

Katalitički efekat meda na stvaranje redukujućih šećera i HMF tokom hidrolize saharoze

Mirjana N. Radovanović, Branimir Z. Račić, Snežana T. Tanasković, Goran S. Marković, Dalibor D. Tomić, Jelena S. Pantović

Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, Čačak

Izvod

Dopunska ishrana pčela invertnim sirupom predstavlja najpopularniji način prihrane. Pčelari često pripremaju invertni sirup dodatkom kiseline rastvoru saharoze na povišenim temperaturama. Međutim, proizvodnja invertnog sirupa u nekontrolisanim uslovima pH, temperature i vremena može uzrokovati nastanak 5-hidroksimetil-2-furaldehida (HMF), štetnog za pčele. Visoko kvalitetan invertni sirup dobija se hidrolitičkom razgradnjom saharoze pomoću enzima invertaze. Pošto med sadrži enzim invertazu, može se koristiti kao biokatalizator inverzije saharoze. U radu je ispitan sadržaj redukujućih šećera nastalih delovanjem bagremovog meda na 50 mas.% rastvora saharoze. Odnos mase redukujućih šećera i saharoze na 40 °C, nakon 5 dana hidrolize i pri koncentraciji meda 10 mas.% iznosio je 0,30 g redukujućih šećera/g saharoze. Najveći sadržaj redukujućih šećera postignut je na temperaturi 35 °C, nakon 48 h invertovanja. U svim uzorcima sirupa hidrolizata dobijenim na različitim temperaturama (35–65 °C) detektovan je HMF u koncentracijama manjim od 4,32 mg kg⁻¹. Ustanovljen je visok stepen negativne korelacije (koeficijent linearnosti -0,94) između parametara volumetrijskog i polarimetrijskog praćenja reakcije hidrolize.

Ključne reči: med kao biokatalizator, hidroliza saharoze, redukujući šećeri, HMF.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Savremena apikultura se suočava sa nizom problema, među kojima je i dopunska ishrana pčela. Dodatnom ishranom se pomaže pčelinjem društvu da preživi i postane brojnije i produktivnije. S druge strane, nepravilna priprema hrane može uzrokovati povećan stepen oboljevanja i uginuća, čime se smanjuje brojnost i produkciona svojstva pčelinjeg društva. U nepovoljnim godinama za ishranu pčela, u pčelarstvu se primenjuje prihrana šećernim sirupima (rastvorima saharoze). Rastvor saharoze pčele razgrađuju sopstvenim biohemijskim mehanizmima na glukozu i fruktozu. To dovodi do njihove fiziološke iscrpljenosti, usled čega u fazu prezimljavanja ulaze oslabljene. U cilju prevencije slabljenja pčelinjeg društva, preporučuje se, pre zime, dodavanje sirupa već razgrađene – invertovane saharoze [1].

Pčelari u Srbiji najčešće sami invertuju rastvor saharoze u nekontrolisanim uslovima temperature, pH i vremena hidrolize. Međutim, na povišenoj temperaturi u uslovima kiselo katalizovane dehidracije heksoza, nastaje 5-hidroksimetil-2-furaldehid (HMF) [2]. Ranija istraživanja potvrđuju štetne efekte HMF na pčele [3–5], pri čemu precizne granične vrednosti toksičnosti ovog jedinjenja nisu određene [6]. Le Blanc *et al.* [4] su ispitivali smrtnost pčela koje su hranjene visokofruktoznim

STRUČNI RAD

UDK 678.743.2:692.53:51

Hem. Ind. 71 (2) 105–110 (2017)

kukuruznim sirupom. Dobijeni rezultati ukazuju na smrtnost 50% jedinki koje su hranjene devetnaest dana sirupom koji je sadržavao HMF u koncentraciji 150 mg kg⁻¹. Isti autori su u ogledu dopunske ishrane pčela visokofruktoznim kukuruznim sirupom sa različitim dozama HMF od 57, 100, 150, 200 i 250 mg kg⁻¹, određivali mortalitet tokom 26 dana od početka ishrane. Rezultati su pokazali da od pet korišćenih, samo sirup sa 250 mg kg⁻¹ HMF indukuje povećan mortalitet pčela [4]. Jachimowicz and El Sherbiny [5] utvrdili su 50% smrtnost populacije pčela koje su tokom šesnaest dana hranjene komercijalno kiselo-hidrolizovanim invertnim šećernim sirupom koji je sadržavao 150 mg kg⁻¹ HMF. U Belgiji je, tokom 2009–2010. godina, registrovan neobičajeno visok stepen uginuća pčela koji nije pripisan sindromu CCD (*colony collapse disorder*). Detaljnom analizom pojave je utvrđeno da su neka društva tokom zime dohranjivana invertnim šećerom, sa sadržajem HMF > 475 mg kg⁻¹. Ovako visok sadržaj HMF bio je posledica nepravilnog postupka proizvodnje dopunske hrane za pčele [7].

Visoko kvalitetan invertni sirup može se dobiti hidrolitičkom razgradnjom saharoze pomoću enzima invertaze. S obzirom na nedovoljnu dostupnost industrijski dobijenog enzima i njegovu cenu, značajno je ispitati katalitičku moć meda, koji je lako dostupan pčelarima. Zahvaljujući prisustvu invertaze, med se može upotrebiti kao biokatalizator u reakciji inverzije (hidrolize) saharoze. Posebno je značajno invertovati saharozu medom, koje bi pčele inače koristile u ishrani iz sop-

Preписка: M.N. Radovanović, Katedra za prehrambenu tehnologiju, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, 32000 Čačak.

E-pošta: mira.radovanovic@kg.ac.rs

Rad primljen: 13. mart, 2014

Rad prihvaćen: 17. septembar, 2014

<https://doi.org/10.2298/HEMIND140313068R>

stvenog legla, kako bi se sprečio prenos bolesti. Unosom meda u rastvor saharoze dobija se kvalitetniji proizvod za ishranu pčela sa stanovišta hranljive vrednosti. Med sadrži male količine različitih enzima, od kojih su najvažniji diastaza, invertaza, katalaza, glukozooksidaza i fosfataza. Invertaza meda potiče iz intestinalnog trakta pčela [8]. Aktivnost enzima u medu zavisi od temperature i vremena skladištenja, kao i botaničkog porekla meda [9–11]. Katalitički efekat ovog pčelinjeg proizvoda iskoristio je Strojkov [12] vršeći inverziju saharoze uz dodatak koncentrovane sirćetne kiseline. Ceksteryte and Racys [1] su vršili hidrolizu 60 mas.% rastvora saharoze pomoću meda uz dodatak limunske kiseline.

Dostupna literatura u Srbiji ne sadrži podatke o upotrebi meda kao katalizatora u reakcijama inverzije saharoze.

Cilj rada bio je da se u skladu sa visokim zahtevima proizvodnje dopunske hrane za pčele, ispita katalitički efekat bagremovog meda. Reakcija hidrolize 50 mas.% rastvora saharoze vršena je bez dodatka kiseline za razliku od ispitivanja drugih autora.

EKSPERIMENTALNI DEO

Korišćen je 50 mas.% rastvor konzumne saharoze kao supstrat hidrolize. Biokatalizator je bio bagremov med prikupljen u sezoni 2012. u okolini Čačka (N 43°50' E 20°23', nadmorska visina 284 m). Sadržaj redukujućih šećera u medu (72,3%) je određen metodom po Lane–Eynon [13], a sadržaj suve materije (82,7%) refraktometrijskom metodom. Volumetrijska metoda predviđena za analizu meda [13] je prilagođena analizi hidrolizata saharoze. Sadržaj redukujućih šećera u dobijenom sirupu znatno je manji u odnosu na prisutne redukujuće šećere u medu. Imajući u vidu ovu činjenicu, pripreman je četiri puta koncentrovani rastvor hidrolizata. Sadržaj redukujućih šećera izražen je u mas.% suve materije hidrolizata.

Korišćene hemikalije u radu su r.a. i HPLC čistoće. Specifični ugao optičke rotacije meren je polarimetrom (model POL-1, Optic, Italy). Suva materija je merena na Abbe refraktometru (A. Krüss-Optronic, Germany). Temperatura je održavana u vodenom kupatilu sa variranjem ± 1 °C. Sadržaj HMF određivan je na HPLC Waters (Binary HPLC Pump 1525, 717 plus auto-sampler, dual λ absorbance detector 2487). Hromatografsko razdvajanje HMF vršeno je na koloni ODS2 Spherisorb (4,6 mm \times 250 mm, 5 μ m) ekvilibriranoj po 30 min pred svaku seriju merenja smešom voda:metanol = 90:10 (vol.). Grejač kolone bio je podešen na 30 °C. Mobilna faza bila je smeša voda: metanol (90:10) u izokratskom modu protoka 1 mL min⁻¹. Merenje je vršeno na 285 nm. Po 2 g uzorka je rastvarano vodom u mernom sudu od 10 mL. Svaki uzorak pre injektovanja profiltriran je kroz membranski filter ALLPURE NY (0,45

μ m). Injektovano je po 20 μ L standarda/uzorka. Pripremljeno je sedam standarda u opsegu koncentracija 0,66–11 mg L⁻¹. Kalibraciona kriva konstruisana je pomoću softvera Empower. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) određeni su na osnovu standardne devijacije odgovora detektora i nagiba kalibracione krive [14] i iznosili su 0,39 i 1,17 mg L⁻¹, redom. Sadržaj HMF u hidrolizatu određen je jednačinom:

$$HMF \left(\text{mg kg}^{-1} \right) = \frac{x}{100m} \quad (1)$$

gde je x – koncentracija HMF u uzorku dobijena pomoću softvera, mg L⁻¹, m – masa hidrolizata, kg.

Sadržaj redukujućih šećera tokom inverzije saharoze na 40 °C

Tri reakcione posude od kojih je svaka sadržala 400 g 50 mas.% rastvora saharoze stavljene su u vodeno kupatilo (40 °C). U prvu posudu dodato je 10, u drugu 20, a u treću 30 mas.% bagremovog meda. Stvaranje redukujućih šećera praćeno je 12 dana dvema nezavisnim metodama: modifikovanom volumetrijskom metodom i polarimetrijski [13]. Analize su vršene prvog, petog, sedmog, devetog i dvanaestog dana ogleda. Za svaki uzorak vršena je predtitracija i dve glavne titracije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost dve glavne titracije preračunato na % suve materije. Polarimetrijsko merenje predstavlja srednju vrednost najmanje dva merenja preračunato u specifični ugao optičke rotacije.

Sadržaj redukujućih šećera i HMF na različitim temperaturama inverzije

Posuda sa 400 g 50 mas.% rastvora saharoze kome je dodato 10 mas.% bagremovog meda stavljena je u vodeno kupatilo gde je održavana zadata temperatura 48 h. Tokom inverzije saharoze praćen je sadržaj HMF i redukujućih šećera u temperaturnom opsegu od 35–65 °C. Eksperiment je izveden u tri ponavljanja.

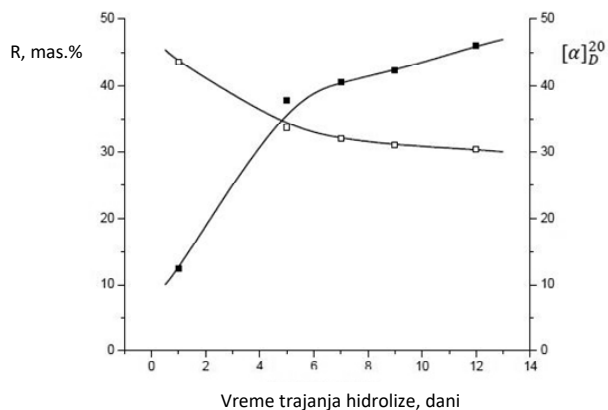
REZULTATI I DISKUSIJA

U radu je ispitan nastanak redukujućih šećera tokom hidrolize saharoze pomoću meda kao biokatalizatora i stvaranje štetnog nusproizvoda HMF.

Uticaj vremena i koncentracije meda na sadržaj redukujućih šećera u sirupu

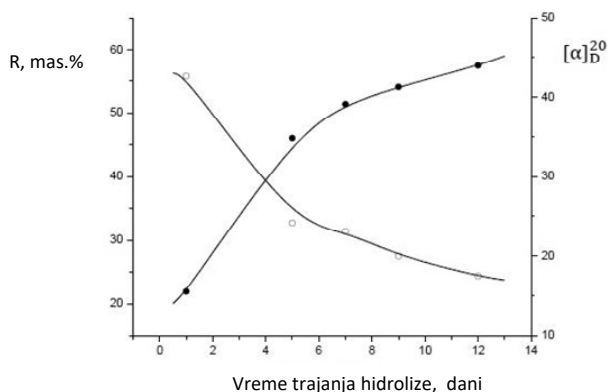
Tokom inverzije rastvora saharoze katalizovane bagremovim medom povećavao se sadržaj redukujućih šećera. Uporedno je prikazana zavisnost sadržaja redukujućih šećera (crni simboli) i specifičnog ugla optičke rotacije (beli simboli) u funkciji vremena (slike 1–3). Redukujući šećeri na početku inverzije potiču iz dodatog meda. Sadržaj redukujućih šećera rastao je tokom vremena, dok se specifični ugao optičke rotacije sma-

njivao. Najviše redukujućih šećera (46,0 mas.%) izmerno je dvanaestog dana ogleda u uzorku sa 10 mas.% meda. U istom uzorku je izmerena i najniža vrednost specifičnog ugla optičke rotacije $30,3^{\circ} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$ (slika 1).



Slika 1. Sadržaj redukujućih šećera R , mas.% (■) i specifičnog ugla optičke rotacije $[\alpha]_D^{20}$ (□) tokom inverzije u uzorku sa 10 mas.% meda.

Figure 1. The content of reducing sugars, R , wt.% (■) and the specific optical rotation angle $[\alpha]_D^{20}$ (□) during the inversion in 10 wt.% honey sample.



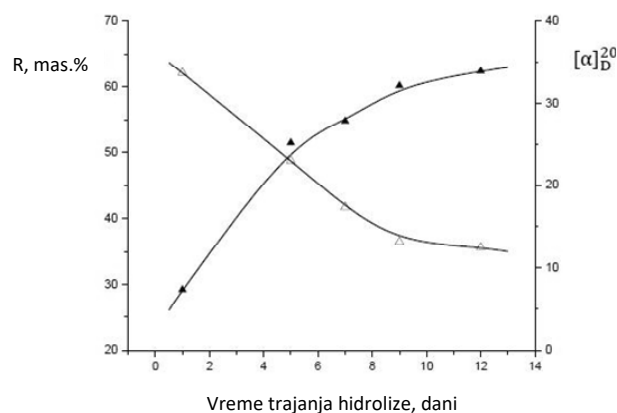
Slika 2. Sadržaj redukujućih šećera R , mas.% (●) i specifičnog ugla optičke rotacije $[\alpha]_D^{20}$ (○) tokom inverzije u uzorku sa 20 mas.% meda.

Figure 2. The content of reducing sugars, R , wt.% (●) and the specific optical rotation angle $[\alpha]_D^{20}$ (○) during the inversion in 20 wt.% honey sample.

Ceksteryte and Racys [1] su vršili hidrolizu 60 mas.% rastvora saharoze pomoću meda (7,6 mas.%) u trajanju od pet dana na $38-40^{\circ}\text{C}$. Nakon ovog vremena, uz dodatak 0,024 mas.% limunske kiseline na početnu masu rastvora inverzija je produžena još pet dana na istoj temperaturi. Dobili su invertirni sirup sa $52.30 \pm 1.30\%$ redukujućih šećera.

U uzorku sa 20 mas.% meda najveći sadržaj redukujućih šećera (57,5 mas.%) je izmeren dvanaestog dana ogleda, pri čemu je specifičan ugao optičke rotacije iznosio $17,5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$ (Slika 2). Maksimalni sadržaj redukujućih šećera (62,4 mas.%) u uzorku sa 30 mas.%

meda je određen takođe dvanaestog dana ogleda, a specifičan ugao optičke rotacije je iznosio $12,5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$ (Slika 3).



Slika 3. Sadržaj redukujućih šećera R , mas.% (▲) i specifičnog ugla optičke rotacije $[\alpha]_D^{20}$ (Δ) tokom inverzije u uzorku sa 30 mas.% meda.

Figure 3. The content of reducing sugars, R , wt.% (▲) and the specific optical rotation angle $[\alpha]_D^{20}$ (Δ) during the inversion in 30 wt.% honey sample.

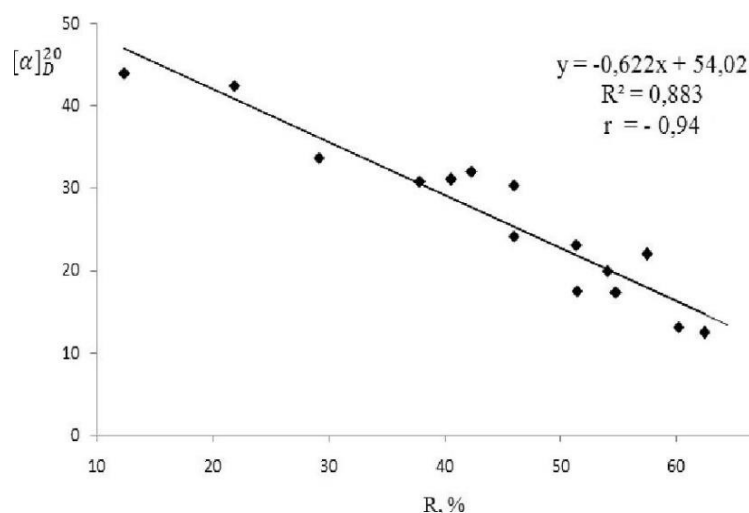
Brzina nastajanja redukujućih šećera bila je najveća prvih pet dana trajanja ogleda. Dužim invertovanjem, brzina reakcije se smanjivala. Ovaj vremenski period (pet dana) predstavlja optimalno vreme reakcije. Prinos reakcije (g redukujućih šećera/g saharoze) približno je isti kod sva tri uzorka od prvog do petog dana ogleda (Tabela 1). Prinos redukujućih šećera se neznatno povećavao u uzorcima sa koncentracijom meda većom dva, odnosno tri puta od najniže primenjene (10 mas.%). Zbog toga se koncentracija od 10 mas.% može smatrati kao optimalna.

Koncentracija meda mas.%	Dani			
	1.–5.	5.–7.	7.–9.	9.–12.
10	0,30	0,02	0,01	0,03
20	0,32	0,06	0,02	0,03
30	0,34	0,04	0,06	0,02

Dobijeni rezultati specifičnih uglova optičke rotacije i odgovarajućih procenata redukujućih šećera pokazuju međusobnu linearnu zavisnost (Slika 4). Koeficijent linearosti polarimetrijskog i volumetrijskog merenja ($-0,94$) ukazuje na statistički značajnu negativnu korelaciju ($P \leq 0,05$) posmatranih obeležja.

Uticaj temperature na stvaranje redukujućih šećera i sadržaj HMF

U drugom delu eksperimenta praćen je sadržaj redukujućih šećera tokom 48 sati hidrolize pomoću 10 mas.% meda u temperaturnom opsegu od $35-65^{\circ}\text{C}$



Slika 4. Zavisnost specifičnih uglova optičke rotacije $[\alpha]_D^{20}$ od sadržaja redukujućih šećera R , mas.%.
 Figure 4. Specific optical rotation angles $[\alpha]_D^{20}$ as a function of the content of reducing sugars R , wt.%.

(tabela 2). Dobijeni rezultati ukazuju da se sadržaj redukujućih šećera povećavao na svim temperaturama, u funkciji vremena. Brzina nastajanja redukujućih šećera je obrnuto proporcionalna povišenju temperature reakcije. Najviši sadržaj redukujućih šećera od 26,1 mas.% izmeren je u uzorku koji je hidrolizovao 48 h na temperaturi od 35 °C., tabela 2.

Tabela 2. Sadržaj redukujućih šećera R (mas.%) u hidrolizatu dobijenom na različitim temperaturama tokom 48 h hidrolize pomoću 10 mas.% meda
 Table 2. The content of reducing sugars, R (wt.%) in the hydrolysate obtained at different temperatures during 48 h of hydrolysis by 10 wt.% honey

Temperatura °C	Vreme, h		
	10	36	48
35	14,5±0,4	20,5±0,1	26,1±0,4
40	14,2±0,1	20,6±0,3	25,5±0,1
45	14,2±0,2	19±0,5	24,6±0,2
50	13,5±0,2	17,8±0,1	21,2±0,3
58	13,0±0,1	16,7±0,1	20,9±0,1
65	13,1±0,1	16,5±0,3	19,4±0,2

U svim uzorcima dobijenih hidrolizata nakon 10, 36 i 48 h invertovanja u temperaturnom opsegu od 35–65 °C prisutan je HMF (sadržaj HMF > LOD, Tabela 3).

Sve softverski određene koncentracije HMF bile su manje od LOQ. Ovo ukazuje na nemogućnost preciznog kvantifikovanja HMF u pojedinačnim uzorcima. Kada se u jednačini (1) za vrednost promenljive x uzme LOQ (minimalna vrednost koja se može kvantifikovati), a za promenljivu m masa uzorka (0,0027 kg) dobijenog hidrolizom na 65 °C nakon 48 h (gde se očekuje najveći sadržaj HMF), dobijene vrednosti ukazuju da se u svim uzorcima nalazilo manje od 4,32 mg·kg⁻¹ ovog nusprodukta. Ova vrednost je manja od vrednosti koncentracije

cije HMF za koju je utvrđeno da je bezopasna za pčele: 30 mg/kg [5] i manja od preporučenog najvišeg sadržaja ovog jedinjenja 20 mg/kg, kao što je u mnogim vrstama meda [15]. Hidrolizom saharoze pomoću meda kao biokatalizatora nastaje znatno manje HMF nego tokom kiseline hidrolize. Med koji su proizvele pčele hranjene invertnim sirupom dobijenim kiselinom hidrolizom pomoću HCl na 70 °C u roku od samo 2 h inverzije sadržao je čak 28,22 mg/kg HMF [16], a poznato je da pčele imaju sposobnost metabolizma HMF do određene granice [1]. Ceksteryte and Racys [1] su dobili invertni sirup koji je sadržao 1,43 mg/kg HMF hidrolizom saharoze pomoću meda i limunske kiseline.

Tabela 3. Sadržaj HMF (mg L⁻¹) u hidrolizatu dobijenom na različitim temperaturama tokom 48 h hidrolize pomoću 10 mas.% meda
 Table 3. The content of HMF (mg L⁻¹) in the hydrolysate obtained at different temperatures during 48 h of hydrolysis by 10 wt.% honey

Temperatura °C	Vreme, h		
	10	36	48
35	0,588±0,004	0,629±0,002	0,650±0,003
40	0,573±0,002	0,63±0,06	0,70±0,02
45	0,612±0,006	0,686±0,004	0,687±0,001
50	0,59±0,06	0,725±0,006	0,728±0,006
58	0,65±0,03	0,81±0,04	0,90±0,05
65	0,613±0,006	0,900±0,006	0,934±0,006

ZAKLJUČAK

Tokom hidrolize 50 mas.% rastvora saharoze uz dodatak meda kao biokatalizatora, bez kiseline, menja se sadržaj redukujućih šećera. Brzina stvaranja redukujućih šećera na 40 °C bila je najveća prvih pet dana trajanja ogleada. Optimalna koncentracija meda iznosila

je 10 mas.%. Koeficijent linearnosti parametara volumetrijskog i polarimetrijskog praćenja reakcije hidrolize saharoze pomoću meda iznosio je $-0,94$. Brzina nastanka redukujućih šećera je obrnuto proporcionalna povišenju temperature, a najviše redukujućih šećera, 26,1% nastalo je na temperaturi 35 °C. U svim uzorcima sirupa dobijenim na različitim temperaturama (35–65 °C), sadržaj HMF je bio manji od 4,32 mg kg⁻¹.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na finansijskoj podršci ovih istraživanja (u okviru projekta III 46010).

LITERATURA

- [1] V. Ceksteryte, J. Racys, The quality of syrups used for bee feeding before winter and their suitability for bee wintering, *J. Apic. Sci.* **50** (2006) 5–14
- [2] F.J. Morales, Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds, in: *Process-Induced Food Toxicants: occurrence, formation, mitigation and health risks*, R.H. Stadler, D.R. Lineback (Eds.), Wiley–Blackwell, Hoboken, NJ, 2009
- [3] L. Bailey, The effect of acid-hydrolysed sucrose on honeybees, *J. Apicult. Res.* **5** (1966) 127–136
- [4] B.W. Le Blanc, G. Eggleston, D. Sammataro, C Cornett, R. Dufault, T. Deeby, E. St Cyr, Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*), *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 7369–7376
- [5] T. Jachimowicz, G. El Sherbiny, Zur Problematik der Verwendung von Invertzucker für die Bienenfütterung, *Apidologie* **6** (1975) 121–143
- [6] L. Zirbes, B.K. Nguyen, D.C. de Graaf, B. De Meulenaer, W. Reybroeck, E. Haubruge, C. Saegerman, Hydroxymethylfurfural: A Possible Emergent Cause of Honey Bee Mortality, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 11865–11870
- [7] R. Van der Zee, L. Pisa, *Bijensterfte 2009–10 en toxische invertsuikersiroop*, NCB Rapport 02/2010 Nederlands Centrum Bijenonderzoek: Tersoal, The Netherlands, 2010, pp. 1–15
- [8] H.D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food Chemistry*, 4th revised and extended ed., Springer-Verlag, Heidelberg, 2009
- [9] L.P. Oddo, M.G. Piazza, P. Pulcini, Invertase activity in honey, *Apidologie* **30** (1999) 57–65
- [10] G. Šarić, D. Matković, M. Hruškar, N. Vahčić, Characterisation and Classification of Croatian Honey by Physicochemical Parameters, *Food Technol. Biotech.* **46** (2008) 355–367
- [11] B. Lichtenberg-Kraag, Saccharose degradation over time in stored honey: influence of time, temperature, enzyme activity and botanical origin, *J. Food. Nutr. Res.* **51** (2012) 217–224
- [12] S.A. Strojkov, *Invertirovannyj sirup*, *Pchelovodstvo* **7** (1990) 27–28
- [13] S. Bogdanov, Harmonized Methods of the International Honey Commission, IHC; http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/IHCPapers/IHC-methods_2009.pdf, 2009
- [14] International Conference of Harmonisation (ICH): Harmonised Tripartite Guideline – Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, 1996.
- [15] F.X. Kammerer, Aktueller stand der Erkenntnisse über die fütterung von bienen mit zucker, *Imkerfreund* **1** (1989) 12–14
- [16] M. Ozcan, D. Arslan, D.A. Ceylan, Effect of inverted sucrose on some properties of honey, *Food Chem.* **99** (2006) 24–29.

SUMMARY**THE CATALYTIC EFFECT OF HONEY ON FORMATION OF REDUCING SUGARS DURING SUCROSE HYDROLYSIS**

Mirjana N. Radovanović, Branimir Z. Račić, Snežana T. Tanasković, Goran S. Marković, Dalibor D. Tomić, Jelena S. Pantović

University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Čačak

(Professional paper)

In commercial apiculture, beekeepers usually remove honey from hives and replenish food reserves with sugar syrup. When honeybees use sugar syrup (sucrose solution), they break down sucrose into glucose and fructose. These processes exhaust and weaken bees. In order to prevent bee exhaustion resulting from this processing, bees should preferably be supplied with ready made food before winter, *i.e.*, with syrup in which sucrose has already been inverted. Feeding with inverted syrups is the most popular way of honeybee feeding. Beekeepers usually prepare inverted syrups by adding a weak organic acid (citric, oxalic, acetic or lactic acid) to sucrose solution at elevated temperatures. Inverted syrup production under uncontrolled pH, temperature and time conditions can cause the formation of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF), a compound harmful to bees. High quality inverted syrup can be obtained through the hydrolytic decomposition of sucrose by the enzyme invertase. Due to its invertase content, honey can be used as a biocatalyst for sucrose inversion. Invertase activity depends on the type, method and time of honey storage. This study evaluates the catalytic effect of acacia honey on formation of reducing sugars during hydrolysis of 50 wt.% sucrose solution. The ratio of reducing sugars and sucrose at 40 °C, after 5 days of hydrolysis at a concentration of honey and 10 wt.% was 0.30 g reducing sugars/g of sucrose. The highest content of reducing sugars was achieved at a temperature of 35 °C, after 48 h of inversion. In all samples of hydrolysates obtained at different temperatures (35–65 °C), HMF was detected at concentrations of less than 4.32 mg kg⁻¹. A high degree of negative correlation (coefficient of linearity –0.94) was established between parameters of volumetric and polarimetric measurements during the hydrolysis of sucrose.

Keywords: Honey as biocatalyst • Sucrose hydrolysis • Reducing sugars • HMF