

# Imunoenzimske metode u analitici meda i pčelinjih proizvoda

---

Rotim, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:918017>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Karla Rotim**

7651/PT

**IMUNOENZIMSKE METODE U ANALITICI MEDA I**  
**PČELINJIH PROIZVODA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Analitika prehrambenih proizvoda

**Mentor:** prof. dr. sc. Ksenija Marković

**Zagreb, 2021.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda  
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## Imunoenzimske metode u analitici meda i pčelinjih proizvoda

*Karla Rotim, 0058213249*

**Sažetak:** U novije vrijeme pojavila se sve veća potreba za provođenjem različitih vrsta analiza u medu i pčelinjim proizvodima koji se, osim zbog svoje nutritivne vrijednosti, često koriste i zbog pozitivnih učinaka na zdravlje. Imunoenzimska ELISA metoda (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) svoju primjenu u analitici meda i pčelinjih proizvoda, prema podacima iz dostupne znanstvene literature, pronalazi u određivanju proteina i peptida koji potiču od pčela, kao što su apalbumin-1 i defenzin-1. Primjere primjene imunoenzimskih ELISA metoda u analitici meda predstavlja također i određivanje peludi određene biljne vrste, određivanje enzima, te određivanje specifičnih proteina u svrhu razlikovanja uzoraka prirodnog meda. Imunoenzimska ELISA metoda može predstavljati jedan od novorazvijenih načina za određivanje specifičnih sastojaka u svrhu unaprjeđenja kvalitete meda i pčelinjih proizvoda.

**Ključne riječi:** ELISA, imunoenzimska metoda, med, pčelinji proizvodi

**Rad sadrži:** 27 stranica, 4 slike, 45 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof. dr. sc. Ksenija Marković

**Datum obrane:** 8. srpnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Quality Control**  
**Laboratory for Food Quality Control**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

**Immunoenzyme methods in the analyses of honey and bee products**

***Karla Rotim, 0058213249***

**Abstract:** Recently, there has been a growing need to conduct various types of analyses in honey and bee products, which, in addition to their nutritional value, are often used for their positive health effects. The Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) finds its application in the analyses of honey and bee products, according to data from the available scientific literature, in the determination of proteins and peptides derived from bees, such as apalbumin-1 and defensin-1. Examples of the application of immunoenzyme ELISA methods in the analyses of honey are also the determination of pollen of a particular plant species, the determination of enzymes, and the determination of specific proteins for the purpose of distinguishing samples of natural honey. The Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) can be one of the newly developed methods for determination of specific compounds in order to improve the quality of honey and bee products.

**Keywords:** bee products, ELISA, immunoenzyme method, honey

**Thesis contains:** 27 pages, 4 figures, 45 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

**Mentor:** PhD. Ksenija Marković, Full professor

**Defence date:** July 8, 2021.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Imunoenzimske metode</b> .....	3
2.1.1. "Sendvič" ELISA test.....	3
2.1.2. Konkurentni ili kompetitivni ELISA test.....	4
2.1.3. Indirektni ELISA test.....	5
2.1.4. Direktni ELISA test.....	6
<b>2.2. Kemijski sastav meda i pčelinjih proizvoda</b> .....	8
<b>2.3. Primjena ELISA metoda u analizama meda i pčelinjih proizvoda</b> .....	12
<b>2.4. Primjena ostalih imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda u analizama meda</b> .....	17
<b>2.5. HPLC i PCR metode u analizama meda</b> .....	19
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	22
<b>4. LITERATURA</b> .....	23

## 1. UVOD

Tijekom dugog vremenskog perioda razvijali i modificirali su se različiti imunološki, odnosno imunokemijski testovi u brojne svrhe, pa tako i za analize u području prehrambene industrije. Vrlo često korištenu metodu iz skupine imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda predstavlja imunoenzimski ELISA test (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) koji se temelji na svojstvu antitijela da specifično veže antigen ili haptan iz uzorka, te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije do koje dolazi zbog promjene boje. Metoda je vrlo osjetljiva, daje brze i pouzdane rezultate, a zahtijeva utrošak malih količina antigena i antitijela.

Danas su razvijeni različiti tipovi ELISA metoda zbog potrebe za većom specifičnošću prema sastojcima koji se određuju i koji mogu imati različitu kemijsku strukturu i svojstva, te radi dobivanja preciznijih rezultata. Svoju primjenu pronalaze u kvalitativnom i kvantitativnom određivanju brojnih sastojaka, a u novije vrijeme i onih prisutnih u medu i pčelinjim proizvodima u svrhu unaprjeđenja njihove kvalitete.

Med i pčelinji proizvodi često se koriste zbog svoje nutritivne vrijednosti ali i pozitivnih učinaka na zdravlje. U novije vrijeme pojavila se sve veća potreba za provođenjem različitih vrsta analiza u svrhu kontrole kvalitete i određivanja autentičnosti meda i pčelinjih proizvoda, a svoju primjenu u tom području pronalaze i imunoenzimski ili ELISA metode.

Cilj ovog rada bio je, pregledom znanstvene literature, opisati i istaknuti pojedine primjere primjene imunoenzimskih ELISA metoda u analizi meda i pčelinjih proizvoda.

## 2. TEORIJSKI DIO

Za analizu i ispitivanje sastojaka hrane učestalo se koriste različite imunološke, odnosno imunokemijske metode. Takove metode se temelje na reakciji vezanja antitijela s antigenima na temelju specifičnih svojstava antitijela. Vrlo često se koriste zbog visoke razine specifičnosti i osjetljivosti, relativno jednostavnog postupka izvođenja te relativno niske cijene u odnosu na druge analitičke metode za brojne analize hrane. Jedna od najčešćih imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda je imunoenzimski ELISA test (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) kojim se može detektirati prisutnost antigena i odrediti njihov udio. Ova metoda se temelji na stvaranju veze između antitijela i ciljanog analita ili antigena iz uzorka. Na osnovu promjene boje, završna mjerenja provode se na ELISA mikročitačima (Butorac i sur., 2013).

Iz navedene skupine metoda, u prehrambenoj industriji često se koristi i Western blot metoda. Svrha primjene ove metode često je detekcija specifičnih proteina iz uzoraka koji se ispituju. Prije provedbe ove metode, često se proteini iz uzorka razdvajaju primjenom SDS poliakrilamidne elektroforeze (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*; SDS-PAGE). SDS poliakrilamidnom elektroforezom, proteini se razdvajaju na temelju razlike u molekularnoj masi. Razdvojeni proteini se prenose na nitroceluloznu, sintetsku ili najlonsku membranu te izlažu specifičnom primarnom antitijelu. Nakon vezanja proteina i primarnog antitijela, na primarno antitijelo specifično se veže konjugirano sekundarno antitijelo. Mjesto na kojem dolazi do vezanja primarnog antitijela i konjugiranog sekundarnog antitijela vidljivo je kao tamna linija. Opisana metoda svoju primjenu pronalazi u detekciji različitih sastojaka u prehrambenim proizvodima (Butorac i sur., 2013).

U analitici prehrambenih proizvoda, iz navedene skupine imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda, svoju primjenu pronalaze i optički biosenzori koji imaju mogućnost otkrivanja vezanja biomolekula u stvarnom vremenu, a u analizama prehrambenih proizvoda se često koriste u svrhu otkrivanja patogenih mikroorganizama i njihovih mogućih toksina, te jednostavni imunokromatografski test (engl. *Lateral Flow Immunochromatographic Test*) (Butorac i sur., 2013).

## 2.1. Imunoenzimske metode

Imunoenzimski ELISA test (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) je metoda pomoću koje se može odrediti prisutnost antigena, te ako su prisutni, također pomoću ove metode je moguće odrediti njihov udio. ELISA test se temelji na specifičnom vezanju antitijela i antigena iz uzorka, a provodi se spektrofotometrijskim mjerenjem reakcije kao rezultat promjene boje. Ova metoda je izrazito osjetljiva i selektivna i zahvaljujući njoj je moguće odrediti nisku koncentraciju analita, a to predstavlja nekoliko nanograma po kilogramu ( $\text{ng kg}^{-1}$ ) uzorka koji se ispituje (Butorac i sur., 2013). Prednosti ELISA testa su brzina i pouzdanost rezultata, a test ne zahtijeva potrošnju velike količine antigena i antitijela (Cvrtila i Runje, 2006). Učestala uporaba ELISA testa je u određivanju alergena u različitim prehrambenim proizvodima, a neki od tih proizvoda su: mlijeko, kikiriki, lješnjak i jaja (Chen i sur., 2012). Također, ova metoda često pronalazi primjenu i u određivanju vrste mesa u toplinski tretiranim ili toplinski netretiranim proizvodima (Cvrtila i Runje, 2006). Postoje različite vrste ELISA testova, a najčešće su: indirektna, "sendvič", konkurentna, te nova direktna, prijenosna i višestruka metoda pomoću mikrotitarskih ploča (Butorac i sur., 2013).

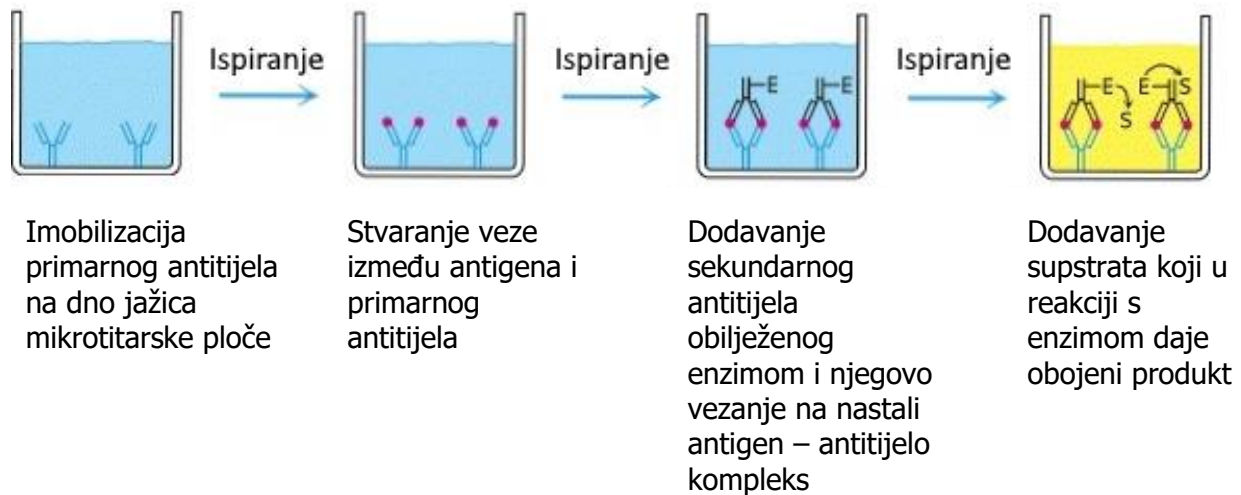
### 2.1.1. "Sendvič" ELISA test

"Sendvič" ELISA test je jedan od najčešće korištenih imunoenzimskih testova u svrhu detekcije proteina. Ova metoda uključuje imobilizaciju primarnog antitijela na dno jažica mikrotitarske ploče. Nakon dodavanja standardne otopine ili otopine uzorka, dolazi do stvaranja veze između antitijela i antigena, ukoliko je antigen prisutan u određenom uzorku. Poslije toga, provodi se ispiranje i tada dolazi do uklanjanja onih antigena koji nisu vezani na primarno antitijelo. U sljedećoj fazi reakcije, dodaje se sekundarno antitijelo koje je obilježeno enzimom i ponovno dolazi do stvaranja veze između antitijela i specifičnog antigena, odnosno, u ovom slučaju se sekundarno antitijelo veže na postojeći antigen – antitijelo kompleks, te se na takav način stvara "sendvič". Specifični antigen je smješten u "sendvič" između primarnog i sekundarnog antitijela. U posljednjim fazama reakcije dodaje se supstrat koji reagira sa enzimom i uzrokuje nastajanje obojenog produkta. Nastalo obojenje se mjeri spektrofotometrijski, a za ovaj princip testa je karakteristično da je izmjerena apsorbancija direktno proporcionalna koncentraciji analita (Besler i sur., 2002). Na slici 1 prikazan je tijek "sendvič" ELISA testa (Pokhrel, 2015).

"Sendvič" ELISA test razvijen je zahvaljujući optimizaciji svakog pojedinačnog koraka ELISA testa (Ecker i Cichna-Markl, 2012). Prednosti "sendvič" ELISA testa su:



- visoka specifičnost, obzirom da se koriste primarno i sekundarno antitijelo, te se zbog toga antigen posebno hvata i detektira,
- antigen ne zahtijeva čišćenje prije mjerenja, pa je test pogodan za analizu složenijih uzoraka,
- fleksibilnost i osjetljivost (Pokhrel, 2015).



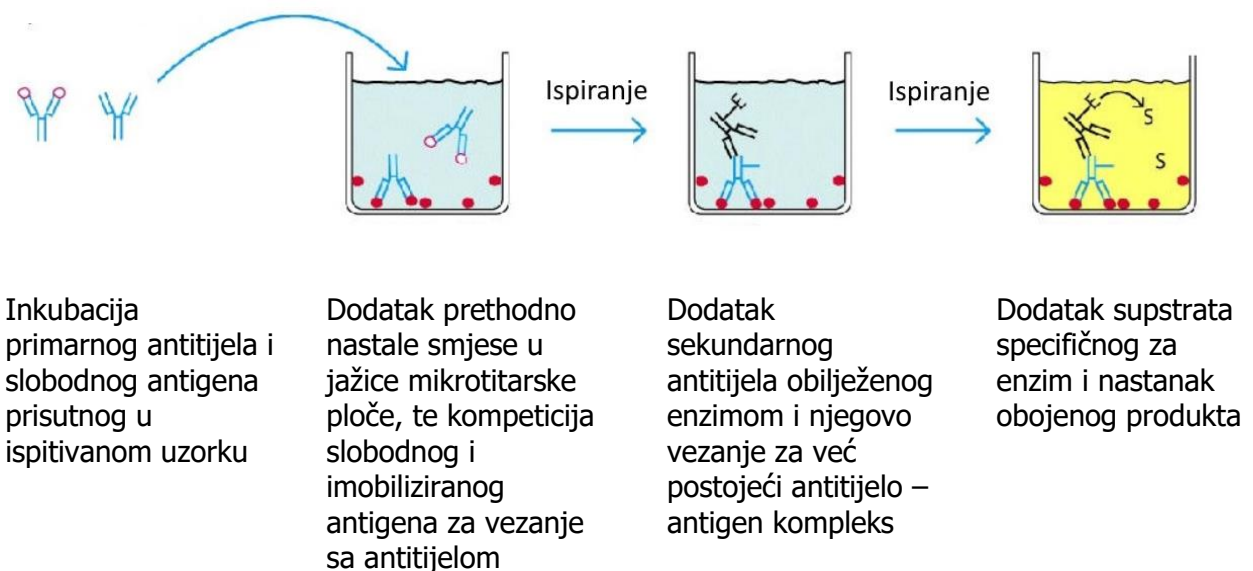
Slika 1. Prikaz tijeka "sandvič" ELISA testa (Pokhrel, 2015)

### 2.1.2. Konkurentni ili kompetitivni ELISA test

Prvi korak u provođenju konkurentnog ili kompetitivnog ELISA testa uključuje imobilizaciju antigena na čvrstu fazu. Nakon toga, u jažice mikrotitarske ploče dodaje se primarno antitijelo i uzorak koji sadrži određenu količinu slobodnog antigena. Dolazi do natjecanja između ta dva antigena, imobiliziranog antigena i slobodnog antigena iz uzorka koji će se vezati sa antitijelom te na taj način omogućiti stvaranje kompleksa antitijelo – antigen. Antigen prisutan u uzorku ima prednost pred imobiliziranim antigenom zbog toga što prvi dolazi u kontakt sa antitijelom. Slijedi korak ispiranja mikrotitarske ploče kako bi se uklonili antigeni koji se nisu vezali za antitijelo i stvorili potreban kompleks. Sljedeći korak čini dodavanje sekundarnog antitijela obilježenog enzimom i njegovo vezanje za postojeći antitijelo – antigen kompleks. Ponovno se provodi ispiranje kako bi se uklonila antitijela koja nisu prepoznala i vezala se za kompleks. U završnim koracima reakcije dodaje se supstrat koji je specifičan za enzim i njegov dodatak rezultira nastankom obojenog produkta, te omogućuje detekciju antigena u određenom uzorku. U slučaju da u analiziranom uzorku nisu prisutni antigeni, tada će sekundarna antitijela

koja su obilježena enzimom pokazati najveći mogući afinitet prema onom antigenu koji je imobiliziran za čvrstu fazu. Izmjerena apsorbancija obojenog produkta koji je nastao će biti izrazito visoka. U slučaju pak kada je prisutna velika količina slobodnog antigena u uzorku, doći će do vezanja manje količine sekundarnog antitijela obilježenog enzimom na imobilizirani antigen. Visoka koncentracija slobodnih antigena iz uzorka uzrokuje inhibiciju vezanja antigena. Slika 2 prikazuje tijek kompetitivnog ili konkurentnog ELISA testa (Pokhrel, 2015).

Kompetitivni ELISA test je karakterističan po tome što je koncentracija antigena prisutnog u analiziranom uzorku obrnuto proporcionalna intenzitetu obojenog produkta nastalog dodatkom supstrata (Ayadin, 2015; Besler i sur., 2002; Pokhrel, 2015). Jedna od prednosti kompetitivnog ELISA testa je ta što se smatra vrlo korisnim za postupke kvantitativnog analiziranja uzoraka koji sadrže nisku koncentraciju analita (Cellsignal, 2001).

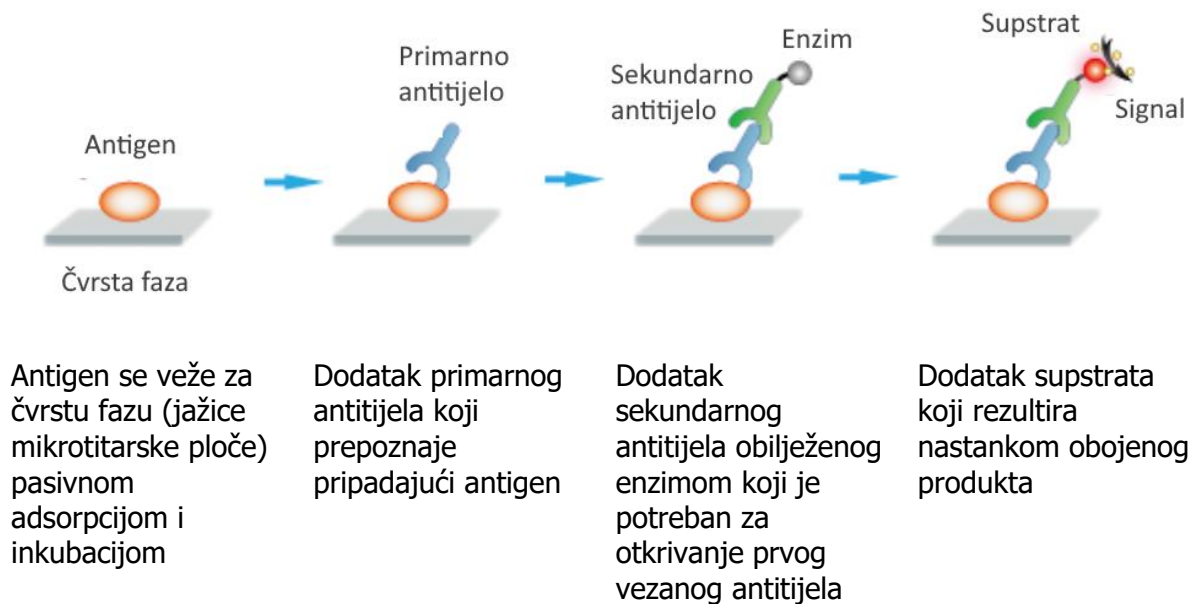


Slika 2. Prikaz tijeka kompetitivnog ili konkurentnog ELISA testa (Pokhrel, 2015)

### 2.1.3. Indirektni ELISA test

Indirektni ELISA test se sastoji od više koraka od kojih se prvih nekoliko koraka provodi na isti način kao u slučaju direktnog ELISA testa. Ova metoda se razlikuje od direktnog ELISA testa po tome što izostaje korak dodatnog ispiranja, te po vrsti antitijela koja se dodaju nakon uklanjanja pufera. Slika 3 prikazuje tijek indirektnog ELISA testa (Creative Diagnostics, 2009). Cilj testa je detekcija prvotno vezanog antitijela pomoću sekundarnog antitijela obilježenog enzimom. Prvi korak u indirektnom ELISA testu predstavlja imobilizacija antigena na čvrstu

fazu. U indirektnom ELISA testu se koriste dva antitijela, prvo se dodaje primarno antitijelo koje je zaduženo za detekciju antigena, te za razliku od direktnog ELISA testa nije obilježeno enzimom. Nakon toga, provodi se korak ispiranja. Zatim se dodaje sekundarno antitijelo obilježeno enzimom koje je komplementarno primarnom antitijelu i potrebno za detekciju primarnog vezanog antitijela. Ponavlja se korak ispiranja, te provodi dodatak supstrata što rezultira nastankom obojenog produkta. Signal koji nastaje mjeri se pomoću posebno dizajniranog čitača. Indirektni ELISA test je puno osjetljiviji obzirom na direktni ELISA test. Također, prednosti ovog testa uključuju nisku cijenu te mogućnost korištenja velikog broja različitih primarnih antitijela (Engvall, 2010; Kohl, Ascoli, 2017; Shah, Maghsoudlou, 2016). Osnovni nedostatak ove metode je postojanje rizika unakrsne reaktivnosti između sekundarnih antitijela obilježenih enzimom (Cellsignal, 2001).



Slika 3. Prikaz tijeka indirektnog ELISA testa (Creative Diagnostics, 2009)

#### 2.1.4. Direktni ELISA test

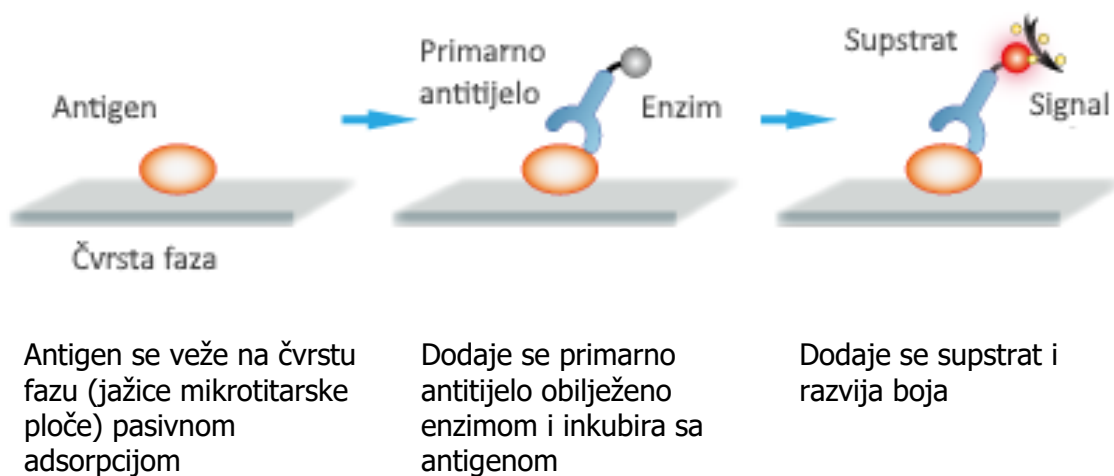
Direktni ELISA test započinje imobilizacijom antigena na čvrstu fazu kroz inkubaciju koja traje jedan sat pri temperaturi 37 °C ili preko noći pri temperaturi 4 °C. Nakon završetka inkubacije, slijedi ispiranje ELISA ploče (čvrsta faza), na koju se vezao antigen, kako bi se eventualno, ukoliko su bila prisutna, uklonila nevezana antitijela i blokirala nevezana mjesta na ploči korištenjem raznih sredstava na bazi životinjskih proteina. Ovaj korak je izuzetno značajan

obzirom da zaustavlja vezanje nespecifičnih antitijela na ELISA ploču i na taj način smanjuje mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata. Zatim se dodaje pufer te se ploča ispiri, a nakon toga slijedi dodatak primarnog antitijela obilježenog enzimom (za razliku od indirektnog ELISA testa tijekom kojeg se dodaje primarno antitijelo na koje nije vezan enzim). Primarno antitijelo obilježeno enzimom se veže direktno na antigen koji je vezan na ELISA ploču, odnosno čvrstu fazu. Provodi se ispiranje te dodaje supstrat što rezultira nastankom obojenja. Dobiveni signal mjeri se pomoću posebnog čitača. Na slici 4 prikazan je tijek direktnog ELISA testa (Creative Diagnostics, 2009). Prednosti direktnog ELISA testa su:

- uklanjanje križne reaktivnosti sekundarnih antitijela,
- veću brzinu u odnosu na indirektni ELISA test zbog manjeg broja koraka koji se provode,

a nedostaci :

- nisku osjetljivost
- visoku cijenu (Engvall, 2010; Kohl, Ascoli, 2017; Shah, Maghsoudlou, 2016).



Slika 4. Prikaz tijeka direktnog ELISA testa (Creative Diagnostics, 2009)

## 2.2. Kemijski sastav meda i pčelinjih proizvoda

Prema "Pravilniku o medu" med se definira kao sladak prehrambeni proizvod koji proizvode medonosne pčele. To su pčele koje sišu nektar medonosnih biljaka ili sekrete živih dijelova biljaka, zatim skupljaju usisani nektar, dodaju mu vlastite specifične tvari, uklanjaju određenu potrebnu količinu vode procesom isparavanja i odlažu u stanice saća do trenutka sazrijevanja (Pravilnik, 2015).

Također, prema "Pravilniku o medu" definirana je osnovna podjela meda, a to je: a) prema podrijetlu i b) prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja.

Prema podrijetlu, med se dijeli na:

- a) cvjetni ili nektarni med: med koji se dobiva od medonosnih biljaka
- b) medljikovac ili medun: med koji se dobiva od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji nastanjuju žive dijelove biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka.

Prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja, med se dijeli na:

- a) med u saću: med kojeg pčele čuvaju u stanicama svježe izgrađenog saća koji ne sadrži leglo ili u satnim osnovama napravljenim od pčelinjeg voska
- b) med sa saćem ili med s dijelovima saća
- c) cijedeći med: stanice saće s medom se otklope, vrši se ocjeđivanje i na takav način se dobije cijedeći med
- d) vrcani med: upotrebom vrcaljke, odnosno vrcanjem dobije se ova vrsta meda
- e) prešani med: med koji se dobiva na način da se saća bez legla preša na hladno ili korištenjem umjerene temperature koja ne bi trebala prelaziti 45 °C
- f) filtrirani med: med koji nastaje tako što se uklanjanjem stranih anorganskih ili organskih tvari značajno uklanjaju zrnca peludi, te to smanjuje prehrambenu vrijednost (Pravilnik, 2015).

Postoji i med za industrijsku uporabu, koji se prema Pravilniku iz 2015. godine naziva pekarski med. To je med koji se koristi u prehrambenoj industriji i može se koristiti kao sastojak hrane koja će se prerađivati, te može imati strani okus ili miris, biti prevrlo ili pregrijan (Pravilnik, 2017).

Otkriće meda datira još od najranijih vremena te je prvo pismeno spominjanje meda bilo na sumerskom jeziku zapisano na ploči koja potječe iz 2100. - 2000. godine prije Krista. Na tom

zapisu govori se o medu kao lijeku i namirnici jer med se od tih najranijih vremena koristio u prehrambene i medicinske svrhe. U mnogo različitih kultura med je imao i određenu vrstu medicinske uloge zbog svojih svojstava, obzirom da je zabilježena njegova primjena za liječenje opekotina, mrene, čireva i općenito zacjeljivanje rana. Smatra se da djeluje smirujuće pri nanošenju na otvorene rane. Med se zahvaljujući svojoj visokoj osmolarnosti može ponašati kao zaštitna barijera u slučaju njegovog nanošenja na rane, te tako sprječiti nastanak i razvoj bakterija na području rane. Za vrijeme razvoja i života prvih ljudi na zemlji, med je bio jedino prirodno dostupno sladilo i kao takav vrlo važan prehrambeni proizvod za *Homo sapiens*. Također, dugo je predstavljao izrazito značajan izvor ugljikohidrata (Alvarez-Suarez i sur., 2010).

Obzirom na sastav, med je složena smjesa više različitih sastojaka kao što su: šećeri (u najvišem udjelu glukoza i fruktoza), proteini, enzimi, aminokiseline, anorganske kiseline, vitamini, hormoni i mineralne tvari. Među navedenim sastojcima, najveći udio općenito u medu zauzimaju šećeri glukoza i fruktoza, dok su neki sastojci prisutni u nižim udjelima: fenolne kiseline, flavonoidi, određeni enzimi i aminokiseline poznati po svojim antioksidacijskim svojstvima. Fruktoza i glukoza, kao glavne komponente meda tijekom probave se vrlo brzo prenose u krvotok i na taj način zadovoljavaju dio potreba tijela za energijom. Količina od 20 g meda može pokriti otprilike 3 % dnevnih potreba organizma za energijom. Med sadrži oko 0,5 % proteina koje najviše sačinjavaju enzimi, a prisutne su i slobodne aminokiseline. Udio elemenata u tragovima i mineralnih tvari pod vrlo velikim je utjecajem botaničkog i geološkog podrijetla meda. Elementi u tragovima su usko vezani uz biomedicinsku aktivnost te imaju puno poznatih ali i još uvijek nepoznatih uloga. Iz tog razloga su provedena brojna istraživanja o sadržaju elemenata u tragovima i mineralnih tvari u medu. Općenito, udio vitamina u medu je nizak, a prisutni vitamini uključuju: vitamin K, vitamine B1, B2, B6 i niacin. Aromu meda čine brojni hlapljivi sastojci, prema nekim istraživanjima više od 500 hlapljivih sastojaka. Sastojci arome u različitim vrstama meda najviše ovise o botaničkom podrijetlu meda. Jedan od primjera spojeva koji karakteriziraju aromu meda je metil antranilat koji je detektiran u citrusnom medu i karakterističan je za tu vrstu meda (Alvarez-Suarez i sur., 2010). Svojstva i sastav meda koji ga karakterizira i čini specifičnim izrazito je pod utjecajem regije i sezone proizvodnje, vremena skladištenja u stanicama saća, sorte pčela, vrste biljke koja predstavlja izvor nektara, načina berbe i skladištenja nakon provedene berbe (Bilikova i sur., 2015).

Poznata je činjenica da je med osnovna hrana kolonijama pčela, ali također je značajan izvor više različitih antimikrobnih spojeva čija je uloga obrana živih organizama. Med je vrlo vrijedan proizvod i zahvaljujući antibakterijskom djelovanju koje se može izraziti kao peroksidno i

neperoksidno djelovanje. Peroksidno djelovanje se javlja kao posljedica nastajanja vodikovog peroksida koji predstavlja enzimski produkt nastajanja glukonske kiseline iz glukoze, a neperoksidno djelovanje može se povezati s antimikrobnim spojevima cvjetnog podrijetla, te proteinima i peptidima pčela prisutnim u medu (Bilikova i sur., 2015).

Također, postoji više različitih pčelinjih proizvoda, među kojima se s obzirom na specifičan sastav i primjenu najviše ističu matična mliječ i propolis. Tim pčelinjim proizvodima pripisuju se i brojni pozitivni učinci na zdravlje (Šuran i sur., 2016; Oršolić, 2013; Furusawa i sur., 2016).

Mliječ je tekućina koju izlučuju posebne žlijezde, a medonosne pčele je koriste za opskrbu matice i ličinki hranom. Postoje tri vrste mliječi:

- radilička,
- trutovska i
- matična mliječ.

Matična mliječ sadrži pantotensku kiselinu, biopterin i nebiopterin u količini koja je deset puta viša u odnosu na radiličku i trutovsku mliječ. Također, matična mliječ sadrži protein rojalaktin koji utječe pozitivno na medonosne pčele skraćivanjem perioda koji je potreban za njihov razvitak te povećanjem veličine tijela. Poznato je kako protein rojalaktin (engl. *Major Royal Jelly Protein 1*; MRJP1) ima vrlo značajnu ulogu u diferencijaciji pčela matica. Matična mliječ kod ljudi se može koristiti u medicinske svrhe. Smatra se da povoljno djeluje na usporavanje procesa starenja, sprječava razvitak dijabetesa regeneracijom oštećenih stanica gušterače, te da ima protutumorska, antialergijska i antimikrobna svojstva. Zahvaljujući 10-hidroksi-decenskoj kiselini i zasićenim dikarboksilnim kiselinama, matična mliječ posjeduje izrazitu protutumorsku aktivnost. Ona djeluje tako što potiče nastanak limfocita T koji se bore protiv tumorskih stanica. Na temelju istraživanja na miševima, kojima se pokušalo dokazati da matična mliječ ima i antialergijska svojstva, zaključeno je da je glavni protein MM 3 (engl. *Major Royal Jelly Protein 3*; MRJP3) tvar kojoj se pripisuju antialergijska svojstva (Furusawa i sur., 2016; Oršolić, 2013).

Obzirom na sastav, najviši udio u matičnoj mliječi zauzima voda, 60 – 70 %, udio proteina iznosi 10 – 18 %, šećera 9 – 15 %, masti 1,5 – 7 %, anorganskih tvari 0,7 – 1,5 %, a matična mliječ sadrži i određene enzime, neuroprijenosnike (acetilkolin i kolin) te spolne hormone (estradiol, testosteron, progesteron) (Oršolić, 2013). Aktivitet vode (aw) prelazi vrijednost 0,92 iako matična mliječ pokazuje visoku mikrobiološku stabilnost. Jednu od značajnijih skupina sastojaka koje grade matičnu mliječ čine fenoli, steroli, gliceroli, vosak, neutralne masti, fosfolipidi i slobodne organske kiseline. Što se tiče slobodnih organskih kiselina koje ulaze u

sastav matične mliječi, najčešće se radi o monohidroksi i dihidroksi kiselinama te dikarboksilnim kiselinama s 8 ili 10 ugljikovih atoma. Hidroksi kiseline koje su građene od 10 ugljikovih atoma se mogu nalaziti u visokim koncentracijama. Identifikacija ovih spojeva može se koristiti kao kriterij definiranja izvornosti matične mliječi i pomoću njih moguće je detektirati prisutnost matične mliječi u različitim prehrambenim i kozmetičkim proizvodima provođenjem odgovarajućih analiza (Sabatini i sur., 2009). Proteini koji su prisutni u matičnoj mliječi čine oko polovinu suhe tvari i velikim dijelom su topljivi u vodi. Glavni proteini matične mliječi (engl. *Major Royal Jelly Proteins*; MRJPs) čine veliki dio topljivih proteina i imaju devet članova. U sastav matične mliječi ulaze i proteinske supstance koje su bitne za metabolizam ugljikohidrata, a to su: glukoza oksidaza, prethodnik – glukozidaza i glukoza dehidrogenaza (Oršolić, 2013).

Pčelinji proizvod kojem se također pripisuju brojni pozitivni učinci na zdravlje, propolis, je smolasta tvar koja nastaje tako što pčele biljne ekstrakte sakupljene s cvjetnih pupoljaka miješaju s voskom i vlastitim enzimima. Propolis predstavlja glavnu liniju obrane pčela od raznih štetnih utjecaja. Osim toga, koristi se kao materijal koji omogućuje zaglađivanje zidova košnice, štiti od razvitka mogućih bolesti pčela te prekriva razne nametnike uginule u košnici čime se sprečava širenje nastalih bakterija u raspadnutom dijelu tkiva. Smatra se da propolis ima brojne pozitivne učinke na zdravlje ljudi kao što su: imunomodulacijski, protutumorski, protuupalni, antioksidacijski, antimikrobni i antiparazitski učinak (Šuran i sur., 2016).



### **2.3. Primjena ELISA metoda u analizama meda i pčelinjih proizvoda**

U novije vrijeme pojavila se sve veća potreba za provođenjem različitih vrsta analiza u svrhu kontrole kvalitete i određivanja autentičnosti meda, a svoju primjenu u tom području često pronalaze i imunoenzimske metode ili ELISA metode, metode iz skupine imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda. Njihova primjena usmjerena je na detekciju i određivanje specifičnih sastojaka meda, kao što su na primjer enzimi (Baroni i sur., 2002).

Jedan od načina utvrđivanja autentičnosti meda i pčelinjih proizvoda je mjerenje omjera stabilnih izotopa C i N. Međutim, u posljednje vrijeme smatra se da je pri određivanju autentičnosti značajan čimbenik fiziološka funkcija izvornih sastojaka navedenih proizvoda (Ramadan i Al-Ghamdi, 2012). Tijekom utvrđivanja autentičnosti meda moguće je i odrediti porast koncentracije šećera te pad koncentracije proteina. Određivanje autentičnosti meda temeljem detekcije proteina i peptida koje su pčele izlučile u med, predstavlja jedan od novorazvijenih načina za unaprjeđenje kvalitete meda kao funkcionalne hrane (Bilikova i sur., 2015).

ELISA metode, kao što je navedeno, pronalaze primjenu u detekciji proteina u medu i pčelinjim proizvodima, a neke od tih proteinskih supstanci predstavljaju i apalbumin-1 te pčelinji peptid defenzin-1. Jedan od značajnih kriterija za određivanje autentičnosti meda ili pčelinjih proizvoda je prisutnost apalbumina-1. Najčešće se apalbumin koristi kao marker u utvrđivanju autentičnosti matične mliječi (Sabatini i sur., 2009). Smatra se da bi bilo poželjno prilikom stavljanja na tržište meda i pčelinjih proizvoda na ambalaži naznačiti informaciju o koncentraciji apalbumina-1 koji ima izraženu fiziološku aktivnost (Bilikova i sur., 2015). Tijekom određivanja apalbumina-1, kako bi se proveo ELISA test, uzorak je potrebno pripremiti na određeni način. Apalbumin-1 kao glavni protein matične mliječi predstavlja autentičnu supstancu meda. Prije provedbe ELISA testova, često se provodi ultracentrifugiranje uzoraka meda, liofilizacija, a ukoliko je potrebno, uzorak se za analizu čuva pri temperaturi od 20 °C. Poliklonska antitijela protiv standardnog proteina, apalbumina-1, se proizvode procesom imunizacije kunića rekombiniranim apalbuminom-1 te čuvaju pri temperaturi od 20 °C. Nakon pripreme uzoraka i proizvodnje odgovarajućih poliklonskih antitijela, provodi se ELISA test. Jedan od primjera primjene uključuje mikrotitarsku ploču ravnog dna s 96 jažica na koju su dodani odgovarajući razrijeđeni uzorci meda. ELISA metoda može se primijeniti za detekciju apalbumina-1 u uzorcima meda pri čemu posebnu pažnju treba posvetiti odgovarajućim razrjeđenjima uzoraka za koja bi bilo poželjno da budu u rasponu od 0,1 do 0,01 %. U slučajevima nižih razrjeđenja uzoraka meda, ispod vrijednosti 0,1 %, osjetljivost metode je smanjena i zbog utjecaja šećera

koji su u uzorku prisutni u visokim koncentracijama (Bilikova i Šimuth, 2010; Bilikova i sur., 2015).

Određivanje apalbumina-1 u medu ELISA metodom primjenjuje se u različite svrhe koje mogu uključivati:

- a) prvotno određivanje kvalitete i autentičnosti meda
- b) utvrđivanje krivotvorina meda, odnosno zamjena meda i pčelinjih proizvoda sa jeftinim industrijskim sirupima, kao što su kukuruzni sirup i kukuruzni sirup s visokim udjelom fruktoze
- c) određivanje apalbumina-1 u različitim pripravcima koji se koriste tijekom proizvodnje pojedinih prehrambenih proizvoda, kao također i u drugim područjima kao što su proizvodnja kozmetičkih preparata, apiterapija, farmaceutska industrija (Bilikova i Šimuth, 2010; Bilikova i sur., 2015).

Provedeno je i istraživanje sa svrhom praćenja promjena udjela apalbumina-1 u medu pri različitim temperaturama ovisno o pojedinim fazama proizvodnje i skladištenja meda. U želji da se istraži kako temperatura utječe na termostabilnost apalbumina-1, uzorci meda su zagrijavani pri temperaturama 30, 60, 80 i 100 °C u trajanju od 40 minuta. Nakon provedenih analiza ELISA metodama, zaključeno je da se uzorci zagrijavani pri temperaturama od 30, 60 i 80 °C ne razlikuju od nezagrijvanih uzoraka. Pri temperaturi od 100 °C zabilježene su promjene u uzorcima, odnosno utvrđeno je kako se pri toj temperaturi počinje djelomično odvijati proces razgradnje proteina. Zaključeno je da je apalbumin-1 u uvjetima inkubacije koji uključuju temperaturu od 80 °C te period od 40 minuta, u uzorcima meda termostabilan. ELISA metoda se obzirom na vrlo precizne rezultate uspostavila kao vrlo korisna i točna metoda u svrhu određivanja udjela apalbumina-1 u medu (Bilikova i Šimuth, 2010; Bilikova i sur., 2015).

U svrhu kontrole kvalitete meda može se provoditi kvantifikacija pčelinjeg peptida defenzina-1 pri čemu svoju primjenu pronalazi i ELISA test, često po principu kompetitivnog ELISA testa. Primjena imunoenzimskog ELISA testa naročito je pogodna pri utvrđivanju onih vrsta meda za koje se smatra da ispoljavaju visoko antibakterijsko djelovanje, obzirom da je spomenuti peptid defenzin-1, uz  $H_2O_2$ , jedan od bitnih čimbenika koji utječe na antibakterijsku aktivnost meda (Valachova i sur., 2016).

Defenzin-1 je prvi put izdvojen iz matične mliječi i tek je kasnije detektiran u samom medu. Također, detektiran je u hemolimfi pčela te u njihovim glavama i prsnoj žlijezdi. Smatra se da ima izraženu aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija, a puno slabije, u jako rijetkim slučajevima, protiv gram-negativnih bakterija. Defenzin-1 je prisutan u masnom tkivu pčela za

vrijeme određenih imunoloških odgovora ili se pojavljuje u tkivima koja su u neprestanom dodiru sa štetnim izvorima iz okoliša. U slučaju zaraze pčela, defenzin-1 je prisutan u masnom tkivu u tijelu, a kao dio imunološkog odgovora, putuje do hemolimfe. Smatra se da peptid defenzin-1 u organizmu pčela izlučuje hipofaringealna žlijezda. Između ostalog, pčele koriste određene izlučevine te žlijezde za proizvodnju matične mliječi i meda. Koncentracija defenzina-1 je u matičnoj mliječi i medu vrlo varijabilna (Valachova i sur., 2016; Kwakman i Zaat, 2012).

Kompetitivni ELISA test primijenjen je u istraživanju Valachove i suradnika (2016) za određivanje defenzina-1 u uzorcima meda s ciljem kontrole kvalitete meda. Osnovno načelo za provedbu testa u svrhu kvantifikacije defenzina-1 predstavljala je kompeticija između ciljanog analita ili defenzina-1 iz uzorka te konjugiranog antitijela, za vezanje na podlogu sa prethodno odgovarajuće pripremljenim poliklonskim antitijelima. Za početak provedbe testa, prethodno posebno proizvedena primarna antitijela su u odgovarajućoj koncentraciji adsorbirana na jažice mikrotitarske ploče u trajanju od 18 sati pri temperaturi od 4 °C. Zatim su dodani uzorci sa određenim sadržajem defenzina-1 te je uslijedio dodatak pufera za blokiranje s ciljem uklanjanja suvišnih mjesta za vezanje. Kada je dodan pufer za blokiranje, slijedio je dodatak poliklonskih antitijela uz miješanje sadržaja mikrotitarske ploče u trajanju od 5 minuta. Nakon inkubacije tijekom noći pri temperaturi od 4 °C te završnog ispiranja, mjerenje apsorbancije provedeno je na ELISA mikročitaču pri 450 nm. Koncentracija defenzina-1, određena je prema prethodno izrađenom baždarnom dijagramu. Za primjenjene reagense utvrđena je visoko izražena specifičnost prema defenzinu-1 te nisu zabilježene unakrsne reakcije s nekim drugim proteinskim tvarima u medu (Valachova i sur., 2016).

Primjer primjene kompetitivnog ELISA testa predstavlja također i detekcija te kvantifikacija peludi određene vrste suncokreta u uzorcima meda, u uvjetima kada je prisutna preko 10 % s prigodnim linearnim odzivom u rasponu od 10 do 90 % peludi suncokreta (Baroni i sur., 2002). Također, ELISA metodi pripisuje se visoka osjetljivost u slučajevima patvorenja meda. Kompetitivni ELISA test primijenjen je i u istraživanju Hrga i Stjepanović (2013) za određivanje proteina u medu, molekulske mase u rasponu od 33 do 36 kDa, na uzorcima meda s različitim udjelima peludi suncokreta. Prije same analize, ciljani proteini su iz uzoraka monoflornog suncokretovog meda razdvojeni kromatografskim tehnikama. Ukazano je da ELISA metoda može predstavljati alternativnu metodu melisopalinološkoj analizi, službenoj metodi kojom se utvrđuje postotak peludi određene biljne vrste, pa tako i peludi suncokreta u uzorcima meda iz navedenog istraživanja.

Won i suradnici (2009) proveli su istraživanje na uzorcima domaćeg korejskog meda i meda podrijetlom s europskog područja. Tijekom razvoja ELISA testa u svrhu istraživanja, posebno

su proizvedena antitijela specifična za sastojke analiziranih uzoraka. ELISA testom učinkovito je prepoznat glavni protein meda i u slučajevima kada je prisutan u niskoj koncentraciji, što ukazuje na pouzdanost primijenjenog testa, posebno u kombinaciji s SDS elektroforezom (Baroni i sur., 2004; Won i sur, 2009).

Za provođenje analiza na uzorcima prirodnog i umjetnog meda kako bi se utvrdile njihove razlike, primjenu pronalazi i indirektna ELISA metoda. Tijekom razvoja metode u istraživanju Joe i suradnika (2018) proizvedena su specifična antitijela koja su se koristila, temeljem njihovog afiniteta za vezanje sa određenim sastojcima, za detekciju i kvantifikaciju tih sastojaka u medu. Analize su provedene na uzorcima koji su predstavljali određene omjere prirodnog i umjetnog meda, a čiji su pojedini sastojci tijekom provedbe ELISA metode predstavljali ciljane antigene. Posebno proizvedeno, specifično primarno antitijelo prepoznato je od strane glavnih proteina iz uzoraka prirodnog meda, za razliku od uzoraka umjetnog meda. Razvijena ELISA metoda omogućila je utvrđivanje razlika između uzoraka potpuno prirodnog meda i uzoraka meda koji su sadržavali dodane sastojke.

Matična mliječ, tekućina koju izlučuju hipofaringealna i mandibularna žlijezda mladih pčela radilica te koja može biti korištena za prehranu ličinki, poznata je po svojoj biološkoj aktivnosti i zahvaljujući tome se koristi u više različitih područja, u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te za proizvodnju određenih kozmetičkih proizvoda. Raširenost uporabe utjecala je na povećanje uvoza u onim zemljama gdje proizvodnja matične mliječi nije uspjela zadovoljiti potrebe domaćeg tržišta. U svrhu kvantitativnih i kvalitativnih analiza različitih komponenata te provedbe određenih analitičkih testova na komercijalno dostupnim proizvodima, pojavila se potreba za poboljšanjem mogućnosti provođenja različitih analitičkih tehnika čime bi se omogućila bolja pouzdanost i točnost rezultata provedenih analiza (Ramadan i Al-Ghamdi, 2012).

U cilju utvrđivanja autentičnosti matične mliječi, provedena su brojna istraživanja te je zaključeno da jedan od kriterija može predstavljati 10-hidroksi-2-decenska kiselina (10-HDA) čija koncentracija u različitim uzorcima može biti različita, odnosno može varirati u širokom rasponu ( Sabatini i sur., 2009; Ramadan i Al-Ghamdi, 2012).

Utvrđivanje autentičnosti značajno je obzirom na pojavu nepoželjne opskrbe pčela proizvodima koji nisu njihova prirodna hrana te zamjene određenog volumena matične mliječi nekom drugom sirovinom ili pak zamjene cijelog proizvoda nekom drugom sirovinom. Nepoželjni primjeri dodatka više od 25 % jogurta, bjelanjaka, vode i kukuruznog škroba, mogu biti detektirani određivanjem porasta udjela vlage, smanjenja udjela masti, proteina i 10-HDA te

nemogućnosti otapanja u alkalnom mediju (Sabatini i sur., 2009; Ramadan i Al-Ghamdi, 2012). Identifikacijom peludi koju sadrži matična mliječ može se odrediti zemljopisno podrijetlo proizvoda pri čemu stručnjaci imaju mogućnost formiranja svojih vlastitih peludnih baza podataka (Ramadan i Al-Ghamdi, 2012).

Također, jedan od temeljnih načina određivanja kvalitete matične mliječi je praćenje svježine proizvoda te su provedena istraživanja kako bi se utvrdilo kako promjene u udjelu pojedinih sastojaka utječu na svježinu. Sabatini i suradnici (2009) su proveli istraživanje na uzorcima matične mliječi pohranjenim pri temperaturi od 4 °C i 20 °C periodički tijekom 24 mjeseca s ciljem utvrđivanja promjena u sadržaju enzima glukoza oksidaze. Zaključeno je da na taj enzim značajno utječu temperatura i period čuvanja. Prema rezultatima istraživanja, koncentracija enzima glukoza oksidaze se pri temperaturi od 20 °C značajno smanjila tijekom mjesec dana, a nakon godinu dana prisutnost enzima nije zabilježena, što upućuje na njegovu razgradnju. Pri temperaturi od 4 °C zabilježena je također smanjena koncentracija enzima, ali izrazito manje u odnosu na temperaturu od 20 °C.

Nadalje, kao marker za određivanje svježine matične mliječi predložen je apalbumin-1, obzirom da je njegova razgradnja povezana s temperaturom i periodom skladištenja. Glavni proteini matične mliječi (MRJPs) sastoje se od devet članova, a jedan od najvažnijih i najzastupljenijih je MRJP1 ili apalbumin-1, poznat ranije kao rojalaktin. MRJP 1 je glikoprotein koji je dio oligomernog kompleksa i sadrži 432 aminokiselinska ostatka. Molekulska masa apalbumina-1 iznosi 55 – 57 kDa. Pripisuje mu se izrazito visoka biološka aktivnost. Apalbumin-1 potpomaže sintezu DNA stanica (hepatocita) štakora, omogućuje produljivanje procesa umnožavanja hepatocita i povećava proizvodnju albumina. Zahvaljujući svojoj stabilnosti i imunološkoj aktivnosti, apalbumin-1 se može koristiti u svrhu određivanja kvalitete i autentičnosti. Kako bi se provela detekcija MRJP1, u novije vrijeme razvijena je brza ELISA metoda koja pronalazi primjenu u tu svrhu. Osnovni nedostatak metode je dugo razvojno vrijeme te nestabilnost postupka izvedbe (Shen i sur., 2015; Zhang i sur., 2019).

## 2.4. Primjena ostalih imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda u analizama meda

Pri određivanju autentičnosti meda često je značajno odrediti i botaničko podrijetlo istraživanih uzoraka, a smatra se kako u tom području svoju primjenu može pronaći i provedba Imunoblot testova, metoda također iz navedene skupine imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda. Tom metodom provodi se analiza proteina meda koji predstavljaju kemijske markere botaničkog podrijetla meda (Baroni i sur., 2002). Prije provedbe ove metode često se izvodi SDS poliakrilamidna elektroforeza (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Naime, potrebno je razdvojiti proteine koji se nalaze u ispitivanom uzorku na temelju razlike u molekulskoj masi proteina. Nakon razdvajanja, proteini se prenose na nitroceluloznu, sintetsku ili najlonsku membranu i kao takovi izlažu prisutnom specifičnom primarnom antitijelu. Nakon vezanja proteina i primarnog antitijela, na to primarno antitijelo specifično se veže konjugirano sekundarno antitijelo. Mjesto na kojem je došlo do vezanja primarnog antitijela i konjugiranog sekundarnog antitijela vidljivo je kao tamna linija (Butorac i sur., 2013). U svrhu određivanja botaničkog podrijetla meda, Baroni i suradnici (2002), kao što je ranije navedeno, primijenili su Imunoblot test, odnosno Western blot test. Navedeni test, kojim se provode analize proteina meda, ubraja se u skupinu imunoloških, odnosno imunokemijskih testova. Svrha provođenja ove metode u uzorcima meda predstavljala je kvantifikaciju proteina koji mogu imati obilježje kemijskih markera botaničkog podrijetla meda. Nužno je naglasiti da proteini meda potječu iz pčela te iz biljaka, peludi ili nektara. Proteini koji potječu od medonosnih pčela, trebali bi biti jednaki za sve vrste meda i iz tog razloga provodi se utvrđivanje mogućnosti korištenja proteina peludi kao kemijskih markera botaničkog podrijetla meda. U svrhu te analize, u istraživanju Baroni i suradnika (2002) korištena su poliklonska anti – pelud antitijela proizvedena imunizacijom kunića peludi određenih vrsta suncokreta i eukaliptusa. Nakon što je proveden postupak dobivanja poliklonskih antitijela potrebnih za provedbu testa, uzorci meda su također za potrebe naknadne provedbe testa početno najprije analizirani SDS elektroforezom s ciljem razdvajanja ciljanih proteina upotrebom *Coomassie Brilliant Blue R-250*, a na osnovu razlika u njihovoj molekulskoj masi. Nakon toga je proveden Imunoblot test. Proteinske trakice dobivene postupkom SDS elektroforeze prenesene su na nitroceluloznu membranu te odgovarajuće fiksirane. Dodatkom anti – pelud antitijela slijedila je inkubacija 2 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, slijedio je dodatak sekundarnih antitijela. Nastali kompleksi detektirani su završnim kemiluminiscentnim mjerenjima. Primjenom ovog cjelokupnog postupka krajnji rezultati ukazuju da su se anti – pelud antitijela, dobivena imunizacijom primjenom peludi iz određene

vrste suncokreta, vezala na određene proteine različite molekulske mase iz uzoraka ekstrakata meda sa sadržajem peludi suncokreta. Utvrđena molekulska masa proteina bila je u rasponu od 84 do 35 kDa. Također, rezultati pokazuju visoku specifičnost anti – pelud antitijela, dobivenih imunizacijom primjenom peludi iz određene vrste suncokreta, za prepoznavanje proteina iz uzoraka meda sa sadržajem peludi suncokreta. U slučaju anti – pelud antitijela dobivenih imunizacijom primjenom peludi iz određene vrste eukaliptusa, utvrđeno je da antitijela imaju mogućnost povezivanja s proteinima peludi različitih molekulskih masa, a iz uzoraka meda sa određenim sadržajem peludi eukaliptusa. Utvrđene molekulske mase razdvojenih proteina u ovom slučaju bile su u rasponu od 120 do 20 kDa. Međutim, ta antitijela pokazala su sklonost prema povezivanju i s drugim ispitivanim ekstraktima proteina peludi iz uzoraka meda. Zahvaljujući činjenici da se korištenjem SDS elektroforeze mogu projicirati proteini peludi za prepoznavanje od strane antitijela takvih proteina ili čak dijelova tih proteina, proteini peludi mogu se koristiti kao kemijski markeri za utvrđivanje botaničkog podrijetla meda. To je posebno omogućeno primjenom Imunoblot testa (Baroni i sur., 2002).

Jednu od mogućnosti primjene Imunoblot testa ili Western blot testa može predstavljati imunološka karakterizacija glavnih proteina u medu različitih vrsta. Kako bi se navedena metoda mogla provesti, često je prvotno potrebno sastojke uzorka razdvojiti SDS elektroforezom, a završna mjerenja temeljem predhodnih specifičnih vezanja često se provode kemiluminiscentnim mjerenjima (Won i sur., 2009).

U istraživanju koje su provodili Joe i suradnici (2018) primijenjena je Western blot analiza kao metoda za utvrđivanje razlika između prirodnog i umjetnog meda. Metoda je provedena uz primjenu antitijela specifičnih za prepoznavanje profila proteina karakterističnih za med. Proteini iz uzoraka meda razdvojeni su postupkom SDS elektroforeze te preneseni na odgovarajuću membranu. Nakon blokiranja uzoraka odgovarajućim reagensom, slijedila je inkubacija sa specifičnim antitijelima. Nakon ispiranja i dodatka sekundarnog antitijela te odgovarajućeg supstrata, provedeno je završno mjerenje dobivenog signala. Temeljem dobivenih rezultata je zapaženo da specifično antitijelo ima sposobnost prepoznavanja glavnih proteina karakterističnih za prirodni med.

## 2.5. HPLC i PCR metode u analizama meda

Rezultati ELISA testova se često u praksi uspoređuju sa rezultatima analiza provedenih drugim analitičkim tehnikama, kao što su na primjer tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*; HPLC) ili lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*; PCR).

Jedan od primjera gdje su u analizama primijenjeni ELISA test i HPLC metoda je detekcija spoja leptosperina. Kato i suradnici (2014) proveli su istraživanje s ciljem detekcije leptosperina u specifičnoj vrsti meda, manuka medu. Leptosperin je sastojak karakterističan za manuka med. Nehlapljiv je te se smatra kako se može koristiti kao marker manuka vrste meda. Kvantifikacijom ovog sastojka može se utvrditi autentičnost meda, zahvaljujući tome što leptosperin pokazuje visoku linearnost s antibakterijskim djelovanjem. To antibakterijsko djelovanje može biti promijenjeno prilikom skladištenja meda, njegovog transporta do trgovine ili za vrijeme stajanja na policama trgovine. S ciljem praćenja udjela leptosperina može se koristiti ELISA metoda, uz predhodnu posebnu proizvodnju specifičnih monoklonskih antitijela potrebnih za provedbu testova. U svrhu određivanja leptosperina koji tijekom ELISA testova predstavlja ciljani antigen u uzorcima manuka meda, korištena je i HPLC metoda. HPLC metodom provedeno je frakcioniranje uzoraka meda, a dobivene frakcije analizirane su postupkom kompetitivnog ELISA testa. Kako bi se mogao provesti ELISA test, prvotno je bilo potrebno pripremiti monoklonska antitijela sa izraženom specifičnošću prema prepoznavanju leptosperina u uzorcima manuka meda. U istraživanju Kato i suradnika (2014) analizirano je 20 uzoraka manuka meda i određena je koncentracija leptosperina u rasponu od 0,3 do 200  $\mu\text{M}$ . Nakon usporedbe dobivenih rezultata ELISA metodom i HPLC analizom, utvrđena je značajna korelacija. Međutim, utvrđene su više vrijednosti rezultata dobivenih ELISA testom u odnosu na HPLC metodu. To dovodi do zaključka da su postojala određena onečišćenja u uzorcima koja su rezultirala ovakvim vrijednostima nakon provedenog ELISA testa. Istraživanjem je potvrđeno da kvantifikacija leptosperina ELISA metodom može biti korisna pri utvrđivanju autentičnosti manuka meda ili određivanja nezadovoljavanja zahtjevanih parametara kvalitete manuka meda prisutnog na tržištu.

U istraživanju koje su proveli Mahmoudi i suradnici (2014) rezultati dobiveni ELISA testom, kako bi se utvrdila količina ostataka antibiotika oksitetraciklina u uzorcima meda, potvrđeni su i HPLC metodom koja pronalazi primjenu za potvrđne analize rezultata dobivenih ELISA testovima. Značajno je pratiti udio oksitetraciklina u medu, obzirom da ga pčelari po potrebi koriste u svrhu liječenja nekih bolesti pčela, a ostaci ovog antibiotika mogli bi kod ljudi izazvati



otpornost na lijekove te utjecati na neke probavne i alergijske učinke (Münstedt i sur., 2005). Prije početka provedbe samog ELISA testa tijekom istraživanja Mahmoudi i suradnika (2014), 5 grama svakog uzorka meda postavljeno je na vortkes miješalicu s ciljem homogenizacije uzorka, uz dodatak 50 mL fosfatnog pufera. Nakon toga je slijedilo centrifugiranje u trajanju od 30 minuta pri sobnoj temperaturi, zbog uklanjanja peludi i ostalih nečistoća. Prema uputama proizvođača testa, uzorci su pipetirani na dno mikrotitarske ploče, u jažice, na koje su predhodno vezana specifična antitijela. Nakon provedbe testa uz odgovarajuće faze ispiranja, te završnog dodatka stop otopine i promjene boje uzorka iz plave u žutu, na posebnom uređaju ELISA mikročitaču očitana je apsorbancija pri 450 nm i određen udio antibiotika oksitetraciklina u uzorcima meda. Uzorci meda u kojima je, nakon provedbe ELISA testa detektirana prisutnost oksitetraciklina, analizirani su naknadno korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, odnosno HPLC metodom. ELISA testom određeno je da koncentracija oksitetraciklina u uzorcima meda varira u rasponu od  $5,32 \text{ ngg}^{-1}$  do  $369,1 \text{ ngg}^{-1}$ . Za provedbu potvrdnih HPLC analiza tijekom istraživanja Mahmoudi i suradnika (2014), početnih 10 g uzoraka je uz dodatak pufera razdvojeno na koloni, nakon čega je uslijedila homogenizacija. Postupak je nastavljen procesom ekstrakcije, uz dodatak pufera, nakon čega je provedeno centrifugiranje. Kada su provedeni svi koraci pripreme uzoraka, eluati su prebačeni u nove kolonice uz dodatak trikloroctene kiseline. Još jednom je provedeno centrifugiranje te ekstrakcija na čvrstoj fazi uz dodatak vodene otopine metanola. Dobiveni uzorci prosušeni su u struji dušika i otopljeni u mobilnoj fazi te kao takovi analizirani HPLC metodom. Usporedbom rezultata dobivenih ELISA testom i HPLC metodom, zaključeno je da su vrijednosti udjela oksitetraciklina puno niži u slučaju HPLC metode u odnosu na ELISA test. Kod ELISA metode moguća je pojava unakrsne reakcije između oksitetraciklina i njegovih metabolita, a HPLC metodom moguće je prepoznati takvu reakciju.

PCR ili lančana reakcija polimeraze je jedna od vrlo često korištenih metoda u brojnim analizama, a čiji je postupak provedbe jednostavan te predstavlja relativno jeftinu i brzu metodu (Bartlett i Stirling, 2003; Garibyan i Avashia, 2013). Temelji se na umnožavanju točno određenih dijelova DNA strukture kako bi se dobio veći broj identičnih kopija koje se koriste za daljnje potrebne analize. Predstavlja polimeraznu lančanu reakciju obzirom na primjenu enzima DNA polimeraze. Tijekom reakcije, dio određene molekule DNA umnožava se i dobivaju se dvije identične kopije, pa iz dvije kopije četiri, a iz četiri kopije osam te se na taj način nastavlja odvijati postupak. Enzim DNA polimeraza, u reakcijskoj smjesi potreban je za umnožavanje određene sekvence DNA (Chin i sur., 2016). Metoda se može se koristiti u različite svrhe, na primjer utvrđivanja različitih patvorenja u prehrambenoj industriji, detekcije razlika između srodnih vrsta, utvrđivanja autentičnosti različitih prehrambenih proizvoda te detekcije

genetički modificiranih organizama (Chin i sur., 2016). Ova metoda svoju primjenu pronalazi i u analitici meda, odnosno za određivanje autentičnosti meda, u svrhu utvrđivanja entomološkog i botaničkog podrijetla meda. Provedena su brojna istraživanja na uzorcima meda u tu svrhu. Kako bi se moglo utvrditi botaničko podrijetlo određenih uzoraka meda, koriste se određene regije genoma plastida koji u ovom slučaju imaju ulogu biomarkera. U istraživanju koje su provodili Bruni i suradnici (2015), upotrijebljena je rbcL i trnH-psbA regija genoma plastida četiri različita uzorka cvjetnog meda. Kako bi to bilo omogućeno, bilo je nužno poznavati referente podatke. Rezultati su doveli do preko 99 % podudaranja za sve istraživane uzorke cvjetnog meda. U analizama koje su uključivale uporabu gena *cyt2b*, *matk*, *psbA* i *ndhF* biljne peludi karakterizirani su uzorci uniflornog i poliflornog meda. Rezultati dobiveni PCR metodom ukazali su da je od 159 uzoraka koji su svi bili okarakterizirani kao uzorci uniflornog meda, postojalo 11 uzoraka koji su u svom sastavu sadržavali pelud drugih biljnih vrsta. Međutim, ti uzorci nisu bili označeni kao poliflori, već su pogrešno bili predstavljeni kao uzorci uniflornog meda. Soares i suradnici (2018) proveli su analize na uzorcima meda od lavande s ciljem identifikacije botaničkog podrijetla uzoraka, a uz uporabu gena *matK* kao biomarkera. Kada je PCR metoda na tim uzorcima u potpunosti provedena, dobiveni rezultati su pokazali da tri različite vrste meda lavande imaju više od 99 % podudarnosti. Obzirom na određivanje entomološkog podrijetla uzoraka meda, za provedbu PCR metode moguće je koristiti mitohondrijsku određenu podjedinicu rRNA te također podjedinicu I mitohondrijske citokrom c oksidaze. Ovim postupkom, uz sekvenciranje DNA, mogu se identificirati uzorci meda te utvrditi njihove razlike (Tsagkaris i sur., 2021; Soares i sur., 2018; Kek i sur., 2017; Wu i sur., 2017; Bruni i sur., 2015).

### 3. ZAKLJUČAK

1. Imunoenzimski ELISA test (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) predstavlja metodu koja se temelji na svojstvu antitijela da specifično veže ciljani analit ili antigen iz uzorka, te spektrofotometrijskom mjerenju bojane reakcije. Metoda svoju primjenu pronalazi u kvalitativnom i kvantitativnom određivanju različitih sastojaka u prehrambenim proizvodima.
2. U analitici meda i pčelinjih proizvoda imunoenzimska ELISA metoda može se primijeniti u određivanju proteina i peptida koji potiču od pčela, kao što su apalbumin-1 i defenzin-1.
3. Primjere primjene imunoenzimskih ELISA metoda u analitici meda predstavlja također i određivanje peludi određene biljne vrste, određivanje enzima, te određivanje specifičnih proteina u svrhu razlikovanja uzoraka prirodnog meda.
4. Određivanje sastojaka primjenom imunoenzimskih ELISA metoda predstavlja jedan od novorazvijenih načina za unaprjeđenje kvalitete meda i pčelinjih proizvoda.

#### 4. LITERATURA

Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli E., Battino M. (2010) Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* **3**: 15–23.

Aydin S. (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* **72**: 4-15.

Bankova V. (2005) Recent trends and important developments in propolis research. Oxford University Press. *eCAM* **2(1)**: 29–32.

Baroni M. V., Chiabrando G. A., Costa C., Wunderlin D. A. (2002) Assessment of the Floral Origin of Honey by SDS-Page Immunoblot Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 1362–1367.

Baroni M. V., Chiabrando G. A., Costa C., Fagundez G. A. (2004) Development of a Competitive ELISA for the Evaluation of Sunflower Pollen in Honey Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 7222–7226.

Bartlett J. M. S., Stirling D. (2003) A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols. *Methods in Molecular Biology* **226**: 3-6.

Besler M., Kasel U., Wichmann G. (2002) Review: Determination of Hidden Allergens in Foods by Immunoassays. *Internet Symposium on Food Allergens* **4 (1)**: 1 – 18.

Bilikova K., Kristof Krakova T., Yamaguchi K., Yamaguchi Y. (2015) Major royal jelly proteins as markers of authenticity and quality of honey. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **66**: 259-267.

Bilikova K., Šimůth J. (2010) New Criterion for Evaluation of Honey: Quantification of Royal Jelly Protein Apalbumin 1 in Honey by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 8776–8781.

Bruni I., Galimberti A., Caridi L., Scaccabarozzi D., De Mattia F., Casiraghi M., Labra M. (2015) A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food Chemistry* **170**: 308–315.

Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8(3-4)**: 90 – 101.

Cellsignal (2001) Cell Signaling Technology, <<https://www.cellsignal.com/applications/elisa/types-of-elisa-tests>>, Pristupljeno 16. veljače 2021.

Chen Y., Chen Q., He L., Shang B., Zhang L. (2012) Enzyme immunoassay and liquid chromatography-fluorescence detection for amikacin in raw milk. *Food Chemistry* **135**: 380-385.

Chin N. L., Kek S. P., Quek M. C. (2016) DNA-based Method for Identification of Species Origin of Honey and Edible Bird's Nest. *International Conference on Biomedical and Biological Engineering* 417-420., doi.org/10.2991/bbe-16.2016.64

Creative Diagnostics (2009) ELISA Guide, <<https://www.creative-diagnostics.com/ELISA-guide.htm>>, Pristupljeno 16. veljače 2021.

Ecker C., Cichna-Markl M. (2012) Development and validation of a sandwich ELISA for the determination of potentially allergenic lupine in food. *Food Chemistry* **130(3)**: 759–766.

Engvall E. (2010) The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Chemistry* **56**: 319–320.

Furusawa T., Arai Y., Kato K., Ichihara K. (2016) Quantitative Analysis of Apisin, a Major Protein Unique to Royal Jelly. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2016**: 1-9.

Garibyan L., Avashia N. (2013) Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* **133(3)**: 1-4.

Hrga I., Stjepanović B. (2013) Melisopalinoške karakteristike najvažnijih vrsta meda u Republici Hrvatskoj. 3. nacionalna konferencija o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda, ISBN: 978-953-6384-9, str. 16-17.

Joe T., Jeong E., Yoo G., Ahn S., Rhee H., Lee D. C. (2018) The monoclonal antibody for discrimination of natural honey against artificial honey. *Food Science and Nutrition* **6**: 2350–2354.

Kato Y., Araki Y., Juri M., Fujinaka R., Ishisaka A., Kitamoto N., Nitta Y., Niwa T., Takimoto Y. (2014) Immunochemical Authentication of Manuka Honey Using a Monoclonal Antibody Specific to a Glycoside of Methyl Syringate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**: 10672–10678.

Kek S. P., Chin N. L., Tan S. W., Yusof Y. A., Chua L. S. (2017) Classification of entomological origin of honey based on its physicochemical and antioxidant properties. *International Journal of Food Properties* **78**: 150–159.

Kohl T.O., Ascoli C.A. (2017) Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harbor Protocols* (**7**): doi: 10.1101/pdb.prot093740

Kohl T.O., Ascoli C.A. (2017) Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harbor Protocols* (**5**): doi: 10.1101/pdb.prot093708

Kwakman, P.H.S., Zaat, S.A.J. (2012) Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life* **64(1)**: 48–55.

Mahmoudi R., Moosavy M., Norian R., Kazemi S., Reza Asadi Nadari M., Mardani K. (2014) Detection of Oxytetracycline Residues in Honey Samples Using ELISA and HPLC Methods. *Pharmaceutical sciences* **19(4)**: 145-150.

Malviya R., Bansal V., Pal O.P. i Sharma P.K. (2010) High Performance Liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology* **2(5)**: 22-26.

Münstedt T., Rademacher E., Petz M. (2005) HPLC, charm II and ELISA: Advantages and disadvantages for the analysis of tetracyclines in honey. *Apiacta* **40**: 5-9.

Oršolić N. (2013) Učinkovitost biološki aktivnih sastavnica matične mliječi: Analiza i standardizacija. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **64**: 445-461.

Pokhrel P. (2015) ELISA- Principle, Types and Applications, <<https://microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications/>> Pristupljeno 13. veljače 2021.

Pravilnik o izmjenama Pravilnika o medu (2017) *Narodne novine* **47** (NN 47/2017), Zagreb.

Pravilnik o medu (2015) *Narodne Novine* **53** (NN 53/2015), Zagreb.

Ramadana M.F., Al-Ghamdi A. (2012) Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods* **4**: 39-52.

Runje M., Cvrtila Ž. (2006) ELISA u analitici hrane. *Meso* **7**: 92-94.

Sabatini A.G., Marcazzan G.L., Caboni M.F., Bogdanov S., Almeida-Muradian L.B. (2009) Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science* **1(1)**: 1-6.

Shah K., Maghsoudlou P. (2016) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine* **77(7)**: 98-101.

Shen L., Wang Y., Zhai L., Zhou W., Tan L., Li M., Liu D., Xiao F. (2015) Determination of royal jelly freshness by ELISA with a highly specific anti-apalbumin 1, major royal jelly protein 1 antibody. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* **16(2)**: 155-166.

Soares S., Grazina L., Costa J., Amaral J. S. , Oliveira M. B. P. P., Mafra I. (2018) Towards honey authentication: Differentiation of *Apis mellifera* subspecies in European honeys based on mitochondrial DNA markers. *Food Chemistry* **86**: 367–373.

Šuran J., Matanović K., Brozić D., Mašek T., Maćešić N., Radin L., Aladrović J., Božić F., Šeol Martinec B., Lipar M., Smolec O., Benić M., Radić B., Bačić G. (2016) Antimikrobno djelovanje propolisa i mogućnost njegove primjene u veterinarskoj medicini. *Veterinarska stanica* **47 (4)** 381-385.

Tsagkaris A. S., Koulis G. A., Danezis G. P., Martakos I., Dasenaki M., Georgioud C. A., Thomaidis N. S. (2021) Honey authenticity: analytical techniques, state of the art and challenges. *Royal Society of Chemistry* **11**: 11273-11294.

Valachova I., Bučekova M., Majtan J. (2016) Quantification of Bee-Derived Peptide Defensin-1 in Honey by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, a New Approach in Honey Quality Control. *Czech Journal of Food Sciences* **34**: 233-243.

Won S., Li C., Kim J., Rhee, H.I. (2009) Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry* **113(4)**: 1334–1338.

Wu Y., Yang Y., Liu M., Wang B., Li M., Chen Y. (2017) Molecular tracing of the origin of six different plant species in bee honey using real-time PCR. *Journal of AOAC International* **100**: 744–752.

Zhang Y., Chen Y., Cai Y., Cui Z., Zhang J., Wang X., Shen L. (2019) Novel polyclonal antibody-based rapid gold sandwich immunochromatographic strip for detecting the major royal jelly protein 1 (MRJP1) in honey. *PLOS One* **14(2)**: 1-15.



## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Marka Rotim*

---

ime i prezime studenta