

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

**„ANALIZA HEMIJSKIH I NUTRITIVNIH KARAKTERISTIKA
POLENA KOJI SU MEDONOSNE PČELE SAKUPILE U
RAZLIČITIM REGIONIMA SRBIJE“**

ALEKSANDAR Ž. KOSTIĆ

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

**„ANALYSIS OF CHEMICAL AND NUTRITIONAL
CHARACTERISTICS OF BEE-COLLECTED POLLEN FROM
DIFFERENT REGIONS OF SERBIA“**

ALEKSANDAR Ž. KOSTIĆ

-DOCTORAL DISSERTATION-

Belgrade, 2015.

Mentor:

dr Živoslav Lj. TEŠIĆ

redovni profesor Hemijskog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

Komentor:

dr Mirjana B. PEŠIĆ

docent Poljoprivrednog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Dušanka M. Milojković-Opsenica

redovni profesor Hemijskog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

dr Tanja D. Ćirković-Veličković

redovni profesor Hemijskog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

dr Časlav M. Lačnjevac

redovni profesor Poljoprivrednog
fakulteta,

Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

SADRŽAJ

| | | |
|-----|--|----|
| I | UVOD | 1 |
| II | OPŠTI DEO | 3 |
| | II-1 Razmnožavanje viših biljaka | 3 |
| | II-2 Oprašivanje (polinacija) i oplodjenje viših biljaka | 3 |
| | II-3 Razvoj, građa i svojstva polena | 5 |
| | II-4 Oprašivanje biljaka pomoću medonosne pčele | 7 |
| | II-5 Sakupljanje polena biljaka pomoću medonosne pčele | 9 |
| | II-6 Palinološko poreklo polena | 9 |
| | II-7 Hemijski sastav i nutritivne karakteristike polena | 22 |
| | II-7a Sadržaj vode (vlage) u polenu, aktivnosti vode (a_w) i pH- vrednosti | 25 |
| | II-7b Sadržaj aminokiselina i proteina u polenu | 28 |
| | II-7c Sadržaj šećera i dijetetskih vlakana u polenu | 40 |
| | II-7d Sadržaj lipidnih materija u polenu | 45 |
| | II-7e Sadržaj makro- i mikroelemenata u polenu | 55 |
| | II-7f Sadržaj fenola, vitamina i određivanje antioksidativne aktivnosti polena | 58 |
| | II-7g Mikrobiološka ispravnost i antimikrobna aktivnost polena | 68 |
| | II-7h Tehno-funkcionalna svojstva hrane | 73 |
| III | EKSPERIMENTALNI DEO | 77 |
| | III-1 Određivanje palinološkog (botaničkog) porekla uzoraka | 78 |
| | III-2 Određivanje opšteg fizičko-hemijskog sastava uzoraka | 79 |
| | III-2a Određivanje sadržaja vlage u uzorcima | 79 |
| | III-2b Određivanje aktivnosti vode i pH-vrednosti uzoraka | 79 |
| | III-2c Određivanje sadržaja pepela u uzorcima | 79 |
| | III-2d Određivanje sadržaja ukupnih lipida u uzorcima | 79 |
| | III-2e Određivanje sadržaja ukupnih proteina u uzorcima | 79 |
| | III-2f Određivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata u uzorcima | 80 |
| | III-2g Određivanje energetske vrednosti uzoraka | 80 |
| | III-3 Određivanje sadržaja pojedinačnih masnih kiselina, polifenolnih jedinjenja i šećera u uzorcima | 80 |
| | III-3a Sekvenciona ekstrakcija različitih frakcija iz uzoraka polena | 80 |
| | III-3b Određivanje sadržaja masnih kiselina u uzorcima | 81 |
| | III-3c Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u uzorcima | 82 |
| | III-3d Određivanje sadržaja rastvorljivih šećera u uzorcima | 83 |
| | III-4 Određivanje sadržaja makro i mikroelemenata u uzorcima | 83 |
| | III-5 Određivanje proteina SDS-PAGE metodom | 84 |

| | | |
|--------|---|-----|
| III-6 | Određivanje tehno-funkcionalnih svojstava polena | 84 |
| III-6a | Određivanje rastvorljivosti proteina | 84 |
| III-6b | Određivanje rastvorljivosti ugljenih hidrata | 85 |
| III-6c | Određivanje emulgirajućih svojstava polena | 85 |
| III-6d | Određivanje penivih svojstava polena | 86 |
| III-6e | Određivanje WAC i OAC vrednosti za polen | 87 |
| III-7 | Određivanje ukupne antioksidativnosti uzoraka polena | 87 |
| III-8 | Određivanje mikrobiološke ispravnosti uzoraka polena | 88 |
| III-9 | Određivanje prisustva aflatoksina u uzorcima polena | 89 |
| III-10 | Statistička analiza rezultata | 89 |
| IV | REZULTATI I DISKUSIJA | 90 |
| IV-1 | Palinološka analiza polena | 90 |
| IV-2 | Fizičko-hemijski sastav uzoraka polena | 93 |
| IV-2a | Sadržaji vlage i pepela u uzorcima polena | 93 |
| IV-2b | Sadržaji makro- i mikroelemenata u uzorcima polena | 95 |
| IV-2c | Sadržaj proteina u uzorcima polena | 101 |
| IV-2d | SDS-PAGE analiza | 105 |
| IV-2e | Sadržaj ukupnih i rastvorljivih ugljenih hidrata u uzorcima polena | 108 |
| IV-2f | Sadržaj ukupnih lipida i pojedinačnih masnih kiselina u uzorcima polena | 114 |
| IV-2g | Energetska vrednost uzoraka polena | 127 |
| IV-2h | Koorelaciona analiza nutritivnih parametara polena | 128 |
| IV-3 | Tehno-funkcionalna svojstva uzoraka polena | 130 |
| IV-3a | Emulgirajuća svojstva uzoraka polena | 130 |
| IV-3b | Peniva svojstva uzoraka polena | 132 |
| IV-3c | Kapacitet vezivanja vode (WAC) uzoraka polena | 133 |
| IV-3d | Kapacitet vezivanja ulja (OAC) uzoraka polena | 134 |
| IV-4 | Sadržaj fenolnih jedinjenja i ukupna antioksidativnost uzoraka polena | 136 |
| IV-5 | pH i a_w - vrednosti i ispitivanje prisustva plesni i aflatoksina u uzorcima polena | 145 |
| IV-5a | pH i a_w - vrednosti uzoraka polena | 145 |
| IV-5b | Ispitivanje prisustva plesni u uzorcima polena | 147 |
| V | ZAKLJUČCI | 156 |
| VI | LITERATURA | 164 |

***OVAJ DOKTORAT POSVEĆUJEM MOM TATI, JEDNOM OD
NAJVEĆIH ZALJUBLJENIKA U PČELE - TA MALA A TAKO
MOĆNA BIĆA.***

***ŽILE, CEO ŽIVOT „BEŽAH“ OD PČELA I ETO GDE ZAVRŠIH.
NADAM SE DA TE NISAM IZNEVERIO I DA BI BIO PONOSAN
NA MENE DA SI I DALJE SA NAMA.***

ZAHVALNICA

ZAHVALJUJUĆI SVOJOJ MULTIDISCIPLINARNOSTI OVAJ DOKTORAT JE, NA MOJU VELIKU SREĆU I ZADOVOLJSTVO, ZAHTEVAO I PODRAZUMEVAO SARADNJU SA VEĆIM BROJEM LJUDI RAZLIČITIH STRUKA I OPREDELJENJA. KAKO SU MI NEKI OD NJIH IZUZETNO PUNO POMOGLI U NJEGOVOJ IZRADI I NASTANKU ŽELEO BIH DA IM SE OVIM PUTEM POSEBNO ZAHVALIM:

- ✓ VELIKU ZAHVALNOST DUGUJEM PROF. DR NIKOLI RISTIĆU, EMERITUSU, KOJI ME JE , U TEŠKOM I PRELOMNOM TRENUTKU MOJE AKADEMSKE KARIJERE, POVEZAO SA PROF. DR ŽIVOSLAVOM TEŠIĆEM, MOJIM MENTOROM, KOME DUGUJEM BESKRAJNU ZAHVALNOST ZA PRIHVATANJE MENTORSTVA U TOM, ZA MENE JAKO VAŽNOM MOMENTU, I ŠTO MI JE ODABIROM OVAKVE TEME OMOGUĆIO DA SPOJIM SVOJE DVE VELIKE LJUBAVI - HEMIJU I BIOLOGIJU. BILO MI JE VELIKO ZADOVOLJSTVO SARADIVATI SA NJIME A NADAM SE DA ĆE SE TA SARADNJA I DALJE NASTAVITI
- ✓ VELIKO HVALA I PROF. DR DUŠANKI MILOJKOVIĆ-OPSENICI KOJA JE PRATILA RAZVOJ I NAPREDAK OVOG DOKTORATA OD SAMOG POČETKA I SVOJIM SUGESTIJAMA I KOREKTNOM SARADNJOM DOPRINELA DA ON NA KRAJU IZGLEDA ONAKO KAKO SMO SVI PRIŽELJKIVALI. PROFESORKA JE ULOŽILA PUNO TRUDA I ENERGIJE U IŠČITAVANJE RADNE VERZIJE DOKTORATA I UKAZALA NA PROPUSTE I PREVIDE KOJI UVEK POSTOJE
- ✓ ZAHVALNOST DUGUJEM I PROF. DR TANJI ĆIRKOVIĆ-VELIČKOVIĆ KAO ČLANU KOMISIJE ZA ODBRANU OVE TEZE NA SARADNJI I KORISNIM SUGESTIJAMA U ZAVRŠNOJ FAZI PISANJA DOKTORATA
- ✓ BESKRAJNO HVALA MOM KOMENTORU I DRAGOJ KOLEGINICI SA KATEDRE, DOC. DR MIRJANI PEŠIĆ BEZ ČIJE ENERGIJE, IDEJA, PODRŠKE I DUGOGODIŠNJE USPEŠNE SARADNJE JA SIGURNO NE BIH NI STIGAO DOVDE NITI IMAO PRILIKU DA PIŠEM OVIH NEKOLIKO REDOVA. MIRO, JOŠ JEDNOM, VEĆI SI HEMIČAR OD MNOGIH KOJI SE TAKO ZOVU TITULOM!
- ✓ TREĆI ALI NE MANJE VAŽAN ČLAN NAŠE „EKIPE“ NA KATEDRI, KOME BIH, TAKOĐE, OVDE ŽELEO DA SE ZAHVALIM JE PROF. DR MIROLJUB BARAĆ. MIĆO, HVALA ŠTO SI ME PRIHVATIO U SVOJU EKIPU I ŠTO ĆEMO, NADAM SE, JOŠ DUGO I USPEŠNO SARADIVATI I GRADITI MOST IZMEĐU HEMIJE I BIOHEMIJE

- ✓ **VELIKO HVALA I PROF. DR SLAĐANI STANOJEVIĆ KOJA JE UVEK BILA TU ZA MENE, I U DOBRU I U ZLU I POKAZALA KOLIKO VELIKI ČOVEK JESTE. SLAĐKA, HVALA TI ŠTO SI TAKVA KAKVA JESI**
- ✓ **VELIKU ZAHVALNOST DUGUJEM PROF. DR MARINI MAČUKANOVIĆ-JOCIĆ, VANREDNOM PROFESORU NA POLJOPRIVREDNOM FAKULTETU ZA STRPLJENJE I TRUD KOJI JE ULOŽILA DA PROČITA I KORIGUJE UVODNI DEO DOKTORATA VEZAN ZA BOTANIČKI ASPEKT PRIČE O POLENU. PROFESORKA, VELIKO HVALA ŠTO STE ME PODSETILI NA SVE LEPOTE BOTANIKE KAO NAUKE I NADAM SE NASTAVKU USPEŠNE SARADNJE**
- ✓ **ZAHVALNOST UPUĆUJEM I DOC. DR TANJI PETROVIĆ SA POLJOPRIVREDNOG FAKULTETA NA KORISNIM SUGESTIJAMA I SARADNJI OKO MIKROBIOLOŠKOG DELA PRIČE U OVOM DOKTORATU. TANJA, BILO BI BOLJE DA NISMO NAŠLI SVE ŠTO SMO NAŠLI U POLENU ALI DRUGAČIJE NE BIH IMAO PRILIKU DA, NA MOJE ZADOVOLJSTVO, SARADUJEM SA TOBOM. HVALA TI**
- ✓ **MORAM DA SPOMENEM I DR SLAĐANU ŽILIĆ SA INSTITUTA ZA KUKURUZ U ZEMUN POLJU SA KOJOM SAM USPEŠNO SARADIVAO U DELU ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNOSTI POLENA KAO I NA PROJEKTU NA KOJEM SAM JEDAN OD PARTICIPANATA**
- ✓ **VELIKU ZAHVALNOST DUGUJEM I SVOM „PREDMETNOM PROFESORU“ PROF. DR ČASLAVU LAČNJEVCU SA KOJIM SAM MALTENE ISTOVREMENO STIGAO NA POLJOPRIVREDNI FAKULTET I OD PRVOG DANA ZAPOČEO, VERUJEM I NADAM SE, USPEŠNU SARADNJU. DRAGI PROFO, HVALA VAM NA TOME I NA BROJNIM SAVETIMA VEZANIM KAKO ZA NAUKU TAKO I ZA OBIČAN, SVAKODNEVNI ŽIVOT**
- ✓ **JEDNO VELIKO HVALA I SOFIJI IĆITOVIĆ, MOM DRUGU I SABORCU SA „POLJOSA“ KOJA JE IMALA ŽIVACA I NERAVA DA PRVA PROČITA RADNU VERZIJU DOKTORATA I UKAŽE MI NA NEKE PROPUSTE I PREVIDE KOJE SAM NAPRAVIO. SOFIJA, KO RADI TAJ I GREŠI A ZATO SU TU I PRIJATELJI**
- ✓ **VELIKO HVALA MOM PRIJATELJU I KOLEGI SA KATEDRE PANTI SA KOJIM SAM DELIO „ISTU MUKU“. PANTO, DOGURASMO I TI I JA DO KRAJA „OVE PRIČE“ ALI NADAM SE DA NAM USPEŠNA SARADNJA, DUGOGODIŠNJA, TEK PREDSTOJI**
- ✓ **ZAHVALJUJEM SE I MALIŠI, VESNI, PROF. DR. EVICI IVANOVIĆ, JELENI, NEŠI BANJCU, IVANI NA USPEŠNOJ DUGOGODIŠNJOJ SARADNJI KROZ**

RAZNORAZNE KURSEVE, TESTOVE, ISPITE ILI OBIČNA KOLEGIJALNA DRUŽENJA I KAFE

- ✓ **HVALA I OSTALIM KOLEGAMA SA KATEDRE, KAKO PROFESORIMA TAKO I TEHNIČARIMA, ZA DUGOGODIŠNJU SARADNJU**
- ✓ **POSEBNO HVALA DRAGICI I DEJANU IPAČ ZA DUGOGODIŠNJU SARADNJU KOJA JE, VREMENOM, PRERASLA U DRUŽENJE I PRIJATELJSTVO**
- ✓ **ŽELEO BIH DA OVDE ISTAKNEM I NEKE VAŽNE LJUDE SA HEMIJSKOG FAKULTETA KOJI SU, SVAKO NA SVOJ NAČIN, DOPRINELI IZRADI OVOG DOKTORATA: UROŠA GAŠIĆA (BEZ KOGA NE BIH STIGAO DO SILNIH REZULTATA O SADRŽAJIMA ŠEĆERA I POLIFENOLA U POLENIMA), MIRU MOSIĆ (OD KOJE SAM „UKRAO ZANAT“ KONCENTROVANJA ŠEĆERA I FENOLA NA SPE-U I KOJA MI JE U POČETKU DOSTA POMOGLA SA UZORCIMA POLENA), DOC. DR JELENU TRIFKOVIĆ (ZBOG KOREKTNE SARADNJE NA PISANJU JEDNOG OD PRVIH RADOVA IZ OVOG DOKTORATA), KAO I DOC. DR MAJU NATIĆ**
- ✓ **VELIKO HVALA MOJOJ HELEN ŠTO JE STALA UZ MENE I OVAJ DOKTORAT OD POČETKA KAKO BI MALO LJUDI UČINILO. U ISTOM SMISLU TU JE I MOJA VLAJKA. VAS DVE SPADATE U ONU MALOBROJNU GRUPU PRAVIH PRIJATELJA KOJI SE ČUVAJU I NEGUJU CEO ŽIVOT**
- ✓ **NA SAMOM KRAJU NAJVEĆE HVALA MOJOJ PORODICI - MAMI RADI SA KOJOM ČESTO PODELIM I PONEKU SUZU KAO SEĆANJE NA ŽILETA. IAKO VIŠE NIJE SA NAMA, SVAKI DAN NAS PODSEĆA SA KAKVIM SMO VELIKIM ČOVEKOM IMALI ČAST BIVSTVOVATI VIŠE OD 30 GODINA. HVALA MOM VLAJKU ŠTO JE IMAO ŽIVACA ZA MOJA „ŠPANSKA SELA I PORTUGALSKE GRADOVE“ KADA SU U PITANJU KOMPJUTERI I TEHNIKA I ŠTO JE ODRADIO VAŽAN DEO TEHNIČKIH DETALJA OKO OVOG DOKTORATA. HVALA MOJOJ SNAJKI LANI NA MNOGOBROJNIM KAFAMA A OBOMA POSEBNO HVALA ZA STRIKINU PRINCEZICU ANJU (KOJA JEDVA ČEKA DA STRIKO I NJU POČNE DA UČI KAO ŠTO UČI DRUGU DECU NA POSLU) I STRIKINOG ŠARMERA STRAHINJU KOJI ĆE BITI DOSTOJAN PREDSTAVNIK TREĆEG KOSTIĆA KOLENA.**

u BEOGRADU

09. x 2015.

MR SCI CHEM ALEKSANDAR KOSTIĆ

SKRAĆENICE

| | |
|--|--|
| PDU – preporučeni dnevni unos | C8:0 – kaprilna kiselina |
| GABA – γ -aminobuterna kiselina | C9:0 – nonanska kiselina |
| Hser – homoserin | C10:0 – kaprinska kiselina |
| Orn – ornitin | C12:0 – laurinska kiselina |
| USA – Sjedinjene Američke Države | C14:0 – miristinska kiselina |
| FAO – Agencija za hranu Ujedinjenih nacija | C13:0 – tridekanska kiselina |
| Trp – triptofan | C15:0 – pentadekanoinska kiselina |
| (Cys) ₂ – cistin | C16:0 – palmitinska kiselina |
| HPLC – tečna hromatografija visokih performanci | C16:0 IZO – izopalmitinska kiselina |
| BCEC-Cl - 2-(11H-benzo[α]-karbazol-11-il)etil-hloroformat | C16:1 – palmitoleinska kiselina |
| F – fruktoza | C17:0 – margarinska kiselina |
| G – glukoza | C17:1 – margaroleinska kiselina |
| NSP – neskrobni polisaharidi | C18:0 – stearinska kiselina |
| UDV – ukupna dijetalna vlakna | C18:1n-9 – oleinska kiselina |
| NDV – nerstvorna dijetalna vlakna | C18:2n-6 – linolna kiselina |
| RDV – rastvorna dijetalna vlakna | C18:3n-6 – γ -linolenska kiselina |
| TLC – tankoslojna hromatografija | C20:0 – arahidska kiselina |
| HPLC-PAD - Ca ²⁺ -ligandna jonoizmenjivačka hromatografija visoke performace spregnuta sa pulsnom amperometrijskom detekcijom | C20:1 – eikozanska kiselina |
| HPLC/MS – tečna hromatografija visokih performanci spregnuta sa masenom spektrometrijom | C20:2 – eikozadienska kiselina |
| | C22:0 – behenska kiselina |
| | C20:3n-6 – dihomog-linolenska kiselina |
| | C20:3n-3 – eikozatrienska kiselina |
| | C20:5n-3 – eikozapentanoinska kiselina |
| | C22:5n-3 – dokozapentanoinska kiselina |
| | C22:6n-3 – dokozaheksanoinska kiselina |

| | |
|--|--|
| C24:0 – lignocerinska kiselina | EEPP - ekstrakt polena podvrgnut digestiji pepsinom |
| C ₂₀ – eikozan | EPR – elektron-paramagnetna rezonanca |
| C ₂₂ – dokozan | cfu – broj jedinki kolonije mikroba po g uzorka |
| C ₂₆ – heksakozan | WAC – kapacitet vezivanja vode |
| C ₂₈ – oktakozan | OAC – kapacitet vezivanja ulja |
| C ₃₂ – dotriakontan | SPOS – Savez pčelarskih organizacija Srbije |
| ZMK – ukupne zasićene masne kiseline | CS – Centralna Srbija |
| NMK – ukupne nezasićene masne kiseline | BG – Beograd |
| MNMK – sadržaj mononezasićenih masnih kiselina | VOJ – Vojvodina |
| PNMK – sadržaj polinezasićenih masnih kiselina | SDS- natrijum-dodecilsulfat |
| PAH – policiklični aromatični ugljovodonici | PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza |
| CCD - colony collapse disorder syndrome | BSA – goveđi serum albumin |
| LC – tečna hromatografija | AOAC – Association of Official Analytical Chemists |
| ESI – elektronsprej jonizacija | MEMK – metil estri masnih kiselina |
| UV – ultravioletno (ultraljubičasto) zračenje | FID – plameno-jonizujućii detektor |
| TAA – ukupna antioksidativnost | SPE – čvrsto-tečna ekstrakcija |
| RSA – radical-scavenging activity | UHPLC-MS/MS – ultratečna hromatografija visokih performansi spregnuta sa masenom spektrometrijom |
| DPPH - [di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)-iminoazanijum] radikal | HPAEC/PAD - anjonska jonoizmenjivačka hromatografija visokih performansi spregnuta sa pulsirajućom amperometrijskom detekcijom |
| GAE – ekvivalenti galne kiseline | |
| QE – ekvivalenti kvercetina | |
| EEP – etanolni ekstrakt polena | |
| PEP – enzimski hidrolizat polena | |

ICP-OES – indukovano-kuplovana plazma spregnuta sa emisionom spektrometrijom

PTFE – politetrafluoretilen

TRIS - tris(trihidroksimetil)metanamin

EAI – indeks aktivnosti emulzije

ESI – indeks stabilnosti emulzije

FC – kapacitet pene

FS – stabilnost pene

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-
etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

Trolox – 6-hidroksi-2,5,7,8-
tetrametilhroman-2-karboksilna
kiselina

ELISA – (enzyme linked immuno
sorbent assay) enzimske imunološke
metode

Analiza hemijskih i nutritivnih karakteristika polena koji su medonosne pčele sakupile u različitim regionima Srbije

Izvod

U ovom radu ispitivane su hemijska i nutritivna svojstva polena koji su sakupile medonosne pčele i to: palinološko poreklo uzoraka polena, sadržaji pepela, vlage, makro- i mikroelemenata, energetska vrednost, ukupni sadržaji proteina, ugljenih hidrata, lipida i fenola, ukupni antioksidativni kapacitet kao i pojedinačni sadržaji rastvorljivih ugljenih hidrata, masnih kiselina i fenolnih jedinjenja. Osim toga, ispitano je i prisustvo plesni i aflatoksina B1, kao mikrobiološki parametar ispravnosti uzoraka kao i tehno-funkcionalnih svojstava: peniva i emulgjuća svojstva, rastvorljivost proteina i ugljenih hidrata, kapaciteti vezivanja vode i ulja.

Utvrđeno je da se uzorci razlikuju po botaničkom poreklu, da je većina polifloralnog tipa sa petnaest zastupljenih biljnih vrsta i rodova od kojih su najzastupljeniji bili krstašice (kupusnjače) (Brassicaceae) i mahunarke (Fabaceae).

Sadržaj vlage u ispitivanim uzorcima se kretao u opsegu od 4,35 do 14,35 g/100g dok je sadržaj pepela bio u intervalu 1,18-3,32 g/100g. Na osnovu sadržaja ukupnih proteina (14,81-27,25%), ugljenih hidrata (64,42-81,84%), lipida (1,31-6,78%) i prosečne energetske vrednosti (375 kcal) zaključeno je da bi se polen koji su sakupile medonosne pčele mogao koristiti kao dodatak ishrani.

Na osnovu sadržaja pojedinačnih rastvorljivih ugljenih hidrata utvrđeno je da je, u najvećem broju uzoraka, najzastupljeniji šećer fruktoza. Osim nje identifikovane su i glukoza, maltoza, saharoza i trehaloza. Od pojedinačnih masnih kiselina u uzorcima polena identifikovano ih je dvadeset, od čega je šest zastupljeno u svim uzorcima – C8:0, C16:0, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6 i C18:3n-3. Na osnovu kvantitativne analize ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja (25,82 - 206,09 mg/100g) za većinu uzoraka se moglo reći da su sadržavali male količine fenolnih jedinjenja. U svim uzorcima identifikovana su četiri od ukupno trinaest prisutnih fenolnih jedinjenja – rutin, luteolin, galna i hlorogena kiselina. Ukupni antioksidativni kapacitet ispitivanih uzoraka se kretao u opsegu od 27,46 do 138,89 mmol kg⁻¹ TROLOX-a.

Na osnovu sadržaja makro- i mikroelemenata zaključeno je da su tri najzastupljenija elementa u uzorcima polena bili kalijum, kalcijum i magnezijum. Utvrđeno je i značajno prisustvo gvožđa i cinka što ispitivane uzorke čini potencijalno dobrim izvorima ova dva važna elementa u ishrani čoveka. Nije utvrđeno značajnije prisustvo potencijalno štetnih elemenata osim prisustva aluminijuma u dva ispitivana uzorka. Zaključeno je da najveći uticaj na sadržaj minerala u uzorcima polena ima njihovo palinološko poreklo.

Ispitivani uzorci polena su pokazivali nisku rastvorljivost proteina (2,79 - 25,90 g/100g), visoku rastvorljivost ugljenih hidrata (31,2 - 75 g/100g), dobra emulgjuća i antipeniva svojstva. Takođe, pokazivali su nizak kapacitet vezivanja vode (0,92 - 2,25 g/100g) a visok za vezivanje ulja (1 - 3,53 g/100g).

Utvrđeno je prisustvo plesni u desetispitivanih uzoraka kao i prisustvo aflatoksina B1 u svim ispitivanim uzorcima, koji je nastao kao produkt metabolizma plesni *Aspergillus flavus*, a koja je identifikovana u dva ispitivana uzorka polena. Zbog toga je neophodno uz analizu prisustva plesni uraditi i mikotoksikološku analizu. Od rodova plesni identifikovano je šest (*Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. i *Fusarium* sp.) pri čemu su plesni iz roda *Trichoderma* sp. prvi put pronađene u polenu.

Ključne reči: Polen koji su sakupile medonosne pčele, hemijska karakterizacija, nutritivna svojstva, antioksidativa svojstva, tehno-funkcionalna svojstva, plesni, aflatoksin B1.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija.

UDK broj: 543

Analysis of chemical and nutritional characteristics of bee-collected pollen from different regions of Serbia

Abstract

In this study chemical and nutritional characteristics of bee-collected pollen have been determined: palynological origin of samples, ash, moisture, macro and microelements content, as well as energetic value and total content of proteins, carbohydrates, lipids and phenolic compounds as well as total antioxidative capacity. Furthermore, contents of soluble sugars, fatty acids and phenolic compounds have been estimated. Presence of moulds and aflatoxin B1 has been investigated as well as techno-functional properties such as: of protein and carbohydrate solubility, foaming and emulsifying properties, water and oil absorption capacity.

It was found that most of the samples were polyfloral with different palynological origin represented by fifteen plant families or species. The most abundant families were Brassicaceae and Fabaceae.

The moisture content was ranged from 4.35 to 14.35 g/100g, while content of ash varied in the range: 1.18 - 3.32 g/100g. Based on the total protein (14.81 to 27.25%), carbohydrate (64.42 to 81.84%) and lipid (1.31 to 6.78%) contents and the average energy value (375 kcal), it was concluded that bee-collected pollen could be used as a dietary supplement.

Among soluble carbohydrates the most abundant sugar was fructose. In addition glucose, sucrose, maltose and trehalose were found. Twenty fatty acids were detected in samples wherein six were found in all of the investigated samples- C8:0, C16:0, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6 i C18:3n-3. Based on the total content of phenolic compounds (25.89 - 206.09 g/100g) most of the samples were characterized by low level. Four of the thirteen detected phenolic compounds were found in all samples- rutin, luteolin, galic and chlorogenic acid. Total antioxidative capacity was ranged from 27.46 to 138.89 mmol kg⁻¹ of TROLOX.

On the basis of the content of macro- and microelements, it was concluded that the three most common elements in samples of pollen were potassium, calcium

and magnesium. There was a significant presence of iron and zinc which makes investigated samples potentially good sources of these important elements in human nutrition. There was no significant presence of potentially harmful elements except for presence of aluminium in two of studied samples. It was concluded that palynological origin had the greatest impact on the mineral content of the bee-collected pollen samples.

The pollen samples showed a low protein solubility (2.79 - 25.90 g/100g), high solubility of carbohydrates (31.2 - 75 g/100g), good emulsifying and non-foaming properties. A low water absorption capacity (0.92 - 2.25 g/100g) and high oil absorption capacity (1 - 3.53 g/100g) were found.

The presence of mould has been detected in ten samples, meanwhile presence of aflatoxin B1 was found in all of the investigated samples of bee-collected pollen. This mycotoxin originates from metabolism of specie *Aspergillus flavus* which has been identified in two samples. Therefore, it is necessary to make mycotoxicological analysis along with analysis of presence of mould. Six mould genera were detected - *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. i *Fusarium* sp. The presence of mould genera *Trichoderma* sp. was identified in the bee-collected pollen for the first time.

Keywords: bee-collected pollen, chemical characterization, nutritional properties, antioxidative properties, techno-functional properties, mould, aflatoxin B1.

Scientific field: Chemistry

Specific scientific field: Analytical chemistry.

UDC Number: 543

I UVOD

Jedan od najvažnijih procesa u živom svetu je razmnožavanje kojim biljke i životinje obezbeđuju produžetak i opstanak svoje vrste. Kod viših biljaka polno razmnožavanje se vrši pomoću polenovih zrna koja predstavljaju muške polne ćelije. Oprašivanje biljaka može da se vrši pomoću vetra ili neke od životinjskih vrsta. Na našim prostorima za najveći broj biljnih vrsta oprašivač (polinator) je medonosna pčela (*Apis mellifera*).

Stari Egipćani su polen opisivali kao „prah koji život znači“. U Antičkoj Grčkoj za polenova zrna se smatralo da se sastoje od voska. Aristotel u svojoj knjizi *Historia animalium* zaključuje da po čvrstini polen podseća na vosak ali zapravo predstavlja „pčelinji hleb“ (bee bread). Kasnije je nazvan brašno. Međutim, ime „pčelinji hleb“ je zadržan kroz vekove. Naziv polen, koji potiče od latinskog naziva za fino brašno tj prašinu, prvi put je upotrebljen 1686. godine od strane Ray-a (John Ray) u njegovoj knjizi *Historia plantarum*. Prvi rad o primeni polena kao hrane prikazao je Meehan 1873. godine dok šira upotreba polena koji su sakupile medonosne pčele započinje nakon drugog svetskog rata [Bogdanov, 2012].

Polen je izuzetno bogat hranljivim materijama – ugljenim hidratima, proteinima, lipidima, makro- i mikroelementima. Pored toga, može poslužiti i kao izvor različitih vitamina i fenolnih jedinjenja. Međutim, sastav cvetnog kao i polena koji su sakupile medonosne pčele može značajno da varira u zavisnosti od botaničkog porekla, geografskog porekla, načina sakupljanja, uslova transporta i čuvanja.

Prema tome, radi utvrđivanja nutritivnih svojstava polena neophodno je poznavanje fizičko-hemijskog sastava polena, dok je poznavanje botaničkog i geografskog porekla polena značajno radi dobijanja polena određenog sastava. Sa druge strane, da bi polen našao širu primenu u ishrani, kao dodatak različitim prehrambenim proizvodima, neophodno je poznavanje njegovih tehno-funkcionalnih svojstava i mikrobiološke ispravnosti.

Bitno je napomenuti da u svetu sve više raste interes za konzumiranje funkcionalne hrane, zbog čega je poznavanje funkcionalnih svojstava polena pored nutritivnih i tehno-funkcionalnih značajno za kreiranje prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću.

Prema dostupnim podacima iz literature, detaljna analiza fizičko-hemijskog sastava polena koju su sakupile medonosne pčele na području Srbije nije urađena, dok tehno-funkcionalna svojstva polena dosada nisu ispitivana.

Cilj ovog rada je bio da se, po prvi put, izvrši detaljna fizičko-hemijska, nutritivna i tehno-funkcionalna karakterizacija uzoraka polena koji su sakupile medonosne pčele na području Srbije. Pored toga, cilj je bio da se ustanovi prisustvo plesni i aflatoksina B1 kao parametara mikrobiološke ispravnosti i utvrdi ukupni antioksidativni kapacitet polena kao funkcionalne hrane. Da bi se postigao ovaj cilj urađeno je sledeće:

- ✓ određeno je palinološko poreklo ispitivanih uzoraka polena
- ✓ određen je sadržaj vlage, pepela, ukupnih proteina, ugljenih hidrata, lipida i fenolnih jedinjenja. Takođe, utvrđen je i ukupni antioksidativni kapacitet polena
- ✓ određena je energetska vrednost uzoraka polena kako bi se utvrdilo u kolikoj meri zadovoljavaju nutritivne parametre u smislu upotrebe kao dodatka u ljudskoj ishrani
- ✓ određeni su sadržaji rastvorljivih ugljenih hidrata i pojedinačnih masnih kiselina prisutnih u ispitivanim uzorcima
- ✓ određena su tehno-funkcionalna svojstva uzoraka polena kao što su peniva i emulgujuća svojstva, rastvorljivost proteina i ugljenih hidrata kao i kapaciteti vezivanja vode i ulja
- ✓ Ispitano je prisustvo plesni, kao jednog od najčešćih mikrobioloških kontaminanata prisutnih u hrani kao i prisustvo aflatoksina B1, najtoksičnijeg mikotoksina koga proizvode određene vrste plesni.

Dobijeni rezultati bi trebalo da pokažu u kolikoj meri se sastav polena koji su pčele sakupile u različitim regionima Srbije razlikovao kao posledica razlika u palinološkom i geografskom poreklu istog. Takođe, naša ispitivanja trebalo bi da omoguće procenu hranljive vrednosti polena skupljenog u Srbiji kao potencijalnog dodatka ljudskoj ishrani, tehno-funkcionalna svojstva polena kako bi se bliže okarakterisala njegova moguća primena u prehrambenim proizvodima, kao i ustanovi mikrobiološka ispravnost radi zdravstvene bezbednosti konzumenata.

II OPŠTI DEO

II-1 Razmnožavanje viših biljaka

Najveći broj biljnih vrsta današnjice pripada tzv. višim biljkama među kojima su najvažnija dva razdela i to:

- ✓ golosemenice (Gymnospermae ili Pionophyta)
- ✓ skrivenosemenice (Angiospermae ili Magnoliophyta).

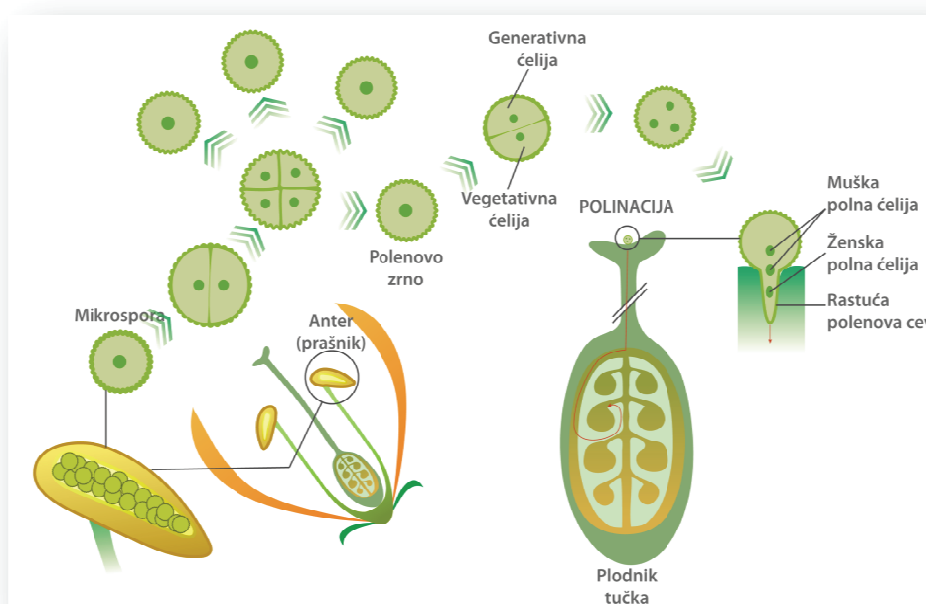
S obzirom da pojava cveta kod skrivenosemenica predstavlja najviši nivo evolutivnog razvoja biljaka, nije čudno što su danas upravo skrivenosemenice najzastupljenije biljke na svetu sa više od dvesta trideset hiljada biljnih vrsta različitih morfo-fizioloških karakteristika [Kojić, 1989; Šerban *et al.*, 2013].

Proces razmnožavanja kod cvetnica započinje mejotičkom deobom neke od ćelija sa diploidnim brojem hromozoma ($2n$) i formiranjem spora. Spore sadrže haploidni broj hromozoma (n) [Stanley i Linskens, 1974]. Na samom početku mikrospore nisu spremne da započnu proces razmnožavanja i da učestvuju u oplodnji. Neophodno je da dođe do nekoliko mitotičkih deoba, da spora miruje određeni vremenski period i tek onda nastaje zrela haploidna mikrospora koja se naziva polenovo zrno [Stanley i Linskens, 1974].

II-2 Oprašivanje (polinacija) i oplodjenje viših biljaka

U toku procesa oprašivanja (polinacije) polenova zrna dospevaju do tučka tj. do njegovog gornjeg, lepljivog dela koji se naziva žig. Transfer polena do tučka vrši se ili putem abiotičkih (vetar - anemofilija i voda- hidrofilija) ili biotičkih (životinje - zoofilija) faktora. Polenovo zrno, osim muških polnih ćelija, sadrži i hranljive sastojke i nakon stizanja do tučka ono se deli i izrasta u vidu polenove cevčice kroz tučak. Ova cevčica prolazi kroz stubić tučka i stiže do plodnika i do jajne ćelije. Pri tome, polenova cevčica puca i oslobađa dve muške polne ćelije (mikrogameti). Jedna se spaja sa jajnom ćelijom i formira diploidni zigot, a od druge će se formirati endosperm. On predstavlja hranljivo tkivo koje će zigot koristiti pri klijanju i razviću u novu biljku. Na taj način se završava proces oplodjenja biljke (sl. 1) [Gajić *et al.*, 2003].

S obzirom da nemaju formiran pravi cvet kojima bi privukle insekte oprašivače, kod golosemenica oprašivanje se uglavnom vrši pomoću vetra dok je kod drugih za oprašivanje neophodan posrednik tj. polinator. Kod anemofilnih biljaka polenova zrna su laka i pokretna da bi mogla lako da se transportuju vetrom, a cvetovi ovih biljaka su obično neatraktivni. Sa druge strane, entemofilna polenova zrna su teška i lepljiva (bogata proteinima) da bi lako mogla da se zalepe za telo polinatora. Oprašivanje biljaka pomoću insekata postoji već više od sto miliona godina. Među insektima, u umerenokontinentalnoj zoni najvažniji polinatori su pčele zahvaljujući kojima se dobija oko 80% hrane biljnog porekla [Mačukanović-Jocić, 2010]. One oprašuju preko četrdeset hiljada biljnih vrsta, a godišnji prihodi od meda mogu biti značajni. Na osnovu toga se može uvideti koliki je njihov značaj sa ekološkog i agronomskog aspekta. Zbog toga su pčelari uvek rado viđeni „gosti“ na poljoprivrednim zasadima kultura koje cvetaju [Gajić *et al.*, 2003; Bogdanov, 2012].



Slika 1. Proces oprašivanja (polinacije)

Poreklo medonosne pčele nije ni danas sa potpunom preciznošću utvrđeno [Stanimirović *et al.*, 2000]. Prema jednim smatra se da je poreklo medonosnih pčela vezano za indijski potkontinent na kojem se i danas mogu naći sve poznate vrste pčela uključujući i četiri najpoznatije vrste medonosne pčele:

- ✓ *Apis mellifera*
- ✓ *Apis indica*
- ✓ *Apis florea*
- ✓ *Apis dorsata*

od kojih je, za nas, najvažnija evropska medonosna pčela (*Apis mellifera*) (sl. 2).



Slika 2. Pčela radilica vrste *Apis mellifera*

Kada je u pitanju filogenetsko poreklo medonosnih pčela one imaju, najverovatnije, zajedničko poreklo sa solitarnim vrstama pčela i osa (tzv. pčele i ose „samice“)[Stanimirović *et al*, 2000]. U okviru svakog pčelinjeg društva razlikuju se tri vrste pčela: matica, trutovi i radilice. Radilice su te koje su zadužene za prikupljanje polena zahvaljujući posebnim korpicama (*corbiculae*) koje im se nalaze na zadnjim nogama, kao i sitnim dlačicama kojima im je obrastao najveći deo tela, a za koje se polenova zrna, takođe, mogu zakačiti.

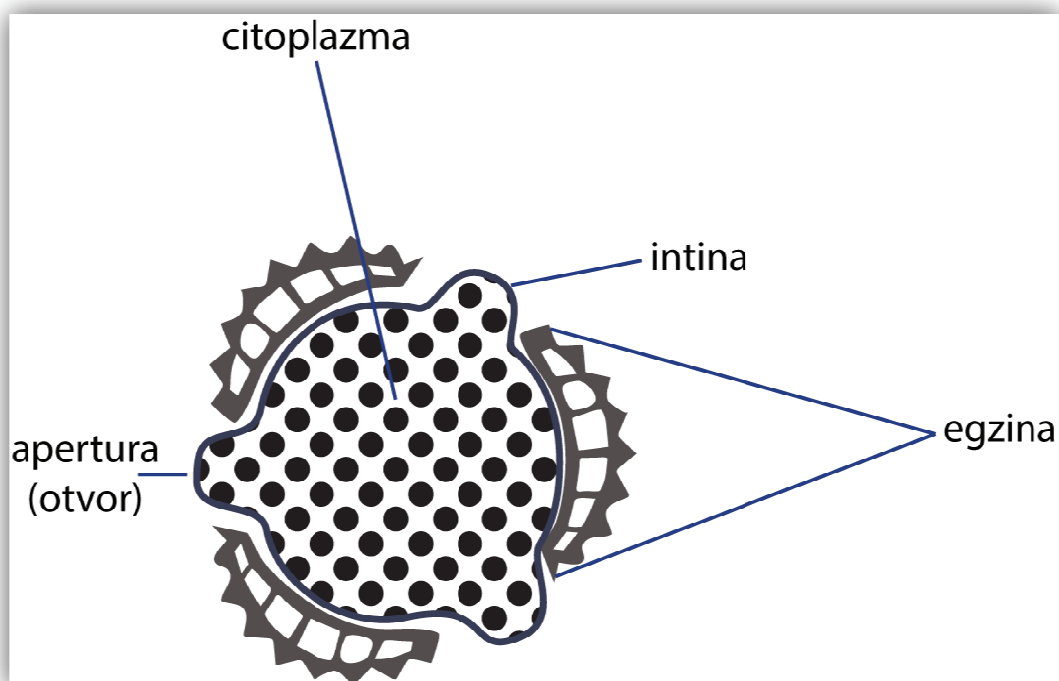
II-3 Razvoj, građa i svojstva polena

Nakon obrazovanja polenovih zrna u njima započinju mitotičke deobe kroz proces formiranja muške polne ćelije tj. muškog gametofita – mikrogametogeneza. Na ovaj način od svake mikrospore koja je dala jedno zrno dolazi do deobe i nastajanja dve ćelije (n):

- ✓ Veće, koja je vegetativna
- ✓ Manje, koja je generativna [Tatić i Petković, 1998].

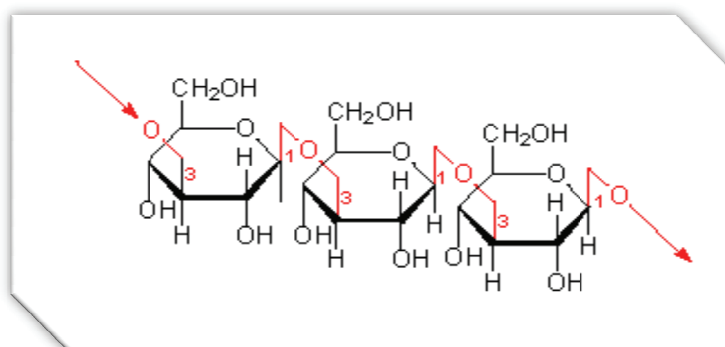
Oko vegetativne i generativnih ćelija polenovog zrna formiraju se dve opne (sl. 3):

- ✓ unutrašnja – intina
- ✓ spoljašnja – egzina.



Slika 3. Građa polenovog zrna

Obe imaju zaštitnu ulogu. Utvrđeno je da se ovakva građa zida kod polena javlja tek nakon stvaranja mikrospora [Stanley i Linskens, 1974]. Naime, u opni budućeg polenovog zrna još je Mangin, 1889-te [Mangin, 1889], identifikovao prisustvo polisaharida kaloze (sl. 4).



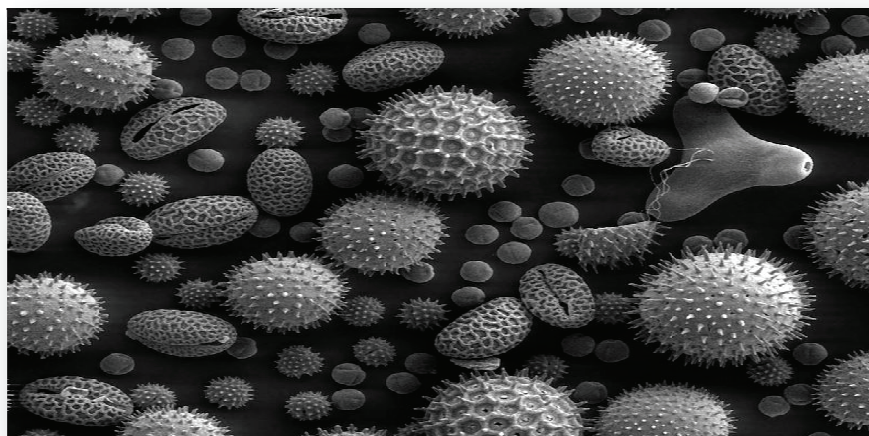
Slika 4. Osnovni gradivni motiv strukture kaloze

Prvo ispitivanje njenog nastanka i uloge izvršio je Eschrich [Eschrich, 1956] i utvrdio da ona ima ulogu da izoluje i razdvaja začetke mladih mikrospora. Kaloza se nalazi u amorfnom delu omotača ćelije i ne formira fibrilarnu strukturu [Frey-Wyssling *et al.*, 1957]. Barskaya i Balina [1971] su utvrdile da je uloga kaloze i da

obezbedi zadržavanje vode tj. da spreči dehidraciju ćelije u periodu kada biljka ne može da obezbedi dovoljnu količinu vlage (npr. u sušnom periodu godine). Neposredno pred nastanak mikrospore kako započne proces razgrađivanja i nestanka kaloze u zidu ćelije tako će se formirati neka vrsta preegzinske opne iz koje će se, nešto kasnije, razviti egzina. Odmah nakon formiranja mikrospora i razgradnje kaloze započinje stvaranje sporopolenina, glavnog gradivnog sastojka egzine. Sama struktura sporopolenina je izuzetno složena i smatra se da je u pitanju polimer nastao oksidacijom karotenoida ili njihovih estara [Shaw i Yeardon, 1966]. Nakon toga dolazi do intenzivnog akumuliranja materijala i nastanka egzinske opne. U toku ove faze dolazi i do promena na otvorima (aperturama) na polenovom zrnju koje se prvi put obmotavaju tankim celuloznim omotačem koji ih odvaja od ostatka zrna, a koji se može smatrati i prvim začetkom intine. Razvoj intine se odigrava paralelno sa razvojem egzinske opne, ali neravnomerno što se može zaključiti i ako se pogleda građa intinskog sloja. U njemu se uočavaju koncentrični krugovi izgrađeni od celuloznog materijala, koji predstavlja osnovnu gradivnu komponentu intine. Na kraju razvoja i sazrevanja polenovog zrna dolazi do nakupljanja lipidnih i obojenih supstanci oko egzine u sloju koji se naziva „pollen kitt“. On ima važnu ulogu u stvaranju mirisa polena, njegovoj atraktivnosti (zbog boje) za životinje – oprašivače kao i u međusobnom slepljivanju zrna polena. Građa i debljina egzine se razlikuje od biljke do biljke pa se, iz tog razloga, i polenova zrna međusobno mogu značajno razlikovati (sl. 5).

II-4 Oprašivanje biljaka pomoću medonosne pčele

Kao što je već naglašeno, najveći broj biljaka oprašuje se pomoću insekata, a među njima najvažniji oprašivač je medonosna pčela. Kada medonosna pčela sleti na cvet ona dodiruje prašnike i pri tome se polenova zrna lepe i kače za brojne dlačice koje postoje na njenom telu. Pčela koristi svoje zadnje noge da sabije polen u korpice za polen (*corbiculae*) koje se nalaze na njima.



Slika 5. Mikroskopski snimak polenovih zrna

Pčela navlaži polen sekretom iz usta čime pomaže da se polen bolje spakuje u korpice i prilepi za telo. Ovaj sekret sadrži različite enzime, a pre svega amilaze i katalaze. Jedna prosečna količina polena, koju pčela spakuje u korpice iznosi oko 8 mg [Bogdanov, 2012]. Po jednim, da bi formirala jednu obnožnicu od polena tj. napunila obe korpice na nogama. pčela u proseku mora da poseti i oprašiti od sedam do dvadeset cvetova [Lebedeva *et al.*, 2001] dok po drugima taj broj cvetova je i do dvesta [Bogdanov, 2012]. Obično se u jednom paketu polena nalazi polen od jedne biljne vrste (monofloralni). Ako je, pak, pčela u toku prikupljanja polena posetila cvetove različitih biljaka, u njenim korpicama i na telu će se naći mešoviti (polifloralni) polen. U proseku jedna pčela dnevno načini deset preleta u toku kojih sakuplja polen.

Pri dobrim vremenskim uslovima u košnicu dnevno se unese preko pedeset hiljada polenovih paketa. U košnici pčela polen sa zadnjih nožica skida pomoću šiljaka koji se nalaze na srednjim nožicama i smešta ga u satne ćelije (saće). Osim srednjih nožica pčela polen pakuje i pomoću glave, a dodaje i med radi poboljšanja njegovog kvaliteta. Na taj način stvara se perga. U periodu kada u prirodi nema polena, u rano proleće, pčele će u košnicu unositi druge materije poput brašna ili piljevine [Stanimirović *et al.*, 2000].

U toku sakupljanja polena pčele radilice mešaju polen u korpicama sa nektarom, a u košnici dodaju još nektara i sekreta iz pljuvačnih žlezda nakon čega polen podleže fermentaciji. Nektar je slatki cvetni sok koji luče posebne žlezde - nektarije. One se nalaze na samom cvetu (floralne) ili na drugim nadzemnim delovima cveta (ekstrafloralne).

II-5 Sakupljanje polena biljaka pomoću medonosne pčele

Sakupljanje polena može se vršiti dvojako: ručno ili pomoću insekata tj. pčela. Prva varijanta je moguća i primenjuje se samo ako se želi sakupiti isključivo polen od jedne biljne vrste, odnosno monofloralni polen. U svim ostalim slučajevima koristi se polen koji su sakupile pčele i samo takav polen se i može naći na tržištu. Prikupljanje polena se može vršiti na različite načine, ali obično se postavljaju zamke sa rešetkama na ulazu u košnicu, ili horizontalno ispod samog ulaza, tako da se sa pčela radilica prilikom sletanja u košnicu a pri prelasku preko tih rešetki i zamki skidaju zrnca polena i ostaju u tim zamkama. Deo polena koji se na ovaj način prikupi može varirati u zavisnosti od slučaja, ali je uvek značajno manji od 100% i kreće se u proseku od 3% do 25% u toku vegetacionog perioda. Vrednosti mogu da se značajno razlikuju čak i kada je prikupljanje izvođeno istim zamkama, ali u različitim kolonijama i kreću se od 15 – 43%. Efikasnost prikupljanja polena može značajno da se promeni i poveća i ako se pčelinja kolonija premesti u područje u kojem cvetaju biljke sa znatno krupnijim zrnima polena. U tom slučaju efikasnost prikupljanja polena može i da se udvostruči. Rezultati koji su dobijeni u istraživanju za veći broj lokacija u Evropi i jednoj u Americi pokazali su da se raspoloživa količina polena razlikovala i kretala od 5,6 kg do 222 kg. Ako se pretpostavi da je prosečna efikasnost zamki oko 20%, to znači da je količina polena koja može da se sakupi pomoću njih između 1,1 kg i 40,4 kg pri čemu je najveća količina polena sakupljena u Kaliforniji (SAD). U Evropi ta količina je bila značajno niža i kretala se od 1,4 kg do 9,2 kg po košnici. Ovako velika razlika je verovatno posledica u razlici u dužini vegetacionog perioda u Kaliforniji u odnosu na Evropu. Osim veličine zrnca polena i njegove količine, u smislu produkcije od strane biljke na efikasnost sakupljanja značajno mogu da utiču i vremenski uslovi kao i potrebe košnice za hranom [Bogdanov, 2012].

II-6 Palinološko poreklo polena

Palinološko (botaničko) poreklo polena koji su sakupile medonosne pčele lako se određuje mikroskopskom analizom, što je danas već prihvaćeno kao standardna analiza. Ovom analizom češće se može odrediti rod ili familija biljaka od koje potiče polen nego konkretna biljna vrsta. Među prve radove koji se bave ispitivanjem

polena koji su sakupile medonosne pčele, a gde se navodi i botaničko poreklo polena, spadaju radovi Heyl-a i Hopkins-a [1920], odnosno Elser-a i Ganzmüller-a [1931]. Prva dvojica su identifikovali i ispitali polen pelinolistne ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia*), a Elser i Gunzmüller su pronašli u polenu koji su sakupile medonosne pčele zrna koja potiču od bora (*Pinus sp.*), jove (*Alnus sp.*) i lešnika (*Corylus sp.*). Auclair i Jamieson [1948] su u svom radu identifikovali polen maslačka (*Taraxum officinale*) i vrbe (*Salix sp.*) kao i polifloralne uzorke. Kauffeld [1980] u svojim rezultatima vezanim za ispitivanje uzoraka polena sa područja Luizijane, SAD (Louisiana, USA) utvrdio je da se, u zavisnosti od meseca kada su pčele sakupljale polen, u njemu može naći polen veoma raznovrsnog palinološkog porekla što zavisi od toga kada biljke cvetaju– u martu mesecu glavne vrste polena potiču od bele holandske deteline (*Trifolium repens*), kruške (*Pyrus communis*), vrbe, voskovite mirte (*Myrica sp.*), krestovnika (*Senecio sp.*) i vrsta *Ilex vomitoria* i *Cercis canadensis*. U toku aprila i maja, osim bele deteline, vrbe i biljke *Ilex vomitoria* glavni izvor polena za pčele su i biljke persijska detelina (*Trifolium resupinatum*), kupina (*Rubus sp.*), otrovni bršljan (*Toxicodendron sp.*), vrbena (*Verbena sp.*) i biljke iz roda *Ligustrum*. U periodu maj – jun najviše cvetaju sledeće biljke: vrbena, divlji sirak (*Sorghum halepense*), „pileće“ drvo (*Sapium sebiferum*), ruj (*Rhus sp.*), štir (*Chenopodium sp.*) i biljka *Ampelopsis arborea*. Analizu polena samo jedne biljne vrste, badema (*Prunus dulcis*) sa područja Kalifornije nalazimo u radu Loper-a i saradnika [Loper *et al.*, 1980]. Autori su analizu radili uporedno za uzorke koji su uzeti direktno sa biljke, prikupljeni ručno i iz košnica. Ispitivanje je pokazalo da su i uzorci koje su prikupile pčele bili poreklom od badema u procentu višem od 98,9%. Analizom devedest i jednog uzorka sa područja države Viktorija u Australiji [Rabie *et al.*, 1987] utvrđeno je da postoji isto toliki broj vrsta polenovih zrna od čega je pet poticalo od biljaka iz familije Eucaliptus, dva od lokalnih biljaka, a čak četrnaest je poticalo od egzotičnih vrsta biljaka među koje autori ubrajaju i šumsko drveće kao i određene vrste livadskog bilja i vrsta koje uzgajaju poljoprivrednici. Uzorci polena sakupljeni na području Egipta [Shawer *et al.*, 1987] pokazali su relativnu malu raznovrsnost u palinološkom pogledu (egipatska detelina (*Trifolium alexandrinum*), bob (*Vicia faba*), divlja slačica (*Brassica kabera*), žuta slatka detelina (*Melilotus siculus*) i kukuruz (*Zea mays*)). U radu Agarwal-a i Nair-a [1989] ispitivan je polen žute akacije (*Acacia auriculaeformis*) koja raste na području Australije, Indonezije i Papue Nove Gvineje. Ova biljka je poznata po tome

što produkuje veliku količinu lakopokretnog polena koji pčele rado sakupljaju jer je bogat hranljivim materijama. Iz istog geografskog regiona (država Otago na Novom Zelandu) nalazimo podatke o palinološkom poreklu devet uzoraka u radu Day-ove i njenih saradnika [Day *et al.*, 1990]. Oni su u ispitivanim uzorcima identifikovali polen bele deteline, vrbe, jastrebovca (*Hieracium pilosella* L.), žutilovke (*Cytisus scoparius*), kupine, bora, čkalja (*Cirsium sp.*), aktinidije (*Actinidia delisiosa*), kao i matagure (*Discaria toumatou*)- endemične biljke sa ovog područja. Kod polena aktinidije utvrdili su i to da od ukupnog broja 60-70% zrna potiče sa muških cvetova, a ostatak sa cvetova koji su imali i tučak.

U radu u kojem naglašavaju važnost boje polenovih zrna a koja je, u značajnoj meri, povezana sa njihovim botaničkim poreklom, Minuataegui i saradnici [Minuataegui *et al.*, 1990] ispitivanjem trideset tri komercijalna uzorka polena pronašli su sledeći palinološki sastav: 49,3% Cistaceae (od toga 39,5% bušin (*Cistus ladaniferus*)), 10,3% iz familije gaveza - Borraginaceae, 9,3% polena je poticalo od biljaka iz familije glavočika (Compositae) i 8,6% od biljaka iz familije bukvi (Fagaceae) - od toga 6,8% od hrasta (*Quercus*).

Saa-Otero sa saradnicima [Saa-Otero *et al.*, 2000] u svom radu detaljno obrazlaže važnost geografskog porekla uzoraka polena za njihov palinološki kao i fizičko-hemijski sastav. Oni su uzorke sakupili na području oblasti Galicije (Španija), a koja se, pak, odlikuje priobalnim pojasom, uz Atlantski okean, i centralnim basenom sa dolinom izrađenom od silikatnih stena. Zbog toga se ova dva područja razlikuju i po tipu biljaka koje u njima rastu. U priobalnom pojasu zastupljene su mediteranske biljke, a u centralnom, uvučenom delu, tipični predstavnici eurosibirske flore. Autori su došli do zaključka da polenova zrna različitih boja (koja su mogli da odvoje) potiču od različitih biljaka. Palinološkom analizom nađena su polenova zrna pitomog kestena (*Castanea sativa*), hrasta lužnjaka (*Quercus robur*), žutilovke, maline (*Rubus idaeus*) i kupine, eukaliptusa, divlje rotkve (*Raphanus raphanistrum*), biljke *Halimium alyssoides*, kao i biljaka iz familije Erica koja broji više od osamsto šezdeset cvetnih vrsta. Serra Bonvehi sa saradnicima [Serra Bonvehi *et al.*, 2001] objavio je rezultate analize jedanaest uzoraka polena iz dve druge španske regije (Extremadura i Salamanca). Na osnovu rezultata njihove melisopalnološke analize svi uzorci su se mogli okarakterisati

kao monofloralni sa predominantnom zastupljenošću polena bušina. Osim polena ove biljke, kao prateći, pronađeni su i poleni sledećih biljnih vrsta ili familija: hrasta, *Echium plantagineum* (biljka iz roda lisičina (*Echium*)) familije glavočika, familije ljutića (Papaveraceae tj. Ranunculaceae), bokvice (*Plantago sp.*) i španskog (portugalskog) vresa (*Erica lusitanica*). Dobijeni rezultati su bili u skladu sa njegovim ranijim istraživanjem [Serra Bonvehi i Escolá Jordá, 1997]. Gonzáles Paramás [Gonzáles Paramás *et al.*, 2006] u svom radu prikazuje rezultate istraživanja koje je, sa svojim saradnicima sproveda na trideset dva uzorka španskih polena sakupljenih u periodu od 1999. do 2001. Palinološkom analizom utvrđeno je da 72% svih uzoraka polena potiče od biljaka iz familije Cistaceae (od čega je čak 92% polena poticalo od bušina). Po 4% uzoraka je poticalo od biljaka iz familija gaveza, glavočika i bukvi, kao i iz roda graška (*Papilionoideae*), dok je po 1% uzoraka polena poticao od biljaka iz familije ruža (Rosaceae) i vresova (Ericaceae). Sve ostale familije i rodovi biljaka bili su ukupno zastupljeni sa svega 10%.

Campos sa saradnicima, u dva odvojena rada [Campos *et al.*, 1997, 2003] je u ispitivanim uzorcima polena koji su pčele sakupile na različitim lokacijama u Portugalu i na Novom Zelandu utvrdila da, po palinološkom poreklu, uzorci su vodili poreklo od sledećih biljnih vrsta: vrbe (*Salix atrocinera*), ljutića (*Ranunculus sardous*), štipavice (*Ulex europeus*), divlje rotkve (sakupljeni u Portugalu i na Novom Zelandu), tasmanijskog eukaliptusa (*Eucalyptus globulis*), bušina, *Echium plantagineum*, *Erica australis* (sakupljeni u Portugalu), *Metrosideros umbellate*, *Ixerba brexioides*, *Knightia excelsa* (sakupljeni na Novom Zelandu). Na važnost geografskog porekla za palinološki sastav uzoraka polena i propolisa sakupljenih na području Portugala ukazali su i Moreira i njegovi saradnici [Moreira *et al.*, 2008]. Tako je glavni polen (45%) u uzorku iz Bornes propolisa poticao od pitomog kestena, dok ga uopšte nije bilo u uzorku iz Fundao (Fundão) propolisa. U njemu je dominantan bio polen jasike (*Populus tremula*) (oko 50%), dok ga u uzorku iz Bornes-a ima oko 30 %. U uzorku iz Fundaoa pronađen je i polen bora. Još jedan od radova vezanih za ispitivanje polena koji su sakupile medonosne pčele u Portugalu je predstavljen kroz istraživanje Morais i saradnika [Morais *et al.*, 2011]. U uzorcima koje su oni analizirali utvrđeno je da su svi bili polifloralni, što je i bilo za očekivati s obzirom na razlike u boji polenovih zrna, a vodili su poreklo

od sledećih familija i vrsta: ruža (jabuka i višnja), slezova (Cistaceae), gaveza, glavočika (maslačak), bukvi (hrast i kesten), mirti, eukaliptusa i mahunarki, pruča i detelina. Autori su, takođe, utvrdili da u zavisnosti od geografskog porekla (a ispitivali su uzorke iz nekoliko nacionalnih parkova u Portugalu) javlja se dominantna zastupljenost određene vrste i tipa polena. Slično razmatranje i, na neki način, nastavak istraživanja iz prethodnog rada nalazimo i u radu Estevinho-ove sa saradnicima [Estevinho *et al.*, 2012] koja u ispitivanim uzorcima, iz nekoliko različitih portugalskih regiona, pronalazi polenova zrna iz deset različitih biljnih familija. Najzastupljenije su bile biljke iz familija gaveza i bukvi. Polen biljaka iz familije vresova utvrđen je kao dominantan (više od 45%) ili kao veoma zastupljen (15 – 45%) u polenima iz Braganse (Bragança) i Lejrije (Leiria). U polenu iz Lejrije najzastupljeniji je bio polen biljke gavez koji je bio veoma zastupljen i u uzorcima sakupljenim u Vizeu (Viseu), Bragansi i Vijani du Kaštelo (Viana do Castelo), što je u skladu sa činjenicom da je ova biljka veoma invazivnog karaktera, da se lako rasejava i širi pa je zbog toga jedna od najvažnijih medonosnih biljaka. Polen sleza pronađen je kao dominantan u uzorcima iz Vizea i Kovilja. U uzorcima iz Vijane du Kaštelo najzastupljeniji je bio polen biljaka iz familije mirti. Osim ovih u svim uzorcima pronađeni su i poleni biljaka iz familija ruža, mahunarki, bukava, maslačaka, mimoza i usnatica (Lamiaceae). Polen nijedne od familija nije pronađen u svim uzorcima što je i bilo za očekivati s obzirom na njihovo različito geografsko poreklo. Još jedno u nizu ispitivanja polena sa područja Španije i Portugala nalazimo u radu Nogueira-ove sa saradnicima [Nogueira *et al.*, 2012]. U osam komercijalnih uzoraka polena oni su utvrdili prisustvo jedanaest familija biljaka. U svim uzorcima je pronađen polen plave trave (*Echium vulgare*) što je bilo i za očekivati s obzirom na njenu rasprostranjenost u ove dve zemlje. U tri uzorka dominantan je bio polen biljaka iz familije Cistaceae gde za dva uzorka, koja su sadržavala više od 80% ovog polena (tačnije 83,6 i 90,6%), možemo reći da su monofloralni. U preostalim uzorcima u tri su pronađena kao najzastupljenija, ali ne dominantno, polenova zrna biljaka iz familija vresova, bukve i gaveza. Osim ovih u po jednom od uzoraka su, u manjem procentu, pronađeni poleni četiri biljke – bora (jedan uzorak), eukaliptusa (jedan uzorak), mimoze i hrasta. Autori zaključuju da nijedna od familija nije bila zastupljena u svim uzorcima što je i očekivano s

obzirom na različito geografsko poreklo uzoraka, a u različitim regionima zastupljene su različite biljke za ispašu pčela kao i različiti klimatski uslovi za rast i cvetanje određenih biljnih vrsta.

U uzorcima sa područja dve brazilske savezne države Minaš Geraiš i Sao Paolo (Minas Gerais i São Paulo) velika grupa istraživača [Markowicz Bastos *et al.*, 2004] pronašla je dvadeset osam vrsta polena. Od toga tri uzorka mogu se smatrati monofloralnim – jedan je sadržavao polen biljke *Eucalyptus* (familija Myrtaceae), drugi polen biljaka iz familije Arecaceae, a treći je sadržavao polen biljke *Eupatorium* (familija glavočika). Šest uzoraka se može okarakterisati kao bifloralni – prvi je sadržavao polen biljke *Antigonon leptopus* (familija Polygonaceae) i polen biljaka iz familije kupusa tj. krstašica (Brassicaceae), drugi polen biljke *Myrcia* (familija Myrtaceae) i biljke *Ilex* (familija Aquifoliaceae). Treći je sadržavao polen biljke *Myrcia* i familije palmi (Arecaceae), četvrti polen biljke *Antigon Leptopus* i familije biljaka kupusa, peti polen biljaka *Eucaliptus* i *Eupatorium*, a poslednji, šesti bifloralni uzorak je sadržavao polen biljaka *Antigon leptopus* i *Eupatorium*. Preostali uzorci su bili multifloralnog tipa i sadržavali su polen biljaka iz više od dve familije. Među njima najzastupljeniji je bio polen biljaka *Eupatorium*, *Mimosa verrucosa* tj. familija mimoza (Mimosaceae), kao i biljke iz familija palmi i trava (Poaceae). Almeida-Muradian sa saradnicima [Almeida-Muradian *et al.*, 2005] je utvrdila da na području Južnog Brazila najveći deo polenovih zrna, u deset uzoraka različite boje koje su ispitali, dominantno je poticao od familija palmi, krestovnika i roda vernonije (*Vernonia*). Modro-va i njene kolege u svoja dva rada daju palinološki i hemijski sastav po osam uzoraka sa dva pčelinjaka sa područja brazilske države Minaš Geraiš [Modro *et al.*, 2007], odnosno devet uzoraka polena iz brazilske oblasti Mata Atlantika (Mata Atlântica) [Modro *et al.*, 2009]. Kada su bili u pitanju uzorci sa pčelinjaka u državi Minaš Geraiš, autori su našli da na osnovu botaničkog porekla u svim uzorcima je pronađen veći broj vrsta polenovih zrna pa su se uzorci mogu okarakterisati kao polifloralni. Ukupno je identifikovano petnaest glavnih rodova ili familija biljaka [*Anadenanthera*, Anacardiaceae, palmino drveće, *Baccharis*, *Cecropia*, kafa (*Coffea*), *Elephantopus* (familija glavočika), eukaliptusi, mlečika, *Gochnatia* (familija glavočika), mirti, ricinusa (*Ricinus*), krestovnika, *Trema* (familija konoplji (Cannabaceae)) i vernonije]. Kada

su bili u pitanju uzorci sa područja Mata Atlantika (ukupno ih je bilo devet) sedam se moglo okarakterisati kao pretežno monofloralni (jedan uzorak je sadržavao 81,3% polena tropskih biljaka iz roda *Alchornea* a koje pripadaju porodici mlecika dok su dva uzoraka sadržavala po 87,6% tj 88,2% polena biljaka iz roda *Vernonia*) odnosno potpuno monofloralni (jedan uzorak je sadržavao 98,3% polena biljaka iz roda *Baccharis*, jedan 94% polena biljaka iz roda palamida (*Cirsium*), i po jedan sa 96,6% polena biljaka iz roda kafa odnosno *Myrcia* (97,7%). Jedan uzorak je bio polifloralni sa sadržajem polenovih zrna biljaka iz roda *Anadenanthera* od 49,3%, biljaka iz roda eukaliptusa od 29,7% i biljaka iz porodice palminog drveća od 10%. Poslednji uzorak se po boji značajno razlikovao od ostalih i nakon analize utvrđeno je da njegova boja u stvari ne potiče od polenovih zrna jer su ona bila potpuno kontaminirana saprofitnim gljivicama iz roda *Cladosporium sp.* Rezultati su, takođe, pokazali da jednobojnost određenog uzorka ne mora biti pouzdan indikator njegovog monofloralnog porekla i da je uvek neophodno uraditi dalju fizičko-hemijsku analizu uzorka.

Ferreres sa saradnicima [Ferreres *et al.*, 2010] je ispitivao polen jednogodišnje biljke *Echium plantagineum* koja je tipična za područje Mediterana i Australije tj. za toplija područja. Somerville i Nicol [2002] su, za potrebe svog istraživanja u toku sedam godina sakupljali uzorke polena iz košnica u dvema australijskim saveznom državama. Prikupili su pedeset uzoraka i u okviru njih identifikovali prisustvo polenovih zrna sledećih biljnih vrsta: *Echium plantagineum*, uljana repica (*Brassica napus*), lažni maslačak (*Hypochoeris radicata*), *Eucalyptus bridgesiana* i *Corymbia maculata*. Polenova zrna nekih biljaka, u zavisnosti od obojenih supstanci prisutnih u "pollen kitt" zoni mogu se međusobno razlikovati već i po boji. Tako je polen biljke *Echium plantagineum* tamno plave boje što ukazuje na bogatstvo antocijanina [Di Paola Naranjo *et al.*, 2004]. Na sličan način tj. na osnovu boja zrna polena mikroskopskom analizom grupa autora iz Rumunije [Mărgitas *et al.*, 2009] pronašla je da u njihovim uzorcima su bili prisutni poleni sledećih biljaka: hoću-neću (*Capsella bursa pastoris* L.) (sivo žuti polen), suncokreta (*Helianthus annuus* L.), kamilice (*Matricaria chamomilla* L.), maslačka (narandžasto crveni polen), belog gloga (*Crataegus monogyna* J.) (svetlozeleni polen), bora, šaša (*Carex sp.*) (svetložuti polen), *Carduus*

sp. (ljubičasti polen), *Onobrychis viciifolia scop.* (smeđi polen), plavog suncokreta (*Centaurea cyanus* L.) (sivi polen), *Knautia arvensis* L. (ljubičasti polen) i vrbe (kestenjasti polen). Još jedno ispitivanje određenih uzoraka polena sa područja Rumunije nalazimo i u radu dela grupe istih autora [Stanciu *et al.*, 2011] koji su, u svojim uzorcima, identifikovali polen suncokreta i šumske vrbe.

Human i Nicolson [2006] su prikazali ispitivanje polena „pegave“ aloje (*Aloe greatheadii* var. *davyana*) iz familije Asphodelaceae. Ona spada među rasprostranjenije biljke u Južnoj Africi, a cveta zimi. Zbog toga je omiljena među pčelarima u tim predelima. Primećeno je da su pčele posebno agresivne i nesklone saradnji što se može dovesti u vezu ili sa samim polenom ili, što je verovatnije, sa time da su pčele nervozne zbog oduzimanja dela hrane i legala u ovom kritičnom periodu. Količina i kvalitet sakupljenog polena direktno utiču na brojnost kolonije, na reproduktivnost, razvoj legla i dužinu opstanka istog. U toku sakupljanja i skladištenja u košnici on će pretrpeti značajne hemijske promene dodatkom nektara (koji pčele ne konzumiraju svež) i pod dejstvom enzima iz pčelinjih pljuvačnih žlezda. Zajedno sa specifičnom bakterijskom florom koja se razvija pri čuvanju polena, sadržaj hranljivih materija u njemu će biti značajno povećan. Ove razlike se lako mogu utvrditi hemijskom analizom biljnog polena i polena koji su pčele sakupile. U tom cilju, a pošto u literaturi nije bilo dostupno previše podataka o tome, u ovom radu je urađeno poređenje karakteristika polena biljke *Aloe greatheadii* var. *davyana* direktno sakupljenog sa biljke, sakupljenog sa pčela radilica i istog tog polena uzetog iz košnica nakon što su ga pčele uskladištile. Takođe, kao komparacioni primer korišćen je polen biljke *Eucaliptus*, jer preko 50% ukupnog polena i meda u Južnoj Africi potiče od nje.

Wróblewska sa saradnicima, u svom radu [Wróblewska *et al.*, 2006] veoma detaljno je objasnila vezu između palinološkog porekla polena sa glavnim proizvodom pčela - medom. Ispitivani su uzorci sa područja severoistočne Poljske. Analizom je utvrđeno da su glavne medonosne biljke bile iz familije kupusa ili krstašica i to najviše divlji kupus (*Brassica*) a osim njih u svim uzorcima utvrđeno je i prisustvo polena rotkvi (*Raphanus*) i slačice tj. poljske gorušice (*Sinapis*). Osim biljaka iz ove familje utvrđeno je i prisustvo polena detelina iz familje mahunarki (Fabaceae) od kojih su najviše pronađene bela detelina i crvena detelina

(*Trifolium pratense*). Od specifičnih medova, na osnovu analize polena, utvrđeno je da u njima više od 45% polena vodi poreklo od uljane repice, heljde (*Fagopyrum esculentum*) i vresa (*Calluna vulgaris*), 30% vodi poreklo od akacija, a 20% od lipe (*Tilia*). U uzorcima polena koji je uzet od pčelara iz određenih oblasti u Poljskoj, Kini i Južnoj Koreji, Szczęśna [2007] je utvrdila prisustvo polena sledećih biljaka i familija: maline, gloga (*Craetegus laevigata*), oskoruše (*Sorbus aucuparia*), pasjakovine (*Rhamnus frangula*), lipe, heljde, crvene deteline, bele deteline, bagrema (*Robinia pseudoaccacia*) i poleni livadskog cveća. Za uzorke iz Poljske ona je uradila i precizniju melisopalinološku analizu kojom je utvrdila da se uzorci mogu podeliti u tri grupe: I grupu su činili uzorci u kojima je predominantno bio zastupljen polen biljaka iz familije kupusnjača (> 65%), II grupu gde je dominantan (> 64%) bio polen biljke pelin (*Artemisia absinthium*) i III grupa uzoraka u kojima nije bilo neke dominantne biljne vrste. Među medonosnim biljem u oblasti Krakova u Poljskoj, za pčele se, kao najvažnijim pokazalo sledećih 12 vrsta [Leja *et al.*, 2007]: divlji kesten (*Aesculus hippocastanum*), vrbica (*Chamerion angustifolium*), purpurni arhandel (*Lamium purpureum*), velikousni lupin (*Lupinus polyphyllus*), jabuka (*Malus domestica*), facelija (*Phacelia tanacetifolia*), divlja kruška (*Pyrus communis*), bagrem, bela slačica (*Sinapis alba*), maslačak, deteline (*Trifolium sp.*) i kukuruz.

Polen meskito drveta (*Prosopis juliflora*) je jedan od retkih izvora nektara za pčele i insekte u pustinjskim oblastima Meksika i SAD-a [Almaraz-Abarca *et al.*, 2007; Le Blanc *et al.*, 2009] u toku aprila i maja, a osim toga, ovo drvo ima jestivo lišće i plodove tako da ga, kao hranu, koriste i druge životinje. Takođe, dobar je azotofiksator zahvaljujući čemu obnavlja zemljište na kojima ovo drvo raste i njegovu plodnost. Osim polena meskito drveta, Le Blanc sa saradnicima [Le Blanc *et al.*, 2009] u uzorcima polena iz Sonart pustinje pronašao je i polene palmi, mimoza, juko drveta života (*Yucca*), terpeninskog žbunja, kao i polen biljke *Chenopod*. Sa druge strane, Almaraz-Abarca sa saradnicima u svom drugom, ranijem, radu [Almaraz-Abarca *et al.*, 2004] na osnovu uzoraka sakupljenih, takođe na području Durango pustinje u Meksiku, iznosi tvrdnju da, iako u svakom uzorku je bio dominantno zastupljen jedan tip polenovih zrna, u svakom uzorku postoji više vrsta polena (ukupno su ih identifikovali šest) što ukazuje da je sam polen koji

su sakupile medonosne pčele složenog sastava. Po njihovom mišljenju ovo nije u saglasnosti sa ranije iznetim mišljenjem Serra-Bonvehi-ja i njegovih saradnika [Serra Bonvehi *et al.*, 2001] da su poleni koji sakupljaju medonosne pčele monofloralni, jer pčele posećuju samo jednu vrstu cvetova. Takođe, ono što u ovom radu ističu jeste da je najzastupljeniji polen u njihovim uzorcima bio polen kukuruza (24%), a taj rezultat nije u saglasnosti sa zaključkom Campos-ove sa saradnicima [Campos *et al.*, 1997] da pčele više oprašuju polen divljih biljaka i onaj manjih dimenzija. Po mišljenju ovih autora način i razlozi zbog kojih pčele biraju određenu vrstu i tip polena je složeniji i zavisi od više faktora nego što se mislilo. Yinmao sa saradnicima u dva odvojena rada [Yinmao *et al.*, 2007a,b] vrši ispitivanje polena sakupljenog sa uljane repice.

Pregled palinološkog porekla uzoraka polena pčela u Turskoj prezentovan je u radu Bilisik-a sa saradnicima [Bilisik *et al.*, 2008]. Oni su pratili polen koji su sakupljale pčele u toku čitave jedne sezone da bi utvrdili postoje li razlike u poreklu tog polena. Bilo je za očekivati da će razlike postojati u skladu sa periodima cvetanja odgovarajućih medonosnih biljaka koje rastu u Turskoj. Na ovaj način su utvrdili da su pčele sakupljale polen sa četrdeset jedne biljke od kojih je za četrnaest udeo bio veći od 1% u uzorcima. Svega oko 2% uzoraka nije bilo moguće razvrstati botanički. U svim uzorcima polenova zrna su, pre same palinološke analize, razdvajana po boji. Među familijama i vrstama biljaka najzastupljenije su bile sledeće: kupusnjače i suncokret (oko 11%), vodopije (*Cichorioideae*, oko 9%), vrbe (oko 8%), ruže (oko 7,5%), različiti (*Centaurea sp.*, oko 7,5%) makovi (*Papaveraceae*, oko 7,5%), kozokrvnica (*Caprifoliaceae* tj. *Knautia*, oko 7%), mahunarke i glavočike (oko 6%), dikice (*Xanthium*, oko 3%), mlečika (*Chrozophora* tj. *Euphorbiaceae*, oko 2,5%), bokvica (*Plantago sp.*, oko 1,5%) i javori (*Acer sp.*, oko 1,5%). Autori su, takođe, utvrdili da postoji pravilna smena u periodima unosa određenih vrsta polena. Na početku sezone pčele su pre svega posećivale i sakupljale polen na vrbama, ružama i delom na kupusnjačama. Sa prestankom cvetanja ovih vrsta pčele su se selile na suncokret, različite i ostale glavočike, dok su u jesen dominantno posećivale razne vrste mahunarki. Glavni period, u kojem je sakupljen najveći deo polena, bio je period od juna do avgusta.

Bogdanov u svom revijalnom radu [Bogdanov, 2012] donosi vrlo detaljan pregled botaničkog porekla polena sakupljenog na području Švajcarske. Tokom 80-ih godina Wille i saradnici sprovedi su široko istraživanje polena koji su sakupljale pčele na području Švajcarske, a rezultate su objavili Keller i saradnici [Keller *et al.*, 2005a, b]. Rezultati su pokazali da najveći deo polena potiče od nekoliko biljnih kultura i to, pre svega, onih koje su bile veoma rasprostranjene, bilo zbog toga što su sađene bilo zbog toga što su prirodno veoma zastupljene. Više od 60% ukupnog polena poticalo je od pet sledećih biljaka: bela i crvena detelina, kukuruz, suncokret i repica. Ostale najzastupljenije biljne vrste - bokvica, maslačak i slačica prirodno stanište imaju u livadama i pašnjacima. Među ostale važne biljke kao izvor polena spadale su vrba, javor, trnjina (*Prunus sp.*) i kruška trnovača (*Pyrus sp.*). U određenim regionima Švajcarske utvrđeno je značajno prisustvo nekih drugih vrsta polena, ali njihovo nalaženje u ostalim regionima Švajcarske nije zabeleženo. Tako je npr. u području severne Švajcarske (oblast Intragna) utvrđeno značajno prisustvo polena vreska (*Calluna vulgaris*) i kestena. U subalpskom regionu (1250 – 1560 m nadmorske visine) najzastupljenije je bio polen šafrana (*Crocus sp.*) i šaša, dok je na samo jednoj lokaciji dominantno nađen polen šušlavca (*Rhinanthus sp.*) i vidca (*Euphrasia sp.*). Ono što je izvesno iz rezultata studije jeste da sadržaj i sastav polena ne preslikava direktno zastupljenost određene biljne vrste na nekom području, ali sa sigurnošću se može reći da je determinisan sklonošću pčela ka određenoj biljnoj vrsti. Na početku vegetacionog i cvetnog perioda, u rano proleće, utvrđen je jedinstven šablon javljanja određenih vrsta polena od nekoliko biljaka: javora, jasena (*Fraxinus sp.*), topole (*Populus sp.*), hrasta, vrbe i bresta (*Ulmus sp.*). Na određenim lokacijama osim ovih vrsta utvrđeno je značajno prisustvo polena maslačka. Tokom maja i juna spektar tipova polena se značajno proširuje pa je neko uopštavanje i generalizacija gotovo nemoguća.

Među novija ispitivanja uzoraka polena koji su sakupile pčele spada i istraživanje uzoraka sa područja centralne Slovačke [Kacániová *et al.*, 2012], a rezultati palinološke analize su dodatno zanimljivi jer je utvrđeno da je većina uzoraka polena bila monofloralna i da su vodili poreklo od suncokreta, od repice ili od maka (*Papaver somniferum*). Činjenica da su uzorci monofloralnog tipa može im

samo povećati ekonomsku vrednost što tvrdi Feás sa saradnicima [Feás *et al.*, 2012] koji u svom istraživanju na dvadeset tri uzorka „organskog pčelinjeg polena“ iz Portugala nalaze da se dva ispitivana uzorka mogu smatrati monofloralnim, jer sadrže preko 80% polena jedne biljke (bušin) dok su ostali bili polifloralni sa jedanaest vrsta polena od devet biljnih familija: Cistaceae, gaveza, ruža, bukvi, glavočika, leptirnjača, crnjuša tj vresova (Ericaceae), mimoza i mirti. Razlike je bilo lako uočiti već i vizuelno jer su uzorci sadržavali zrnca različitih boja. Međutim, u većini uzoraka najviše je bio zastupljen polen biljke bušin dok nijedan od polena nije bio prisutan u svim uzorcima, što je bilo i očekivano, s obzirom na njihovo različito geografsko poreklo.

U današnje vreme primetno je znatno smanjenje populacije pčela širom sveta [Kievits, 2007; Oldroyd, 2007; Osborne, 2007] što indirektno utiče na razvoj mnogih biljnih vrsta imajući u vidu značajnu ulogu pčela u procesu oprašivanja. S obzirom na važnost polena kao hrane za pčele, Odoux sa saradnicima [Odoux *et al.*, 2012] je u svom istraživanju nastojao da istovremeno objasni kako pčele oprašuju biljke na različitim područjima zapadne Francuske i kako sastav flore na određenom području utiče na kvalitet polena i da li obezbeđuje dovoljno kvalitetnu hranu za lokalnu pčelinju zajednicu. U tom smislu celokupna godina je podeljena na pet klastera : klaster I (1 – 15 nedelja), klaster II (16 – 21 i 24 – 27 nedelja), klaster III (22, 23 i 30 nedelja) i klaster IV (28, 29, 31 i 32 nedelja) i klaster V (33 – 52 nedelja). Utvrđeno je da glavni deo polena (92%) potiče od biljaka letine (61,25%) i od drveća (31,36%) tokom čitave godine. Ostatak polena potiče od trava (4,5%) i baštenskog bilja (1%). Glavne vrste od biljaka letine su bili kukuruz, makovi, gorčica (*Menyanthes trifoliata*) i sirak (*Sorghum bicolor*). Od drvenastih vrsta najzastupljeniji su bili poleni ruža, bršljana (*Hedera*), drenea (*Cornus*) i javora. Ukupna prosečna količina polena sakupljena po košnici bila je 4817 g. Uzimajući u obzir četiri potencijalna izvora polena udeo pojedinih tipova polena je sledeći: 62% od letine, 32,2% od drvenastih biljaka, 4,5% od trava a 1,3% od baštenskog bilja. Gledajući samo polen koji potiče sa oranica tj. od letine, 27,2% polena potiče od samih žitarica i usevnih biljaka dok od korovskih vrsta potiče 34,8%. Gledano po klasterima, polen koji potiče sa područja prikupljanja letine činio je 3003 g (60% ukupnog polena u klasterima III i IV), na polen drveća otpadalo je 1537 g

(75% u klasterima II i III), 221 g je činio polen trava (65% u klasterima II i III), a na polen baštenskog bilja otpadalo je 55 g (57% unutar klastera II). Polen prikupljen u toku proleća pretežno je poticao od nekoliko vrsta: divlje višnje (*Prunus avium*) od koje je poticalo do 79% ukupnog polena tj u proseku 22 g polena dnevno; dreva na koji je otpadalo do 46% ukupnog polena tj. 21 g/danu; javora (do 50% tj. 11 g/dan); zove (*Sambucus*) čiji polen u dnevnom unosu je činio do 7% (3 g dnevno); hrasta sa do 15% od dnevnog unosa (3 g) i jasena (*Fraxinus*) sa dnevnim unosom od 2 g (31%). U jesenjem periodu najveću zastupljenost polena imao je bršljan (do 77% odnosno 13 g/dan). U zimskom razdoblju od žitarica i kultivisanih kultura, uopšte, najveći deo polena za prehranu pčela je poticao od kukuruza (do 77% tj 36 g/dan), sirka (do 37% odnosno 18 g/dan) i suncokreta (do 70% tj 9 g/dan). Polen uljane repice bio je zastupljen do 29%. Kada su u pitanju bile korovske biljke, najviše je pronađeno polena sledećih biljaka: maka (do 66% tj 36 g/dan), slačice (do 98% tj 17 g/dan), cikoriije (*Cichorium*) (do 48% tj 5 g/dan), bogorodičine trave (*Hypericum*) (do 15% tj 2 g/dan). Ove vrste su dominantno činile polen koji pčele koriste u letnjem periodu, dok je u zimskom periodu glavni izvor polena bila biljka Veronika (do 89% tj 2 g/dan). Kada su trave bile u pitanju najveći deo polena od njih javio se u prolećnom periodu, gde su preovladavale biljke slatka detelina (*Onobrychis*) sa unosom od 4 g/dan, divlji grašak (*Vicia*) sa, takođe, 4 g dnevnog unosa. Tu su još i maslačak i lucerka (*Medicago*) sa po 3 g dnevnog unosa. Kada je u pitanju bilo baštensko bilje, unos polena ovih biljaka je bio ujednačen tokom cele godine ali sa malim udelom u ukupnoj količini polena i to maksimalno do 1 g dnevno. Među ovim biljkama izdvojile su se bekovina (*Viburnum*), platani (*Platanus*), barbaris (*Berberis*) i divlji kesten (*Aesculus*).

U određenim državama, osim medonosne pčele važan polinator su i solitarne pčele (*Melipona subnitida*). Polen koji su one sakupile na području brazilske države Paraíba analizirali su Sarmento Silva i saradnici [Sarmento Silva *et al.*, 2007]. Uočeno je da se, generalno, uzorci na osnovu boje polenovih zrna mogu podeliti u dve velike grupe i to braon i žute polene. Žuti poleni su se prevashodno sastojali od polenovih zrna tri biljne vrste od kojih je dominantan bio polen biljke iz familije mimoza (*Mimosa gemmulata*) koji je činio 98,95%. U braon uzorcima polena pronađena su zrna pet biljnih vrsta pri čemu je dominantan bio polen biljaka iz familije leptirnjača sa 89,84%.

Iako postoje naznake u literaturi da pčele kada sakupljaju polen uglavnom to čine sa jedne biljke [Almeida-Muradian *et al.*, 2005], s obzirom na činjenicu da se polen u košnicama sakuplja tokom većeg broja meseci u toku kojih se smenjuju paše na kojima pčelari borave, retko koji uzorak polena koji su sakupile medonosne pčele će biti potpuno, botanički, homogen tj monofloralan. Iz tog razloga Campos-eva sa saradnicima [Campos *et al.*, 2008] je predložila da se kao **monofloralan** smatra svaki uzorak u kojem je identifikovano više od 80% jedne vrste polenovih zrna. Osim toga, oni su predložili da se ostali tipovi polena klasifikuju na sledeći način:

- ✓ **polen sa predominantnim tipom polenovih zrna** – ako sadrži više od 45% jedne vrste polena
- ✓ **prateći tipovi polena** – ako sadrže od 15 do 45% određenih vrsta polenovih zrna
- ✓ **važni izolovani tipovi polena** – ako su zastupljeni od 3 do 15% u uzorku polena.

II-7 Hemijski sastav i nutritivne karakteristike polena

Kao što je već naglašeno, dva glavna izvora hrane i energije za pčele su polen i med [Stanimirović *et al.*, 2000]. Dok je med više energetska rezerva, zbog visokog sadržaja šećera, dotle je polen glavna hrana u pčelinjem društvu. Razlog tome je obilje različitih tipova jedinjenja koja ulaze u sastav polena. Kako je većina tih komponenti potencijalno korisna i za čoveka, sve je više izražen trend primene polena kao dodatka ishrani čoveka. Hemijski sastav polena značajno varira i zavisi od više faktora. Između ostalih, najveći uticaj na sadržaj određenih supstanci u polenu ima njegovo botaničko i geografsko poreklo. U zavisnosti od koje biljke potiče i na kom prostoru je sakupljen, razlike u sastavu polena mogu biti veoma izražene [Campos, 1997]. Osim toga, na hemijski sastav polena mogu da utiču metoda, način sakupljanja uzoraka, njihovo čuvanje i skladištenje [Campos *et al.*, 2010]. Jedino kod monofloralnih uzoraka polena možemo očekivati stalnost u hemijskom sastavu. Za sve ostale može se govoriti samo o prosečnom sadržaju

komponenti [Bogdanov, 2012]. Prosečan sastav glavnih komponenti uzorka polena je prikazan u **Tabeli 1**.

Tabela 1. - Prosečan sadržaj glavnih komponenti u uzorku polena [Campos et al., 1997]

| Komponenta | sadržaj [%] |
|-------------------|--------------------|
| Polisaharidi | Oko 50% |
| Prosti šećeri | 4-10% |
| Lipidi | 1-20% |
| Proteini | 6-28% |
| Aminokiseline | Oko 6% |

Osim ovih jedinjenja u polenu se mogu javiti različita fenolna i polifenolna jedinjenja (a pre svega različiti flavonoidi u formi glikozida), vitamini, karoteni, makro- i mikroelementi i voda. Onaj deo hemijskih komponenti polena koji ima hranljiva (nutritivna) svojstva predstavlja glavni deo u ispitivanjima njegovog sastava. Kada su u pitanju hranljive komponente u polenu, Campos-eva sa saradnicima [Campos *et al.*, 2010] naglašava da najveći deo njih potiče od cvetnog polena, dok je udeo pčelinjih proizvoda mali i odnosi se pre svega na glukozu i fruktozu. Sadržaj nutritivnih komponenti u polenu kao i deo od preporučenog dnevnog unosa (PDU), ako bi se polen koristio u ishrani, prikazani su u **Tabeli 2**.

Prema prikazanim rezultatima u zavisnosti od sastava polena, značajan deo dnevnih potreba za određenim komponentama u ljudskoj ishrani bi mogao biti podmiren ako bi se polen koristio kao dodatak (suplement) u hrani. Nagai sa saradnicima [Nagai *et al.*, 2007] je pokazao da enzimskom hidrolizom uzoraka španskih polena (koji su vodili poreklo od biljke bušina) pomoću šest proteaza mogu se dobiti hidrolizati koji su izuzetno bogati proteinima. Pri tome, njihova apsorpcija u organizmu je bila visoka. Na osnovu dobijenih rezultata oni su izračunali da bi 15 g ovog polena dnevno moglo, u potpunosti, da podmiri potrebe odraslog čoveka za aminokiselinama.

Ne postoji saglasnost o tome da li, i u kojoj meri, čovek može da vari polen pre svega zbog čvrste opne, egzine, koja se nalazi na površini polenovog zrna [Campos *et al.*, 2010]. Istraživanja su pokazala da životinje pri oprašivanju biljaka najčešće uzimaju nektar, jer lako mogu da ga svare, ali mogu da vare polen i njegova zrna [van Tets i Whelan, 1997] pri čemu se nutritivno značajne komponente iz polena oslobađaju dejstvom digestivnih enzima u sistemu za varenje [Roulston i Cane, 2000].

Tabela 2. - Prosečan sadržaj nutritivnih komponenti u uzorku polena i preporučeni dnevni unos (PDU) u ljudskoj ishrani.

| Komponenta | g/100g | % od PDU sadržan u 15 g polena | PDU (g/dan) |
|-----------------------|-----------|--------------------------------|----------------------------|
| Ugljeni hidrati | 13-55 | 1-4,6 | 320 |
| Sirova vlakna | 0,3-20 | 0,3-18 | 30 |
| Proteini | 10-40 | 5,4-22 | 50 |
| Masti | 1-13 | 0,1-4 | 80 |
| Vitamini | mg/100g | % od PDU sadržan u 15g polena | PDU (g dan ⁻¹) |
| C | 7-56 | 2-15 | 100 |
| Provitamin A | 1-20 | 30-600 | 0,9 |
| E | 4-32 | 8-66 | 13 |
| B3 | 4-11 | 7-20 | 15 |
| B6 | 0,2-0,7 | 4-13 | 1,4 |
| B1 | 0,6-1,3 | 15-32 | 1,1 |
| B2 | 0,6-2 | 12-42 | 1,3 |
| Pantotenska kiselina | 0,5-2 | 2-9 | 6 |
| Folna kiselina | 0,3-1 | 20-67 | 0,4 |
| H | 0,05-0,07 | 30-42 | 0,045 |
| Makro i mikroelementi | mg/100g | % od PDU sadržan u 15 g polena | PDU (g/dan) |
| K | 400-2000 | 5-27 | 2000 |
| P | 80-600 | 2-16 | 1000 |
| Ca | 20-300 | 0,5-7 | 1100 |
| Mg | 20-300 | 2-23 | 350 |
| Zn | 3-25 | 10-79 | 8,5 |
| Mn | 2-11 | 15-85 | 3,5 |
| Fe | 1,1-17 | 2-37 | 12,5 |
| Cu | 0,2-1,6 | 4-36 | 1,2 |

Slična istraživanja su pokazala da je proces digestije polena prisutan i u digestivnom traktu ljudi [Franchi *et al.*, 1997]. Prosečna svarljivost ugljenih hidrata iz polena je bila 15%, a proteina oko 53%. Neki smatraju da svarljivost polena u ljudskom digestivnom traktu nije dovoljna i da se može poboljšati ako se polenovo zrno razbije i smrvi. Zbog toga postoje kompanije koje prodaju polen u ovoj formi. U svakom slučaju maceracija polena u vodi, ili nekom drugom rastvaraču, nekoliko sati pre njegove upotrebe se preporučuje i može samo poboljšati njegovu primenu kao suplementa u ishrani [Campos *et al.*, 2010]. Iako neke zemlje imaju zakonski regulisane standarde kvaliteta polena (Brazil, Švajcarska, Kina, Poljska, Bugarska) ne postoji jedinstveni predlog za prosečan sadržaj osnovnih hranljivih komponenti u polenu. Iz tog razloga Campos-ova sa saradnicima [Campos *et al.*, 2008] predlaže da to budu sledeći parametri:

- ✓ vlaga manje od 8 g/100g uzorka
- ✓ pepeo manje od 6 g/100g uzorka
- ✓ ukupni proteini (Nx6,25) više od 15 g/100g uzorka
- ✓ ukupni šećeri više od 40 g/100g uzorka
- ✓ masti više od 1,5 g/100g uzorka.

II-7a Sadržaj vode (vlage) u polenu, aktivnosti vode (a_w) i pH- vrednosti

Sadržaj vlage u polenu se kreće od 20 do 30% [Bogdanov, 2012; Campos *et al.*, 2010]. Ovako visok sadržaj vlage (preko 10%) čini polen podložnim fermentaciji zbog čega se polen, nakon sakupljanja, mora po sadržaju vlage svesti u okvire koji su, u nekim zemljama, zakonski regulisani. Tako je npr. sadržaj vlage u polenu koji je dozvoljen u Brazilu 4% [Brasil, Ministério da Saúde, 2001], u Srbiji [Službeni list, SCG, 2003], Argentini [Krell, 1996], Švajcarskoj i Urugvaju [Campos *et al.*, 2008] 8%, a u Kini [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, 2003] i Bugarskoj [Campos *et al.*, 2008] 10%. Količina vode prisutna u polenu određuje i njegovu drugu važnu osobinu, a to je aktivnost vode, a_w kao i pH- vrednost. Aktivnost vode je jedan od važnih parametara koji utiče na kvalitet i stabilnost prehrambenih proizvoda, a definiše se na sledeći način [Belitz *et al.*, 2009]:

$$a_w = P/P_0 = \text{RRVV}/100$$

gde su P i P_0 naponi pare vlage za ispitivanu namirnicu, odnosno čiste vode na temperaturi T, dok je RRVV ravnotežna relativna vlažnost vazduha na datoj temperaturi. Vrednost aktivnosti vode u uzorku može značajno da utiče na razvoj mikroorganizama kao i na (ne)odigravanje određenih hemijskih ili enzimskih reakcija. Ako je vrednost za a_w u intervalu od 0,6 do 0,9 ovakva hrana se označava kao „umereno vlažna“ i smatra se da je bezbedna za ljudsku ishranu [Belitz *et al.*, 2009]. S obzirom na veliku raznovrsnost mikroorganizama i njihovu manju ili veću osetljivost tj. Otpornost, u našoj zemlji se smatra da je svaka namirnica sa vrednošću za a_w manjom od 0,6 mikrobiološki ispravna jer pri takvim uslovima neće biti moguć razvoj ni bakterija (čiji razvoj započinje pri vrednosti za a_w većoj od 0,75) ni plesni (neke vrste se razvijaju pri $a_w > 0,80$ a vrste iz roda *Aspergillus* već pri $a_w > 0,73$) niti najotpornijih tzv. osmotolerantnih kvasaca (razvijaju se već pri $a_w > 0,60$) [Vereš, 2004]. Sa druge strane, Serra-Bonvehí i Jordá [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] smatraju da su za upotrebu u ljudskoj ishrani bezbedni uzorci u kojima aktivnost vode ne prelazi 0,3.

U literaturi se mogu pronaći različiti podaci o sadržaju vlage, a_w i pH- vrednosti u uzorcima polena. Tako Herbert i Shimanuki u svom radu iz 1978. [Herbert i Shimanuki, 1978] o analizi hemijskog sastava polena iz američke savezne države Merilend (Maryland) upoređuju sadržaj vlage u sveže sakupljenim uzorcima polena pčela i onim koje su one već uskladištile za potrebe ishrane larvi. Na osnovu analize pronašli su da se sadržaj vlage kretao od 21,7% do 27% u sveže sakupljeni uzorcima, odnosno, od 18,8% do 28% u uskladištenim uzorcima što pokazuje da se sadržaj vlage nije pri tome bitnije promenio. Orzáez-Villanueva u radu sa svojim istraživačkim timom [Orzáez-Villanueva *et al.*, 2002] u petnaest uzoraka španskih polena koje su sakupile medonosne pčele je utvrdila da se sadržaj vlage kretao od 4,59 g% do 9,96 g% sa prosečnom vrednošću od $7,14 \pm 1,71$ g%. Nicolson i Human pri ispitivanju uzoraka australijskih polena „pegave“ aloje [Nicolson i Human, 2006] i suncokretovog polena [Nicolson i Human, 2013] nalaze da je sadržaj vlage u uzorcima bio različit u zavisnosti da li su uzorci prikupljeni ručno ili su ih sakupile pčele. Vлага je bila daleko manja u ručno sakupljenim uzorcima (oko 13 g/100g uzorka polena „pegave“ aloje tj. 7 - 8 g/100g uzorka suncokretovog polena) od onih koji su uzeti iz košnica (19 - 21 g/100g uzorka „pegave“ aloje odnosno 16 - 20 g/100g uzorka suncokretovog polena). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima sa sličnog geografskog područja koje su, za ručno sakupljene uzorke polena aktinidije na Novom Zelandu, dobili Clark i Lintas [Clark i Lintas, 1992] u kojima se vlaga u uzorcima sa muških cvetova kretala do 11% dok je kod polena sakupljenog sa cvetova koji su imali i tučak bila niža, oko 4%. Tri prethodna istraživanja su u potpunoj saglasnosti sa rezultatima Day-eva sa saradnicima [Day *et al.*, 1990]. U rezultatima svog rada o nutritivnim karakteristikama uzoraka pčelinjeg polena sa Novog Zelanda ona navodi da se sadržaj vlage u uzorcima kretao od 16,8%, koliko je nađeno u uzorku biljke mataguri, do 25,9%, koliki je bio stepen vlage u polenu vrbe.

Serra-Bonvehí [Serra-Bonvehí *et al.*, 2001; Serra-Bonvehí i Jordá, 1997], u dva odvojena istraživanja uzoraka španskih polena, ističe da su sadržaj vlage (4,68 - 5,87 g/100g uzorka) i aktivnost vode (ispod 0,3) bili na odgovarajućem nivou koji garantuje bezbedno čuvanje i skladištenje uzoraka. Pozivajući se na predlog Serra-Bonvehí-ja i Jordá-e [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] Domínguez-Valhondo-ova sa kolegama [Domínguez-Valhondo *et al.*, 2011] je odredila sadržaj većeg broja

fizičko-hemijskih parametara, uključujući i vlagu i a_w -vrednost u pet uzoraka polena iz severnog dela španske provincije Ekstramadura (Extremadura) pri čemu naglašavaju važnost načina sušenja uzoraka. Naime, deo uzoraka je osušen liofilizacijom odmah nakon prikupljanja, a deo je sušen na klasičan način tj uz zagrevanje do konstantne mase. Rezultati su jasno pokazali da su liofilizovani uzorci imali daleko bolje karakterisitike jer su i po sadržaju vlage (2,95 - 5,79%) i po aktivnosti vode (manja od 0,27) ispunjavali uslove koje predlažu Serra-Bonvehí i Jordá [Serra-Bonvehí i Jordá,1997] kao bezbedne za upotrebu u humanoj ishrani. Sa druge strane, uzorci sušeni na klasičan način su imali sadržaj vlage (13,64 - 24,66%) i a_w (0,46 i 0,66) znatno iznad preporučenih ili dozvoljenih vrednosti.

U uzorcima polena iz južnog dela Brazila Almeida sa saradnicima [Almeida *et al.*, 2005] je utvrdila da je prosečan sadržaj vlage od 7,5% bio u skladu sa argentinskim ali iznad vrednosti koje dozvoljavaju brazilski propisi. Modro-va sa saradnicima [Modro *et al.*, 2007] u šesnaest uzoraka polena sa područja brazilske države Minaš Geraiš utvrdila je da se prosečni sadržaj vlage kretao oko vrednosti od 27% što je bilo daleko iznad dozvoljenih vrednosti. I Carpes-ova je, ispitivala uzorke brazilskih polena [Carpes *et al.*, 2009]. Dobijeni rezultati za vlagu su se kretali u opsegu: 1,69 – 7,84% i 47% uzoraka je bilo po tom sadržaju izvan zakonski propisanog sadržaja vlage od 4% u uzorcima polena. Aktivnost vode u svim uzorcima se kretala oko vrednosti $0,38 \pm 0,04$ što je u potpunosti u skladu sa preporučenim vrednostima po brazilskim propisima za dehidratisanu hranu.

Estevinho sa saradnicima [Estevinho *et al.*, 2012] pri ispitivanju portugalskih uzoraka polena našla je da se sadržaj vlage kretao od 4,33% do 6,67% dok je aktivnost vode imala vrednosti od 0,32 do 0,55. To je bilo više od zakonskog maksimuma u Brazilu ali u skladu sa propisima u Argentini ili Švajcarskoj. Takođe, vidimo da su vrednosti za a_w bile više od onih koje predlažu Serra-Bonvehí i Jordá [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997]. Dobijene pH- vrednosti u uzorcima kretale su se u opsegu 4,33 - 6,33. U svim uzorcima uočena je pozitivna korelacija između sadržaja vlage i aktivnosti vode. Feás sa saradnicima [Feás *et al.*, 2012], takođe, daje rezultate za a_w i pH- vrednost portugalskih uzoraka polena. Oni su dobili rezultate za a_w od 0,21 do 0,37 sa prosečnom vrednošću $0,31 \pm 0,04$. Ovakve vrednosti su karakteristične za suhu hranu. Kada je bila u pitanju pH- vrednost svi uzorci su bili

kiseli (4,3 - 5,2) sa srednjom vrednošću od $4,8 \pm 0,2$. Ovako niska vrednost pH, takođe, garantuje, ispravnost uzoraka polena. Slične rezultate i zaključke o uticaju sadržaja vlage (6,02 - 8,40%) i aktivnosti vode (0,26 - 0,43) nalazimo u radu Nogueira-e i njenog istraživačkog tima [Nogueira *et al.*, 2012]. Yang sa saradnicima [Yang *et al.*, 2013] u uzorcima više vrsta polena iz Kine utvrdio je da je sadržaj vlage u njima se kretao u intervalu 1,82 - 7,33% što je bilo u skladu sa zakonskim propisima u Kini.

Gergen, Radu, Bordean i Isengard [Gergen *et al.*, 2006] naglašavaju da nizak sadržaj vlage u polenu (4 - 10%) može da utiče na proces njegove obrade i tretmana kao i skladištenja u odgovarajućim uslovima. Sadržaj vode u ispitivanim uzorcima se kretao od 4,88% do 6,90%. Morgano i saradnici [Morgano *et al.*, 2011] oslanjajući se upravo na ovo istraživanje Gergena kao i na preporuku Serra-Bonvehí-jeve i Jordá-e [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] ispitali su sto pedeset četiri uzorka iz jedanaest različitih brazilskih država i iz Federalnog Distrikta (Brazilija). Prosečan sadržaj vlage u uzorcima u opsegu temperatura u kojem je rađeno (27 - 50 °C) nije se statistički značajno razlikovao (sa pouzdanošću većom od 95%) i kretao se od 6,26% do 6,35%.

II-7b Sadržaj aminokiselina i proteina u polenu

Aminokiseline i proteini su jedna od najvažnijih nutritivnih komponenti koje su zastupljene u polenu u značajnijoj količini [Campos *et al.*, 1997]. Aminokiseline se mogu javiti ili u slobodnoj formi ili vezane unutar proteina iz kojih se mogu osloboditi pri procesu hidrolize. Upravo na taj način Auclair i Jamieson prezentuju sadržaj aminokiselina u polenu maslačka i vrbe [Auclair i Jamieson, 1948]. Oni su identifikovali ukupno dvadeset jednu aminokiselinu od kojih su sve bile prisutne kako vezane u proteinima tako i u slobodnoj formi osim β -alanina koji je identifikovan samo u slobodnom obliku. Od ostalih asparagin i glutamin nisu nađeni u proteinskim hidrolizatima što je bilo i za očekivati jer, zbog svoje amidne strukture, nakon kisele hidrolize oni su prešli u oblik asparaginske i glutaminske kiseline koje su identifikovane. Aminokiseline i proteini su od izuzetnog značaja za ishranu pčelinjeg društva. Osim osam aminokiselina koje su esencijalne i za

čoveka, pčele moraju još dve (arginin i histidin) unositi putem hrane [Gilliam *et al.*, 1980] te je stoga izuzetno važno da ih ima u polenu. Tih deset aminokiselina su:

- | | |
|-------------|---------------|
| ✓ izoleucin | ✓ arginin |
| ✓ leucin | ✓ fenilalanin |
| ✓ lizin | ✓ treonin |
| ✓ metionin | ✓ triptofan |
| ✓ histidin | ✓ valin. |

deGoot [deGoot, 1953] u svom radu daje predlog minimalnih vrednosti o sadržaju aminokiselina u uzorcima polena a koje su neophodne za pravilan rast i razvoj pčelinjeg društva. Te vrednosti su date u **Tabeli 3**.

Kada je u pitanju sadržaj ukupnih proteina Kleinschmidt sa saradnicima [Kleinschmidt *et al.*, 1974] iznosi podatke da uzorci polena koji su sadržavali ispod 20% proteina nisu mogli da zadovolje potrebe pčela u njihovoj ishrani te su se takva društva slabije razvijala a same pčele su imale kraći životni vek.

Tabela 3. - Minimalne količine esencijalnih aminokiselina neophodnih za pravilnu ishranu i razvoj pčela [deGoot, 1953].

| Aminokiselina | Minimalna količina neophodna za pravilnu ishranu i razvoj pčele [g/16g N] |
|---------------|---|
| Izoleucin | 4,0 |
| Leucin | 4,5 |
| Lizin | 3,0 |
| Metionin | 1,5 |
| Histidin | 1,5 |
| Arginin | 3,0 |
| Fenilalanin | 1,5 |
| Treonin | 3,0 |
| Triptofan | 1,0 |
| Valin | 4,0 |

Ova vrednost se može uzeti kao donja granica za zadovoljavajući sadržaj proteina u uzorcima polena, sa nutritivnog aspekta. Za svakih 10 g proteina koji su potrebni za razvoj pčelinje kolonije neophodno je da pčele sakupe 48 g polena koji sadrži 30% proteina. Ako bi se sadržaj proteina smanjio na 20% bilo bi potrebno čak 72 g takvog polena [Somerville, 2001].

Većina aminokiselina i proteina u polenovom zrnu je smeštena u egzini [Paramás *et al.*, 2006]. U prirodi, kada je vlažnost vazduha pogodna, doći će do

pucanja egzinske opne (kao posledica njene hidratacije) pa supstance mogu da prođu kroz pore polena. Zato neki autori predlažu da se, pre ekstrakcije proteina iz polena, on drži potopljen barem sat vremena u vodi [Serra Bonvehí i Escolá Jordá., 1997]. Drugi ovu ekstrakciju vrše u razblaženom etanolu ili HCl. Autori su proces ekstrakcije proteina iz polena pratili pomoću mikroskopa i vršili poređenje dobijenih rezultata. Ako se, za ekstrakciju, upotrebi 80%-tni etanol dobija se bistar ekstrakt kada se proteini odvoje ali nije primećeno da dolazi do ekstrakcije materijala iz egzine. Primenom hlorovodonične kiseline, $c=0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, dobijaju se rezultati vrlo slični onima dobijenim u vodi. Zatim je ispitana ekstrakcija sa sva tri sredstva u kombinaciji sa mehaničkim drobljenjem materijala. Egzina je razarana mehaničkom drobilicom ili u ultrazvučnom kupatilu i u oba slučaja mikroskopska analiza je pokazala da je egzina, u manjoj ili većoj meri, razgrađena ali je temperatura morala biti kontrolisana da ne bi došlo do interkonverzije aminokiselina. Ovo je predstavljalo limitirajući faktor za ovakav način pripreme uzoraka. Primena homogenizatora se pokazala boljom mada kod nekih polena je uočeno da egzina ni tada nije bila razgrađena. Na kraju, usvojeno je da se uzorci pripremaju kombinovanom primenom ultrazvuka, homogenizatora i 80%-tnog etanola. Dobijeni rezultati za uzorke polena su bili u saglasnosti sa prethodnom studijom urađenom u Španiji [Serra Bonvehí i Escolá Jordá., 1997]. Pronađene su dvadeset dve aminokiseline, a najzastupljeniji je bio prolin sa $20,27 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka. γ – aminobuterna kiselina (GABA) je bila zastupljena u skoro svim uzorcima sa prosečnom količinom od $0,53 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka polena. Homoserin tj. izotreonin (Hser) i ornitin (Orn) su pronadjeni u 22% tj. 16% uzoraka polena. Na nivou ukupnog sadržaja aminokiselina najzastupljeniji je bio prolin mada je i glutaminska kiselina sa $15,10 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka prosečno pokazala značajnu zastupljenost. Kako procenat zastupljenosti polena biljke *Cistus ladanifer* opada u polenu a raste udeo polena biljke *Echium plantagineum* tako se sadržaj slobodnih aminokiselina u određenoj meri smanjivao ali je ukupni sadržaj aminokiselina pokazivao rast. Razlog blagog pada slobodnih aminokiselina je povećanje sadržaja slobodnog prolina koji se javio kod uzoraka sakupljenih krajem proleća. Ispitano je i zašto zastupljenost polena ove dve vrste utiče na sadržaj slobodnih i ukupnih aminokiselina. U tu svrhu mehanički je izvršeno razdvajanje zrna polena koji potiču od *Cistus ladanifer* i

Echium plantagineum da bi se dobili monofloralni uzorci polena a onda je u njima određen sadržaj slobodnih i ukupnih aminokiselina. Rezultati su pokazali da je sadržaj slobodnih aminokiselina i prolina u polenu biljke *Cistus ladanifer* iznosio 32,46 mg g⁻¹ tj. 21,87 mg g⁻¹ uzorka. Sa druge strane, za polen biljke *Echium plantagineum* dobijeni su rezultati od 22,18 mg g⁻¹ za slobodne aminokiseline i 12,23 mg prolina na g uzorka. Nasuprot tome, ukupni sadržaj aminokiselina je bio viši kod drugog polena (32,22%) nego kod prvog (13,95%). Glavni uzrok je upravo zastupljenost prolina koji u polen dospeva pretežno od pčele a ne iz biljke.

Nielsen sa saradnicima još 1955. [Nielsen *et al.*, 1955] daje pregled hemijskog sastava polena ručno sakupljenog na kukuruzu i dvema vrstama jova -evropskoj i sivoj (*Alnus glutinosa* i *Alnus incana*) kao i na planinskom boru (*Pinus montana*). Rezultati su pokazali da je polen planinskog bora bio izuzetno siromašan po sadržaju proteina (oko 12%). Uzorci polena ostalih biljaka sadržavali su znatno veće količine proteina (više od 25%). Analizom sadržaja slobodnih aminokiselina identifikovano je ukupno devetnaest sa prilično ujednačenim količinama u svim uzorcima i tipovima polena. Herbert i Shimanuki [Herbert i Shimanuki, 1978], na osnovu rezultata hemijske analize četrnaest uzoraka polena (sedam sveže prikupljenih od pčela i sedam koji su pčele već bile uskladištile za ishranu larvi) pronašli su relativno konzistentan sadržaj proteina, bez značajnijih razlika. On se kretao u opsegu 21,0 - 29,3% u svežim, odnosno 19,3 - 26,5% proteina u uskladištenim uzorcima. Kauffeld [1980] je prikazao sadržaj slobodnih aminokiselina u uzorcima polena sakupljenim tokom čitave godine u američkoj saveznoj državi Luizijani (Louisiana state, USA). Utvrđeno je prisustvo petnaest aminokiselina. Od toga, tri su pronađene u količini od 1 g/100g uzorka polena (metionin, hidroksiprolin i β-alanin), a osam ih je pronađeno u količinama 2 - 8 g/100g uzorka (tirozin, alanin, triptofan, treonin, leucin, izoleucin, valin, histidin) pri čemu je količina svake od njih bila prilično konzistentna na nekoj od vrednosti u ovom intervalu. Preostale aminokiseline (fenilalanin, arginin, prolin i asparaginska kiselina) su pronađene u uzorcima u količinama koje su značajno varirale u toku godine. Gilliam sa saradnicima [Gilliam *et al.*, 1980] daje poređenje sadržaja aminokiselina i proteina u uzorcima polena koji su ručno sakupljeni na biljkama iz roda citrusa (*Citrus*) i onih koji su sakupile medonosne pčele. Dobijeni rezultati su pokazali da je u

polenima koji su pčele sakupile sadržaj ukupnih proteina (17,1 - 22,6%) i prolina bio viši nego u ručno sakupljenim uzorcima (6,2 - 20,7%). Sadržaj ostalih slobodnih aminokiselina je bio ujednačen u svim uzorcima. Sa druge strane, Human-ova i Nicolson-ova [2006] tvrde da je sadržaj proteina u uzorcima polena koji su sakupile pčele (31%) i onog uzetog direktno iz košnica (28%) bio znatno niži u odnosu na polene koji su ručno sakupljeni direktno sa biljaka (51%). Sadržaj proteina je bio znatno viši u polenu biljke aloje nego u polenu eukaliptusa. Kada je bio u pitanju sadržaj slobodnih aminokiselina autori su utvrdili prisustvo najmanje 18 aminokiselina od čega je deset esencijalnih za pčele. Odnos esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina nije se bitno razlikovao u tri vrste ispitivanog polena aloje. Sve esencijalne aminokiseline, osim triptofana, su bile zastupljene u dovoljnim količinama sa nutritivnog aspekta. Njihov sadržaj u ovom polenu je sličan sadržaju ovih aminokiselina u medu. Kada je u pitanju polen eukaliptusa i u njemu je sadržaj većine esencijalnih aminokiselina bio na potrebnom nivou izuzev izoleucina i povremeno triptofana. Najzastupljenije aminokiseline u polenu eukaliptusa su bile glutaminska, asparaginska kiselina i prolin.

Najveći deo azota koji postoji u polenu potiče od slobodnih aminokiselina i proteina. Određivanje sadržaja ukupnog azota je izuzetno važno, zbog njegovog nutritivnog značaja [Rabie *et al.*, 1983]. Skoro svi autori sadržaj proteina, iz sadržaja azota dobijenog metodom po Kjeldahl-u, izračunavaju korišćenjem korekcionog faktora 6,25 što je u skladu sa pretpostavkom da sadržaj proteina u uzorcima polena iznosi oko 16%. McCaughey sa kolegama daje pregled aminokiselinskog sastava polena različitog porekla [McCaughey *et al.*, 1980]. Autori ovog rada su odredili sadržaj proteinskog azota, koji je ostao sačuvan nakon hidrolize, kao procenat od mase aminokiselina koje su preostale nakon hidrolize. Ono što prethodni istraživači nisu uzimali u obzir to je deo azota koji se gubi u vidu amonijaka. Ako se sadržaj azota koji je otišao u amonijak zbog deaminacije asparagina i glutamina zanemari, dobija se da je sadržaj proteinskog azota oko 16% i takav rezultat su dobili svi prethodni istraživači. Međutim, imajući u vidu da sadržaj glutaminske i asparaginske kiseline u uzorcima nakon hidrolize uopšte nije zanemarljiv, ovakvo izostavljanje azota koji odlazi u vidu amonijaka smanjuje ukupni sadržaj azota za čak 2% jer su autori ovog rada svojim proračunima

pronašli da je ukupni udeo proteinskog azota oko 18%. Zbog toga oni predlažu da korekcionni factor za preračunavanje sadržaja proteina na osnovu sadržaja azota dobijenog metodom po Kjeldahl-u bude 5,6. Agarwal i Nair [1989] su, ispitujući polen biljke *Acacia auriculaeformis* na prisustvo slobodnih i vezanih aminokiselina, utvrdili prisustvo šesnaest slobodnih aminokiselina i devetnaest aminokiselina koje su bile vezane u proteine. U uzorcima slobodnih aminokiselina nađeno je da su oni bili bogati serinom, prolinom i glutaminskom kiselinom, dok je u uzorcima od aminokiselina koje su bile ugrađene u proteine utvrđeno da su asparaginska i glutaminska kiselina, kao i glicin, bili najviše zastupljeni. Prisustvo aminokiselina u polenu je izuzetno važno za pčele jer će ih one iskoristiti, osim u razvoju hipofaringalnih žlezda, i za biosintezu tkiva, hemolimfnih proteina i nekih enzima.

Ispitivanjem sadržaja slobodnih aminokiselina u uzorcima polena sa Novog Zelanda [Day *et al.*, 1990] utvrđeno je da su najniže koncentracije aminokiselina nađene u polenu koji je poticao od ženskih cvetova aktinidije (241,0 pmol μg^{-1} polena) što čini svega 2,9% ukupne mase uzorka. Najviši sadržaj aminokiselina nađen je u polenu žutilovke (1956 pmol μg^{-1} polena) i činio je 23,5% ukupne mase suvog uzorka. Sadržaj aminokiselina u polenu matakure je najviše varirao i kretao se u opsegu od 13,18% do 34,11%. U svakom od polena je izračunat i udeo svake od esencijalnih aminokiselina da bi bilo moguće njihovo poređenje. Ne postoji konzistentnost po pitanju aminokiseline čiji sadržaj najviše varira u zavisnosti od vrste polena. Tako je u polenu deteline, kupine i muških cvetova aktinidije najviše varirao alanin, kod polena matakure i vrbe to je bio prolin, kod jastrebovog semena, čkalja i ženskih cvetova aktinidije najviše se menjao sadržaj histidina, u polenu bora najveće varijacije su zabeležene u sadržaju glutaminske kiseline, dok je kod žutilovke to bila asparaginska kiselina. Ono što jeste zajedničko svim vrstama polena je velika varijabilnost u sadržaju prolina. Poleni vrbe, kupine, žutilovke, matakure i muških cvetova aktinidije sadrže dovoljne količine svih esencijalnih aminokiselina neophodnih za pravilan rast i razvoj pčela. Ostale aminokiseline mogu da se sintetišu iz esencijalnih. Esencijalna aminokiselina koje eventualno nema u dovoljnoj količini postaje limitirajući faktor za pravilan razvoj pčele. Na osnovu deGoot-ovih istraživanja može se zaključiti da su polen jastrebovog semena i čkalja deficitarni po sadržaju arginina i izoleucina. Minimalna

količina izoleucina koja je po deGoot-u neophodna za normalan razvoj jedinke je 4% od ukupnog sadržaja aminokiselina. Na osnovu tog kriterijuma deficitarni po sadržaju izoleucina su još i polen deteline, bora i ženskih cvetova aktinidije. S obzirom da u ovom radu nije ispitivan sadržaj triptofana, jer se razgrađuje tokom same analize, dolazi se do zaključka da je glavna limitirajuća aminokiselina za razvoj pčela bio izoleucin. Neplodni ženski cvetovi aktinidije su relativno siromašni u aminokiselinama u odnosu na plodne muške cvetove. Ovo je u saglasnosti sa već postojećim istraživanjima koja su pokazala nizak sadržaj aminokiselina u neplodnim cvetovima u odnosu na one gde je oprašivanje moguće [Stanley i Linskens, 1974; Kakihara *et al.*, 1988]. Razlike u sadržaju aminokiselina u neplodnim i plodnim cvetovima mogle su prouzrokovati postojeće razlike i u još nekim vrstama ispitivanih polena poput polena deteline, kupine i vrbe. Sadržaj prolina i alanina se, takođe, značajno razlikuje u plodnim i neplodnim cvetovima i znatno je viši kod cvetova gde je oprašivanje moguće [Kakihara *et al.*, 1988]. Koncentracije ove dve aminokiseline su najviše varirale od uzorka do uzorka. Na osnovu svih dobijenih rezultata za sadržaj aminokiselina može se reći da je polen jastrebovog semena sa najnižim nutritivnim kvalitetom. Kako je ova biljka široko rasprostranjena u određenim planinskim oblastima Novog Zelanda moguće je da je to uzrok deficitarnosti u sadržaju određenih proteina kod pčela iz tih područja. Somerville [2001] i Nicol [Somerville i Nicol, 2006] su prikazali veoma detaljnu studiju o nutritivnoj vrednosti polena u Australiji. U tu svrhu analizirali su čak sto devedeset četiri uzorka polena. Za svaki je detaljno određen aminokiselinski profil tj sadržaj svake od aminokiselina koje su od značaja za ishranu pčela, sadržaj ukupnih proteina i na osnovu toga da li sadrže više od 20% proteina ili ne izvedeni su zaključci o njihovoj nutritivnoj vrednosti [Somerville, 2001]. Takođe, za svaki uzorak polena je predstavljen njegov aminokiselinski sadržaj u zavisnosti od palinološkog porekla i na taj način veoma detaljno prezentovane nutritivne vrednosti svake pojedinačne vrste polena. Kada je bio u pitanju sadržaj slobodnih aminokiselina u najvećem broju uzoraka (69 što čini 35% svih uzoraka) limitirajući faktor je bio sadržaj izoleucina koji je iznosio ispod neophodnih 4 g/16g N [deGoot, 1953]. Samo još dve aminokiseline su, u manjem broju uzoraka, bile deficitarne i to valin (jedanaest uzoraka) i metionin (dva uzorka). Na osnovu svega, autori izvode

zaključak da su svi uzorci polena, osim polena lažnog maslačka, dobri za ishranu pčela i da bi zadovoljili njihove potrebe za proteinima i aminokiselinama.

Analizom dvadeset uzoraka španskih polena (područja Ekstramadura i Salamanka) Serra-Bonvehí i Jordá [Serra Bonvehí i Jordá, 1997] utvrdili su da je sadržaj proteina oscilovao u opsegu: 12,6 - 18,2 g/100g uzorka. Glavni deo sadržaja azota u polenu je upravo u vidu proteinske frakcije. Kada su u pitanju slobodne aminokiseline identifikovano ih je osamnaest od kojih je najzastupljeniji bio prolin (19,7 mg g⁻¹ uzorka što čini oko 63,1% od ukupnih aminokiselina), a od esencijalnih aminokiselina, lizin, histidin i arginin su činili od 5,74% do 19,76%. S obzirom da je polen sušen na niskoj temperaturi u kratkom vremenskom periodu, nisu identifikovani proizvodi Maillard-ove reakcije. Tek ako se proces sušenja vrši na 60 °C u trajanju od 2 sata ili na 40 °C u toku nedelju dana dolazi do degradacije S-metilmetionina pri čemu nastaje dimetil-sulfid od kojeg se oseća jak, neprijatan miris [Collin *et al.*, 1995]. Od ostalih aminokiselina značajno su zastupljene bile metionin, fenilalanin, arginin i histidin dok je cistin pronađen u malim količinama. Poređenjem sadržaja slobodnih aminokiselina u različitim uzorcima uočava se slična raspodela u količinama zastupljenih aminokiselina. Isti autor sa saradnicima [Serra Bonvehí *et al.*, 2001] je u jedanaest uzoraka sa područja zapadne Španije utvrdila da je u deset uzoraka sadržaj slobodnih aminokiselina bio iznad propisanih 2 g/100g uzorka što, po njima, ukazuje na svežinu uzorka i na adekvatne uslove sušenja. Ovi autori, takođe, ukazuju da se na osnovu smanjenog sadržaja aminokiselina u uzorku može utvrditi da li je uzorak pregoreo prilikom sušenja ili je neadekvatno pakovan zbog čega mu se smanjuje nutritivna vrednost. Za utvrđivanje starosti uzorka ovi autori predlažu upotrebu odnosa količine prolina i ukupnih aminokiselina. Ako je taj odnos ispod 75% (što je bio slučaj i sa njihovim uzorcima) to ukazuje na svežinu uzorka kao i adekvatno sušenje, pakovanje i skladištenje. U petnaest komercijalnih uzoraka iz Španije Orzáez Villanueva [Orzáez Villanueva *et al.*, 2002] sa svojim timom je utvrdila relativno konstantan sadržaj proteina sa srednjom vrednošću od 13,93 ± 1,67 g%. Nešto viši sadržaj proteina (oko 20%) nalazimo u radu Almeida-e sa saradnicima [Almeida *et al.*, 2005] pri čemu autori naglašavaju da su dobijene vrednosti u ispitivanim uzorcima polena bili u granicama vrednosti koje su dozvoljene po brazilskim

[Brasil, 2001] i argentinskim [Krell, 1996] pravilnicima o kvalitetu. Domínguez-Valhondo-va sa saradnicima [Domínguez-Valhondo *et al.*, 2011] odredila je sadržaj ukupnih proteina i slobodnih aminokiselina u uzorcima polena iz Španije. Po sadržaju ukupnih proteina nešto bogatiji bili su polifloralni uzorci (16,08% tj. 17,64%). U tom smislu polen se pokazao kao bogatiji proteinima od nekih drugih vrsta hrane poput jaja (12,8%), odnosno svinjetine (14,2%). Kada je bio u pitanju sadržaj slobodnih aminokiselina u svim uzorcima dominantan je bio prolin (18,94 - 25,81 mg g⁻¹ suvog uzorka). Sadržaj slobodnih aminokiselina opadao je sa sušenjem uzoraka i bio je bolje očuvan u liofilizovanim uzorcima nego onim koji su sušeni na klasičan način tj na povišenoj temperaturi. Osim prolina u značajnim količinama nađene su i druge osnovne aminokiseline - histin, glicin i glutaminska kiselina. Po ovim autorima zanimljivo je prisustvo γ -aminobuterne kiselina (GABA) koja ne spada u proteinske aminokiseline ali je izuzetno važna jer utiče na neurotransmisiju signala u organizmu, na izlučivanje tečnosti kao i na relaksaciju organizma [Jakobs *et al.*, 1993]. Iz tog razloga prisustvo GABA u polenu (0,26 - 0,69 mg g⁻¹ uzorka) čini ga zanimljivim i za upotrebu u ljudskoj ishrani. Na osnovu analize uzoraka polena iz Portugala Estevinho sa saradnicima [Estevinho *et al.*, 2012] je pokazala da se sadržaj proteina nije statistički značajnije razlikovao u zavisnosti od geografskog porekla i da se kretao u opsegu od 24,23% do 34,18%. Razlike koje postoje mogu biti posledica ili različitih uslova pod kojima su biljke rasle [Almeida *et al.*, 2005] ili različitog botaničkog porekla uzoraka [Szcześna, 2006].

Na aminokiselinski sastav polena utiču eksterni i interni faktori. Najvažniji eksterni faktori su uslovi sušenja uzoraka i njihovo čuvanje, a od internih floralno poreklo polena. Roulston sa saradnicima [Roulston i Cane; Roulston *et al.*, 2000] u analizi polena trista sedamdeset sedam biljnih vrsta iz devedeset tri familije utvrdio je veoma širok opseg koncentracija proteina (od 2,5% do 61%) u zavisnosti od vrste pri čemu je količina proteina unutar polena biljaka iz jedne biljne familije bila poprilično konzistentna. Sadržaj proteina u svim uzorcima u radu Saa-Otero-ove i saradnika [Saa-Otero *et al.*, 2000] je bio dosta visok i kretao se od 22% do 27%.

Szcześna u svojim radovima [2006a, b] daje poređenje sadržaja aminokiselina i proteina u uzorcima iz tri zemlje (Kina, Južna Koreja i Poljska) pri čemu rezultati

pokazuju da se sadržaj nije menjao u zavisnosti od geografskog porekla. U najvećim količinama pronađene su glutaminska i asparaginska kiselina, prolin, leucin i lizin koje su, zajedno, činile više od 50% ukupnih aminokiselina. Sa druge strane, sadržaj proteina i aminokiselina je značajno varirao od uzorka do uzorka što je verovatno uzrokovano njihovim različitim botaničkim preklom. Uzorci iz Kine bili su najbogatiji u sadržaju proteina i svih aminokiselina izuzev asparaginske kiseline i arginina. Njihov sadržaj bio je ujednačen u svim uzorcima. Sadržaj esencijalnih aminokiselina kretao se oko 37% u uzorcima iz Kine i Koreje dok je u uzorcima iz Poljske bio viši za 3%. Kada su bili u pitanju uzorci polena različitog geografskog porekla Odoux i saradnici [Odoux *et al.*, 2012] pratili su variranje sadržaja proteina u zavisnosti od dela godine i ispaše kada su oni sakupljeni. Pri tome su utvrdili da je sadržaj proteina varirao od 16,7% do 29,9% sa prosečnom vrednošću od 24,5%. Najviši sadržaj proteina zabeležen je u proleće, od 16. do 19. nedelje (28,6 – 29,1%) i u jesen, u 44-oj nedelji (26 – 29,9%). Najniža vrednost je nađena u rano proleće, do 14-te nedelje (20 – 24,5%) i u leto, od 24. do 36-te nedelje (16,8 – 24%). Prosečna vrednost proteina iznosila je 4,4 g po nedelji unosa. Glavni izvor proteina bili su poleni žitarica i drveća među kojima su najviši sadržaj proteina imali poleni drena (14,8 – 19,6 g), kukuruza i sirka (5,8 – 11,3 g proteina). Nešto drugačiju raspodelu količine proteina, u zavisnosti od godišnjeg doba, u uzorcima iz Kine nalazimo u radu Yang-a i saradnika [Yang *et al.*, 2013]. Pronađeno je da se sadržaj proteina (koji su bili druga po zastupljenosti komponenta u polenu posle ugljenih hidrata) kretao u opsegu od 14,26% do 28,95% pri čemu je u uzorcima iz drugog dela godine sadržaj proteina bio za 20% viši nego u onima koji su sakupljeni na početku sezone. Ispitivanje sadržaja aminokiselina je pokazalo da su dominantno zastupljeni prolin (2,33 g/100g), glutaminska kiselina (2 g/100g) i asparaginska kiselina (1,91 g/100g). Ukupni sadržaj esencijalnih aminokiselina kretao se u intervalu od 4,62 do 11,60%. To je predstavljalo 35,18% tj 42,78% od ukupnih aminokiselina što je neznatno više u odnosu na FAO standarde (33,9%) [FAO, 1991]. Sadržaj lizina u polenu je bio niži od onog preporučenog po FAO standardima, dok je, sa druge strane, sadržaj triptofana znatno prelazio preporučene vrednosti.

U radu Carpes-ove i kolega [Carpes *et al.*, 2009] dati su rezultati analize brazilskih polena u kojima su utvrdili da je prosečan sadržaj proteina ($20,47 \pm 2,64\%$) bio u skladu sa brazilskom zakonskom regulativom pri čemu je količina proteina varirala u zavisnosti od geografskog porekla i kretala se od 15,04% do 27,69%. Slično tome, Modro-va sa svojim istraživačkim timom [Modro *et al.*, 2007 i 2009] za uzorke sa dva pčelinjaka u brazilskoj državi Minas Gerais utvrdila je da je srednja vrednost ukupnih proteina bila $28,27 \pm 6,19\%$ odnosno $23,73 \pm 5,91\%$. Kada je bio, u pitanju, sadržaj proteina u devet ispitivanih uzoraka iz brazilske oblasti Mata Atlantika utvrdila je da se po prosečnom sadržaju proteina ($26,2 \pm 10,5\%$) oni uklapaju u brazilske propise s tim što se sadržaj proteina u pojedinačnim uzorcima značajnije razlikovao i kretao od 15,39% koliko ih je bilo u pretežno monofloralnom uzorku koji je poticao od biljaka iz roda *Vernonia* do, čak 44,44% proteina koliko je sadržavao poliflorani uzorak sačinjen od polena biljaka iz rodova *Anadenanthera* i eukaliptus i od biljaka iz familije palminog drveća. Još više sadržaje proteina u uzorcima veneculanskog polena pronašla je Santiago-va koja u svom radu [Santiago, 2008] iznosi podatke da su ispitivani uzorci sadržavali od 24,92 g do čak 52,56 g proteina na 100 g uzorka. Feás, sa svojim istraživačkim timom [Feás *et al.*, 2012], na osnovu analize dvadeset tri uzorka polena došao je do zaključka da je prosečan sadržaj proteina u uzorcima bio 21,8%. Tim sa Nogueira-om na čelu [Nogueira *et al.*, 2012], pri ispitivanju osam uzoraka je dobio vrednosti za sadržaj proteina u njima koje su se kretale u opsegu: 12,50 - 25,15 g/100g uzorka.

Nicolson-ova i Human-ova [2013] iznose rezultate analize sadržaja aminokiselina i proteina u uzorcima suncokretovog polena koji je sakupljen kako ručno, tako i pomoću pčela. Utvrdile su da je sadržaj proteina u uzorcima koje su sakupile medonosne pčele bio niži u odnosu na one koji su sakupljeni ručno. Kada je bio u pitanju sadržaj slobodnih aminokiselina za većinu esencijalnih aminokiselina on je bio ujednačen u svim uzorcima izuzev prolina u dva uzorka ručno sakupljena i arginina koji se razlikovao u uzorcima koje su sakupile pčele i uskladištenih uzoraka. Metionin i triptofan su bili u koncentracijama ispod donje granice neophodne za pravilnu ishranu pčele. Tri neesencijalne aminokiseline su prisutne u većim koncentracijama u uskladištenim uzorcima u odnosu na ručno sakupljene

uzorke. Slično razmatranje uticaja načina sakupljanja polena na njegov sastav tj. na sadržaj slobodnih aminokiselina u njemu nalazimo u radu Weiner-ove i saradnika [Weiner *et al.*, 2010]. Autori su ispitivali polen sto četrdeset dve biljne vrste od kojih samo pet nisu bile među onima koje pčele uobičajeno oprašuju u toku ispaše (Močvarni neven - *Caltha Palustris* L., Velebilje - *Circaea lutetiana* L., Prišt trava - *Erophila verna* L., Zova, Beli kampion - *Silene latifolia* Poir.). Autori smatraju da su se prethodna ispitivanja uglavnom bazirala na polenu koji su sakupile pčele, a jako malo je bilo ispitivanja ručno sakupljenog polena. Ispitivanje sastava polena koji su sakupile pčele je složeno zbog toga što pčele u tom procesu dodaju određene količine nektara i meda polenu kao i izlučevine iz svojih pljuvačnih žlezda, a što sasvim sigurno utiče na krajnji sastav polena. Tako npr. ako bi se dodatak ugljenih hidrata polenu, koji su dospeli na ovaj način, zanemario značajno bi bio umanjen udeo proteina u polenu. Zbog toga su se autori u ovom radu odlučili da polen sakupljaju ručno. U tom cilju za svaki uzorak uziman je polen sa, u proseku, dvesta cvetova određene biljne vrste kako bi se prikupila dovoljna količina polena za analizu (0,08 – 9,6 mg). Biljne vrste su se značajno razlikovale u sadržaju aminokiselina, a posebno po odnosu slobodnih i vezanih aminokiselina. Biljne vrste iz jedne familije, sa druge strane, pokazivale su sličan hemijski sastav i sadržaj aminokiselina.

S obzirom da su triptofan (Try) i cistin (dimer cisteina, (Cys)₂) vrlo osetljive aminokiseline koje se razgrađuju prilikom klasičnih HPLC-metoda analiza sadržaja slobodnih aminokiselina [Day *et al.*, 1990], You sa saradnicima [You *et al.*, 2007] je razvio novu metodu derivatizacije aminokiselina pomoću 2-(11H-benzo[α]-karbazol-11-il)etil-hloroformat (BCEC-Cl). Ovo jedinjenje sa svim aminokiselinama uključujući i Try i (Cys)₂ davalo je stabilne derivate koje je lako detektovati fluorescentnim detektorom. Szcześna [Szcześna, 2007] pri analizi sadržaja aminokiselina sugerise da se pre same hidrolize doda permravlja kiselina da bi se sačuvala aminokiseline koje sadrže sumpor, uključujući i Cys tj (Cys)₂.

Na osnovu prikazanog možemo zaključiti da je poznavanje sadržaja aminokiselina i proteina u dosadašnjoj literaturi dalo tri vrste veoma važnih informacija:

- ✓ može da pomogne pri utvrđivanju botaničkog i geografskog porekla polena i meda

- ✓ u nutritivnom smislu aminokiseline i proteini su važne komponente pa su poleni bogati njima pogodniji za upotrebu kao dodatak ishrani
- ✓ u smislu kontrole kvaliteta sadržaj aminokiselina može da bude indikator o ispravnosti sušenja i kasnijeg skladištenja uzoraka polena odnosno skladištenja meda [Paramás Gonzáles *et al.*, 2006].

II-7c Sadržaj šećera i dijetetskih vlakana u polenu

Kao što je naglašeno u **Tabeli 2** [Campos *et al.*, 2010] šećeri (ugljeni hidrati, saharidi) su najzastupljenija makrokomponenta u polenu koji su sakupile pčele što je posledica dodavanja meda i nektara kojim pčele obogaćuju polen pre nego što ga uskladište za potrebe ishrane larvi [Stanimirović *et al.*, 2000]. Na šećere otpada od 13% do 55% ukupnog sadržaja supstanci u polenu od čega se polisaharidi kreću i do 50%, dok prostih šećera (mono i disaharida) ima u sadržaju od 4% do 10% [Campos, 1997]. Među polisaharidima najzastupljeniju su skrob i polisaharidi koji potiču iz ćelijskog zida [Bogdanov, 2012]. Kao što je ranije naglašeno prvi polisaharid koji se specifično razvija u polenu je kaloza koja ima ulogu da pre svega štiti mlade mikrospore nastale u polenovom zrnu i da obezbedi vlažnost uzorka u sušnom periodu [Eschrich, 1956 ; Barskaya i Balina, 1971]. Nakon perioda formiranja tetrada kaloza nestaje a u okviru egzine i intine najzastupljeniji polisaharid postaje celuloza. Od prostih šećera dominantno su zastupljeni fruktoza, glukoza i saharoza.

Za dijetetska vlakna ne postoji još uvek jedinstvena definicija, što je verovatno uslovljeno njihovom hemijskom raznorodnošću. Najčešće se kaže da su to određeni oligo- i polisaharidi, kao i njihovi hidrofilni derivati, koje ljudski enzimi ne mogu da svare u gornjem delu probavnog trakta [Thebaudin *et al.*, 1997]. Od šećera koji obično ulaze u sastav vlakana zastupljeni su celuloza, hemiceluloza (koje potiču iz ćelijskog zida), agar, razni pektini i alginati koji mogu da se nalaze u semenu ili potiču od bakterija [Vasić *et al.*, 2009]. Osim njih, po nekim autorima, u sastav vlakana ulazi i onaj deo skroba koji nije svarljiv [Bogdanov, 2012].

Day-ova sa saradnicima [Day *et al.*, 1990] u analizi nutritivnog sadržaja i kvaliteta pčelinjeg polena sa Novog Zelanda, između ostalog, daje i podatke o

ukupnom sadržaju šećera kao i sadržaju redukujućih šećera. U datim uzorcima polena sadržaj šećera se kretao od 12,6% u polenu makagure do 29,6% u polenu ženskih cvetova aktinidije.

U vrlo detaljnoj analizi nutritivnih i mikrobioloških karakteristika uzoraka polena iz Španije Sera-Bonvehí i Jordá [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] iznose rezultate o sadržaju svih ugljenih hidrata u uzorcima polena što je uključivalo ukupne slobodne šećere, skrob kao i dijetetskih vlakna. Autori su utvrdili prisustvo redukujućih šećera u izuzetno visokim koncentracijama. Kod većine polena ugljeni hidrati čine glavninu suve materije i variraju u zavisnosti od porekla i vrste. Razlike u sadržaju ugljenih hidrata pronađene su između ručno sakupljenih uzoraka polena (1 – 37 g/100g uzorka) i onih koje su prikupile medonosne pčele (20 – 48 g/100g uzorka). Angiospermni polen koji prikupe pčele je bogatiji u redukujućim šećerima i znatno siromašniji po sadržaju neredukujućih šećera u odnosu na polen koji je ručno prikupljen. U ispitivanim uzorcima sadržaj redukujućih šećera je prosečno iznosio 32,9 g/100g uzorka, a sadržaj saharoze je bio, u proseku, 6,12 g/100g uzorka. Prisustvo redukujućih šećera u polenu koji su sakupile medonosne pčele može se objasniti i činjenicom da one koriste med i nektar kao fluid kojim slepljuju zrna polena kada ih prenose u svojim korbikularnim korpicama do košnice. Od monosaharida u uzorcima su bili najzastupljeniji fruktoza i glukoza, dok su u malim koncentracijama nađeni i disaharidi – trehaloza, izomaltoza i maltoza, kao i trisaharidi – rafinoza (α -D-galaktozilsaharoza), erloza (α -D-glukozilsaharoza) i melecitoza. Kada se uporede sadržaji fruktoze (F) i glukoze (G) udeo fruktoze je značajno veći što se vidi i iz F/G indeksa koji se u uzorcima kretao od 1,13 do 1,53. Sadržaj skroba u uzorcima je varirao i prosečna vrednost mu je bila 2,13 g/100g uzorka. Sadržaj dijetetskih vlakana se nameće kao važan nutritivni parametar kvaliteta hrane kada se ima u vidu da njihov manjak u hrani može predstavljati ozbiljan rizik po zdravlje ljudi u svim razvijenijim društvima. Autori su analizirali tzv. "neskrobne" polisaharide (NSP) koji ne uključuju lignin i sporopolenin. Rezultate su izrazili kao sadržaj ukupnih dijetetskih vlakana (UDV), nerastvornih dijetetskih vlakana (NDV) i rastvornih dijetetskih vlakana (RDV). Sadržaj UDV-a je bio veći kod polena koji su prikupile medonosne pčele. Prosečna vrednost je iznosila 10,6 – 15,9 g/100g

uzorka. Na osnovu rezultata dobijenih za NDV može se zaključiti da polisaharidi – celuloza i kaloza, čine glavni deo dijetetskih vlakana (prosečni sadržaj je bio $11,3 \pm 1$ g/100g uzorka). Ovo pokazuje da polen sadrži neophodne količine i raznovrsnost NDV i RDV koje ga čine pogodnim za upotrebu kao dodatak svakodnevnoj ishrani.

Saa-Otero-va sa svojim kolegama [Saa-Otero *et al.*, 2000] daje podatke o sadržaju glukoze i fruktoze, kao dva najzastupljenija šećera, u uzorcima polena iz Španije. Oni su našli da je sadržaj fruktoze u svim uzorcima bio viši u odnosu na sadržaj glukoze izuzev uzorka koji je poticao od eurosibirske flore gde je nađen viši sadržaj glukoze (21,8%). Najveći sadržaj fruktoze nađen je, takođe, u uzorku poreklom od biljaka eurosibirskog područja (23%). Kada su u pitanju sadržaji glukoze i fruktoze u pojedinačnim, monofloralnim, vrstama polena najveći sadržaj glukoze je nađen u polenu biljaka iz roda *Rubus* (21%), a najniži u polenu divlje rotkve (9,1%). Sa druge strane, sadržaj fruktoze bio je najviši u polenu pitomog kestena (26,3%) a najniži u polenu eukaliptusa (17,6%). U ovom slučaju teško je dovesti u direktnu vezu sadržaj šećera sa određenim botaničkim poreklom polena. Serra Bonvehí i kolege [Serra-Bonvehí *et al.*, 2001] u radu o sadržaju polifenolnih i flavonoidnih jedinjenja u uzorcima španskih polena govore i o sadržaju slobodnih šećera (s obzirom da se dobar deo ovih jedinjenja nalazi u vidu glikozida tj. s jedinjenih sa različitim šećerima). Tako su utvrdili da od slobodnih šećera u uzorcima polena su bili prisutni glukoza, fruktoza i saharoza, kao dominantno zastupljeni. U niskim koncentracijama nađeni su disaharidi trehaloza, izomaltoza i maltoza kao i trisaharidi rafinoza, erloza i melizitoza što je bilo identično rezultatima u njihovom ranijem radu [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997]. Nakon hidrolize pomoću HCl ($c = 1,2 \text{ mol dm}^{-3}$) na $90 \text{ }^\circ\text{C}$ u 50%-tnom metanolu u trajanju od 60 minuta [Hertog *et al.*, 1992] nađeni su i drugi šećeri poput ramnoze. Orzáez Villanueva sa saradnicima [Orzáez Villanueva *et al.*, 2002] u uzorcima polena iz Španije odredila je sadržaj šećera, kao deo nutritivne analize polena. Oko 65% svih uzoraka sadržavalo je prosečnu količinu šećera na nivou 37,5 g% od čega kod svih uzoraka je na saharozu otpadalo manje od 2% izuzev kod jednog uzorka gde je sadržaj saharoze bio na nivou od 12 g%. Analizu sadržaja ukupnih kao i rastvorljivih šećera određenih portugalskih uzoraka polena koji su sakupile medonosne pčele nalazimo u radu Estevinho-ove i njenog istraživačkog tima

[Estevinho *et al.*, 2012]. Na osnovu rezultata za ukupni sadržaja ugljenih hidrata (od 60,82% do 70,76%) videlo se da oni predstavljaju glavnu frakciju u polenu na koju otpada oko dve trećine ukupnog sadržaja polena. Dobijeni rezultati su bili nešto viši u odnosu na one dobijene pri ispitivanju polena iz Brazila gde je utvrđeno da sadrže 52,10% ugljenih hidrata [Carpes *et al.*, 2009]. Kada je u pitanju sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata najviši sadržaj je utvrđen u uzorcima iz Vijane du Kaštelo (55,67 g/100g) dok je najmanji sadržaj nađen u uzorcima iz Vizeua (43,33 g/100g). Značajne statističke razlike ($p < 0,05$) u sadržaju rastvorljivih ugljenih hidrata su uočene između uzoraka iz Lejre, Vijana du Kaštele i Kovilja u odnosu na uzorke iz Vizeua i Braganse. Visok sadržaj ove frakcije ukazuje na prisustvo nektara i meda koji pčele koriste za „lepljenje“ zrna polena kada ga skladište i pakuju [Sarmiento Silva *et al.*, 2012]. Na osnovu analize dvadeset tri uzorka polena Feás i saradnici [Feás *et al.*, 2012] su dobili da je prosečan sadržaj ugljenih hidrata u njima bio 67,7%. Izuzetno visok sadržaj šećera (69,68% - 84,25%) u španskim i portugalskim polenima našla je Nogueira-ova sa saradnicima [Nogueira *et al.*, 2012] koji, kao razlog, isto navode dodatak meda i nektara dok pčela sakuplja polen. Od ukupnih šećera na redukujuće je otpadalo od 26,09% do 41,79%.

Human-ova i Nicolson-ova [Human i Nicolson, 2006] su u svojim uzorcima polena iz Južne Afrike poredile i sadržaj šećera u polenima koje su sakupile medonosne pčele i onih ručno sakupljenih. Sadržaj ugljenih hidrata je očekivano bio znatno niži u svežem polenu nego u polenu koji su sakupile pčele jer pčele u polen dodaju nektar koji je bogat ugljenim hidratima. Sadržaj ugljenih hidrata u polenu uzetom sa pčela pri ulasku u košnicu i onom koji su one uskladištile nije se značajnije razlikovao. U ispitivanim polenima nije nađen skrob.

Szczęsna [Szczęsna, 2007] daje rezultate analize sadržaja šećera u polenima iz Poljske, Južne Koreje i Kine. Ona je utvrdila da su u uzorcima najzastupljeniji šećeri bili fruktoza i glukoza, od monosaharida, odnosno saharoza, trehaloza, turanoza i maltoza od disaharida. Procenat pojedinih šećera je varirao i iznosio 46% za fruktozu, 37% za glukozu, 8% za saharozu, 7% za maltozu i 1% za turanozu i trehalozu. Sadržaj i vrsta šećera u pojedinim uzorcima su varirali u zavisnosti od

njihovog geografskog i botaničkog porekla. Tako je npr. u uzorcima iz Poljske sadržaj glukoze i fruktoze bio znatno viši u odnosu na uzorke iz Južne Koreje i Kine.

Carpes-ova sa saradnicima [Carpes *et al.*, 2009] u uzorcima iz južnog Brazila našli su visok sadržaj redukujućih šećera - $48,79 \pm 4,16\%$. Ono što su, takođe, naglasili, jeste, da je potreban dalji razvoj metoda za određivanje šećera u polenima kako bi što više njih moglo da se identifikuje. Takvu novu metodu nalazimo u radu Qian-a i saradnika [Qian *et al.*, 2008]. Oni su sadržaj šećera u uzorcima polena koji su sakupile medonosne pčele u različitim delovima sveta (Španija, Izrael, Kina i Rumunija) odredili pomoću tankoslojne (TLC) hromatografije. Dobijeni rezultati TLC analize su pokazali da u svim uzorcima polena postoje značajne količine šećera i to fruktoze (15,9 - 19,9%), glukoze (8,2 - 13,1%) i saharoze (14,8 - 18,4%). Nakon analize rezultata TLC hromatografije sadržaj šećera je detaljnije ispitivan pomoću HPLC - PAD metode (Ca^{2+} -ligandna jonoizmenjivačka hromatografija visoke performance spregnuta sa pulsnom amperometrijskom detekcijom). Prisustvo glavnih šećera dodatno je potvrđeno HPLC/MS analizom. Dobijeni rezultati su pokazali da postoje izvesna preklapanja između rezultata za galaktozu i ksilozu ali za sve ostale heksoze kao i za saharozu su dobijena dosta dobra razdvajanja. Ono što je prednost njihove nove metode jeste što su pomoću nje osim najčešće identifikovanih šećera u uzorcima polena (heksoza i saharoze), a za koje su dobili i veću osetljivost metode, uspeali da identifikuju i trisaharid melozitozu kao šećer prisutan u tragovima. Ono što je bila druga prednost ove metode jeste što se izbegava dodatak rastvora neke soli nakon prolaska uzorka kroz kolonu jer nagrađeni kompleksi između Ca^{2+} -jona i šećera zbog visokog naelektrisanja su davali odličan odgovor u PAD-u i MS-u.

Analizom sadržaja šećera u uzorcima polena različitog geografskog porekla i različitog vremena prikupljanja Odoux i njegove kolege [Odoux *et al.*, 2012] su utvrdile da je on varirao od 14,6% do 41,1% sa maksimalnim vrednostima od 22. do 28. nedelje (31,2 - 41%) i od 33. do 36. nedelje (27,4 - 33,6%) dok su minimalne količine šećera nađene u jesen, u toku 37. nedelje (ispod 25%). Biljne vrste sa najvećim sadržajem šećera u polenu su bile mak i malina u proleće tj. cikorija i slačica u leto. Ispitivanjem sadržaja ugljenih hidrata i dijetetskih vlakana u uzorcima kineskih polena Yang sa saradnicima [Yang *et al.*, 2013] je utvrdio da su šećeri bili najzastupljenija nutritivna komponenta sa sadržajem od 59,43 do čak 75,65%.

Prema sadržaju dijetetskih vlakana polen je njihov odličan izvor (17,60 – 31,26%) uz napomenu da su to uglavnom nerastvorljiva vlakna. Procenat rastvorljivih vlakana se kreće od 0,86% do 5,92% što odnos rastvorljiva vlakna/nerastvorljiva vlakna u polenu čini nešto nepovoljnijim od poželjnog za dobre dijetetske osobine (1:2). Najvažnije komponente u okviru nerastvorljivih dijetetskih vlakana su bile celuloza i kaloza.

II-7d Sadržaj lipidnih materija u polenu

Glavne lipidne komponente u polenu su polarne i neutralne masti (mono, di i trigliceridi) kao i manje količine slobodnih masnih kiselina, sterana i ugljovodonika. Od masnih kiselina najviše su zastupljene palmitinska (C16:0), oleinska (C18:1), linolna (C18:2) i linolenska (C18:3) kiselina pri čemu na nezasićene masne kiseline otpada više od 70% sadržaja [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997]. Postoje značajne razlike u sadržaju lipida u zavisnosti od botaničkog porekla polena [Bogdanov, 2012; Campos *et al.*, 2008]. Najveći deo lipidnih supstanci u polenovom zrnu je skoncentrisan u površinskom, zaštitnom delu tzv. „pollen kitt-u“. Ovaj deo zrna uglavnom vodi poreklo od proizvoda raspadanja ćelija tapetuma u prašnicima što ima izuzetno važnu ulogu u formiranju samog zrna. „Pollen kitt“ sloj se uglavnom javlja kod skrivenosemenica, a razlike u sastavu ovog sloja utiču na adhezivnost polena kako kod entomofilnih tako i kod anemofilnih biljnih vrsta. Najvažnije funkcije „pollen kitt-a“ su u uspešnom raznošenju polenovih zrna preko životinja i u očuvanju muških gametofita do, u toku i posle polinacije. Hemijsko ispitivanje ovog sloja polena ima značaja u smislu dobijanja informacija o lipidnim komponentama u polenu, jer se u njemu može nalaziti od 1 – 20% ukupnih lipida niske polarnosti (tzv. neutralni lipidi). Do ovih podataka došlo se ekstrakcijom polena u benzenu ili etru pri čemu se odvajaju u najvećoj meri upravo komponente koje čine „pollen kitt“, a to su pre svega: slobodne masne kiseline, razni gliceridi, steroli i sterolni estri, ugljovodonici, nesterolni terpenoidi kao i karatenoidni pigmenti. Veći broj autora je identifikovao nesaponifikovane lipide u polenu poput različitih steroida [Hugel, 1962; Hugel *et al.*, 1964]. Kao što je naglašeno u uvodnom delu „pollen kitt“ sloj ima potencijalno važnu ulogu u privlačenju insekata oprašivača na biljku.

U radu Dobson-ove [Dobson, 1988] nalazimo vrlo detaljnu studiju o sadržaju lipida u polenovom zrnu i o njihovoj ulozi. Istraživanje je obuhvatilo šezdeset osam biljnih vrsta iz dvadeset osam familija sa područja Kalifornije. Uz znatno variranje u brojnosti (od tri do dvadeset), neutralni lipidi su u mnogo većoj meri identifikovani u površinskoj zoni nego u unutrašnjosti polenovih zrna gde su, u mnogo većoj meri nađeni steroli i njihovi estri, a od neutralnih lipida samo trigliceridi. Sa druge strane, „pollen kitt“ zona je znatno bogatija negliceridnim lipidima od kojih su mnogi lako isparljiva jedinjenja, ali su u njoj pronadjeni skoro svi lipidi. Ugljovodonična frakcija je nađena samo u površinskoj zoni. Gliceridi su u većoj meri nađeni u unutrašnjoj zoni, od čega najviše trigliceridi, dok su di- i monogliceridi znatno manje zastupljeni. Steroli su u većoj meri nađeni u unutrašnjoj zoni, dok su sa druge strane, nesterolni lipidi bili više zastupljeni u „pollen kitt“ zoni. Sterolni estri su nađeni u obe zone ali u većoj meri i uz veću raznovrsnost identifikovani su u površinskom sloju. Slobodne kiseline, uključujući i masne, su u većoj meri nađene u „pollen kitt“ zoni. Metil estri kiselina su nađeni samo u nekim od polena pri čemu su u svim slučajevima, osim jednog, identifikovani u površinskom sloju. Terpeni su nađeni u obe zone ali su u površinskom sloju pokazali posebno veliku raznovrsnost. Nekoliko vrsta za koje se zna ili se pretpostavlja da ih oprašuju druge životinje pokazuju tenedeciju ka niskom sadržaju lipida u površinskoj zoni. Takve npr. biljke iz roda ribizle (*Ribes speciosum*), snežni cvet (*Sarcodes sanguinea*) i *Mimulus aurantiacus* oprašuje kolibri, a kalifornijski kesten (*Aesculus californica*) leptirovi. Zanimljiva je jedna vrsta orhideja, *Habenaria dilatata*, koju oprašuju komarci ili moljci.

Nasuprot neutralnim, polarni lipidi (fosfolipidi, glikolipidi, sulfolipidi i flavonoidi) su pokazali znatno manju raznovrsnost i skoro isključivo su nađeni u unutrašnjoj zoni polenovog zrna. Njihovo prisustvo je utvrđeno kod svega 15 biljnih vrsta. Od pigmenata žuti karotenoidi i flavonoidni pigmenti su bili značajno zastupljeni i u površinskom i u unutrašnjem sloju polenovog zrna. Karotenodi, koji su liposolubilni, nađeni su zajedno sa neutralnim lipidima i to najviše u obliku karotena i ksantofila prevashodno u „pollen kitt“ zoni. Sa druge strane, flavonoidi koji su više hidrosolubilni nađeni su u znatno većoj meri u unutrašnjoj zoni polenovog zrna. Od ostalih nelipidnih jedinjenja nađeni su neki alkaloidi u pet

vrsta u unutrašnjoj i kod dvadeset dve vrste u „pollen kitt“ zoni. Ova studija je pokazala da je „pollen kitt“ zona bogata tzv. negliceridnim lipidima poput ugljovodonika, karotenoidinih pigmenata i velikog broja terpena što ukazuje na činjenicu da bi ova zona polenovog zrna mogla biti nosilac arome polena. Moguća paralela se može povući između tipa lipida prisutnih u ovoj zoni sa mirisom cveta. Ugljovodonici i drugi slaboisparljivi lipidi u ovoj zoni mogući su „fiksatori“ lakoisparljivih jedinjenja, a pre svega terpena. Mali broj polarnih lipida koji je nađen u ovoj zoni polena verovatno ima ulogu u stvaranju interakcije između polena i tučka cveta. S obzirom na raznolikost lipida u površinskom sloju postavlja se pitanje u kolikoj meri je to povezano sa prilagođavanjem biljaka određenoj životinjskoj vrsti oprašivača. Moguće je da ova jedinjenja imaju i neku drugu namenu poput zaštite od predatora, parazita ili drugih opasnosti iz ekosistema. Poređenjem sastava lipida u ovoj zoni sa lipidnom frakcijom u nekim drugim biljnim organima koji mogu imati sličnu ulogu u privlačenju oprašivača može nam pokazati da li ova jedinjenja zaista tome i služe ili ne.

Na osnovu ispitivanja sadržaja masnih kiselina i sterola u uzorcima badema u Kaliforniji [Loper *et al.*, 1980] utvrđen je određeni porast u sadržaju masnih kiselina u polenu koji su sakupile pčele u odnosu na ručno prikupljeni polen mada se, u kvalitativnom smislu, uzorci nisu razlikovali. Takođe, uočen je blagi porast zasićenih C-18 masnih kiselina. Od sterola, u svim uzorcima, najzastupljeniji je bio C₂₄ metilenholesterol dok su dva manje zastupljena bili sitosterol i izofukosterol.

Analizom sadržaja masnih kiselina i nesaponifikovanih lipida u egipatskim uzorcima polena Shower sa saradnicima [Shower *et al.*, 1987] je došao do sledećih podataka: ukupni sadržaj lipida kretao se od 7,16% do 10,92% koliko je nađeno u kukuruзу, odnosno bobu. Niže masne kiselina poput dekanske (C10:0) nađene su samo u polenu divlje slačice. Laurinska (C12:0) kiselina je nađena u niskim koncentracijama u svim uzorcima polena izuzev polena egipatske deteline. Miristinska (C14:0) kiselina je bila glavna masna kiselina u svim uzorcima polena. Miristoleinska (C14:1) kiselina je nađena u niskim koncentracijama u polenu divlje slačice i boba. Palmitinska kiselina je nađena u značajnim količinama u tri uzorka polena dok nije nađena u polenu kukuruza i slatke žute deteline. Linolenska kiselina je nađena u polenima žute deteline, divlje slačice i boba, isto kao linolna

kiselina s tim što je linolna kiselina nađena u znatno višim koncentracijama. Najduža masna kiselina koja je identifikovana, arahidinska (C20:0), je nađena samo u polenu divlje slačice. U svih uzorcima polena pronađeni su C₂₀, C₂₂, C₂₆, C₂₈ i C₃₂ ugljovodonici u različitim količinama. Eikozan (C₂₀) u značajnim količinama nađen u svim uzorcima polena. Dokozaan (C₂₂) je bio najzastupljeniji u polenu egipatske deteline sa više od 20% većim sadržajem u odnosu na bilo koji drugi ugljovodonik. U polenu divlje slačice i slatke deteline u značajnim količinama nađen je i oktakozaan (C₂₈) Dotriakontan (C₃₂) je identifikovan u svim uzorcima polena ali u niskim koncentracijama. Kada su u pitanju steroli njihov sadržaj je bio relativno mali u svim uzorcima polena izuzev u polenu kukuruza gde su činili 54,5% ukupnih nesaponifikovanih lipida. Rezultati ovih istraživača se razlikuju od rezultata Farag-a i saradnika koji su našli da polen egipatske deteline sakupljen u delti Nila sadrži znatno manje količine C₂₂, C₂₆, C₂₈ i C₃₂ ugljovodonika a uopšte ne sadrži C₂₀ ugljovodonike.

Jedna od stalno prisutnih grupa lipidnih jedinjenja u polenu su i karotenoidi. Predstavljaju jednu od najčešćih vrsta pigmenata. Prvi put u uzorcima polena su ih identifikovali Bertrand i Poirault, 1892. i njihovo prisustvo u polenu entemofilnih vrsta biljaka je više nego očekivano s obzirom da su važan izvor vitamina A za insekte [Stanley i Linskens, 1974]. Najčešće zastupljeni karotenoidi su α i β -karoten, a osim njih u određenim uzorcima identifikovani su i estri luteina, kriptoksantin, ksantofili i flavoksantini [Karrer i Leumann, 1951]. U uzorcima polena široko rasprostranjenih korova Wittgenstein i Sawicki [1970] su pronašli da se sadržaj karotenoida (izražen kao ekvivalenti β -karotena) kretao u opsegu od 0,05% do 0,08%, izraženo na masu suvog uzorka. Na osnovu ovih saznanja Minuataegui sa svojim timom [Minuataegui *et al.*, 1990] daje pregled sadržaja karotenoida u trideset pet komercijalnih uzoraka polena. Oni su utvrdili da je sadržaj karotenoida bio u širokom opsegu: 0,8 - 315 mg β -karotena na 100 g uzorka. S obzirom da su svi uzorci, manje ili više, bili monofloralni sa dominantno zastupljenim polenom biljke *Cistus ladaniferus* botaničko poreklo se, možda, može isključiti kao uzrok ovih razlika u rezultatima. Pre se može povezati sa razlikama u načinu proizvodnje, skladištenja i čuvanja uzoraka polena. Odsustvo vlage pri tome je od suštinske važnosti za dobro očuvanje kvaliteta uzorka polena mada se

smanjenje sadržaja karotena u nekim uzorcima može povezati i sa neadekvatnim metodama sušenja uzoraka (uglavnom pčelari primenjuju najjednostavnije i prirodno sušenje na suncu i na otvorenom) što dovodi do zagrevanja polena i gubitka karotenoida. Almeida sa saradnicima [Almeida *et al.*, 2005] poredi sadržaj karotenoida u uzorcima polena u zavisnosti od njihovog botaničkog porekla i pri tome je utvrdila da je najniža koncentracija bila u uzorcima polena u kojima je predominantno bio zastupljen polen biljaka iz familije palmi dok su najbogatiji bili poleni biljaka iz rodova senecija i vernonija. Količina karotenoida kretala se od prisustva u tragovima do $489,2 \mu\text{g g}^{-1}$ suvog uzorka.

Day-ova sa svojim kolegama [Day *et al.*, 1990] ispitujući nutritivni sastav uzoraka polena sa Novog Zelanda utvrdila je da su se uzorci polena, u zavisnosti od botaničkog porekla, značajnije razlikovali i po sadržaju lipida. Tako su najniži sadržaj lipida (0,17%) pronašli u uzorcima polena koji su poticali od ženskih cvetova aktinidije dok je najviši sadržaj (13,4%) bio u polenu jastrebove trave. Osim toga, niskim sadržajem lipida odlikovali su se i polen kupine i žutilovke zbog čega autori naglašavaju da bi takvu ispašu trebalo izbegavati jer nedostatak lipida u hrani može izazvati usporen i nepotpun razvoj pčelinjeg društva s obzirom da su steroli, kao deo lipidnih supstanci, važan prekursor za biosintezu hormona koji kod životinja izaziva mitarenje.

Serra-Bonvehí i Jordá [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] u uzorcima španskih polena pronašli su da se ukupan sadržaj lipida kretao oko vrednosti od $5,91 \pm 0,59 \text{ g}/100\text{g}$ suvog uzorka. Kada je bio u pitanju masno-kiselinski sastav najzastupljenije su bile nezasićene C18:1, C18:2 i C18:3 masne kiseline, jer one pokrivaju polenovo zrno u vidu tankog filma kao deo „pollen kitt“ zone. Osim toga, određen je i ukupan sadržaj zasićenih masnih kiselina (ZMK) i nezasićenih masnih kiselina (NMK) kao i vrednost njihovog odnosa (NMK/ZMK). Ovaj odnos je imao vrednost od 1,96 što je ukazivalo na dobar potencijal polena kao dodatka ishrani. Naime, dijetetski propisi predlažu da taj odnos treba da bude oko 1 ili veći od 1 tj. da je poželjno da sadržaj nezasićenih masnih kiselina bude veći od sadržaja zasićenih. Saa-Otero-ova i njeni saradnici [Saa-Otero *et al.*, 2000], u svom radu, iznose podatke o sadržaju masnih kiselina u uzorcima polena iz severozapadnog dela Španije uzetog direktno iz korbikula pčela. Dobijeni rezultati su pokazali da se uzorci mnogo više razlikuju u

kvantitativnom nego u kvalitativnom smislu, jer su u svima identifikovane iste masne kiseline, uz svega nekoliko izuzetaka. Oni su vezani za prisustvo polena pitomog kestena i biljke *Halimium alyssoides* (endemična vrsta sa Iberijskog poluostrva). Naime, u dva uzorka pronađena je kaprilna kiselina (C8:0) dok je u ostalim uzorcima nema. Utvrđeno je i prisustvo pentadekanske kiseline (C15:0) i palmitoleinske kiseline (C16:1). Gadoleinska kiselina (C 20:1) je pronađena samo u dva uzorka i to upravo u onim košnicama koje su se odlikovale visokim sadržajem polena gore navedene dve biljke. Neke masne kiseline [nonanska (C9:0), kaprinska (C10:0), margarinska (C17:0), margaroleinska (C 17:1) i stearinska (C18:0)] nisu pronađene ni u jednom od uzoraka dok su ostale nađene u svim samo u različitim količinama. Laurinska kiselina je nađena u svim uzorcima i u svim vrstama polena sa najvišim sadržajem u polenu biljke *Halimium alyssoides* (1,8%) dok je najniži sadržaj iznosio 1,3%. Tridekanska kiselina (C13:0) je u svim vrstama polena nađena sa udelom manjim od 1% izuzev polena žutilovke gde je zastupljena bila sa čak 4,6%. Verovatno iz tog razloga je u svim košnicama ima sa udelom većim od 3% s obzirom da je u svim košnicama udeo polena žutilovke bio značajan. Miristinska kiselina (C14:0) najveći udeo ima u polenu divlje rotkve (3,1%). Gledano po košnicama, samo u jednoj je njen udeo dostizao 2,5% dok u ostalim nije prelazio 1%. Izopalmitinska kiselina (C16:0 IZO) nađena je u svim košnicama u visokim koncentracijama, ali je zanimljivo da je nema u polenu divlje rotkve. Njeno pojavljivanje u značajnim količinama u svim košnicama može se dovesti u vezu sa polenom biljaka iz roda *Rubus* koji je značajno zastupljen u svim košnicama, a u kojem je nađeno da ima najviše ove masne kiseline. Palmitoleinska kiselina je, i to u niskim količinama, nađena samo u polenu pitomog kestena, eukaliptusa, hrasta lužnjaka i biljaka iz roda *Erica*. Gadoleinska kiselina značajnije je bila zastupljena (4,1%) samo u polenu pitomog kestena. Behenska (C22:0) kiselina je najveću vrednost imala u uzorcima polena divlje rotkve (8,5%) i biljaka iz roda *Rubus* (3,2%), a pronađena je u svim košnicama. Kao što je već naglašeno, sadržaj masnih kiselina u uzorcima i vrstama polena više se razlikovao kvantitativno nego kvalitativno, ali treba napomenuti par izuzetaka:

- ✓ poleni eukaliptusa, pitomog kestena i biljaka iz roda *Erica* imali su sličan profil masnih kiselina kako u kvantitativnom tako i u kvalitativnom smislu

- ✓ polen žutilovke nije sadržavao sledeće masne kiseline: C8:0, C16:1 i C17:1
- ✓ u polenu divlje rotkve nisu identifikovane C16:0 IZO, C8:0, C16:1 i C20:1 masna kiselina
- ✓ polen biljaka iz roda *Rubus* nije sadržavao sledeće masne kiseline: C16:1 i C20:1.

Na osnovu ovoga možemo da visok sadržaj C16:0 IZO masne kiseline u određenim košnicama dovedemo u vezu sa visokim sadržajem polena biljaka iz roda *Rubus* u ovim košnicama. Po sličnom principu nizak sadržaj C13:0 masne kiseline u jednoj košnici možemo dovesti u vezu sa niskim sadržajem polena žutilovke u njoj, jer je jedino u njenom polenu utvrđena značajnija zastupljenost ove masne kiseline. Kada je bila u pitanju eikozanska kiselina ona je u najvećim količinama nađena u uzorcima iz dve košnice što se može dovesti u vezu sa visokim sadržajem polena divljeg kestena u prvoj, odnosno polena biljke *Halimium alyssoides* u drugoj košnici, a obe vrste polena su bile bogate ovom masnom kiselinom. Na kraju, može se izvesti generalni zaključak da nezasićene masne kiseline C18:3, C18:2 i C18:1 dominiraju u polenu iz ovog dela Iberijskog poluostrva.

U uzorcima španskih polena Orzáez-Villanueva sa svojim istraživačkim timom [Orzáez-Villanueva *et al.*, 2002] našla je da se sadržaj ukupnih lipida kretao u opsegu: 3,60 - 8,96 g%. Analizu sadržaja lipidnih supstanci u portugalskim uzorcima polena pčela nalazimo u radu Estevinho-ve sa saradnicima [Estevinho *et al.*, 2012]. Na osnovu njihovih rezultata, koji su se kretali u opsegu od 2,33% do 3,32% lipida, može se reći da su ovi uzorci slični španskim uzorcima, što je bilo i za očekivati s obzirom na slično geografsko i botaničko poreklo. Da je zaista tako potvrđuju i podaci iz rada Nogueira-ove i kolega [Nogueira *et al.*, 2012] koji su u sedam uzoraka polena iz Španije i Portugala našli ujednačen sadržaj lipida, a koji se kretao u opsegu 2,35 - 3,06 g/100g suvog uzorka. Podatke o sadržaju masnih kiselina u uzorcima polena iz Portugala nalazimo i u radu Feás-a i saradnika [Feás *et al.*, 2012]. Oni su identifikovali sedam slobodnih masnih kiselina i to: kaprinsku (C10:0), (C16:0), (C18:1), (C18:2), (C18:3), arahidinsku (C20:0) i (C20:1). Najzastupljenija među njima je bila linolenska kiselina (25,82 – 56,90%) a prate je linolna (5,94 – 24,80%), palmitinska (7,83 – 30,05%), oleinska (4,63 – 20,61%).

Kaprinska, eikozanska i arahidinska kiselina nisu nađene u svim uzorcima a njihove prosečene vrednosti, u uzorcima gde ih ima, su bile 4,68, 0,93 i 0,77%. Osim pojedinačne identifikacije autori su odredili i sadržaj ZMK, NMK, mononezasićenih masnih kiselina (MNMK), polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) kao i odnos PNMK/ZMK. Rezultati su pokazali da je sadržaj NMK bio u opsegu od 55,42 do 88,93% što pokazuje da poleni sadrže daleko više nezasićenih u odnosu na zasićene masne kiseline što je dobra osobina, sa nutritivne tačke gledišta. Osim toga, PNMK/ZMK je uvek bio veći od 1 što je, takođe, poželjno.

Sa druge strane, sadržaj lipida u uzorcima iz Poljske, Kine i Koreje bio je, očekivano, nešto drugačiji [Szczesna, 2006b]. Osim toga, uzrok razlika u određenom sadržaju lipida može biti i različita metodologija rada [Szczesna, 2006a]. Nezavisno od dobijenih rezultata Estevinho-va ističe važnost lipida kao nutritivne komponente polena gde posebno ističe značaj estara masnih kiselina. U tom smislu, u ovom radu, osim ukupnog sadržaja lipida određen je i sadržaj ZMK, mononezasićenih masnih kiselina (MNMK), polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) kao i odnos PNMK/ZMK. U uzorcima je pronađeno sedam različitih masnih kiselina od kojih je u svim uzorcima najzastupljenija bila α -linolenska kiselina (30 - 55,7%). Linolna kiselina je bila druga po zastupljenosti izuzev u jednom uzroku gde je to bila palmitinska kiselina. Ono što se može izvesti kao generalni zaključak je to da su u svim uzorcima znatno više vrednosti za PNMK u odnosu na ZMK i MNMK. Linolenska i linolna kiselina su dve izuzetno važne kiseline za strukturu ćelijskog zida i povezane su sa funkcionisanjem mozga i neurotransmitera. Ove kiseline, takođe, imaju važnu funkciju u prenosu kiseonika do krvi kao i u sintezi hemoglobina [Youdim *et al.*, 2000; Yehuda *et al.*, 2002]. Takođe, ove masne kiseline kao deo ω -6 serije masnih kiselina su važni prekursori nekih leukotriena, tromboksana i prostaglandina koji imaju važnu inflamatornu ulogu u organizmu. Ne treba zaboraviti ni nutritivni značaj ω -3 i ω -6 masnih kiselina [Guil *et al.*, 1996].

Sadržaj masnih kiselina u uzorcima polena iz Kine, sakupljenih iz košnica pčela, prikazan je u radu Yang-a i kolega [Yang *et al.*, 2013]. Njihovi rezultati pokazuju da su najzastupljenije bile C18:3 (25,1%), C16:0 (19,6%), C18:1 (17,3%), C18:2 (8,78%), C22:0 (behenska) (4,07%) i C18:0 (stearinska) (2,96%) kiseline.

Markowicz Bastos-ova sa kolegama [Markowicz Bastos *et al.*, 2004] u uzorcima određenih brazilskih polena identifikovala je sledeće slobodne masne kiseline: C18:1, C18:2 i C20:0. C16:0 je, takođe, bila značajno zastupljena u svim uzorcima (13,5 – 27,8%) osim jednog. Linolenska kiselina je, u značajnijim količinama, nađena u jednom bifloralnom i jednom polifloralnom uzorku polena. Rezultati analize su pokazali da se u kvalitativnom smislu nijedan od uzoraka ne razlikuje, ali se količine pojedinih masnih kiselina po uzorcima značajno razlikuju što može biti posledica razlike u botaničkom poreklu ili uslova proizvodnje, čuvanja i skladištenja uzoraka. Našli su, takođe, da su od ukupnih masnih kiselina od 18,6% do 55,9% činile nezasićene masne kiseline. U tri monofloralna uzorka nađen je visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina (više od 32%), a imali su različito botaničko poreklo. Među bifloralnim uzorcima oni koji su sadržavali polen biljke *Antigonon leptous* odlikovali su se nižim sadržajem nezasićenih masnih kiselina (manje od 20%). Uzorci koji su sadržavali polen biljke eukaliptus ili *Eupatorium* su se odlikovali visokim sadržajem nezasićenih masnih kiselina. Oba polifloralna uzorka koja su sadržavala i polen biljaka iz familije palmi, odlikovali su se visokim sadržajem nezasićenih masnih kiselina. Odnos nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u istraživanju ovih autora je skoro u svim uzorcima bio manji od 1,0 (0,6 – 1,0% u monofloralnim, 0,4 – 0,8% u polifloralnim i 0,3 – 17% u bifloralnim uzorcima). Bastos sa saradnicima [Bastos *et al.*, 2004] je našao da se sadržaj oleinske, linolne, arahidinske i palmitinske kiseline u uzorcima iz Brazila kretao u intervalu od 19% do 56%. Somerwille [Sommerwille, 2005] i Carpes-ova sa svojim timom [Carpes *et al.*, 2009] dobili su, za uzorke iz Australije i Brazila, sličan opseg vrednosti o ukupnom sadržaju lipida. U australijskim uzorcima sadržaj lipida se kretao od 0% do 11,2% koliko je nađeno u lipidno najbogatijem polenu biljke *Hypochoeris radicata* pri čemu je prosečni sadržaj lipida u svih sto sedamedeset dva uzorka bio 2,52%. Sa druge, strane, u brazilskim polenima autori su pronašli da je prosečan sadržaj lipida iznosio $4,86 \pm 0,65$ g/100g suvog uzorka.

Stránský i njegove kolege, Valter-ova i Fiedler [2001] daju detaljan pregled polena zove, kao jedne od najrasprostranjenijih žbunastih biljaka, a iz razloga sve većeg problema ljudi sa njenim polenom kao jakim alergenom. Hromatografskom analizom utvrđeno je prisustvo vrlo kompleksne smeše lipidnih jedinjenja -

alifatičnih ugljovodonika, PAH-ova i skvalena, slobodnih masnih kiselina, slobodnih alkohola i slobodnih sterola i triterpena. Rezultati su pokazali znatno viši sadržaj alkena nego u nekim drugim biljnim materijalima. Sadržaj PAH-ova i skvalena je bio jako nizak što ukazuje da oni najverovatnije potiču od hemijske kontaminacije iz okruženja. Od masnih kiselina utvrđeno je prisustvo kako zasićenih tako i nezasićenih masnih kiselina dužih lanaca (od C₁₄ do C₃₄). Od slobodnih alkohola identifikovani su alkoholi od C₂₀ do C₃₄ sa maksimumom sadržaja kod alkohola C₂₈. Takođe, potvrđeno je i prisustvo α - i β -amirina ((3 β)-Urs-12-en-3-ol i (3 β)-Olean-12-en-3-ol). Od sterola identifikovani su kampesterol, stigmasterol i β -sitosterol.

Sadržaj lipida u polenu aloje, prema Human-ovoj i Nicolson-ovoj [Nicolson i Human, 2006], nije bio previše visok i kretao se u rasponu od 0,8 – 31,7%, ali je i pored toga bio viši u odnosu na prosečnu vrednost sadržaja lipida u polenu eukaliptusa koji se kretao oko 2%. U svežem cvetnom polenu sadržaj je bio viši nego u polenu koji su sakupile ili uskladištile pčele gde je, opet, sadržaj lipida manji u polenu na ulasku u košnicu. Lipidi u polenu su, u svakom slučaju, važan izvor energije za pčele. Masne kiseline za pčele su važne u procesu reprodukcije i razvoja kao i u ishrani. Osim toga, linolna, linolenska, miristinska i laurinska (C12:0) kiselina su bitne za održavanje higijene košnice [Manning, 2001]. Lipidna frakcija u aloji je sadržavala osamnaest masnih kiselina. Prema literaturi [Manning, 2001] glavne masne kiseline u polenu su palmitinska, oleinska i linolna kiselina, dok su u ispitivanom svežem cvetnom polenu rezultati pokazali da najviše ima palmitinske, stearinske, oleinske i gadoleinske kiseline (*cis*-9-eikozanska kiselina, C20:1). One čine 76% (svež polen), 72% (polen sa pčela) i 65% (uskladišten) ukupnih lipida u polenu. Zastupljenost stearinske kiseline opada u pčelinjem i uskladištenom polenu dok, obrnuto, sadržaj gadoleinske kiseline se povećao. Sa druge strane, odnos zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina u tri vrste polena ostaje relativno konstantan. Nicolson-ova i Human-ova [Nicolson i Human, 2013] u uzorcima polena suncokreta u Južnoj Africi pronašle su osam masnih kiselina, a koje su činile polovinu od svih lipida. Najzastupljenije su bile laurinska (C14:0), palmitinska i linolenska. Nije utvrđena nikakva razlika u sadržaju slobodnih masnih kiselina između uzoraka polena koje su sakupile pčele i onih koji

su ručno prikupljeni, osim u slučaju eikozanske kiseline (C20:1), dok je sadržaj oleinske kiseline bio najviši u uzorcima koje su pčele uskladištile u košnici.

II-7e Sadržaj makro- i mikroelemenata u polenu

Polen može značajno da se razlikuje po sadržaju mineralnih materija što zavisi kako od botaničkog tako i od geografskog porekla pre svega kroz uticaj sastava okolnog zemljišta na sadržaj makro- i mikroelemenata [Campos *et al.*, 2008; Orzáez Villanueva *et al.*, 2001]. Određivanje minerala se obično vrši iz pepela koji zaostane nakon spaljivanja uzoraka a u nekim radovima je, upravo, i izražen kao sadržaj pepela bez detaljne pretrage sadržaja makro- i mikroelemenata [Human i Nicolson, 2006]. Prema Somerville-u i Nicol-ovoj [Somerville i Nicol, 2002], do sada su u polenu identifikovani sledeći elementi: K, P, Mg, Ca, Na, S, Fe, Cu, Mn, Zn, Al, Cd, Cr, Pb, Ni, Se i još neki elementi u tragovima. Dozvoljeni sadržaj pepela u polenu, gde je to zakonski regulisano, se razlikuje od zemlje do zemlje i kreće se od 2 g/100g do 6 g/100g suvog uzorka [Campos *et al.*, 2008].

Serra-Bonvehí i Jordá [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997], uz ostale precizne nutritivne parametre polena, su utvrdili da je prosečan sadržaj pepela u uzorcima bio 1,93 g/100g uzorka. Od makroelemenata najzastupljeniji su bili kalijum, fosfor, kalcijum, magnezijum i natrijum. Među ostalim elementima najzastupljeniji su bili Fe (39,2 mg kg⁻¹) i Zn (33,9 mg kg⁻¹). Takođe, uočene su razlike u sadržaju elemenata (osim za P, Ca i Mg) između ručno prikupljenih uzoraka i onih koje su sakupile medonosne pčele. Za većinu polena nije poznat potpuni mineralni sastav, a što je danas veoma bitno kada se teži da se od njega prave različiti suplementi za ishranu insekata (pre svega pčela) i čoveka. Neki poleni su deficitarni u sadržaju kalijuma [House, 1961] dok su u drugima utvrđene povišene koncentracije kalcijuma i natrijuma [Dadd, 1973]. Kalijum i fosfor su od posebnog značaja za normalan razvoj pčela [Dadd, 1973], dok njihove visoke koncentracije kod nekih legla pčela u Nemačkoj su prouzrokovale paralizu odraslih jedinki [Horn, 1985]. Povišen sadržaj nekih mikroelemenata, poput cinka, može biti glavni uzročnik tzv. CCD sindroma („colony collapse disorder syndrome“) koji se manifestuje odlaskom odraslih pčela radilica iz košnice tako da košnica ostaje nezaštićena, samo sa

maticom i leglom [Somerville i Nicol, 2002]. Orzáez-Villanueva sa saradnicima [Orzáez-Villanueva *et al.*, 2001, 2002] navodi da je sadržaj pepela u španskim polenima bio značajno ujednačen i da se kretao na nivou 1,5 g% dok je prosečno najzastupljeniji element bio kalijum ($385,25 \pm 51,48$ mg/100g svežeg uzorka). Slede natrijum ($58,28 \pm 31,52$ mg/100g) i kalcijum ($58,25 \pm 0,52$ mg/100g). Od ostalih makroelemenata najniži sadržaj je imao magnezijum ($43,43 \pm 8,71$ mg/100g svežeg uzorka). Za mikroelemente određeni su sledeći prosečni sadržaji: Fe ($4,01 \pm 1,02$ mg/100g), Zn ($3,66 \pm 1,02$ mg/100g), Mn ($2,49 \pm 0,89$ mg/100g) i Cu ($0,89 \pm 0,11$ mg/100g). Feás i kolege [Feás *et al.*, 2012] u uzorcima portugalskih polena nalaze nešto viši sadržaj pepela (2,9%) u odnosu na španske uzorke. Estevinho-va sa kolegama [Estevinho *et al.*, 2012] u uzorcima portugalskih polena utvrdila je da je sadržaj pepela bio ispod 4% pri čemu su značajne razlike među pojedinim uzorcima objašnjene razlikom u njihovom geografskom poreklu tj. razlikama u sastavu zemljišta na kome su biljke rasle.

Somerville i Nicol-ova [Somerville i Nicol, 2002], takođe, daju podatke o sadržaju minerala u uzorcima polena u Australiji. Utvrđene su značajne razlike u koncentracijama elemenata među uzorcima polena, mada su koncentracije za pojedine elemente kod uzoraka sa zajedničkim botaničkim poreklom bile uglavnom konstantne. U 60 - 70% uzoraka koncentracije Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn i Na su bile ispod očekivanih, dok je približno isti broj uzoraka imao povišene ili snižene koncentracije P, S i Zn. Najviše koncentracije bakra i mangana u odnosu na trideset četiri druge biljne vrste nađene su kod polena biljke *Corymbia maculata*. Tako je npr. koncentracija bakra u polenu ove biljke bila za 26% viša u odnosu na koncentraciju kod sledeće po redu biljne vrste – *Eucalyptus punctata*. Sa druge strane u polenu ove biljke pronađene su najviše koncentracije za Fe (520 mg kg⁻¹) koje su za 271% bile više u odnosu na koncentraciju (140 mg kg⁻¹) kod polena biljaka - *Eucalyptus albens* i *Echium plantagineum*. U polenu ove druge biljke su pronađene najviše koncentracije za fosfor i sumpor. U uzorcima polena repice pronađene su povišene koncentracije za Mg i Ca kao i niska koncentracija gvožđa. Polen biljke lažni maslačak (*Hypochoeris radicata*) je sadržavao najniže koncentracije za sledećih šest elemenata: Fe, K, Mg, P, S i Zn. Najviša koncentracija za Na ($290 - 480$ mg kg⁻¹) pronađena je u polenima sledeće tri vrste: *Banksia*

ericifolia, *Casuarina littoralis*, *Eucalyptus punctata*. Kako su ove tri biljke sa područja Šolhejvena (Shoalhaven) u Novom Južnom Velsu koje je priobalno područje sa drenažom zemljišta evidentno je da ovo isušivanje tla ima uticaja na povišene koncentracije natrijuma u polenu biljaka. Korelaciona analiza je pokazala da se lažni maslačak i repica veoma lako mogu identifikovati i razlikovati od ostalih biljaka pomoću sadržaja Na i Ca koji se razlikuju od ostalih osam elemenata. Značajno jake pozitivne korelacije nađene su i za Mn i Cu (0,910), P i S (0,905), K i S (0,851) i K i Zn (0,823). Dobijeni rezultati jasno pokazuju visok stepen variranja koncentracija elemenata u uzorcima. Dominantno su bili zastupljeni makroelementi poput kalijuma, fosfora i sumpora, a pratili su ih elementi - kalcijum, magnezijum, natrijum, bakar, gvožđe, mangan i cink. Od svih vrsta ubedljivo najviša koncentracija kalijuma (38000 mg kg⁻¹) nađena je kod biljke *Asphodelus fistulosus* (rod čapljan, *Asphodelus*).

Szczęśna [2007] u svom radu daje pregled sadržaja makro- i mikroelemenata u polenu različitog geografskog porekla. Dobijeni rezultati su pokazali da od ukupnih elemenata najzastupljeniji su bili K (59%), Mg (18%), Na (12%) i Ca (8%), dok je sadržaj Fe, Mn, Zn, Cu bio na nivou od 3%. S obzirom na visok sadržaj nekih od elemenata koji su važni za ljudsku ishranu zaključak autora je bio da se polen može i treba koristiti kao dodatak ishrani kod ljudi. I Nogueira-ova sa svojim kolegama [Nogueira *et al.*, 2012], ispitujući polene različitog geografskog porekla, nalazi da se sadržaj pepela u njima kretao od 0,5 do 3,16 g/100g svežeg uzorka..

Stanciu sa saradnicima [Stanciu *et al.*, 2011] daje pregled sadržaja makro- i mikroelemenata u uzorcima polena suncokreta i šumske vrbe koji su prikupljeni ručno, odnosno koje su prikupile medonosne pčele. Kod polena obe biljne vrste uočene su razlike i specifičnosti u sadržaju mineralnih elemenata. Najviši sadržaj je utvrđen za kalijum, kako u biljnom tako i u pčelinjem polenu, s tim što je sadržaj bio znatno viši u biljnom nego u pčelinjem polenu. Njega prate kalcijum i magnezijum. Sadržaj gvožđa i cinka je bio niži, ali je opet zadržan odnos njihove veće količine u biljnom nego u pčelinjem polenu. Velike varijacije u sadržaju elemenata su uočene za sve elemente, izuzev za cink, u svim uzorcima.

Human-ova i Nicolson-ova [Human i Nicolson, 2006] daju podatak da je u polenu pegave aloje sadržaj pepela bio u opsegu od 1 do 6,4% pri čemu i one potvrđuju da je sadržaj pepela bio veći u svežem cvetnom polenu.

U radu Carpes-ove i kolega [Carpes *et al.*, 2009] nalazimo podatke o sadržaju Fe, Ca, Zn, K, Na, Mg i Mn u uzorcima brazilskih polena. Oni su utvrdili da je najzastupljeniji bio fosfor ($6923,63 \pm 872,53 \text{ mg kg}^{-1}$), a zatim slede kalijum ($5116,76 \pm 528,89 \text{ mg kg}^{-1}$), kalcijum ($1031,98 \pm 377,51 \text{ mg kg}^{-1}$) i magnezijum ($754,64 \pm 184,17 \text{ mg kg}^{-1}$). Tukey-ev test je pokazao da ne postoje statistički značajne razlike u sadržaju Ca, Fe, Cu, P, Mg, Mn i Na u ispitivanim uzorcima. Morgano sa svojim timom [Morgano *et al.*, 2012] daje vrlo detaljan pregled mineralnog sastava uzoraka polena iz različitih delova Brazila. Pri tome su utvrdili da su najzastupljeniji elementi K (37%), P (36%), Ca (16%) i Mg (9%), dok su od mikroelemenata odredili sadržaje Na (0,63%), Fe (0,60%), Mn (0,47%), Zn (0,34%), Cu (0,07%) i Se (0,04%).

Prema Yang-u i saradnicima [Yang *et al.*, 2013] sadržaj pepela u kineskim polenima se kretao u opsegu od 1,70 do 5,01%. Kada je bio u pitanju sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog uzorka) utvrdili su da on opada u sledećem nizu: P (5946), K (5324), Ca (2068), Mg (1449), Na (483,4), Al (129,3), Fe (119,3), Mn (70,23), Zn (45,10) i Cu (17,35). Sadržaj najvažnijih makroelemenata poput K, Ca, Mg, Fe, Zn i Mn bio je viši nego što je otkriveno u španskom [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] ili australijskom polenu [Somerville i Nicol, 2002] posebno kod Ca i Mg. Sadržaj štetnih toksičnih metala poput Cd, Hg i Pb je bio ili ispod granice detekcije (Cd i Hg) ili je u nekim uzorcima identifikovano Pb u nešto većim koncentracijama koje su kao standardnu vrednost predložile Campos i saradnici [Campos *et al.*, 2008] i to: za Cd $\leq 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, za Pb $\leq 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$, za As $\leq 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ i za Hg $\leq 0,03 \text{ mg kg}^{-1}$. Ono što je zanimljivo jeste da svi uzorci imaju sadržaj aluminijuma preko 100 mg kg^{-1} što je slično rezultatima koje je dobio Morgano sa saradnicima [Morgano *et al.*, 2010]. Od ostalih elemenata, u polenu iz jugoistočnog Brazila, Morgano sa kolegama daje sledeće podatke (mg kg^{-1}): As (0,01 - 1,38), Ba (2,78 - 17,63), Cd (0,003 - 0,233), Co (0,01 - 1,11), Cr (0,01 - 2,32), Ni (0,1 - 1,13), Pb (0,01 - 0,44), Sb (0,035 - 1,33) i Hg (0,0004 - 0,0068).

II-7f Sadržaj fenola, vitamina i određivanje antioksidativne aktivnosti polena

Proces oksidacije u živim sistemima podrazumeva transfer elektrona sa molekula na oksidujuće sredstvo. Antioksidansi su molekuli koji imaju sposobnost da spreče ili uspore ovaj proces tj da uspore oksidaciju biološki važnih molekula u

ćelijama. Oksidacione reakcije stvaraju slobodne radikale koji započinju nepoželjne lančane reakcije u ćeliji dovodeći do njenog oštećenja. Antioksidansi u ćeliji će, ili hemijskim putem neutralisati nastale slobodne radikale i intermedijere koji nastaju od njih tako što izreaguju sa njima i prevedu ih u stabilan oblik sa parnim brojem elektrona, ili će inhibirati odigravanje daljih oksidacionih reakcija tako što će se sami oksidovati [Campos *et al.*, 2010]. Teorija o radikalima u fiziologiji čoveka tvrdi da skoro svi procesi oštećenja, starenja i odumiranja ćelija uključuju slobodne radikale. Oksidativni stres organizma dovodi do pojave i razvoja mnogih hroničnih i degenerativnih bolesti poput kancera, autoimunih bolesti, reumatoidnog artritisa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja i starenja [Valko *et al.*, 2006, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008]. Kada je u pitanju hrana antioksidativnost se obično povezuje sa aktivnošću različitih enzima (superoksid-dizmutaza, peroksidaze i katalaze), dok od hemijskih jedinjenja najveću antioksidativnu moć pokazuju jedinjenja iz grupe karotenoida, fenola, tokoferola i vitamin C [Larson, 1988; Bartosz, 1997]. U biljkama, a pre svega voću i povrću, najveći deo antioksidativnih sposobnosti potiče od različitih fenolnih jedinjenja. Njihova sposobnost da neutrališu slobodne radikale tesno je povezana sa njihovom strukturom tj. konjugovanim dvostrukim vezama i velikim brojem OH-grupa vezanih za aromatične prstenove [Leja *et al.*, 2007].

Antioksidativnost polena je usko povezana sa njegovim botaničkim poreklom, dok nije utvrđena njena povezanost sa geografskim poreklom [Märghitas *et al.*, 2009, Almaraz-Abarca *et al.*, 2004; Leja *et al.*, 2007]. Osnovni nosioci antioksidativne funkcije u polenu su različita jedinjenja fenolnog tipa među kojima se posebno ističu flavonoidna jedinjenja. Ona mogu biti prisutna u biljkama u značajnim količinama (0,5 - 1,5%) [Jovanovic *et al.*, 1994]. Ispitivanje flavonoida koji su bili radiohemijski obeleženi pokazalo je da je najveći deo unetih flavonoida (44,2 %) prisutan u gastrointestinalnom traktu pre nego što se izluče putem žuči. Zbog toga je logično pretpostaviti da se glavna aktivnost flavonoida kao antioksidanata odigra tokom intenzivnih oksidativnih procesa pri varenju. Kiselo-bazna i redoks svojstva flavonoida čine ih pogodnim biohemijskim antioksidansima. Zbog njihove relativno niske pK_a vrednosti (4 - 5) radikali dobijeni iz 3',4'-dihidroksiflavonoida biće negativno naelektrisani na $pH = 7$, što značajno umanjuje reaktivnost i

olakšava im prolaz kroz negativno naelektrisani dvostruki sloj fosfolipida u ćelijskoj membrani [Jovanovic *et al.*, 1994].

U radu Strohl-ove i Seikel-ove nalazimo jednu od prvih detaljnih pretraga o sadržaju polifenola u polenu bora [Strohl i Seikel, 1965]. One su, takođe, izvršile identifikaciju jedinjenja fenolnog tipa u različitim vrstama polena:

- ✓ flavonon sa manje od 5 OH-grupa (žuti bor, *Pinus ponderosa*)
- ✓ izoramnetin i kvercetin (japanski crveni bor (*Pinus densiflora*) i crni bor, *Pinus thunbergii*)
- ✓ naringenin (mimoza)
- ✓ kampferol, robinetin, morin i miricetin (različite biljne vrste).

Svi su pronađeni u vidu glikozida. U plavom polenu šumarice (*Anemone nemorosa*) pronađena su četiri antocijanina, dok je hidrokofeinska kiselina pronađena u polenu lisičijeg repa (*Lycopodium clavatum*), a hlorogena u polenu forsitiije (*Forsythia intermedia*). Više estara različitih fenolnih kiselina (*p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarinska, ferulinska i kofeinska) sa glukozom je pronađeno u polenu petunije (*Petunia hybrida*), dok je polen ginkoa (*Ginkgo biloba*) obilovao kininskom i šikiminskom kiselinom. Na osnovu njihovih rezultata (pri čemu su identifikovale više od pedeset fenolnih jedinjenja) spisku ovih jedinjenja, koja se mogu naći u polenu, mogu se dodati: vanilin, *cis* i *trans*-kumarinska kiselina, galna kiselina, *cis* i *trans*-ferulinska kiselina, auron, dihidrokampferol, dihidrokvercetin, elaginska kiselina, kao i različiti estri alkohola sa kumarinskom i srodnim kiselinama. U radu Campos-eve sa saradnicima [Campos *et al.*, 1997] nalazimo podatke na osnovu kojih ona tvrdi da se monofloralni poleni koje su sakupile medonosne pčele mogu čak identifikovati na osnovu sadržaja flavonoida i fenola u njima poređenjem sa floralnim polenom. Naime, sadržaj fenola u svakom tipu polena je bio poprilično konzistentan. Serra-Bonvehí sa kolegama [Serra-Bonvehí *et al.*, 2001], u uzorcima španskih polena, utvrdio je ukupni sadržaj polifenola (prosečna vrednost $1,24 \pm 0,2$ g/100g uzorka) i flavonoida (prosečna vrednost je bila $0,51 \pm 0,16$ g/100g uzorka). Za 64% uzoraka je utvrđeno da sadrže minimalne količine polifenola, ali ne ispod $1,20$ g/100g uzorka, dok se deo flavonoida nalazio u obliku glikozida, a deo se (pod dejstvom α i β -glikozidaze iz pčelinje pljuvačke) nalazio

u aglikonskom obliku. Njihov prosečan sadržaj je iznosio $65,05 \pm 14,20$ mg/100g uzorka, a najzastupljeniji je bio rutin (prosečni sadržaj $29 \pm 7,98$ mg/100g uzorka).

U fitohemijskoj analizi flavonoidnih ekstrakata, zbog složenosti smeše, jako je teško izvršiti njihovu pojedinačnu izolaciju i karakterizaciju pre nego što se uradi njihova identifikacija [Ferrerres *et al.*, 2010]. Analiza uzoraka pomoću tečne hromatografije sa masenim detektorom (HPLC/MS) omogućava potpunu karakterizaciju ovih jedinjenja, a bez njihovog prethodnog izolovanja i prečišćavanja. Šta više ova metoda se pokazala kao jako dobra kada se oskudeva sa materijalom iz koga bi bilo moguće izvršiti izolovanje i prečišćavanje ovih jedinjenja za njihovu dalju analizu, posebno kada je u pitanju ispitivanje nekih važnih metabolita ili za ispitivanje izomera. Rezultati njihove analize polena koji je poticao od biljke iz roda lisičina (*Echium plantagineum*) pokazali su da su svi flavonoidi bili u glikozidnoj formi sa najzastupljenijim kampferol-3-*O*-neohesperozidom. Od ostalih identifikovani su: kvercetin-3-*O*-soforozid, kvercetin-3-*O*-neohesperozid, kampferol-3-*O*-glukozid, kampferol-3-*O*-rutinozid. Di Paola-Naranjo sa saradnicima [Di Paola-Naranjo *et al.*, 2004] je izvršio ispitivanje sadržaja antocijana u uzorcima polena biljke *Echium plantagineum*. Pri tome su utvrdili da su antocijani uglavnom bili prisutni u formi glikozida sa šećerima (identifikovane su glukoza, rutinoza i ramnoza), pri čemu su šećeri bili glikolizovani u položaju C3 na antocijanima. Ukupni sadržaj antocijana kretao se u rasponu od 45 mg/100g do 80 mg/100g sirovog uzorka, a od pojedinačnih jedinjenja identifikovani su delfinidin, cijanidin, petunidin. Glavni antocijanski pigment u svim uzorcima je bio petunidin-3-rutinozid. Glikozide flavonoida, koji mogu biti veoma raznovrsni, kao i način vezivanja između šećera i flavonoida ispitivali su u svom radu Ferrerres i saradnici [Ferrerres *et al.*, 2004]. U tu svrhu koristili su kombinaciju tečne hromatografije (LC), masene spektrometrije (MS) i elektronsprej jonizacije (ESI). Analiza omogućava ispitivanje tri vrste flavonoida – soforozida, gentiobiozida i X,Y-diglukozida bez njihove prethodnog razdvajanja i prečišćavanja. Važnu ulogu u identifikaciji i karakterizaciji (1→2) i (1→6) interglikozidnih veza imaju molekularni joni m/z 162 i 180. Za prvi ova dva jona su veoma zastupljena, dok u ostala dva slučaja njihova zastupljenost je jako niska. X,Y-*O*-diglukozid može biti razlikovan od *O*-diglukozida prisustvom prvog, a

odsustvom drugog gorenavedenog molekuskog jona. Kod X-soforozid-Y-glukozid flavonoida, koji ima tri vezane glukoze, m/z 162 je jedini pik dobijen u MS/MS analizi. Za flavonoid sa četiri vezane glukoze (X-soforotriozid-Y-glukozid i X-soforozid-Y-soforozid) na osnovu MS/MS analize utvrđeno je da je došlo do odvajanja šećera vezanog u položaju C7. Sa druge strane, Campos-eva sa saradnicima [Campos *et al.*, 2003] u svojim ispitivanim uzorcima polena pronašla je glikozide kvercetina, kampferola, herbacetina i izoramnetina. U nekim od uzoraka pronađene su i značajnije količine aglikona flavonoida kao i nekih drugih fenolnih jedinjenja. Ispitivanjem je, takođe, utvrđeno da je antioksidativna moć uzoraka opadala sa vremenom i to veoma izraženo u prvoj godini stajanja (u nekim uzorcima opala je i do 50%). Ukupni vremenski period u kome su praćene promene u antioksidativnim sposobnostima polena je bio četiri godine. Osim uticaja fenolnih jedinjenja ispitan je uticaj i drugih frakcija koje su izolovane iz polena. Utvrđeno je da je lipidna frakcija (koja je predstavljala čak 48% ukupnog polena) bila potpuno inaktivna u smislu antioksidativnosti. I proteinska i šećerna frakcija, takođe, nisu imale preteranog uticaja na antioksidativnu moć polena što je potvrdilo značaj fenolnih jedinjenja u polenima. LeBlanc sa kolegama [LeBlanc *et al.*, 2009] naglašava važnost fenolnih jedinjenja i vitamina kao antioksidanasa u zaštiti polenovog zrna od štetnog dejstva spoljašnjih faktora, a pre svega UV-zračenja. U prilog tome navode činjenicu da planinske biljke, koje su zbog više nadmorske visine u većoj meri izložene dejstvu UV-zraka, u polenu sadrže veću količinu epoksi-karotenoida i ksantofila i da sa porastom nadmorske visine njihova količina raste. Takođe, utvrđeno je da je profil flavonoidnih jedinjenja u egzini polena drugačiji u odnosu na intinu i da je u spoljašnjem sloju povećano prisustvo aromatičnih kiselina poput *p*-hidroksibenzoeve, *p*-kumarinske, galne, ferulinske i vanilinske. Ispitivanjem antioksidativne moći pojedinih vrsta polena oni su utvrdili da polen mimoze sadrži najveći procenat polifenolnih supstanci (najzastupljeniji je bio naringenin) i, u skladu sa time, je pokazao veću antioksidativnu moć u odnosu na polene koji su poticali od ostalih biljnih vrsta (meskito drvo, terpentinsko žbunje i *Chenopod*). Utvrđena je i direktna veza između broja OH-grupa u polifenolnim jedinjenjima sa njihovom sposobnošću "hvatanja" i neutralizacije slobodnih radikala. Od ostalih identifikovanih jedinjenja u svim uzorcima polena

nađen je glikozid naringenin-4,5-dihidroksi-7-metoksiflavanon. U polenu palme identifikovani su i 2,6-dihidroksi-6-metilbenzaldehyd i 2-formiloksi-1-feniletanon, dok je u polenu mimoze nađen i alkaloid karnegin. U polenu *Chenopod*-a nađeni su i estri linolne kiseline. Autori naglašavaju da je važan i period godine kada se uzorci sakupljaju. Tako je polen palme bio sa najmanjim sadržajem fenolnih jedinjenja vrlo verovatno zbog toga što je sakupljen u novembru kada je UV-zračenje najmanje pa biljka ima najmanju potrebu za biosintezom ovih jedinjenja.

Almaraz-Abarca sa kolegama [Almaraz-Abarca *et al.*, 2004] je utvrdila direktnu vezu između sadržaja flavonoida u uzorcima polena sa njegovom antioksidativnom moći. Kada su bile u pitanju pojedinačne vrste polena najnižu sposobnost „hvatanja“ radikala imao je polen glatkog štira, umerenu moć pokazali su poleni kukuruza i ljutića, dok su se kao najbolji antioksidansi pokazali poleni štira i nevena. Iako su svi bili dobri antioksidansi ipak su dobijene vrednosti niže od onih koje pokazuju neka jedinjenja koja se koriste kao standardi za to poput kofeinske kiseline, kvercetina i askorbinske kiseline. Isti autori analizirali su i uzorke polena Meskito drveta koje su sakupile medonosne pčele. Rezultati su pokazali da polen ima veoma visoku moć suzbijanja procesa lipidne peroksidacije [Almaraz-Abarca *et al.*, 2007] čak višu od čistog kvercetina. Autori posebno naglašavaju značaj fenolnih jedinjenja sa reaktivnim OH-grupa u položajima 3' i 4' u B-prstenu flavonoida. Proces lipidne peroksidacije podrazumeva oksidativnu degradaciju lipida koja se odigrava zahvaljujući tome što slobodni radikali uzimaju elektron od lipida u ćelijskoj membrani što dovodi do oštećenja same ćelije. Ovaj proces je karakterističan pre svega za nezasićene masne kiseline zbog njihovih dvostrukih veza između kojih se nalazi reaktivna metilenska grupa.

Leja sa saradnicima [Leja *et al.*, 2007] utvrdio je da se ukupna antioksidativnost (TAA) polena kretala u intervalu od 7% (kukuruz) do vrednosti između 60 - 90% (bela slačica, maslačak, kruška, jabuka, divlji kesten, facelija, bagrem). Umerenu antioksidativnu moć (27 - 55%) pokazali su uzorci polena vrbice (*Chamerion angustifolium*), detelina i biljaka *Lupinus polyphyllus* i *Lamium purpureum*. Uzorci polena su se značajno razlikovali i po vrednosti aktivnosti skupljanja („hvatanja“) radikala (RSA, radical-scavenging activity). U tom smislu svi uzorci su mogli da se podele u tri grupe:

- ✓ uzorci polena sa visokom sposobnošću neutralizacije DPPH [di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)-iminoazanijum] radikala koja se kretala od 61% do 91,3% i to su bili poleni biljaka *L. polyphyllus*, facelije, detelina, bele slačice, bagrema i divljeg kestena
- ✓ uzorci polena sa srednjom RSA-vrednošću (23,5 - 29,6%)- kukuruza, vrbice i kruške
- ✓ uzorci polena biljaka sa niskom RSA-vrednošću (8,6 - 16%) - *L. purpureum*, maslačka i jabuke.

I po pitanju ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja poleni su se znatno razlikovali. Tako je utvrđeno da poleni kruške i kukuruza imaju najvišu, odnosno najnižu koncentraciju ovih jedinjenja od svih ispitivanih polena. Slično tome najviše fenilpropanoida je nađeno u polenu kruške i biljke *P. Tanacetifolia*, dok je najniža koncentracija ponovo bila u polenu kukuruza. Udeo fenilpropanoida u ukupnim fenolnim jedinjenjima za sve polene je bio približno isti (oko 25 %) izuzev polena bele slačice (38,3%). Sadržaj flavonola je pokazao veliku raznolikost i kretao se od 170 mg/100g kod biljke *L. purpureum* do 1349 mg/100g kod polena kruške. I udeo flavonola u ukupnim fenolnim jedinjenjima znatno je varirao i kretao se od 4,78% kod *L. purpureum* do 37,3% kod vrbice. Sadržaj antocijana je bio relativno nizak u poređenju sa sadržajem ostalih fenolnih jedinjenja. Kretao se od 92 mg/100g kod polena detelina i kukuruza do 327 mg/100g kod polena biljke *P. tanacetifolia*. Udeo antocijana u ukupnim fenolima varirao je od 3% (*L. purpureum*) do 13% (deteline).

Za razliku od većine autora koji su utvrdili direktnu vezu između sadržaja fenola i antioksidativne sposobnosti polena Mārghitas sa svojim timom [Mārghitas *et al.*, 2009] nije utvrdila tu vezu. Sadržaj fenola u uzorcima polena koje si ispitivali se kretao od 16,4 mg g⁻¹ ekvivalenta galne kiseline (GAE) u polenu vrbe do 4,4 mg g⁻¹ GAE u polenu biljke *Knautia arvensis* L. Najvišu antioksidativnost imali su poleni suncokreta i kamilice (5335 mmol Fe²⁺ na g uzorka), a najnižu polen biljke *Knautia arvensis* L. (0,255 mmol Fe²⁺ na g uzorka). Uzrok neslaganju ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne sposobnosti je bio sadržaj fenola u uzorcima biljaka suncokreta, maslačka i *Onobrychis viciifolia* scop. Ova odstupanja su bila u skladu sa rezultatima koje je dobio Leja sa saradnicima [Leja *et al.*, 2007]. Sa druge

strane, sadržaj ukupnih flavonoida (13,6 mg g⁻¹ ekvivalenta kvercetina (QE) u polenu vrbe do 0,6 mg g⁻¹ QE u polenu bora) se podudara sa antioksidativnom moći i bio je u direktnoj vezi sa strukturom flavonoida, tačnije, sa položajem OH-grupa vezanih za aromatične prstenove. Moguće je da i određena nefenolna jedinjenja doprinose antioksidativnim moćima polena.

U uzorcima polena (dominantno zastupljeni poleni mimoze i iz familija boba) koje su sakupile solitarne pčele na području severoistočnog Brazila [Sarmiento Silva *et al.*, 2006] utvrđeno je prisustvo sledećih flavonoida: tricetina, selagina (prvi rad u kome je utvrđeno njegovo prisustvo u polenu), metoksiherbacetina, naringenina, izoramnetina. Uzorci su, takođe, pokazali visoku antioksidativnu moć i to posebno kada je, umesto, etanola i vode, kao ekstrakciono sredstvo korišćen etil-acetat. Carpes-ova sa kolegama [Carpes *et al.*, 2009] pri analizi brazilskih polena utvrdila je veliku raznovrsnost u smislu sadržaja fenola (19,28 - 48,90 mg g⁻¹ GAE) i flavonoida (2,10 - 28,33 mg g⁻¹ polena). Antioksidativna aktivnost je, u svakom od uzoraka, imala svoje specifične vrednosti koji su imale veze sa njegovim genetičkim i botaničkim poreklom.

Morais sa svojim saradnicima [Morais *et al.*, 2011] u analizi portugalskih polena, još jednom, potvrđuje tezu da su glavni uzročnik antioksidativnih sposobnosti polena različita fenolna jedinjenja i flavonoidi iako nisu pronašli direktnu korelaciju. Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja se kretao u opsegu: 10,5 - 16,8 mg g⁻¹ GEA. Njihovi rezultati su bili slični rezultatima Campos-ove i saradnika [Campos *et al.*, 2003]. Osim fenolnih jedinjenja u aktivnosti učestvuju i vitamini i proteini. Na osnovu rezultata lipidne peroksidacije pomoću β-karotena utvrđene su značajne razlike među pojedinačnim uzorcima. Feás sa kolegama [Feás *et al.*, 2012], ispitujući uzorke polena iz Portugala, utvrdio je prisustvo fenola (12,9 - 19,8 mg g⁻¹ GEA) i flavonoida (4,5 - 7,1 mg g⁻¹ ekvivalenta katehina) kao glavne bioaktivne komponente. Rezultati su pokazali pozitivnu korelaciju između sadržaja ovih jedinjenja sa antioksidativnim sposobnostima polena.

Kroyer i Hegedus [Kroyer i Hegedus, 2001] prikazali su nov način određivanja antioksidativnosti polena tako što osim u nativnom polenu, vrše ispitivanje i ekstrakata (etanolnog, metanolnog i vodenog). Ukupni sadržaj polifenola, koji je određen u polenu se kretao u opsegu 7,4 - 9,7 mg g⁻¹ GEA dok je u ekstraktima bio

znatno povišen – 24,67 mg g⁻¹ GEA u etanolnom, 21,77 mg g⁻¹ GEA u metanolnom i 21,47 mg g⁻¹ GEA u vodenom ekstraktu. U istom smislu uočeno je i povećanje same antioksidativnosti u ekstraktima u odnosu na kompletan uzorak polena. Na sličan način, Rzepecka-Stojko-va sa kolegama [Rzepecka-Stojko *et al.*, 2012a] je određivala antioksidativnu moć sledećih ekstrakata polena: etanolnog ekstrakta (EEP), enzimskog hidrolizata polena (PEP) i ekstrakta polena koji je podvrgnut digestiji pepsinom (EPP). Rezultati dobijeni pomoću EPR-spektroskopije pokazali su sledeći opadajući niz antioksidativnosti: EPP > EEP > PEP. Na osnovu dobijenih vrednosti autori zaključuju da se polen može koristiti kao dobar dijetetski suplement. U svom drugom radu [Rzepecka-Stojko *et al.*, 2012b] su pratili uticaj skladištenja polena na sadržaj polifenola u njemu. Utvrdili su da je prosečan sadržaj iznosio 11,3 mg g⁻¹ GEA. Nakon dvanaest meseci ponovo je utvrđen sadržaj polifenola u uzorcima i ustanovljeno je da je on najviše opao (na 57,7% od početne vrednosti u ekstraktima) u uzorcima koji su čuvani na sobnoj temperaturi i nezaštićeni od svetlosti. U uzorcima koji su čuvani na svetlosti sadržaj polifenola se održao na 63,1% od početne vrednosti. Ako su uzorci bili čuvani i na sniženoj temperaturi očuvano je 80% ukupnih fenola u polenu. U PEP uzorcima prosečan sadržaj polifenola je iznosio 14,95 mg g⁻¹ GEA i u njima je, takođe, najveće opadanje uočeno za uzorke koji su čuvani na svetlu i sobnoj temperaturi (do 58,9% početne vrednosti) dok su, ponovo, se najboljim pokazali uzorci čuvani u mraku i na sniženoj temperaturi (očuvano je 80,9% fenolnih jedinjenja). Najbolji rezultati su dobijeni kod EPP uzoraka pri čemu je u njima početna količina fenola iznosila čak 39,95 mg g⁻¹ GEA, dok su vrednosti nakon godinu dana skladištenja znatno manje opale i to na 78,3% (svetlo i sobna temperatura), 86,5% (mrak i sobna temperatura), odnosno 92,1% (mrak i snižena temperatura).

U radu Smirnovе i saradnika [Smirnova *et al.*, 2012] nalazimo zanimljiv osvrt na ulogu egzinske membrane polena u njegovoj antioksidativnoj moći. Kao što je u uvodnom delu rečeno, njena glavna komponenta je složeni polimerni sporopolenin čija struktura još uvek nije do kraja razjašnjena, a u koju su inkorporirani strukturni proteini [Meichik *et al.*, 2006] kao i fenolne kiseline (poput hidroksicimetne i ferulinske) [de Leeuw *et al.*, 2006] odgovorne za apsorpciju UV-zraka [Rozema *et al.*, 2001; Atkin *et al.*, 2011]. Na osnovu pretpostavke da ova jedinjenja zadržavaju

svoja antioksidativna svojstva i kada se ugrade u složeni polimerni matriks sporopolenina, autori su utvrdili da je moguće neutralisati određene vrste slobodnih radikala i vodonik-peroksida čime su ovu tezu potvrdili.

Kada je bio u pitanju sadržaj vitamina u polenima među prve radove koji donose takve podatke, svakako, spada rad Loper-a i saradnika [Loper *et al.*, 1980]. Oni su u uzorcima korbikularnog polena pronašli 20,6 mg/100g vitamina C, 0,76 mg/100g pantotenske kiseline i 0,61 mg/100g piridoksina. Sa druge strane, uzorci ručno prikupljenog polena su bili znatno bogatiji u sadržaju vitamina pa je u njima pronađeno 3,38 mg/100g pantotenske kiseline, 8,05 mg/100g niacina, 228 mg/100g inozitola i 0,91 mg/100g piridoksina. I u jednim i u drugim uzorcima količina vitamina je sa vremenom opadala. Sličnu promenu u sadržaju vitamina nalazimo i u radu Pereira de Melo-ve i de Almeida-Muradian-ove [Pereira de Melo i de Almeida-Muradian, 2010]. One daju podatke o sadržaju vitamina C, E, ukupnih karotenoida i β -karotena u šest serija brazilskih uzoraka polena. Rezultati za vitamin C su pokazali da je njegov sadržaj u svežim uzorcima tj. uzorcima sa najvećim sadržajem vlage bio smanjen što bi moglo biti uzrokovano činjenicom da je askorbinska kiselina podložna razgradnji u vodenom okruženju tj. u rastvoru. Koncentracija vitamina E u suvim uzorcima je, sa druge strane, bila niža za oko 18% nego u svežim uzorcima, što znači da sam proces sušenja utiče na njegovu razgradnju. Slično smanjenje, od 13%, odnosno 16%, dobijeno je za ukupne karotenoide i za β -karoten. To znači da su i ova jedinjenja osetljiva na povišenu temperaturu i da se delimično razgrađuju pri datim uslovima. Ispitivanja su ponovljena i nakon šest tj. dvanaest meseci od trenutka skladištenja. Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi, u svetlu, u mraku i u frižideru na sniženoj temperaturi. Pokazalo se da je koncentracija vitamina C u uzorcima koji su čuvani na sobnoj temperaturi opala za 50% u odnosu na sveže uzorke. Međutim, značajnije razlike u sadržaju vitamina C između uzoraka starih šest i dvanaest meseci nema, što znači da se najveći deo vitamina C razgradio u prvom periodu od trenutka skladištenja, da taj proces nije linearan i da se posle određenog vremena količina vitamina C ustaljuje. U uzorcima koji su držani na sniženoj temperaturi opadanje količine vitamina C je bilo dvostruko manje i kretalo se u vrednosti oko 22% nakon 6, tj. 26% nakon 12 meseci. To ukazuje na činjenicu da je vitamin C na

nižoj temperaturi nešto stabilniji i da je njegova razgradnja, samim time, usporena. Kada je u pitanju sadržaj vitamina E rezultati su pokazali da se njegov sadržaj značajnije ne menja pri skladištenju pri bilo kojim uslovima. Smanjenje količine ovog vitamina u uzorcima nije prelazilo 18% kod uzoraka koji su čuvani na sobnoj temperaturi i na svetlu. S obzirom da su vitamini najbolje očuvani u uzorcima polena koji su skladišteni na sniženoj temperaturi, autori predlažu takve uslove čuvanja kao standardne. Sadržaj β -karotena se približno podjednako smanjivao u uzorcima koji su čuvani na sobnoj temperaturi bilo uz dejstvo svetlosti bilo zaštićeni od nje. Količina razgrađenog β -karotena je varirala u zavisnosti od uzorka i kretala se od 40 – 90% posle šest tj. 60 – 75% posle dvanaest meseci. Ako su uzorci čuvani na sniženoj temperaturi smanjenje sadržaja β -karotena je bilo drastično niže (do 12%), što opet ukazuje na činjenicu da uzorke treba čuvati na sniženoj temperaturi.

Na osnovu svih ranijih istraživanja Campos-eva sa saradnicima [Campos *et al.*, 2008] daje predlog o količini vitamina koji treba da budu prisutni u polenu (**Tabela 4**).

Tabela 4. - Preporučene vrednosti sadržaja vitamina u polenu

| Vitamin | Preporučena količina [mg kg ⁻¹] |
|--------------------------------------|---|
| β -karoten | 10-200 |
| B ₁ -tiamin | 6-13 |
| B ₂ -riboflavin | 6-20 |
| B ₃ -niacin | 40-110 |
| B ₅ -pantotenska kiselina | 5-20 |
| B ₆ -piridoksin | 2-7 |
| C-askorbinska kiselina | 70-560 |
| H-biotin | 0,5-0,7 |
| Folna kiselina | 3-10 |

II-7g Mikrobiološka ispravnost i antimikrobna aktivnost polena

Uz poznavanje palinološkog porekla i hemijskog sastava jedan od osnovnih parametara kvaliteta polena je njegova mikrobiološka ispravnost. Da li je neki polen bezbedan za upotrebu kao dodatak ishrani ne možemo znati samo ako utvrdimo od koje biljke vodi poreklo i da li sadrži neku toksičnu supstancu, već i da

li je u njemu došlo do razvoja određenih mikroorganizama. To je kod polena posebno izraženo s obzirom da on predstavlja idealnu podlogu za razvoj mikroba, ako se ima u vidu bogatstvo hranljivih komponenti i optimalna količina vlage. Osim sadržaja vlage još jedan jako bitan parametar za razvoj mikroba jeste i a_w -vrednost. Iz tog razloga u literaturi postoje radovi koji se bave i ovim aspektom ispravnosti polena, a u nekima od njih postoje i preporuke o parametrima kvaliteta koje treba ispoštovati. Tako Campos-eva sa saradnicima u svom revijalnom radu [Campos *et al.*, 2008] daje, osim hemijskih, preporučene vrednosti i mikrobioloških parametara tj. dozvoljen broj jedinki različitih bakterija, plesni i kvasaca (**Tabela 5**).

Među „pionirske“ radove sa mikrobiološkog aspekta spadaju radovi Gilliam-ove [Gilliam, 1979a i b]. Ona je, ispitujući cvetni i polen koji su sakupile medonosne pčele identifikovala ukupno sto trinaest vrsta kvasaca i četrdeset jednu vrstu bakterija iz roda *Bacillus*. Najzastupljeniji kvasac je bio *Torulopsis magnoliae* za koji se, pošto ga nije bilo u cvetnom polenu, pretpostavlja da je dospeo u polen aktivnošću samih pčela. Kako su uzorci stajali ili bili adekvatno skladišteni tako je broj identifikovanih vrsta u uzorcima opadao. Od bakterija vrsta *Bacillus subtilis* je izolovana iz svih uzoraka polena, bez obzira na način kako su prikupljeni. S obzirom da su najbrojnije kolonije bakterija pronađene u uzorcima koje su pčele sakupile, autor pretpostavlja da upravo one, svojom aktivnošću doprinose kontaminaciji uzoraka.

Tabela 5. - Mikrobiološki parametri kvaliteta polena

| Mikrobiološka analiza | |
|------------------------------|------------------------------|
| <i>Salmonella</i> | Nema u 10 g uzorka |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Nema u 1 g uzorka |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | Maksimalno 100 na 1 g uzorka |
| <i>Escherichia coli</i> | Nema u 1 g uzorka |
| Ukupni aerobni mikrobi | <100 000 po 1 g uzorka |
| Plesni i buđi | <50 000 po 1 g uzorka |
| <u>Aflatoksini</u> | [g kg ⁻¹] |
| B1 | < 2 |
| B1+B2+G1+G2 | < 4 |

Serra-Bonvehí i Jordá [1997] utvrdili su prisustvo različitih bakterija i plesni čija se pojava u uzorcima polena pripisuje kako prirodnom okruženju, zbog povoljnog sadržaja vlage u polenu i aktivnosti vode, tako i ljudskom faktoru. Autori nisu utvrdili prisustvo aflatoksina u ispitivanim uzorcima.

González sa saradnicima [González *et al.*, 2005] daje pregled plesni prisutnih u uzorcima polena u Španiji koji su potencijalni izvor mikotoksina u njemu, a pre svih aflatoksina. Identifikovali su sledeće rodove – *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. i *Alternaria* sp. pri čemu se plesni iz ove treće grupe javljaju veoma često u uzorcima. U svim uzorcima u kojima je identifikovan *Aspergillus carbonarius* identifikovan je i ohratoksin A, dok je isti mikotoksin nađen i u određenom delu uzoraka u kojima su pronađene sledeće gljivice – *Aspergillus ochraceus* (53,3%), *Penicillium verrucosum* (33,3%) i *Aspergillus niger* (25%). Takođe, osim ohratoksina, u 28,6% uzoraka u kojima su identifikovani *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* utvrđeno je i prisustvo aflatoksina B1. Aflatoksin B2 je nađen u svega 10% uzoraka, dok aflatoksini G1 i G2 nisu nađeni. Ispitivanjem uzoraka polena iz Slovačke [Kačániová *et al.*, 2011] došlo se do podataka o prisustvu mikroba iz devet rodova plesni među kojima su najčešće bile zastupljene sledeće vrste: *Mucor mucedo*, *Alternaria alternata*, *Mucor hiernalis*, *Aspergillus fumigatus* i *Cladosporium cladosporioides*. Najveća kontaminacija je bila u zamrznutom polenu suncokreta, dok su najmalobrojnije plesni pronađene kod polena bulke (*Papaver somniferum*). Od mikotoksina urađene su analize na prisustvo ukupnih aflatoksina, ohratoksina A, fumonizina, zearalenona, deoksinivalenola i T-2 toksina. U uzorcima polena bulke najzastupljeniji je bio zearalenon ($361,55 \pm 0,26 \mu\text{g kg}^{-1}$), dok je kod polena repe ($265,40 \pm 0,18 \mu\text{g kg}^{-1}$) i suncokreta ($364,72 \pm 13 \mu\text{g kg}^{-1}$) to bio T-2 toksin.

Mikrobiološka analiza uzoraka portugalskih polena [Estevinho *et al.*, 2012] pokazala je da je 60% uzoraka bilo kontaminirano nekom vrstom buđi i plesni, dok su aerobne mezofilne bakterije nađene u 40% uzoraka. Kada je u pitanju sanitarna ispravnost uzoraka koja je praćena preko prisustva fekalnih bakterija, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, ona je bila zadovoljavajuća s obzirom da ovi mikroorganizmi nisu pronađeni. I za sadržaj plesni i za sadržaj mezofilnih bakterija utvrđena je pozitivna korelacija sa aktivnošću vode i sadržajem vlage u uzorcima

kao i sa pH- vrednošću uzoraka. Ovo se posebno odnosi na pH, jer je uočeno da je do razvoja mikroorganizama uvek dolazilo u svim uzorcima u kojima je pH- vrednost bila iznad 4,96. Istovremeno, u svim tim uzorcima aktivnost vode je bila veća od 0,55. To znači da je, osim određene pH- vrednosti, potrebno da i aktivnost vode u uzorcima ima tačno određenu vrednost inače se mikroorganizmi ne mogu razviti. Znatno manju brojnost različitih mikroorganizama (bez *E. Coli* i *S. aureus* i sa fekalnim bakterijama u samo dva uzorka) u polenu našli su Feás i kolege [Feás *et al.*, 2012], što dovode u vezu sa poreklom uzoraka, dobrim i adekvatnim procesom prerade, pakovanja i čuvanja. Ono u čemu su saglasni sa prethodnim autorima jeste da su nizak sadržaj vlage, adekvatno pH i a_w - vrednost neophodni za mikrobiološku ispravnost uzoraka.

Nogueira sa saradnicima [Nogueira *et al.*, 2012] u uzorcima polena različitog geografskog porekla utvrdila je da je 50% uzoraka bilo kontaminirano različitim rodovima i vrstama buđi i kvasaca (*Candida sp.*, *Rhodotorula mucilaginosa sp.*, *Zigosaccharomyces rouxii sp.*, *Criptococcus humicola sp.* i *Saccharomyces cerevisiae sp.*), ali da je u svim uzorcima brojnost bila ispod one koja je propisana argentinskim pravilnikom o kvalitetu hrane ($1,5 \cdot 10^3$ (cfu) jedinki kolonije po g uzorka). Ovo je bilo značajno manje od kontaminacije uzoraka koje su pronašli drugi autori [Coronel *et al.*, 2004], gde su svi uzorci sadržavali neku vrstu buđi ili plesni. Aerobne mezofilne bakterije su pronađene samo u 12,5% uzoraka i brojnost im je oscilovala od manje od 10 g^{-1} do $8,7 \cdot 10^3$ jedinki po g uzorka. Ono po čemu se, takođe, rezultati ovih autora razlikuju od rezultata Coronel-ove je što nisu pronađene nikakve bakterije koje bi bile indikatori sanitarne neispravnosti uzoraka (*E. coli*, fekalne bakterije, *S. aureus*, *Salmonella sp.* i *Clostridia*), dok je ona pronašla fekalne bakterije. Prema saznanjima autora ovog rada, plesan koja je pronađena u najvećem broju uzoraka (*Candida Magnoliae*) je veoma često izolovana u košnicama, ali je neinvazivna vrsta po ljudsko zdravlje. Ipak, rezultati jednog istraživanja [Cascio *et al.*, 2007] povezuju je sa pojavom bolesti tenosinovitis (zapaljenski proces kada se nakuplja tečnost oko tetiva) kod imunokompetitivne dece tj. dece koja mogu da razviju imuni odgovor. Dve vrste pronađene u ovim uzorcima (*Saccharomyces cerevisiae* i *Zygosaccharomyces rouxii*) odgovorne su za kvarenje hrane koja je obrađena i pakovana pod uobičajenim

uslovima i standardima rada za proizvodnju hrane. *Candida norvegensis* sp. i *Rhodotorula mucilaginosa* su dve vrste koje mogu izazvati zdravstvene probleme kod ljudi, jer se nastanjuju na koži, oko noktiju, u respiratornom i urogenitalnom traktu i mogu izazvati dijareju. Podatke o sanitarnom kvalitetu polena u Alžiru nalazimo u radu Hani-ja i saradnika [Hani *et al.*, 2012]. Uzorci iz tri alžirska regiona su se razlikovali po prisustvu aerobnih bakterija (od 10^3 do $620 \cdot 10^3$ cfu g^{-1} uzorka) pri čemu je *S. aureus* pronađen samo u uzorcima iz jedne oblasti. Sadržaj koliformnih bakterija je rastao sa porastom vlažnosti vazduha i ambijentalne temperature. Isti trend je uočen i za plesni koje su identifikovane u uzorcima (od $50 \cdot 10^3$ do $400 \cdot 10^3$ cfu g^{-1} uzorka). U uzorcima nije nađena *Salmonella*.

Zahvaljujući prisustvu bioaktivnih jedinjenja poput flavonoida kvercetina, neki poleni, mogu pokazivati i antimikrobnu aktivnost [Campos *et al.*, 2010]. Tako su poleni eukaliptusa, sardinijskog ljutića (*Ranunculus sardous*) i žutike (*Ulex europeans*) a koji su sakupile medonosne pčele, zahvaljujući ovom jedinjenju pokazivali značajnu antimikrobnu aktivnost prema bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativna bakterija iz roda *Coccobacillus* koja izaziva oboljenje pluća i bubrega). Sa druge strane, neki derivati kvercetina, kojima je bio bogat polen eukaliptusa, nisu pokazivali antimikrobnu aktivnost. Tichy i Novak [2000] su pokazali da neke od hidrofobnih komponenti u polenu pčele imaju izraženo baktericidno dejstvo prema rodu *Viridans streptococci*, a koje su, opet, poznate kao bakterije sa izraženim α -hemolitičkim dejstvom. Basim sa saradnicima [Basim *et al.*, 2006] ispitivao je antimikrobna svojstva turskih polena prema sedam bakterijskih sojeva (*A. tumefaciens*, *P. syringae* pv. *tomato*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. corrugate* i *R. solanacearum*) patogenih za biljke. Među najvažnijim jedinjenjima ističu različite flavonoide, a pre svih pinocembrin, galangin i pinobanksin. Osim njih, toksični po bakterije su se pokazali i estri kumarinske i kofeinske kiseline. S obzirom da su se do sada kao baktericidi uglavnom koristili veštački sintetisani preparati na bazi bakra, autori sugerišu da bi se, možda, na ovaj način moglo preći na prirodne preparate koji, kasnije, ne bi bili toksični po čoveka ako bi tretirana biljka bila iskorišćena kao hrana. Takođe, primena takvih preparata bi bila poželjnija i sa ekološkog aspekta [Bolkan i Reinert, 1994]. Kada je bila u pitanju antimikrobna

aktivnost portugalskih uzoraka polena [Morais *et al.*, 2011] za gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*) najveću aktivnost je pokazivao jedan od uzoraka jer je u njegovom slučaju minimalna koncentracija koja je inhibirala aktivnost mikroba bila svega 0,17%. I ostali poleni su pokazivali antimikrobno dejstvo, ali u znatno višim koncentracijama. Kod gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli* i *Salmonella Typhi*) ponovo je najveću antimikrobnu aktivnost imao isti uzorak. Svi poleni su pokazali značajnu antigljivičnu aktivnost pogotovo prema *Zygosacharomyces bailii* što se verovatno može objasniti činjenicom da ova gljivica potiče iz meda i da se nije prilagodila na prisustvo metanola koji je korišćen za ekstrakciju iz polena. Dobijeni rezultati ukazuju da su gram-pozitivne bakterije bile osetljivije u odnosu na gram-negativne bakterije, što se može dovesti u vezu kako sa fleksibilnijim ćelijskim zidom kod ovih bakterija tako i sa kompleksnijom hemijskom strukturom. Polisaharidi i lipidi u ćelijskom zidu su najvažnija jedinjenja koja određuju toksičnost i patogenost mikroorganizama pri čemu ćelijski zid gram-negativnih bakterija sadrži jedan lipidnosaharidni sloj koji nemaju gram-pozitivne bakterije. Kacániová sa saradnicima [Kacániová *et al.*, 2012] je ispitivala antimikrobnu aktivnost metanolskih i etanolskih ekstrakata polena iz Slovačke i utvrdila da najveću osetljivost pokazuje *Escherichia coli* CCM 3988, dok osetljivost ostalih bakterija opada u nizu: *Staphylococcus aureus* CCM 3953 > *Salmonella enterica* CCM 4420 > *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960 > *Listeria monocytogenes* CCM 4699. Među gljivicama osetljivost opada u nizu: *Aspergillus fumigatus* > *Aspergillus niger* > *Aspergillus flavus*. Najjače antifungalno dejstvo među plesnima ekstrakti polena su pokazali prema sledećim vrstama (u zavisnosti od tipa ekstrakta koji je korišćen): *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida crusei* i *Rhodotorula mucilaginosa*. I ovi autori, na kraju, zaključuju da je antimikrobna aktivnost polena povezana sa fenolnim jedinjenjima prisutnim u njemu.

II-7h Tehno-funkcionalna svojstva hrane

Pod tehno-funkcionalnim svojstvima hrane podrazumevamo fizička i hemijska svojstva hrane koja određuju njene osobine prilikom proizvodnje, prerade, pakovanja, čuvanja ili upotrebe [Barać *et al.*, 2014]. Među najvažnija jedinjenja od

kojih zavise ove osobine ubrajaju se proteini. Od fizičkih i hemijskih osobina proteina, poput primarne strukture tj. aminokiselinskog sastava, sekundarne i tercijarne strukture, molekulske mase, ukupnog naelektrisanja, hidrofobnog efekta itd., zavisice njihova tehno-funkcionalna svojstva. Ove osobine određene su i spoljašnjim faktorima poput pH- vrednosti rastvora, jonske sile, temperature, rastvorljivosti proteina u vodi [Damodoran, 1997]. Među najvažnija tehno-funkcionalna svojstva ubrajaju se rastvorljivost, sposobnost zadržavanja vode, emulgujuća i peniva svojstva funkcionalno aktivnih komponenti. Rastvorljivost proteina i sposobnost zadržavanja vode spadaju u grupu tehno-funkcionalnih svojstava koja zavise od njihove interakcije sa rastvaračem tj. sa vodom, dok su emulgujuća i peniva svojstva povezana sa njihovom površinskom aktivnošću [Pešić, 2011]. Ova svojstva bitno utiču na krajnje osobine proizvoda što može biti veoma važno s obzirom da je kod potrošača i sam vizuelni efekat i izgled proizvoda izuzetno važan prilikom odabira.

Rastvorljivost proteina zavisi od odnosa broja polarnih i nepolarnih grupa u njegovoj strukturi kao i njihovog uzajamnog prostornog položaja [Belitz *et al.*, 2009]. Proteini se rastvaraju u vodi kada privlačne sile hidratacije preovladaju međusobne hidrofobne interakcije koje postoje unutar strukture molekula proteina. Najniža rastvorljivost proteina je na njegovoj pI-vrednosti [Barać *et al.*, 2014], a zavisi i od jonske sile u samom rastvoru. Sa povećanjem njene vrednosti i rastvorljivost obično raste u prisustvu jednovalentnih i dvovalentnih jona [Lee *et al.*, 2003]. Najniža rastvorljivost kod proteina soje je pri vrednosti $I < 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ [Barać *et al.*, 2014]. Povišenjem temperature rastvorljivost proteina opada, jer dolazi do njihove agregacije i formiranja koloidnih struktura. Tako npr. rastvorljivost glicinina je prepolovljena nakon termičkog tretmana rastvora [Lakemond *et al.*, 2000].

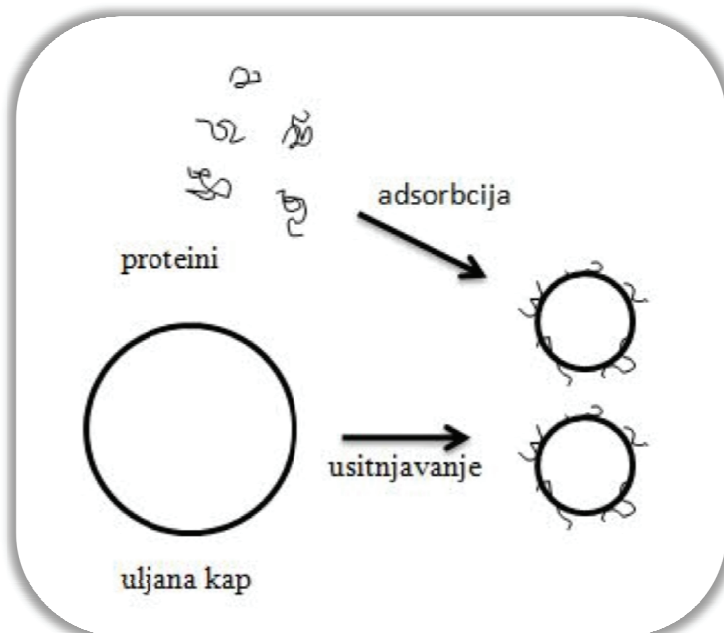
Sposobnost zadržavanja vode se obično izražava preko vrednosti kapaciteta vezivanja vode (WAC) koji pokazuje koliku sposobnost proizvod ili uzorak ima da zadrži vodu nasuprot dejstvu gravitacione sile [Barać *et al.*, 2014]. Sama voda može se naći u više, fizički različitih, interakcija sa proteinima [Moure *et al.*, 2006]:

- ✓ vezana voda
- ✓ hidrodinamička voda

- ✓ kapilarno-vezana voda
- ✓ fizički okludovana voda.

Kuntz i Kauzmann su utvrdili da na ovo tehno-funkcionalno svojstvo u hrani utiče primarna struktura proteina [1974]. Osim nje, koliki će WAC pokazati neki materijal zavisi i od njegove hidrofobnosti, pH- vrednosti, temperature, jonske sile i koncentracije proteina u rastvoru [Damodoran, 1997]. Proteini soje pokazuju odličan WAC [Riaz *et al.*, 2006].

S obzirom da se u prehrambenim proizvodima često nalaze zajedno komponente koje bi, zbog razlike u polarnosti, po prirodi stvari bile međusobno nemešljive, upotreba emulgatora je neophodna pri proizvodnji hrane. Njihova funkcija je da povećaju mešljivost i da nastalu emulziju održe stabilnom. Upravo proteini imaju dobra emulgujuća svojstva pre svega zbog posedovanja osobina površinski aktivnih supstanci. Oni zapravo nepolarnu (uljnu) frakciju razbijaju na sitnije kapljice i smanjuju površinski napon na dodirnoj površini ulje/voda i na taj način sprečavaju ponovno spajanje u jednu celinu [Tcholakova *et al.*, 2006; Dickinson, 2009]. Proces formiranja emulzije, uz proteine kao površinski aktivne supstance, je prikazan na slici 6.



slika 6. Proces formiranja emulzije sa proteinima kao stabilizatorima [Pešić, 2011]

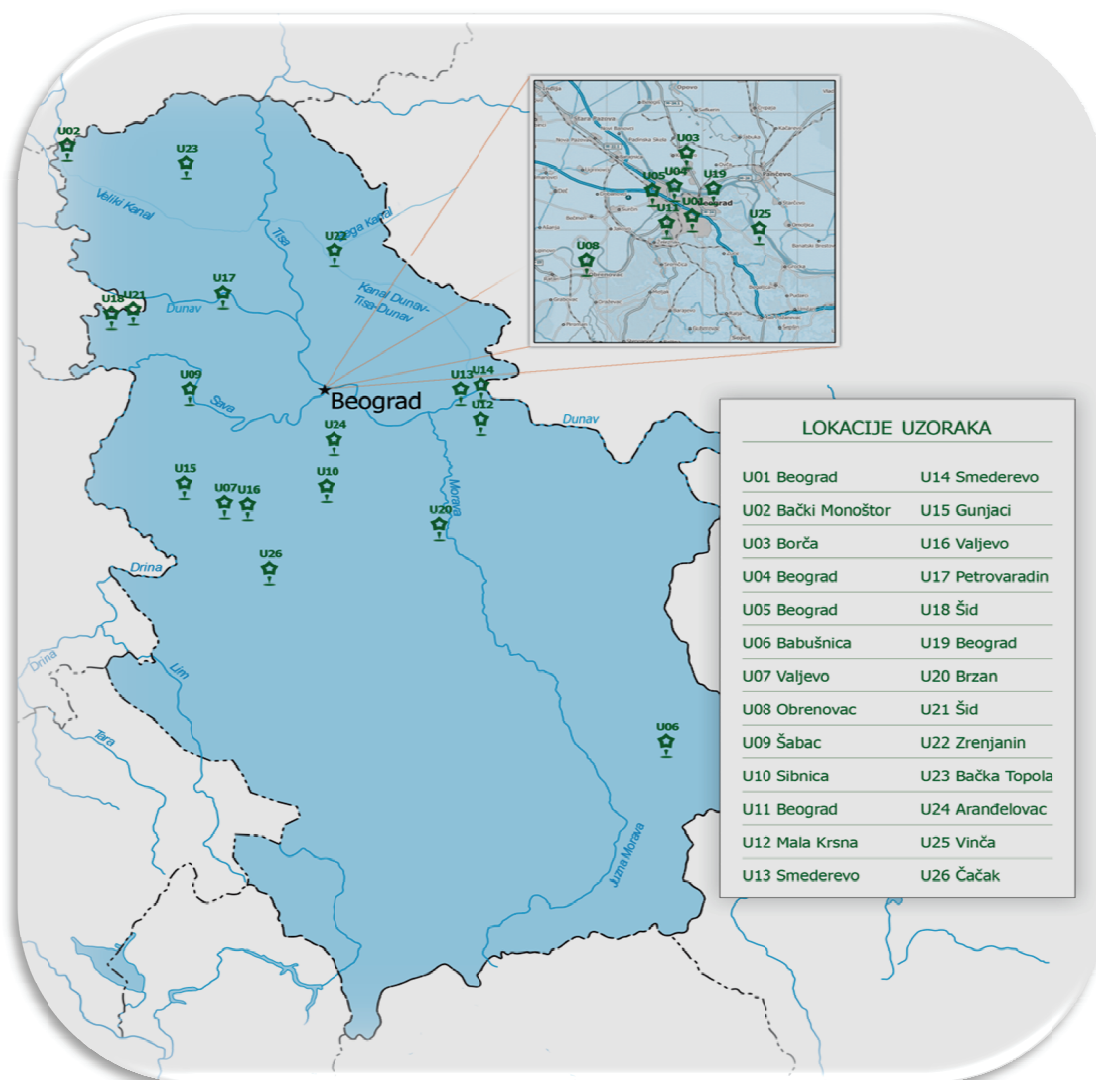
Utvrđeno je da dobra emulgjuća svojstva pokazuju proteini soje [Barać *et al.*, 2014], mleka [Pešić, 2011], azuki pasulja i graška [Barać *et al.*, 2015]. Faktori koji mogu da utiču na emulgjuća svojstva proteina su: pH- vrednost, temperatura, povišeni pritisak, jonska sila, molekulska struktura i koncentracija proteina [Barać *et al.*, 2014]. Tako je utvrđeno da termički tretman, uz dogovarajuću pH- vrednost, poboljšava emulgjuća svojstva proteina soje, azuki pasulja i graška [Barać *et al.*, 2015].

Tokom procesa formiranja pene u prehrambenim proizvodima odigravaju se procesi vrlo slični emulgovanju, a to su: difuzija proteina do granične površine između polarne i nepolarne zone (voda/ulje), adsorpcija, koncentrovanje i smanjenje površinskog napona [Barać *et al.*, 2014]. Pene koje se zasnivaju na proteinima se, zapravo, sastoje od vazdušnih mehurova koji su obmotani molekulima proteina u vidu tankog filma na površini mehura, dok je prostor između mehurova ispunjen vodom, kao rastvaračem. Kao faktor koji prevashodno određuje brzinu i stabilnost formiranja pena na bazi proteina ističe se njihova sposobnost brzog difundovanja do međufazne površine i formiranje zaštitnog filma u toku kojeg dolazi i do reorganizacije samih molekula proteina [Kinsella and Phillips, 1989; Phillips *et al.*, 1994]. Na sposobnost proteina soje da formiraju pene utiče više faktora, a pre svih prisustvo lipida ili organskih rastvarača koji narušavaju stabilnost pene [Barać *et al.*, 2014]. Kod proteina mleka peniva svojstva zavise od vrste i koncentracije proteina, pH- vrednosti, temperature, jonske sile, prisustva neorganskih soli, lipida ili šećera [Pešić, 2011]. Osim njih, kao proteini sa dobrim penivim svojstvima prepoznati su i proteini belanceta jajeta i želatin [Zayas, 1997].

U dostupnoj literaturi nema podataka o tehno-funkcionalnim svojstvima polena. Tek nedavno Krystijan-ova sa saradnicima [Krystijan *et al.*, 2015] je ispitivala uticaj dodatka polena pri procesu proizvodnje keksa na njegova funkcionalna, senzorna i antioksidativna svojstva. Pri tome je utvrdila da dodatak polena daje značajno tamniju boju keksu pri pečenju u odnosu na kontrolni uzorak. Takođe, povećava im mekoću (bez obzira na to koliko se polena doda), sadržaje ukupnih šećera, proteina, pepela, dijetetskih vlakana i polifenola. I vrednost ukupne antioksidativnosti je bila povišena dodatkom polena. Zbog nutritivnog značaja polena i potrebe za razvojem zdravih, funkcionalnih proizvoda sa dodatkom polena, neophodno je poznavanje njegovih tehno-funkcionalnih svojstava.

III EKSPERIMENTALNI DEO

Za potrebe ovog doktorata preko Saveza pčelarskih organizacija Srbije (SPOS) prikupljeno je dvadeset šest uzoraka polena tokom proleća 2011. Uzorci su nabavljeni od lokalnih pčelara, članova ove organizacije, pri čemu je dvadeset pet uzoraka prikupljeno u centralnim i severnim delovima Srbije dok je jedan uzorak poticao iz jugoistočnog dela Srbije (Babušnica). Od preostalih dvadeset pet uzoraka za jedanaest možemo reći da su vodili poreklo sa područja grada Beograda (užeg ili šireg) (u daljem tekstu skraćeno BG), osam ih je prikupljeno u centralnoj Srbiji (u daljem tekstu skraćeno CS), a šest je vodilo poreklo iz Vojvodine (u daljem tekstu skraćeno VOJ). Detaljno geografsko poreklo svih uzoraka prikazano je na slici 7.



slika 7. Mapa Srbije sa geografskim poreklom ispitivanih uzoraka polena koji su sakupile medonosne pčele

Nakon pristizanja u laboratoriju svi uzorci su pakovani u dobro zatvorene PET-kese i čuvani u zamrzivaču na - 18 °C do početka ispitivanja i analiziranja. Sve hemikalije koje su korišćene u eksperimentima bile su analitičke čistoće (ili još višeg stepena) i nabavljene od Merck-a (Merck, Darmstadt, Germany), Fluke AG (Fluka Buchs, Switzerland), Sigma-Aldrich-a (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany) i Tokyo Chemical Industry (TCI, Europe, Belgium). Ultra-čista voda je dobijena pomoću sistema SG Ver. 1.11, Water (USA, LLC), dok je za potrebe analize hemijskih parametara i pripremu standardnih rastvora korišćena voda dobijena pomoću sistema za prečišćavanje vode Thermo Fisher TKA MicroPure (0,055 $\mu\text{S cm}^{-1}$) (Germany). Za potrebe SDS-PAGE elektroforeze u redukcionim uslovima korišćen je set marker-standarda malih molekulskih masa (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) koji je uključivao: fosforilazu B (94000), goveđi (BSA)-serum albumin (66000), ovalbumin (45000), karbon-anhidrazu (30000), tripsin inhibitor (20100) i α -laktalbumin (14400).

III-1 Određivanje palinološkog (botaničkog) porekla uzoraka

Uzorci polena su pripremljeni za kvalitativnu analizu botaničkog porekla prema metodi koju je opisao Barth sa saradnicima [Barth *et al.*, 2010], a koja je modifikovana u smislu veličine ispitivanih uzoraka. Mereno je po 500 mg uzorka u centrifugalnoj kiveti. Uzorci su, zatim, prelivani sa po 15 cm^3 apsolutnog etanola i ostavljani da stoje 24 h. Fragmentacija polenovih zrna je olakšana na taj način što su uzorci držani po 5 min u ultrazvučnom kupatilu. Nakon centrifugiranja, u trajanju od po 3 minuta, na 2000 $\times g$ obrtaja, uklonjen je supernatant. Postupak je ponavljan sve dok nije dobijena homogena suspenzija. Nakon toga, preostali nerastvoreni deo je suspendovan u 20 cm^3 destilovane vode. Jedna kap te suspenzije, uzeta iz središta kivete, nanošena je između dve staklene pločice za mikroskopiranje i prekrivena slojem (veličine 18 \times 18 mm) koji se sastojao od glicerola, želatina, fenola, destilovane vode i baznog fuksina [Laaidi *et al.*, 2003]. Posmatranjem pod mikroskopom (uz uvećanje od 400 puta) u svakom uzorku izbrojano je najmanje po 500 polenovih zrna (u proseku 591 \pm 57 zrna) koja su zatim identifikovana korišćenjem referentnih slajdova i atlasa [Moore and Webb, 1978; Reille, 1995, 1998, 1999a i 1999b; Bucher *et al.*, 2004].

III-2 Određivanje opšteg fizičko-hemijskog sastava uzoraka

III-2a Određivanje sadržaja vlage u uzorcima

Sadržaj vlage je određen prema AOAC (Association of Official Analytical Chemists) [AOAC, 1997] standardnoj metodi br. 925.45B. Rezultati su izraženi u % (g/100g) u odnosu na masu suvog uzorka.

III-2b Određivanje aktivnosti vode i pH-vrednosti uzoraka

Aktivnost vode je merena na 25 °C tako što je svaki uzorak polena direktno ubacivan u aparat za merenje aktivnosti vode (Testo 650, Germany). Za određivanje pH-vrednosti uzoraka korišćen je digitalni pH- metar (Consort C931, Consort BVBA, Parklaan 36, B-2300 Turnhout, Belgium). Sama pH- vrednost je merena tako što je na 5 g uzorka polena dodavano 20 cm³ ultra-čiste vode i intenzivno mućkano na Vortex-u.

III-2c Određivanje sadržaja pepela u uzorcima

Sadržaj pepela (ΣP) je određen prema AOAC-standardnoj metodi br. 920.181. Rezultati su izraženi u % (g/100g) u odnosu na masu suvog uzorka (bez vlage).

III-2d Određivanje sadržaja ukupnih lipida u uzorcima

Sadržaj lipida (ΣL) je određen prema AOAC-standardnoj metodi br. 963.15. Rezultati su izraženi u % (g/100g) u odnosu na masu suvog uzorka (bez vlage).

III-2e Određivanje sadržaja ukupnih proteina u uzorcima

Sadržaj proteina (ΣPr) je određen prema AOAC-standardnoj metodi br. 960.52. Rezultati su izraženi u % (g/100g) u odnosu na masu suvog uzorka (bez vlage).

III-2f Određivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata u uzorcima

Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata (ΣUH) određen je iz razlike ukupnog sadržaja supstanci (100%) i sadržaja pepela, lipida i proteina [Yang *et al.*, 2013]:

$$\Sigma UH = 100 - [\Sigma P + \Sigma L + (\Sigma Pr)]$$

III-2g Određivanje energetske vrednosti uzoraka

Ukupna energetska vrednost je izračunata na osnovu hemijskog sastava uzoraka, a prema preporuci Svetske agencije za hranu (FAO, Food and Agriculture Organization), po kojoj se sadržaj proteina, lipida i ugljenih hidrata prisutnih u 100 g uzorka množi odgovarajućim faktorima da bi se dobile vrednosti ekvivalentne sadržaju toplote koji nastaje sagorevanjem ovih jedinjenja u ljudskom organizmu [FAO, 2002].

III-3 Određivanje sadržaja pojedinačnih masnih kiselina, polifenolnih jedinjenja i šećera u uzorcima

Osim određivanja opšteg fizičko-hemijskog sastava uzoraka polena koji je podrazumevao i određivanje ukupnih lipida i šećera u ispitivanim uzorcima urađena je i detaljnija hemijska analiza prisutnih važnih jedinjenja. Za potrebe određivanja sadržaja ovih supstanci prethodno je izvršena sekvenciona ekstrakcija uzoraka polena po metodi Campos-ove i saradnika [Campos *et al.*, 2003] koja je modifikovana i prilagođena ispitivanim uzorcima.

III-3a Sekvenciona ekstrakcija različitih frakcija iz uzoraka polena

Izmereno je 0.5 g uzorka polena i ekstrahovano sa 20 cm³ heptana u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta na 30 °C. Uzorak je centrifugiran da se odvoji nepolarna (lipidna) frakcija (frakcija A, F-A) a ostatak se tretira 50%-tnim etanolom (10 + 10 cm³) 15 minuta na ultrazvučnom kupatilu. Uzorak se zatim procedi ili centrifugira (po

potrebi). Etanol se, nakon toga, upari na vakuum uparivaču na 35 °C. Iz preostalog vodenog sloja fenolna frakcija (F-B) se ekstrahuje pomoću etil-acetata (15 – 20 cm³) u odnosu 1:1. Vodeni ekstrakt se, zatim, ispira odgovarajućom zapreminom butanola da bi se ekstrahovala proteinska frakcija (F-C). Nakon toga u vodenoj fazi će zaostati samo šećeri (F-D). Ako postoji nerastvorni deo uzorak treba procediti ili centrifugirati i čvrstu fazu odbaciti.

III-3b Određivanje sadržaja masnih kiselina u uzorcima

Masne kiseline, prisutne u ispitivanim uzorcima polena, određene su gasno-hromatografskom metodom (GC) i to na sledeći način:

Lipidna frakcija (F-A) je rastvorena u *tert*-butilmetiletru. Masne kiseline lipidne frakcije su zatim prevedene u metilestre masnih kiselina (MEMK) upotrebom 0,25 M trimetilsulfonijum-hidroksida u metanolu (EN ISO 5509:2000). Pre započinjanja same reakcije transesterifikacije u svaki uzorak je dodato po 30 µL (10 mg cm⁻³) rastvora metilnonadekanoata kao internog standarda za potrebe kasnije kvantifikacije masnih kiselina u uzorcima. MEMK su određivani na instrumentu Shimadzu 2010 (Kyoto, Japan) koji je bio opremljen split/splitless injektorom, plameno-jonizujućim (FID) detektorom i cijanopropil-HP-88 kolonom (dužina 100 m, prečnik 0,25 mm, debljina sloja filma 0,20 µm) proizvođača J&W Scientific, CA. Temperatura injektora je bila 250 °C, a detektora 280 °C. Protok nosećeg gasa, azota, je iznosio 1,33 cm³ min⁻¹. Injektirane zapremine uzoraka su bile po 1 µL, a zapremina koja je splitovana je podešena u odnosu 1 : 50. Temperatura kolone je programirana od početnih 125 °C do 230 °C. Ukupno vreme analize je iznosilo 50,5 min. Pikovi u uzorcima su identifikovani poređenjem retencionih vremena sa pikovima u standardima Supelco 37 component FAME (Supelco, Bellefonte, USA). Sadržaj masnih kiselina je izračunavan kao mg g⁻¹ lipida i izražen kao relativna količina ukupnih masnih kiselina u %.

III-3c Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u uzorcima

Za potrebe određivanja sadržaja polifenola u uzorcima polena druga frakcija (F-B) iz sekvencione ekstrakcije je prečišćena i koncentrovana pomoću metode za čvrsto-tečnu ekstrakciju (Solid Phase Extraction, SPE). U tu svrhu je korišćen solid-phase manifold za merenje i kontrolu, SPE-12G (J.T. Baker, USA) i SPE-kertridži Strata C-18E, 500 mg zapremine 3 cm³ (Phenomenex-ThermoFisher Scientific, Germany). Aktivacija kertridža je vršena propuštanjem po 10 cm³ metanola i 0,5%-tnog rastvora hlorovodonične kiseline, a zatim je na kertridž nanošeno po 2 cm³ pripremljenog F-B ekstrakta. Nakon toga je vršeno ispiranje kertridža sa po 10 cm³ 0,5% HCl (radi uklanjanja eventualno prisutnih šećera i drugih polarnih supstanci). Na kraju, vršeno je eluiranje uzoraka sa po 5 cm³ zakišljenog rastvora metanola (dodato mu je 0,5% HCl) u kivete koje su zatvarane i pakovane u zamrzivač do dalje analize.

Standardi za analizu su nabavljeni od Fluka AG (Buch, Switzerland). Analiza je vršena UHPLC-MS/MS sistemom uz injektiranje od po 5 µL uzorka. Sistem za određivanje sadržaja polifenola se sastojao od kvaternerne Accela-600 pumpe i autosemplera povezanih na linearni ion trap - orbitrap - hibridni maseni spektrofotometar (LTQ OrbiTrap XL, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Za jonizaciju uzoraka (prethodnim zagrevanjem) korišćen je elektrosprej sistem HESI-II (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Kolona za razdvajanje koja je korišćena je bila Hypersil gold C-18 (100 × 2,1 mm, 1,9 µm; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Mobilna faza se sastojala od vode i 0,1%-tne mravlje kiseline (A) tj. od acetonitrila i 0,1%-tne mravlje kiseline (B). Primenjivan je program linearnog gradijentnog eluiranja sa protokom od 0,3 cm³ min⁻¹ i to u sledećem režimu i odnosu: 0,0 – 1,0 min 5% B, 1,0 – 9,9 min od 5% do 95 % (B), 9,9 – 10 min od 95% do 5 % (B), i na kraju 5% (B) u trajanju od 3 min. Polifenolna jedinjenja su identifikovana i kvantifikovana na osnovu nekoliko parametara (masenog spektra, tačne mase, karakteristične fragmentacije i karakterističnih retencionih vremena) i to pomoću Xcalibur softvera (verzija 2.1), Mass Frontier softvera (verzija 6.0) i internet baze podataka za izračunavanje tačnih masa traženih jedinjenja - ChemSpider (www.chemspider.com).

III-3d Određivanje sadržaja rastvorljivih šećera u uzorcima

Osim određivanja ukupnog sadržaja ugljenih hidrata, kao dela opštih fizičko-hemijskih parametara, urađeno je i ispitivanje pojedinih važnih šećera koji su rastvorljivi u vodi i nalazili su se u poslednjoj frakciji (F-D) dobijenoj sekvencionom ekstrakcijom. U tom smislu pripremljeni su standardni rastvori fruktoze, saharoze, maltoze, glukoze i trehaloze koji su nabavljeni od Tokyo Chemical Industry (TCI, Europe, Belgium). Analiza je rađena HPAEC/PAD metodom (anjonska jonoizmenjivačka hromatografija visokih performanci sa pulsirajućom amperometrijskom detekcijom) na tečnom hromatografu ICS 3000 DP (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) koji je bio opremljen kvaternernom gradijentnom pumpom (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Za razdvajanje šećera korišćena je anjon-izmenjivačka- Carbo Pac®PA10 pelikularna kolona (4×250 mm) (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Zapremina injektovanja je iznosila 25 µL a radna temperatura 30 °C. Eluiranje uzoraka je vršeno uz protok od 0,7 cm³ min⁻¹ u gradijent sistemu napravljenom od 600 mM NaOH (eluent A), 500 mM natrijum-acetata (eluent B) i ultra čiste vode (eluent C). Primenjivan je sledeći program gradijentnog eluiranja: 0,0 – 20,0 min, 15% A; 20,1 – 30,0 min, 20% A; 0,0 – 5,0 min, 0% B; 5,1 – 12,0 min, 2% B; 12,1 – 20,0 min, 4% B; 20,1 – 30,0 min, 20% B. Dobijeni rezultati su izraženi kao procentni sadržaj šećera na suv uzorak polena.

III-4 Određivanje sadržaja makro i mikroelemenata u uzorcima

Mineralni sastav tj. sadržaj pojedinačnih makro- i mikroelemenata u uzorcima polena izvršen je ICP–OES metodom (indukovano-kuplovana plazma - optička emisiona spektrometrija) (iCAP 6500 Duo ICP, Thermo Scientific, UK). Za te potrebe oko 0,6 – 0,7 g uzorka je tretirano sa 7 cm³ 65%-tne HNO₃ i sa 1 cm³ 35%-tnog H₂O₂ u politetrafluoroetilenskim (PTFE) posudama. Za mineralizaciju uzoraka korišćen je zatvoren mikrotalasni digestioni sistem (ETHOS 1, Milestone, Italy). Na kraju, dobijeni uzorci su razblaživani bidestilovanom vodom do 50 cm³. Na isti način su pripremljene i slepe probe. Kao standard su korišćeni A multielementni plazma standardni rastvori, Specpure-4, koji su sadržavali po 1 g dm⁻³ svakog od analiziranih elemenata. Dobijeni rezultati su izraženi kao mg metala na kg uzorka za makroelemente

(K, Mg, Na and Ca) i mikroelemente (Fe, Zn, Cu and Co), odnosno, kao μg metala na kg uzorka polena za elemente prisutne u tragovima (Cd, Cr and Ni).

III-5 Određivanje proteina SDS-PAGE metodom

Analiza proteina (SDS-PAGE) u redukujućim uslovima je urađena po metodi Fling-a i Gregerson-a [1986]. Gel za razdvajanje (12,5 g/100g) je imao pH = 8,85, dok je gel za koncentrovanje (5 g/100g) imao vrednost pH od 6,80. Kao radni pufer je korišćen TRIS-glicin pufer [$0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ TRIS (hidroksimetilaminometan), $0,19 \text{ mol dm}^{-3}$ glicin i $0,1 \text{ g/100g}$ SDS (natrijum-dodecilsulfat)]. Ekstrakti polena (F-C) razblaživani su puferskim rastvorom, pH = 6,80, do koncentracije od $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ proteina. Svi uzorci su zagrevani 5 minuta u ključaloj vodi, neposredno pre analize za koju je uziman alikvot od po $50 \mu\text{L}$. Elektroforeza je sprovedena u trajanju od 5 h. Nakon toga gel je potapan i fiksiran u rastvoru boje Comassie blue R250 [$0,23 \text{ g/100g}$ boje Coomassie®brilliant blue R250, $3,9 \text{ g/100g}$ trihlorsirćetne kiseline, $6 \text{ cm}^3/100\text{cm}^3$ sirćetne kiseline i $17 \text{ cm}^3/100\text{cm}^3$ metanola]. Posle obezbojavanja, pomoću rastvora za obezbojavanje [$18 \text{ cm}^3/100\text{cm}^3$ etanola i $8 \text{ cm}^3/100\text{cm}^3$ sirćetne kiseline], gel je skeniran i analiziran SIGMA-GEL programom – SigmaGel software version 1.1 (Jandal Scientific, San Rafael, USA).

III-6 Određivanje tehno-funkcionalnih svojstava polena

U tehno-funkcionalna svojstva proteina, koja su određena u okviru ove disertacije, spadaju rastvorljivost proteina, rasvorljivost ugljenih hidrata, emulgujuća i peniva svojstva polena, kao i njegov kapacitet vezivanja vode (WAC) i ulja (OAC).

III-6a Određivanje rastvorljivosti proteina

Radi određivanja sadržaja rastvorljivih proteina uzorak polena je ekstrahovan pomoću desetostruko veće zapremine fosfatnog pufera ($0,1 \text{ M}$, pH = 7,4) na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 sata. Suspenzija je nakon toga centrifugirana ($10.000 \times g$) 20

minuta na sniženoj temperaturi (4 °C). Dobijeni supernatant je predstavljao proteinski ekstrakt iz polena. Sadržaj proteina je određen spektrofotometrijskom metodom po Bradford-ovoj [1976] na 595 nm uz upotrebu goveđeg serum albumina (BSA) kao standarda.

III-6b Određivanje rastvorljivosti ugljenih hidrata

Radi određivanja sadržaja rastvorljivih ugljenih hidrata korišćena je, uobičajena, „antronska“ metoda [Frølund *et al.*, 1996] koja bi, ukratko, podrazumevala sledeće korake: 0,15 g uzorka polena je ekstrahovano sa 40 cm³ ultra-čiste vode na 100 °C u trajanju od 40 minuta. Nakon toga rastvori su profiltrirani, a dobijeni filtrat je razblažen do zapremine od 50 cm³. Zatim je uziman alikvot od 0,3 cm³ uzorka, dodavano mu je 5 cm³ antrona i mešano sa sumpornom kiselinom ($c = 8,6 \text{ mol dm}^{-3}$). Tako pripremljeni uzorci su zagrevani na vodenom kupatilu na 100 °C u trajanju od 10 minuta, a nakon toga su ostavljani u ledenom kupatilu da se ohlade do 4 °C. Nakon toga, merena je apsorbancija plavozelenih rastvora na 620 nm. Sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata u uzorcima polena određivan je primenom standardnih krivih. Za pripremanje standardnih rastvora uziman je dominantno očekivani najzastupljeniji šećer, što je u našem slučaju bila fruktoza, osim uzoraka **10**, **20** i **23**, gde je to bila maltoza tj. u uzorku **19** u kome je korišćena smeša (1:1) fruktoze i maltoze. Odabir najzastupljenijeg šećera, koji će se uzeti kao referentni za dati uzorak, urađen je na osnovu rezultata analize pojedinih rastvorljivih šećera u uzorcima polena (**III-3c**).

III-6c Određivanje emulgujućih svojstava polena

Emulgujuća svojstva polena određena su metodom po Pearce-u i Kinsella-i [1978]. U tom smislu, 45 cm³ vodenog ekstrakta polena (0,1 g/100g) mešano je sa 15 cm³ čistog suncokretovog ulja, pH= 7. Tako dobijeni uzorci su homogenizovani intenzivnim mućkanjem pomoću homogenizatora marke MSE (MSE-174 Homogeniser, Measuring & Scientific Equipment Ltd., Spenser st., London, S.W1, England) u trajanju od 1 minuta. Uzimani su alikvoti od po 50 µL odmah po završetku homogenizovanja (0 min) i

10 minuta nakon homogenizacije, pri čemu je vođeno računa da uzorci budu uzeti tačno sa dna suda za homogenizaciju, bez mućkanja i narušavanja emulzije. Svakom od alikvota je dodavano po 10 cm³ rastvora natrijum-dodecilsulfata (SDS) (0,1 g/100g) i nakon toga im je merena apsorbanacija na 500 nm. Dve vrednosti za apsorbanacije– odmah nakon homogenizovanja (A₀) i 10 minuta nakon toga (A₁₀) - iskorišćene su za određivanje indeksa aktivnosti emulzije (EAI) i indeksa stabilnosti emulzije (ESI). Ova dva parametra računaju se pomoću sledećih obrazaca:

$$EAI = 2T \cdot (A_0 \cdot F / c \cdot \Phi \cdot 10000) \text{ [m}^2\text{g}^{-1}\text{]}$$

gde su: T-2,203; F- faktor razblaženja (100); c- koncentracija proteina [gcm⁻³] i Φ= 0,25

$$ESI = A_0 \cdot (\Delta T / \Delta A) \text{ [min]}$$

gde su: ΔT- vremenski intervali između dva merenja apsorbanace (10 min) i ΔA- razlika u vrednosti apsorbanaci u momentu formiranja emulzije i nakon deset minuta.

III-6d Određivanje penivih svojstava polena

Peniva svojstva polena određene su pomoću metode Baraća i saradnika [Barać *et al.*, 2010]. Za te potrebe uzimano je po 30 cm³ vodenog ekstrakta polena (koncentracija 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 i 2,5 g/100g) pri pH= 7 i podvrgavano je struji vazduha (protok vazduha je iznosio 6 dm³ u minutu) u trajanju od 15 s kroz degazer (Waters, Milford, MA, USA) koji se nalazio na dnu kolone od 250 cm³. Peniva svojstva polena su izražena kroz vrednosti kapaciteta (FC) i stabilnosti (FS) pene. Ova dva parametra računaju se pomoću sledećih obrazaca:

$$FC = (V_1 - V_0) / V \cdot 100 \text{ [%]}$$

gde su: V₀- početna zapremina rastvora proteina; V₁- zapremina do koje se podigao nivo pene u koloni

$$FS = (V_3 - V_0) / V \cdot 100 \text{ [%]}$$

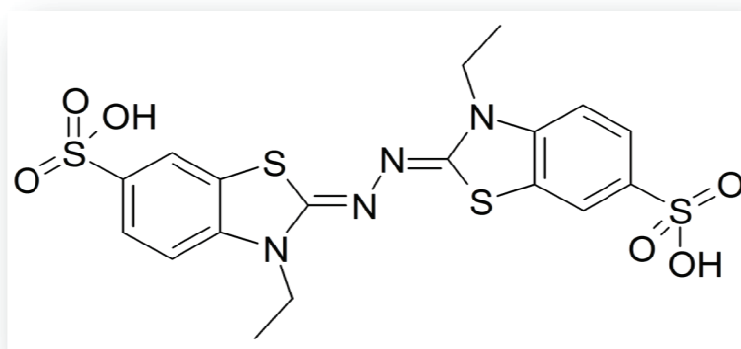
gde su: V₀- početna zapremina rastvora proteina; V₃- zapremina na kojoj se pena održala posle 3 minuta.

III-6e Određivanje WAC i OAC vrednosti za polen

Vrednosti odnosa kapaciteta vezivanja vode i kapaciteta vezivanja ulja (WAC/OAC) za polen određene su po metodi Wani-ja i saradnika [Wani *et al.*, 2013] uz malu modifikaciju: 1 g uzorka je mešan sa 10 cm³ smeše dejonizovane vode i ulja (3:1) u kiveti i mešan 1 minut. Nakon toga, uzorak je ostavljan da stoji pola sata na sobnoj temperaturi posle čega je centrifugiran 30 min na 2000 x g. Nakon završenog centrifugiranja merena je zapremina dobijenog supernatanta. WAC/OAC vrednost je izračunavana iz odnosa početne zapremine smeše voda/ulje i zapremine dobijenog supernatanta nakon centrifugiranja uzorka. Rezultati su izraženi kao g smeše voda/ulje koji su absorbovani na 100 g uzorka polena.

III-7 Određivanje ukupne antioksidativnosti uzorka polena

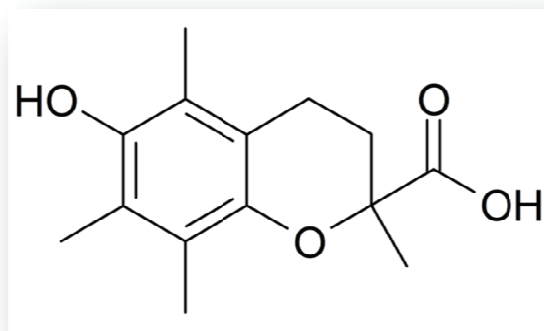
Za određivanje antioksidativne moći polena korišćena je modifikovana metoda po Serpen-u i saradnicima [Serpen *et al.*, 2007]. Za to je pripremljen radni rastvor ABTS-a [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] (sl. 8) koji se pravi na sam dan izvođenja eksperimenta (zbog stabilnosti) polazeći od 7 mM rastvora ABTS-a i to mešanjem 9 cm³ tog rastvora sa 800 cm³ smeše voda : etanol (1:1).



slika 8. Struktura ABTS-a

Antioksidativna moć polena se ispituje mešanjem 10 mg uzorka sa 10 cm³ radnog rastvora ABTS-a u trajanju od 30 min. Nakon toga, uzorci se centrifugiraju (9200 x g) a zatim se meri apsorbancija na 734 nm. Rezultati su preračunati na mmol

Trolox-a (koji bi imao ekvivalentnu antioksidativnu moć) na kg uzorka korišćenjem standardne krive. Trolox [6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina] (sl. 9) je sintetički analog vitaminu E koji se u organizmu ponaša na sličan način ovom jedinjenju tj. može da “hvata” slobodne radikale, u čemu se i ogleda njegova antioksidativna moć.



slika 9. Struktura Trolox-a.

III-8 Određivanje mikrobiološke ispravnosti uzoraka polena

Kako je već naglašeno u delu vezanom za pregled literature, osim poznavanja botaničkog porekla i hemijskog sastava uzoraka polena, mikrobiološki kvalitet je još jedan od osnovnih parametara koji nam mogu ukazati na njihovu (ne)ispravnost. U tom smislu, uzorci polena su podvrgnuti mikrobiološkoj analizi na prisustvo buđi i plesni kao jednog od najčešće zastupljenih biokontaminanata u polenima. Sama analiza je rađena metodom decimanih razblaženja na sledeći način: odmeravano je po 10 g uzoraka polena i mešano je sa 90 cm³ fiziološkog rastvora, masene koncentracije, $\gamma(\text{NaCl})=8,5 \text{ g dm}^{-3}$. Nakon toga je vršena homogenizacija čime je dobijeno osnovno razblaženje. Od njega je pripremljeno prvo razblaženje mešanjem 1 cm³ tog rastvora sa 9 cm³ fiziološkog rastvora (razblaženje 10⁻¹) a zatim je napravljena i preostala serija decimalnih razblaženja (od 10⁻² do 10⁻⁴) uzimanjem po 1 cm³ rastvora odgovarajućeg razblaženja i mešanjem sa 9 cm³ fiziološkog rastvora. Za analizu broja plesni korišćena su razblaženja od 10⁻³ i 10⁻⁴ tako što je po 1 cm³ prebacivan u Petri-jevu šolju i zalivan sa Sabouraud-maltoznim agarom. Nakon 5 - 7 dana inkubacije, na 25 °C, prebrojane su i razvijene

kolonije plesni, a rezultat je izražen kao broj nastalih kolonija (colony forming units, cfu) po g uzorka polena. Identifikacija kolonija razvijenih plesni urađena je na osnovu mikroskopskog pregleda micelije i spora prema Watanabe-u [1994] i Burgess *et al.* [1994]. Sve izolovane plesni su identifikovane do nivoa roda osim *Aspergillus sp.* koji je identifikovan do nivoa vrste.

III-9 Određivanje prisustva aflatoksina u uzorcima polena

Prisustvo aflatoksina je ispitivano pomoću imunoenzimske (ELISA) metode. Homogenizovano je 5 g uzorka i 1 g NaCl u 25 cm³ 70%-tnog metanola u erlenmajeru od 250 ml na orbitalnoj mešalici (GFL 3015, Germany) u toku 30 minuta. Zatim je homogenat profiltriran kroz Whatman filter papir 1. Filtrat je dalje analiziran prema uputstvu proizvođača Celer® Techna test ELISA kitova. Apsorbancija je određivana na talasnoj dužini od 450 nm na ELISA čitač spektrofotometru (BioTek EL x 800TM, USA).

III-10 Statistička analiza rezultata

Svi eksperimenti su rađeni uz tri ponavljanja, a dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Pomoću *t*-testa utvrđeno je da li postoje statistički značajne razlike između dobijenih rezultata pri čemu se smatralo da te razlike ne postoje ako je vrednost za $p < 0,05$. Za te proračune je korišćen statistički program Statistica verzija 8.0 (Stat.Soft. Inc., Tulsa, OK, USA). Korelacioni koeficijenti između različitih fizičko-hemijskih i tehno-funkcionalnih osobina polena su određeni pomoću Pearson-ovog koeficijenta korelacije na nivou značajnosti $p < 0,05$.

IV REZULTATI I DISKUSIJA

IV-1 Palinološka analiza polena

Rezultati palinološke analize polena prikazani su u **Tabeli 6.**

Tabela 6. - Rezultati palinološke analize polena

| uzorak | Predominantni tip polena (>45%) | Prateći tip polena (15-45%) | Važni izolovani tipovi polena (3-15%) | Geografsko poreklo (region) |
|--------|---------------------------------|---|--|-----------------------------|
| 1 | <i>Fraxinus</i> (60%) | / | Rannunculaceae, <i>Zea mays</i> , <i>Rumex</i> , Pinaceae, <i>Juglans</i> , Asteraceae | Beograd |
| 2 | Brassicaceae (93%) | / | Moraceae | Bački Monoštor (VOJ) |
| 3 | Fabaceae (48%) | Brassicaceae (19%) | Rannunculaceae, <i>Vitis</i> | Borča (BG) |
| 4 | <i>Helianthus</i> (75%) | / | Cannabaceae, Asteraceae, <i>Zea mays</i> | Beograd |
| 5 | / | Brassicaceae (45%), <i>Salix</i> (35%) | Rosaceae, <i>Vitis</i> | Beograd |
| 6 | <i>Salix</i> (81%) | / | Rosaceae, <i>Quercus</i> | Babušnica |
| 7 | / | <i>Plantago</i> (25%), <i>Ambrosia</i> (22%) | <i>Apiaceae</i> , <i>Artemisia</i> , Asteraceae, Fabaceae, <i>Zea mays</i> , Rannunculaceae, <i>Tilia</i> | Valjevo (CS) |
| 8 | Fabaceae (72%) | / | Brassicaceae, <i>Sophora</i> | Obrenovac (BG) |
| 9 | Fabaceae (50%) | / | Brassicaceae, Rosaceae, <i>Salix</i> , <i>Vitis</i> | Šabac (CS) |
| 10 | <i>Apiaceae</i> (69%) | / | / | Sibnica (CS) |
| 11 | / | Brassicaceae (31%), Fabaceae (18%), Moraceae (18%) | Lamiaceae, <i>Salix</i> , <i>Tilia</i> | Beograd |
| 12 | Brassicaceae (76%) | / | <i>Salix</i> , Rosaceae, <i>Sambucus</i> , <i>Apiaceae</i> | Mala Krsna (BG) |
| 13 | Brassicaceae (53%) | / | <i>Apiaceae</i> , Asteraceae, Fabaceae, Rannunculaceae | Smederevo (BG) |
| 14 | Fabaceae (81%) | / | Brassicaceae | Smederevo (BG) |
| 15 | / | Rosaceae (42%), Fabaceae (23%) | Asteraceae, <i>Plantago</i> | Gunjaci (CS) |
| 16 | / | <i>Plantago</i> (35%), Fabaceae (19%), <i>Ambrosia</i> (19%), Asteraceae (18%) | <i>Zea mays</i> | Valjevo (CS) |
| 17 | / | Brassicaceae (34%), Fabaceae (28%) | <i>Helianthus</i> , Rannunculaceae, <i>Tilia</i> | Petrovaradin (VOJ) |
| 18 | / | <i>Ambrosia</i> (31%), Asteraceae (18%) | <i>Apiaceae</i> , <i>Artemisia</i> , <i>Helianthus</i> , Brassicaceae, Chenopodiaceae, Rannunculaceae | Šid (VOJ) |
| 19 | / | Asteraceae (18%) | <i>Helianthus</i> , <i>Carduus</i> , Brassicaceae, Fabaceae, <i>Plantago</i> , Poaceae, <i>Zea mays</i> , Rannunculaceae, Rosaceae | Beograd |
| 20 | / | Fabaceae (34%), Brassicaceae (25%) | <i>Artemisia</i> , <i>Ambrosia</i> , Rannunculaceae, <i>Vitis</i> | Brzan (CS) |
| 21 | Rannunculaceae (76%) | / | Asteraceae, <i>Artemisia</i> , <i>Helianthus</i> | Šid (VOJ) |
| 22 | Fabaceae (57%) | / | Brassicaceae, <i>Ambrosia</i> , <i>Helianthus</i> , <i>Vitis</i> | Zrenjanin (VOJ) |
| 23 | / | <i>Sophora</i> (42%) | Asteraceae, Cannabaceae | Bačka Topola (VOJ) |
| 24 | Fabaceae (78%) | / | Brassicaceae | Arandelovac (CS) |
| 25 | <i>Sophora</i> (46%) | <i>Helianthus</i> (21%) | Asteraceae, Chenopodiaceae, <i>Zea mays</i> , Rannunculaceae | Vinča (BG) |
| 26 | / | Rannunculaceae (24%), <i>Robinia</i> (22%) | Asteraceae, <i>Artemisia</i> , <i>Ambrosia</i> , Chenopodiaceae, <i>Cornus</i> , Brassicaceae | Čačak (CS) |

U skladu sa preporukom Campos-eve [Campos *et al.*, 2008] među ispitivanim uzorcima polena samo tri uzorka su bila monofloralnog tipa i ispunjavala su uslov da sadrže više od 80% polenovih zrna koja vode poreklo od jedne biljne vrste ili iz iste familije biljaka. To su bili:

- uzorak 2 koji je sadržavao 93% polenovih zrna koja su vodila poreklo od biljaka iz familije krstašica tj. kupusnjača (Brassicaceae)

- uzorak **6** koji je sadržavao 81% polenovih zrna vrbe (*Salix*)
- uzorak **14** sa oko 81% polenovih zrna koja su vodila poreklo od biljaka iz familije mahunarki (Fabaceae)

Preostala dvadeset i tri uzorka mogu se okarakterisati kao poliflorani sa ukupno petnaest identifikovanih biljnih vrsta ili familija koje su bile različito zastupljene. Među njima polen biljaka iz familija mahunarki bio je zastupljen kao dominantan u šest uzoraka (uzorci **3, 8, 9, 14, 22 i 24**) dok je polen krstašica bio zastupljen kao dominantan u dva uzorka (uzorci **12 i 13**). Poleni biljaka iz ove dve familije pronađeni su u skoro svim ostalim uzorcima bilo kao prateći tip polena bilo kao važna izolovana vrsta polenovih zrna. Ovako velika i široka zastupljenost polena biljaka iz ove dve familije u skoro svim uzorcima posledica je široke zastupljenosti ovih biljaka u poljoprivrednoj proizvodnji naše zemlje [Bošnjak *et al.*, 2012]. Od biljaka iz familije mahunarki treba posebno izdvojiti soju, koja se intenzivno gaji na velikim površinama širom Srbije, zbog njene upotrebe kako u ljudskoj tako i u stočnoj ishrani. Tu su, zatim, razne vrste detelina, koje se gaje kao kvalitetna stočna hrana, kao i grašak i pasulj koji su poznate kultivisane vrste rado prisutne na trpezama u našim domaćinstvima. Slična situacija je i sa kupusom, keljom, brokolijem, kelerabom i ostalim biljkama iz familije krstašica (kupusnjača) među kojima posebno treba istaći kupus po kome su neki od delova Srbije poznati i van granica naše zemlje (npr. Futog i okolina su poznati proizvođači tzv. „futoškog“ kupusa izuzetnog kvaliteta). Od ostalih dominantno zastupljenih tipova polenovih zrna prisutni su, u po jednom uzorku, poleni jasena (uzorak **1**) suncokreta (uzorak **4**), japanskog bagrema (*Sophora*) (uzorak **25**) i biljaka iz familije štitonoša (Apiaceae) (uzorak **10**) i ljutića (uzorak **21**). Od familija i biljnih vrsta koje su izolovane kao značajni izvori polena identifikovane su i dudovi (Moraceae), glavočike, ambrozija, ruže, bokvice i bagrem.

U raspodeli biljnih familija i vrsta u zavisnosti od geografskog porekla ne postoji neka pravilnost tj većina najzastupljenijih vrsta i familija se javlja u svim delovima Srbije (**Tabela 7**).

Tabela 7. - Raspodela biljnih vrsta i familija u zavisnosti od geografskog porekla uzoraka

| | BGD | VOJ | CS |
|----------------------------------|---|--|--|
| Predominantno zastupljeni poleni | <i>Helianthus</i> (75%) <i>Fraxinus</i> (60%) Fabaceae (81%, 72%, 48%) Brassicaceae (76%, 53%) <i>Sophora</i> (46%) | Brassicaceae (93%), Rannunculaceae (76%), Fabaceae (57%) | Apiaceae (69%), Fabaceae (78%, 50%) |
| Prateći tipovi polena | Brassicaceae (45%, 31%, 19%) <i>Salix</i> (35%), <i>Helianthus</i> (21%), Fabaceae (18%), Moraceae (18%) Asteraceae (18%) | Brassicaceae (34%), Fabaceae (28%), <i>Sophora</i> (42%), <i>Ambrosia</i> (31%), Asteraceae (18%) | Rosaceae (42%), <i>Plantago</i> (35%), Fabaceae (34%, 23%, 19%), <i>Plantago</i> (25%), Brassicaceae (25%), Rannunculaceae (24%), <i>Ambrosia</i> (22%, 19%), <i>Robinia</i> (22%), Asteraceae (18%) |
| Važni izolovani tipovi polena | Rannunculaceae, <i>Zea mays</i> , <i>Rumex</i> , Pinaceae, <i>Juglans</i> , Asteraceae, <i>Vitis</i> , Cannabaceae, Rosaceae, Brassicaceae, <i>Sophora</i> , Lamiaceae, <i>Salix</i> , <i>Tilia</i> , <i>Sambucus</i> , Apiaceae, Fabaceae, <i>Helianthus</i> , <i>Carduus</i> , <i>Plantago</i> , Poaceae, Chenopodiaceae | Moraceae, <i>Helianthus</i> , Rannunculaceae, <i>Tilia</i> , Apiaceae, <i>Artemisia</i> , Brassicaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, <i>Ambrosia</i> , <i>Vitis</i> , Cannabaceae | Apiaceae, <i>Artemisia</i> , Asteraceae, Fabaceae, <i>Zea mays</i> , Rannunculaceae, <i>Tilia</i> , Brassicaceae, Rosaceae, <i>Salix</i> , <i>Vitis</i> , <i>Plantago</i> , <i>Ambrosia</i> , Chenopodiaceae, <i>Cornus</i> |

Polen leguminoza se javlja u svim delovima Srbije bilo kao dominantan, prateći ili važan izolovan tip, kao i polen vrbe. Sa druge strane, polen kupusnjača nije pronađen kao dominantan u Centralnoj Srbiji, ali se javlja u nekim uzorcima iz tog dela Srbije kao prateći ili kao važan izolovani tip polena. Polen suncokreta je pronađen u uzorcima iz Vojvodine i Beograda, dok ga nije bilo u uzorcima iz Centralne Srbije što je i očekivano ako se ima u vidu gde se i kada uzgaja suncokret. Polen japanskog bagrema je pronađen u uzorcima iz Vojvodine i Beograda što ukazuje da se u tom delu Srbije verovatno više koristi kao ukrasno bilje. Polen ljutića je pronađen kao dominantan u uzorcima iz Vojvodine, ali se javlja i u uzorcima iz svih ostalih delova Srbije u manjim procentima. Polen štitonoša je pronađen kao dominantan u uzorcima iz Centralne Srbije, a u ostalim uzorcima se javlja bilo kao prateći tip bilo kao važna izolovana vrsta polena. I biljke iz familija ljutića i štitonoša su poljsko samoniklo bilje koje raste po livadama i pašnjacima pa je za očekivati da se javlja u svim delovima Srbije.

Primećuje se, u okviru datih rezultata, da je u šest uzoraka prisutan polen ambrozije, bilo kao prateći bilo kao važan izolovani tip. Ambrozija je prepoznata kao jedna od najinvazivnijih korovskih biljnih vrsta i kao jedna od biljnih vrsta čiji je polen najjači alergen [Oswalt i Marshall, 2008; Smith *et al.*, 2013].

IV-2 Fizičko-hemijski sastav uzoraka polena

IV-2a Sadržaji vlage i pepela u uzorcima polena

Ukupni sadržaji vlage i pepela, izraženi u g/100g, u ispitivanim uzorcima prikazani su u **Tabeli 8**.

Tabela 8. - Sadržaji vlage i pepela [g/100g] u uzorcima polena*

| Uzorak | Vlaga | Pepeo |
|---------------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 8,92 ± 0,02 | 1,18 ± 0,03 |
| 2 | 10,10 ± 0,12 | 2,45 ± 0,02 |
| 3 | 9,31 ± 0,02 a | 2,69 ± 0,09 a |
| 4 | 10,84 ± 0,04 | 1,93 ± 0,04 b |
| 5 | 11,16 ± 0,04 | 2,60 ± 0,02 c |
| 6 | 9,76 ± 0,03 b,c | 2,98 ± 0,01 |
| 7 | 10,24 ± 0,02 d | 3,26 ± 0,02 d |
| 8 | 9,86 ± 0,03 b | 2,73 ± 0,02 a |
| 9 | 10,58 ± 0,04 | 2,85 ± 0,01 e |
| 10 | 4,35 ± 0,02 | 2,68 ± 0,05 a |
| 11 | 6,80 ± 0,03 | 2,72 ± 0,02 a |
| 12 | 8,53 ± 0,03 f | 2,85 ± 0,04 e |
| 13 | 9,57 ± 0,07 e | 2,57 ± 0,05 c |
| 14 | 11,82 ± 0,04 | 3,32 ± 0,03 d |
| 15 | 11,32 ± 0,03 | 2,34 ± 0,03 f |
| 16 | 8,09 ± 0,11 g | 2,26 ± 0,02 g |
| 17 | 9,35 ± 0,06 a | 2,19 ± 0,04 g,h |
| 18 | 8,53 ± 0,02 f | 1,87 ± 0,03 b |
| 19 | 12,62 ± 0,05 | 1,89 ± 0,06 b |
| 20 | 10,33 ± 0,05 d | 2,20 ± 0,03 g,i |
| 21 | 8,65 ± 0,04 | 2,19 ± 0,05 h,i |
| 22 | 9,54 ± 0,02 e | 2,11 ± 0,03 j |
| 23 | 14,35 ± 0,05 | 1,59 ± 0,05 |
| 24 | 9,65 ± 0,25 c,e | 2,16 ± 0,03 h,i,j |
| 25 | 9,05 ± 0,07 | 2,04 ± 0,06 |
| 26 | 8,18 ± 0,03 g | 2,35 ± 0,04 f |
| min vrednost | 4,35 ± 0,02 | 1,18 ± 0,03 |
| max vrednost | 14,35 ± 0,05 | 3,32 ± 0,03 |

* Rezultati za pepeo su uzrađeni u odnosu na masu suvih a vlage u odnosu na masu vlažnih uzoraka. Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$).

Sadržaj vlage se u uzorcima kretao u opsegu od 4,35 g/100g, koliko je nađeno u uzorku **10** (Sibnica), do 14,35 g/100g u uzorku **23** (Bačka Topola). Srednja vrednost vlage u uzorcima iznosila je 9,7 g/100g.

Srednja vrednost i količina vlage su u većini ispitivanih uzoraka bile iznad gornje vrednosti dozvoljene po našem zakonu, a koja iznosi 8 g/100g [Službeni list Srbije i Crne Gore, 2003]. Na osnovu zakonske regulative sadržaj vlage u ispitivanim uzorcima bio je i iznad dozvoljenih vrednosti u Brazilu [Brasil, Ministério de Saúde, 2001], a

jedino je neznatno bio ispod vrednosti koje su dozvoljene u Kini [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, 2003] i Bugarskoj [Campos *et al.*, 2008] (10%). Visok sadržaj vlage u uzorcima polena je najverovatnije posledica ili neadekvatnih uslova skladištenja uzoraka ili nedovoljnog sušenja uzoraka pri njihovom sakupljanju. S obzirom da prisustvo vlage u većim količinama u materijalima koji se koriste u ishrani može dovesti do razvoja mikroorganizama i fermentacije, bilo bi potrebno da se ova količina vlage svede u zakonski predviđene okvire. Međutim, Bogdanov [Bogdanov, 2012] sugeriše da sadržaj vlage ne bi trebalo da bude ispod 6% jer bi to negativno uticalo na senzorna svojstva polena i da je optimalna vrednost za nju od 6% do 10%.

Prosečan sadržaj vlage u ispitivanim uzorcima polena bio je nešto viši u odnosu na one koje su za uzorke španskog polena dobijali Serra-Bonvehí i saradnici [Serra-Bonvehí *et al.*, 2001; Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] (4,68 - 5,87 g/100g) i Orzáez-Villanueva i saradnici [Orzáez-Villanueva *et al.*, 2001] (7,14 ± 1,71 g%), odnosno, Almeida sa saradnicima [Almeida *et al.*, 2005] za uzorke polena iz južnog Brazila (7,5%). Međutim, sa druge strane Modro-va sa saradnicima [Modro *et al.*, 2007] je za druge uzorke brazilskih polena našla znatno viši sadržaj vlage (27%), a tako visoke vrednosti u uzorcima polena našli su i neki drugi istraživači za uzorke polena iz Amerike (18,8 - 28%) [Herbert i Shimanuki, 1978,] odnosno sa Novog Zelanda (16 - 21 g/100g) [Human i Nicolson, 2013]. Carpes-ova [Carpes *et al.*, 2009] je utvrdila da su se vrednosti za vlagu u brazilskim uzorcima polena kretale u opsegu od 1,69% do 7,84% pri čemu je čak 47% uzoraka prevazilazilo gornju granicu dozvoljenih vrednosti za sadržaj vlage po brazilskim propisima.

Sadržaj pepela u ispitivanim uzorcima kretao se u intervalu od 1,18 g/100g koliko je sadržavao prvi uzorak iz Beograda do 3,32 g/100g koliko je izmereno za uzorak broj **14** koji je vodio poreklo z Smedereva. Može se uočiti da je količina pepela u ispitivanim uzorcima bila znatno ujednačenija u odnosu na sadržaj vlage. Ako se dobijene vrednosti uporede sa dozvoljenim vrednostima za sadržaj pepela u uzorcima polena (koji se kretao od 2 g/100g do 6 g/100g uzorka [Campos *et al.*, 2008]) vidimo da se ispitivani uzorci nalaze na donjoj granici tih vrednosti ili ispod nje. Dobijeni rezultati su bili slični rezultatima koje su dobili Serra-Bonvehí i Jordá-ijeva (1,93 g/100g) [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] kao i rezultatima Nogueira-ove i

saradnika [Nogueira *et al.*, 2012] koji su u polenima našli sadržaj pepela u opsegu od 0,5 g/100g do 3,16 g/100g uzorka. I Human-ova i Nicolson-ova [Human i Nicolson, 2006] daju rezultate o sadržaju pepela u uzorcima polena sa vrednostima nešto iznad 1% za polen koji su sakupile medonosne pčele. Prema dosadašnjim istraživanjima najveći uticaj na sadržaj pepela u uzorcima polena ima njihovo botaničko i geografsko poreklo, i to pre svega hemijski sastav zemljišta na kome raste medonosno bilje [Campos *et al.*, 2008; Orzáez-Villanueva *et al.*, 2001]. Osim toga, Nogueira-ova [Nogueira *et al.*, 2012] ističe i mogućnost nedovoljno efikasne procedure čišćenja uzoraka polena pri njihovom sakupljanju što može uticati na povećanje sadržaja mineralnih materija, a samim time, i pepela u njima.

IV-2b Sadržaji makro- i mikroelemenata u uzorcima polena

Ukupni sadržaji makro- i mikroelemenata, izraženi u mg kg⁻¹, u ispitivanim uzorcima prikazani su u **Tabelama 9 i 10**.

Najzastupljeniji makroelement je bio kalijum. Njegov sadržaj se kretao u rasponu od 2462 do 4236 mg kg⁻¹ sa prosečnom vrednošću od 3391 mg kg⁻¹. Najmanje količine su pronađene u uzorku broj **4** (Beograd), dok je najviše ovog elementa bilo u uzorku iz Valjeva (broj **7**). Drugi po zastupljenosti je bio kalcijum (855,5 - 2032 mg kg⁻¹) sa prosečnim sadržajem od 1425 mg kg⁻¹. Najveći sadržaj ovog elementa je nađen u uzorku broj **12** (Mala Krsna) dok se sa minimalnom količinom kalcijuma odlikovao uzorak broj **23** (Bačka Topola).

Sadržaj magnezijuma je bio nešto ujednačeniji u uzorcima i kretao se u opsegu od 503 mg kg⁻¹ do 964 mg kg⁻¹ (prosečna vrednost je bila 749 mg kg⁻¹) pri čemu je minimalna količina ovog elementa bila u uzorku iz Beograda koji se odlikovao i najmanjim sadržajem kalijuma (br. **4**), a maksimalni sadržaj magnezijuma je pronađen u uzorku iz Male Krsne (br. **12**), koji je imao i najviši sadržaj kalcijuma, kao i u uzorku iz Šapca (br. **9**). Ako se uporede botaničko poreklo uzoraka i sadržaj ova tri najzastupljenija elementa može se uočiti da je najveći sadržaj kalijuma registrovan u uzorku br. **7** čiji je polen poticao od polena bokvice (25%) i ambrozije (22%), dok je minimalni sadržaj kalijuma zabeležen u uzorku koji je dominantno sadržavao polen suncokreta (br. **4**, 75%). Poleni biljaka iz familije

kupusnjača mogu se okarakterisati kao bogati kalcijumom, jer su tri uzorka sa najviše ovog elementa (**2**, **12** i **17**) predominantno sadržavala polen biljaka iz ove familije.. Sa druge strane, možemo reći da je polen japanskog bagrema siromašan kalcijumom. Po sadržaju magnezijuma, kao bogate, možemo izdvojiti uzorke koji su pretežno poticali od biljaka iz familija kupusnjača i leguminoza dok je polen suncokreta bio siromašan i ovim elementom baš kao i u slučaju kalijuma.

Sadržaj gvožđa, kao sledećeg po zastupljenosti makroelementa, bio je u intervalu 40 – 141 mg kg⁻¹ pri čemu je srednja vrednost u uzorcima iznosila 70,1 mg kg⁻¹. Najmanje količine ovog elementa su utvrđene u uzorku broj **22** (Zrenjanin) dok su najveće količine izmerene u uzorku broj **4** (Beograd) potpuno suprotno njegovom minimalnom sadržaju kalijuma i magnezijuma.

Tabela 9. - Sadržaji makroelemenata [mg kg⁻¹] u uzorcima polena*

| metali uzorak | K | Ca | Mg | Fe | Al | Mn | Zn | Na |
|------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 3616,3 ± 28,7 a | 921,6 ± 4,6 a | 747,6 ± 4,7 a | 100,39 ± 0,02 a | 53,67 ± 0,22 | 31,94 ± 0,22 | 57,5 ± 0,4 | 27,5 ± 0,3 |
| 2 | 3241,3 ± 25,7 b | 1739 ± 14 b | 831,8 ± 4,2 b | 48,3 ± 0,2 b | 27,8 ± 0,1 | 18,88 ± 0,30 a | 36,9 ± 0,4 | 26,75 ± 0,16 |
| 3 | 3389 ± 22,5 cd | 1461,7 ± 11,1 c | 928,4 ± 4,1 c | 83,1 ± 0,3 | 100,8 ± 0,4 | 18,38 ± 0,22 | 36,59 ± 0,06 | 54,9 ± 0,6 |
| 4 | 2462,0 ± 6,2 | 1188,6 ± 14,5 d | 502,8 ± 2,8 | 141,3 ± 0,7 | 112,0 ± 0,4 | 16,16 ± 0,31 b | 44,9 ± 0,6 | 5,84 ± 0,08 |
| 5 | 3420,2 ± 7,3 c | 1500,4 ± 19,9 e | 819,8 ± 6,7 b | 74,1 ± 0,3 | 36,2 ± 0,2 | 32,66 ± 0,51 | 40,36 ± 0,06 a | 17,7 ± 0,3 |
| 6 | 3404,4 ± 6,7 c | 1196 ± 7 d | 595 ± 3 d | 56,9 ± 0,2 | 10,97 ± 0,05 | 22,75 ± 0,22 | 41,2 ± 0,4 b | 15,11 ± 0,07 |
| 7 | 4235,7 ± 14,6 | 1454,5 ± 7,0 c | 829 ± 4 b | 100,1 ± 0,2 a | 27,11 ± 0,02 a | 47,26 ± 0,22 | 75,9 ± 0,1 | 19,44 ± 0,01 a |
| 8 | 3507,6 ± 21,1 e | 1438 ± 12 c | 963,4 ± 4,3 e | 60,3 ± 0,3 | 29,3 ± 0,1 | 21,97 ± 0,37 c | 38,1 ± 0,2 | 16,63 ± 0,02 |
| 9 | 3562,4 ± 5,1 f | 1587,5 ± 1,9 f | 964,1 ± 6,1 e | 64,1 ± 0,1 c | 27,1 ± 0,1 a | 23,40 ± 0,17 | 39,8 ± 0,2 | 16,4 ± 0,2 |
| 10 | 3045,7 ± 15,3 | 1280,6 ± 9,6 | 622,6 ± 3,0 f | 79,6 ± 0,4 | 62,1 ± 0,1 | 19,89 ± 0,28 | 43,9 ± 0,2 c | 14,9 ± 0,1 |
| 11 | 3637,0 ± 28,2 ag | 1903 ± 19 | 941,3 ± 11,1 c | 74,8 ± 0,3 | 24,7 ± 0,1 | 20,45 ± 0,35 | 37,4 ± 0,1 | 29,3 ± 0,3 |
| 12 | 3664,1 ± 5,8 g | 2032 ± 11 g | 964,3 ± 7,0 e | 52,5 ± 0,3 | 21,6 ± 0,1 | 21,32 ± 0,33 d | 31,7 ± 0,2 | 25,8 ± 0,2 |
| 14 | 3512 ± 37 ef | 1236,3 ± 11,6 h | 875 ± 4 | 93,6 ± 0,6 | 61,4 ± 0,3 | 18,96 ± 0,22 a | 40,74 ± 0,05 d | 34,7 ± 0,2 b |
| 15 | 3384 ± 8 d | 1776,9 ± 17,5 i | 750,6 ± 1,5 a | 68,44 ± 0,06 d | 16,8 ± 0,1 b | 92,23 ± 1,51 | 40,9 ± 0,5 b,d | 15,5 ± 0,7 |
| 16 | 3710,9 ± 4,4 h | 973 ± 7 | 657,1 ± 5,8 g | 48,1 ± 0,1 b | 8,50 ± 0,06 | 21,73 ± 0,21 c | 43,7 ± 0,5 c | 21,3 ± 0,2 |
| 17 | 3240 ± 7 b | 2003,3 ± 22,0 g | 734,7 ± 6,7 ah | 66,1 ± 0,3 | 31,7 ± 0,1 c | 21,12 ± 0,21 d | 41,1 ± 0,5 b | 14,7 ± 0,2 |
| 18 | 2740 ± 16 | 1747,9 ± 21,1 bj | 584,7 ± 5,8 d | 53,6 ± 0,1 e | 28,52 ± 0,02 | 13,52 ± 0,05 | 28,8 ± 0,2 | 34,6 ± 0,6 b |
| 19 | 3186,1 ± 32,3 b | 1034,9 ± 6,5 | 619,6 ± 3,0 f | 44,1 ± 0,1 | 26,57 ± 0,02 | 15,47 ± 0,09 | 39,0 ± 0,4 e | 19,5 ± 0,9 ac |
| 20 | 3536,1 ± 14,1 e | 1581,4 ± 7,3 f | 776,1 ± 6,9 | 53,6 ± 0,1 e | 26,93 ± 0,11 a | 17,99 ± 0,15 e | 34,8 ± 0,3 | 21,57 ± 0,09 |
| 21 | 3675 ± 24 gh | 1733,9 ± 14,4 b | 650,1 ± 3,4 g | 68,5 ± 0,1 d | 42,0 ± 0,1 | 17,67 ± 0,07 | 40,3 ± 0,2 a | 23,4 ± 0,2 |
| 22 | 3219,0 ± 16,1 b | 1228,7 ± 7,1 h | 702,5 ± 2,5 | 39,6 ± 0,2 | 16,6 ± 0,1 b | 13,81 ± 0,14 | 41,9 ± 0,5 | 21,7 ± 0,2 |
| 23 | 2662,5 ± 6,5 | 855,5 ± 8,3 | 552,6 ± 1,7 | 114,9 ± 0,1 | 90,05 ± 0,04 | 14,91 ± 0,08 | 39,05 ± 0,05 e | 4,95 ± 0,05 |
| 24 | 3819,7 ± 19,9 i | 1307,6 ± 12,3 | 847,7 ± 2,8 | 54,6 ± 0,1 | 22,1 ± 0,1 | 18,12 ± 0,24 e | 48,5 ± 0,5 | 19,6 ± 0,2 c |
| 25 | 3126,7 ± 7,3 | 920,9 ± 2,4 a | 534 ± 3 | 46,8 ± 0,2 | 31,6 ± 0,1 c | 15,08 ± 0,13 | 44,4 ± 0,2 | 8,21 ± 0,06 |
| 26 | 3787,6 ± 16,8 i | 1532,4 ± 8,1 e | 730,9 ± 3,6 h | 63,9 ± 0,3 c | 30,35 ± 0,06 | 16,13 ± 0,39 b | 33,3 ± 0,2 | 30,8 ± 0,1 |
| min vrednost | 2462,0 ± 6,2 | 855,5 ± 8,3 | 502,8 ± 2,8 | 39,6 ± 0,2 | 8,50 ± 0,06 | 13,52 ± 0,05 | 28,8 ± 0,2 | 4,95 ± 0,05 |
| max vrednost | 4235,7 ± 14,6 | 2032 ± 11 | 964,3 ± 7,0 | 141,3 ± 0,7 | 112,0 ± 0,4 | 92,23 ± 1,51 | 75,9 ± 0,1 | 54,9 ± 0,6 |

* Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali (p < 0,05).

Sledeći po zastupljenosti od makroelemenata je bio aluminijum. Po sadržaju ovog elementa, koji je bio u sličnom rasponu vrednosti kao i sadržaj gvožđa, izdvojili su se uzorak iz Valjeva (br. **16**) sa svega 8,5 mg kg⁻¹ ovog elementa dok je, ponovo, uzorak broj **4** (Beograd) zapažen kao onaj u kome je sadržaj aluminijuma bio više nego 10-ostruko veći (112 mg kg⁻¹). Prosečna zastupljenost aluminijuma u uzorcima je iznosila 38,6 mg kg⁻¹.

Od preostala tri makroelementa (Mn, Zn i Na) mangan je bio najzastupljeniji u uzorku broj **15** (Gunjaci, 92 mg kg⁻¹) a najmanje ga je bilo u uzorku broj **18** (Šid, 13,5 mg kg⁻¹); cinka je najviše bilo u uzorku iz Valjeva (7,76 mg kg⁻¹), a najmanje u uzorku iz Šida (18,29 mg kg⁻¹) koji je imao i najniži sadržaj mangana. Na kraju, po sadržaju natrijuma možemo izdvojiti uzorak broj **3**, iz Borče (55 mg kg⁻¹), kao najbogatiji ovim elementom, odnosno uzorak broj **23** iz Bačke Topole, koji je već izdvojen kao najsiromašniji kalcijumom a koji se pokazao i kao uzorak sa minimalnom količinom natrijuma (55 mg kg⁻¹). Ako se posmatraju srednje vrednosti sadržaja za ova tri elementa one su iznosile – 41,6 mg kg⁻¹ za cink, 23,7 mg kg⁻¹ za mangan i 21,6 mg kg⁻¹ natrijuma u uzorcima. Prateći povezanost pojave ovih elemenata sa botaničkim poreklom uzoraka ne uočava se nikakva posebna pravilnost osim što se može reći da su uzorci koji su, pretežno, poticali od suncokreta i japanskog bagrema bili siromašni po sadržaju natrijuma.

Tabela 10. - Sadržaji mikroelemenata [mg kg⁻¹] u uzorcima polena*

| metali uzorak | Cu | Ba | Ni | Sr | Cd | Co | Cr |
|------------------|---------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | 5,78 ± 0,03 | 1,763 ± 0,004 | 1,513 ± 0,021 | 0,730 ± 0,008 | 0,099 ± 0,008 | 0,098 ± 0,001 | 0,46 ± 0,01 |
| 2 | 7,90 ± 0,08 | 0,665 ± 0,003 | 1,14 ± 0,02 a | 0,957 ± 0,009 | 0,066 ± 0,004 a | 0,033 ± 0,004 a | 0,21 ± 0,01 a,g |
| 3 | 7,59 ± 0,05 | 1,244 ± 0,002 | 0,44 ± 0,02 | 1,60 ± 0,02 a | 0,055 ± 0,003 b,c | 0,036 ± 0,005 a,b | 0,26 ± 0,02 b |
| 4 | 6,3 ± 0,1 a | 0,931 ± 0,005 | 0,252 ± 0,006 | 0,82 ± 0,01 | 0,045 ± 0,009 d,e | 0,049 ± 0,004 c | 0,332 ± 0,007 |
| 5 | 7,363 ± 0,096 b | 1,54 ± 0,01 | 1,00 ± 0,02 | 0,92 ± 0,02 | 0,142 ± 0,012 | 0,047 ± 0,001 c | 0,26 ± 0,02 b |
| 6 | 6,60 ± 0,06 | 2,047 ± 0,005 | 0,72 ± 0,01 b | 1,639 ± 0,008 | 0,055 ± 0,002 b | 0,030 ± 0,002 a,d | 0,17 ± 0,02 c |
| 7 | 9,12 ± 0,04 | 6,098 ± 0,004 | 0,94 ± 0,02 | 3,37 ± 0,01 | 0,228 ± 0,001 | 0,083 ± 0,002 e | 0,27 ± 0,03 b |
| 8 | 8,08 ± 0,13 | 0,649 ± 0,0204 | 0,41 ± 0,03 | 1,15 ± 0,01 | 0,044 ± 0,001 d | 0,033 ± 0,003 a | 0,23 ± 0,02 d,e |
| 9 | 10,29 ± 0,05 c | 0,728 ± 0,003 | 0,71 ± 0,01 b | 1,172 ± 0,005 b | 0,054 ± 0,007 b,c,f | 0,029 ± 0,005 a,f | 0,24 ± 0,02 d |
| 10 | 6,78 ± 0,07 | 0,905 ± 0,001 | 0,37 ± 0,02 c | 1,18 ± 0,13 b | 0,048 ± 0,005 e | 0,090 ± 0,005 e | 0,249 ± 0,002 d |
| 11 | 9,8 ± 0,2 | 1,039 ± 0,005 | 1,26 ± 0,01 | 1,78 ± 0,02 | 0,057 ± 0,002 c | 0,024 ± 0,004 a | 0,24 ± 0,01 d |
| 12 | 8,9 ± 0,1 | 0,383 ± 0,003 | 0,35 ± 0,01 | 0,746 ± 0,009 | 0,050 ± 0,002 e,f | 0,016 ± 0,002 g | 0,23 ± 0,02 e |
| 14 | 7,326 ± 0,098 b | 0,77 ± 0,01 | 0,300 ± 0,008 d | 3,06 ± 0,02 | 0,044 ± 0,002 d | 0,042 ± 0,001 b | 0,27 ± 0,01 b |
| 15 | 8,62 ± 0,05 | 2,64 ± 0,02 | 2,23 ± 0,03 | 1,198 ± 0,005 | 0,167 ± 0,004 | 0,058 ± 0,005 c | 0,20 ± 0,01 a,f |
| 16 | 6,08 ± 0,05 | 1,84 ± 0,02 | 0,75 ± 0,03 | 1,032 ± 0,008 | 0,049 ± 0,005 e,f | 0,036 ± 0,001 a | 0,17 ± 0,01 c |
| 17 | 10,74 ± 0,07 | 0,94 ± 0,01 | 0,29 ± 0,02 d | 3,06 ± 0,03 | 0,039 ± 0,004 d | 0,017 ± 0,008 a,d,f,g | 0,21 ± 0,01 g |
| 18 | 8,52 ± 0,04 | 0,630 ± 0,004 | 0,81 ± 0,01 e | 0,878 ± 0,002 | 0,048 ± 0,005 d,f | 0,026 ± 0,003 a | 0,17 ± 0,02 c |
| 19 | 6,25 ± 0,07 a | 0,567 ± 0,004 | 0,56 ± 0,02 | 0,858 ± 0,003 | 0,053 ± 0,002 f | 0,029 ± 0,003 a | 0,19 ± 0,01 f,i |
| 20 | 8,67 ± 0,05 | 0,681 ± 0,005 | 0,65 ± 0,02 | 1,076 ± 0,006 c | 0,050 ± 0,002 e | 0,024 ± 0,002 a,f | 0,21 ± 0,02 a,g,h |
| 21 | 10,4 ± 0,1 c | 1,306 ± 0,008 | 1,12 ± 0,02 a | 2,30 ± 0,01 | 0,061 ± 0,009 a,b,c | 0,030 ± 0,001 a | 0,21 ± 0,01 a,g |
| 22 | 6,86 ± 0,07 | 0,760 ± 0,004 | 0,367 ± 0,004 c | 1,59 ± 0,01 a | 0,067 ± 0,004 a | 0,017 ± 0,010 g | 0,17 ± 0,01 c |
| 23 | 4,40 ± 0,04 | 0,782 ± 0,001 | 0,23 ± 0,02 | 0,906 ± 0,004 | 0,028 ± 0,003 | 0,035 ± 0,002 a | 0,29 ± 0,02 |
| 24 | 8,21 ± 0,08 d | 0,597 ± 0,008 | 0,80 ± 0,02 e | 1,07 ± 0,01 c | 0,056 ± 0,004 b,c | 0,031 ± 0,004 a | 0,196 ± 0,006 f,h |
| 25 | 5,26 ± 0,05 | 0,465 ± 0,007 | 0,543 ± 0,003 | 0,510 ± 0,004 | 0,046 ± 0,011 d,f | 0,0130 ± 0,005 g | 0,20 ± 0,01 a,h |
| 26 | 8,3 ± 0,2 d | 0,640 ± 0,009 | 1,14 ± 0,02 a | 0,67 ± 0,01 | 0,036 ± 0,004 | 0,030 ± 0,006 | 0,21 ± 0,03 a,e,g,h,i |
| min vrednost | 4,40 ± 0,04 | 0,383 ± 0,003 | 0,23 ± 0,02 | 0,730 ± 0,008 | 0,028 ± 0,003 | 0,0130 ± 0,005 | 0,17 ± 0,01 |
| max vrednost | 10,74 ± 0,07 | 6,098 ± 0,004 | 2,23 ± 0,03 | 3,37 ± 0,01 | 0,228 ± 0,001 | 0,098 ± 0,001 | 0,46 ± 0,01 |

*Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali (p < 0,05).

Rezultati koji su dobijeni, o zastupljenosti makroelemenata u ispitivanim uzorcima, su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Carpes-ova i njeni saradnici [Carpes *et al.*, 2009], kao i Morgano sa saradnicima [Morgano *et al.*, 2012] za uzorke polena iz Brazila u kojima su tri najzastupljenija metala bili, takođe, kalijum, kalcijum i

magnezijum. Isti redosled zastupljenosti ovih makroelemenata su pronašli i Yang i saradnici u kineskim uzorcima polena [Yang *et al.*, 2013]. Ako se dobijeni rezultati uporede i sa rezultatima koje su dobili Stanciu i njegove kolege [Stanciu *et al.*, 2011] ponovo se može uočiti saglasnost u zastupljenosti tri navedena glavna makroelementa. Gledano količinski, prosečan sadržaj kalijuma u uzorcima je bio jedan i po do dva puta manji u odnosu na vrednost koju su dobili Yang (5324 mg kg⁻¹) i Carpes-ova sa saradnicima (5117 mg kg⁻¹). Sadržaj kalcijuma je bio između vrednosti koje su oni dobili (2068 mg kg⁻¹ tj 1031 mg kg⁻¹ Ca), a po sadržaju magnezijuma ispitivani uzorci su bili gotovo identični uzorcima Carpes-ove (755 mg kg⁻¹), dok je Yang sa saradnicima pronašao dvostrukoveću prosečnu zastupljenost Mg u uzorcima kineskih polena (1449 mg kg⁻¹). Velike varijacije u sadržaju ovih elemenata autori dovode u vezu sa razlikama u botaničkom poreklu uzoraka.

Kada su u pitanju ostali metali koji su u uzorcima polena bili prisutni kao makroelementi može se uočiti da je natrijum znatno manje zastupljen u odnosu na rezultate drugih istraživača. Tako je u uzorcima španskih polena, koje su ispitivali Orzáez-Villanueva i njene kolege [Orzáez-Villanueva *et al.*, 2001, 2002], natrijum bio drugi po zastupljenosti od makroelemenata, odmah iza kalijuma i to sa prosečnim sadržajem od 582 mg kg⁻¹ što je daleko više (10 puta) od maksimalnog sadržaja natrijuma detektovanog u uzorku br. 3 (55 mg kg⁻¹). Znatno veću zastupljenost natrijuma, u odnosu na ispitivane uzorke, pronašli su Szczęśna [2007] i Yang sa saradnicima [Yang *et al.*, 2013]. Sa druge strane, nizak sadržaj natrijuma u uzorcima polena pronašao je i Morgano sa saradnicima [Morgano *et al.*, 2012] koji je natrijum svrstao u mikroelemente. Po sadržajima gvožđa, mangana i cinka ispitivani uzorci polena su bili u saglasnosti sa rezultatima Orzáez-Villanueva-e i saradnika, dok je prosečan sadržaj gvožđa i mangana bio neznatno viši u kineskim uzorcima polena [Yang *et al.*, 2013]. Sadržaj cinka je bio u saglasnosti i sa ovim rezultatima. Serra-Bonvehí i Jordá [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997], ističu važnost gvožđa i cinka kao dva elementa neophodna u ljudskoj ishrani, a koje je polen sadržavao u količini od 15% potrebnog dnevnog unosa za odraslog čoveka (39,2 mg kg⁻¹ za Fe tj 33,9 mg kg⁻¹ za Zn). U tom smislu, oni naglašavaju da je polen znatno bogatiji ovim važnim makroelementima i pogodniji za upotrebu u ishrani od drugih pčelinjih proizvoda. Poređenjem vrednosti potrebnog dnevnog unosa ova

dva elementa sa vrednostima dobijenim za ispitivane uzorke polena uočava se da bi na ovaj odrasla osoba obezbedila čak 30% dnevnih potreba za unosom gvožđa tj. 15% za cink. Po sadržaju aluminijuma samo dva uzorka polena su sadržavala ovaj element u količinama većim od 100 mg kg^{-1} dok je u svim ostalim uzorcima njegov sadržaj bio znatno niži. Ovakvi rezultati su zadovoljavajući, jer Campos-eva sa saradnicima [Campos *et al.*, 2008] kao jedan od velikih problema u uzorcima koje su oni ispitivali ističe upravo to što je sadržaj ovog elementa u svima bio veći od ove granice, a slične podatke za aluminijum nalazimo i u Morgano-ovom radu [Morgano *et al.*, 2010]. Naime, veliki problem sa ovim elementom je što je on neurotoksičan i može da utiče na reproduktivnost ljudi. Zbog toga se preterana konzumacija ovakvog polena ne preporučuje starijim ljudima, trudnicama i deci. Imajući u vidu da su oba uzorka u kojima je detektovan povišen sadržaj ovog elementa (br. 3 i br. 4) geografski vodili poreklo iz regiona grada Beograda moguće je da je to uzrok njihove kontaminacije aluminijumom. Ako se ima u vidu da je Beograd, kao glavni grad, industrijski i trgovački centar Srbije, moguće je da je pod antropogenim uticajem došlo do zagađenja ako su uzorci prikupljeni u urbanoj zoni grada. Ono što Somerville i Nicol-ova ističu [Somerville i Nicol, 2002], osim velikog variranja u sadržaju svih elemenata zastupljenih u polenu u zavisnosti od njegovog botaničkog porekla, jeste i to da je koncentracija svih elemenata u polenu znatno viša u odnosu na koncentracije u medu. Razlog tome može biti i činjenica da u toku transporta do košnice pčele polen vlaže nektarom odakle može da potiče deo elemenata identifikovanih u polenu.

Analizom sadržaja mikroelemenata po zastupljenosti, na prvom mestu se izdvojio bakar ($4,4 - 10,7 \text{ mg kg}^{-1}$) sa prosečnim sadržajem u uzorcima od $7,8 \text{ mg kg}^{-1}$. Ovakav sadržaj bakra je skoro devet puta veći od prosečnog sadržaja ovog elementa u uzorcima polena iz Španije ($0,89 \text{ mg kg}^{-1}$) [Orzáez-Villanueva *et al.*, 2001, 2002], dvostrukoveći od sadržaja koje je dobila Szczęsna [2007] i čak sto puta više od rezultata koje su dobili Morgano i saradnici za brazilske uzorke polena [Morgano *et al.*, 2012]. Sa druge strane, po sadržaju bakra uzorci polena iz Kine [Yang *et al.*, 2013] su bili više nego dvostrukobogatiji ($17,35 \text{ mg kg}^{-1}$). Ako posmatramo pojedinačno, po uzorcima, najveća količina bakra ($10,7 \text{ mg kg}^{-1}$) je pronađena u uzorku broj 17 koji je poticao sa Petrovaradina, dok je najmanje

bakra bilo u uzorku broj **23**, poreklom iz Bačke Topole. U njemu je pronađeno 4,4 mg kg⁻¹ ovog elementa. Sadržaj stroncijuma, za koji nisu pronađeni podaci da je određivan ranije u uzorcima polena, iznosio je u proseku 1,38 mg kg⁻¹. Maksimalna količina ovog mikroelementa, izmerena u ispitivanim uzorcima, bila je 3,4 mg kg⁻¹ (br. **7**, Valjevo) a minimalna 0,73 mg kg⁻¹ (br. **1**, Beograd). U sličnim količinama (1,22 mg kg⁻¹) pronađen je i barijum. Imajući u vidu da se ova dva elementa često „prate“ u zemljištu [Warren *et al.*, 1974] i na sličnost u veličini Sr²⁺ i Ba²⁺ jona, moguće je da dođe do zamene u mineralima jednog elementa drugim [Krejci *et al.*, 2011a]. Na taj način biljka može da ih zajedno usvoji preko korenovog sistema [Krejci *et al.*, 2011b] zbog čega je moguće i da im koncentracije u biljci, pa i u polenovom zrnju, budu slične. Posmatrano po uzorcima, najveći i najmanji sadržaj barijuma je bio u uzorku broj **7** (6,1 mg kg⁻¹) odnosno **12** (0,38 mg kg⁻¹). Na osnovu ovih vrednosti možemo da kažemo da je deo uzoraka sa većim sadržajem ovog elementa bio u saglasnosti sa rezultatima koje su, za sadržaj barijuma u brazilskim polenima, dobili Morgano i saradnici (2,78 – 17,63 mg kg⁻¹), dok su uzorci sa nešto nižim sadržajem bili ispod dobijenih vrednosti. S obzirom na potencijalnu toksičnost ova dva elementa po čoveka [Schroeder *et al.*, 1972; Toccalino *et al.*, 2012] jasno je da njihovo prisustvo u uzorcima polena nije poželjno.

Prosečan sadržaj nikla u ispitivanim uzorcima je iznosio 0,76 mg kg⁻¹ sa maksimalnom vrednošću od 2,23 mg kg⁻¹ (uzorak broj **15**, Gunjaci) i minimalnom vrednošću od 0,228 mg kg⁻¹ pronađenom u uzorku iz Bačke Topole. Ako se ove vrednosti uporede sa rezultatima za uzorke brazilskog polena [Morgano *et al.*, 2012], a u kojima se sadržaj ovog mikroelementa kretao u opsegu od 0,1 - 1,13 mg kg⁻¹, zaključuje se da je sadržaj nikla bio neznatno viši u pojedinim uzorcima polena.

Za preostala tri mikroelementa (Cr, Cd i Co) možemo reći da su bili prisutni u minimalnim količinama ili u tragovima (prosečni sadržaji: Cr- 0,234 mg kg⁻¹; Cd- 0,067 mg kg⁻¹ i Co- 0,038 mg kg⁻¹). Ovi rezultati su bili u skladu sa rezultatima koje su dobili Morgano i saradnici u slučaju kadmijuma (0,003 - 0,233 mg kg⁻¹) ili nešto niži za hrom (0,01 - 2,32 mg kg⁻¹) i kobalt (0,01 - 1,11 mg kg⁻¹). Takođe, prosečna vrednost sadržaja kadmijuma je bila u skladu sa predloženim standardnim vrednostima za ovaj metal [Campos *et al.*, 2008], a koja iznosi manje od 0,1 mg kg⁻¹ i koja je jako niska ako se ima u vidu njegova toksičnost. Samo tri uzorka su sadržavala kadmijum

iznad dozvoljene granice i to: uzorak broj 7 (0,228 mg kg⁻¹), uzorak broj 15 (0,167 mg kg⁻¹) i uzorak broj 5 (0,142 mg kg⁻¹). Veoma je moguće da je u svim ovim uzorcima uzrok kontaminacije bio antropogen tj. da su poleni prikupljeni u području blizu nekog industrijskog postrojenja, naseljenog mesta ili saobraćajnice.

U **Tabeli 11** dati su rezultati korelacione analize za sadržaj makro- i mikroelemenata u uzorcima polena.

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da je sadržaj aluminijuma u značajnoj srednjoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem hroma (0,60) kao i u značajno jakoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem gvožđa (0,80). Sa druge strane, sadržaj ovog elementa je bio u značajnoj srednjoj negativnoj korelaciji sa sadržajem kalijuma (-0,52). Sadržaj barijuma u svim uzorcima je bio u značajno jakoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem cinka (0,80) kao i u značajnim srednjim pozitivnim korelacijama sa sadržajima mangana (0,60) kobalta (0,53) i stroncijuma (0,50). Sadržaj magnezijuma se nalazio u značajno jakoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem bakra (0,84) i u značajnoj srednjoj korelaciji sa sadržajem kalcijuma u uzorcima (0,51).

Tabela 11. - Rezultati korelacione analize za sadržaj makro i mikroelemenata u uzorcima polena

| | Al | Ba | Ca | Cd | Co | Cr | Cu | Fe | Zn | Sr | Ni | Na | Mn | Mg | K |
|----|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Al | / | -0,11 | -0,29 | -0,22 | 0,25 | 0,60* | -0,30 | 0,80* | 0,04 | 0,02 | -0,35 | 0,08 | -0,20 | -0,22 | -0,52* |
| Ba | -0,11 | / | -0,02 | 0,41 | 0,53* | 0,15 | 0,14 | 0,31 | 0,80* | 0,50* | 0,38 | -0,04 | 0,60* | 0,02 | 0,46 |
| Ca | -0,29 | -0,02 | / | 0,11 | -0,26 | -0,28 | 0,84* | -0,24 | -0,35 | 0,28 | 0,24 | 0,29 | 0,20 | 0,51* | 0,23 |
| Cd | -0,22 | 0,41 | 0,11 | / | 0,46 | 0,10 | -0,12 | -0,09 | 0,27 | 0,17 | 0,23 | -0,08 | 0,37 | 0,24 | 0,29 |
| Co | 0,26 | 0,53* | -0,26 | 0,46 | / | 0,64* | -0,25 | 0,48 | 0,62* | 0,09 | 0,30 | -0,05 | 0,42 | -0,02 | 0,14 |
| Cr | 0,60* | 0,15 | -0,28 | 0,10 | 0,64* | / | -0,25 | 0,74* | 0,41 | -0,04 | 0,07 | 0,01 | 0,07 | 0,08 | -0,06 |
| Cu | -0,30 | 0,14 | 0,84* | -0,12 | -0,25 | -0,25 | / | -0,14 | -0,06 | 0,46 | 0,26 | 0,26 | 0,19 | 0,48 | 0,43 |
| Fe | 0,80* | 0,31 | -0,24 | -0,09 | 0,48 | 0,74* | -0,14 | / | 0,41 | 0,19 | -0,06 | -0,13 | 0,13 | -0,19 | -0,27 |
| Zn | 0,04 | 0,80* | -0,35 | 0,27 | 0,62* | 0,41 | -0,06 | 0,41 | / | 0,41 | 0,17 | -0,22 | 0,34 | -0,06 | 0,39 |
| Sr | -0,02 | 0,50* | 0,28 | 0,17 | 0,09 | -0,04 | 0,46 | 0,19 | 0,41 | / | -0,10 | 0,15 | 0,14 | 0,22 | 0,35 |
| Ni | -0,35 | 0,37 | 0,24 | 0,23 | 0,30 | 0,07 | 0,26 | -0,06 | 0,17 | -0,10 | / | 0,13 | 0,72* | 0,10 | 0,36 |
| Na | 0,08 | -0,04 | 0,29 | -0,08 | -0,05 | 0,01 | 0,26 | -0,13 | -0,22 | 0,15 | 0,13 | / | -0,12 | 0,46 | 0,31 |
| Mn | -0,20 | 0,60* | 0,20 | 0,37 | 0,42 | 0,08 | 0,19 | 0,13 | 0,34 | 0,14 | 0,72* | -0,12 | / | 0,14 | 0,25 |
| Mg | -0,22 | 0,02 | 0,51* | 0,24 | -0,02 | 0,08 | 0,48 | -0,19 | -0,06 | 0,22 | 0,10 | 0,46 | 0,14 | / | 0,62* |
| K | -0,52* | 0,46 | 0,23 | 0,29 | 0,14 | -0,06 | 0,43 | -0,27 | 0,39 | 0,35 | 0,36 | 0,31 | 0,25 | 0,62* | / |

* značajne srednje ($r = 0,50-0,70$) i jake korelacije ($r > 0,70$).

Sadržaj kobalta je bio u značajnoj srednjoj pozitivnoj korelaciji sa rezultatima za sadržaje hroma (0,64) i cinka (0,62), dok je prisustvo hroma u uzorcima bilo u značajno jakoj korelaciji sa sadržajem gvožđa (0,74). Značajne srednje pozitivne koorelacije pokazali su još sadržaji nikla i mangana (0,60) kao i magnezijuma i kalijuma (0,62). Jedini element čiji rezultati se nisu mogli dovesti u pouzdanu vezu ni sa jednim drugim elementom u ispitivanim uzorcima je bio kadmijum.

IV-2c Sadržaj proteina u uzorcima polena

Ukupni sadržaj proteina u ispitivanim uzorcima polena, kao i njihova rastvorljivost prikazani su u **Tabeli 12**. Na osnovu dobijenih rezultata ukupni sadržaj proteina kretao u rasponu od 14,81 g/100g koliko ih je nađeno u uzorku broj **25**, iz Vinče do 27,25 g/100g koliko ih je sadržavao uzorak iz Male Krsne (br. **12**). Prosečan sadržaj proteina, u uzorcima, iznosio je 19,44 g/100g.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za uzorke kineskog (14,86 - 28,96 g/100g) [Yang *et al.*, 2013], kolumbijskog (13 - 24,5 g/100g) [Barajas *et al.*, 2012], portugalskog i španskog (12,50 - 25,15 g/100g) [Nogueira *et al.*, 2012] i brazilskog polena (15,04 - 27,69 g/100g) [Carpes *et al.*, 2009]. Rezultati su u saglasnosti i sa rezultatima Herbert-a i Shimanuki-ja [2002] koji su poredili sadržaje proteina u sveže prikupljenim (21,0 - 29,3 g/100g) i uskladištenim uzorcima (19,3 - 26,5 g/100g) polena. U rezultatima Serra-Bonvehí-ja i Jordá-e za španske polene nalazimo znatno manje razlike u sadržajem proteina (12,6 - 18,2 g/100g), što je bilo u saglasnosti sa rezultatima za ispitivane uzorke polena koji su sadržavali manje količine proteina (manje od 20%). Ispitivani uzorci polena sa višim sadržajem proteina (22 - 27%) su bili u saglasnosti sa rezultatima Saa-Otero-ove i saradnika [Saa-Otero *et al.*, 2000].

Kauffeld [1980] prikazuje podatke o sadržaju proteina u uzorcima koji su sakupile medonosne pčele (17,1 - 22,6%) i onih koji su ručno prikupljeni (6,2 - 20,7%) pri čemu su rezultati dobijeni u ovoj studiji bili u saglasnosti sa dobijenim ispitivanjima ovog autora. Sa druge strane, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su bili ispod vrednosti koje su dobile Human-ova i Nicolson-ova [2006]. Naime, po njihovom istraživanju ručno prikupljeni uzorci polena su bili znatno bogatiji po sadržaju proteina (51%) u odnosu na one koje su sakupile pčele (31%) ili koji su uzeti direktno iz košnice (28%). U rezultatima Estevinho-ove sa saradnicima [Estevinho *et al.*, 2012] nalazimo podatke o nešto višem sadržaju proteina u uzorcima polena koje su oni ispitivali (24,23 - 34,18 g/100g) kao i u rezultatima Santiago-ove [2008] koja je u uzorcima polena iz Venecuele našla da se sadržaj proteina kretao u rasponu od 24,92 do čak 52,56 g/100g suvog uzorka. Sa druge strane, u radu Villanueva-ove [Orzáez-Villanueva *et al.*, 2002] sa saradnicima nalazimo nešto niže prosečne sadržaje ukupnih proteina (9,89 - 16,56 g/100g) u odnosu na one prikazane u ovoj disertaciji.

Tabela 12. - Sadržaj ukupnih proteina (g/100g) i njihova rastvorljivost (%)*

| Uzorak | Ukupni proteini | Rastvorljivost proteina |
|---------------------|---------------------|-------------------------|
| 1 | 17,62 ± 0,19 a | 2,79 ± 0,13 |
| 2 | 23,56 ± 0,19 | 6,00 ± 0,01 a |
| 3 | 20,69 ± 0,25 b | 7,47 ± 0,27 c,d |
| 4 | 15,75 ± 0,12 | 19,27 ± 0,38 i |
| 5 | 22,62 ± 0,25 c | 7,95 ± 0,03 d,e |
| 6 | 24,81 ± 0,06 | 5,77 ± 0,04 a |
| 7 | 17,25 ± 0,06 | 16,99 ± 0,14 f |
| 8 | 21,25 ± 0,19 | 4,75 ± 0,10 |
| 9 | 21,93 ± 0,12 | 6,22 ± 0,12 a |
| 10 | 18,87 ± 0,12 | 8,82 ± 0,09 g,h |
| 11 | 20,62 ± 0,19 b | 6,40 ± 0,02 a,b |
| 12 | 27,25 ± 0,19 | 7,08 ± 0,12 b,c |
| 13 | 22,69 ± 0,06 c | 6,40 ± 0,02 a,b |
| 14 | 19,87 ± 0,25 d | 8,38 ± 0,10 e,g |
| 15 | 20,37 ± 0,31 b | 7,36 ± 0,09 c,d |
| 16 | 17,87 ± 0,19 a | 12,11 ± 0,36 |
| 17 | 19,94 ± 0,25 d | 9,30 ± 0,28 h |
| 18 | 16,12 ± 0,31 e | 18,80 ± 0,43 i |
| 19 | 16,31 ± 0,19 e | 17,36 ± 0,04 f |
| 20 | 17,87 ± 0,31 a | 10,32 ± 0,09 j |
| 21 | 16,75 ± 0,31 | 16,92 ± 0,38 f |
| 22 | 17,62 ± 0,19 a | 14,93 ± 0,73 |
| 23 | 15,25 ± 0,25 | 23,99 ± 1,59 |
| 24 | 19,69 ± 0,25 d,f | 10,86 ± 0,20 j |
| 25 | 14,81 ± 0,31 | 25,90 ± 0,60 |
| 26 | 19,50 ± 0,12 f | 10,54 ± 0,36 j |
| min vrednost | 14,81 ± 0,31 | 2,79 ± 0,13 |
| max vrednost | 27,25 ± 0,19 | 25,90 ± 0,60 |

*Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$).

Ako uporedimo botaničko poreklo ispitivanih uzoraka polena može se primetiti da uzorak koji ima najveći sadržaj proteina (27,25 g/100g) nije monofloralan, ali je sa izrazito dominantno zastupljenim polenom biljaka iz familije krstašica. I druga dva uzorka u kojima je polen ovih biljaka bio dominantno zastupljen (uzorak broj 2 je monofloralan) su se odlikovali visokim sadržajem proteina (23,56 g/100g u uzorku broj 2 odnosno 22,69 g/100g u uzorku broj 13). Uzorci polena koji su prevashodno bili bogati polenom leguminoza odlikovali su se neznatnim razlikama u sadržaju proteina (od 17,62 g/100g do 21,93 g/100g), dok je najniži sadržaj proteina (14,81 g/100g) nađen u polifloralnom uzorku koji je sadržavao polen japanskog bagrema i suncokreta. Dobijeni rezultati ukazuju da botaničko poreklo uzoraka može imati uticaja na sadržaj proteina ali i da su određene varijacije u sadržaju proteina prisutne i kod uzoraka koji imaju isto botaničko poreklo.

Ni u dostupnoj literaturi ne postoji saglasnost o tome kako botaničko poreklo polena utiče na sadržaj proteina u njemu. Roulston sa saradnicima [Roulston i Cane; Roulston *et al.*, 2000] iznosi tvrdnju na osnovu svojih istraživanja da je sadržaj

proteina (2 – 61%) u polenima bio vrlo raznolik među devedest tri familije biljaka ali, unutar jedne biljne familije, vrlo konzistentan. Najniži sadržaj proteina bio je u polenima anemofilnih biljaka. Veće koncentracije proteina su utvrđene u polenima biljaka koje oprašuju životinje mada nije jasno utvrđeno da li je razlog tome težnja da se polinator „nagradi“ i privuče ili činjenica da je polen tih biljaka imao najmanja zrna. Takođe, nije utvrđena direktna veza između količine proteina u polenu i vrste biljke koju pčele biraju za oprašivanje. Feás sa saradnicima [Feás *et al.*, 2012], na osnovu značajnih razlika u sadržaju proteina koje su postojale u uzorcima polena zaključuje da je uzrok tome, najverovatnije, različito botaničko poreklo uzoraka. Do istog zaključka došli su i Nogueira i saradnici [Nogueira *et al.*, 2012]. U radu Saa-Otero-ove i saradnika [Saa-Otero *et al.*, 2000] nalazimo podatke da je sadržaj proteina u pojedinim, monofloralnim, vrstama polena varirao od 14,4% do 29,5%. Sa druge strane, Somerville [Somerville, 2001] i Nicol-ova [Somerville i Nicol, 2006] na osnovu svoje vrlo detaljne studije sa sto devedeset četiri uzorka australijskog polena su došli do zaključka da, za razliku od prethodno navedenih autora koji tvrde da unutar jedne biljne vrste i roda postoji poprilična konzistentnost u sadržaju proteina u uzorcima, takve stalnosti nema i da se i uzorci koji potiču od iste biljne vrste mogu statistički značajno razlikovati po sadržaju proteina. I Almeida-e sa njenim timom [Almeida *et al.*, 2005] predlaže zaključak da će biljka, pod različitim uslovima, uvek imati polen različitog hemijskog sastava pa u tom smislu različit mora biti i sadržaj proteina.

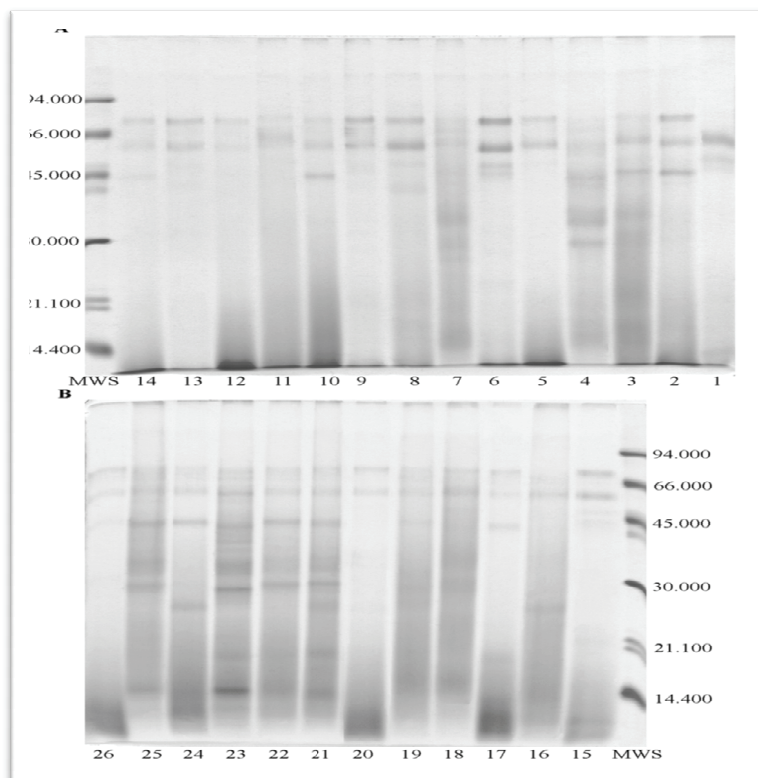
Na osnovu svega toga možemo zaključiti da se u ispitivanim uzorcima polena razlike koje postoje u sadržaju proteina za uzorke koji su imali isto botaničko poreklo možda mogu dovesti u vezu sa različitim uslovima pod kojima su biljke uzgajane.

Rastvorljivost proteina predstavlja jedno od osnovnih tehno-funkcionalnih svojstava hrane koja određuju mogućnost primene u prehrambenoj industriji. Ova grupa svojstava zavisi od fizičkog i hemijskog sastava, izuzimajući nutritivnu vrednost [Kinsella i Melachouris, 1976]. Rastvorljivost proteina u velikoj meri određuje druge osobine materijala kao što su sklonost ka emulgovanju i želiranju, kao i njegovu penivost [Kinsella i Melachouris, 1976]. U slučaju ispitivanih uzoraka polena rastvorljivost proteina se kretala u opsegu od 2,79 g/100g (uzorak broj 1) do 25,9 g/100g kolika je bila rastvorljivost proteina u uzorku iz Vinče (br. 25). Prosečna rastvorljivost proteina je iznosila 11,22 g/100g. Dobijene vrednosti se

mogu uporediti sa rastvorljivošću proteina u proteinskim proizvodima od soje sa niskom rastvorljivošću (brašno, koncentрати i izolati) na pH = 7 [Lee *et al.*, 2003]. Naime, ovi proizvodi su pokazivali prosečnu rastvorljivost od 20 g/100g, ili nešto nižu, pri ovoj pH- vrednosti što je zavisilo od tipa proizvoda i od jonske sile rastvora. Prema ovim autorima na rastvorljivost sojinih proteina u velikoj meri utiču njihov sastav, konformacija molekula kao i uslovi pri proizvodnji. Uzimajući u obzir kompleksnost hemijskog sastava polena sasvim je izvesno da će na rastvorljivost proteina iz polena uticati, osim njihovog sastava i konformacije molekula, i moguće interakcije koje oni mogu da ostvare sa drugim komponentama u polenu kao što su lipidi, fenolna jedinjenja, ugljeni hidrati i mineralne komponente.

IV-2d SDS-PAGE analiza

Analiza sastava rastvorljivih proteina u uzorcima polena izvršena je SDS-PAGE analizom u redukovanim uslovima. Izgled elektroforegrama rastvorljivih proteina u polenu je prikazan na slici 10.



Slika 10. Elektroforegrami rastvorljivih proteina polena dobijeni SDS-PAGE metodom u redukujućim uslovima

Na osnovu toga uočavaju se sličnosti i razlike u sastavu rastvorljivih proteina među ispitivanim uzorcima. Veoma jasno se izdvaja nekoliko proteinskih traka u opsegu 10 - 80 kDa. Svi uzorci, osim uzorka broj **1**, sadrže dve glavne trake proteina sa molekulskim masama (MWs) od 77 kDa, odnosno 59 kDa, što ukazuje da rastvorljivi proteini polena imaju sličan proteinski sastav.

U opsegu molekulskih masa od 25 kDa do 50 kDa, u trinaest uzoraka polenovih ekstrakata, može se uočiti nekoliko traka proteina koje su bile manjeg ili većeg intenziteta. Proteini sa molekulskim masama manjim od 25 kDa su takođe identifikovani u svim uzorcima, ali su dobijene trake kod većine uzoraka difuzne. Sličnost u pogledu sastava rastvorljivih proteina u ispitivanim uzorcima polena može se dovesti i u vezu sa uticajem enzima koje pčele luče prilikom prikupljanja polena, a kojim delimično utiču na sastav proteina u njemu. Naime, pčele radilice imaju veoma razvijene vilične (mandibularne) žlezde koje luče kiseli sekret (pH = 5,5 - 6,0) [Terra i Ferreira, 1994] čija je funkcija rastvaranje polenovih zrna, propolisa i delimično varenje hrane [Stanimirović *et al.*, 2000]. Tako su u pljuvački pčele identifikovane amilaze i katalaze [Bogdanov, 2012], serin-proteinaze [Schumaker *et al.*, 1993; Terra i Ferreira, 1994] kao i neke cistein-proteinaze [Schumaker *et al.*, 1993; Terra i Ferreira, 1994]. Sve rastvorljive proteine, na osnovu njihovih molekulskih masa, možemo podeliti na tri glavne frakcije:

- ✓ frakcija proteina sa molekulskim masama od 80 – 50 kDa
- ✓ frakcija proteina sa molekulskim masama od 50 – 25 kDa
- ✓ frakcija proteina sa molekulskim masama od 25 – 10 kDa.

Na osnovu toga, u **Tabeli 13** prikazan je sastav proteina u ispitivanim uzorcima saglasno njihovim molekulskim masama.

Na osnovu rezultata ove analize procenjeno je da se udeo rastvorljivih proteina sa molekulskim masama u opsegu od 80 kDa do 50 kDa kretao u uzorcima od 13,4% do 32,2%. Najveći udeo ove frakcije proteina je nađen u uzorku broj **6**, dok je najmanji udeo proteina najvećih molekulskih masa nađen u uzorku broj **24**. Prosečan udeo ove frakcije u uzorcima proteina polena iznosio je 20,4%. Zastupljenost proteina svih frakcija koje su imale molekulske mase između 50 kDa i 25 kDa varirala je od 22,2% do 43,6% rastvorljivih proteina, dok se zastupljenost

proteina svih frakcija sa molekulskim masama u opsegu od 25 kDa do 10 kDa kretala u intervalu 32,9 – 63,4% rastvorljivih proteina. Najviše proteina svih frakcija sa molekulskim masama od 50 kDa do 25 kDa bilo je u uzorku broj **18**, a najmanje u uzorku broj **17** sa prosečnim udelom ovih frakcija od 33,2%. Najviše proteina svih frakcija sa najmanjim molekulskim masama je nađeno u uzorku broj **17**, a najmanje u uzorku broj **13**. Srednja vrednost udela ovih frakcija proteina, gledano u odnosu na sve uzorke, iznosila je 46,4% rastvorljivih proteina. Može se uočiti da je uzorak iz Petrovaradina (br. **17**), koji je sadržavao smešu polena leguminoza i kupusnjača imao najviši sadržaj proteinskih frakcija sa najmanjim molekulskim masama, najmanji sadržaj svih frakcija proteina sa molekulskim masama od 50 kDa do 25 kDa kao i veoma nizak sadržaj proteinskih frakcija sa najvećim molekulskim masama .

Tabela 13. - Procenti sadržaja rastvorljivih proteina [%] u uzorcima polena na osnovu njihovih molekulskih masa*

| Proteinske frakcije na osnovu njihovih molarnih masa | | | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| Uzorak | 80 – 50kDa | 50 – 25kDa | 25 – 10kDa |
| 1 | 30 ± 1 | 24,4 ± 0,9 a | 45,5 ± 1,1 a,b,d |
| 2 | 20,6 ± 0,6 a | 31,6 ± 0,8 b,c | 47,8 ± 0,8 c |
| 3 | 16,2 ± 0,7 b,c,h | 38,3 ± 0,8 d | 45,5 ± 1,1 a,b,d |
| 4 | 19,9 ± 0,9 a,d | 41,8 ± 0,8 e,f | 38,4 ± 1,3 e |
| 5 | 24,4 ± 1,0 | 25,5 ± 0,8 a,g | 50,0 ± 0,9 f |
| 6 | 32,2 ± 0,9 e | 31,6 ± 0,7 b,c | 36,2 ± 1,1 g |
| 7 | 21,2 ± 0,9 a,g | 40 ± 1 h | 38,8 ± 0,8 e |
| 8 | 26,4 ± 1,0 f | 33,4 ± 0,8 d | 40,2 ± 0,9 e |
| 9 | 31,9 ± 0,9 e | 31,6 ± 0,7 b,c | 36,5 ± 1,2 g |
| 10 | 19,0 ± 0,7 d | 28,7 ± 0,7 i | 52,3 ± 1,3 h,i |
| 11 | 22,4 ± 0,9 g | 31,5 ± 0,8 b,c | 46,1 ± 0,9 a,b,c |
| 12 | 20,9 ± 0,8 a | 27,6 ± 0,6 i | 51,5 ± 1,2 f,h |
| 13 | 31,5 ± 1,0 e | 36 ± 1 j | 32,9 ± 0,9 |
| 14 | 26,8 ± 0,9 f | 30,5 ± 0,6 b | 42,6 ± 0,7 j |
| 15 | 19,9 ± 0,9 a,d | 26,2 ± 0,9 g | 53,8 ± 0,8 i,k |
| 16 | 14,2 ± 0,6 i,j | 35,6 ± 0,8 j | 50,2 ± 1,0 f |
| 17 | 14,3 ± 0,4 i,j | 22,2 ± 0,5 k | 63,4 ± 1,3 |
| 18 | 16,6 ± 0,6 b,k | 43,6 ± 0,8 | 39,8 ± 0,9 e |
| 19 | 15,5 ± 0,5 b,c,i | 40,0 ± 0,8 h,m | 44,5 ± 1,0 a,l |
| 20 | 15,7 ± 0,6 b,c,i | 22,9 ± 0,9 k | 61,4 ± 1,2 |
| 21 | 14,9 ± 0,7 h,i | 40,3 ± 0,9 h | 44,8 ± 0,8 b,d,m |
| 22 | 14,9 ± 0,6 h,i | 38,6 ± 0,6 d,m | 46,5 ± 1,1 b,c,m |
| 23 | 14,9 ± 0,6 h,i | 41 ± 1 e,h | 44 ± 1 j,l |
| 24 | 13,4 ± 0,6 j | 32,5 ± 0,9 c,d | 54,1 ± 1,1 k |
| 25 | 17,7 ± 0,7 k | 42,8 ± 0,8 f,e | 39,5 ± 0,9 e |
| 26 | 15,7 ± 0,7 b,c,i | 25,3 ± 0,7 a,g | 59 ± 1 |
| min vrednost | 13,4 ± 0,6 | 22,2 ± 0,5 | 32,9 ± 0,9 |
| max vrednost | 32,2 ± 0,9 | 43,6 ± 0,8 | 63,4 ± 1,3 |

*Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali (p < 0,05).

IV-2e Sadržaj ukupnih i rastvorljivih ugljenih hidrata u uzorcima polena

Ukupni sadržaj ugljenih hidrata, dobijen ispitivanjem uzoraka polena, kao i njihova rastvorljivost prikazani su u **Tabeli 14**. Ukupni sadržaj ugljenih hidrata se kretao u intervalu od 64,42 g/100g (uzorak br. **12**, Mala Krsna) do 81,84 g/100g šećera koliko je sadržavao uzorak broj **25**, iz Vinče. Prosečan sadržaj ove grupe jedinjenja u ispitivanim uzorcima iznosio je 75,51 g/100g što čini šećere najzastupljenijom frakcijom u uzorcima polena i, u tom smislu, ima jako veliki uticaj na njihova nutritivna svojstva i energetska vrednost.

Tabela 14. - Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata (g/100g) i njihova rastvorljivost (%)*

| Uzorak | Ukupni ugljeni hidrati | Rastvorljivost ugljenih hidrata |
|---------------------|------------------------|---------------------------------|
| 1 | 78,12 ± 0,25 a | 68,9 ± 0,5 a |
| 2 | 67,21 ± 0,28 | 71,1 ± 0,6 b |
| 3 | 74,37 ± 0,38 b | 64,0 ± 0,3 c,d |
| 4 | 79,66 ± 0,17 | 64,9 ± 0,1 c |
| 5 | 70,47 ± 0,31 | 69,5 ± 0,1 a,b |
| 6 | 69,30 ± 0,09 | 61,0 ± 0,1 e,f |
| 7 | 77,31 ± 0,09 c,d | 56,1 ± 0,3 g |
| 8 | 73,64 ± 0,024 e | 57,7 ± 0,2 g |
| 9 | 72,66 ± 0,17 | 62,7 ± 0,2 d,e |
| 10 | 76,39 ± 0,19 f | 40,0 ± 0,4 |
| 11 | 73,25 ± 0,24 e | 68,3 ± 0,1 a |
| 12 | 64,42 ± 0,29 | 65,0 ± 0,6 c |
| 13 | 70,98 ± 0,13 | 69,5 ± 0,4 a,b |
| 14 | 74,72 ± 0,31 b | 45,9 ± 0,1 h |
| 15 | 75,09 ± 0,39 | 64,6 ± 0,3 c,d |
| 16 | 77,74 ± 0,24 a,c | 48,1 ± 0,4 i,j |
| 17 | 75,94 ± 0,32 f | 75,0 ± 0,4 |
| 18 | 78,85 ± 0,36 g | 47,0 ± 0,4 h,i |
| 19 | 80,19 ± 0,28 | 59,8 ± 0,1 f |
| 20 | 76,96 ± 0,41 d | 49,6 ± 0,3 j |
| 21 | 78,68 ± 0,40 g | 51,9 ± 0,2 |
| 22 | 78,76 ± 0,25 g | 60,4 ± 0,2 f |
| 23 | 81,65 ± 0,33 h | 60,2 ± 0,5 f |
| 24 | 76,31 ± 0,32 f | 31,2 ± 0,2 |
| 25 | 81,84 ± 0,38 h | 45,5 ± 0,1 h |
| 26 | 76,37 ± 0,23 f | 57,5 ± 0,2 g |
| min vrednost | 64,42 ± 0,29 | 31,2 ± 0,2 |
| max vrednost | 81,84 ± 0,38 | 75,0 ± 0,4 |

*Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$).

Dobijene vrednosti za ukupni sadržaj ugljenih hidrata su bile veom slične onima koje su, u svojim istraživanjima, dobili Nogueira [Nogueira *et al.*, 2012] i Yang [Yang *et al.*, 2013] sa saradnicima. Prva je, ispitujući portugalske i španske polene, dobila da se sadržaj ugljenih hidrata kretao u opsegu od 69,68 g/100g do

84,25 g/100g, dok je drugi autor u kineskim polenima pronašao ukupne šećere u intervalu 59,43 - 75,65 g/100g. Bitno je naglasiti da su obe grupe autora koristile istu metodu za izračunavanje sadržaja šećera koja je korišćena i u ovoj disertaciji (**III-2f**). Sa druge strane, Carpes-ova sa svojim timom [Carpes *et al.*, 2009] je ukupni sadržaj ugljenih hidrata odredila spektrofotometrijskom metodom i dobila nešto nižu vrednost za prosečnu zastupljenost ove grupe jedinjenja (52,1 g/100g) što može biti u vezi sa primenjenom metodom rada, ali i sa strukturom šećera i prirodom. Još niže vrednosti za ukupan sadržaj šećera u polenima sa Novog Zelanda dobila je Day-ova sa saradnicima [Day *et al.*, 1990]. Međutim, autori naglašavaju da u prikazanim rezultatima za sadržaj šećera, s obzirom na metodu koju su koristili (kolorimetrijsko određivanje pomoću hidrazina *p*-hidroksibenzojeve kiseline), izvesna odstupanja mogu nastati zbog prisustva proteina i određenih makroelemenata (Ca) koji utiču na reakciju šećera sa ovim jedinjenjem [Lever, 1972]. Iz istog razloga moguće je da dobijeni rezultat za ukupne šećere bude nešto niži od sadržaja redukujućih šećera kada se oni pojedinačno odrede. Na ove količine utiču nektar i med koje pčela dodaje iz svoje pljuvačke dok sakuplja ili pakuje polen [Stanley i Linskens, 1974]. I Estevinho-ova sa saradnicima [Estevinho *et al.*, 2012] prikazuje slične vrednosti o sadržaju šećera u ispitivanim uzorcima polena (60,82 - 70,76%) dok je u radu Feás-a i kolega [Feás *et al.*, 2012] prosečan sadržaj ugljenih hidrata iznosio 67,7%. Orzáez Villanueva i kolege [Orzáez Villanueva *et al.*, 2002], takođe, potvrđuju da su šećeri glavna nutritivna komponenta u polenu i sve uzorke dele u četiri grupe:

- ✓ 13,33% uzoraka sadržavalo je šećere na nivou od 60 – 65 g%
- ✓ 33,33% imalo je sadržaj šećera u intervalu 65 – 70 g%
- ✓ 46,66% u intervalu od 70 do 75 g%
- ✓ 6,66% uzoraka je imalo najveći sadržaj šećera u intervalu – 75 – 80 g%.

Poređenjem sa rezultatima za ispitivane uzorke polena možemo zaključiti da su oni bili nešto bogatiji po ukupnom sadržaju ugljenih hidrata. Naime:

- ✓ jedan uzorak (3,85%) od dvadeset šest spadao je u prvu grupu, najsiromašnijih uzoraka

- ✓ dva uzorka (7,69%) su sadržavala do 70 g šećera
- ✓ sedam uzoraka (26,92%) je sadržavalo od 70 g do 75 g ovih jedinjenja
- ✓ trinaest uzoraka (50%) je po sadržaju šećera spadalo u kategoriju najbogatijih po sadržaju ukupnih ugljenih hidrata
- ✓ tri uzorka (11,54%) prevazilaze granice koje su ovi autori dali jer su sadržavali ukupnih ugljenih hidrata preko 80 g/100g uzorka. To su bili uzorci iz Beograda (br. 19), Bačke Topole (br. 23) i Vinče (br. 25) koji je, bio najbogatiji po ukupnom sadržaju ugljenih hidrata.

Sa druge strane, uzorci polena iz Španije koje su sakupile medonosne pčele imali su nešto niži sadržaj ukupnih ugljenih hidrata (20 – 48 g/100g) [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997].

Sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata u ispitivanim uzorcima polena je prikazan u **Tabeli 15.**

Tabela 15. - Sadržaj pojedinačnih i ukupnih (Σ) rastvorljivih ugljenih hidrata (g/100g) u ispitivanim uzorcima polena*

| uzorak | Fruktoza | Glukoza | Saharoza | Maltoza | Trehaloza | Σ |
|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------|
| 1 | 31,49 ± 0,40 a | 0,33 ± 0,02 | 0,77 ± 0,02 a | 16,22 ± 0,27 | 3,23 ± 0,16 a | 52,04 |
| 2 | 22,82 ± 0,25 b | 16,11 ± 0,29 | 5,65 ± 0,21 | 0 ± 0 | 0,26 ± 0,01 | 44,84 |
| 3 | 26,59 ± 0,49 | 7,02 ± 0,23 | 0,93 ± 0,04 | 10,21 ± 0,23 a | 2,09 ± 0,10 b | 46,84 |
| 4 | 23,72 ± 0,42 c | 7,79 ± 0,20 a | 0,63 ± 0,02 c | 14,37 ± 0,31 c | 2,10 ± 0,09 b | 48,61 |
| 5 | 34,59 ± 0,49 | 1,20 ± 0,06 | 0,67 ± 0,02 c | 14,28 ± 0,38 c | 3,68 ± 0,18 | 54,42 |
| 6 | 21,02 ± 0,75 d | 15,27 ± 0,34 | 0,75 ± 0,03 a,b | 9,62 ± 0,39 a,b | 0,73 ± 0,02 | 47,39 |
| 7 | 30,20 ± 0,46 e | 1,36 ± 0,03 | 1,21 ± 0,06 | 12,18 ± 0,25 d | 4,67 ± 0,22 | 49,62 |
| 8 | 28,49 ± 0,50 f | 1,85 ± 0,07 b | 0,43 ± 0,01 d | 10,45 ± 0,46 a,b | 0,84 ± 0,02 c | 42,06 |
| 9 | 19,47 ± 0,35 g | 3,60 ± 0,17 c | 3,94 ± 0,16 | 13,10 ± 0,56 d | 1,20 ± 0,06 d | 41,31 |
| 10 | 0,96 ± 0,01 | 1,06 ± 0,03 d | 0 ± 0 | 28,86 ± 0,45 | 3,26 ± 0,12 a | 34,14 |
| 11 | 36,32 ± 0,56 h | 0,27 ± 0,01 | 0,45 ± 0,01 d | 11,35 ± 0,26 | 1,55 ± 0,06 e | 49,94 |
| 12 | 22,72 ± 0,33 b | 6,39 ± 0,27 e | 0,25 ± 0,01 e | 8,80 ± 0,19 e | 1,05 ± 0,05 h | 39,21 |
| 13 | 11,21 ± 0,47 i | 1,00 ± 0,04 d | 1,53 ± 0,07 | 35,15 ± 0,84 | 1,60 ± 0,06 e,f | 50,49 |
| 14 | 19,95 ± 0,26 d,g | 3,70 ± 0,18 c | 0,84 ± 0,01 | 6,19 ± 0,19 f | 2,23 ± 0,08 b | 32,91 |
| 15 | 29,03 ± 0,63 e,f | 6,12 ± 0,28 e | 0,66 ± 0,01 c | 8,41 ± 0,24 e | 2,00 ± 0,09 b,g | 46,22 |
| 16 | 23,13 ± 0,46 b,c | 1,55 ± 0,03 f | 0,73 ± 0,01 b | 7,77 ± 0,22 | 1,64 ± 0,08 e,f | 34,82 |
| 17 | 35,62 ± 0,39 h | 8,23 ± 0,21 a,g | 0,39 ± 0,01 f | 10,25 ± 0,19 a | 2,02 ± 0,08 b,g | 56,51 |
| 18 | 17,55 ± 0,36 | 9,14 ± 0,28 h | 0,22 ± 0,01 | 6,90 ± 0,20 | 1,58 ± 0,07 e,f | 35,39 |
| 19 | 21,22 ± 0,43 d | 1,65 ± 0,06 f | 0,35 ± 0,01 g | 21,61 ± 0,38 | 1,19 ± 0,05 d | 46,02 |
| 20 | 10,88 ± 0,14 i | 0,88 ± 0,03 | 0,74 ± 0,01 a,b | 19,90 ± 0,43 | 0,87 ± 0,02 c | 33,27 |
| 21 | 24,67 ± 0,41 | 2,16 ± 0,09 | 0,34 ± 0,01 g | 10,21 ± 0,45 a,b | 1,11 ± 0,05 d,h | 38,49 |
| 22 | 31,34 ± 0,56 a,e | 1,95 ± 0,06 b | 0,090 ± 0,003 | 11,92 ± 0,19 d | 1,79 ± 0,12 f,g | 47,09 |
| 23 | 37,10 ± 0,67 h | 4,83 ± 0,16 | 0,51 ± 0,01 | 9,83 ± 0,16 b | 0,69 ± 0,01 | 52,96 |
| 24 | 15,29 ± 0,69 | 8,61 ± 0,37 g,h | 0,25 ± 0,01 e | 0,65 ± 0,01 | 0,19 ± 0,01 | 24,99 |
| 25 | 19,28 ± 0,60 g | 8,98 ± 0,14 h | 0,16 ± 0,01 | 5,99 ± 0,16 f | 0,83 ± 0,02 c | 35,24 |
| 26 | 28,26 ± 0,62 f | 8,65 ± 0,32 g,h | 0,38 ± 0,01 f | 2,57 ± 0,12 | 3,19 ± 0,14 a | 43,05 |
| min vrednost | 0,96 ± 0,01 | 0,27 ± 0,01 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0,19 ± 0,01 | |
| max vrednost | 37,10 ± 0,67 | 16,11 ± 0,29 | 5,65 ± 0,21 | 35,15 ± 0,84 | 4,67 ± 0,22 | |

*Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$).

Dobijeni rezultati su pokazali da u dvadeset tri uzorka najzastupljeniji monosaharid je bila fruktoza što je bilo u saglasnosti sa rezultatima Serra-Bonvehí-ja i Jordá-e [1997]. Kada je bio u pitanju sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata ovi

autori su našli da je polen bio znatno bogatiji redukujućim (32,9 g/100g) nego neredukujućim šećerima (6,12 g/100g) od kojih su, zapravo pronašli samo saharozu. Pored fruktoze kao drugi najzastupljeniji monosaharid je nađena glukoza dok su disaharidi poput maltoze i trehaloze nađeni samo u tragovima. Za razliku od rezultata njihovog istraživanja u tri uzorka polena koji su ispitivani u ovoj disertaciji najzastupljeniji šećer je bila maltoza dok su u jednom uzorku bili podjednako zastupljeni fruktoza i maltoza. Glukoza, koju su ovo dvoje autora našli kao drugi najzastupljeniji šećer u uzorcima je bila treći po zastupljenosti.

Ako se pogledaju vrednosti za sadržaje ovih šećera količina fruktoze u uzorcima se kretala u širokom opsegu od 0,96 g/100g do 37,10 g/100g sa prosečnim sadržajem od 23,92 g/100g uzorka. Najveći sadržaj fruktoze je nađen u uzorku broj **23** (Bačka Topola) i iznosio je 37,10 g/100g dok je, sa druge strane, uzorak broj **10** (Sibnica) bio izuzetno siromašan ovim šećerom (0,96 g/100g) da bi se moglo reći da je u njemu fruktoza bila zastupljena samo u tragovima. Maltoza, kao redukujući disaharid, bila je najzastupljenija u uzorcima **10**, **13** i **20** dok je u uzorku broj **19** po količini bila skoro izjednačena sa fruktozom. Opseg sadržaja ovog šećera kretao se od 0 do 35,15 g/100g sa prosečnom vrednošću od 12,27 g/100g. U uzorku broj **2** (Bački Monoštor) maltoza nije detektovana dok je najviše ovog šećera bilo u uzorku broj **13**, iz Smedereva. Treći po zastupljenosti rastvorljivi ugljeni hidrat u ispitivanim uzorcima bila je glukoza sa prosečnim sadržajem od 4,99 g/100g. Najveći sadržaj ovog redukujućeg monosaharida pronađen je u uzorku iz Bačkog Monoštora (16,11 g/100g) dok je najmanje glukoze sadržavao uzorak broj **11**, iz Beograda (0,27 g/100g). Za razliku od Serra-Bonvehí-ja i Jordá-e [1997] koji daju rezultate sa sadržajem saharoze, kao najzastupljenijeg neredukujućeg šećera (prosečni sadržaj je iznosio 6,12 g/100g) u uzorcima polena iz ove disertacije prosečan sadržaj saharoze je bio znatno niži (0,91 g/100g). Poređenjem sa rezultatima za preostala četiri identifikovana i ispitana rastvorljiva šećera uočava se da je sadržaj saharoze bio najmanji. Ako se pogleda sadržaj saharoze pojedinačno po uzorcima, uočava se da u uzorku broj **10** (Sibnica) ona nije identifikovana dok je najviše saharoze sadržavao uzorak broj **2**, iz Bačkog Monoštora, u kome je nađeno 5,65 g/100g ovog šećera. U većim količinama od saharoze u ispitivanim uzorcima polena pronađena je trehaloza (1,75 g/100g) što je čini najzastupljenijim neredukujućim disaharidom.

Uzorak sa najvećim sadržajem ovog šećera je bio uzorak broj 7 (4,67 g/100g), iz Valjeva dok ga je najmanje bilo u uzorku iz Arandjelovca (0,19 g/100g).

Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima ostalih autora dolazimo do podataka da je najzastupljeniji šećer fruktoza s tim što se pronađene količine razlikuju. Tako Saa-Oterova sa saradnicima [Saa-Otero *et al.*, 2000] daje podatke o sadržaj fruktoze u opsegu od 17,6% do 26,3%, u zavisnosti od botaničkog porekla polena, dok je Qian sa kolegama [Qian *et al.*, 2012] pronašao nešto ujednačeniju zastupljenost fruktoze u uzorcima (15,9 - 19,9%). Uočava se da ispitivani uzorci znatno više variraju po zastupljenosti fruktoze i da se javljaju uzorci koji sadrže i dvostrukoveću količinu ovog šećera u odnosu na podatke u literaturi, ali postoje i uzorci sa znatno manjom količinom fruktoze. I Szczęśna [Szczęśna, 2000] izveštava o najvećoj zastupljenosti fruktoze (46%) dok je redosled ostalih rastvorljivih šećera bio: glukoza (36%), saharoza (8%), maltoza (7%) i trehaloza (1%). Ono po čemu se rezultati iz ove disertacije razlikuju jeste znatno niži sadržaj saharoze u ispitivanim uzorcima dok, sa druge strane, ovo je jedan od retkih radova u kojem je, saglasno rezultatima za ispitivane uzorke polena, pronađena maltoza u značajnijoj količini kao i trehaloza koja je u ostalim slučajevima kada je identifikovana pronalazena u tragovima [Serra-Bonvehí *et al.*, 2001].

U **Tabeli 16** prikazani su rezultati korelacione analize sadržaja rastvorljivih ugljenih hidrata koji su ispitivani.

Tabela 16. - Rezultati korelacione analize za sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata u uzorcima polena

| | Fruktoza | Maltoza | Glukoza | Trehaloza | Saharoza |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|------------------|-----------------|
| Fruktoza | / | -0,40 | -0,04 | 0,19 | -0,07 |
| Maltoza | -0,40 | / | -0,59* | 0,25 | 0,14 |
| Glukoza | -0,04 | -0,59* | / | 0,40 | 0,34 |
| Trehaloza | 0,19 | 0,25 | 0,40 | / | -0,20 |
| Saharoza | -0,07 | 0,14 | 0,34 | -0,20 | / |

* značajne srednje ($r = 0,5-0,7$) i jake korelacije ($r > 0,7$).

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da sadržaji rastvorljivih ugljenih hidrata nisu u međusobnoj korelaciji osim što su sadržaj glukoze i maltoze u značajnoj srednjoj negativnoj korelaciji što znači da porast sadržaja jednog šećera uslovljava smanjenje u sadržaju drugog.

Na osnovu rezultata za rastvorljivost ugljenih hidrata i ukupnog sadržaja rastvorljivih ugljenih hidrata može se uočiti da postoje izvesna odstupanja. Naime, kod većine uzoraka rastvorljivost ugljenih hidrata je bila nešto veća u odnosu na ukupni sadržaj rastvorljivih šećera koji su pojedinačno identifikovani što ukazuje da u sastavu polena postoje još neki rastvorljivi ugljeni hidrati koji u ovom istraživanju nisu bili obuhvaćeni analizama. To se, pre svega, odnosi na skrob [Bogdanov, 2012] i pektin [Human i Nicolson, 2006]. U slučaju pektina ove autorke su utvrdile da se njegov sadržaj značajno povećao u uzorcima polena koji su pčele sakupile i uskladištile u košnici što se moglo dovesti u vezu sa procesom hidratacije samog polena. Naime, uočeno povećanje vode u polenu pčele u odnosu na cvetni polen dovodi do bubrenja polenovog zrna što znači da se mora promeniti struktura opne polenovog zrna a za to je potrebno da se sintetišu pektini.

Takođe, kod četiri uzorka (**5**, **13**, **23** i **24**) ukupni sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata je bio nešto veći u odnosu na njihovu rastvorljivost što se može, kao što je ranije naglašeno, dovesti u vezu sa metodom rada, ali može biti i posledica interakcije ugljenih hidrata sa drugim komponentama u polenu, a pre svega sa proteinima (gde mogu da predstavljaju prostetičnu grupu u nekom složenom proteinu) ili sa polifenolima, sa kojima formiraju glikozide o čemu će biti reči u delu o ispitivanju sadržaj polifenolnih jedinjenja u polenu. Ako se uporede vrednosti za ukupni sadržaj ugljenih hidrata i njihovu rastvorljivu frakciju vidimo da udeo rastvorljivih šećera značajno varira i kreće se od 31,2% u uzorku broj **24** do 75% koliko ih je sadržavao uzorak broj **17**. Ukoliko uporedimo botaničko poreklo tih uzoraka uočava se da i jedan i drugi uzorak u svom sastavu sadrže polene mahunarki i krstašica što potvrđuje tezu Saa-Otero-ve i saradnika da je teško dovesti u direktnu vezu sadržaj ovih šećera sa palinološkim poreklom uzoraka [Saa-Otero *et al.*, 2000]. Prosečna rastvorljivost ugljenih hidrata u ispitivanim uzorcima je iznosila 58,29% od ukupnih ugljenih hidrata. Najverovatnije da udeo rastvorljivih ugljenih hidrata opada u onim uzorcima u kojima su više bili zastupljeni polisaharidi poput kaloze, celuloze, lignina i sporopolenina a koji nisu bili rastvorni u vodi [Krell, 1996].

IV-2f Sadržaj ukupnih lipida i pojedinačnih masnih kiselina u uzorcima polena

Ukupni sadržaj lipida određen u uzorcima polena, kao i pojedinačnih masnih kiselina koje su identifikovane prikazan je u **Tabeli 17**.

Na osnovu prikazanih podataka može se videti da se ukupni sadržaj lipida, u ispitivanim uzorcima, kretao od 1,31 g/100g do 6,78 g/100g. Najmanje ovih supstanci pronađeno je u uzorku broj **25** (Vinča) dok je najveći sadržaj pronađen u uzorku broj **2** (Bački Monoštor). Prosečan sadržaj lipidnih supstanci je iznosio 2,66 g/100g uzorka. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima koje daju Orzáez-Villanueva i saradnici (3,60 - 8,96 g/100g) [Orzáez-Villanueva *et al.*, 2002], Somerwille (prosečni sadržaj 2,52 g/100g) [2005] kao i Estevinho-ova (2,33 - 3,32 g/100g) [Estevinho *et al.*, 2012] i Nogueira-ova (2,35 - 3,06 g/100g) [Nogueira *et al.*, 2012] sa svojim timovima. Sa druge strane, nešto više prosečne vrednosti za sadržaj lipida nalazimo u radovima Serra-Bonvehí-ja i Jordá-e (prosečni sadržaj 5,91 g/100g) [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] kao i Carpes-ove i njenih kolega (prosečni sadržaj 4,86 g/100g) [Carpes *et al.*, 2009]. U uzorcima polena iz Egipta nađeni su lipidi u znatno većoj količini (7,16 - 10,92%) [Shawer *et al.*, 1987] dok Day-ova sa kolegama [Day *et al.*, 1990], u uzorcima novozelandskih polena, nalazi lipidne materije u znatno širem opsegu vrednosti u odnosu na sve ostale radove (od 0,17% do 13,4%).

Poređenjem botaničkog porekla ispitivanih uzoraka polena može se jasno uočiti da je najveći sadržaj lipidnih supstanci nađen u monofloralnom polenu koji je vodio poreklo od kupusnjača. I ostali uzorci u kojima je polen ove familije bio dominantan i značajno zastupljen su se odlikovali nešto višim sadržajem lipidnih supstanci. Tako npr. drugi po sadržaju lipidnih supstancije bio polen iz uzorka **12** (5,48 g/100g); u njemu je pronađeno čak 76% polena kupusnjača što ga čini skoro monofloralnim. Isto tako, i uzorak iz Smedereva (br. **13**) imao je visok sadržaj polena ove familije biljaka (53%), a, u skladu sa time, i nešto viši sadržaj lipidnih supstanci (3,76 g/100g). Sa druge strane, može se reći da prisustvo polena leguminoza utiče na smanjenje sadržaja lipidnih supstanci. Naime, uzorci u kojima je polen ove familije biljaka imao značajnog udela uglavnom su se nalazili pri dnu skale po sadržaju lipidnih materija.

Tako je u uzorcima **14**, **22** i **24** od kojih je prvi bio monofloralni sa 81% udela polena ove familije, a druga dva su se odlikovala visokim sadržajem polena leguminoza (57 i 78%), sadržaj lipida bio ispod ili na granici od 2 g/100g uzorka. Poređenjem sadržaja lipidnih supstanci u uzorcima u kojima su bili zastupljeni istovremeno poleni ove dve vrste biljnih familija u značajnijim količinama, može se videti da je sadržaj lipida bio na nivou ili nešto malo iznad prosečnog sadržaja – u uzorku **3** (48% leguminoze i 19% kupusnjače) iznosio je 2,25 g/100g, u uzorku **17** (34% kupusnjače i 28% leguminoze) iznosio je oko 3 g/100g, a i u uzorku broj **21** (34% leguminoze i 25% kupusnjače) 2,96 g/100g. Na osnovu ovoga može se zaključiti da poleni ove dve familije biljaka imaju suprotne trendove u smislu sadržaja lipidnih supstanci.

Tabela 17 (I deo). - Ukupni sadržaj lipida [g/100g] i sadržaj pojedinačnih masnih kiselina [%] u uzorcima polena*

| uzorak | Ukupni lipidi | C8:0** | C12:0** | C14:0** | C15:0** | C16:0** | C16:1** | C17:0** |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|
| 1 | 3,07 ± 0,03 | 2,29 ± 0,10 | 0,92 ± 0,02 | 2,36 ± 0,10 a | 0,98 ± 0,03 a | 26,48 ± 0,28 | 1,15 ± 0,10 a | 0,96 ± 0,03 a |
| 2 | 6,78 ± 0,07 | 6,44 ± 0,16 a | 1,77 ± 0,08 a | 7,29 ± 0,21 | 1,99 ± 0,08 | 15,80 ± 0,21 | / | 2,85 ± 0,12 b |
| 3 | 2,25 ± 0,04 | 5,54 ± 0,11 b | 2,84 ± 0,11 b | 11,24 ± 0,03 b | 0,71 ± 0,02 d | 27,68 ± 0,39 a | / | 0,76 ± 0,02 |
| 4 | 2,66 ± 0,01 | 8,56 ± 0,12 | 10,51 ± 0,21 | / | / | 37,39 ± 0,37 | / | / |
| 5 | 4,30 ± 0,04 | 2,73 ± 0,06 c | 5,20 ± 0,12 c | 4,78 ± 0,23c,d,e | 1,20 ± 0,05 | 20,89 ± 0,29 b | / | 1,79 ± 0,08 c |
| 6 | 2,91 ± 0,02 b | 1,58 ± 0,07 | 2,07 ± 0,06 | 1,81 ± 0,09 | 1,34 ± 0,06 e | 34,28 ± 0,27 c | / | 0,69 ± 0,03 |
| 7 | 2,18 ± 0,01 c,d | 4,71 ± 0,10 d,e | 7,45 ± 0,11 d | 4,84 ± 0,10 d | 1,93 ± 0,08 b,f | 23,56 ± 0,26 d | / | 2,40 ± 0,10 d |
| 8 | 2,38 ± 0,03 e | 3,00 ± 0,11 h | 1,23 ± 0,06 e | 4,42 ± 0,11 c,f | / | 27,58 ± 0,29 a | / | / |
| 9 | 2,55 ± 0,04 | 7,51 ± 0,16 | 4,30 ± 0,19 f | 2,51 ± 0,10 a,g | 1,63 ± 0,03 | 20,95 ± 0,29 b | / | 1,24 ± 0,06 |
| 10 | 2,05 ± 0,02 f | 11,56 ± 0,14 | 4,65 ± 0,11 f,g | 5,57 ± 0,12 h | 2,16 ± 0,10 c | 24,88 ± 0,21 e | / | 2,43 ± 0,10 d |
| 11 | 3,40 ± 0,03 | 2,54 ± 0,11 c | 1,21 ± 0,06 e | 4,26 ± 0,12 i,f | 0,96 ± 0,04 a | 27,67 ± 0,37 a | 1,13 ± 0,05 a | 1,56 ± 0,07 e |
| 12 | 5,48 ± 0,06 | 3,07 ± 0,09 h | 0,73 ± 0,02 | 4,74 ± 0,12 d,j | 0,47 ± 0,02 | 18,39 ± 0,15 | / | 2,72 ± 0,10 b |
| 13 | 3,76 ± 0,02 | 4,89 ± 0,12 d,e | / | 4,49 ± 0,10 c,f,j | 0,85 ± 0,04 | 20,69 ± 0,21 b | / | 1,81 ± 0,09 |
| 14 | 2,08 ± 0,03 f,g | 4,76 ± 0,11 d,e | 1,61 ± 0,08 a,h | 6,88 ± 0,12 | 1,79 ± 0,08 f | 23,43 ± 0,23 d | / | 1,74 ± 0,08 c |
| 15 | 2,19 ± 0,05 c | 4,41 ± 0,12 f,g | 5,46 ± 0,11 c,i | 2,76 ± 0,10 k | 3,24 ± 0,09 | 21,60 ± 0,20 | / | 2,61 ± 0,09 |
| 16 | 2,12 ± 0,03 d,g | 6,39 ± 0,09 a | 5,65 ± 0,10 i | / | / | 31,47 ± 0,24 f | / | b,d |
| 17 | 1,93 ± 0,03 | 5,19 ± 0,10 i | 2,91 ± 0,09 b | 3,32 ± 0,11 l,m | 1,38 ± 0,06 e | 28,10 ± 0,19 a | / | 1,99 ± 0,08 f |
| 18 | 3,15 ± 0,02 | 4,07 ± 0,10 | 4,71 ± 0,11 g | 5,13 ± 0,09 e | 0,74 ± 0,03 d | 20,72 ± 0,22 b | / | 1,57 ± 0,07 e |
| 19 | 1,61 ± 0,03 | 4,67 ± 0,11 d,f | 2,36 ± 0,10 j | 3,38 ± 0,11 i | / | 22,74 ± 0,22 g | / | 0,94 ± 0,03 a |
| 20 | 2,96 ± 0,05 b | 5,48 ± 0,19 | 0,69 ± 0,03 | 10,43 ± 0,23 | / | 33,73 ± 0,29 | / | / |
| 21 | 2,38 ± 0,04 e | 4,77 ± 0,10 e,f | 6,22 ± 0,21 | 3,99 ± 0,18 i | / | 40,54 ± 0,52 | / | 2,46 ± 0,11 d |
| 22 | 1,50 ± 0,03 h | 4,77 ± 0,12 e,f | 4,48 ± 0,10 f,g | 5,64 ± 0,13 h | / | 24,83 ± 0,23 e | / | / |
| 23 | 1,51 ± 0,03 h | 16,75 ± 0,23 | 3,22 ± 0,10 | 7,85 ± 0,12 | / | 24,73 ± 0,22 e | / | / |
| 24 | 1,84 ± 0,04 i | 4,42 ± 0,11 g | 2,27 ± 0,10 j | 11,05 ± 0,15 b | 0,75 ± 0,03 d | 33,25 ± 0,27 h | / | / |
| 25 | 1,31 ± 0,01 | 5,30 ± 0,11 b,i | 7,47 ± 0,15 d | 2,71 ± 0,11 g,k | 1,48 ± 0,07 e | 31,83 ± 0,25 f | / | / |
| 26 | 1,78 ± 0,07 i | 2,98 ± 0,10 h | 1,59 ± 0,07 h | 3,13 ± 0,11 m | 1,08 ± 0,05 | 22,99 ± 0,28 | / | / |
| min vrednost | 1,31 ± 0,01 | 1,58 ± 0,07 | 0,69 ± 0,03 | 1,81 ± 0,09 | 0,47 ± 0,02 | 15,80 ± 0,21 | 1,13 ± 0,05 | 0,69 ± 0,03 |
| max vrednost | 6,78 ± 0,07 | 16,75 ± 0,23 | 10,51 ± 0,21 | 11,24 ± 0,03 | 3,24 ± 0,09 | 40,54 ± 0,52 | 1,15 ± 0,10 | 2,72 ± 0,10 |

* Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali (p < 0,05).

** Oznake u tabeli: C8:0 - kaprilna kiselina; C12:0 - laurinska kiselina; C14:0- miristinska kiselina; C15:0- pentadekanoinska kiselina; C16:0- palmitinska kiselina; C16:1- palmitoleinska kiselina; C17:0- margarinska kiselina.

Iz tog razloga dok prisustvo polena kupusnjača utiče na povećanje sadržaja ukupnih lipida prisustvo polena mahunarki utiče na njegovo smanjivanje pa je rezultat ova dva suprotna uticaja prosečni sadržaj lipidnih supstanci u ovakvim

uzorcima. Najniži sadržaj lipida nađen je u polifloralnom uzorku broj **25** koji je pretežno sadržavao polen japanskog bagrema (46%) i suncokreta (21%). Ako se pogleda i uzorak broj **23**, koji je sadržavao 42% polena japanskog bagrema a sadržaj lipida mu je bio jako nizak (1,51 g/100g), može se izvesti zaključak i da se polen ove biljke odlikuje niskim sadržajem lipidnih supstanci. Takođe, i uzorak broj **4** koji je bio skoro monofloralnog porekla od suncokreta imao je sadržaj lipida u granicama proseka što znači da je polen i ove biljke siromašan ili relativno siromašan lipidnim supstancama.

Tabela 17 (II deo). - Sadržaj pojedinačnih masnih kiselina [%] u uzorcima polena*

| | C18:0** | C18:1n-9** | C18:2n-6** | C18:3n-6** | C18:3n-3** | C20:0** | C20:1** | C20:2** |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 6,43 ± 0,14 | 22,50 ± 0,30 a | 9,08 ± 0,19 a,b | / | 8,64 ± 0,14 a | 0,78 ± 0,02 | / | 0,77 ± 0,02 |
| 2 | 6,96 ± 0,18 a | 19,25 ± 0,24 b | 8,69 ± 0,19 a | / | 27,72 ± 0,13 b | 1,25 ± 0,06 a | / | / |
| 3 | 11,16 ± 0,15 b | 15,05 ± 0,15 c | 4,99 ± 0,10 c | / | 17,00 ± 0,19 | 2,31 ± 0,08 c | / | / |
| 4 | 15,47 ± 0,24 c | 13,93 ± 0,23 d | 6,60 ± 0,21 d | / | 7,54 ± 0,15 c | / | / | / |
| 5 | 13,31 ± 0,22 d,e | 12,69 ± 0,21 e,f | 8,01 ± 0,13 e | 0,56 ± 0,02 | 25,05 ± 0,24 d | 1,95 ± 0,08 b | / | / |
| 6 | 14,53 ± 0,13 f | 18,85 ± 0,24 b | 11,06 ± 0,14 f | / | 7,68 ± 0,08 c | 1,38 ± 0,06 a | / | / |
| 7 | 12,06 ± 0,18 g | 11,99 ± 0,20 g | 9,57 ± 0,11 g | / | 16,37 ± 0,17 e | 2,06 ± 0,07 b | / | / |
| 8 | 12,08 ± 0,18 g,h | 22,71 ± 0,31 a | 5,62 ± 0,12 h,i | / | 22,32 ± 0,34 f | 1,03 ± 0,05 | / | / |
| 9 | 11,39 ± 0,38 b | 13,50 ± 0,31 d | 9,37 ± 0,26 b,g | / | 22,19 ± 0,27 f | 2,39 ± 0,11 c,d | 1,68 ± 0,08 | / |
| 10 | 6,98 ± 0,12 a | 10,77 ± 0,12 | 7,57 ± 0,11 | / | 14,38 ± 0,17 g | 4,06 ± 0,11 e | / | / |
| 11 | 8,90 ± 0,14 | 13,99 ± 0,34 d | 5,04 ± 0,14 c | / | 22,27 ± 0,26 f | 3,99 ± 0,12 e | / | / |
| 12 | 10,25 ± 0,16 i | 15,06 ± 0,16 c | 5,21 ± 0,13 c,j | / | 36,79 ± 0,46 | 2,57 ± 0,11 d,f | / | / |
| 13 | 13,09 ± 0,11 d | 15,59 ± 0,18 h | 5,53 ± 0,10 h | / | 27,75 ± 0,21 b | 5,30 ± 0,09 | / | / |
| 14 | 11,92 ± 0,13 g | 15,66 ± 0,15 h | 6,42 ± 0,13 d | / | 21,53 ± 0,28 | 2,50 ± 0,11 c,f | / | / |
| 15 | 13,93 ± 0,16 j,k | 17,12 ± 0,13 | 8,77 ± 0,11 a | / | 16,30 ± 0,11 e | 1,60 ± 0,07 g | / | / |
| 16 | 13,20 ± 0,19 d | 12,35 ± 0,14 e,g | 11,20 ± 0,17 f | / | 19,74 ± 0,15 i | / | / | / |
| 17 | 12,98 ± 0,20 d,l | 16,71 ± 0,19 | 3,92 ± 0,11 | / | 20,68 ± 0,21 h | 1,32 ± 0,06 a | / | / |
| 18 | 12,41 ± 0,12h,m | 12,82 ± 0,20 f | 10,98 ± 0,25 f | / | 22,48 ± 0,27 f | 1,90 ± 0,09 b | / | / |
| 19 | 12,53 ± 0,14 m | 10,10 ± 0,18 i | 7,98 ± 0,15 e | / | 14,72 ± 0,15 g | 3,41 ± 0,13 | / | / |
| 20 | 13,61 ± 0,14 e,k | 14,95 ± 0,16 c | 5,37 ± 0,11 h,j | / | 20,01 ± 0,30 i | 1,95 ± 0,08 b | / | / |
| 21 | 10,08 ± 0,20 n | 11,30 ± 0,25 | 5,84 ± 0,14 i,k | / | 12,50 ± 0,11 | / | 2,30 ± 0,09 | / |
| 22 | 9,85 ± 0,15 n | 12,17 ± 0,16 g | 5,62 ± 0,21 h,k | / | 20,66 ± 0,27 h | / | / | / |
| 23 | 14,23 ± 0,15 f,j | 13,63 ± 0,16 d | 4,98 ± 0,10 c | / | 8,64 ± 0,12 a | 5,95 ± 0,11 | 2,64 ± 0,09 | / |
| 24 | 12,81 ± 0,13 l | 13,54 ± 0,15 d | 5,97 ± 0,11 k | / | 13,60 ± 0,18 | 1,57 ± 0,07 g | / | / |
| 25 | 15,47 ± 0,28 c | 10,08 ± 0,16 i | 8,03 ± 0,11 e | / | 11,69 ± 0,25 | 2,28 ± 0,09 c | / | / |
| 26 | 14,11 ± 0,20 j | 15,05 ± 0,17 c | 6,67 ± 0,15 d | / | 24,98 ± 0,28 d | 4,57 ± 0,14 | / | / |
| min vrednost | 6,43 ± 0,14 | 10,08 ± 0,16 | 3,92 ± 0,11 | 0,56 ± 0,02 | 7,54 ± 0,15 | 0,78 ± 0,02 | 1,68 ± 0,08 | 0,77 ± 0,02 |
| max vrednost | 15,47 ± 0,24 | 22,71 ± 0,31 | 11,20 ± 0,17 | 0,56 ± 0,02 | 36,79 ± 0,46 | 5,95 ± 0,11 | 2,64 ± 0,09 | 0,77 ± 0,02 |

* Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali (p < 0,05).

** Oznake u tabeli: C18:0- stearinska kiselina; C18:1n-9- oleinska kiselina; C18:2n-6- linolna kiselina; C18:3n-6-γ- linolenska kiselina; C18:3n-3- linolenska kiselina; C20:0- arahidska kiselina; C20:1- eikozanska kiselina; C20:2- eikozadienska kiselina.

Većina autora je saglasna da je uzrok razlikama u sadržaju lipidnih supstanci razlika u botaničkom poreklu [Bogdanov, 2012; Shower *et al.*, 1987; Day *et al.*, 1990; Campos *et al.*, 2008], a Szcsęsna [Szcsęsna, 2006a] izdvaja i mogućnost uticaja različite metodologije rada. Naime, imajući u vidu veliku raznovrsnost ove

grupacije jedinjenja kao i razlike u tome u kom delu polenovog zrna se javljaju (što je već detaljno objašnjeno u odeljku **II-2d** Opšteg dela) Dobson-ova [Dobson, 1988] ukazuje na sličnosti u sadržaju lipida u površinskom sloju polenovog zrna u zavisnosti od njegovog botaničkog porekla. Tako npr. biljke iz familije glavočika pokazuju veliku raznovrsnost u sadržaju lipida dok, sa druge strane, biljke iz familije Onagraceae se odlikuju siromašnom lipidnom frakcijom uz posebno slabu zastupljenost ugljovodonika.

Tabela 17 (III deo). - Sadržaj pojedinačnih masnih kiselina [%] u uzorcima polena*

| | C22:0** | C20:3n-6** | C20:3n-3** | C20:5n-3** | C22:5n-3** | C22:6n-3** | C24:0** |
|--------------|-----------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|---------------|
| 1 | 0,72 ± 0,03 a | 4,95 ± 0,16 | 5,12 ± 0,12 | / | 2,70 ± 0,15 | / | 3,17 ± 0,12 |
| 2 | / | / | / | / | / | / | / |
| 3 | 0,72 ± 0,03 a | / | / | / | / | / | / |
| 4 | / | / | / | / | / | / | / |
| 5 | 1,83 ± 0,07 b | / | / | / | / | / | / |
| 6 | 2,51 ± 0,07 | / | / | / | 2,21 ± 0,06 | / | / |
| 7 | 1,76 ± 0,08 b | / | / | / | / | / | 1,28 ± 0,08 a |
| 8 | / | / | / | / | / | / | / |
| 9 | 1,36 ± 0,06 c | / | / | / | / | / | / |
| 10 | 5,00 ± 0,12 | / | / | / | / | / | / |
| 11 | 0,88 ± 0,02 | / | 3,99 ± 0,12 | / | / | / | 0,96 ± 0,03 |
| 12 | / | / | / | / | / | / | / |
| 13 | / | / | / | / | / | / | / |
| 14 | 1,75 ± 0,07 b | / | / | / | / | / | / |
| 15 | 2,20 ± 0,11 | / | / | / | / | / | / |
| 16 | / | / | / | / | / | / | / |
| 17 | 1,51 ± 0,07 d,e | / | / | / | / | / | / |
| 18 | 1,37 ± 0,06 c,d | / | / | / | / | / | 1,15 ± 0,04 a |
| 19 | 10,91 ± 0,19 | 6,25 ± 0,11 | / | / | / | / | / |
| 20 | 1,26 ± 0,06 c | / | / | / | / | / | / |
| 21 | / | / | / | / | / | / | / |
| 22 | / | / | / | / | / | / | / |
| 23 | 7,29 ± 0,11 | / | / | / | / | / | / |
| 24 | 0,78 ± 0,02 a | / | / | / | / | / | / |
| 25 | 3,66 ± 0,18 | / | / | / | / | / | / |
| 26 | 1,58 ± 0,05 e | 0,54 ± 0,02 | 0,74 ± 0,02 | / | / | / | / |
| min vrednost | 0,72 ± 0,03 | 0,54 ± 0,02 | 0,74 ± 0,02 | / | 2,21 ± 0,06 | / | 0,96 ± 0,03 |
| max vrednost | 10,91 ± 0,19 | 6,25 ± 0,11 | 5,12 ± 0,12 | / | 2,21 ± 0,06 | / | 3,17 ± 0,12 |

* Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$).

** Oznake u tabeli: C22:0- behenska kiselina; C20:3n-6- dihomo- γ -linolenska kiselina; C20:3n-3- eikozatrienska kiselina; C20:5n-3- eikozapentanoiska kiselina; C22:5n-3- dokozaheptanoiska kiselina; C22:6n-3- dokozaheksanoiska kiselina; C24:0- lignocerinska kiselina.

Analizom sadržaja pojedinačnih masnih kiselina dolazimo do sledećih zaključaka:

- ✓ u svim uzorcima prisutno je šest masnih kiselina i to – C8:0, C16:0, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6 i C18:3n-3
- ✓ od preostalih masnih kiselina šest se može posmatrati kao značajno zastupljene jer su se javljale u većini uzoraka i to - jedna (C12:0) je identifikovana u dvadeset pet uzoraka polena, jedna (C14:0) u dvadeset četiri uzorka, jedna (C20:0) u

dvadeset dva uzorka, dve (C15:0 i C22:0) u osamnaest uzoraka i jedna (C17:0) u sedamnaest uzoraka

- ✓ za osam masnih kiselina se može reći da su slabo zastupljene u uzorcima i to – jedna (C24:0) je detektovana u četiri uzorka, tri (C20:1, C20:3n-3 i C20:3n-6) su identifikovane u tri uzorka, jedna (C16:1) je pronađena u dva uzorka, jedna (C18:3n-6) je identifikovana samo u jednom uzorku dok dve masne kiseline (C20:5n-3 i C22:6n-3) nisu pronađene ni u jednom od ispitivanih uzoraka.

Prisustvo retkih i neuobičajenih masnih kiselina u semenu biljaka može se, u mnogim slučajevima, dovesti u vezu sa pripadnošću određenoj biljnoj porodici [Aitzmüller, 1993; Bađci *et al.*, 2003; Tsydendambaev *et al.*, 2004]. U smislu sadržaja polinezasićenih masnih kiselina biljne vrste i porodice se dele u dve velike grupe:

- ✓ „18:3“ biljke
- ✓ „16:3“ biljke.

Kod prve grupe biljaka obavezno je prisustvo linolenske kiseline (C18:3) kao karakteristične polinezasićene masne kiseline i svih drugih masnih kiselina za koje je ona prekursor dok je kod „16:3“ biljnih vrsta karakteristično da, osim linolenske, sadrže i najmanje 2% heksadekatrienske kiseline (C16:3) [Mongrand *et al.*, 1998; Tsydendambaev *et al.*, 2004]. Linolenska kiselina je proizvod metabolizma pretežno viših biljaka i zbog toga se javlja kod biljnih vrsta koje su na najvišem evolutivnim stupnju dok su „16:3“ biljne vrste uglavnom na nešto nižem stupnju razvoja jer je ova masna kiselina karakteristična i za prokariotske organizme poput algi ili cijanobakterija [Mongrand *et al.*, 1998; Tsydendambaev *et al.*, 2004].

Na osnovu navedenih podataka moguće je objasniti prisustvo nekih od retkih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima polena na sledeći način:

- ✓ γ -linolenska kiselina (C18:3n-6) i njeno prisustvo u uzorku broj 5 mogu se povezati sa prisustvom polena biljaka iz porodice Brassicaceae s obzirom da je ova retka masna kiselina izolovana u semenu uljane repice (*Brassica napus*) [Thelen i Ohlrogge, 2002]. S obzirom da je uzorak br. 5 vodio

poreklo iz beogradskog regiona ova biljna kultura je zastupljena i gaji se u okolnim mestima, pa je moguće da je njen polen prisutan i u ispitivanom uzorku polena

- ✓ Prisustvo eikozadienske (C20:2) polinezasićene masne kiseline u uzorku br. **1** može se povezati sa prisustvom polena biljaka iz familije Rannunculaceae, koji je zastupljen u njemu [Tsydendambaev *et al.*, 2004] kao i sa polenom kukuruza koji je, takođe, izolovan u ovom uzorku [Makarenko *et al.*, 2003]
- ✓ Prisustvo eikozanske (gadoleinske) kiseline (C20:1) u uzorku br. **9** može se povezati sa prisustvom biljaka iz familije Fabaceae (a koji je bio dominantno zastupljen u ovom uzorku) i to najverovatnije sa sojom jer je ova masna kiselina izolovana iz semena ove biljke [Thelen i Ohlrogge, 2002] kao i sa polenom biljaka iz familije Brassicaceae (pre svega sa uljanom repicom) čiji je polen, takođe, identifikovan u ovom uzorku, a može da sadrži eikozadiensku kiselinu [Holbrook *et al.*, 1992]. Prisustvo ove nezasićene masne kiseline u uzorku broj **21** može se dovesti u vezu sa dominantno zastupljenim polenom biljaka iz familije Rannunculaceae [Tsydendambaev *et al.*, 2004; Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007; Telci *et al.*, 2014], dok se njeno prisustvo u uzorku broj **23** može dovesti u vezu sa prisustvom polena biljaka familije Cannabaceae u kojima je utvrđeno da u njihovom semenu ima ove retke masne kiseline [Bağci *et al.*, 2003]
- ✓ Iako se dominantno zastupljene familije od kojih vode poreklo uzorci polena broj **1** i **11** potpuno razlikuju, prisustvo palmitoleinske kiseline u njima bi se moglo dovesti u vezu sa polenom kukuruza za šta postoje i podaci u literaturi [Makarenko *et al.*, 2003]. Naime, polen ove biljke je prisutan u uzorku br. **1** kao prateći polen, a moguće je da se javlja i u uzorku br. **11** samo u veoma niskoj količini pa nije identifikovan kao značajnije zastupljen. Osim toga u uzorku broj **1** ova nezasićena masna kiselina može da potiče i od polena biljaka iz familije Rannunculaceae u čijem semenu je, takođe, izolovana [Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007].

Prisustvo retkih polinezasićenih masnih kiselina (C18:3n-6, C20:3n-3 i C20:3n-6) u određenim uzorcima polena može se povezati sa prisustvom mikroorganizama u

njima [Lopez Alonso i Garcia Maroto, 2000]. Naime, u procesu biosinteze ovih kiselina iz stearinske kiseline pod dejstvom odgovarajućeg enzima, desaturaze, nastaje oleinska kiselina, a iz nje se dalje formira linolenska kiselina. S obzirom na činjenicu da više biljke, kao i sisari, nemaju sposobnost biosinteze ovih masnih kiselina zbog nedostatka, enzima koji su neophodni u procesu elongacije C-niza, moguće je da su one nastale kao produkt aktivnosti mikroorganizama [Gill i Valivety, 1997].

Uzorci broj **1** i **11** mogu se okarakterisati kao specifični, s obzirom da su bogati retkim masnim kiselinama, jer se jedino u njima može pronaći palmitoleinska kiselina dok se uzorak **1** još odlikuje i specifičnim prisustvom lignocerinske (koje ima i u uzorku broj **11**) eikozatrienske, dokozapentanoinske kao i dihomog-linoleinske kiseline. Moguće je da se ovo može povezati sa njihovim zajedničkim geografskim poreklom, jer oba uzorka vode poreklo iz Beograda, kao i sa eventualnom aktivnošću mikroorganizama u njima.

S obzirom na važnost masnih kiselina u ishrani i na to da možemo razlikovati zasićene i nezasićene masne kiseline koje, sa nutritivnog aspekta, imaju različit značaj [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] (o čemu je bilo reči u odeljku **II-2d** Opšteg dela) upoređeni su i sadržaji svakog od ovih tipova masnih kiselina u ispitivanim uzorcima. U **Tabeli 18** dati su ukupni sadržaji zasićenih (ZMK), mononezasićenih (MNMK) i polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) u ispitivanim uzorcima.

Najzastupljenija među zasićenim masnim kiselinama je bila palmitinska kiselina sa prosečnim sadržajem od 26,39%. Najveća zastupljenost ove kiseline je bila u uzorku broj **21** (40,54%), a najmanja u uzorku broj **2** (15,80%).

Druga po zastupljenosti je bila stearinska kiselina čiji se sadržaj u uzorcima kretao u opsegu 6,43 (uzorak br. **1**) – 15,47% (uzorak br. **25**). Prosečan sadržaj ove masne kiseline u uzorcima je iznosio 11,91%. Na kraju, treća zasićena masna kiselina, a koja je bila prisutna u svim ispitivanim uzorcima, je bila kaprilna kiselina sa prosečnim sadržajem 5,32% od ukupnih masnih kiselina pri čemu je najviše ove kiseline nađeno u uzorku broj **23** (16,75%), a najmanje u uzorku broj **6** (1,58%). Od mononezasićenih masnih kiselina u svim uzorcima je bila prisutna oleinska kiselina sa prosečnim udelom od 14,67% pri čemu je najveći sadržaj ove kiseline nađen u uzorku broj **8** (22,71%) a najmanji u uzorcima broj **19** i **25** (10,10%). Linolna i linolenska kiselina

su bile polinezasićene masne kiseline koje su identifikovane u svim ispitivanim uzorcima polena. Znatno veći udeo je utvrđen kod linolenske (prosečan sadržaj 18,59%) nego kod linolne kiseline (prosečan sadržaj 7,23%). Uzorak najbogatiji linolenskom kiselinom je bio uzorak broj **12** (36,79%), a najsiromašniji je bio uzorak broj **4** (7,54%). Sa druge strane, najveći udeo linolne kiseline je nađen u uzorku broj **16** (11,20%), a najmanji u uzorku broj **17** (3,92%).

Tabela 18. - Udeli pojedinih tipova masnih kiselina [%] u uzorcima polena kao i odnos sadržaja zasićenih i nezasićenih m.k.

| uzorci | ZMK* | MNMK* | PNMK* | Σ (NMK) | NMK/ZMK |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|---------------|
| 1 | 45,09 | 23,65 | 31,26 | 54,91 | 1,2178 |
| 2 | 44,35 | 19,25 | 36,41 | 55,66 | 1,255 |
| 3 | 62,96 | 15,05 | 21,99 | 37,04 | 0,5883 |
| 4 | 71,93 | 13,93 | 14,14 | 28,07 | 0,3902 |
| 5 | 53,68 | 12,69 | 33,62 | 46,31 | 0,8627 |
| 6 | 60,19 | 18,85 | 18,74 | 37,59 | 0,6245 |
| 7 | 62,05 | 11,99 | 25,94 | 37,93 | 0,6113 |
| 8 | 49,34 | 22,71 | 27,94 | 50,65 | 1,0266 |
| 9 | 53,28 | 15,18 | 31,56 | 46,74 | 0,8773 |
| 10 | 67,29 | 10,77 | 21,95 | 32,72 | 0,4863 |
| 11 | 52,93 | 15,12 | 27,31 | 42,43 | 0,8016 |
| 12 | 42,94 | 15,06 | 42 | 57,06 | 1,3288 |
| 13 | 51,12 | 15,59 | 33,28 | 48,87 | 0,956 |
| 14 | 56,38 | 15,66 | 27,95 | 43,61 | 0,7735 |
| 15 | 57,81 | 17,12 | 25,07 | 42,19 | 0,7298 |
| 16 | 56,71 | 12,35 | 30,94 | 43,29 | 0,7634 |
| 17 | 58,7 | 16,71 | 24,6 | 41,31 | 0,7037 |
| 18 | 53,77 | 12,82 | 33,46 | 46,28 | 0,8607 |
| 19 | 60,94 | 10,1 | 28,95 | 39,05 | 0,6408 |
| 20 | 67,15 | 14,95 | 25,38 | 40,33 | 0,6006 |
| 21 | 68,06 | 13,6 | 18,34 | 31,94 | 0,4693 |
| 22 | 49,57 | 12,17 | 26,28 | 38,45 | 0,7757 |
| 23 | 80,02 | 16,28 | 13,62 | 29,9 | 0,3737 |
| 24 | 66,9 | 13,54 | 19,57 | 33,11 | 0,4949 |
| 25 | 70,2 | 10,08 | 19,72 | 29,8 | 0,4245 |
| 26 | 52,03 | 15,05 | 32,93 | 47,98 | 0,9222 |
| min vrednost | 42,94 | 10,08 | 14,14 | 28,07 | 0,3737 |
| max vrednost | 80,02 | 23,65 | 42,00 | 57,06 | 1,3288 |

* ZMK- zasićene masne kis., MNMK-mononezasićene masne kis., PNMK-polinezasićene masne kis.

Ako se vrednosti sadržaja pojedinačnih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima uporede sa podacima u literaturi najbližnjem raspodelu u sadržaju masnih kiselina nalazimo u podacima za kineske uzorke polena [Yang *et al.*, 2013] s tim što su autori u ovim uzorcima kao najzastupljeniju pronašli linolensku (25,1%) a kao drugu po zastupljenosti palmitinsku kiselinu (19,6%) dok je u analiziranim uzorcima redosled bio obrnut sa vrlo sličnom procentualnom zastupljenošću (26,39% tj. 18,59%). Treća po zastupljenosti, u oba slučaja, je bila oleinska kiselina

koje je u kineskim uzorcima polena bilo (17,3%) što je bilo nešto više u odnosu na uzorke polena ispitivane u ovoj disertaciji (14,67%). Stearinska kiselina, koja je u ispitivanim uzorcima polena bila 4. po zastupljenosti, u kineskim se nalazila na 5. mestu (2,96%), odmah iza behenske kiseline koja se u ispitivanim uzorcima našla na 8. mestu i to kao poslednja od masnih kiselina koje su bile zastupljene u većini uzoraka. Sličan raspored najzastupljenije tri masne kiseline nalazimo i u radu Estevinho-ve i saradnika [Estevinho *et al.*, 2012] koji su pronašli da su tri glavne masne kiseline bile linolenska (30 - 55,7%), linolna i palmitinska kiselina kao i u radu Feás-a i saradnika [Feás *et al.*, 2012], dok Saa-Otero i saradnici [Saa-Otero *et al.*, 2000] navode da su glavne tri nezasićene masne kiseline bile linolenska, linolna i oleinska kiselina, dok je palmitinska bila znatno manje zastupljena (1,3 - 1,8%) ali prisutna i svim uzorcima. Isti redosled tri glavne kiseline nalazimo i u radu Serra-Bonvehí-ja i Jordá-e koji ističu da je to zbog toga što ove nezasićene kiseline služe da pokrivaju polenovo zrno u vidu tankog filma u „pollen kitt“ zoni [1997]. Markowicz Bastos-eva sa saradnicima [Markowicz Bastos *et al.*, 2004] je u svim uzorcima brazilskih polena utvrdila prisustvo oleinske, linolne i arahidske kiseline, dok palmitinska nije identifikovana u jednom od uzoraka. Sa druge strane, u njihovim uzorcima linolenska kiselina je pronađena samo u dva (od četrnaest) uzoraka. Po Manning-u [2001] u polenu je identifikovano 18 masnih kiselina od kojih su najzastupljenije i najvažnije bile palmitinska, stearinska, oleinska i linolna kiselina. Nicolson i Human-ova [2013] u svom radu daju podatke o prisustvu svega osam masnih kiselina u južnoafričkim polenima pri čemu su tri glavne bile miristinska, palmitinska i linolenska kiselina.

S obzirom na važnost i značaj posmatranja uzajamnog odnosa ova dva tipa masnih kiselina i na poželjno viši sadržaj nezasićenih masnih kiselina u odnosu na zasićene [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997], u **Tabeli 18** dat je i odnos ove dve vrednosti za ispitivane uzorke polena. Kako bi uzorci polena imali zadovoljavajući nutritivni kvalitet neophodno je da odnos ove dve grupe masnih kiselina bude veći od 1 tj. da su više zastupljene nezasićene masne kiseline.

Na osnovu podataka dobijenih za ispitivane uzorke u ovom istraživanju može se videti da je vrednost ovog parametra u samo četiri uzorka (**1, 2, 8 i 12**) zadovoljavajuća tj. veća od 1. U svim ostalim uzorcima zasićene masne kiseline su bile zastupljene u većem udelu u odnosu na nezasićene i zbog toga je za dvadeset

dva uzorka vrednost ovog parametra bila manja od 1. U tom smislu može se zaključiti da su takvi uzorci imali manju nutritivnu vrednost. Međutim, dobijeni rezultati su se poklopili sa podacima koje za NMK/ZMK odnos daje Markowicz Bastos sa svojim kolegama [Markowicz Bastos *et al.*, 2004] koji su, takođe, za brazilske uzorke polena dobili da je udeo zasićenih masnih kiselina bio veći od nezasićenih i da su, u tom smislu, uzorci bili slabijeg kvaliteta sa nutritivnog aspekta. Sa druge strane, uzorci polena iz Španije [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] su bili dobrog nutritivnog kvaliteta jer je u svima NMK/ZMK odnos bio veći od 1, tačnije skoro 2 (1,96). Sličan, povoljan odnos, nezasićenih i zasićenih masnih kiselina našli su i Feás i saradnici [Feás *et al.*, 2012] mada je u njihovom slučaju taj odnos bio nešto niži i bliži 1, ali sasvim dovoljan da uzorke možemo da okarakterišemo kao nutritivno dobre. Yang i saradnici [Yang *et al.*, 2013] ističu da iako u svim uzorcima su najzastupljenije masne kiseline bile linolenska, linolna i palmitinska njihov sadržaj je značajno varirao. Zbog toga se i vrednost odnosa zasićenih i nezasićenih masnih kiselina znatno razlikuje u uzorcima. Tako je udeo linolenske kiseline u svim uzorcima generalno bio viši od udela linolne kiseline, a ona je poznata kao esencijalna masna kiselina za ljudsku ishranu i kao takva se mora unositi putem hrane. Kod čoveka ona bitno utiče na povećanje sadržaja lipoproteina veće gustine. Ovakav povišen sadržaj nezasićenih masnih kiselina u polenima direktno ih nominuje kao dobre kandidate za upotrebu u ljudskoj ishrani kao dijetetski dodatak. Autori razlike koje postoje u sadržaju pojedinačnih masnih kiselina u uzorcima povezuju sa različitim biološkim poreklom kao i sa razlikama u procesu dobijanja i skladištenja uzoraka polena. O velikom uticaju botaničkog porekla polena na sadržaj masnih kiselina govore u svom radu i Saa-Otero-va sa saradnicima [Saa-Otero *et al.*, 2000].

Povišeni sadržaj zasićenih masnih kiselina u odnosu na nezasićene masne kiseline u uzorcima polena ispitivanim u ovoj studiji može biti posledica kako samog sastava i porekla polenovih zrna tako i neodgovarajućih uslova prerade i čuvanja polena [Markowicz Bastos *et al.*, 2004]. Naime, polenovo zrno, nakon što ga pčela sakupi, ako dođe u kontakt sa sadržajem njenih pljuvačnih žlezda podleže nizu hemijskih promena i transformacija među koje spada i oksidacija nezasićenih masnih kiselina pod dejstvom hidrolitičkih enzima iz pljuvačke pčele. Na ove promene utiču i temperatura i prisustvo kiseonika. Takođe, kada pčelari sakupe polen veoma često ga podrvgavaju različitim procesima dehidratacije što može

uticati na smanjenje sadržaja nezasićenih masnih kiselina u njemu. Uticaj uslova prerade i čuvanja polena se posebno nameće kao logičan zaključak s obzirom da je poznato da pčele biraju polen sa visokim sadržajem nezasićenih masnih kiselina [Serra Bonvehí i Jordá, 1997].

Ako se podaci dobijeni za sadržaje masnih kiselina u ispitivnim uzorcima povežu sa botaničkim poreklom ponovo se, kao i u slučaju ukupnih lipida, uočava da je sadržaj nezasićenih masnih kiselina najviši u uzorcima broj **12** (57,06%) i **2** (55,66%) koji su monofloralnog, ili izrazito dominantnog, porekla od familije kupusnjača. Sa druge strane, najviši sadržaj zasićenih masnih kiselina je pronađen u uzorcima **23** (80,02%) i **4** (71,93%) i **25** (70,2%) za koje je ranije utvrđeno da su se odlikovali najnižim sadržajem ukupnih lipida ili su bili u granici proseka.

U **Tabeli 19** dati su rezultati korelacione analize za sadržaj pojedinačnih masnih kiselina u uzorcima polena. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ✓ sadržaj kaprilne kiseline je u značajnoj srednjoj pozitivnoj korelaciji (0,57) sa sadržajem eikozanske kiseline koja se javlja samo u tri uzorka (br. **9**, **21** i **23**). Ovo se ne može dovesti u vezu sa njihovim botaničkim poreklom s obzirom da sva tri potiču od različitih biljnih vrsta i familija
- ✓ sadržaji oleinske i laurinske kiseline su bili u značajnoj srednjoj negativnoj korelaciji (-0,57)
- ✓ sadržaj palmitinske kiseline je, takođe, u značajnoj srednjoj negativnoj korelaciji sa sadržajem linolenske kiseline (-0,64)
- ✓ sadržaj palmitoleinske kiseline je bio u značajnoj srednjoj negativnoj korelaciji sa sadržajem stearinske kiseline (-0,50). Sa druge strane, prisustvo ove masne kiseline je bilo u značajno jakim pozitivnim korelacijama sa sadržajima dve nezasićene masne kiseline – eikozadienske (0,70), eikozatrienske (0,99), kao i u značajnoj srednjoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem dokozapentanoinske kiseline (0,51). Sadržaji eikozatrienske i palmitoleinske kiseline su u izuzetno značajno jakoj pozitivnoj korelaciji (0,99). Njihovo prisustvo se poklapa u dva od tri uzorka u koliko se javlja eikozatrienska kiselina (br. **1** i **11**), dok u uzorku broj **26** nema palmitoleinske kiseline. Ono što karakteriše ove uzorke je zajedničko geografsko poreklo jer su oba uzorka iz regiona grada Beograda. U ista dva

- uzorka identifikovana je i lignocerinska kiselina tako da i ona pokazuje jaku korelacionu povezanost (0,77) sa sadržajem palmitoleinske kiseline
- ✓ sadržaji pentadekanoinske i margarinske kiseline su u umereno jakoj pozitivnoj korelaciji (0,58). Ove dve masne kiseline, pre svega zbog neparnog broja C-atoma, spadaju u ređe i manje zastupljene masne kiseline kako u biljnom, tako i u životinjskom svetu [Řezanka i Sigler, 2009; Jenkins *et al.*, 2015]. U ljudskom organizmu one se javljaju kao posledica konzumiranja mleka i mlečnih proizvoda u kojima nastaju kao produkt aktivnosti mikroorganizama u toku fermentacije [Vlaeminck *et al.*, 2006]. S obzirom da su i uzorci polena podložni procesu fermentacije, moguće je da je prisustvo ove dve masne kiseline u njima upravo posledica takvih mikrobioloških procesa pa je zbog toga izražena i pozitivna korelacija između njihovih sadržaja.
 - ✓ sadržaji oleinske i dokozapentanoinske kiseline su se nalazili u značajnoj srednjoj pozitivnoj korelaciji (0,55) što bi se možda moglo povezati sa činjenicom da je oleinska kiselina prekursor u biosintezi ove polinezasićene masne kiseline [Gill i Valivety, 1997]
 - ✓ sadržaji palmitinske i linolenske kiseline pokazuju značajnu jaku negativnu korelaciju (-0,64) u uzorcima polena
 - ✓ sadržaji arahidske i behenske kiseline su pokazali značajnu srednju pozitivnu korelaciju (0,50) što bi se moglo povezati sa činjenicom da su obe kiseline u uzorke polena verovatno dospele kao posledica aktivnosti mikroorganizama, jer u višim biljkama su retko zastupljene masne kiseline sa C-nizom dužim od osamnaest atoma. Pri tome, moguće da je prvo, iz stearinske kiseline, elongacijom niza nastala arahidska, a zatim iz nje i behenska kiselina
 - ✓ sadržaj behenske kiseline je pokazivao značajno srednju pozitivnu korelaciju sa sadržajem dihomo- γ -linoleinske kiseline (0,53)
 - ✓ lignocerinska kiselina je prisutna u ista dva uzorka u kojima je pronađena i eikozatrienska kiselina tako da njihovi sadržaji pokazuju značajno jaku pozitivnu korelacionu povezanost (0,80).

Tabela 19. - Korelaciona analiza sadržaja pojedinih tipova masnih kiselina

| | 8:0 | 12:0 | 14:0 | 15:0 | 16:0 | 16:1 | 17:0 | 18:0 | 18:1n -9 | 18:2n -6 | 18:3n -6 | 18:3n -3 | 20:0 | 20:1 | 20:2 | 22:0 | 20:3n -6 | 20:3n -3 | 22:5n -3 | 24:0 |
|-------------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------------|-------------|-------|
| 8:0 | / | 0,28 | 0,17 | -0,08 | 0,00 | -0,27 | -0,11 | 0,05 | -0,32 | -0,16 | -0,17 | -0,32 | 0,36 | 0,57* | -0,20 | 0,41 | -0,17 | -0,29 | -0,31 | -0,26 |
| 12:0 | 0,28 | / | -0,40 | 0,07 | 0,34 | -0,28 | -0,04 | 0,32 | -0,52* | 0,31 | 0,13 | -0,44 | -0,40 | 0,14 | -0,21 | 0,01 | -0,22 | -0,30 | -0,24 | -0,09 |
| 14:0 | 0,17 | -0,40 | / | -0,07 | -0,09 | -0,15 | -0,03 | -0,17 | -0,02 | -0,46 | -0,00 | 0,13 | 0,24 | 0,05 | -0,17 | 0,01 | -0,19 | -0,17 | -0,27 | -0,15 |
| 15:0 | -0,08 | 0,07 | -0,07 | / | -0,42 | 0,01 | 0,58* | -0,15 | 0,13 | 0,33 | 0,06 | 0,06 | 0,13 | -0,23 | 0,01 | 0,01 | -0,17 | 0,01 | 0,07 | 0,08 |
| 16:0 | 0,00 | 0,34 | -0,09 | -0,42 | / | 0,03 | -0,46 | 0,30 | -0,12 | -0,13 | -0,18 | -0,64* | -0,43 | 0,17 | 0,00 | -0,14 | -0,10 | 0,02 | 0,17 | -0,08 |
| 16:1 | -0,27 | -0,28 | -0,15 | 0,01 | 0,03 | / | 0,02 | -0,50* | 0,32 | -0,02 | -0,06 | -0,13 | 0,04 | -0,10 | 0,70* | -0,12 | 0,39 | 0,99* | 0,51* | 0,77* |
| 17:0 | -0,11 | -0,04 | -0,03 | 0,58 | -0,46 | 0,02 | / | -0,47 | 0,01 | 0,08 | 0,12 | 0,39 | 0,06 | -0,00 | -0,04 | -0,08 | -0,08 | -0,01 | -0,09 | 0,09 |
| 18:0 | 0,05 | 0,32 | -0,17 | -0,15 | 0,30 | -0,50* | -0,47 | / | -0,21 | 0,03 | 0,11 | -0,20 | 0,08 | 0,02 | -0,45 | 0,17 | -0,23 | -0,49 | -0,22 | -0,45 |
| 18:1n -9 | -0,32 | -0,52* | -0,02 | 0,13 | -0,12 | 0,32 | 0,01 | -0,21 | / | -0,02 | -0,12 | 0,08 | -0,18 | -0,20 | 0,48 | -0,38 | 0,08 | 0,36 | 0,55* | 0,32 |
| 18:2n -6 | -0,16 | 0,31 | -0,46 | 0,33 | -0,13 | -0,02 | 0,08 | 0,03 | -0,02 | / | 0,08 | -0,19 | -0,27 | -0,15 | 0,18 | 0,08 | 0,17 | 0,00 | 0,38 | 0,30 |
| 18:3n -6 | -0,17 | 0,13 | -0,00 | 0,06 | -0,18 | -0,06 | 0,12 | 0,11 | -0,12 | 0,08 | / | 0,19 | -0,03 | -0,07 | -0,04 | 0,00 | -0,06 | -0,06 | -0,06 | -0,07 |
| 18:3n -3 | -0,32 | -0,44 | 0,13 | 0,06 | -0,64* | -0,13 | 0,39 | -0,20 | 0,08 | -0,19 | 0,19 | / | 0,17 | -0,26 | -0,29 | -0,37 | -0,26 | -0,14 | -0,43 | -0,21 |
| 20:0 | 0,36 | -0,40 | 0,24 | 0,13 | -0,43 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | -0,18 | -0,27 | -0,03 | 0,17 | / | 0,19 | -0,18 | 0,50* | 0,04 | 0,04 | -0,20 | -0,11 |
| 20:1 | 0,57* | 0,14 | 0,05 | -0,23 | 0,17 | -0,10 | -0,00 | 0,02 | -0,20 | -0,15 | -0,07 | -0,26 | 0,19 | / | -0,07 | 0,21 | -0,11 | -0,11 | -0,10 | -0,13 |
| 20:2 | -0,20 | -0,21 | -0,17 | 0,01 | 0,00 | 0,70* | -0,04 | -0,45 | 0,48 | 0,18 | -0,04 | -0,29 | -0,18 | -0,07 | / | -0,09 | 0,60* | 0,77* | 0,76* | 0,85* |
| 22:0 | 0,41 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | -0,14 | -0,12 | -0,08 | 0,17 | -0,38 | 0,08 | 0,00 | -0,37 | 0,50* | 0,21 | -0,09 | / | 0,53* | -0,12 | -0,03 | -0,11 |
| 20:3n -6 | -0,17 | -0,22 | -0,19 | -0,17 | -0,10 | 0,39 | -0,08 | -0,23 | 0,08 | 0,17 | -0,06 | -0,26 | 0,04 | -0,11 | 0,60* | 0,53* | / | 0,45 | 0,43 | 0,47 |
| 20:3n -3 | -0,29 | -0,30 | -0,17 | 0,01 | 0,02 | 0,99* | -0,01 | -0,49 | 0,36 | 0,00 | -0,06 | -0,14 | 0,04 | -0,11 | 0,77* | -0,12 | 0,45 | / | 0,57* | 0,80* |
| 22:5n -3 | -0,31 | -0,24 | -0,27 | 0,07 | 0,17 | 0,51* | -0,09 | -0,22 | 0,55* | 0,38 | -0,06 | -0,43 | -0,20 | -0,10 | 0,76* | -0,03 | 0,43 | 0,57* | / | 0,07 |
| 24:0 | -0,26 | -0,09 | -0,15 | 0,08 | -0,08 | 0,77* | 0,09 | -0,45 | 0,32 | 0,30 | -0,07 | -0,21 | -0,11 | -0,13 | 0,85* | -0,11 | 0,47 | 0,80* | 0,07 | / |

* značajne srednje ($r= 0,5 - 0,7$) i jake korelacije ($r> 0,7$).

IV-2g Energetska vrednost uzoraka polena

Ukupna energetska vrednost ispitivanih uzoraka polena je prikazana u **Tabeli 20**.

Na osnovu prikazanih rezultata uočava se da su se energetske vrednosti u uzorcima polena kretale u opsegu 350,65 – 395,6 kcal/100g uzorka. Prosečna energetska vrednost u uzorcima je iznosila 376,06 kcal/100g. Najveću energetska vrednost je imao uzorak broj **2** (Bački Monoštor), dok je sa najnižom energetskom vrednošću bio uzorak iz Bačke Topole (br. **23**).

Poređenjem energetske vrednosti za ispitivane uzorke polena sa njihovim botaničkim poreklom uočava se da je uzorak sa najvišom energetskom vrednošću bio monofloralni uzorak koji je sadržavao polen kupusnjača.

Tabela 20. - Energetska vrednost, E [kcal/100g] pojedinačnih uzoraka polena*

| uzorak | E [kcal/100g] | uzorak | E [kcal/100g] |
|---------------------|----------------|--------|----------------------|
| 1 | 381,08 ± 0,07 | 14 | 364,01 ± 0,01 |
| 2 | 395,6 ± 0,1 a | 15 | 366,6 ± 0,1 |
| 3 | 375,2 ± 0,1 | 16 | 379,5 ± 0,3 |
| 4 | 371,1 ± 0,1 b | 17 | 373,37 ± 0,09d |
| 5 | 378,3 ± 0,1 c | 18 | 383,09 ± 0,02 |
| 6 | 376,79 ± 0,02 | 19 | 358,28 ± 0,05 |
| 7 | 371,0 ± 0,03 b | 20 | 374,71 ± 0,06 |
| 8 | 373,6 ± 0,03 d | 21 | 378,59 ± 0,04c |
| 9 | 371,5 ± 0,04 e | 22 | 370,35 ± 0,07 |
| 10 | 394,54 ± 0,02 | 23 | 350,65 ± 0,05 |
| 11 | 391,5 ± 0,03 | 24 | 372 ± 1 e |
| 12 | 395,2 ± 0,2 a | 25 | 371,4 ± 0,2b,e |
| 13 | 382,0 ± 0,2 | 26 | 377,4 ± 0,2 |
| min vrednost | | | 350,65 ± 0,05 |
| max vrednost | | | 395,6 ± 0,1 |

* Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$).

Ukoliko se pogledaju energetske vrednosti i ostalih uzoraka u kojima je polen ovih biljaka bio dominantno (**12** i **13**) ili značajnije zastupljen (**5**, **11** i **17**), može se uočiti da su njihove energetske vrednosti iznad ili blizu prosečne vrednosti energije što bi moglo ukazati na to da polen ovih biljaka ima dobru ili zadovoljavajuću energetska vrednost. Sa druge strane, najnižu energetska vrednost imao je polifloralni polen koji je pretežno sadržavao polen japanskog bagrema. I drugi uzorak polena (br. **25**) koji je takođe, u značajnoj meri, sadržavao polen ove biljke se odlikovao nižom energetskom vrednošću što bi moglo ukazati na postojanje određene zavisnosti između

energetskih vrednosti uzoraka i njihovog palinološkog porekla. Ukoliko se dobijena prosečna energetska vrednost uporedi sa rezultatom koji su dobile Orzáez-Villanueva i saradnici [Orzáez-Villanueva *et al.*, 2002], a koja je iznosila 381,7 kcal/100g, može se uočiti da se radi o veoma sličnim rezultatima. Ako se, pak uporede preporučeni doprinosi pojedinih nutritivnih komponenti (proteina, ugljenih hidrata i lipida) u ukupnoj energetske vrednosti [FAO, 2002], a koji bi po ovim autorima trebalo da iznose – 10 - 12% od proteina, 30% od lipida i oko 60% od ugljenih hidrata – onda bi u analiziranim uzorcima oko 41 kcal/100g trebalo da potiče od proteina, oko 225 kcal/100g od ugljenih hidrata a oko 113 kcal/100g od lipida.

Kada se preračunaju podaci o doprinosu energetskim vrednostima pojedinih komponenti za ispitivane uzorke, dobijaju se sledeći podaci:

- ✓ 23,51 kcal/100g potiče od lipida što je značajno niže od preporučene vrednosti
- ✓ 70,8 kcal/100g potiče od proteina što je gotovo dvostrukoviše od preporučene vrednosti
- ✓ 176,1 kcal/100g potiče od rastvorljivih ugljenih hidrata što je neznatno niže od preporučene vrednosti.

Može se zaključiti da su uzorci polena analizirani u ovoj disertaciji zadovoljavajućeg energetskog kvaliteta, ali sa nedovoljno pravilnom raspodelom energetskih vrednosti gledano po komponentama.

IV-2h Koorelaciona analiza nutritivnih parametara polena

Rezultati međusobnog poređenja sadržaja ukupnih proteina, pepela, vlage, ukupnih ugljenih hidrata (U.H.), lipida i energetske vrednosti u ispitivanim uzorcima polena prikazani su u **Tabeli 21**.

Tabela 21. - Korelaciona analiza nutritivnih parametara uzoraka polena

| | Vlaga | Pepeo | Proteini | Lipidi | U. H. | E |
|----------|--------|--------|----------|--------|--------|--------|
| Vlaga | / | -0,15 | -0,14 | -0,10 | 0,14 | -0,79* |
| Pepeo | -0,15 | / | 0,59* | 0,20 | -0,60* | 0,22 |
| Proteini | -0,14 | 0,59* | / | 0,66* | -0,98* | 0,50* |
| Lipidi | -0,10 | 0,20 | 0,66* | / | -0,79* | 0,69* |
| U. H. | 0,14 | -0,60* | -0,98* | -0,79* | / | -0,58* |
| E | -0,79* | 0,22 | 0,50* | 0,69* | -0,58* | / |

* značajne srednje($r= 0,5 - 0,7$) i jake korelacije ($r > 0,7$).

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da postoji značajno jaka negativna korelacija između sadržaja vlage i energetske vrednosti ispitivanih uzoraka ($r = -0,79$, $p < 0,05$). Ovakav rezultat je krajnje logičan i očekivan, jer sa porastom vlage u uzorcima smanjuje se zastupljenost hranljivih komponenti u polenu koje imaju pozitivan uticaj na njegovu energetska vrednost. Sadržaj pepela je pokazao značajno srednju pozitivnu korelaciju sa sadržajem proteina ($r = 0,59$, $p < 0,05$) a negativnu sa sadržajem ugljenih hidrata ($r = -0,60$, $p < 0,05$). Ovo se može povezati sa činjenicom da pri sagorevanju određeni deo proteina može završiti u pepelu bilo jer je bio neorganskog porekla (npr. prostetične grupe u određenim proteinima koje mogu biti metalnog tipa) bilo jer sagorevanjem daju jedinjenja koja su u čvrstom stanju pa zaostaju u pepelu. Sa druge strane, sagorevanjem ugljenih hidrata kao proizvodi nastaju ugljenik(IV)-oksid i voda koji ne mogu dati nikakav doprinos u sadržaju pepela. Sadržaj proteina pokazao je i značajnu srednju pozitivnu korelaciju sa sadržajem lipida ($r = 0,66$, $p < 0,05$) kao i sa energetska vrednošću ($r = 0,50$, $p < 0,05$). I jedan i drugi rezultat su očekivani s obzirom da lipidi mogu da formiraju lipoproteinske strukture u polenu, a doprinos proteina ukupnom sadržaju energije uzoraka je već istaknut u odeljku **IV-2g**. Osim toga, ukupni sadržaj proteina je pokazao značajno jaku negativnu korelaciju sa ukupnim sadržajem ugljenih hidrata ($r = -0,98$, $p < 0,05$). Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da su ovo dve „kompetitivne“ grupe nutritivnih sastojaka u polenu što može da znači da povećanje sadržaja jedne izaziva smanjenje sadržaja druge grupe jedinjenja. Na sličan način mogao bi se objasniti i uzajamno negativan odnos sadržaja lipida i ugljenih hidrata i značajno jaka negativna korelacija ($r = -0,79$, $p < 0,05$). Osim toga, s obzirom da su lipidi uglavnom hidrofobne komponente u polenu, a ugljeni hidrati uglavnom hidrofilne, i na ovaj način se može dodatno povezati obrnuto srazmeran odnos ovih grupa jedinjenja. Ono što se još dodatno dâ primetiti jeste da je energetska vrednost uzoraka u značajnim srednjim pozitivnim korelacijama sa sadržajima lipida ($r = 0,69$, $p < 0,05$), ugljenih hidrata ($r = -0,58$, $p < 0,05$) i proteina ($r = 0,50$, $p < 0,05$).

IV-3 Tehno-funkcionalna svojstva uzoraka polena

Uz rastvorljivost proteina i ugljenih hidrata, čiji su rezultati prikazani u okviru podataka o sadržaju proteina (**IV-2d**) i ugljenih hidrata (**IV-2e**) u okviru istraživanja određena su i preostala važna tehno-funkcionalna svojstva polena – emulgujuća, peniva kao i kapaciteti vezivanja vode i ulja.

IV-3a Emulgujuća svojstva uzoraka polena

Emulgujuća svojstva imaju jednu od važnih uloga u formiranju strukture i osobina prehrambenih proizvoda kao što su: majonezi, krimeri, instant kafe, krem-likeri, neki voćni napici i mnogi proizvodi od mesa [Dalglish, 2004]. Ona veoma pozitivno utiču na kinestetske osobine prehrambenih proizvoda čime poboljšavaju njihovu atraktivnost za kupca. Dobijeni rezultati za indeks stabilnosti (ESI) i indeks aktivnosti emulzije (EAI) su prikazani u **Tabeli 22**.

Tabela 22. - Emulgujuća svojstva – ESI [min] i EAI [m² g⁻¹] - uzoraka polena*

| uzorak | ESI | EAI |
|---------------------|-------------------|---------------------|
| 1 | 21,6 ± 0,7 a,b | 16,08 ± 0,17 a |
| 2 | 43,0 ± 0,7 | 10,76 ± 0,15 b |
| 3 | 29,4 ± 1,1 c,d | 13,30 ± 0,04 c |
| 4 | 30,6 ± 1,1 c,e | 14,08 ± 0,29 d,e |
| 5 | 23,9 ± 1,0 f,g | 14,94 ± 0,24 f,g |
| 6 | 27,9 ± 1,0 d,h,i | 17,58 ± 0,55 h,i |
| 7 | 39,3 ± 0,3 j | 13,74 ± 0,11 c,d |
| 8 | 19,6 ± 0,1 k | 17,06 ± 0,11 h |
| 9 | 20,0 ± 0,7 b,k | 22,11 ± 0,04 j |
| 10 | 28,3 ± 0,6 d,h,i | 21,54 ± 0,94 j |
| 11 | 22,2 ± 0,6 a,f | 24,52 ± 0,62 |
| 12 | 23,9 ± 0,9 f,g | 16,34 ± 0,46 a |
| 13 | 29,7 ± 0,9 c,i | 14,57 ± 0,68 e,f |
| 14 | 40,0 ± 0,9 e,j | 13,91 ± 0,24 c,d |
| 15 | 27,4 ± 1,2 h | 18,31 ± 0,2 k |
| 16 | 37,6 ± 1,4 | 13,69 ± 0,06 a |
| 17 | 32,1 ± 1,6 e,m | 14,43 ± 0,17 e,f |
| 18 | 24,3 ± 1,0 g | 14,70 ± 0,18 e,f |
| 19 | 49,3 ± 0,7 n | 12,53 ± 0,18 |
| 20 | 23,1 ± 0,7 a,f,g | 17,54 ± 0,37 h,i |
| 21 | 33,2 ± 0,1 m | 15,46 ± 0,42 g |
| 22 | 37,4 ± 1,6 e | 13,34 ± 0,11 c |
| 23 | 47,5 ± 2,2 o | 15,09 ± 0,09 f,g |
| 24 | 40,6 ± 1,7 j | 18,15 ± 0,24 i,k |
| 25 | 48,2 ± 0,6 n,o | 10,40 ± 0,5 b |
| 26 | 29,3 ± 1,3 c,i | 14,20 ± 0,2 d,e |
| min vrednost | 19,6 ± 0,1 | 10,40 ± 0,5 |
| max vrednost | 49,3 ± 0,7 | 24,52 ± 0,62 |

* Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali (p < 0,05).

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se uočiti značajne razlike u vrednostima oba parametra. Vrednosti za ESI su se kretale u opsegu od 19,6 min (uzorak broj **8**) do 49,3 min (uzorak broj **19**) pri čemu je prosečna vrednost iznosila 31,85 min, dok su se vrednosti za EAI parametar kretale u intervalu: 10,40 – 24,52 m² g⁻¹ sa srednjom vrednošću od 15,71 m² g⁻¹. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni za proteinske proizvode kao što su: izolati proteina graška [Barać *et al.*, 2010], brašno indijskog tzv. „kidney bean“ pasulja [Wani *et al.*, 2013a], brašno crnog (vigna) pasulja („black gram“)[Wani *et al.*, 2013b] i niskomasno sojino brašno [Heywood *et al.*, 2002], što pokazuje da polen koji su sakupile medonosne pčele ima dobra emulgjuća svojstva. Korelaciona analiza dobijenih rezultata za sadržaje rastvorljivih proteina, proteinskih frakcija i emulgjućih osobina polena (**Tabela 23**) ukazuje da:

- ✓ postoji značajna pozitivna korelacija između ESI-vrednosti i rastvorljivosti proteina
- ✓ rastvorljivost proteina je bila u negativnoj korelaciji sa vrednošću za EAI-parametar
- ✓ frakcija proteina koja je najviše doprinosila dobrim emulgjućim osobinama polena je bila frakcija sa MWs od 50 kDa do 25 kDa
- ✓ proteini većih molekulskih masa (PF 80 – 50 kDa) pokazivali su negativnu korelaciju sa emulgjućim svojstvima polena.

Dobijeni rezultati ukazuju da se proteini manjih molekulskih masa, najverovatnije, lakše adsorbuju na dodirnoj površini voda/ulje omogućavajući stvaranje stabilnije emulzije u odnosu na proteine sa većim molekulskim masama. Negativna korelacija između ESI i EAI ukazuje da se stabilna emulzija mnogo lakše formira kada je na dodirnoj površini adsorbovano više molekula proteina. Postojanje pozitivne korelacije između rastvorljivosti proteina i emulgjućih svojstava polena utvrdio je Phillips sa saradnicima [Phillips *et al.*, 1994]. Osim proteina dobra emulgjuća svojstva mogu da imaju i druge komponente hrane, kao što su polarni lipidi. Kod voda/ulje emulzija komponente koje se mogu naći na međufaznoj površini su molekuli proteina, manji monogliceridi, estri masnih kiselina, fosfolipidi ili smeša svih ovih jedinjenja [Dalglish, 2004].

Tabela 23. - Korelacioni koeficijenti (r) i jednačine ($p < 0,05$) između rastvorljivosti proteina, odgovarajućih proteinskih frakcija i emulgujući osobina uzoraka polena

| parametri | r | Korelaciona jednačina | y | X |
|---------------------------------------|-------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| Rastvorljivost proteina / PF 80-50kDa | -0,57 | $y = 22,97 - 0,573x$ | rastvorljivost proteina | PF 80-50kDa |
| Rastvorljivost proteina / PF 50-25kDa | 0,73 | $y = -11,24 + 0,678x$ | rastvorljivost proteina | PF 50-25kDa |
| ESI / Rastvorljivost proteina | 0,47 | $y = 24,18 + 0,682x$ | ESI | rastvorljivost proteina |
| EAI / Rastvorljivost proteina | -0,39 | $y = 18,44 - 2,19x$ | EAI | rastvorljivost proteina |
| ESI / PF 80-50kDa | -0,39 | $y = 43,69 - 0,579x$ | ESI | PF 80-50kDa |
| ESI / PF 50-25kDa | 0,41 | $y = 13,26 + 0,560x$ | ESI | PF 50-25kDa |
| ESI / EAI | -0,55 | $y = 54,75 - 0,143x$ | ESI | EAI |

Polen koji su sakupile pčele sadrži sva ova jedinjenja, u različitim koncentracijama, zavisno od botaničkog i geografskog porekla [Stanley i Linskens, 1974; Liang *et al.*, 2013]. Osim toga, poleni sadrže značajne količine elemenata poput kalijuma i kalcijuma, polisaharida poput skroba i pektina, koji takođe mogu da ostvaruju interakcije sa komponentama koje mogu da imaju stabilizujući ili destabilizujući efekat na emulziju. Zbog toga niske vrednosti korelacionih koeficijenata između indeksa stabilnosti/aktivnosti emulzije i rastvorljivosti proteina ili njihovog sadržaja mogu biti posledica interakcija između površinski aktivnih komponenti prisutnih u uzorcima polena.

IV-3b Peniva svojstva uzoraka polena

Struktura velikog broja prehrambenih proizvoda zavisi od inkorporacije vazduha tokom proizvodnog procesa. U takve proizvode spadaju hleb, kolači, sladoled ili topinzi [Phillips *et al.*, 1994]. Očuvanje penive strukture je znatno teže u odnosu na emulzije jer je sama struktura međufazne površine voda/vazduh bitno drugačija od strukture međufazne površine voda/ulje [Dagleish, 2006]. Suspenzije polena, koje su bile pripremljene za potrebe ispitivanja njihovih penivih osobina (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 i 2,5 g/100g) nisu uspele da formiraju održivu penu, pod datim eksperimentalnim uslovima. Mogući razlog tome je prisustvo površinski aktivnih lipidnih supstanci prisutnih u „pollen kitt“ zona u površinskom delu zrna polena. Ovi lipidi redukuju stabilnost pene zbog veće površinske aktivnosti u odnosu na proteine što iziskuje potiskivanje proteina sa međufazne površine voda/vazduh. Ovo umanjuje debljinu površinskog proteinskog filma, smanjuje njegovu kohezivnost što rezultuje u

slabljenju jačine filma i dovodi do njegovog pucanja [Phillips *et al.*, 1989]. Na osnovu rezultata Liang-a i saradnika [Liang *et al.*, 2013] glavne frakcije polarnih lipida u polenu čine fosfolipidi ćelijskih membrana, fosfatidil-holini i fosfatidil serini. Na osnovu svega rečenog možemo zaključiti da bi se polen pčela mogao koristiti kao uspešno antipenivo sredstvo pri proizvodnji onih prehrambenih proizvoda kod kojih su peniva svojstva nepoželjna.

IV-3c Kapacitet vezivanja vode (WAC) uzoraka polena

Kapacitet vezivanja vode može biti važan kod prehrambenih proizvoda kod kojih je bitno postići tačno određenu vlažnost proizvoda. Komponente koje imaju visoku vrednost WAC-a će obezbediti da krajnji proizvod bude suv i krt što, u nekim situacijama, može biti izuzetno važno, posebno pri skladištenju.

Rezultati za WAC ispitivanih uzoraka polena (**Tabela 24**) se međusobno značajno razlikuju i kreću se u opsegu od 0,92 g g⁻¹ u uzorku broj **18** iz Šida do 2,25 g g⁻¹ koliko je utvrđeno u uzorku iz Smedereva (br. **14**). Prosečna vrednost u uzorcima je iznosila 1,43 g g⁻¹. Dobijeni rezultati za ispitivane uzorke su bili nešto niži od onih koje je dobio Wani sa saradnicima za brašno indijskog („kidney“) pasulja (2,6 - 2,7 g g⁻¹) [Wani *et al.*, 2013a], odnosno za brašno crnog (vigna) pasulja kod koga su se vrednosti za WAC kretale od 2,9 do 3,1 g g⁻¹ [Wani *et al.*, 2013b]. Takođe, prosečna vrednost za WAC u datim uzorcima polena je bila nešto niža u odnosu na vrednost dobijenu za brašno dobijeno od sorte pasulja vitabosa (*Mucuna deeringiana*) (1,82 cm³ g⁻¹) [Acuña *et al.*, 2012] ali je bila slična onoj koju su, isti autori, dobili za sojino brašno (1,43 cm³ g⁻¹). Glavne komponente koje bi mogle da utiču na sposobnost vezivanja vode kod polena su nerastvorni proteini koji sadrže velike hidrofилne zone, poput polarnih naelektrisanih bočnih grupa koje vode poreklo od aminokiselina ili od nerastvornih ugljenih hidrata, koji, takođe, mogu da sadrže u svojoj strukturi veliki broj polarnih grupa. Ovi molekuli, zahvaljujući svojoj složenoj strukturi i činjenici da nisu planarni već da se nalaze u prostoru kao trodimenzionalne forme, mogu da vezuju na svojoj površini vodu pomoću kapilarnih sila. Kapacitetu vezivanja vode mogu doprineti i lipidni molekuli sa polarnim grupama, poput fosfolipida ili nekih soli masnih kiselina, koji poseduju polarne delove molekula i mogu, dodatno, da pojačaju sposobnost vezivanja vode.

Tabela 24. - WAC [g g⁻¹], OAC [g g⁻¹] i WOAI vrednosti za uzorke polena*

| uzorak | WAC | OAC | WOAI |
|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| 1 | 1,69 ± 0,01 | 3,25 ± 0,01 | 0,520 ± 0,004 a |
| 2 | 1,28 ± 0,01 a,b | 2,28 ± 0,01 a | 0,561 ± 0,004 |
| 3 | 1,85 ± 0,01 | 1,95 ± 0,02 b | 0,949 ± 0,005 |
| 4 | 1,30 ± 0,01 a,c | 2,21 ± 0,01 c | 0,588 ± 0,0002 |
| 5 | 1,29 ± 0,02 a,d | 2,90 ± 0,01 d | 0,445 ± 0,005 |
| 6 | 1,64 ± 0,01 | 2,01 ± 0,01 | 0,816 ± 0,002 |
| 7 | 1,35 ± 0,01 f | 2,71 ± 0,02 e | 0,498 ± 0,001 b |
| 8 | 1,73 ± 0,01 | 2,28 ± 0,01 a | 0,759 ± 0,001 |
| 9 | 1,99 ± 0,01 | 2,68 ± 0,01 | 0,743 ± 0,001 |
| 10 | 1,03 ± 0,02 | 1,96 ± 0,01 b | 0,526 ± 0,007 a |
| 11 | 1,31 ± 0,01 d,c | 1,55 ± 0,01 | 0,845 ± 0,001 |
| 12 | 1,37 ± 0,02 f,g | 1,00 ± 0,01 | 1,370 ± 0,003 |
| 13 | 1,20 ± 0,01 | 3,33 ± 0,01 | 0,360 ± 0,003 |
| 14 | 2,25 ± 0,01 | 3,17 ± 0,01 | 0,710 ± 0,001 |
| 15 | 1,25 ± 0,01 b,e | 2,60 ± 0,01 | 0,481 ± 0,003 c |
| 16 | 1,36 ± 0,01 f,g | 2,71 ± 0,01 e | 0,502 ± 0,002 b |
| 17 | 1,41 ± 0,01 | 2,92 ± 0,01 d | 0,483 ± 0,001 c |
| 18 | 0,92 ± 0,02 | 2,32 ± 0,01 | 0,397 ± 0,007 |
| 19 | 1,46 ± 0,02 | 2,21 ± 0,01 c,f | 0,661 ± 0,005 |
| 20 | 1,32 ± 0,01 c | 2,19 ± 0,01 f,g | 0,604 ± 0,001 |
| 21 | 1,28 ± 0,02 a,b,e | 2,72 ± 0,01 e | 0,471 ± 0,005 |
| 22 | 1,39 ± 0,02 g | 2,71 ± 0,01 e | 0,513 ± 0,006 |
| 23 | 1,53 ± 0,02 | 3,53 ± 0,01 | 0,433 ± 0,003 d |
| 24 | 1,38 ± 0,02 g | 2,42 ± 0,01 | 0,570 ± 0,002 |
| 25 | 1,36 ± 0,01 f,g | 2,18 ± 0,01 g | 0,624 ± 0,003 |
| 26 | 1,25 ± 0,02 e | 2,90 ± 0,01 d | 0,431 ± 0,003 d |
| min vrednost | 0,92 ± 0,02 | 1,00 ± 0,01 | 0,360 ± 0,03 |
| max vrednost | 2,25 ± 0,01 | 3,53 ± 0,01 | 1,370 ± 0,003 |

* Svaki rezultat je dat sa standardnom devijacijom. Uzorci označeni istim slovima nisu se statistički značajno razlikovali (p < 0,05).

Iz tog razloga, dobijene razlike u vrednostima za WAC ukazuju na razlike u sadržaju proteina, lipida i ugljenih hidrata u uzorcima polena koji su sakupile medonosne pčele.

IV-3d Kapacitet vezivanja ulja (OAC) uzoraka polena

Kapacitet vezivanja ulja bilo kog prehrambenog proizvoda je važan parametar jer su lipidne komponente odgovorne za očuvanje arome proizvoda, konzistencije i pojačavanja prijatnog ukusa u ustima [Kinsella i Melachouris, 1976; Kinsella, 1982]. Vrednost za OAC u najvećoj meri zavisi od sposobnosti proizvoda da fizički okluduje ili vezuje ulje u u svoju strukturu pomoću kompleksnih kapilarnih sila i hidrofobnih interakcija. Iz tog razloga veoma važno je prisustvo hidrofobnih zona u prehrambenom proizvodu, koje će omogućiti startnu interakciju sa uljem po principu da se „slično u sličnom rastvara“ i meša. Na osnovu rezultata za OAC ispitivanih uzoraka polena prikazanih u **Tabeli 24** može se uočiti da su se vrednosti ovog parametra kretale u sledećem intervalu: 1 g g⁻¹ (uzorak br. **12**, Mala

Krsna) – 3,53 g g⁻¹ (uzorak br. **23**, Bačka Topola). Ovo ukazuje na značajne razlike među uzorcima, pri čemu je srednja vrednost za OAC iznosila 2,49 g g⁻¹. Dobijeni rezultati OAC-a za ispitivane uzorke polena su bili viši u odnosu na one koje je Wani sa saradnicima dobio za ispitivane uzorke brašna pasulja (2,1 - 2,2 g g⁻¹ za crni tj. 2,2 - 2,3 g g⁻¹ za indijski pasulj) [Wani *et al.*, 2013a i b]. Takođe, polen je pokazao veću moć vezivanja ulja i u odnosu na rezultate za za brašno dobijeno od sorte pasulja vitabosa (*Mucuna deeringiana*) (1,82 cm³ g⁻¹) odnosno sojino brašno (1,43 cm³ g⁻¹) koje je dobio Acuña sa svojim timom [Acuña *et al.*, 2012]. Niže vrednosti OAC-a u odnosu na polen dobijene su i pri ispitivanju brašna većine proteinskih izolata [Elizalde *et al.*, 1996; Boye *et al.*, 2010]. Glavna komponenta koja doprinosi velikom OAC kod polena može biti sporopolenin, o kome je detaljno bilo reči u uvodnom delu ove disertacije [Stanley i Liskens, 1974; Shaw i Yeardon, 1966]. Zahvaljujući svojoj kompleksnoj poroznoj strukturi, sa puno šupljina, on može da okluduje i „zarobi“ uljaste supstance u unutrašnjosti matriksa. Osim njega povišenoj vrednosti za OAC mogu doprineti i drugi lipidi iz „pollen kitt“ zone zrna polena kao proteini sa izraženim hidrofobnim zonama koji, takođe, mogu da ostvare interakcije sa nepolarnim lipidnim supstancama.

Poređenjem odnosa za WAC i OAC parametar izraženog kroz WOAI-vrednost može se ustanoviti koliko je neki materijal sa izbalansiranim hidrofilnim i lipofilnim karakteristikama (ako je taj odnos sa vrednošću oko 1), odnosno, koliko ima više izražene hidrofilne ili hidrofobne osobine. U skoro svim uzorcima polena koji su ispitivani vrednost ovog odnosa (**Tabela 24**) je bila manja od 1 osim u uzorku **12** gde je taj odnos imao vrednost oko 1,37. Ovo ukazuje da je sam polen pretežno lipofilna supstanca tj. da u njemu preovlađujući uticaj imaju jedinjenja hidrofobnog karaktera što se može povezati sa opnom polenovih zrna koja je izrazito bogata lipidnim supstancama. Odstupanje koje se javilo kod uzorka broj **12** nije u skladu sa njegovim visokim sadržajem lipidnih supstanci (5,48%) što ukazuje da, u ovom slučaju, neke druge materije, određuju povećanu hidrofilitnost poput ukupnih proteina kojima je ovaj uzorak bio najbogatiji od svih (27,25%). Rezultati korelacione analize za WOAI-parametar prikazane su u **Tabeli 25**. Utvrđene su i značajne korelacije između WOAI-vrednosti i sadržaja ugljenih hidrata i pepela. Takođe, postojanje pozitivne korelacije između sadržaja proteina i WOAI-vrednosti

ukazuje na kompleksnu vezu između ovih parametara. Nisu pronađene značajne korelacije između WAC i OAC vrednosti sa drugim tehno-funkcionalnim osobinama polena, kao ni sa njegovim hemijskim sastavom.

Tabela 25. - Korelacioni koeficijenti (r) i jednačine ($p < 0,05$) između WOAI i sadržaja proteina, ugljenih hidrata i pepela u uzorcima polena

| parametri | r | Korelaciona jednačina | y | X |
|-----------------------|-------|-----------------------|------|-----------------|
| WOAI / proteini | 0,54 | $y = -0,12 + 0,038x$ | WOAI | proteini |
| WOAI / ugljeni hidrat | -0,52 | $y = 2,57 - 0,026x$ | WOAI | ugljeni hidrati |
| WOAI / pepeo | 0,44 | $y = 0,16 + 0,192x$ | WOAI | pepeo |

IV-4 Sadržaj fenolnih jedinjenja i ukupna antioksidativnost uzoraka polena

Sadržaji pojedinačnih određenih fenolnih jedinjenja flavonoidnog tipa prikazani su u **Tabeli 26**.

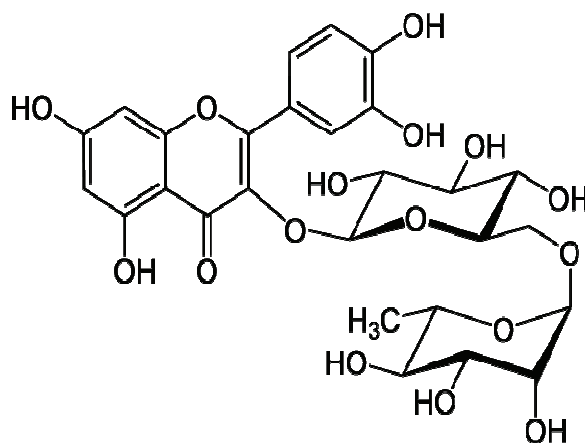
Tabela 26. - Sadržaji pojedinih fenolnih jedinjenja [mg/100g] u uzorcima polena**

| fenol uzorak | g.k. ¹ | p.k. ¹ | h.k. ¹ | kk. ¹ | ru. ¹ | ek. ¹ | na. ¹ | lu. ¹ | ak. ¹ | ka. ¹ | kr. ¹ | pn. ¹ | ga. ¹ |
|---------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| 1 | 2,10 ± 0,02 a | 0,040 ± 0,001 ab | 0,58 ± 0,01 | 1,93 ± 0,02 | 82,2 ± 0,5 | 0,46 ± 0,01 a | 0,110 ± 0,003 | 0,240 ± 0,007 | / | 0,190 ± 0,006 a | 2,75 ± 0,03 | 0,46 ± 0,01 | 0,230 ± 0,007 |
| 2 | 2,01 ± 0,01 ab | 0,180 ± 0,007 c | 0,70 ± 0,01 | 0,590 ± 0,009 ab | 194,7 ± 1,5 | 0,570 ± 0,007 | / | 0,170 ± 0,004a | / | 0,200 ± 0,009 a | 0,200 ± 0,008 a | / | 0,020 ± 0,001 |
| 3 | 2,04 ± 0,05 c | / | 0,31 ± 0,01ab,f | 0,54 ± 0,01 cd | 23,5 ± 0,3 a | 0,170 ± 0,008 b,c | / | 0,170 ± 0,007a | / | / | 0,090 ± 0,003 c | / | 0,01 ± 0,0004 a |
| 4 | 2,03 ± 0,02 ad | 0,040 ± 0,001 b | 0,32 ± 0,01a,b,c | 0,53 ± 0,01 cd | 8,02 ± 0,08 | 0,640 ± 0,008 | / | 0,170 ± 0,003a | / | / | 0,070 ± 0,002 | / | 0,01 ± 0,0003 a |
| 5 | 2,06 ± 0,03 b | 0,050 ± 0,002 | 0,88 ± 0,02 | 0,67 ± 0,02 | 115 ± 1 | 0,47 ± 0,02 a | / | 0,200 ± 0,008 | 2,21 ± 0,02 | 0,040 ± 0,001 b | 0,190 ± 0,009 a | / | 0,01 ± 0,0003 a |
| 6 | 2,04 ± 0,02 a,e | 0,150 ± 0,006 de | 0,44 ± 0,01 e | 0,56 ± 0,02 b,c | 24,7 ± 0,5 b | 0,34 ± 0,01 d | / | 0,170 ± 0,004a | 1,86 ± 0,05 | / | 0,080 ± 0,003 c | / | / |
| 7 | 2,01 ± 0,02 af | 0,040 ± 0,001 ab | 0,30 ± 0,01 af | 0,520 ± 0,009 d | 22,5 ± 0,5 c | 0,180 ± 0,009 b | 0,090 ± 0,002 | 0,170 ± 0,008a | / | / | / | / | 0,01 ± 0,0002 a |
| 8 | 2,01 ± 0,02 ag | 0,160 ± 0,007 d | 0,51 ± 0,02 g | 0,60 ± 0,01 a | 44,2 ± 0,3 d | / | / | 0,180 ± 0,006a | / | / | 0,050 ± 0,002 | / | / |
| 9 | 2,07 ± 0,01 b,d,f,g,h,i,j | 0,0100 ± 0,0005 f | 0,34 ± 0,01 c,d | 0,62 ± 0,02 a,e | 31,7 ± 0,3 | / | / | 0,170 ± 0,008a | / | / | / | / | / |
| 10 | 2,10 ± 0,02 b,d,f,g,k,i,m,n,o | 0,0100 ± 0,0004 f | 0,380 ± 0,009 h | 0,540 ± 0,008 c | 26,6 ± 0,4 e | 0,180 ± 0,008 b | / | 0,79 ± 0,02 | / | 0,130 ± 0,006 c | 0,060 ± 0,002 | / | / |
| 11 | 2,09 ± 0,02 b,d,f,g,p | 0,140 ± 0,006 e,g | 0,33 ± 0,01b,c,d | 0,53 ± 0,02 cd | 45,6 ± 0,1 f | / | / | 0,200 ± 0,008 | / | / | / | / | 0,010 ± 0,001 a |
| 12 | 2,35 ± 0,04 a,b,c,d,f,g,q | 0,120 ± 0,005 h,i | 0,350 ± 0,009 d | 0,53 ± 0,02 cd | 201,6 ± 1,6 | 0,180 ± 0,007 b | 0,53 ± 0,01 | 0,180 ± 0,008a | / | 0,240 ± 0,009 | / | / | 0,010 ± 0,001 a |
| 13 | 2,12 ± 0,03 b,d,e,f,g,r,s,t | 0,130 ± 0,004 g,h | 0,50 ± 0,02 g | 0,90 ± 0,02 | 111,5 ± 0,5 | 0,32 ± 0,01 d | / | 0,190 ± 0,004a | 6,9 ± 0,2 | 0,170 ± 0,003 d | 0,73 ± 0,02 | 0,180 ± 0,008 | 0,080 ± 0,003 |
| 14 | 2,06 ± 0,03 q | 0,23 ± 0,01 | 0,32 ± 0,01 a,d | 0,630 ± 0,009 e | 70 ± 1 | 0,180 ± 0,008 b | / | 0,47 ± 0,01 b | / | 0,130 ± 0,006 c | / | / | / |
| 15 | 2,03 ± 0,03 a,m,r | 0,040 ± 0,002 a | 0,43 ± 0,01 e,g | 0,59 ± 0,02 a,b | 23,9 ± 0,8 a,b,c | 0,38 ± 0,01 e | 0,27 ± 0,01 | 0,190 ± 0,009a | 0,560 ± 0,008 | / | / | / | / |
| 16 | 2,06 ± 0,02 b,f,g | 0,150 ± 0,007 d,e | 0,250 ± 0,008 | 0,55 ± 0,01 c,f | 49,2 ± 1,0 | 0,36 ± 0,01 d,e | / | 0,180 ± 0,008a | / | / | / | / | / |
| 17 | 2,01 ± 0,03 a,h,n,p,s,t | 0,130 ± 0,006g,h,j | 0,41 ± 0,01 g,h | 0,58 ± 0,02 a,b,f,g | 34,2 ± 0,9 g | / | / | 0,39 ± 0,01 | / | 0,020 ± 0,001 | 0,100 ± 0,004 b | / | 0,090 ± 0,003 |
| 18 | 2,04 ± 0,02 a,n,p,s | 0,120 ± 0,005h,i,j | 0,28 ± 0,01 i | / | 4,43 ± 0,09 | 0,290 ± 0,009 | 0,38 ± 0,01 | 0,160 ± 0,007a | / | / | / | / | / |
| 19 | 2,01 ± 0,03 a,i,p,s,u | 0,190 ± 0,008 c | 0,270 ± 0,009 i | 0,50 ± 0,01 d | 3,1 ± 0,1 | / | 0,43 ± 0,02 | 0,160 ± 0,007a | / | 0,040 ± 0,001 b | / | / | / |
| 20 | 2,08 ± 0,03 b,f,g,t,u | 0,140 ± 0,003 e,j | 0,40 ± 0,01 h | 0,59 ± 0,02 a,b | 55,9 ± 1,1 | 0,160 ± 0,002 c | / | 0,200 ± 0,009 | / | 0,100 ± 0,004 | / | / | / |
| 21 | 2,07 ± 0,02 a,b,v | 0,070 ± 0,003 | 0,34 ± 0,01 c,d | 0,53 ± 0,01 cd | 27,7 ± 0,7 e | / | / | 0,47 ± 0,02 b | / | / | / | / | 0,01 ± 0,0004 a |
| 22 | 2,05 ± 0,02 o,q,t | 0,110 ± 0,005 i | 0,30 ± 0,01 a,f,i | 0,50 ± 0,01 d | 12,2 ± 0,3 | / | / | 0,160 ± 0,007a | / | / | / | / | / |
| 23 | 2,09 ± 0,02 a,b,z | 0,160 ± 0,006 d | 0,43 ± 0,02 e,h | 0,84 ± 0,02 | 45,08 ± 0,95 d,f | 0,250 ± 0,009 | / | 0,33 ± 0,01 | / | 0,39 ± 0,01 | 0,280 ± 0,009 | 0,050 ± 0,002 | 0,040 ± 0,001 |
| 24 | 2,02 ± 0,02 j,o,q,t,v,z | 0,0100 ± 0,0005 f | 0,30 ± 0,01 a,i | 0,52 ± 0,02 cd | 17,3 ± 0,3 | 0,40 ± 0,02 e | 0,160 ± 0,005 | 0,170 ± 0,008a | / | / | / | / | / |
| 25 | 2,03 ± 0,02 o,q,t,z | 0,060 ± 0,003 | 1,50 ± 0,04 | 0,78 ± 0,01 | 103,7 ± 0,6 | / | 0,100 ± 0,004 | 0,190 ± 0,009a | / | 0,180 ± 0,008a,d | 0,110 ± 0,005 b | / | 0,030 ± 0,001 |
| 26 | 2,07 ± 0,07a | 0,090 ± 0,003 | 0,29 ± 0,01 f,j | 0,54 ± 0,03 c,g | 35,0 ± 0,5 g | / | / | 0,190 ± 0,007a | / | / | / | / | / |
| min vrednost | 2,01 ± 0,03 | 0,0100 ± 0,0004 | 0,250 ± 0,008 | 0,50 ± 0,01 | 3,1 ± 0,1 | 0,160 ± 0,002 | 0,090 ± 0,002 | 0,160 ± 0,007 | 0,560 ± 0,008 | 0,020 ± 0,001 | 0,060 ± 0,002 | 0,050 ± 0,002 | 0,010 ± 0,001 a |
| max vrednost | 2,35 ± 0,04 | 0,23 ± 0,01 | 1,50 ± 0,04 | 1,93 ± 0,02 | 201,6 ± 1,6 | 0,570 ± 0,007 | 0,53 ± 0,01 | 0,47 ± 0,01 | 6,9 ± 0,2 | 0,39 ± 0,01 | 2,75 ± 0,03 | 0,46 ± 0,01 | 0,230 ± 0,007 |

*g.k. – galna kis., p.k. – protokatehinska kis., h.k. – hlorogena kis., k.k. – kofeinska kis., ru. – rutin, e.k. – elaginska kis., na – naringenin, lu – luteolin, a.k. – apscisinska kis., ka – kampferol, kr – krisin, pn – pinocembrin, ga – galangin.

** slovim su obeleženi uzorci koji se statistički ne razlikuju (p < 0,05).

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da su u svim uzorcima identifikovana 4 fenolna jedinjenja i to – rutin, galna i hlorogena kiselina kao i luteolin. Najzastupljeniji u svim uzorcima je bio rutin sa prosečnim sadržajem od 38,93 mg/100g uzorka. Pri tome su se količine ovog jedinjenja značajno razlikovale od uzorka do uzorka. Maksimalni sadržaj je pronađen u uzorku iz Male Krsne (br. **12**) u kome je izmereno 201,6 mg/100g dok je minimalni sadržaj pronađen u uzorku broj **19** (Beograd)- 3,1 mg/100g rutina. U literaturi se može naći podatak o sadržaju ovog glikozida u uzorcima polenima iz Španije [Serra-Bonvehí *et al.*, 2001] sa prosečnim sadržajem od 29 mg/100g uzorka, što je neznatno niže u odnosu na prosečni sadržaj u analiziranim uzorcima. Po mišljenju ovih autora sadržaj rutina se može iskoristiti kao parametar svežine uzoraka kao i uslova njihovog čuvanja. Osim toga, Di Paola-Naranjo i saradnici [Di Paola-Naranjo *et al.*, 2004] su u polenu biljke iz roda lisičine (*Echium plantagineum*) pronašli, ponovo, rutin ali i slično jedinjenje, petunidin-3-rutinozid. Takođe, u polenima većeg broja biljaka (kukuruz, ljutić, meskito drvo) autori su [Almaraz-Abarca *et al.*, 2007] identifikovali prisustvo kvercetina, u značajnijim količinama, koji je sastavni deo rutina tj. u njemu gradi 3-*O*-glikozidnu vezu sa disaharidom, rutinozom (slika 11).



Slika 11. Struktura rutina

Poređenjem sa botaničkim poreklom uzoraka može se jasno uočiti povezanost prisustva ovog jedinjenja sa određenom biljnom vrstom ili familijom.

Četiri uzorka (br. **12**, **2**, **5** i **13**), koja su po sadržaju rutina bila značajno iznad ostalih, su bili ili monofloralnog tipa od biljaka iz familije kupusnjača ili sa značajnim udelom polena ovih biljaka. Sa druge strane, dva uzorka sa daleko najnižim sadržajem rutina su bili uzorci **19** (Beograd) i **18** (Šid). U prvom je pronađeno 3,1 mg/100g, a

u drugom 4,43 mg/100g rutina što je pedeset puta manje u odnosu na najbogatije uzorke. Poređenjem botaničkog porekla ova dva uzorka uočava se da su i u jednom i u drugom polifloralnom uzorku prisutni poleni biljaka iz familije glavočika, mada uzorak broj **16**, koji sadrži isti udeo polena ovih biljaka ima desetostrukoveći sadržaj rutina. Moguće je da sama složenost uzoraka i prisustvo velikog broja vrsta polena utiče na prisustvo ovog jedinjenja, jer u njima nijedan od tipova polena nije bio zastupljen sa više od 20% udela.

Blisku povezanost botaničkog porekla polena i prisustva određenih polifenolnih jedinjenja uočili su i Campos-eva sa saradnicima [Campos *et al.*, 1997] koja, čak, ukazuje da se može izvršiti identifikacija palinološkog porekla uzorka na osnovu profila prisutnih fenolnih jedinjenja. Naime, ako se podese stalni i identični uslovi i uporede signali flavonoida, dobijeni HPLC analizom, onda se procenat određene vrste i tipa polenovih zrna može dobiti kao odnos signala određenog flavonoida u uzorku polena koji su sakupile medonosne pčele (a koji se pretežno sastoji od jedne do dve vrste polenovih zrna uz par pratećih tipova) i u uzorku čistog, cvetnog, polena.

Drugo po zastupljenosti fenolno jedinjenje je bila galna kiselina. Ono što karakteriše prisustvo ove kiseline je da je ona u svim uzorcima prisutna u gotovo identičnoj količini sa prosečnim sadržajem od 2,14 mg/100g. Kao dokaz da je ovo skoro uvek prisutno fenolno jedinjenje u prirodnim proizvodima, pa tako i u polenu [Le Blanc *et al.*, 2009; Strohl i Seikel, 1965] govori i činjenica da se u standardnoj metodi, za određivanje ukupnih fenola, po Folin-Ciocalteu rezultati izražavaju upravo kao mg ekvivalenti galne kiseline, koja se koristi i kao standard. S obzirom na veoma ujednačenu zastupljenost ovog jedinjenja (oko 2 mg/100g) u svim uzorcima nije moguće njeno prisustvo dovesti u vezu sa određenom biljnom familijom ili vrstom.

Osim galne još jedna fenolna kiselina, hlorogena, je identifikovana u svim uzorcima sa prosečnim sadržajem od 0,45 mg/100g uzorka. Zastupljenost ove kiseline se, u dvadeset pet uzoraka, kretala u opsegu od 0,25 mg/100g do 0,88 mg/100g sa nešto većim sadržajem u uzorku broj **25** gde je detektovana količina ovog jedinjenja od 1,5 mg/100g. Nije moguće dovesti prisustvo ove kiseline u vezu sa palinološkim poreklom ispitivanih uzoraka.

Četvrto fenolno jedinjenje, prisutno u svim ispitivanim uzorcima polena je bio luteolin. Sadržaj ovog flavona se kretao u opsegu: 0,16 - 0,79 mg/100g. Prosečni sadržaj je iznosio 0,24 mg/100g. Ni u ovom slučaju nije bilo moguće dovesti u direktnu vezu prisustvo ovog jedinjenja sa palinološkim poreklom uzoraka polena koji su ispitivani u ovoj disertaciji.

Na kraju, treba istaći da su još dve, iz ove grupe jedinjenja, kiseline detektovane u dvadeset pet od dvadeset šest uzoraka. To su kofeinska kiselina (prosečni sadržaj je iznosio 0,67 mg/100g) i protokatehinska kiselina (prosečni sadržaj je iznosio 0,109 mg/100g). Kofeinska kiselina jedino nije pronađena u uzorku broj **18** (Šid), koji se odlikovao i daleko najnižim sadržajem rutina. U svim uzorcima količine su se kretale od 0,50 mg/100g do 0,90 mg/100g osim jednog uzorka iz Beograda (br. **1**) u kome je utvrđeno prisustvo ove kiseline u količini od 1,93 mg/100g. Jedini uzorak u kome nije utvrđeno prisustvo protokatehinske kiseline je bio uzorak broj **3**. U svim ostalim uzorcima ova kiselina je nađena u niskim koncentracijama pri čemu je najviše je bilo u uzorku broj **19**, iz Beograda (0,19 mg/100g), dok je u uzorku broj **10** (Sibnica) nađena u tragovima.

Fenolno jedinjenje koje je, takođe, bilo zastupljeno u većini uzoraka jeste elaginska kiselina koja je identifikovana u sedamnaest ispitivanih polena. Sadržaji ove kiseline, tamo gde je pronađena, su se kretali u opsegu od 0,16 - 0,64 mg/100g. Najniži, ujednačeni, sadržaji ove kiseline (0,16 - 0,18 mg/100g) su pronađeni u nekoliko uzoraka (br. **3, 7, 10, 12, 14 i 20**), dok je maksimalna količina elaginske kiseline (0,64 mg/100g) pronađena u uzorku iz Beograda (br. **4**). Prosečni sadržaj ove kiseline po uzorcima je iznosio 0,33 mg/100g. Zastupljenost fenolnih kiselina je i očekivana ako se ima u vidu njihova važna uloga u različitim procesima u biljkama poput fotosinteze, rasta, razmnožavanja, odbijanja predatora i slično [Leiss *et al.* 2009; Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011]. Takođe, ove kiseline su u povišenoj koncentraciji prisutne u egzini polenovog zrna kako bi ga štatile od štetnih dejstava, a pre svega od UV-zraka [Le Blanc *et al.*, 2009].

Od preostalih jedinjenja flavonoidnog tipa galangin je pronađen u četrnaest, a krisin i kampferol su nađeni u po dvanaest uzoraka. Iako ga jeste bilo u većem broju uzoraka, galangin je u trinaest uzoraka nađen u jako niskim koncentracijama (<0,1 mg/100g) dok je jedino uzorak iz Beograda (br. **1**), koji je vodio poreklo pretežno od polena jasena, sadržavao značajniju količinu ovog jedinjenja (0,230 mg/100g)

te bi se njegovo prisustvo moglo povezati sa polenom ove familije. Prosečan sadržaj hrizina iznosio je 0,377 mg/100g uzorka. Najviše hrizina sadržavao je uzorak broj **1** (Beograd) - 2,75 mg/100g, dok je u svim ostalim uzorcima u kojima je identifikovan njegov sadržaj bio manji i kretao se u intervalu: 0,10 - 0,73 mg/100g. U pet uzoraka pronađen je u jako niskim koncentracijama reda veličine od 0,05 do 0,09 mg/100g (br. **3, 4, 6,8** i 10). Kao i u slučaju galangina, povišena koncentracija krisina u uzorku broj **1** bi mogla da se poveže sa polenom jasena koji je bio dominantno zastupljen samo u ovom uzorku polena.

Zastupljenost kampferola u dvanaest uzoraka se kretala u intervalu od 0,02 mg/100g, koliko ga je pronađeno u uzorku broj **17** (Petrovaradin), do 0,39 mg/100g koliko je sadržavao uzorak iz Bačke Topole (br. **23**). Prosečan sadržaj kampferola je iznosio 0,124 mg/100g. O prisustvu kampferola u aglikozidnoj formi [Strohl i Seikel, 1965] odnosno, u obliku glikozida [Ferrerres *et al.*, 2010] nalazimo podatke i u dostupnoj literaturi. Sadržaj naringenina, koji je nađen u osam uzoraka, kretao se u intervalu od 0,09 mg/100g koliko ga je bilo u uzorku broj **7** (Valjevo) do 0,53 mg/100g koliko je nađeno u uzorku broj **12** (Mala Krsna). Prosečan sadržaj ovog flavonoida koga su i drugi autori [Le Blanc *et al.*, 2009; Sarmiento Silva *et al.*, 2006; Strohl i Seikel, 1965] pronalazili kao slobodnu komponentu u polenima iznosio je 0,104 mg/100g uzorka. Još dva fenolna jedinjenja – apscisinska kiselina i pinocembrin – pronađeni su u po četiri, odnosno, tri uzorka polena. Najviši sadržaj ove kiseline je iznosio 6,9 mg/100g uzorka (br. **13**, Smederevo) dok je najmanje je bilo u uzorku broj **15** (Gunjaci, 0,560 mg/100g). Sadržaj pinocembrina u tri uzorka kretao se u intervalu: 0,05 – 0,46 mg/100g. Najviše ga je bilo u uzorku broj **1** a najmanje u uzorku **23**.

U **Tabeli 27** prikazani su rezultati korelacione analize za sadržaje fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima polena koje su sakupile medonosne pčele.

Tabela 27. - Korelaciona analiza sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja u uzorcima polena

| | Elaginska k. | Galangin | Galna k. | Hlorogena k. | Krisin | Kofeinska k. | Kampferol | Luteolin | Protokatehinska k. | Rutin |
|--------------------|--------------|----------|----------|--------------|--------|--------------|-----------|----------|--------------------|--------|
| Elaginska k. | / | 0,004 | 0,76* | 0,75* | 0,10 | -0,01 | -0,59* | -0,72* | 0,18 | 0,81* |
| Galangin | 0,004 | / | 0,53* | -0,33 | 0,99 | 0,99* | 0,05 | 0,14 | -0,54* | -0,35 |
| Galna k. | 0,76* | 0,53* | / | -0,60* | 0,46 | 0,52* | 0,17 | 0,40 | -0,34 | -0,76* |
| Hlorogena k. | 0,75* | -0,33 | -0,60* | / | -0,23 | -0,29 | -0,83* | -0,60* | -0,42 | 0,54* |
| Krisin | 0,10 | 0,99* | 0,46 | 0,23 | / | 0,99* | -0,03 | 0,10 | -0,61* | -0,30 |
| Kofeinska k. | -0,01 | 0,99* | 0,52* | -0,29 | 0,99* | / | 0,06 | 0,23 | -0,61* | -0,43 |
| Kampferol | -0,59* | 0,05 | 0,17 | -0,83* | -0,03 | 0,06 | / | 0,78* | 0,60* | -0,47 |
| Luteolin | -0,72* | 0,14 | 0,40 | -0,60* | 0,10 | 0,23 | 0,78* | / | 0,07 | -0,86* |
| Protokatehinska k. | -0,18 | -0,54* | -0,34 | -0,42 | -0,61* | -0,61* | 0,60* | 0,07 | / | 0,31 |
| Rutin | 0,81* | -0,35 | 0,76* | 0,54* | -0,31 | -0,43 | -0,47 | -0,86* | 0,31 | / |

* značajne srednje ($r = 0,5 - 0,7$) i jake korelacije ($r > 0,7$).

Skoro linearnu zavisnost u sadržajima ($r= 0,99$) u ispitivanim uzorcima nalazimo za hrizin sa galanginom i kofeinskom kiselinom. To se posebno može pratiti kod prva dva jedinjenja jer se pojavljuju u skoro identičnom broju uzoraka a i maksimalne količine su im vezane za isti uzorak (br. 1) koji sadrži i maksimalnu količinu kofeinske kiseline. Na osnovu toga, možemo reći da je polen jasena bogat sa ova tri fenolna jedinjenja i da je njihovo pojavljivanje uslovljeno njegovim botaničkim poreklom. U značajno jakoj pozitivnoj korelaciji su i sadržaji elaginske kiseline i rutina ($r= 0,81$). Prisustvo rutina u značajnijim količinama je bilo praćeno prisustvom luteolina u niskim koncentracijama na šta ukazuje značajno jaka negativna korelacija sadržaja ova dva jedinjenja ($r= -0,86$). Značajno jaku negativnu korelaciju ($r= -0,83$) pokazali su i sadržaji kampferola i hlorogene kiseline dok je sa sadržajem luteolina, sadržaj kampferola pokazivao značajnu jaku pozitivnu korelaciju ($r= 0,78$). Sadržaj rutina je bio u značajnoj srednjoj pozitivnoj korelaciji ($r= 0,54$) sa sadržajem hlorogene kiseline. Značajno jake pozitivne koorelacije sadržaja galne, elaginske i hlorogene kiseline ($r= 0,75$) su očekivane s obzirom na to da su sve ove kiseline važne za mnoge fiziološke procese u biljkama kao i za zaštitu samog polenovog zrna zbog čega su i pronađene u većini uzoraka. Na kraju, treba istaći i značajno jaku negativnu korelaciju sadržaja luteolina sa elaginskom ($r= -0,72$) kao i značajnu srednju negativnu korelaciju sa hlorogenom kiselinom ($r= -0,60$).

Na osnovu pojedinačnih vrednosti za sadržaje fenolnih jedinjenja određen je i ukupni sadržaj ovih supstanci (USF) u svakom uzorku polena. Rezultati su prikazani u **Tabeli 28**. Kako su ova jedinjenja jedna od najzaslužnijih za ukupni antioksidativni kapacitet polena zahvaljujući, pre svega svojoj strukturi [Leja *et al.*, 2007], u istoj tabeli su prikazani i rezultati ispitivanja ukupnog antioksidativnog kapaciteta (UAK) uzoraka polena kako bi se utvrdilo da li postoji veza između ova dva parametra saglasno sa navodima u literaturi [Campos *et al.*, 2003; Le Blanc *et al.*, 2009].

Tabela 28. - Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja [mg/100g] i ukupni antioksidativni kapacitet [mmolkg⁻¹TROLOX] uzoraka polena

| uzorak | usf | uak | uzorak | usf | uak |
|---------------------|--------|--------|--------|---------------|---------------|
| 1 | 91,29 | 59,84 | 14 | 74,02 | 67,64 |
| 2 | 199,34 | 92,51 | 15 | 28,39 | 97,23 |
| 3 | 26,83 | 96,13 | 16 | 52,75 | 54,88 |
| 4 | 11,83 | 27,46 | 17 | 37,93 | 71,70 |
| 5 | 121,78 | 99,49 | 18 | 7,70 | 71,70 |
| 6 | 30,34 | 108,65 | 19 | 6,70 | 35,10 |
| 7 | 25,82 | 53,21 | 20 | 59,57 | 77,33 |
| 8 | 47,71 | 91,98 | 21 | 31,19 | 64,01 |
| 9 | 34,91 | 87,93 | 22 | 15,32 | 54,34 |
| 10 | 30,79 | 34,78 | 23 | 49,94 | 28,11 |
| 11 | 48,90 | 117,21 | 24 | 20,88 | 63,74 |
| 12 | 206,09 | 138,89 | 25 | 108,68 | 44,73 |
| 13 | 123,72 | 84,36 | 26 | 38,18 | 96,79 |
| min vrednost | | | | 6,70 | 27,46 |
| max vrednost | | | | 206,09 | 138,89 |

Na osnovu rezultata za ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja mogu se uočiti značajne razlike u dobijenim vrednostima pri čemu se maksimalna (206,09 mg/100g, uzorak broj **12**, Mala Krsna) i minimalna dobijena vrednost (6,70 mg/100g, uzorak broj **19**, Beograd) razlikuju za više od trideset puta. Prosečan sadržaj fenolnih jedinjenja u uzorcima je iznosio 58,87 mg/100g. Pored toga, kod većine uzoraka može se uočiti značajno niži sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (ili njihov prosečan sadržaj) u poređenju sa podacima koji postoje u literaturi:

- ✓ 440 – 1640 mg/100g [Mārghitas *et al.*, 2009]
- ✓ 1050 - 1680 mg/100g [Morais *et al.*, 2011]
- ✓ 1290 – 1980 mg/100g [Feás *et al.*, 2012]
- ✓ 740 - 970 mg/100g [Kroyer i Hegedus, 2001]
- ✓ prosečni sadržaj 1130 mg/100g [Rzepecka-Stojko *et al.*, 2012b]
- ✓ prosečni sadržaj 1240 mg/100g [Serra-Bonvehí *et al.*, 2001].

Ovakav sniženi sadržaj fenolnih jedinjenja mogao bi se dovesti u vezu sa uslovima skladištenja i čuvanja uzoraka kao i sa vremenom koje su uzorci proveli uskladišteni do trenutka kada su analize urađene. Naime, sa porastom vremena skladištenja uzoraka polena sadržaj fenolnih jedinjenja u njemu je značajno opadao [Rzepecka-Stojko *et al.*, 2012b]. Osim toga, ako uzorci, iz bilo kog razloga, nisu konstantno čuvani na sniženoj temperaturi i u mraku sadržaj fenola će, takođe, se značajno umanjiti. Treba napomenuti da je važan i period godine u kome se vrši prikupljanje polena. Ukoliko je to u periodu smanjenog dejstva sunčevih zraka i UV-zraka i prisustvo ovih jedinjenja u polenu, kao zaštitnih molekula, će biti manje [Le Blanc *et al.*, 2009].

Poređenjem botaničkog porekla ispitivanih uzoraka polena sa sadržajima jedinjenja fenolnog tipa može se uočiti da je najveći udeo ovih jedinjenja bio prisutan u polenu koji se može okarakterisati kao polen skoro monofloralnog tipa sa poreklom od biljaka iz familije kupusnjača. I naredna tri uzorka sa visokim vrednostima ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja bila su vezana upravo za polene koji su dominantno poticali od biljaka iz ove familije. Najnižim sadržajem fenolnih supstanci, pak, odlikovala su se dva polifloralna uzorka polena u kome nijedna vrsta polena nije bila dominantno zastupljena, ali je sa najvećim udelom bio polen koji je poticao od biljaka iz familije glavočika. Osim ova dva uzorka, niske vrednosti ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja nađene su kod polena koji je dominantno poticao od suncokreta kao i kod dva polena koja su vodila poreklo pretežno od biljaka iz familije leguminoza. Kod ostalih uzoraka u kojima je polen ovih biljaka bio dominantno zastupljen može se uočiti da se većina njih odlikovala niskim sadržajem ovih jedinjenja. Ovi rezultati kao i podaci o uzorcima sa maksimalnim količinama fenolnih jedinjenja ukazuju da se prisustvo ove grupe supstanci može dovesti u vezu sa njihovim botaničkim poreklom.

Poređenjem podataka o ukupnom sadržaju fenolnih jedinjenja i ukupnog antioksidativnog kapaciteta uzoraka polena može se uočiti da je uzorak koji se odlikovao maksimalnim vrednostima za oba parametra bio uzorak br. **12** (Mala Krsna). Međutim, već kod naredna dva uzorka koja su imala visoke UAK-vrednosti uočavaju se značajna odstupanja jer su, po sadržaju fenolnih jedinjenja, ovi uzorci bili bliže minimalnim vrednostima. Jedino se još uzorak broj **5** (Beograd), koji se odlikovao nešto višim vrednostima sadržaja fenolnih jedinjenja, može okarakterisati kao uzorak sa visokom antioksidativnom moći. Dobijeni podaci podudaraju sa podacima Mārghitas-ove [Mārghitas *et al.*, 2009], Leja-e [Leja *et al.*, 2007] i Morais-a [Morais *et al.*, 2009] sa saradnicima koji nisu pronašli direktnu vezu između ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u uzorcima polena i njihovog antioksidativnog kapaciteta. Ova odstupanja i razlike mogla bi se objasniti činjenicom da i druga jedinjenja mogu da utiču na sposobnost polena da neutrališe slobodne radikale: vitamini [Loper *et al.*, 1980; Pereira de Melo i Almeida-Muradian, 2010], proteini i šećeri [Campos *et al.*, 2003]. Iako je Campos-eva sa saradnicima, uz proteine i šećere, ispitivala i udeo lipida u antioksidativnoj moći

polena i utvrdila da oni na to ne utiču, Smirnova sa saradnicima [Smirnova *et al.*, 2012] ukazuje na ulogu egzinske opne (koja je bogata sporopoleninom i sličnim supstancama lipidnog karaktera) u antioksidativnoj sposobnosti polena. Naime, oni proširuju spisak uloga ove opne u zrnu polena. To znači da osim zaštitne uloge polnih ćelija od mehaničkog oštećenja, sušenja i apsorpcije UV zračenja, egzinska opna može imati ulogu i u uklanjanju viška slobodnih radikala koji nastaju u njegovoj neposrednoj blizini, u intini. Očigledno je da dinamički sistem koji je zaslužan za stvaranje i razgradnju reaktivnih vrsta u ćelijskom zidu predstavlja složeni multikomponentni mehanizam koji obezbeđuje otpornost na stres polenovog zrna. U isto vreme, ovaj sistem je uključen i u intracelularne interakcije na stigmi tučka kao i u finalnu fazu rasta i razvoja vegetativne cevi.

Na osnovu dobijenih rezultata ne može se utvrditi veza između vrednosti za UAK i geografskog porekla uzoraka. Naime, uzorak sa najnižom vrednošću za UAK i drugi po redu uzorak sa njenom najvišom vrednošću potiču iz Beograda. Ovaj zaključak je bio u saglasnosti sa sličnim podacima do kojih su došli drugi autori [Mārghitas *et al.*, 2009; Almaraz-Abarca *et al.*, 2004; Leja *et al.*, 2007].

IV-5 pH i a_w - vrednosti i ispitivanje prisustva plesni i aflatoksina u uzorcima polena

Ispitivanje i poznavanje mikrobioloških karakteristika uzoraka je, uz informacije o palinološkom i fizičko-hemijskom sastavu polena, najvažniji parametar njegovog kvaliteta. One, u velikoj meri, zavise od sadržaja vlage, pH i a_w - vrednosti uzoraka polena.

IV-5a pH i a_w - vrednosti uzoraka polena

Kao što je već naglašeno u delu o ispitivanju sadržaja vlage, aktivnosti vode i pH- vrednosti polena (**II-2a**) su dva važna parametra koji se smatraju od velike važnosti za bezbednu upotrebu polena kao dodatka ishrani. Ukoliko se njihove odgovarajuće, granične, vrednosti vrednosti prekorače u uzorcima polena može, veoma lako, doći do razvoja različitih bakterija, plesni i kvasaca kao biokontaminanata. Problem sa prisustvom mikroba u uzorcima polena nije toliko u samim mikrobima koliko u

njihovim produktima metabolizma koji mogu biti izuzetno toksični i štetni po zdravlje. Da bi se očuvala mikrobiološka ispravnost uzorka u bilo kom trenutku njegovog „puta“ od proizvođača do potrošača moraju biti ispoštovani standardi koji će sprečiti razvoj mikroorganizama. Da bi se to izbeglonije uvek potrebno vršiti neke posebne tretmane uzoraka poput zračenja, ozonizacije ili hemijske obrade (čime bi se mogla nagraditi neka toksična jedinjenja, smanjiti nutritivna vrednost polena ili promeniti njegova tehno-funkcionalna svojstva) već treba delovati preventivno i na taj način sprečiti kontaminaciju mikrobima [Bogdanov, 2012]. S obzirom da su aktivnost vode i pH-vrednost uzoraka polena veoma često u intervalu koji pogoduje razvoju mikroba određene su i vrednosti ova dva parametra i prikazane u **Tabeli 29**.

Tabela 29. - pH- vrednost i aktivnost vode, a_w u uzorcima polena

| Uzorak | pH | a_w | uzorak | pH | a_w |
|---------------------|------|-------------|--------|-------------|--------------------|
| 1 | 5,25 | 0,38±0,01 | 14 | 5,53 | 0,388±0,013 |
| 2 | 5,30 | 0,39±0,01 | 15 | 5,28 | 0,386±0,014 |
| 3 | 5,26 | 0,385±0,015 | 16 | 5,12 | 0,385±0,012 |
| 4 | 5,13 | 0,390±0,015 | 17 | 5,35 | 0,387±0,012 |
| 5 | 5,48 | 0,386±0,011 | 18 | 5,46 | 0,385±0,010 |
| 6 | 5,20 | 0,387±0,015 | 19 | 4,90 | 0,370±0,009 |
| 7 | 4,88 | 0,390±0,015 | 20 | 5,01 | 0,377±0,014 |
| 8 | 5,30 | 0,388±0,015 | 21 | 5,62 | 0,375±0,010 |
| 9 | 4,01 | 0,391±0,015 | 22 | 4,56 | 0,385±0,012 |
| 10 | 4,55 | 0,384±0,015 | 23 | 4,77 | 0,39±0,01 |
| 11 | 5,52 | 0,389±0,019 | 24 | 5,45 | 0,382±0,012 |
| 12 | 5,67 | 0,382±0,011 | 25 | 5,09 | 0,380±0,009 |
| 13 | 5,75 | 0,387±0,015 | 26 | 5,82 | 0,375±0,010 |
| min vrednost | | | | 4,01 | 0,370±0,009 |
| max vrednost | | | | 5,82 | 0,391±0,015 |

Prosečna vrednost za aktivnost vode u ispitivanim u uzorcima je iznosila 0,384. Najnižu vrednost za a_w je imao uzorak broj **19**, iz Beograda (0,370) a najvišu (0,391) uzorak iz Šapca (br. **9**). Može se uočiti da je opseg vrednosti za sve uzorke jako mali te se dobijeni rezultati nisu međusobno statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$). Vrednosti za pH su se kretale u intervalu 4,01 - 5,82. Najkiseliji je bio uzorak broj **9** (Šabac), dok je najvišu pH- vrednost imao uzorak iz Čačka (br. **26**). Opseg u kome su se kretale dobijene vrednosti za pH je bio veći u odnosu na rezultate za a_w -vrednost, sa prosečnom vrednošću za pH koja je iznosila 5,2. Na osnovu prosečne vrednosti za a_w (0,384) može se videti da je ona nešto viša u odnosu na vrednost koju preporučuju Serra-Bonvehí i Jordá [1997] kao bezbednu za upotrebu polena u ljudskoj ishrani, a to je 0,30. Sa druge strane, rezultati za aktivnost vode su bili u potpunoj saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni za

uzorke polena iz Brazila (prosečna vrednost 0,38) [Carpes *et al.*, 2009], Španije (0,26 - 0,43) i Portugala (0,32 - 0,55) [Estevinho *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2012]. Carpes-ova, posebno naglašava, da je njihov rezultat u saglasnosti sa brazilskim propisima za dehidratisanu hranu. Iz tog razloga treba istaći da je vrednost od 0,30 samo predlog dva autora, a ne zvaničan stav niti zakonski propis jer se propisi, od zemlje do zemlje, mogu i značajno da razlikuju po dozvoljenim vrednostima. Dobijene pH- vrednosti ispitivanih uzoraka su bile u saglasnosti sa rezultatima koje su dobijali drugi autori u svojim istraživanjima: 4,33 - 6,33 [Estevinho *et al.*, 2012], 4,3 - 5,2 [Feás *et al.*, 2012]. Osim toga, vrednosti za pH su bile u skladu i sa brazilskim propisima (4,0 - 6,0) [Brasil, 2001]. Niske vrednosti pH garantuju ispravnost uzoraka polena [Feás *et al.*, 2012]. S obzirom da je već evidentirano (**IV-2a**) povišeno prisustvo vlage u većini uzoraka i da je vrednost za aktivnost vode nešto iznad 0,30, moguće je da je uzrok tome neki propust i greška bilo pri proizvodnji, bilo pri skladištenju uzoraka polena. Po nekim autorima najkritičniji momenat je sakupljanje polena u zamkama koje se postavljaju na ulaz u košnice [Estevinho *et al.*, 2012]. Glavni problem je što veoma često pčelari ne skladište dnevno polen koji se na taj način nakupi u zamkama, a pošto je on vrlo higroskopian višak vlage iz vazduha će se nahvatati na njemu. Druga kritična faza je sušenje. Ono se mora izvršiti što je brže moguće. Obično sušenje na vazduhu treba izbegavati, jer ono veoma pogoduje razvoju mikroorganizama. Sadržaj vlage ispod 3% može negativno da se odrazi na boju i da podstakne veći broj hemijskih procesa poput Milardove reakcije, dehidratacije fruktoze, gubitka lako isparljivih supstanci i razvoja neprijatnog mirisa koji je posledica oksidacije lipida [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997].

IV-5b Ispitivanje prisustva plesni u uzorcima polena

Rezultati ispitivanja prisustva plesni u uzorcima polena su dati u **Tabeli 30**.

Prisustvo plesni je utvrđeno u deset od dvadeset šest ispitivanih uzoraka polena. Pri tome, rodovi *Mucor sp.*, *Penicillium sp.* i *Alternaria sp.* identifikovani su u tri uzorka (30%), dok su rodovi *Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.* i *Fusarium sp.* izolovani u dva uzorka (20%). Vrsta *Aspergillus flavus* je izolovana u dva ispitivana uzorka (20%). Najveća kontaminacija plesnima je pronađena u uzorku broj **17**, sa

Petrovaradina, u kome su identifikovana dva roda plesni (*Fusarium* sp. i *Alternaria* sp.), kao i vrsta *Aspergillus flavus*. Takođe, još dva uzorka su bila kontaminirana sa po dva različita roda - *Penicillium* sp. i *Rhizopus* sp. su identifikovani u uzorku iz Babušnice (br. 6) dok su *Penicillium* sp. i *Mucor* sp. izolovani u uzorku broj 12 (Mala Krsna). Od ostalih sedam kontaminiranih uzoraka u svima je identifikovana samo po jedna vrsta ili rod plesni.

Tabela 30. - Prisustvo plesni i aflatoksina, AFB1 [$\mu\text{g kg}^{-1}$] u uzorcima polena

| uzorak | identifikovane vrste i/ili rodovi | brojnost kolonija [cfu g^{-1}] | [AFB1] | uzorak | identifikovane vrste i/ili rodovi | brojnost kolonija [cfu g^{-1}] | [AFB1] |
|---------------------|-----------------------------------|---|--------|--------|-----------------------------------|---|--------------|
| 1 | / | / | 10,63 | 14 | / | / | 5,20 |
| 2 | / | / | 11,86 | 15 | <i>Trichoderma</i> sp. | $1 \cdot 10^4$ | 13,16 |
| 3 | <i>Mucor</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | 7,72 | 16 | / | / | 6,62 |
| 4 | / | / | 5,74 | 17 | <i>Aspergillus flavus</i> | $1 \cdot 10^3$ | 7,68 |
| | | | | | <i>Fusarium</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | |
| 5 | / | / | 13,84 | 18 | <i>Alternaria</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | 10,89 |
| 6 | <i>Penicillium</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | 17,32 | 19 | <i>Alternaria</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | 6,87 |
| | <i>Rhizopus</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | | | / | / | |
| 7 | / | / | 3,15 | 20 | <i>Mucor</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | 9,63 |
| 8 | <i>Penicillium</i> sp. | $1 \cdot 10^4$ | 9,04 | 21 | <i>Alternaria</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | 6,83 |
| 9 | / | / | 4,72 | 22 | / | / | 10,95 |
| 10 | / | / | 5,39 | 23 | / | / | 4,82 |
| 11 | / | / | 8,87 | 24 | / | / | 11,61 |
| 12 | <i>Penicillium</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | 4,84 | 25 | / | / | 3,96 |
| | <i>Mucor</i> sp. | $1 \cdot 10^3$ | | | | | |
| 13 | <i>Aspergillus flavus</i> | $1 \cdot 10^3$ | 6,48 | 26 | / | / | 7,00 |
| min vrednost | | | | | | $1 \cdot 10^3$ | 3,15 |
| max vrednost | | | | | | $1 \cdot 10^4$ | 17,32 |

Brojnost kolonija plesni u uzorcima polena koji su bili kontaminirani se kretala u opsegu od $1 \cdot 10^3$ do $1 \cdot 10^4$ cfu g^{-1} . U uzorcima broj 8 (Obrenovac) i 15 (Gunjaci) pronađena je najveća brojnost plesni iz rodova *Penicillium* sp. (br. 8) i *Trichoderma* sp. (br. 15)- 10^4 cfu g^{-1} . S obzirom da u našem pravilniku o kvalitetu i ispravnosti nisu definisani i propisani parametri o mikrobiološkom kvalitetu i ispravnosti polena koji su sakupile medonosne pčele, dobijene vrednosti o brojnosti kolonija plesni u uzorcima polena su upoređene sa propisanim granicama u argentinskom pravilniku o kvalitetu hrane [Coronel *et al.*, 2004]. U skladu sa njime, gornja dozvoljena granica prisustva za plesni iznosi $1,5 \cdot 10^3$ cfu g^{-1} . Na osnovu toga i dobijenih rezultata može se reći da je u uzorcima 6, 8, 12, 15 i 17 zabeležena

povišena brojnost kolonija plesni, dok je u preostalim pet uzoraka, u kojima su plesni identifikovane, njihova brojnost bila u skladu sa navedenim pravilnikom.

Poređenjem geografskog porekla uzoraka i pronađenih kolonija plesni može se primetiti da se radi o uzorcima sa potpuno različitih prostora i da su uzorci iz Šida (**18 i 21**) bili kontaminirani.

Poređenjem botaničkog porekla ispitivanih uzoraka i prisustva plesni u polenu nije moguće utvrditi direktnu vezu između ova dva podatka. Iako je u sedam od deset uzoraka koji su u svom sastavu imali polen biljaka iz familije kupusnjača i leguminoza identifikovano prisustvo plesni postojali su i uzorci (br. **6, 8 i 21**) koji su, takođe, sadržavali polen ovih biljaka ali u njima nisu pronađene plesni.

Ispitivanje mikrobiološke ispravnosti uzoraka polena u radovima drugih autora [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997; Feás *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2012] pokazuje da postoji velika raznovrsnost u prisutnim vrstama i rodovima mikroorganizama pre svega, plesnima. Prisustvo vrste *Aspergillus flavus* kao i većeg broja plesni identifikovanih do nivoa roda (*Mucor*, *Alternaria*, *Penicillium* i *Fusarium*) u analiziranim uzorcima bilo je u saglasnosti sa podacima iz literature. Na osnovu dostupne literature prisustvo roda *Trichoderma* nije zabeleženo u ispitivanju mikrobiološke ispravnosti uzoraka polena zbog čega rezultati iz ove disertacije predstavljaju doprinos identifikovanim vrstama plesni prisutnim u polenu koji su sakupile medonosne pčele.

Do kontaminacije polena mikroorganizmima može doći bilo na samom cvetu, bilo u toku prikupljanja polena ili ishrane larvi i matice u košnici kada pčele mogu doprineti tome [Snowdon i Cliver, 1996]. Po mišljenju Serra-Bonvehí-ja i Jordá-e [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997] velika raznovrsnost u vrstama i tipovima mikroorganizama prisutnih u uzorcima polenima se može pripisati kako prirodnom okruženju tako i ljudskom faktoru. U sveže prikupljenom polenu sadržaj vode se kreće u granicama od 20 do 30%, što u kombinaciji sa visokim sadržajem hranljivih materija predstavlja veoma pogodnu sredinu za rast i razmnožavanje različitih mikroorganizama, a pre svega kvasaca, plesni, sporogenih bakterija i koka [Brindza *et al.*, 2010]. U osušenom polenu sadržaj vlage bi trebalo da se kreće u rasponu od 4 do 8% [Mutsares, 2005; Melo i Almeida-Muradian, 2011]. Kvalitet osušenog polena će u velikoj meri zavisiti od primenjenih metoda

za njegovo konzervisanje. Većina pčelara u Srbiji, tradicionalno obavlja proces sušenja na otvorenom, u hladu, u struji ambijentalnog vazduha, što može dovesti do kontaminacije polena mikotoksigenim plesnima. I aktivnost vode bitno utiče na razvoj mikroorganizama u polenu: što je bila veća aktivnost vode u uzorcima utoliko je bio i veći sadržaj mikroorganizama u njima. U tom smislu, Serra-Bonvehí i Jordá [1997] predlažu sledeće mere predostrožnosti:

- ✓ uzorke bi trebalo sakupljati u roku od 48 h od trenutka postavljanja zamki u košnicama
- ✓ uzorke treba sušiti dok im aktivnost vode ne opadne ispod 0,60 i to u roku od 24 h od trenutka prikupljanja (72 h od trenutka postavljanja zamki u košnicama).

Zbog svega navedenog tradicionalni način sušenja uzoraka na otvorenom u trajanju od nekoliko dana bi trebalo izbegavati i uzorke sušiti samo u zatvorenom prostoru i pod kontrolisanim uslovima.

Osim vrednosti za a_w , veoma važan parametar koji može selektivno uticati na prisustvo plesni u uzorku polena je njegova pH- vrednost. Poređenjem rezultata za pH- vrednost u ispitivanim uzorcima polena u kojima je došlo do razvoja plesni (pH 5,01 - 5,75) sa literaturnim podacima može se uočiti da su oni u saglasnosti sa sledećim tvrdnjama:

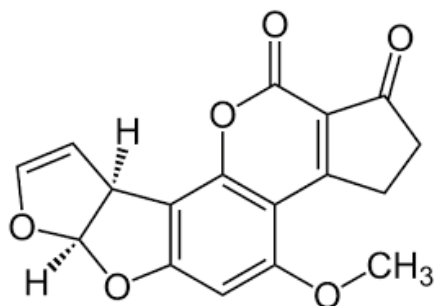
- ✓ Magan i Lacey [1984] tvrde da je razvoj mikroba moguć samo u intervalu pH od 4,5 do 6,0
- ✓ Po Estevinho-voj i saradnicima [Estevinho *et al.*, 2012] donja granica za pH- vrednost je još viša i iznosi 4,96.

Međutim, kao što je već naglašeno, pH- vrednost je prateći parametar koji, uz aktivnost vode, može uticati na pojavu mikroorganizama u osušenom polenu. Tako su Magan i Lacey [1984] utvrdili da se najniža vrednost za a_w na kojoj, uz adekvatnu pH- vrednost, već počinje razvoj plesni iz rodova *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp. kretala u granicama od 0,71 do 0,96. Međutim, na razvoj plesni u polenu pored pH- vrednosti mogu uticati i vrsta plesni o kojoj se radi, kao i optimalna temperatura za njihov rast i razmnožavanje. Sa druge strane, prema nekim autorima [Estevinho *et*

al., 2012] razvoj mikroorganizama započinje već pri vrednosti za a_w od 0,55. Obe vrednosti su znatno iznad 0,30, koje su predložili Serra-Bonvehí i Jordá [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997], a takođe su i iznad vrednosti dobijenih u ovom istraživanju. S obzirom da je u ispitivanim uzorcima polena, i pored niske a_w - vrednosti ipak došlo do razvoja mikroorganizama, može se zaključiti da je potrebno dodatno ispitati i usaglasiti predložene vrednosti za a_w ali je, isto tako, izvesno da je ovo samo jedan od potencijalnih faktora koji određuje prisustvo i razvoj plesni u uzorcima polena.

Kontaminacija određenim mikroorganizmima nije štetna toliko zbog samih mikroorganizama, ukoliko se ta vrednost kreće u propisanim granicama, već, pre svega, zbog produkcije mikotoksina [Barać *et al.*, 2015]. Ova jedinjenja nastaju kao produkti metabolizma mikroba i mogu se javiti u različitim vrstama proizvoda kao što su kukuruz, pirinač, cerealijske, kikiriki, lešnik, orasi, suva hrana, zelena i pržena kafa, kakao i začini [Magan i Olsen, 2004]. Među mikotoksinima posebno treba apostrofirati aflatoksine [Serra-Bonvehí i Jordá, 1997]. Oni su potencijalno toksični, kancerogeni, mutageni, teratogeni i imunosupresivni agensi. Nastaju kao sekundarni produkt metabolizma pre svega dve vrste iz roda *Aspergillus* sp. – *Aspergillus flavus* (zbog čega je on u ovom istraživanju i identifikovan do nivoa vrste za razliku od svih ostalih plesni koje su identifikovane na do nivoa roda) i *Aspergillus parasiticus* [Rustom, 1997] Rezultati analize prisustva aflatoksina B1 (AFB1, slika 12) kao najopasnijeg iz ove grupe srodnih jedinjenja za ispitivane uzorke polena prikazani su u **Tabeli 30**.

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da u svim uzorcima je zabeležena kontaminacija sa AFB1. S obzirom da je prethodnom analizom prisustva plesni utvrđeno da je čak šesnaest uzoraka bilo sterilno, a da je analiza prisustva AFB1 pokazala da su svi uzorci kontaminirani, dobijeni rezultati ukazuju na to da su svi uzorci, u nekom trenutku, ipak, bili kontaminirani vrstama iz roda *Aspergillus* sp. [Moss, 1996].



Slika 12. Strukturna formula aflatoksina B1 (AFB1)

Kasnije, verovatno usled promene uslova i stvaranja nepovoljnog okruženja, došlo je do njihovog odumiranja. Bez obzira na to, za vreme svog prisustva u polenu plesni su produkovale aflatoksine koji su pronađeni u uzorcima polena. Moguće je da je već sama biljka, sa koje je pčela sakupljala polen bila zaražena plesnima i da na taj način polen biva kontaminiran još dok je na cvetu.

Na osnovu činjenice da najveći broj uzoraka polena, analiziranih u ovoj disertaciji potiče iz Vojvodine, Beograda i centralne Srbije, regiona poznatih po gajenju žitarica (za ljudsku ishranu), kukuruza i soje (za ishranu životinja), a imajući u vidu da je polen leguminoza bio jedan od dva najzastupljenija polena u ispitivanim uzorcima, ovakav vid kontaminacije aflatoksinom je bio moguć. Iako je razvoj ovog tipa plesni, do sada, više bio karakterističan za vlažnije suptropske i tropske krajeve, poslednjih godina na Balkanskom poluostrvu dolazi do postepenih i sve značajnijih klimatskih promena koje su praćene učestalom pojavom intenzivnih padavina i naglim promenama temperatura po čemu se uslovi sve više približavaju onima koji pogoduju razvoju kvasaca i plesni. Izveštaj Republičkog hidrometeorološkog zavoda za period od 2010. do 2012. godine pokazuje da je prolećni i letnji deo u te dve godine bio izrazito sušan. Kako se taj period poklapa sa vremenom prikupljanja ispitivanih uzoraka polena i imajući u vidu da su kasno proleće i leto upravo deo godine kada je najintenzivnija pčelinja paša i prikupljanje meda i polena, ovako sušni uslovi su sigurno dodatno pogodovali razvoju plesni i pojavi aflatoksina. Poznato je da je u prethodne dve godine bilo velikih problema sa pojavom aflatoksina u stočnoj hrani u Srbiji, a kasnije i u mleku. Među biljnim vrstama koje su posebno osetljive i podložne razvoju plesni iz roda *Aspergillus* sp. treba istaći kukuruz, soju kao i lešnik i srodno koštunjavo voće [Rustom, 1997; Nilüfer and Boyacıoğlu, 2002].

Drugi mogući način kontaminacije polena mikotoksinima je u okviru same košnice, ukoliko su pčele bile zaražene nekom bolešću ili zbog prisustva štetnih insekata i miševa koji napadaju košnice u pčelinjacima. Prisustvo ovih mikotoksina štetno je i za same pčele, jer nepovoljno utiče na razvoj legla i odraslih jedinki, čime se slabi društvo i postaje podložno bolestima i napadima drugih životinja [Niu *et al.*, 2011]. Treći put za kontaminaciju uzoraka aflatoksinima je dejstvo ljudskog faktora tj. da su uzorci mogli biti inficirani plesnima u toku prikupljanja, sušenja, transporta, pakovanja ili skladištenja. Razlog zašto je prisustvo aflatoksina veoma opasno i štetno je njegova izuzetno velika toksičnost. Naime, laboratorijski testovi na miševima su pokazali da je kancerogeno dejstvo ovih jedinjenja izraženo već pri dnevnom unosu od svega $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ telesne težine [Belitz *et al.*, 2009]. Poređenja radi, da bi se izazvao karcinom kod miševa pod dejstvom izuzetno toksičnog jedinjenja, dimetilnitrozoamina, potreban je dnevni unos od čak $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ telesne težine. Njegova akutna toksična doza (LD_{50}) iznosi $7,5 \text{ mg kg}^{-1}$ telesne težine odraslog čoveka [Belitz *et al.*, 2009]. Prema listi Međunarodne agencije za ispitivanje kancera (IARC) aflatoksin B1 spada u grupu 1 supstanci, a to su supstance sa dokazanim kancerogenim dejstvom na čoveka. Od svih aflatoksina on je jedini sa potvrđenim sposobnostima izazivanja kancera i sa najjačim mutagenim dejstvom i to pre svega na ćelije jetre [Wogan *et al.*, 1994; Eaton i Gallager, 1994]. Analizirajući dobijene vrednosti za sadržaj AFB1 u ispitivanim uzorcima polena dolazi se do sledećih rezultata:

- ✓ najniža koncentracija ovog mikotoksina je zabeležena u uzorku broj **7** ($3,15 \mu\text{g kg}^{-1}$), koji je vodio poreklo iz Valjeva, a najviša ($17,32 \mu\text{g kg}^{-1}$) u uzorku broj **6**, iz Babušnice
- ✓ Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da su se koncentracije AFB1 u najmanje kontaminiranom i u najkontaminiranijem uzorku razlikovale za oko 5,5 puta
- ✓ prosečan sadržaj aflatoksina B1 u ispitivanim uzorcima iznosio $8,26 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Vrednosti za maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) aflatoksina prema pravilniku o kvalitetu hrane koje važe u Srbiji [Službeni list, 2011] kreću se u intervalu od 2 do $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ zavisno od toga o kojoj se hrani i namirnicama radi. Dozvoljene vrednosti aflatoksina su u zemljama EU još niže, propisane su

pravilnikom [EC No 1881, 2006] i kreću se od nulte tolerancije u mleku i mlečnim proizvodima do $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ za kikiriki ali pre njegove upotrebe u ljudskoj ishrani. Za najveći deo prehrambenih proizvoda granice dozvoljenih koncentracija se kreću u intervalu $2 - 5 \mu\text{g kg}^{-1}$ telesne težine. Ukoliko MDK vrednosti koje važe u Srbiji uporedimo sa vrednostima dobijenim za uzorke polena analizirane u okviru ove disertacije možemo uočiti sledeće:

- ✓ najveći deo uzoraka se uklapa u dozvoljene vrednosti, izuzev uzoraka **15** ($13,16 \mu\text{g kg}^{-1}$), **5** ($13,84 \mu\text{g kg}^{-1}$) i **6** ($17,32 \mu\text{g kg}^{-1}$)
- ✓ Za dva uzorka možemo reći da su po vrednostima za AFB1 bila na gornjoj granici dozvoljenih MDK – uzorak **24** ($11,61 \mu\text{g kg}^{-1}$) i uzorak **2** ($11,86 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Ako sadržaje AFB1 u uzorcima polena uporedimo sa propisima koji važe u EU, prosečan sadržaj aflatoksina B1 u ispitivanim uzorcima polena ($8,26 \mu\text{g kg}^{-1}$) prevazilazi gornju dozvoljenu koncentraciju u kikirikiju, kao materijalu u kome je najveća tolerancija za prisustvo aflatoksina. Sa druge strane, svi uzorci, očekivano, prevazilaze nultu toleranciju kao i MDK-vrednosti za većinu namirnica, a za koje je navedeno da iznose $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Osim toga, ako se posmatra i gornja dozvoljena granica u tom smislu od $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ telesne težine uočava se sledeće:

- ✓ dvadeset jedan uzorak sadrži aflatoksina u količinama iznad dozvoljenih granica
- ✓ tri uzorka su na granici dozvoljene vrednosti (**9**- $4,72 \mu\text{g kg}^{-1}$, **23**- $4,82 \mu\text{g kg}^{-1}$ i **12**- $4,84 \mu\text{g kg}^{-1}$)
- ✓ dva uzorka se uklapala u referentne vrednosti EU - uzorak broj **7** ($3,15 \mu\text{g kg}^{-1}$) i uzorak broj **25** ($3,96 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Iako nijedan od ova dva propisa ne navodi eksplicitno polen koji su sakupile pčele (osim ako ga ne posmatramo kao dijetetski dodatak ishrani a za koji su MDK-vrednosti manje od $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$), imajući u vidu dosadašnje podatke o štetnosti bilo kakvog prisustva aflatoksina u hrani može se zaključiti da se upotreba kontaminiranog polena koji su sakupile medonosne pčele mora izbegavati. U literaturi postoji podatak [Niu *et al.*, 2011] da se štetno dejstvo aflatoksina na pčele može smanjiti dodavanjem propolisa u njihovoj ishrani što ostavlja mogućnost da bi ovaj pčelinji proizvod mogao imati isti ili sličan efekat kada bismo ga dodali polenu namenjenom ljudskoj ishrani, a koji je bio kontaminiran aflatoksinima.

Razlog zašto je u ovom istraživanju akcenat stavljen na ispitivanje prisustva aflatoksina u polenima jeste taj što većina ostalih identifikovanih plesni ne spada u kategoriju štetnih i opasnih po ljudsko zdravlje. Naime, jedina vrsta plesni iz roda *Mucor* sp. koja može da ima štetno dejstvo na čoveka je *Mucor indicus* i za nju je utvrđeno da može da izazove zigomikozu [Toro *et al.*, 1998]. Ovo oboljenje se u slučaju da mu je izazivač *Mucor indicus* naziva mukormikoza i manifestuje se pojavom teških rana i deformacija na licu, a pre svega na nosu i oko očiju ili usta. Iako se radi o retkom oboljenju (najčešće se javlja nakon velikih prirodnih katastrofa), s obzirom da skoro svi dolazimo u kontakt sa plesnima koje ga izazivaju, kod osoba sa oslabljenim imunim sistemom ono može biti jako opasno pa čak i sa smrtnim ishodom [Muma i Chipalo-Mutati, 2010]. Ovu bolest mogu da izazovu i neke vrste gljivica iz roda *Rhizopus* sp. koje, osim nje, kod dijabetičara mogu da dovedu i do pojave ketoacidoze [Chinn i Diamond, 1982; Chiasson *et al.*, 2003; Maletkovic i Drexler, 2013]. Ova bolest se ranije često javljala kod dijabetičara sa dijabetesom tipa I (ređe kod tipa II) i bila je izrazito smrtonosna sve do pojave i primene insulina u njihovom lečenju 20-ih godina XX veka. Plesni iz roda *Alternaria* sp. mogu biti izazivači alergija kod nekih ljudi [Singh i Denning, 2012]. U okviru roda *Fusarium* sp. svega nekoliko vrsta mogu imati štetno dejstvo po čoveka zbog proizvodnje mikotoksina fumonizina [Moss, 1998]. Ovaj toksin kod čoveka može, potencijalno, izazvati pojavu primarnog karcinoma jetre i jednjaka, a ima izraženo dejstvo i kao neurotoksin [Domijan, 2012] i uglavnom se javlja u siromašnijim delovima sveta gde su ljudi orijentisani ka upotrebi sirovog kukuruza i njegovog brašna direktno u ishrani. Na kraju, u rod *Trichoderma* sp. spada osamdeset osam vrsta plesni (među kojima je i svakodnevno prisutna buđ koja se javlja u kućama i stanovima), a svega nekoliko vrsta pokazuje blagu toksičnost po čoveka [Reino *et al.*, 2008].

Na osnovu svega iznetog može se zaključiti da bi osim analize polena na prisustvo mikroorganizama kao standardni deo mikrobiološke procedure trebalo uvesti i njegovu analizu na prisustvo mikotoksina s obzirom da su dobijeni rezultati pokazali da odsustvo plesni u ispitivanim uzorcima polena nije garant da oni u sebi ne sadrže određene toksine i da, u tom smislu, mogu biti potencijalno opasni i štetni za upotrebu kao dodatak ishrani ljudi.

V ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske disertacije izvršena je hemijska i nutritivna karakterizacija polena koji su medonosne pčele sakupile u različitim regionima Srbije. Na osnovu svih izloženih i prodiskutovanih rezultata mogu se formulisati sledeći zaključci:

- ✓ Na osnovu palinološkog porekla ispitivanih uzoraka polena može se zaključiti da ih je većina bila polifloralnog porekla izuzev tri ispitivana uzorka koji se mogu okarakterisati kao monofloralni, jer sadrže više od 80% polenovih zrna jedne biljne familije ili vrste – uzorak br. **2** (93% polena kupusnjača, Brassicaceae), uzorak br. **6** (81% polena vrbe, *Salix*) i uzorak br. **14** (81% polena mahunarki, Fabaceae). Nije bilo moguće utvrditi povezanost palinološkog porekla polena sa njegovim geografskim poreklom s obzirom da je u skoro svim uzorcima polen kupusnjača i mahunarki identifikovan u manjem ili većem procentu. Ovo je bilo očekivano s obzirom na zastupljenost vrsta iz ove dve familije u svim delovima i regionima Srbije.
- ✓ Na osnovu rezultata dobijenih za sadržaj vlage u ispitivanim uzorcima polena (4,35 – 14,35 g/100g) može se zaključiti da je u velikoj većini uzoraka ovaj parametar bio iznad gornje granice dozvoljene po zakonskoj regulativi (8 g/100g). To može biti posledica bilo neadekvatnih uslova čuvanja i skladištenja uzoraka bilo nedovoljnog sušenja. Neophodno je sadržaj vlage svesti na granicu od oko 6% kako bi se sprečila pojava i razvoj mikroba koji bi ugrozili ispravnost polena koji su sakupile medonosne pčele.
- ✓ na osnovu sadržaja pepela (1,18 – 3,32 g/100g) ispitivani uzorci su bili na ili ispod donje granice dozvoljenih vrednosti za sadržaj pepela u polenu (2 -6 g/100g).

- ✓ Na osnovu rezultata dobijenih za sadržaj makro- i mikroelemenata, kao tri najzastupljenija elementa su se izdvojili kalijum, kalcijum i magnezijum, što je bilo u skladu sa rezultatima većine istraživača. Ono što se razlikovalo jeste količinska zastupljenost pojedinih elemenata što potvrđuje tezu da geografsko poreklo, pre svega kroz sastav okolnog zemljišta, ima veliki uticaj na sadržaj minerala u polenima. Osim toga, utvrđena je i povezanost sadržaja određenih makroelemenata sa botaničkim poreklom uzoraka. Tako je zapaženo da se uzorci koji su dominantno sadržavali polen kupusnjača i mahunarki mogu okarakterisati kao bogati magnezijumom, dok je za uzorke bogate polenom suncokreta bilo karakteristično da su sadržavali najmanje količine kalijuma i magnezijuma. Uzorci koji su dominantno sadržavali polen mahunarki bili su bogati i po sadržaju kalcijuma, dok se uzorci bogati polenima suncokreta i japanskog bagrema mogu okarakterisati kao siromašni natrijumom. Uočeno je i da su ispitivani uzorci polena sadržavali gvožđe i cink u značajnim količinama. Kako su ova dva elementa važna sa nutritivnog aspekta utvrđeno je da bi korišćenjem ispitivanog polena koji su sakupile medonosne pčele kao dodatka ishrani odrastao čovek mogao da podmiri 30% dnevnih potreba za unosom gvožđa, odnosno, 15% količine cinka koja mu je neophodna. Prisustvo aluminijuma, kao potencijalno toksičnog elementa, u granicama iznad dozvoljenih (100 mg/100g) je utvrđeno samo u dva ispitivana uzorka pri čemu su oba vodila poreklo iz Beograda. Na osnovu toga je zaključeno da je povišena koncentracija ovog elementa u tim slučajevima posledica uticaja antropogenog faktora.
- ✓ Na osnovu ispitivanja sadržaja mikroelemenata utvrđeno je da je najzastupljeniji bio bakar. Po prvi put u uzorcima polena koji su sakupile medonosne pčele identifikovan je i stroncijum. Na osnovu sadržaja toksičnih metala (Cr, Cd, Co) utvrđeno je da su prisutni samo u tragovima.
- ✓ Prosečan sadržaj proteina u ispitivanim uzorcima polena je iznosio 19,44 g/100g što je bilo u skladu sa najvećim brojem prethodnih istraživanja. Poređenjem botaničkog porekla uzoraka sa sadržajem proteina utvrđeno je da se poleni kupusnjača mogu okarakterisati kao najbogatiji po sadržaju proteina

dok se, sa druge strane, poleni suncokreta i japanskog bagrema mogu okarakterisati kao poleni sa niskim sadržajem proteina. Moguće je da i način uzgajanja biljaka utiče na sadržaj proteina u njima.

- ✓ Na osnovu prosečne vrednosti za rastvorljivost proteina (11,22 g/100g) može se zaključiti da je polen koji su sakupile medonosne pčele sličan proizvodima od soje sa niskom rastvorljivošću proteina. Ovo se može dovesti u vezu sa kompleksnim hemijskim sastavom polena, sa složenom strukturom samih molekula proteina, njihovom konformacijom, kao i sa mogućim interakcijama koje oni mogu da ostvare u polenu sa drugim komponentama prisutnim u njemu (šećerima, lipidima, metalima).
- ✓ Na osnovu rezultata SDS-PAGE analize jasno se mogu uočiti tri frakcije proteina i to: proteini sa molekulskim masama od 80 kDa do 50 kDa, proteini sa molekulskim masama od 50 kDa do 25 kDa i proteini sa molekulskim masama od 25 kDa do 10kDa. Svi ispitivani uzorci polena (izuzev uzorka br. 1) su kao dve glavne trake proteina sadržavali trake sa molekulskim masama od 77 kDa tj. 59 kDa što je ukazivalo na sličnost u sastavu rastvorljivih proteina u ispitivanim uzorcima polena. Sličnost u pogledu sastava rastvorljivih proteina u ispitivanim uzorcima polena može se dovesti i u vezu sa enzimama koje pčele luče prilikom prikupljanja polena (amilaze, katalaze serin i cistein-proteinaze). Jedan od ispitivanih uzoraka (br. 17) može se okarakterisati kao uzorak bogat proteinima niskih molekulskih masa.
- ✓ Na osnovu prosečnog sadržaja ugljenih hidrata (75,51 g/100g) u ispitivanim uzorcima može se zaključiti da se radi o najzastupljenijoj frakciji u polenima koja će, u skladu sa time, imati i veliki uticaj na nutritivne karakteristike i energetske vrednosti ispitivanih uzoraka polena. Poređenjem sa podacima u literaturi samo jedan uzorak bi se mogao okarakterisati kao siromašan (sadržavao manje od 65 g/100g), trinaest uzoraka je bilo izuzetno bogato ukupnim ugljenim hidratima (od 75 do 80 g/100g) dok tri uzorka prevazilaze gornju granicu od 80 g/100g ukupnih šećera.

- ✓ Na osnovu sadržaja rastvorljivih ugljenih hidrata zaključeno je da je u dvadeset tri uzorka najzastupljeniji šećer bila fruktoza, sa prosečnim sadržajem od 23,92 g/100g. U tri uzorka najzastupljeniji šećer je bila maltoza (prosečan sadržaj od 12,27 g/100g) dok su u jednom uzorku u podjednakim količinama pronađene fruktoza i maltoza. Preostala tri rastvorljiva ugljena hidrata koja su identifikovana, glukoza, saharoza i trehaloza, bili su prisutni u uzorcima u manjim količinama. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji se razlikuju od literaturnih pre svega po tome što je sadržaj saharoze u uzorcima polena bio znatno niži od podataka dostupnih u literaturi. Osim toga, kod većine uzoraka rastvorljivost ugljenih hidrata je bila nešto viša od ukupnog sadržaja rastvorljivih ugljenih hidrata koji su ispitani i identifikovani, što ukazuje da su u uzorcima, najverovatnije, bili prisutni i još neki rastvorljivi ugljeni hidrati koji nisu bili obuhvaćeni ispitivanjem i to pre svega skrob i pektini.
- ✓ Na osnovu dobijenih rezultata za ukupne sadržaje lipida (1,31 - 6,78 g/100g) može se zaključiti da su bili u saglasnosti sa većinom prethodnih istraživanja. Poređenjem sadržaja ukupnih lipida sa palinološkim poreklom uzoraka zaključeno je da su uzorci koji su bili bogati polenom kupusnjača imali i najviše sadržaje lipida. Sa druge strane, uzorci polena koji su vodili poreklo od mahunarki mogli su se okarakterisati kao uzorci sa niskim sadržajem lipidnih materija. Do sličnog zaključka se može doći i za polen japanskog bagrema.
- ✓ Na osnovu analize sadržaja pojedinačnih masnih kiselina utvrđeno je da su u svim ispitivanim uzorcima polena prisutne sledeće masne kiseline: kaprilna (C8:0), palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1n-9) i linolenska (C18:3n-3). Od preostalih dvadeset masnih kiselina za šest se može reći da su značajno zastupljene u većini uzoraka - laurinska (C12:0), miristinska (C14:0), pentadekanoinska (C15:0), margarinska (C17:0), arahidska (C20:0) i behenska kiselina (C22:0). Sa druge strane, za šest masnih kiselina se može reći da su "retke" i neuobičajene, jer su se javljale u svega nekoliko ispitivanih uzoraka: palmitoleinska (C16:1), γ -linolenska (C18:3n-6), eikozanska (C20:1), eikozatrienska (C20:3n-3), dihomo- γ -linolenska (C20:3n-6) i lignocerinska

(C24:0), dok dve nisu pronađene ni u jednom od uzoraka: dokozopentanoinska (C20:5n-3) i dokozoheksanoinska kiselina (C22:6n-3). Prisustvo "retkih" masnih kiselina može se, u nekim slučajevima, dovesti u vezu sa palinološkim poreklom ispitivanih uzoraka polena i poslužiti kao parametar hemotaksonomije. U tom smislu, prisustvo γ -linolenske kiseline u jednom od ispitivanih uzoraka, može se povezati sa prisustvom polena biljaka iz familije Brassicaceae. Prisustvo eikozadienske kiseline u jednom od ispitivanih uzoraka moguće je povezati sa prisustvom polena biljaka iz familije ljutića (Ranunculaceae) kao i sa polenom kukuruza (*Zea mays*). Prisustvo gadoleinske kiseline (C20:1) u nekoliko ispitivanih uzoraka može se povezati sa prisustvom polena biljaka iz familija mahunarki, kupusnjača, ljutića ili konoplje (Cannabaceae). Prisustvo palmitoleinske (C16:1) kiseline u dva ispitivana uzorka polena može se povezati sa prisustvom polena kukuruza u njima, za koji je dokazano da sadrži ovu retku masnu kiselinu, ili sa polenom biljaka iz familije ljutića.

- ✓ Na osnovu rezultata odnosa sadržaja nezasićenih i zasićenih masnih kiselina može se zaključiti da je samo u jednom uzorku ovaj odnos bio veći od 1, što je vrednost poželjna sa nutritivnog aspekta. Snižene vrednosti ovog odnosa, a samim time i hranljiva vrednost polena, može se dovesti u vezu kako sa samim poreklom polena tako i sa neodgovarajućim uslovima njegove prerade i čuvanja.
- ✓ Na osnovu rezultata dobijenih za energetske vrednosti uzoraka polena (350,65 - 395,6 kcal/100g) može se zaključiti da su ispitivani uzorci polena zadovoljavajućeg energetskeg kvaliteta, ali sa nedovoljno pravilnom raspodelom energetskeg vrednosti po komponentama s obzirom da sadrže niži sadržaj lipida i ugljenih hidrata i viši sadržaj proteina u odnosu na preporučene vrednosti.
- ✓ U okviru ove disertacije po prvi put su određena tehno-funkcionalna svojstva polena – emulgjuća svojstva, peniva svojstva, kapacitet vezivanja vode i ulja. Na osnovu rezultata dobijenih za ESI (19,6 - 49,3 min) i EAI (10,4 - 24,5 m² g⁻¹) parametre može se zaključiti da polen koji su sakupile medonosne pčele ima dobra emulgjuća svojstva koja su u rangju sa emulgjućim osobinama

proteinskih proizvoda kao što su izolati graška, brašno više vrsta pasulja i sojino niskomasno brašno. Najveći doprinos stabilnosti emulzija daju proteini malih molekulskih masa jer se lakše adsorbuju na dodirnoj površini voda/ulje i na taj način stabilizuju emulziju. Osim proteina na stabilnost nagrađenih emulzija uticaj mogu da imaju i drugi molekuli prisutni u polenu kao što su polarni lipidi, skrob, pektin, joni kalijuma ili kalcijuma.

- ✓ Ispitivanje penivih osobina polena je pokazalo da uzorci ne poseduju ovo svojstvo, jer suspenzije koje su pravljene nisu uspele da formiraju održivu penu. Zbog toga se može zaključiti da polen koji su sakupile medonosne pčele poseduje anti-peniva svojstva.
- ✓ Na osnovu rezultata za WAC-parametar ($0,92 - 2,25 \text{ g g}^{-1}$) može se zaključiti da uzorci polena nisu pokazali visok kapacitet vezivanja vode. Glavna komponenta koja je mogla da utiče na vrednost ovog parametra su nerastvorljivi proteini, a osim njih i neki od polarnih lipidnih molekula.
- ✓ Na osnovu rezultata za OAC-parametar ($1 - 3,53 \text{ g g}^{-1}$) može se zaključiti da polen ima veću sposobnost vezivanja ulja od vode i da je kapacitet vezivanja ulja ispitivanih uzoraka polena bio veći u odnosu na vrednosti OAC parametra kod više vrsta brašna pasulja i sojinog brašna. Kao glavna komponenta koja bi mogla da utiče na povećanu OAC vrednost izdvaja se sporopolenin, kao i drugi lipidni molekuli prisutni u "pollen-kitt" zoni ili proteini sa izraženim hidrofobnim zonama. Poređenjem vrednosti za ova dva parametra kroz WOAI-parametar može se zaključiti da su svi uzorci, izuzev jednog, imali vrednost ovog parametra nižu od 1. To ukazuje na činjenicu da je polen, pretežno, lipofilnog karaktera.
- ✓ Na osnovu rezultata analize sadržaja fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima polena može se zaključiti da su četiri bila prisutna u svim uzorcima. Najzastupljenije od svih jedinjenja je bio rutin sa značajnim razlikama u sadržaju ($3,1 - 201,6 \text{ mg/100g}$) gledano po uzorcima što se delimično može dovesti u vezu sa njihovim palinološkim poreklom. Naime, može se zaključiti da su uzorci koji su

u značajnijoj meri sadržavali polen kupusnjača bili bogatiji ovim glikozidom. Prisustvo preostala tri fenolna jedinjenja prisutna u svim uzorcima – galne kiseline (prosečni sadržaj 2,14 mg/100g), hlorogene kiseline (prosečni sadržaj 0,45 mg/100g) i luteolina (prosečni sadržaj 0,24 mg/100g) – nije bilo moguće dovesti u vezu sa određenim tipom polenovih zrna i njegovim palinološkim poreklom. Od preostalih fenolnih jedinjenja u većini je bila prisutna i elaginska kiselina (0,16 - 0,64 mg/100g) kao i galangin, hrizin (prosečan sadržaj 0,377 mg/100g) i kampferol (prosečan sadržaj 0,124 mg/100g) s tim što je galangin samo u jednom uzorku bio prisutan u značajnijoj količini. U tom smislu moguće je njegovo prisustvo, kao i prisustvo krisina, povezati sa polenom jasena koji je bio dominantno zastupljen tip polena u datom uzorku.

- ✓ Na osnovu vrednosti za ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja (6,7 - 206,1 mg/100g) i poređenjem sa podacim dostupnim u literaturi, može se zaključiti da je većina uzoraka bila relativno siromašna polifenolima. Ovakvi rezultati bi se mogli dovesti u vezu ili sa uslovima čuvanja i skladištenja uzoraka, jer sa vremenom i porastom temperature sadržaj ovih jedinjenja opada, ili sa periodom godine kada su uzorci prikupljeni. Poređenjem botaničkog porekla ispitivanih uzoraka, uzorci bogatiji fenolnim jedinjenjima se mogu dovesti u vezu sa polenom biljaka iz familije kupusnjača dok bi na nizak sadržaj ovih jedinjenja uticaj mogao da ima polen biljaka iz familije glavočika. Sa druge strane, nije bilo moguće utvrditi direktnu povezanost botaničkog porekla uzoraka sa ukupnim antioksidativnim kapacitetom kao ni povezanost sa geografskim poreklom ispitivanih uzoraka.
- ✓ Na osnovu vrednosti za aktivnost vode (prosečna vrednost 0,384) i pH-vrednost u uzorcima (4,01 - 5,82) može se zaključiti da su dobijene vrednosti u saglasnosti sa većim brojem ranijih istraživanja. Dobijene vrednosti za a_w su nešto više u odnosu na vrednost 0,3 koju određeni autori u literaturi preporučuju kao bezbednu za upotrebu polena u ljudskoj ishrani. S obzirom da je u većini uzoraka utvrđen i povišen sadržaj vlage, najverovatnije je uzrok povećanih vrednosti ova dva parametra neki od propusta prilikom prikupljanja

ili čuvanja ispitivanih uzoraka od strane pčelara. U literaturi ne postoji potpuna saglasnost oko vrednosti za a_w i pH koje su potrebne za razvoj mikroorganizama. Zbog toga je neophodno dodatno ispitati i usaglasiti predložene vrednosti imajući u vidu i da su a_w i pH-vrednost samo neki od faktora koji mogu uticati na razvoj mikroorganizama.

- ✓ Većina pčelara u Srbiji tradicionalno obavlja sušenje uzoraka polena na otvorenom, u hladu, što bi trebalo izbegavati jer osim povišenog sadržaja vlage i a_w -vrednosti mnogo veći problem predstavlja potencijalni razvoj mikroba.
- ✓ Na osnovu rezultata analize prisustva plesni utvrđeno je da je deset od dvadeset šest ispitivanih uzoraka bilo kontaminirano jednim od šest rodova plesni (*Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp.) pri čemu je prisustvo plesni iz roda *Trichoderma* po prvi put utvrđeno u polenu. Osim toga, u dva uzorka je izolovana plesan *Aspergillus flavus*. Poređenjem vrednosti brojnosti kolonija sa dostupnim, argentinskim, pravilnikom o mikrobiološkoj ispravnosti polena (u našem pravilniku nije definisana gornja granica dozvoljenog prisustva plesni) utvrđeno je da se za dva uzorka može reći da su imali povišenu kontaminaciju plesnima. Poređenjem botaničkog porekla uzoraka i prisustva plesni u njima nije bilo moguće utvrditi direktnu povezanost.
- ✓ Na osnovu rezultata mikotoksikološke analize utvrđeno je da su svi uzorci bili kontaminirani aflatoksinom B1 kao jednim od najopasnijih produkata metabolizma određenih vrsta plesni. Potrebno je naglasiti i da postepena promena klime na našem području čini sveukupnu hranu izloženijom i podložnijom dejstvu mikroba, a samim time i pojavom mikotoksina u njoj. Iako su dobijeni rezultati pokazali da je većina uzoraka polena bila sterilna i bez prisustva plesni, činjenica da je u svim uzorcima utvrđeno prisustvo aflatoksina B1 potvrđuje ispravnom pretpostavku iznetu u okviru ove disertacije da bi bilo neophodno, kao deo standardne mikrobiološke analize polena, uvesti i mikotoksikološku analizu uzoraka.

VI LITERATURA

- Acuña P C S., González H G J., Torres D A I (2012) **Physicochemical characteristics and functional properties of vitabosa (*Mucuna deeringiana*) and soybean (*Glycine max*);** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(1): 98-105. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000007>
- Agarwal A., Nair K K P (1989) **Free and protein-bound amino acids of pollen of acacia auriculaeformis (Mimosaceae);** *Grana*, 28(2): 155-157. <http://dx.doi.org/10.1080/00173138909429968>
- Aitzmüller K (1993) **Capillary GLC fatty acid fingerprints of seed lipids – a tool in plant chemotaxonomy;** *Journal of High Resolution Chromatography*, 16(8): 488-490. <http://dx.doi.org/10.1002/jhrc.1240160809>
- Almaraz Abarca N., Campos da Graça M., Ávila-Reyes J A., Naranjo-Jiménez N., Corral J H., González-Valdez L S (2007) **Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee – collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae);** *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2): 119-124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.001>
- Almaraz-Abarca N., Campos G M., Ávila-Reyes A J., Naranjo-Jiménez N., Herrera-Corral J., González-Valdez S L (2004) **Variability of antioxidant activity among honeybee – collected pollen of different botanical origin;** *Interciencia (Comunicaciones Reports)*, 29(10): 574-578. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33909706>
- Almeida-Muradian B L., Pamplona C L., Coimbra S., Ortrud B M (2005) **Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets;** *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1): 105-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>
- AOAC (1997) **Official methods of analysis 16th edition;** Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Atkin L S., Barrier S., Cui Z., Fletcher I D P., Mackenzie G., Panel V., Sol V., Zhang X (2011) **UV and visible light screening by individual sporopollenin exines derived from *Lycopodium clavatum* (club moss) and *Ambrosia trifida* (giant ragweed);** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 102(3): 209–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.005>
- Auclair L J., Jamieson A C (1948) **A qualitative analysis of aminoacids in pollen collected by bees;** *Science*, 108(2805): 357-358. <http://www.jstor.org/stable/1677287>
- Bağcı E., Bruehl L., Aitzmüller K., Altan Y (2003) **A chemotaxonomic approach to the fatty acid and tocopherol content of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae);** *Turkish Journal of Botany*, 27(2): 141-147. <http://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-03-27-2/bot-27-2-7-0203-5.pdf>
- Barać M., Pešić M., Kostić A (2015) **Bioški aktivne komponente hrane,** Poljoprivredni fakultet, Beograd, 143-152.
- Barać M B., Pešić M B., Stanojević S P., Kostić A Ž., Bivolarević V (2015) **Comparative study of the functional properties of three legume seed isoates: adzuki, pea and soy bean;** *Journal of Food Science and Technoogy*, 52(5): 2779-2787. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-014-1298-6>

- Barać M., Čabrilo S., Pešić M., Stanojević S., Žilić S., Maćej O., Ristić N (2010) **Profile and functional properties of seed proteins from six Pea (*Pisum sativum*) genotypes**; *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12): 4973-4990. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms11124973>
- Barać M., Pešić M., Žilić S., Stanojević S (2014) **Proteinski proizvodi od soje**, Poljoprivredni fakultet, Beograd, pp. 133.
- Barajas J., Cortes-Rodriguez M., Rodríguez-Sandoval E (2012) **Effect of temperature on the drying process of bee pollen from two zones of Colombia**; *Journal of Food Process Engineering*, 35(1): 134-148. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00577.x>
- Barskaya E I., Balina N V (1971) **Role of callose in plant anthers**; *Fiziologija rastenij (Russian Journal of Plant Physiology)*, 18(4): 605-610. <http://link.springer.com.proxy.kobson.nb.rs:2048/journal/11183>
- Barth M O., Freitas S A., Oliveira S E., Silva A R., Maester M F., Andrella R S R., Cardozo M B Q G (2010) **Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization**; *Anais de Academia Brasileira de Ciências*, 82(4): 893-902. <http://www.scielo.br/pdf/aabc/v82n4/11.pdf>
- Bartosz G (1997) **Oxidative stress in plants**; *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(1): 47-64. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-997-0022-9>
- Basim E., Basim H., Özcan M (2006) **Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens**; *Journal of Food Engineering*, 77(4): 992-996. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.027>
- Bastos H M D., Barth O M., Rocha I C., Cunha S B I., Carvalho O P., Torres S A E., Michelan M (2004) **Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of Sao Paulo and Minas Gerais, Brazil**; *Journal of Apicultural Research*, 43(2): 35-39. <http://www.ibrabee.org.uk/index.php/ibra-bee-research-journals-publications/jar/item/299>
- Belitz H-D., Grosh W., Schieberle P (2009) **Food Chemistry** (4th revised and extended Edition). Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, Germany. pp 3-5. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Bilisik A., Cakmak I., Bicakci A., Malyer H (2008) **Seasonal variation of collected pollen loads of honeybees (*Apis mellifera L. anatoliaca*)**; *Grana*, 47(1): 70-77. <http://dx.doi.org/10.1080/00173130801923976>
- Bogdanov S (2012) **Pollen: Collection, Harvest, Composition, Quality**; *Bee Product Science (The Pollen book)*, chapter 1. www.bee-hexagon.net
- Bolkan A H., Reinert R W (1994) **Developing and implementing IPM strategies to assist farmers: an industry approach**; *Plant Disease*, 78(6): 545-55. http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Articles/PlantDisease78n06_545.pdf
- Bošnjak D., Rodić V., Munćan P (2012) **Soybean acreages needed to satisfy consumption of basic livestock products in Serbia**; *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18(4): 539-544. <http://www.agrojournal.org/18/04-10-12.pdf>

- Boye J., Zare F., Pletch A (2010) **Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed**; *Food Research International*, 43(2): 414-431.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Bradford M M (1976) **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**; *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brasil, *Ministério da agricultura*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. Instrução Normativa No 3, de 19 de janeiro de 2001. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**.
<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>
- Brindza J., Gróf J., Bacigálová K., Ferienc P., Tóth D (2010) **Pollen microbial colonization and safety**. *Acta Chimica Slovaca*, 3(1): 95-102. http://www.acs.chtf.stuba.sk/papers/acs_0061.pdf
- Bucher E., Kofler V., Vorwohl G., Zieger E (2004) **Das pollenbild der sudtiroler honige**; *Landesagentur für Umwelt und Arbeitsschutz*, Biologisches Labor., pp. 677.
- Burgess LW., Summerell B A., Bullock S., Gott K P., Backhouse D. (1994) **Laboratory Manual for Fusarium Research**. Third edition. Fusarium Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Sydney, p. 133
- Campos G R M., Bogdanov S., Almeida – Muradian B L., Szczesna T., Mancebo Y., Frigerio C., Ferreira F (2008) **Pollen composition and standardisation of analytical methods**; *Journal of Apicultural Research*, 47(2): 154–161. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.47.2.12>
- Campos Graça M., Frigerio C., Lopes J., Bogdanov S (2010) **What is a future of bee-pollen?**; *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2(4): 131-144. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.4.02.4.01>
- Campos M (1997) **Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas**. PhD thesis. Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Campos M G., Markham K R., Mitchell K A., da Cuhna A P (1997) **An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid / phenolic profiles**; *Phytochemical Analysis*, 8(4): 181-185.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199707\)8:4<181::AID-PCA359>3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199707)8:4<181::AID-PCA359>3.0.CO;2-A)
- Campos M G., Webby R F., Markham K R., Mitchell K A., da Cuhna A P (2003) **Age – induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 742-745. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0206466>
- Carpes T S., Cabral S R I., Luz P F C., Capelleti P J., Alencar M S., Masson L M (2009) **Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the southern region of Brazil**; *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(3-4): 667–673. <http://world-food.net/category/journals/2009/>

- Carpes T S., Mourão B G., de Alencar M S., Masson L M (2009) **Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil**; *Brazilian Journal of Food Technology*, 12(3): 220–229. <http://dx.doi.org/10.4260/BJFT2009800900016>
- Carpes T., Cabral I., Rosalen P. L., Matias de Alencar S., Masson M. L (2009) **Caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen apícola da região sul do Brasil**; *Alimentos e Nutrição Araraquara (Brazilian Journal of Food and Nutrition)*, 20(2): 271–277.
<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/1057/808>
- Cascio L G., Dalle Carbonare L., Maccacaro L., Caliarì F., Ligozzi M., Cascio L V., Fontana R (2007) **First case of bloodstream infection due to *Candida magnoliae* in Chinese oncological patient**; *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10): 3470–3473. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00934-07>
- Cheikh-Rouhou S., Besbes S., Hentati B., Blecker C., Deroanne C., Attia H (2007) ***Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction**; *Food Chemistry*, 101(2): 673–681.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.022>
- Chiasson L-J., Aris-Jilwan N., Bélanger R., Bertrand S., Beauregard H., Ékoé M-J., Fournier H., Havrankova J (2003) **Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hypersmolar state**; *CMAJ JAMC*, 168(7): 859–866. <http://www.cmaj.ca/content/168/7/859.full.pdf+html>
- Chinn R Y., Diamond R D (1982) **Generation of chemotactic factors by *Rhizopus oryzae* in the presence and absence of serum: relationship to hyphal damage mediated by human neutrophils and effects of hyperglycemia and ketoacidosis**; *Infection and Immunity*, 38(3): 1123–1129.
<http://iai.asm.org/content/38/3/1123>
- Clark C J., Lintas C (1992) **Chemical composition of pollen from kiwifruit vines**; *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 20(3): 337–344. <http://dx.doi.org/10.1080/01140671.1992.10421776>
- Collin S., Vanhavre Th., Odart E., Bouseta A (1995) **Heat treatment of pollens: Impact on their volatile flavor constituents**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(2): 444–448.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf00050a035>
- Coronel B B., Grasso D., Perreira C S., Fernández G (2004) **Caracterización bromatológica del polen apícola argentino**; *Cienica, Docencia y Tecnología*, XV(29): 145–181.
<http://www.redalyc.org/pdf/145/14502906.pdf>
- Dadd R H (1973) **Insect nutrition: Current developments and metabolic implications**; *Annual Review of Entomology*, 18(1): 381–420. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.18.010173.002121>
- Dalgleish G D (2004) **Food Emulsions: Their structures and structure forming-properties**; *In Food Emulsions*, Eds.: Friberg E. S, Larsson K, Sjöblom, Marcel Dekker Inc., NY, USA: 1–44.
- Dalgleish G D (2006) **Food Emulsions - Their structures and structure forming-properties**; *Food Hydrocolloids*, 20(4): 415–422. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.10.009>

- Damodoran S (1997) **Food Proteins: An overview**. In *Food proteins and their application* (4th edition). Eds.: Friberg S. i Larsson K., Marcel Dekker Inc., New York, USA: 1-59.
- Day S., Beyer R., Mercer A., Ogden S (1990) **The nutrient composition of honeybee – collected pollen in Otago, New Zealand**; *Journal of Apicultural Research*, 29(3): 138-146.
<http://www.ibra.org.uk/articles/Nutrient-composition-of-pollen>
- de Leeuw W J., Versteegh M J G., van Bergen F P (2006) **Biomacromolecules of algae and plants and their fossil analogues**; *Plant Ecology*, 182(1-2): 209–233. <http://dx.doi.org/10.1007/s11258-005-9027-x>
- deGoot P A (1953) **Protein and amino acids requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.)**; *Physiologia Comparata et d'Ecologia*, 3: 197–285.
<http://194.47.52.113/janlars/partnerskapalnarp/ekonf/20130516/deGroot1953.pdf>
- Di Paola-Naranjo R D., Sánchez S J., Paramás A M G., Gonzalo J C R (2004) **Liquid chromatographic – mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium Plantagineum***; *Journal of Chromatography A*, 1054(3): 205-210.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.023>
- Dickinson E (2009) **Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers**, *Food Hydrocolloids*, 23(6): 1473-1482. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- Dobson M E H (1988) **Survey of pollen and pollenkitt lipids-chemical cues to flower visitors?**; *American Journal of Botany*, 75(2): 170–182. <http://www.jstor.org/stable/2443884>
- Domijan M-A (2012) **Fumonizin B1: neurotoksični mikotoksin**. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 63(4): 531-543. <http://dx.doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2239>
- Domínguez-Valhondo D., Bohoyo Gil D., Hernández T M., González-Gómez D (2011) **Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritonal properties of honeybee-collected pollen**; *International Journal of Food Science & Technology*, 46(10): 2204–2211.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02738.x>
- Eaton D L., Gallager E P (1994) **Mechanism of aflatoxin carcinogenesis**. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34: 135-172. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pa.34.040194.001031>
- EC No. 1881/2006 **Commission Regulation of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs**.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>
- Elizalde E B., Bartholomai B G., Pilosof M R A (1996) **The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins**; *LWT – Food Science and Technology*, 29(4): 334-339. <http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1996.0050>
- Elser E., Ganzmüller (1931) **Die chemische Zusammensetzung einiger Blütenstaubarte**; *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 194(1-2): 21-32. <http://dx.doi.org/10.1515/bchm2.1931.194.1-2.21>

- Eschrich W (1956) **Kallose**; *Protoplasma*, 47 (3-4): 487-530.
<http://link.springer.com.proxy.kobson.nb.rs:2048/journal/709/47/3/page/1>
- Estevinho L M., Rodrigues S., Pereira A P., Feás X (2012) **Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation**; *International Journal of Food Science & Technology*, 47(2): 429-435. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02859.x>
- FAO (2002) **Food energy- methods of analysis and conversion factors**; *FAO food and nutrition paper (report of technical workshop)*, 77: 57-60. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y5022e/y5022e00.pdf>
- Feás X., Vásquez-Tato M P., Estevinho L., Seijas J A., Iglesias A (2012) **Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality**; *Molecules*, 17(7): 8359-8377. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17078359>
- Ferrerres F., Llorach R., Gil-Izquierdo A (2004) **Characterization of the interglycosidic linkage in di -, tri -, tetra - and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry**; *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3): 312-321. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.586>
- Ferrerres F., Pereira D M., Valentão P., Andrade P B (2010) **First report of non-coloured flavonoids in *Echium plantagineum* bee pollen : differentiation of isomers by liquid chromatography / ion trap mass spectrometry**; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(6): 801-806.
<http://dx.doi.org/10.1002/rcm.4454>
- Fling S P., Gregerson D S (1986) **Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity TRIS buffer system without urea**; *Analytical Biochemistry*, 155(1): 83-88.
[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90228-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(86)90228-9)
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). **Amino acid requirements and scoring pattern**. In *Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition*; FAO/WHO Food and Nutrition Paper, Rome, Italy, 2013, Vol 92, pp 11. <http://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>
- Franchi G G., Franchi G., Corti P., Pompella A (1997) **Microspectrophotometric evaluation of digestibility of pollen grains**; *Plant Foods for Human Nutrition*, 50(2): 115 - 126. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02436031>
- Frey-Wyssling A., Epprecht W., Kessler G (1957) **Zur charakterisierung der siebröhren-kallose**; *Experientia*, 13 (1): 22-23. <http://link.springer.com/journal/18/13/1/page/1>
- Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen H P (1996) **Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin**; *Water Research*, 30(8): 1749-1758.
[http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00323-1](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(95)00323-1)
- Gajić M., Vilotić D., Obratov-Petković D (2003) **Botanika (šumska botanika) za I i II razred šumarske i drvoprerađivačke škole** (IV prerađeno izdanje); Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.

- GB/T19330-2003, **Product of designations of origin or geographical indication-Raohe (Northeast-China black bee) honey, royall jelly, propolis, bee pollen (in Chinese)**. *General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China*, Beijing, China.
<http://www.chinesestandard.net/PDF-English-Translation/GBT19330-2008.html>
- Gergen I., Radu F., Bordean D., Isengard D-H (2006) **Determination of water content in bee's pollen samples by Karl Fisher titration**; *Food Control*, 17(3): 176-179.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.018>
- Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N (2011) **Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human**; *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31): 6697-6703.
<http://dx.doi.org/10.5897/JMPR11.1404>
- Gill I., Valivety R (1997) **Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications**; *Trends in Biotechnology*, 15(10): 401-409. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01076-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01076-7)
- Gilliam M (1979a) **Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts**; *Apidologie*, 10(1): 43-53.
http://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1979/01/Apidologie_0044-8435_1979_10_1_ART0006.pdf
- Gilliam M (1979b) **Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus***; *Apidologie*, 10(3): 269-274.
http://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1979/03/Apidologie_0044-8435_1979_10_3_ART0004.pdf
- Gilliam M., McCaughey W F., Wintermute B (1980) **Amino acids in pollens and nectars of citrus cultivars and in stored pollen and honey from honeybee colonies in citrus groves**; *Journal of Apicultural Research*, 19(1): 64-72.
<http://www.cabdirect.org/abstracts/19800210688.html;jsessionid=9C9EB3EB43474BC63CE3C0AD0D61D12C>
- González G., Hinojo J M., Mateo R., Medina A., Jiménez M (2005) **Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen**; *International Journal of Food Microbiology*, 105(1): 1-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.001>
- Guil J L., Torija M E., Giménez J J., Rodríguez I (1996) **Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography**; *Journal of Chromatography A*, 719(1): 229-235. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00414-9](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(95)00414-9)
- Hani B., Dalila B., Saliha D., Daoud H., Mouloud G., Seddik K (2012) **Microbiological sanitary aspects of pollen**; *Advances in Environmental Biology*, 6(4): 1415-1420.
<http://www.aensiweb.com/old/aeb/2012/1415-1420.pdf>
- Herbert W., Shimanuki H (1978) **Chemical composition and nutritive value of bee - collected and bee - stored pollen**; *Apidologie*, 9(1): 33-40.
http://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1978/01/Apidologie_0044-8435_1978_9_1_ART0003.pdf
- Hertog M G L., Hollman P C H., Venema D P (1992) **Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9): 1591-1598. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00021a023>

- Heyl W F., Hopkins H H (1920) **The ragweed pollen proteins**; *American Chemical Society Journal*, 42(8): 1738-1743. <http://dx.doi.org/10.1021/ja01453a026>
- Heywood A A., Myers J D., Bailey B T., Johnson A L (2002) **Functional properties of low-fat soy flour produced by an extrusion-expelling system**; *JAOCs – Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(12): 1249-1253. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-002-0635-y>
- Holbrook L A., Magus J R., Taylor D C (1992) **Abcisic acid induction of elongase activity, biosynthesis and accumulation of very long chain monounsaturated fatty acids and oil body proteins in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv Reston**; *Plant Science*, 84(1): 99-115. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90213-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(92)90213-6)
- Horn H (1985) **Die waldtrachtkrankheit der honigbiene: der einfluß des mineralstoffgehaltes in honigtauhonigen**; *Apidologie*, 16(2): 139-156. http://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1985/02/Apidologie_0044-8435_1985_16_2_ART0004.pdf
- House H L (1961) **Insect nutrition**; *Annual Review of Entomology*, 6(1): 13-26. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.06.010161.000305>
- Hugel M F (1962) **Étude de quelques constituants du pollen**; *Annals de Abeille (Apidologie)*, 5(1): 97-133. http://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1962/02/Ann.Abeille_0044-8435_1962_5_2_ART0001.pdf
- Hugel M F., Witter W., Audier H., Barbier M., Lederer E (1964) **Analyse des sterols du pollen par spectrometrie de masse**; *Phytochemistry*, 3(1): 7-16. http://ac.els-cdn.com/S0031942200839886/1-s2.0-S0031942200839886-main.pdf?_tid=85e05c4c-3418-11e4-827c-00000aab0f6b&acdnat=1409824245_de04ea44afca451a036936bef8d873a9
- Human H., Nicolson S W (2006) **Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greebii* var. *davyana*(*Asphodelaceae*)**; *Phytochemistry*, 67(14): 1486-1492. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.phytochem.2006.05.023>
- Jakobs C., Jaeken J., Gibson K M (1993) **Inherited disorders of GABA metabolism**, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 16(4), 704-715. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00711902>
- Jenkins B., West J A., Koulman A (2015) **A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15:0) and heptadecanoic acid (C17:0) in health and disease**; *Molecules*, 20(2): 2425-2444. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20022425>
- Jovanovic V S., Steenken S., Tomic M., Marjanovic B., Simic G M (1994) **Flavonoids as antioxidants**; *Journal of American Chemical Society*, 116(11): 4846-4851. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00090a032>
- Kačaniová M., Juráček M., Chlebo R., Kňazovická V., Kadasi-Horáková M., Kunová S., Lejková J., Haščík P., Mareček J., Šimko M (2011) **Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia**; *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 46(7): 623-629. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2011.589322>

- Kacániová M., Vuković N., Chlebo R., Haščik P., Rovná K., Cubon J., Džugan M., Pasternakiewicz A (2012) **The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia**; *Archives of Biological Sciences - Belgrade*, 64(3): 927-934. <http://dx.doi.org/10.2298/ABS1203927K>
- Kakihara F., Kato M., Tokumasu S (1988) **Relationship between pollen degeneration and amino acids, especially proline, in male-sterile Japanese radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* Bailey)**; *Scientia Horticulturae*, 36(1-2): 17-23. http://ac.els-cdn.com/0304423888900039/1-s2.0-0304423888900039-main.pdf?_tid=e56e1798-2c44-11e4-9412-00000aab0f26&acdnat=1408963694_e3e59c988349d3bd1c6c6e80455beedd
- Karrer P., Leumann E (1951) **Carotinoide aus den pollen von *Cyclamen persicum***; *Helvetica Chimica Acta*, 34(5): 1412-1414. <http://dx.doi.org/10.1002/hlca.19510340525>
- Kauffeld M N (1980) **Chemical analysis of Louisiana pollen and colony conditions during a year**; *Apidologie*, 11(1): 47-55. http://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1980/01/Apidologie_0044-8435_1980_11_1_ART0006.pdf
- Keller I., Fluri P., Imdorf A (2005) **Pollen nutrition and colony development in honey bees Part I**; *Bee World*, 86(1): 3-10. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.2.86.1.02>
- Keller I., Fluri P., Imdorf A (2005) **Pollen nutrition and colony development in honey bees Part II**; *Bee World*, 86(2): 27-34. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.2.86.2.02>
- Kievits J (2007) **Bee gone: colony collapse disorder**; *Pesticide News*, 76: 3-5. <http://www.pan-uk.org/pestnews/Issue/pn76/pn76%20p3-5.pdf>
- Kinsella J E (1982) **Relationship between structure and functional properties of food proteins**; *Food Proteins*, eds.: Fox F P., Condon E J., Applied Science Publishers, London, UK: 51-103. <http://books.google.rs/books?hl=sr&lr=&id=uFaUueWsD98C&oi=fnd&pg=PA51&dq=Kinsella+J+E+%281982%29+Relationship+between+structure+and+functional+properties+of+food+proteins%3B+Food+Proteins,&ots=codaJpaOpp&sig=3wGkeB7Xeh-RfdMu5dB6w7ieGI8#v=onepage&q=Kinsella%20J%20E%20%281982%29%20Relationship%20between%20structure%20and%20functional%20properties%20of%20food%20proteins%3B%20Food%20Proteins%2C&f=false>
- Kinsella J E., Melachouris N (1976) **Functional properties of proteins in food**; *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 7(3): 219-280. <http://dx.doi.org/10.1080/10408397609527208>
- Kleinschmidt G J., Kondos A. C., Harden J., Turner J W (1974) **Colony management for *Eucalypt* honey flows**; *The Australian Beekeeper*, 75(May 1974): 261-264. <http://www.theabk.com.au/issues>
- Kojić M (1989) **Botanika**, Naučna knjiga, Beograd.
- Krejci M R., Finney L., Vogt S., Joester D (2011a) **Selective sequestration of strontium in desmid green algae by biogenic co-precipitation with barite**. *SusChemSus*, 4(4): 470-473. <http://dx.doi.org/10.1002/cssc.201000448>

- Krejci M R, Wasserman B., Finney L., McNulty I., Legnini D., Vogt S., Joester D (2011b) **Selectivity in biomineralization of barium and strontium.** *Journal of Structural Biology*, 176(2): 192-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2011.08.006>
- Krell R (1996) **Value-added products from Beekeeping.** *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome *FAO Agricultural Services Bulletin*, 124: 87-113. http://apiardeal.ro/biblioteca/Bibliografie%20universala/EN_-_Value_added_products_from_beekeeping_-_395_pag.pdf
- Kroyer G., Hegedus N (2001) **Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement;** *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(3): 171-174. [http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564\(01\)00039-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564(01)00039-X)
- Krystyjan M., Gumul D., Ziobro R., Korus A (2015) **The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits.** *LWT - Food Science and Technology*, 63(1): 640-646. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.075>
- Kuntz I D Jr., Kauzmann W (1974) **Hydratation of proteins and polypeptides: Review,** *Advances in Protein Chemistry*, 28: 239-345. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60232-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60232-6)
- Laaidi M., Thibaudon M., Besancenot J-P (2003) **Two statistical approaches to forecasting the start and duration of the pollen season of *Ambrosia* in the area of Lyon (France);** *International Journal of Biometeorology*, 48(2): 65-73. <http://dx.doi.org/10.1007/s00484-003-0182-2>
- Lakemond C M M., de Jongh H H J., Hessing M., Gruppen H., Voragen A G (2000) **Heat denaturation of soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on molecular structure;** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6): 1991-1995. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9908704>
- Larson A R (1988) **The antioxidants of higher plants;** *Phytochemistry*, 27(4): 969-978. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80254-1](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(88)80254-1)
- Le Blanc B W., Davis O K., Boue S., DeLucca A., Deeby T (2009) **Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen;** *Food Chemistry*, 115(4): 1299-1305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.055>
- Lebedeva V P., Irenkova H V., Lebedev V I (2001) **Поведение пчел при сборе и использовании уду,** *Пчеловодство*, No 7. <http://www.beejournal.ru/>
- Lee H K., Ryu S H., Rhee C K (2003) **Protein solubility characteristics of commercial soy protein products;** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(1): 85-90. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-003-0656-6>
- Lee K H., Ryu H S., Rhee K C (2003) **Protein solubility characteristics of commercial soy protein products;** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(1): 85-90. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-003-0656-6>
- Leiss A K., Maltese F., Choi H Y., Verpoorte R., Klinkhamer G L P (2009) **Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for Thrips in *Chrysanthemum*;** *Plant Physiology*, 150(3): 1567-1575. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.138131>

- Leja M., Mareczek A., Wyzgolik G., Klepacz-Baniak J., Czekońska K (2007) **Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species**; *Food Chemistry*, 100(1): 237-240.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047>
- Lever M (1972) **A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates**; *Analytical Biochemistry*, 47: 273-279. http://ac.els-cdn.com/0003269772903016/1-s2.0-0003269772903016-main.pdf?_tid=df4a273e-31c2-11e4-b068-00000aab0f26&acdnat=1409567556_feb6f7b319cbc5531d92433518c3c4bf
- Liang M., Zhang P., Shu X., Liu C., Shu J (2013) **Characterization of pollen by MALDI-TOF lipid profiling**; *International Journal of Mass Spectrometry*, 334: 13-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2012.09.007>
- Loper M G, Standifer N L., Thompson J M., Gilliam M (1980) **Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread**; *Apidologie*, 11(1): 63-73.
http://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1980/01/Apidologie_0044-8435_1980_11_1_ART0008.pdf
- Lopez Alonso D., Garcia Maroto F (2000) **Plants as chemical factories for the production of polyunsaturated fatty acids**; *Biotechnology Advances*, 18(6): 481-497. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00048-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00048-3)
- Mačukanović-Jocić M (2010) **Biologija medonosnog bilja sa atlasom apiflore Srbije**, Poljoprivredni fakultet, Beograd
- Magan N., Lacey J (1984) **Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi**; *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1): 71-81. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80213-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80213-2)
- Magan N., Olsen M (2004) **Mycotoxins in Food: Detection and control**. CRC Press Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, MA, USA
- Makarenko S P., Konstantinov Y M., Khotimchenko S V., Konenkina T A., Arziev A Sh (2003) **Fatty acid composition of mitochondrial membrane lipids in cultivate (*Zea mays*) and wild (*Elymus sibiricus*) grasses**; *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(4): 487-492.
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1024716606132>
- Maletkovic J., Drexler A (2013) **Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state**; *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 42(4): 677-695. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2013.07.001>
- Mangin L (1889) **Observations sur la membrane du grain de pollen mûr**; *Bulletin de La Societe Botanique de France*, 36: 274-284. <http://www.botanicus.org/item/31753002245097>
- Manning R (2001) **Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees**; *Bee World*, 82(2): 60-75. http://www.ibra.org.uk/articles/20090428_39
- Mărghitas L A., Stanciu O G., Dezmirean D S., Bobiș O., Popescu O., Bogdanov S., Campos M G (2009) **In vitro antioxidant capacity of honeybee - collected pollen of selected floral origin harvested from Romania**; *Food Chemistry*, 115(3): 878-883. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.014>

- Markowicz Bastos H D., Bart O M., Rocha I C., da Silva Cuhna B I., de Oliveira Carvalho P., Silva Torres A E., Michelin M (2004) **Fatty acid composition and palynological analysis of bee (Apis) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil**; *Journal of Apicultural Research*, 43(2): 35-39.
http://www.ibra.org.uk/articles/20080612_133
- McCaughey F W., Gilliam M., Standifer N L (1980) **Amino acids and protein adequacy for honey bees of pollens from desert plants and other floral sources**; *Apidologie*, 11(1): 75-86.
http://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1980/01/Apidologie_0044-8435_1980_11_1_ART0009.pdf
- Meichik R N., Matveyeva N P., Nikolaeva I Yu (2006) **Features of ionogenic group composition in polymeric matrix of lilly pollen wall**; *Biochemistry (Moscow)*, 71(8): 893-899.
<http://dx.doi.org/10.1134/S0006297906080116>
- Melo I L P., Almeida-Muradian L B (2011) **Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(1): 194-197.
<http://www.scielo.br/pdf/cta/v31n1/29.pdf>
- Minuataegui S., Sancho T M., López J., Huidobro F J, Simal J (1990) **Determination of carotens from bee-collected pollen by high performance liquid chromatography**; *Journal of Apicultural Research*, 29(3): 147-150. <http://www.ibra.org.uk/articles/Carotenes-in-pollen>
- Modro F H A., Message D., Luz F P C, Neto A A M J (2007) **Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais**; *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(8): 1057-1065.
<http://www.scielo.br/pdf/pab/v42n8/a01v42n8.pdf>
- Modro F H A., Silva C I., Luz F P C., Message D (2009) **Analysis of pollen load based on color, physicochemical composition and botanical source**; *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(2): 281-285. <http://www.scielo.br/pdf/aabc/v81n2/v81n2a14.pdf>
- Mongrand S., Bessoule J J., Cabantous F., Cassagne C (1998) **The C_{16:3}/C_{18:3} fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species**; *Phytochemistry*, 49(4): 1049-1064.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00243-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00243-X)
- Moore P D., Webb J A (1978); *An Illustrated Guide to Pollen Analysis*, Hodder & Stoughton, London, pp. 133.
- Morais M., Moreira L., Feás X., Estevinho M L (2011) **Honeybee - collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity**; *Food and Chemical Toxicology*, 49(5): 1096-1101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.020>
- Moreira L., Dias L G., Pereira J A., Estevinho L (2008) **Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal**; *Food and Chemical Toxicology*, 46(11): 3482-3485.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025>
- Morgano A M., Milani F R., Martins T C M., Rodriguez-Amaya B D (2011) **Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fisher titration**; *Food Control*, 22(10): 1604-1608.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.03.016>

- Morgano M A, Teixeira Martins M C., Rabonato L C., Milani R F., Yotsuyanagi K., Rodriguez – Amaya D B (2012) **A comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: Geographic and seasonal variations and contribution to human diet**; *Journal of Brazilian Chemical Society*, 23(4), 727-736. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012000400019>
- Morgano M A, Teixeira Martins M C., Rabonato L C., Milani R F., Yotsuyanagi K., Rodriguez – Amaya D B (2010) **Inorganic contaminants in bee pollen from Southeastern Brazil**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6876-6883. <http://dx.doi.org/10.1021/jf100433p>
- Moss M O (1996) **Mycotoxins**. *Mycological Research*, 100(5): 513-526. [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80001-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80001-3)
- Moss M O (1998) **Recent studies of mycotoxins**. *Journal of Applied Microbiology (Symposium supplement)*, 84(S1): 62S-76S. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.0840s162S.x>
- Moure A., Sineiro J., Domínguez P., Parajó J C (2006) **Functionality of oilseed protein products: A review**; *Food Research International*, 39(9): 945-963. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.07.002>
- Muma I K M., Chipalo-Mutati G (2010) **Deadly orbital mucormycosis, rare yet possible infection**. *Medical Journal of Zambia*, 37(4): 268-272. <http://www.ajol.info/index.php/mjz/article/viewFile/76434/66891>
- Mutsaers M., Blitterswijk H., Leven L., Kerkvliet J., Waerdt J (2005) **Bee products. Properties, processing and marketing**. Agromisa Foundation, Wageningen, Netherlands. http://journeytoforever.org/farm_library/AD42.pdf
- Nagai T., Inoue R., Suzuki N., Tanoue Y., Kai N., Nagashima T (2007) **Antihypertensive activities of enzymatic hydrolysates from honey-bee collected pollen of *Cistus ladaniferus***; *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 5(3-4): 86-89. http://world-food.net/download/journals/2007-issue_3_4/f16.pdf
- Nicolson S W., Human H (2013) **Chemical composition of the "low quality" pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae)**; *Apidologie*, 44(2): 144-152. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-012-0166-5>
- Nielsen N., Grömmér J., Lundén R (1955) **Investigation on the chemical composition of pollen from some plants**; *Acta Chemica Scandinavica*, 9: 1100-1106. <http://dx.doi.org/10.3891/acta.chem.scand.09-1100>
- Nilüfer D.; Boyacıoğlu D (2002) **A comparative study of three different methods for the determinations of aflatoxins in Tahini**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): 3375-3379. <http://dx.doi.org/10.1021/jf020005a>
- Niu G., Johnson M R., Berenbaum R M (2011) **Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis**. *Apidologie*, 42(1): 79-87. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010039>
- Nogueira C., Iglesias A., Feás X., Estevinho L M (2012) **Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach**; *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9): 11173-11187. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms130911173>

- Odoux F-J, Feuillet D, Aupinel P, Loublier Y, Tasei N-J, Mateescu C (2012) **Territorial biodiversity and consequences on physic-chemical characteristics of pollen collected by honey bee colonies**; *Apidologie*, 43(9): 561-575. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-012-0125-1>
- Oldroyd P B (2007) **What's killing American honey bees?**; *PLOS Biology*, 5(6): e168 (1195-1199). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0050168>
- Orzáez Villanueva M T, Díaz Marquina A, Bravo Serrano R, Blázquez Abellán G (2002) **The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition**; *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 53(3): 217-224. <http://dx.doi.org/10.1080/09637480220132832>
- Orzáez Villanueva M T, Díaz Marquina A, Bravo Serrano R, Blázquez Abellán G (2001) **Mineral content of commercial pollen**; *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52(3): 243-249. <http://dx.doi.org/10.1080/09637480020027000-3-1>
- Osborne D W (2007) **Mysterious honeybee death leave sting on agriculture**; *FDA Veterinarian Newsletter*, XXII(III). <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDAVeterinarianNewsletter/ucm109421.htm>
- Oswalt M L, Marshall D G Jr (2008) **Ragweed as an example of worldwide allergen expansion**; *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 4(3): 130-135. <http://dx.doi.org/10.2310/7480.2008.00016>
- Paramás Gonzáles M A, Gómez Báez A J, Cerdón Marcos C, García-Vilanova J R, Sánchez Sánchez J (2006) **HPLC – fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen)**; *Food Chemistry*, 95(1): 148-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.008>
- Pearce N K, Kinsella E J (1978) **Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3): 716-723. <http://dx.doi.org/10.1021/jf60217a041>
- Pereira de Melo L I, de Almeida-Muradian B L (2010) **Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples**; *Quimica Nova*, 33(3): 514-518. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300004>
- Pešić B M (2011) **Biohemijske karakteristike i tehnološka funkcionalna svojstva termički i enzimski tretiranih mleka različitog porekla**; doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd: 31-41.
- Pham-Huy L, He H, Pham-Huy C (2008) **Free radicals and antioxidants**; *International Journal of Biomedical Science*, 4(2): 89-96. <http://www.ijbs.org/User/All-by-date.aspx>
- Phillips G L, Davis J M, Kinsella E J (1989) **The effect of various milk proteins on the foaming properties of egg white**; *Food Hydrocolloids*, 3(3): 163-174. [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(89\)80001-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(89)80001-3)
- Phillips G L, Whitehead M D, Kinsella E J (1994) **Structure-function properties of food proteins**; ed.: Taylor L S, Academic Press Inc., San Diego, California, USA: 25-178.
- Qian L W, Khan Z, Watson G D, Fearnley J (2008) **Analisis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry**; *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(1): 78-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2007.07.001>

- Rabie L A, Wells D J., Dent K L (1983) **The nitrogen content of pollen protein**; *Journal of Apicultural Research*, 22(2): 119-123. http://www.ibra.org.uk/articles/20121004_10
- Reille M (1995) **Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du nord**; *Laboratoire de Botanique et Palynologie*, Supplement 1, Marseille, pp. 328.
- Reille M (1998) **Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du nord**; *Laboratoire de Botanique et Palynologie*, Supplement 2, Marseille, pp. 523.
- Reille M (1999a) **Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du nord**; *Laboratoire de Botanique et Palynologie*, Index, Marseille, pp. 243.
- Reille M (1999b) **Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du nord**; *Laboratoire de Botanique et Palynologie*, Marseille, pp. 535.
- Reino J L., Guerrero R F., Hernandez-Galan R., Collado I G (2008) **Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma***. *Phytochemistry Reviews*, 7(1): 89-123. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-006-9032-2>
- Řezanka T., Sigler K (2009) **Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms**. *Progress in Lipid Research*, 48(3-4): 206-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2009.03.003>
- Riaz M N (2006) *Soy Applications in Foods*: 39-226, CRC Taylor and Francic, London, UK.
- Roulston H T., Cane H J., Buchmann L S (2000) **What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions or phylogeny?**; *Ecological Monographs*, 70(4): 617-643. <http://dx.doi.org/10.2307/2657188>
- Roulston T H., Cane J H (2000) **Pollen nutritional content and digestibility for animals**; *Plant Systematics and Evolution*, 222(1-4): 187-209. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00984102>
- Rozema J., Broekman R A., Lud D., Huiskes J H Ad., Moerdijk T., de Bakker N., Meijkamp B., van Beem A (2001) **Consequences of depletion stratospheric ozone for terrestrial Antarctic ecosystem: the response of *Deschampsia antarctica* to enhanced UV-B radiation in a controlled environment**; *Plant Ecology*, 154(1-2): 101-115. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1012956230160>
- Rustom I Y S (1997) **Aflatoxin in food: occurrence, legislation and inactivation by physical methods**. *Food Chemistry*, 59(1): 57-67. [http://dx.doi.org/1016/S0308-8146\(96\)00096-9](http://dx.doi.org/1016/S0308-8146(96)00096-9)
- Rzepecka-Stojko A., Pilawa B., Ramos P., Stojko J (2012a) **Antioxidative properties of bee pollen extracts examined by EPR Spectroscopy**; *Journal of Apicultural Science*, 56(1): 23-30. <http://dx.doi.org/10.2478/v10289-012-0003-0>
- Rzepecka-Stojko A., Stec M., Kurzeja E., Gawrońska E., Pawłowska-Goral K (2012b) **The effect of storage of bee pollen extracts on polyphenol content**; *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(4): 1007-1011. <http://www.pjoes.com/pdf/21.4/Pol.J. Environ. Stud. Vol.21.No.4.1007-1011.pdf>

- Saa-Otero P M., Díaz-Losada E., Fernández-Gómez E (2000) **Analysis of fatty acids, proteins and ethereal extract in honeybee pollen**; *Grana*, 39(4): 175-181. <http://dx.doi.org/10.1080/00173130051084287>
- Santiago B V P (2008) **Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los andes venezolanos**; *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(4): 411-415. <http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v58n4/art14.pdf>
- Sarmento Silva M T., Camara A C., da Silva Lins C A., Barbosa-Filho M J., Sarmento da Silva M E., Freitas M B., Ribeiro dos Santos A F (2006) **Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen polads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke**; *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7): 507-511. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.011>
- Schroeder A H., Tipton H I., Nason P A (1972) **Trace metals in man: strontium and barium**; *Journal of Chronic Diseases*, 25(9): 491-517. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681\(72\)90150-6](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681(72)90150-6)
- Schumaker T T S., Cristofolleti P T., Terra W R (1993) **Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae**; *Apidologie*, 24(1): 3-17. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19930101>
- Šerban N., Cvijan M., Jančić R (2013) **Biologija za I razred gimnazije i poljoprivredne škole** (IX izdanje); Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Serpen A., Capuano E., Fogliano V., Gökmen V (2007) **A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19): 7676-7681. <http://dx.doi.org/10.1021/jf071291z>
- Serra-Bonvehí J., Escolá Jordá R (1997) **Nutrient composition and microbiological quality of honeybee collected pollen in Spain**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3): 725-732. <http://dx.doi.org/10.1021/jf960265q>
- Serra-Bonvehí J., Torrentó S M., Lorente C E (2001) **Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee - collected pollen produced in Spain**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4): 1848-1853. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0012300>
- Shaw G., Yeadon A (1966) **Chemical studies on the constitution of some pollen and spore membranes**; *Journal of the Chemical Society C, Organic*: 16-22. <http://dx.doi.org/10.1039/J39660000016>
- Shawer B M., Ali M S., Abdellatif A M., El-Refai A A (1987) **Biochemical studies of bee-collected pollen in Egypt 2. Fatty acids and non-saponifiables**; *Journal of Apicultural Research*, 26(2): 133-136. <http://www.ibra.org.uk/articles/Biochemical-studies-of-bee-collected-pollen-in-Egypt-2-Fatty-acids-and-non-saponifiables>
- Singh B., Denning D W (2012) **Allergic bronchopulmonary mycosis due to *Alternaria*: Case report and review**. *Medical Mycology Case Reports*, 1(1): 20-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mmcr.2012.02.001>
- Službeni glasnik Republike Srbije 28/2011, **Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama kontaminata u hrani i hrani za životinje.**

- Službeni list SCG 45/2003, **Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za med, druge pčelinje proizvode, preparate na bazi meda i drugih pčelinjih proizvoda**. Službenom listu SCG, br. 45/2003 od 17.10.2003. godine, član 31. <http://faolex.fao.org/docs/pdf/srb130173.pdf>
- Smirnova V A, Timofeyev N K., Breygina M A., Matveyeva N P., Yermakov P I (2012) **Antioxidant properties of the pollen exine polymer matrix**; *Biophysics*, 57(2): 174–178. <http://dx.doi.org/10.1134/S0006350912020224>
- Smith M., Cecchi L., Skjøth A C., Karrer G., Šikoparija B (2013) **Common ragweed: a treat to environmental health in Europe**; *Environment International*, 61: 115-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.08.005>
- Snowdon J A., Cliver D O (1996) **Microorganisms in honey. Review article**. *International Journal of Food Microbiology*, 31(1-3): 1-26. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00970-1](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)00970-1)
- Somerville C D (2001) **Nutritional value of bee collected pollens**, Rural Industries Research & Development Corporation, NSW Agriculture, Kingston, Australia. <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/01-047>
- Somerville D C (2005) **Lipid content of honey-bee collected pollen from south-east Australia**; *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45(12): 1659-1161. <http://dx.doi.org/10.1071/EA03190>
- Somerville D C., Nicol H I (2002) **Mineral content of honeybee-collected pollen from southern New South Wales**; *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42(8): 1131-1136. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0206466>
- Somerville D C., Nicol I H (2006) **Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity**; *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(1): 141–149. <http://www.kobson.nb.rs.proxy.kobson.nb.rs:2048/teeal/Clanak.aspx?ID=109673>
- Stanciu O G., Mărghitas L A., Dezmirean D S., Campos M G (2011) **A comparision between the mineral content of flower and honeybee collected pollen of selected plant origin (*Helianthus annuus L.* and *Salix sp.*)**; *Romanian Biotechnological Letters*, 16(4): 6291-6296. <http://www.rombio.eu/rbl4vol16/1%200ltica%20Stanciu.pdf>
- Stanimirović Z., Soldatović B., Vučinić M (2000) **Biologija pčela - Medonosna pčela**, Veterinarski fakultet i Medicinska knjiga, Beograd. http://www.vet.bg.ac.rs/~biolog/images/stories/UZGOJ_PCELA/Knjiga_MEDONOSNA_PCELA.pdf
- Stanley R. G., Linskens H F (1974) **Pollen (Biology, Biochemistry, Management)**, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
- Stránský K., Valterová I., Fiedler P (2001) **Nonsaponifiable lipid components of the pollen of elder (*Sambucus nigra L.*)**; *Journal of Chromatography A*, 936(1-2): 173–181. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01313-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01313-9)

- Strohl J M., Seikel K M (1965) **Polyphenols of pine pollens (a survey)**; *Phytochemistry*, 4(3): 383–399.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86190-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86190-7)
- Szczęsna T (2006a) **Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen from selected botanical origins**; *Journal of Apicultural Science*, 50(2): 81-90. <http://www.jas.org.pl/Protein-content-and-amino-acid-composition-of-bee-collected-pollen-from-selected-botanical-origins,0,91.html>
- Szczęsna T (2006b) **Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen originating from Poland, South Korea and China**; *Journal of Apicultural Science*, 50(2): 91-99.
<http://www.jas.org.pl/Protein-content-and-amino-acids-compositon-of-bee-collected-pollen-originating-from-Poland-South-Korea-and-China,0,92.html>
- Szczęsna T (2007) **Concentration of selected elements in honeybee-collected pollen**; *Journal of Apicultural Science*, 51(1): 5–13. <http://www.jas.org.pl/Concentration-of-selected-elements-in-honeybee-collected-pollen,0,99.html>
- Szczęsna T (2007) **Study on the sugar composition of honeybee-collected pollen**; *Journal of Apicultural Science*, 51(1): 15-21. <http://www.jas.org.pl/Study-on-the-sugar-composition-of-honeybee-collected-pollen,0,100.html>
- Tatić B., Petković V (1998) **Morfologija biljaka**, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Tcholakova S., Denkov N D., Ivanov I B., Campbell B (2006) **Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins**; *Advances in Colloid and Interface Science*, 123-126: 259-293.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2006.05.021>
- Telci I., Sahin-Yaglioglu A., Eser F., Aksit H., Demirtas I., Tekin S (2014) **Comparison of seed oil composition of *Nigella sativa* L. and *N. damascena* L. during seed maturation stages**; *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(10): 1723-1729. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-014-2513-3>
- Terra W R., Ferreira C (1994) **Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function**; *Comparative Biochemistry and Physiology; Part B: Comparative Biochemistry*, 109(1): 1-62.
[http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4)
- Thebaudin Y J., Lefebvre C A., Harrington M., Bourgeois C M (1997) **Dietary Fibres: Nutritional and technological interest**; *Trends in Food Science & Technology*, 8(2): 41–48.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01007-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01007-8)
- Thelen J J., Ohlrogge J B (2002) **Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants**; *Metabolic Engineering*, 4(1): 12-21. <http://dx.doi.org/10.1006/mben.2001.0204>
- Tichy J., Novak J (2000) **Detection of antimicrobials in bee products with activity against *Viridans streptococci***; *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 6(5): 383-389.
<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/acm.2000.6.383>

- Toccalino L P., Norman E J., Scott C J (2012) **Chemical mixtures in untreated water from public-supply wells in the US- occurrence, composition and potential toxicity**; *Science of The Total Environment*, 431(1): 262-270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.044>
- Toro C., del Palacio A., Álvarez C., Rodríguez-Peralto J L., Carabias E., Cuétara S., Carpintero Y., Gómez C (1998) **Zigomicosis cutánea por *Rhizopus arrhizus* en herida quirúrgica [Cutaneous zygomycosis caused by *Rhizopus arrhizus* in a surgical wound**; *Revista Iberoamericana de Micología*, (in Spanish) 15(2): 94-96. <http://www.reviberoammicol.com/1998-15/094096.pdf>
- Tsydendambaev V D., Christie W W., Brechany E Y., Vereshchagin A G (2004) **Identification of unusual fatty acids of four alpine plant species from the Pamirs**; *Phytochemistry*, 65(19): 2695-2703. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.021>
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin T D M., Mazur M., Telser J (2007) **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1): 44-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko M., Rhodes C J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M (2006) **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer**; *Chemico-Biological Interactions*, 160(1): 1-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- van Tets G I., Whelan J R (1997) **Banksia pollen in the diet of Australian mammals**; *Ecography*, 20(5): 499-505. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0587.1997.tb00418.x>
- Vasić A M., Vujičić L B., Tepić N A., Gvozdanić-Varga M J., Šumić M Z (2009) **Dietary fiber content in some dry beans**; *Acta Periodica Technologica*, 40: 103-110. <http://dx.doi.org/10.2298/APT0940103V>
- Vereš M (2004) **Principi konzervisanja namirnica** (drugo izdanje), Poljoprivredni fakultet, Beograd, 270-281.
- Vlaeminck B., Fievez V., Cabrita A R J., Fonseca A J M., Dewhurst R J (2006) **Factors affecting odd- and brached-chain fatty acids in milk: Review**. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4): 389-417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.017>
- Wani A I., Sogi S D., Gill S B (2013b) **Physicochemical and functional properties of flours from three Black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars**; *International Journal of Food Science and Technology*, 48(4): 771-777. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.12025>
- Wani A I., Sogi S D., Wani A A., Gill S B (2013a) **Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars**; *LWT-Food Science and Technology*, 53(1): 278-284. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.006>
- Warren H V., Church B N., Northcote K E (1974) **Barium-Strontium relationships: possible geochemical tool in search for ore bodies**. *Western Miner*, Issue: April. http://propertyfile.gov.bc.ca/PDFTemp/fileid_11676.pdf
- Watanabe T (1994) **Pictorial atlas of soil and seed fungi**, in *Morphologies of cultured fungi and key to species*. Lewis Publishers, Boca Raton, Boston, London, Washington D.C. pp. 410.

- Weiner N C., Hilpert A., Werner M., Linsenmair C E., Blüthgen N (2010) **Pollen aminoacids and flower specialization in solitary bees**; *Apidologie*, 41(4): 476–487. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2009083>
- Wittgenstein E., Sawicki E (1970) **Analysis of the non-polar fraction of giant ragweed pollen: Caratenoids**; *Mikrochimica acta*, 58(4): 765-782. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01262911>
- Wogan N G., Edwards S G., Newberne M P (1971) **Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs**; *Cancer Research*, 31(12): 1936-1942. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/31/12/1936.full.pdf+html>
- Wróblewska A., Warakomska Z., Koter M (2006) **Pollen analysis of bee products from the north – eastern Poland**; *Journal of Apicultural Science*, 50(1): 71-83. <http://www.jas.org.pl/Pollen-analysis-of-bee-products-from-the-North-Eastern-Poland,0,82.html>
- Yang K., Wu D., Ye X., Liu D., Chem J., Sun P (2013) **Characterization of chemical composition of bee pollen in China**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3): 708–718. <http://dx.doi.org/10.1021/jf304056b>
- Yehuda S., Rabinovitz S., Carasso R L., Mostofsky D I (2002) **The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane**; *Neurobiology of Aging*, 23(5): 843-853. [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00074-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00074-X)
- Yinmao Y., Fang Z., Wenchen Z., Xian'en Z., Yourui S., Sujuan L (2007) **Analysis of saturated free fatty acids from pollen by HPLC with fluorescence detection**; *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(3): 225-236. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200600224>
- Yinmao Y., Lingjun L., Wenchen Z., Xian'en Z., Yourui S., Honglun W., Yulin L (2007) **Study of a new derivatizing reagent that improves the analysis of amino acids by HPLC with fluorescence detection: application to hydrolyzed rape bee pollen**; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(8): 2705-2718. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1155-9>
- You J., Liu L., Zhao W., Zhao X., Suo Y., Wang H., Li Y (2007) **Study of a new derivatizing reagent that improves the analysis of amino acids by HPLC with fluorescence detection: application to hydrolyzed rape bee pollen**; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(8): 2705–2718. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1155-9>
- Youdim K A., Martin A., Joseph J A (2000) **Essential fatty acids and the brain: possible health implications**; *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18(4-5): 383–399. [http://dx.doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00013-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00013-7)
- Zayas F J (1997) **Foaming properties of protein**; *In Functionality of Proteins in Food*, chapter 5:260-309. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59116-7_6

Aleksandar Ž. Kostić, rođen je 1978. godine u Beogradu. Osnovnu školu završio je u Tekerišu a srednju, gimnaziju prirodno – matematičkog smera, u Šapcu.

Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 1997. godine. Diplomirao je na Katedri za Primenjenu hemiju 2003. godine sa prosečnom ocenom tokom studija 8,20 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Magistarsku tezu pod nazivom:“ Sinteza, svojstva i kinetika bubrenja hidrogela poliakrilne kiseline i njenih kopolimera“ odbranio je 24. decembra 2009 godine na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 10.00 na posle – diplomskim studijama.

Od novembra 2003. do februara 2004. predavao je hemiju u Osnovnoj školi „Braća Baruh“ u Beogradu, a od aprila 2004. godine zaposlen je na Katedri za hemiju i biohemiju Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu u zvanju asistenta pripravnika, a od marta 2012. godine u zvanju asistenta.

Koautor je Praktikuma iz Opšte i neorganske hemije na odsecima modula Biljne proizvodnje (Voćarstvo i vinogradarstvo, Ratarstvo i povrtarstvo, Fitomedicina i Hortikultura) koji studenti koriste tokom izvođenja laboratorijskih vežbi (obavezan predmet na I godini studija, zimski semestar) kao i udžbenika za predmet Biološki aktivne komponente hrane za studente odseka za Prehrambenu tehnologiju – modul Tehnologija ratarskih proizvoda (obavezan predmet na III godini studija, letnji semestar).

Učestvovao je u realizaciji 4 projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, a trenutno je angažovan na još dva tekuća projekta – TR 31003 („Razvoj tehnologija i proizvoda na bazi mineralnih sirovina i otpadne biomase u cilju zaštite resursa za proizvodnju bezbedne hrane“) i TR 31069 („Korišćenje biljnih izvora proteina, dijetalnih vlakana i antioksidansa u proizvodnji hrane“).

Član je Srpskog hemijskog društva i Društva prehrambenih tehnologa Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Александар Костић

број индекса ДХ13/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа хемијских и нутритивних карактеристика полена који су медоносне пчеле

сакупиле у различитим регионима Србије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 09. X 2015.

A. Kostić

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Александар Костић

Број индекса: ДХ13/2012

Студијски програм: Хемија/Аналитичка хемија

Наслов рада: Анализа хемијских и нутритивних карактеристика полена који су медоносне пчеле сакупиле у различитим регионима Србије

Ментори: проф. др Живослав Тешић; доц. др Мирјана Пешић

Потписани: мр Александар Костић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 09. X 2015.

A. Kostić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа хемијских и нутритивних карактеристика полена који су медоносне пчеле сакупиле у различитим регионима Србије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 09. X 2015.

A. Keshri