različitim stadijem fermentacije pčelinjeg kruha u pojedinim stanicama saća iz kojeg su uzorci bili prikupljeni, dok se sveukupne spektralne varijacije uočene u cijelom spektralnom području mogu povezati sa različitim botaničkim podrijetlom pčelinje peludi kao početne sirovine za proizvodnju pčelinjeg kruha.

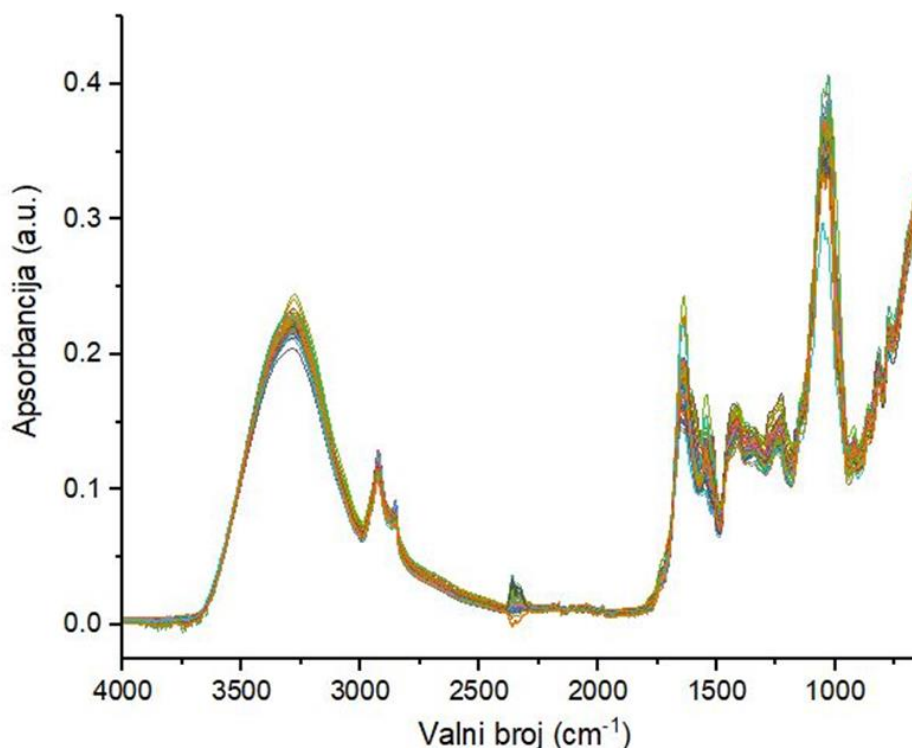


Grafikon 4.3.1. Spektralne varijacije uzoraka pčelinjeg kruha (K1 – K35) prikupljenih iz individualnih stanica saća iz K1 pokusne zajednice (n = 35)

Grafikon 4.3.2. prikazuje spektralne varijacije uzoraka pčelinjeg kruha (K1 – K35) prikupljenih iz individualnih stanica saća K2 pokusne zajednice (n = 35). Iz navedenog je grafičkog prikaza razvidno kako su spektralne varijacije slične onima iz prethodno prikazanog Grafikona 4.3.1., a navedene su varijacije također rezultat različitog botaničkog podrijetla peludi i različitog stadija fermentacije pčelinjeg kruha. Iste su spektralne varijacije (razlike u kemijskom sastavu) potvrđene i u uzorcima pčelinjeg kruha (K1 – K35) prikupljenih iz individualnih stanica saća iz K3 pokusne zajednice (n = 35) čiji su spektri prikazani na Grafikonu 4.3.3.



Grafikon 4.3.2. Spektralne varijacije uzoraka pčelinjeg kruha (K1 – K35) prikupljenih iz individualnih stanica saća K2 pokusne zajednice (n = 35)



Grafikon 4.3.3. Spektralne varijacije uzoraka pčelinjeg kruha (K1 – K35) prikupljenih iz individualnih stanica saća iz K3 pokusne zajednice (n = 35)

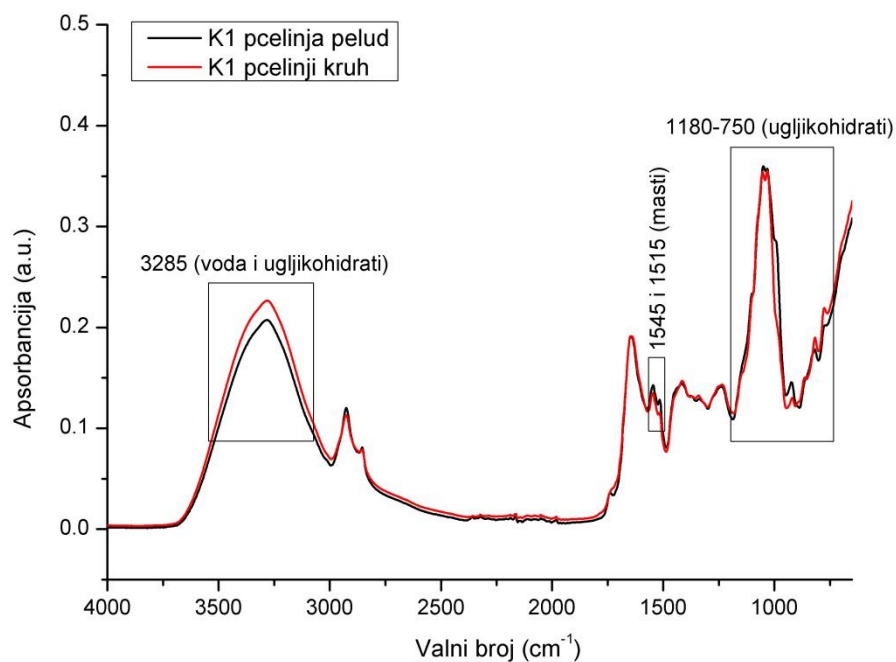
Sumirano, u svim uzorcima pčelinjeg kruha iz pokusnih zajednica K1, K2 i K3 zabilježen su identična opažanja u spektralnim varijacijama, a iste se prepisuju različitim botaničkom podrijetlu pčelinje peludi te različitim stadiju procesa fermentacije.

4.2.3. Komparativne spektralne razlike između pčelinje peludi i pčelinjeg kruha

Grafikon 4.4.1. prikazuje komparativne spektralne razlike između pčelinje peludi i pčelinjeg kruha (srednji spektri) prikupljenih iz K1 pokusne zajednice. Rezultati spektralne analize su pokazali kako se najistaknutije razlike očituju u spektralnom području od 3600 do 3000 cm^{-1} te u dijelu područja „otiska prsta“ (od 1180 do 750 cm^{-1}). Intenzitet apsorbanacije vrpca s apsorpcijskim maksimumom pri 3280 cm^{-1} u spektralnom području od 3600 do 3000 cm^{-1} viši je u pčelinjem kruhu u odnosu na pčelinju pelud što primarno odražava viši udio vode u uzorcima pčelinjeg kruha, a djelomično i promjene u profilu frakcije šećera (obzirom da se u tom području očituju O–H istežne vibracije hidroksilnih skupina vode i ugljikohidrata, primarno glukoze, fruktoze i saharoze). Iako se u tom području nalazi i vrpca N–H istežnih vibracija bjelančevina (amid A vrpca), ona je preklapljena intenzivnijim vibracijama O–H skupina vode i ugljikohidrata. Također, značajne razlike u sastavu bjelančevina između pčelinje peludi i pčelinjeg kruha nisu uočene u drugim spektralnim

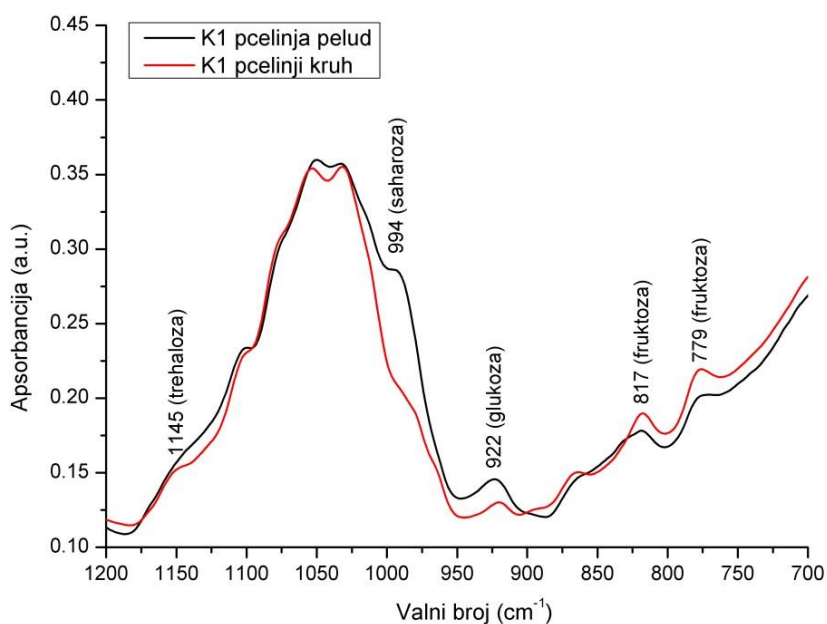
područjima u kojima se nalaze apsorpcijske vrpce vezane za bjelančevine (Amid II i Amid III vrpca), stoga se spomenute razlike u intenzitetu apsorpcije primarno pripisuju promjenama u udjelu vode i ugljikohidrata, odnosno šećera. Navedeno je u skladu s podacima iz znanstvene literature koji potvrđuju viši udio vode i drugačiji sastav šećera u pčelinjem kruhu u odnosu na pčelinju pelud (Prđun i sur. 2021.; Bakour i sur. 2019.).

Nadalje, iz Grafikona 4.4.1. je vidljivo kako je integralni spektralni profil većeg dijela *fingerprint* područja (od 1760 do 1190 cm^{-1}) pčelinje peludi i pčelinjeg kruha sličan što ukazuje na neznatno promijenjen sastav glede udjela bjelančevina te potvrđuje uspješnost konzervacije pčelinje peludi transformacijom u pčelinji kruh. Izuzetak je viši udio masti u pčelinjoj peludi u odnosu na pčelinji kruh koji se odražava kroz viši intenzitet apsorpcije vrpce na 1544 cm^{-1} i 1515 cm^{-1} povezanih s aromatskim strukturama masti (C=C istežne vibracije). Navedeno je također u skladu s podacima iz dostupne znanstvene literature prema kojoj udio masti u pčelinjoj peludi prosječno iznosi 7 % (Campos i sur. 2008.), a u pčelinjem kruhu 1,9 % (Bakour i sur. 2019.).



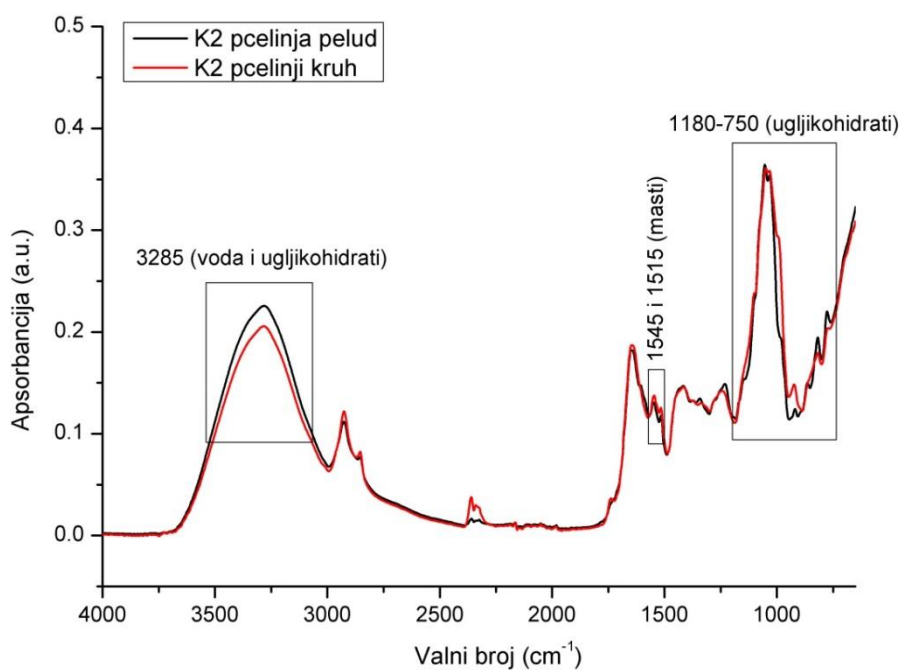
Grafikon 4.4.1. Komparativne spektralne razlike između pčelinje peludi i pčelinjeg kruha (srednji spektri) prikupljenih iz K1 pokusne zajednice

Uz promjene u udjelu vode, najznačajnije razlike između pčelinje peludi i pčelinjeg kruha očituju se u drugom dijelu područja „otiska prsta“, od 1180 do 750 cm^{-1} (Grafikon 4.4.2.). U tom je području vidljivo kako se spektralne značajke pčelinje peludi i pčelinjeg kruha značajno razlikuju, u vidu promjena položaja i intenziteta apsorpcijskih vrpca. Tako je uočeno kako je intenzitet apsorpcijske vrpce na 994 cm^{-1} karakteristične za C–O istezne vibracije saharoze (Wang i sur. 2010.; Max i Chapados 2001.) niži u pčelinjem kruhu u odnosu na pčelinju pelud. Kako navode Bakour i sur. (2019.), saharoza se u pčelinjem kruhu pojavljuje u niskom udjelu zbog njezine razgradnje tijekom mliječno-kisele fermentacije tijekom koje bakterije te šećere koriste kao izvor kisika za proizvodnju mliječne kiseline. U prilog ovim zapažanjima govore i podaci iz znanstvene literature prema kojima se udio saharoze u pčelinjoj peludi kreće od 5,87 do 22,04 % (Prđun i sur. 2021.), dok u pčelinjem kruhu dolazi gotovo u tragovima (Bakour i sur. 2019.). Glukoza je dostatno zastupljena i u pčelinjoj peludi i u pčelinjem kruhu, no neznatno viši udio utvrđen je pčelinjoj peludi što se reflektira i u spektrima analiziranih uzoraka. Naime, apsorpcijska vrpca na 922 cm^{-1} karakteristična za C–C istezne vibracije glukoze intenzivnija je u spektru pčelinje peludi, dok su te razlike manje izražene kod položaja druge, za glukozu karakteristične vrpce, na 1031 cm^{-1} . Navedena zapažanja se također mogu povezati s prethodno objavljenim podacima o udjelu glukoze koja u pčelinjoj peludi prosječno iznosi 12,4 % (Prđun i sur. 2021.), a u pčelinjem kruhu 5,7 % (Bakour i sur. 2019.). Zamjetne spektralne razlike uočene su u krajnjem dijelu spektra u vidu višeg intenziteta signala na 817 i 779 cm^{-1} (pripisani deformacijskim C–C–H vibracijama fruktoze) (Max i Chapados 2007.) u spektru pčelinjeg kruha. Navedene spektralne varijacije ukazuju na niži sadržaj saharoze (i neznatno glukoze) i viši udio fruktoze u pčelinjem kruhu u odnosu na pčelinju pelud, što je također prije svega posljedica razgradnje saharoze tijekom procesa fermentacije pčelinje peludi. U spektru pčelinjeg kruha uočena je i izraženija vrpca pri 1145 cm^{-1} koja se može pripisati C–O isteznim vibracijama trehaloze (Kuroiwa i sur. 2015.). S obzirom da se trehaloza navodi kao treći najzastupljeniji šećer u pčelinjem kruhu, nakon fruktoze i glukoze (Bakour i sur. 2019.), može se pretpostaviti kako se navedena apsorpcijska vrpca u pčelinjem kruhu ističe upravo radi višeg udjela ovog disaharida. Također, može se pretpostaviti kako je manji udio glukoze u pčelinjem kruhu posljedica stvaranja trehaloze koja nastaje glikozidnom vezom između dvije jedinice α -glukoze (dio glukoze utroši se na stvaranje trehaloze).

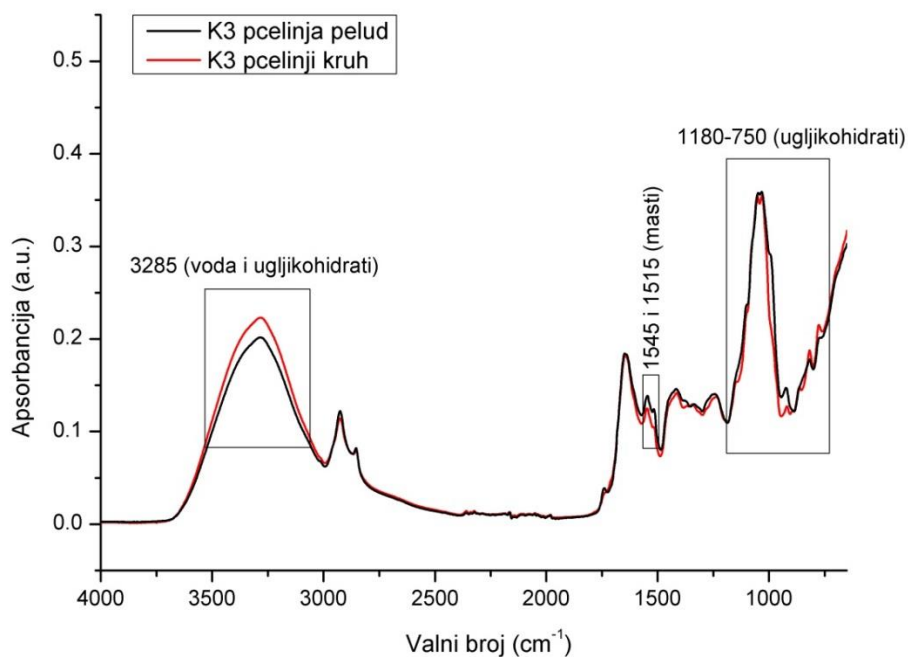


Grafikon 4.4.2. Komparativne spektralne razlike između pčelinje peludi i pčelinjeg kruha (srednji spektri) prikupljenih iz K1 pokusne zajednice (spektralno područje: 1180-750 cm^{-1})

Navedene spektralne varijacije u vidu istovjetnog trenda kemijskih promjena (varijacija u udjelu vode i promijenjenog profila frakcije šećera) uočene su i komparativnom analizom uzoraka pčelinje peludi i pčelinjeg kruha iz pokusnih zajednica K2 (Grafikon 4.4.3.) i K3 (Grafikon 4.4.4.). Ovi rezultati potvrđuju jednake pozadinske kemijske alteracije tijekom procesa transformacije pčelinje peludi u pčelinji kruh koje su bile popraćene istovjetnim promjenama u uzorcima pčelinje peludi i pčelinjeg kruha prikupljenih iz sve tri pokusne pčelinje zajednice. Te su promjene primarno posljedica mliječno-kisele fermentacije. Također, spomenute kemijske alteracije zapažene u sve tri pokusne zajednice potvrđuju učinkovitost procesa konzerviranja pčelinje peludi s obzirom da je osnovni kemijski sastav pčelinje peludi ostao sačuvan.



Grafikon 4.4.3. Komparativne spektralne razlike između pčelinje peludi i pčelinjeg kruha (srednji spektri) prikupljenih iz K2 pokusne zajednice



Grafikon 4.4.4. Komparativne spektralne razlike između pčelinje peludi i pčelinjeg kruha (srednji spektri) prikupljenih iz K3 pokusne zajednice

5. Zaključak

U ovom je istraživanju utvrđena dubina stanica saća do koje siva pčela (*A.mellifera carnica*) skladišti pelud te promjene u kemijskom sastavu peludi od početne sirovine (pčelinja pelud) do finalnog proizvoda (pčelinjeg kruha) temeljem spektralne (FTIR-ATR) analize.

Rezultati istraživanja su pokazali kako je prosječna dubina praznih stanica saća iznosila 11 mm, a dubina stanica saća ispunjenih peludnim sadržajem 7,85 mm. Navedena se vrijednost nalazi između $\frac{2}{3}$ i $\frac{3}{4}$ stanice, odnosno između vrijednosti koje se uobičajeno navode u literaturi kao dubina stanica saća do koje pčele skladište pčelinju pelud.

Spektralnom analizom uzoraka pčelinje peludi utvrđeno je kako postoje neznatne razlike u kemijskom sastavu između uzoraka iz različitih zajednica, što je bio i očekivan rezultat s obzirom da je pčelinja pelud prikupljena na istoj lokaciji i u istom razdoblju, te je botanički sastav peludi bio sličan. Spektralnom analizom uzoraka pčelinjeg kruha utvrđene su određene varijacije u kemijskom sastavu, što je rezultat različitog botaničkog podrijetla peludi, kao i različitog stadija mliječno-kisele fermentacije.

Komparativnom spektralnom analizom srednjeg spektra pčelinje peludi i pčelinjeg kruha iz iste zajednice, utvrđene su značajnije razlike u udjelu vode i ugljikohidrata (promijenjen profil frakcije šećera) te manje razlike u udjelu masti. Rezultati spektralne analize pokazali su kako pčelinji kruh sadrži viši udio vode, fruktoze i trehaloze, dok pčelinja pelud ima neznatno viši udio glukoze i masti. Ovi rezultati potvrđuju jednake pozadinske mehanizme kemijskih promjena tijekom procesa transformacije pčelinje peludi u pčelinji kruh koje su bile popraćene istovjetnim promjenama u uzorcima pčelinje peludi i pčelinjeg kruha prikupljenih iz sve tri pokusne zajednice. Te su promjene primarno posljedica mliječno-kisele fermentacije. Također, spomenute kemijske alteracije zapažene u sve tri pokusne zajednice potvrđuju učinkovitost procesa konzerviranja pčelinje peludi s obzirom da se osnovni kemijski sastav pčelinje peludi, izuzev prethodno spomenutih razlika, nije značajno promijenio.

Iz navedenih se zapažanja može zaključiti kako je upravo mliječno-kiselom fermentacijom očuvana nutritivna vrijednost i osnovni kemijski sastav pčelinje peludi, a u posljedično nastalom pčelinjem kruhu su pojedini nutrijenti (poput ugljikohidrata) postali biodostupniji (probavljiviji) što ovaj pčelinji proizvod čini posebno zanimljivim dodatkom prehrani.

FTIR-ATR spektroskopija se pokazala kao brza, precizna i efikasna metoda za detaljnu karakterizaciju kemijskog sastava pčelinje peludi i pčelinjeg kruha. Također, u ovom je istraživanju po prvi puta prikazan FTIR-ATR spektar pčelinjeg kruha. Navedeno otvara prostor za daljnja istraživanja ovih pčelinjih proizvoda (posebice pčelinjeg kruha koji je još uvijek nedovoljno istražen).

6. Popis literature

1. Akhmetova R., Sibgatullin J., Garmonov S. i Akhmetova L. (2012). Technology for Extraction of Bee – bread from the Honeycomb. *Procedia Engineering*, 42, 1822 – 1825. [online] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705812029840> – pristup 17.08.2022.
2. Anjos O., Santos A., Dias T. i Estevinho L. (2017). Application of FTIR-ATR spectroscopy on the bee pollen characterization. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), pp.210 – 218. [online] <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00218839.2017.1289657?journalCode=tjar20> – pristup 09.09.2022.
3. Anderson C. (2022). Bee bread- how bees store pollen, Honeybees. [online] <https://carolinahoneybees.com/bee-bread> - pristup 22.08.2022.
4. Anderson K. E., Carroll M. J., Sheehan T., Mott B. M., Maes P., Corby-Harris V. (2014). Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Mol Ecol.* (2014) 23:5904–17. doi: 10.1111/mec.12966
5. Asama T., Arima T. H., Gomi T., Keishi T., Tani H., Kimura Y. (2015). *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 818–826.
6. Atkin S. L., Barrier S., Cui Z., Fletcher P. D. I., Mackenzie G., Panel V. (2011). UV and visible light screening by individual sporopollenin exines derived from *Lycopodium clavatum* (club moss) and *Ambrosia trifida* (giant ragweed). *J Photochem Photobiol B.* 102:209–17. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.005
7. Bakour M., Fernandes Â., Barros L., Sokovic M., Ferreira I. i Badiia I. (2019). Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT*, 109, 276 – 282. [online] https://www.researchgate.net/publication/330858367_Bee_bread_as_a_functional_product_Chemical_composition_and_bioactive_properties – pristup 22.08.2022.
8. Barene I., Daberte I. i Siksna S. (2014). Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinos teorija ir praktika*, 21(1), 16 – 22. [online] <https://www.scielo.br/j/aabc/a/GR4tLxTH8Yf38BxFFhgvbdf/?lang=en#> – pristup 15.09.2022.
9. Barth O., Freitas A., Oliveira É., Silva R., Maester F., Andrella R. i Cardozo, G. (2010). Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82(4), 893 – 902. [online]

<https://www.scielo.br/i/aabc/a/GR4tLxTH8Yf38BxFFhgvdF/?lang=en#> – pristup 20.08.2022.

10. Bayram N. E., Gercek Y. C., Celik S., Mayda N., Kostić A., Dramićan A., i Özkök A. (2021) Phenolic and free amino acid profiles of bee bread and bee pollen with the same botanical origin – similarities and differences, Arabian Journal of Chemistry. Elsevier. [online] <https://cherry.chem.bg.ac.rs/handle/123456789/4491> – pristup 20.08.2022.
11. Berthomieu C. i Hienerwadel R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Photosynthesis Research, 101(2 – 3), 157 – 170. [online] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19513810/> – pristup 18.09.2022.
12. Bogdanov S. (2016). The Bee Pollen Book, Chapter 1. Bee – Hexagon. [online] https://www.researchgate.net/profile/Stefan_Bogdanov/publication/304011810_Pollen_Collection_Harvest_Compostion_Quality/links/5762c0c808aee61395bef502/Pollen-Collection-Harvest-Compostion-Quality.pdf – Pristup: 20.08.2022.
13. Campos M., Boganov S., Almeida – Muradian L. i Szczesna T. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. [online] <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00218839.2008.11101443> – pristup 16.08.2022.
14. Campos M., Frigerio C., Lopes J., i Bogdanov S. (2010). What is the future of Bee–Pollen. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 2(4), 131–144.
15. Carroll M., Brown N., Goodall C., Downs A., Sheenan T. i Anderson K. (2021). Correction: Honey bees preferentially consume freshly – stored pollen. PLOS ONE, 16(3), 1 – 2. [online] <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175933> – pristup 27.08.2022.
16. Chen J., Wang J. i Zheng, H. (2021). Characterization of Bifidobacterium Apousia sp. nov., Bifidobacterium Choladohabitans sp. nov., and Bifidobacterium polysaccharolyticum sp. nov., three novel species of the genus Bifidobacterium from Honey Bee Gut, Systematic and Applied Microbiology. Urban & Fischer. [online] <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202021000709#:~:text=Bifidobacterium%20is%20one%20of%20the,functional%20potentials%20in%20hemicellulose%20digestion> - pristup 25.08.2022.
17. Combey R. (2017). Microbial and Qualitative Analyses of Stingless Bee Bread using Dry Preservation Methods. 5 (1)45 – 50. [online] https://www.researchgate.net/publication/317289833_Microbial_and_Qualitative_Analyses_of_Stingless_Bee_Bread_using_Dry_Preservation_Methods – pristup 25.08.2022.

18. Cowan T. W. (1896). British beekeepers guide book to the management of bees in movable comb hives. Houlston & Sons.
19. Crailsheim K. (1991). Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. Graz: SpringerLink, 55 – 60.
20. Darchen R. (1954). Quelques regulations sociales dans la construction chez les Abeilles. Insectes Soc. [online] <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105244> – pristup 28.08.2022.
21. DeGrandi-Hoffman G., Eckholm B. J. Huang, M. H. (2013). A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. *Apidologie*, 44, 52–63.
22. De Melo A. A. M., Estevinho M. L. M. F., Sattler J. A. G., Souza B. R., da Silva Freitas A., Barth O. M., Almeida-Muradian L. B. (2016) Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *LWT Food Sci. Technol.* 65, 808–815.
23. Diamant C., Girard J. (2000). Instrumental Analysis Lecture and Laboratory: A Survey. [online] <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ed077p646> – pristup 27.08.2022.
24. Didaras N.A., Karatasou K. , Dimitriou T.G. , Amoutzias G.D. , Mossialos D. (2020). Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics*, 9, 811.
25. Dominguez-Valhondo D., Bohoyo G. D., Hernandez M.T., Gonzalez-Gomez D. (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honey bee – collected pollen. *International Journal of Food Science & Technology* 46: 2204–2211.
26. Dranca F., Ursachi F. i Oroian M. (2020). Bee Bread: Physicochemical Characterization and Phenolic Content Extraction Optimization. *Foods*, 9(10), p.1358. [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7599645> – pristup 22.08.2022.
27. El-Azazy M. (2018). Infrared Spectroscopy – Principles, Advances, and Applications. [online] https://www.researchgate.net/publication/344238237_Infrared_Spectroscopy_Principles_Advances_and_Applications – pristup 27.08.2022.
28. Ellis A., Ellis J., O'Malley M. i Zettel Nalen C. (2010). Benefits of Pollen to Honey Bees. *EDIS*, (6). [online] <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN86800.pdf> – pristup 20.08.2022.
29. Fatrcová – Šramková K, Nůžková J, Ostrovský R. (2010). Nutričné vlastnosti včelieho peľu (Nutritional properties of bee pollen) *Potravinárstvo* 4 24 – 32

30. Friedle C., D'Alvise P., Schweikert K., Wallner K. i Hasselmann M. (2021). Changes of microorganism composition in fresh and stored bee pollen from Southern Germany. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(34), 47251 – 47261. [online] <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11356-021-13932-4.pdf> – pristup 13.09.2022.
31. Gallai N., Salles J., Settele J., Vaissière B. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3), 810 – 821. [online] <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921800908002942> – pristup 15.08.2022.
32. Giampieri F., Quiles J., Cianciosi D., Forbes- Hernández T., Orantes- Bermejo F., Alvarez – Suarez J., Battino M. (2022). Bee Products: An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(23), pp.6833 – 6848. [online] <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jafc.1c05822> – pristup 13.09.2022.
33. Gilliam M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts. *Apidologie*, 10(1), 43 – 53. [online] https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1979/01/Apidologie_0044_8435_1979_10_1_ART0006.pdf – pristup 16.09.2022.
34. Haydak M. (1970). *Honey Bee Nutrition*. 15th ed. St. Paul, Minnesota: University of Minnesota, 143 – 156.
35. Hinton-Sheley P. (2021). ATR- FTIR: An Overview. *News – Medical.net*. [online] <https://www.azolifesciences.com/article/What-is-ATR-FTIR.aspx> – pristup 28.08.2022.
36. Hoover S., Ovinge L. (2018). Pollen Collection, Honey Production, and Pollination Services: Managing Honey Bees in an Agricultural Setting. *Journal of Economic Entomology*, 111(4), 1509 – 1516. [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6075204> – pristup 27.08.2022.
37. Huber F. (1814). *Nouvelles observations sur les abeilles* (2nd ed.). Vol. II: Revue, corrig_ee et consid_erablement augment_ee. Paris & Gen_eeve: J J Paschoud, 479 [online] https://dl.dropboxusercontent.com/u/6639518/Nouvelles_observations_sur_les_abeilles_1814_tomell.pdf – pristup 16.08.2022.
38. Ivanišová E., Kačániová M., Frančáková H., Petrová J., Hutková J., Brovarskyi V., Velychko S., Adamchuk L., Schubertová Z. i Musilová J. (2015). Bee bread – perspective source of bioactive compounds for future. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 9(1), 592 – 598. [online] https://www.academia.edu/78485189/Bee_bread_perspective_source_of_bioactive_compounds_for_future – pristup 13.08.2022.

39. Kaplan M., Karaoglu Ö., Eroglu N. i Silici S. (2016). Fatty Acids and Proximate Composition of Beebread. *Food Technology and Biotechnology*, 54(4). [online] <https://hrcak.srce.hr/170007> – pristup 24.08.2022.
40. Karaman M. (2019). Evaluation of some nutritional and antioxidant values of bee bread (perga) for athletes. [online] <http://dx.doi.org/10.33468/sbsebd.114> pristup 25.08.2022.
41. Kezić N., Bubalo D., Grgić Z., Dražić M., Barišić D., Filipi J., Jakopović I., Ševar M., Krakar D. i Tretinjak V. (2014). Priručnik – Konvencionalno i ekološko pčelarenje. Zagreb: CIP Katalogizacija, 32 – 34.
42. Khalifa S. A., Elashal M., Kieliszek M., Ghazala N.E., Farag M.A., Saeed A., Xiao J., Zou X., Khatib A., Göransson U. (2020). Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends Food Sci. Technol.*, 97, 300–316.
43. Kieliszek M., Piwowarek K., Kot A., Błażejczak S., Chlebowska- Śmigiel A. i Wolska I. (2018). Pollen and bee bread as new health – oriented products: A review. [online] https://www.researchgate.net/publication/321186296_Pollen_and_bee_bread_as_new_health-oriented_products_A_review – pristup 22.08.2022.
44. Kong J., Yu S. (2007) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39, 549–559.
45. Komosinska- Vassev K., Olczyk P., Kaźmierczak J., Mencner L. i Olczyk K. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine*, 1 – 6. [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4377380/> – pristup 11.09.2022.
46. Kuroiwa T., Kimura K., Aoki Y., Neves M. A., Sato S., Mukataka S., Kanazawa A., Ichikawa, S. (2015). Quantitative Evaluation of the Effects of Moisture Distribution on Enzyme-Induced Acylation of the Trehalose in Reduced-Moisture Organic Media. *Journal of Food Research*. 4(5): 133-142
47. Lebedev VI. (2005) Bee bread harvesting at the bee farm. *Bee Keeping*;6:27–28.
48. Loper G. M., Standifer L. N., Thompson M. J., i Gilliam M. (1980) Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*prunus dulcis*) pollen and bee bread. I- fatty acids, sterols, vitamins and minerals, *Apidologie*. EDP Sciences. [online] https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1980/01/Apidologie_0044-8435_1980_11_1_ART0008/Apidologie_0044-8435_1980_11_1_ART0008.html pristup 08.09.2022.
49. Svečnjak L., Chesson L. A., Albino Gallina, Maia M., Martinello M., Mutinelli F., Necati Muz M., Nunes F. M., Saucy F., Tipple B. J., Klaus Wallner, Waś E., Waters T. A. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* beeswax research, *Journal of Apicultural*

Research, 58:2, 1 – 108, [online] [10.1080/00218839.2019.1571556](https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1571556) pristup 11.09.2022

50. Max J.J., Chapados C., (2007) Glucose and fructose hydrates in aqueous solution by IR spectroscopy. *J. Phys. Chem*,111, 2679–2689.
51. Mărgăoan R., Cornea – Cipcigan M., Topal E. i Kösoğlu M. (2020). Impact of Fermentation Processes on the Bioactive Profile and Health – Promoting Properties of Bee Bread, Mead and Honey Vinegar. *Processes*, 8(9), 1081. [online] <https://www.proquest.com/openview/56c92be87ee76f5b9916f15fd1bdb428/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2032344> – pristup 26.08.2022.
52. Max J. J., Chapados C. (2001). Sucrose Hydrates in Aqueous Solution by IR Spectroscopy. *Journal of Physical. Chemistry*. 105:10681-10688.
53. Max J. J., Chapados C. (2007). Glucose and Fructose Hydrates in Aqueous Solution by IR Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry*. 111: 2679-2689
54. Martin H. i Lindauer M. (1966). Sinnesphysiologische Leistungen beim Wabenbau der Honigbiene. *Z. Vgl. Physiol*. 53, 372–404.
55. Mayda N., Özkök A., Ecem Bayram N., Gerçek Y. i Sorkun K. (2020). Bee bread and bee pollen of different plant sources: determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 1795 – 1809.
56. Mohammad S., Mahmud-Ab-Rashid N. i Zawawi N. (2020). Botanical Origin and Nutritional Values of Bee Bread of Stingless Bee (*Heterotrigona itama*) from Malaysia. *Journal of Food Quality*, 1-12. [online] <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6849038> – pristup 17.08.2022.
57. Naiem E. S., Hrasnigg N., Crailsheim K. (1999). Nurse bees support the physiological development of young bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol B* 169, 271–279
58. Pascoal A., Rodrigues S., Teixeira A., Feás X., Estevinho L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem Toxicol*. 63:233–9. doi: 10.1016/j.fct.2013.11.010
59. Prđun S., Svečnjak L., Valentić M., Marijanović Z. i Jerković I. (2021). Characterization of Bee Pollen: Physico – Chemical Properties, Headspace Composition and FTIR Spectral Profiles. [online] <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/9/2103/htm> – pristup 28.08.2022.
60. Quinby M. (2008). *Mysteries of Bee – Keeping Explained*. 1st ed. New York: C. M. Saxton, agricultural book publisher 152 Fulton street. 1853.,.12.

61. Saavedra K. I. C, Rojas C. I., Delgado G. E. P. (2013). Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque – Perú). *Rev Chil Nutr* 40:71–78
62. Salazar- González C, Díaz- Moreno C (2016). The nutritional and bioactive aptitude of bee pollen for a solid – state fermentation process. *Journal of Apicultural Research* 55(2): 161 – 175
63. Seeley T. D., Morse R. A. (1976). The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* 23(4): 495–512.
64. Smati N. (2022). Bee bread preservation methods: physical, chemical and microbial *stability throughout storage* [online] https://oasisbr.ibict.br/vufind/Record/RCAP_5f6c4769df34c9322940bca42eb3ddbc – pristup 25.08.2022.
65. Socrates, G. (2004) *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*; John Wiley & Sons: New York, NY, USA,.
66. Sobral F., Calhella R., Barros L., Dueñas M., Tomás A., Santos- Buelga C., Vilas- Boas M. i Ferreira I. (2017). Flavonoid Composition and Antitumor Activity of Bee Bread Collected in Northeast Portugal. *Molecules*, 22(2), p.248. [online] <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/2/248> – pristup 15.08.2022.
67. Stanciu O. G, Mărghitaş L, Dezmirean D. (2009). Macro – and Oligo – Mineral Elements from Honeybee – Collected Pollen and Beebread Harvested from Transylvania (Romania). *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj – Napoca. Animal Science and Biotechnologies* 66.
68. Ūrcan A., Marghitas I., Dezmirean D., Bobis O., Bonta V., Muresan C., Margaoan R. (2017). Chemical Composition and Biological Activities of Beebread – Review. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj – Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 74(1), .6. [online] https://www.researchgate.net/publication/317191111_Chemical_Composition_and_Biological_Activities_of_Beebread_-_Review – pristup 16.08.2022.
69. Vásquez A. i Olofsson T. C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.*, 48, 189–195.
70. Wang J., Kliks M. M., Jun S., Jackson M., Li Q. X. (2010). Rapid analysis of glucose, fructose, sucrose, and maltose in honeys from different geographic regions using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Science*. 75: 208-214
71. Workman J. i Weyer, L. (2007). *Practical guide to interpretive near – infrared spectroscopy*. 1st ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1 – 5.

7. Prilozi

Tablica 7.1. Cjelokupni izvorni podaci mjerenja i deskriptivna statistika za dubinu praznih stanica saća (n = 30) – prosječna vrijednost, minimalna i maksimalna vrijednost i standardna devijacija

REDNI BROJ UZORKA	POKUSNA ZAJEDNICA		
	K1	K2	K3
1.	11.65	10.23	11
2.	11.77	10.98	11.3
3.	11.3	11.75	10.95
4.	11.72	11.27	10.46
5.	11.67	11.65	10.24
6.	11.37	10.62	9.37
7.	11.15	9.7	10.31
8.	10.91	10.63	10.26
9.	12.05	11.09	10.58
10.	10.98	11.76	10.2
11.	10.97	11.95	10.5
12.	11.34	10.99	9.95
13.	11.01	10.65	9.74
14.	11.35	11.85	10.77
15.	11.63	10.69	10.75
16.	11.03	8.97	12.15
17.	11.32	10.44	12.09
18.	10.18	11.72	11.87
19.	10.99	11.54	12.23
20.	11.01	11.98	11.31
21.	10.56	11.03	11.63
22.	10.4	11.88	11.09
23.	10.82	10.82	10.95
24.	9.71	10.03	11.96
25.	10.23	10.79	11.25
26.	10.87	11.88	11.8
27.	10.44	9.31	12.36
28.	10.2	11.6	11.66
29.	10.95	11.83	10.31
30.	10.17	10.56	11.22
Prosječna vrijednost (mm)	10.99	11.01	11.01
Minimalna vrijednost (mm)	9.71	8.97	9.37
Maksimalna vrijednost (mm)	12.05	11.98	12.36
Standardna devijacija (mm)	0.57	0.81	0.79

Tablica 7.2. Cjelokupni izvorni podaci mjerenja i deskriptivna statistika za dubinu stanica saća ispunjenih peludnim sadržajem (n = 100) – prosječna vrijednost, minimalna i maksimalna vrijednost i standardna devijacija

REDNI BROJ UZORKA	POKUSNA ZAJEDNICA		
	K1	K2	K3
1.	5.92	8.70	6.90
2.	5.40	6.01	6.75
3.	6.99	10.16	5.55
4.	9.30	10.71	5.23
5.	6.75	9.70	6.15
6.	10.22	9.10	5.75
7.	9.80	7.27	5.20
8.	8.71	7.16	6.40
9.	8.44	9.92	7.20
10.	7.33	8.04	6.92
11.	6.80	9.86	6.40
12.	5.97	8.30	8.87
13.	5.29	9.51	7.39
14.	7.58	9.16	8.91
15.	7.62	8.34	7.91
16.	10.26	8.50	7.93
17.	8.53	8.17	8.20
18.	8.20	7.04	7.55
19.	10.11	7.63	6.29
20.	9.78	8.98	8.41
21.	8.13	5.95	6.94
22.	7.67	8.08	9.29
23.	7.18	6.56	8.76
24.	7.19	5.25	8.47
25.	5.39	6.09	9.06
26.	6.37	7.46	8.10
27.	8.21	6.97	6.66
28.	7.08	9.36	6.88
29.	10.05	8.17	8.89
30.	7.30	9.74	8.87
31.	7.35	7.68	8.55
32.	9.01	8.44	8.63
33.	6.79	9.84	8.52
34.	6.29	7.87	7.63
35.	6.12	7.35	6.92
36.	7.21	9.31	8.44
37.	8.57	7.05	7.81
38.	6.38	6.87	8.92
39.	5.59	7.69	9.65

40.	6.98	7.62	8.52
41.	5.48	8.11	7.28
42.	8.13	7.62	8.06
43.	8.68	7.98	9.22
44.	9.44	8.67	6.91
45.	6.08	8.85	7.33
46.	8.02	7.67	6.70
47.	6.73	8.78	8.32
48.	5.58	8.19	7.57
49.	7.19	7.15	8.83
50.	6.07	7.55	8.11
51.	8.09	7.74	8.97
52.	5.40	9.17	9.67
53.	8.66	5.51	7.71
54.	6.48	8.15	7.28
55.	8.67	7.28	8.01
56.	8.24	8.64	7.27
57.	6.21	9.32	7.92
58.	7.44	7.54	7.20
59.	7.49	9.81	8.36
60.	7.00	8.48	7.02
61.	7.21	7.88	7.93
62.	7.29	7.93	8.79
63.	7.77	8.58	8.86
64.	7.56	7.95	8.55
65.	7.72	7.38	8.05
66.	7.28	8.29	7.36
67.	6.45	8.46	8.70
68.	6.87	8.79	7.44
69.	5.19	7.67	8.22
70.	6.74	8.68	7.18
71.	7.54	7.67	7.91
72.	8.13	8.68	9.19
73.	7.19	7.67	8.81
74.	6.11	7.60	9.52
75.	5.80	7.62	8.83
76.	5.93	6.24	7.90
77.	6.86	8.68	8.11
78.	7.17	9.85	9.18
79.	6.93	7.50	8.83
80.	7.94	9.62	9.36
81.	7.04	8.52	9.72
82.	7.96	8.81	9.21
83.	8.05	9.46	8.15

84.	7.73	9.43	8.92
85.	7.96	8.42	8.31
86.	7.09	9.49	8.33
87.	7.23	9.91	9.53
88.	9.53	7.70	7.70
89.	7.22	7.69	8.57
90.	6.27	9.29	9.12
91.	7.48	7.46	8.22
92.	6.39	9.05	8.81
93.	7.38	8.05	8.37
94.	6.07	8.42	7.48
95.	6.32	6.59	8.51
96.	7.07	6.19	7.93
97.	7.54	8.46	7.58
98.	8.11	7.17	8.82
99.	9.32	7.13	8.47
100.	7.77	6.60	8.39
Prosječna vrijednost (mm)	7.38	8.14	8.02
Minimalna vrijednost (mm)	5.19	5,25	5,20
Maksimalna vrijednost (mm)	10.26	10.71	9.72
Standardna devijacija (mm)	1.19	1.09	1.00

Životopis

Kristian Bošković rođen je 24. studenog 1994. godine u Supetru na otoku Braču. Osnovnu i srednju školu je završio na otoku Braču, a 2016. godine upisuje preddiplomski studij ekološke poljoprivrede na Agronomskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu. Nakon završenog preddiplomskog studija upisuje diplomski studij ekološke poljoprivrede i agroturizma na istoimenom fakultetu. Tečno se služi engleskim jezikom u jeziku i pismu, dok se pasivno koristi francuskim jezikom. Kao i cijela njegova obitelj, veliki je ljubitelj prirode, što je i važniji dio njegovog odgoja, pa se cijela obitelj već dugi niz godina bavi agroturizmom i ekološkim uzgojem domaćih proizvoda na vlastitom ranču i obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu.