

# Imunoenzimske metode u analitici hrane

---

Osvald, Ena

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:784351>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ena Osvald**

7476/PT

**IMUNOENZIMSKE METODE U ANALITICI HRANE**  
**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 hrane**

***Ena Osvald, 0058211111***

**Sažetak:** Imunoenzimske ELISA metode (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; ELISA) su vrlo raširene imunološke, odnosno imunokemijske metode koje, obzirom na visoku osjetljivost i selektivnost, u analitici uzoraka hrane omogućuju određivanje vrlo niskih koncentracija ciljanih analita. Prema dostupnoj znanstvenoj literaturi, svoju primjenu u analitici hrane pronalaze u određivanju potencijalnih alergena, različitih kontaminanata i rezidua, a brojne su prednosti uporabe ELISA metoda u procjeni autentičnosti prehrambenih proizvoda. Usprkos određenim nedostacima, zbog svojih prednosti u odnosu na druge analitičke tehnike i metode, mogu pružiti koristan alat u svrhu kontrole kvalitete i sigurnosti hrane.

**Ključne riječi:** analitika hrane, ELISA, imunoenzimska metoda

**Rad sadrži:** 24 stranice, 1 sliku, 1 tablicu, 57 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:** 15. 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 food analyses**

***Ena Osvald, 0058211111***

**Abstract:** Immunenzyme ELISA methods (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) are often used immunological, respectively and immunochemical methods which, due to their high sensitivity and selectivity, enable the determination of very low concentrations of target analytes in the analyses of food samples. According to the available scientific literature, they find their application in food analyses in the determination of potential allergens, various contaminants and residues, and there are numerous advantages of ELISA methods applications in assessing the authenticity of food products. Despite certain disadvantages, due to their advantages over other analytical techniques and methods, they can provide an valuable tool for the purpose of food quality and safety control.

**Keywords:** ELISA, food analyses, immunoenzyme method

**Thesis contains:** 24 pages, 1 figure, 1 table, 57 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:** 15th July 2021

## Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Imunoenzimske metode.....	2
2.1.1. "Sendvič" ELISA test .....	4
2.1.2. Konkurentni ELISA test .....	5
2.2. Primjeri primjene imunoenzimskih metoda u prehrambenoj industriji .....	6
2.2.1. Imunoenzimske metode u određivanju alergena u hrani .....	6
2.2.2. Imunoenzimske metode u određivanju kontaminanata i rezidua .....	9
2.2.3. Imunoenzimske metode u procjeni autentičnosti prehrambenih proizvoda.	13
3. ZAKLJUČAK.....	18
4. LITERATURA.....	19

## **1. UVOD**

Imunološki testovi temelje se na specifičnosti vezanja ciljanog analita ili antigena i antitijela, a zbog svoje jednostavnosti izvođenja te relativno niske cijene u odnosu na druge analitičke tehnike i metode, nalaze primjenu u prehrambenoj industriji.

Vrlo raširena imunološka, odnosno imunokemijska metoda je imunoenzimska ELISA metoda (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; ELISA) koja omogućuje kvalitativno i kvantitativno određivanje ciljanih analita ili antigena temeljem vezanja antitijela i antigena. Učinkovita ekstrakcija analita iz uzorka je uvijek kritičan korak u analizama hrane, a poseban naglasak treba staviti i na odabir antitijela koja se koriste za imunoenzimske testove koji nude specifične, osjetljive i brze metode za detekciju i kvantifikaciju čak i tragova različitih sastojaka hrane.

Cilj ovoga rada bio je, pregledom znanstvene literature, iznijeti spoznaje o primjeni imunoenzimskih ELISA metoda u analitici hrane.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Imunoenzimske metode

Imunoenzimski testovi dolaze u raznim oblicima i imaju brojne primjene. U analitici prehrambenih proizvoda dostupni su komercijalni testovi, ali i specifični testovi koje analitičari razvijaju za svoje vlastite primjene. Konačna odluka i odabir testova ovisi o opremi u laboratoriju. Imunoenzimske metode pružaju neprocjenjiv alat u analitici prehrambenih proizvoda koje stručnjaci koriste u kontroli kvalitete i osiguravanju sigurnosti prehrambenih proizvoda (Bonwick i Smith, 2004).

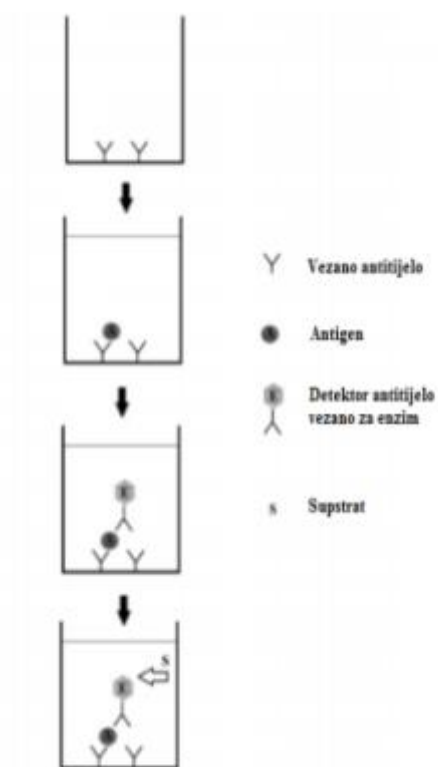
Imunoenzimska ELISA metoda (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; ELISA) često je korištena metoda koja se temelji na vezanju antitijela i antigena iz uzorka, a kojom se određuje količina i prisutnost ciljanih analita ili antigena u hrani. Vezanjem antitijela i antigena dolazi do reakcije, a samim time i do promjene boje čije vrijednosti apsorbancije se očitavaju na spektrofotometru (Butorac i sur., 2013).

ELISA metoda sve više pronalazi primjenu u analitici prehrambenih proizvoda, a obzirom da je visoko osjetljiva i selektivna, omogućuje određivanje vrlo niskih koncentracija analita u ispitivanim uzorcima. Razlikujemo više tehnika imunološkog određivanja pomoću ELISA metode: indirektnu, "sandvič", konkurentnu i novu višestruku i prijenosnu metodu pomoću mikrotitarskih ploča (Butorac i sur., 2013).

ELISA metoda često se koristi i kao "screening" metoda, dajući rezultate o prisutnosti analita ili više njih u uzorku iznad određene razine (Runje i Cvrtila, 2006). Navedenom metodom, ukoliko se koristi kao orijentacijska metoda, moguće je dobiti rezultate unutar nekoliko sati (Marinculić i sur., 2009).

Sam princip ELISA testa uključuje imobilizaciju jednog ili dva antigena ili antitijela na čvrstu podlogu. Problemi separacije su ovim načinom uklonjeni jer nakon reakcije između vezane i nevezane komponente, jedna komponenta ostaje pričvršćena na čvrstu podlogu, dok se ostatak jednostavno uklanja ispiranjem pri čemu vezani reaktant ostaje u obliku koji je moguće izmjeriti. Problem mjerenja signala riješen je na način da se jedna komponenta, odnosno antitijelo, obilježava enzimom. Tako obilježena antitijela moguće je detektirati obzirom da nakon dodatka supstrata za enzim dolazi do promjene intenziteta boje koji se može pratiti, odnosno mjeriti spektrofotometrijski (Bonwick i Smith, 2004).

Prednosti ELISA metode su brojne: jednostavna, brza metoda, moguća automatizacija, koristi standardizirani format jažica, osjetljivost ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), selektivnost, dostupnost reagensa, brzi povrat informacija, niski troškovi, prenosivost. Međutim, metoda ima i određene nedostatke: dulje razvojno vrijeme, moguća križna reaktivnost, učinak matriksa, mogućnost lažno pozitivnih rezultata, potreba potvrđnih metoda, nemogućnost analize više sastojaka istovremeno, otežan uvid u probleme ako nije osigurana kvaliteta testa (Hefle, 2006). Na slici 1 prikazan je primjer tijeka imunoenzimskog ELISA testa.



**Slika 1.** Primjer tijeka imunoenzimskog ELISA testa (Butorac i sur., 2013)



### 2.1.1. "Sendvič" ELISA test

"Sendvič" ili direktna ELISA jedan je od najčešće korištenih imunoloških testova u svrhu detektiranja proteina. Ova metoda omogućuje detekciju i određivanje specifičnih topljivih proteina (Yeung, 2006). "Sendvič" metoda uključuje imobilizirana hvatajuća visoko pročišćena antitijela na mikrojažicama. U nastavku testa dodaje se standardna otopina ili otopina uzorka gdje dolazi do vezanja antigena na antitijelo. Nakon toga, provodi se ispiranje i tada dolazi do uklanjanja antigena koji nisu vezani na primarno antitijelo, odnosno uklanja se nevezani antigen. Zatim se dodaje sekundarno antitijelo obilježeno enzimom te ponovno dolazi do stvaranja veze između specifičnog antitijela i antigena pri čemu se stvara kompleks u kojem je antigen u "sendviču" između primarnog i sekundarnog antitijela. U završnim koracima reakcije dodaje se supstrat koji reagira s enzimom i stvara obojeni produkt čiji intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski, a izmjerena apsorbancija izravno je proporcionalna koncentraciji analita (Besler i sur., 2002). "Sendvič" metoda 2-5 puta je osjetljivija od ostalih metoda (Aydin, 2015).

Prednosti "sendvič" ELISA testa uključuju visoku specifičnost, obzirom da se koriste primarno i sekundarno antitijelo, te se antigen posebno hvata i detektira; mogućnost analiza složenijih uzoraka obzirom da antigen ne zahtijeva čišćenje prije mjerenja; fleksibilnost i osjetljivost. Primjer tijeka "sendvič" ELISA testa uključuje imobilizaciju primarnog antitijela na dno jažica mikrotitarske ploče, stvaranje veze između antigena i primarnog antitijela, dodavanje sekundarnog antitijela obilježenog enzimom i njegovo vezanje na nastali antigen – antitijelo kompleks, te dodavanje supstrata koji u reakciji s enzimom daje obojeni produkt, uz ispiranje između svake od navedenih faza (Pokhrel, 2015).

### 2.1.2. Konkurentni ELISA test

Konkurentni ili kompetitivni ELISA test uključuje imobiliziranje antigena i njihovo vezanje na dno mikrojažica. U pojedine jažice se dodaje određena količina primarnog antitijela i slobodnog antigena iz uzorka, čime dolazi do stvaranja kompleksa između antitijela i slobodnog i imobiliziranog antigena. Zatim slijedi ispiranje čime se uklanja nevezani antigen te dodatak konjugiranog antitijela, obilježenog enzimom koje se veže na antigen-antitijelo kompleks. Dodatkom supstrata, koji je specifičan za enzim, dolazi do nastanka obojenog produkta. Ukoliko u analiziranom uzorku nisu prisutni antigeni, antitijelo na koje je vezan enzim, pokazat će najveći mogući afinitet prema antigenu koji je imobiliziran na čvrstu fazu što rezultira visokim vrijednostima apsorbancije nastalog obojenog produkta. Povećanjem udjela antigena u analiziranom uzorku dolazi do inhibicije vezanja antitijela označenih enzimima na podlogu, a time i nižih vrijednosti apsorbancije (Besler i sur., 2002). Jedna od značajnih prednosti konkurentnog ELISA testa je mogućnost kvantitativnog analiziranja uzoraka koji sadrže niske koncentracije analita (Cellsignal, 2001). Primjer tijeka konkurentnog ELISA testa uključuje inkubaciju primarnog antitijela i slobodnog antigena prisutnog u ispitivanom uzorku, dodatak prethodno nastale smjese u jažice mikrotitarske ploče, te kompeticiju slobodnog i imobiliziranog antigena za vezanje sa antitijelom, zatim dodatak sekundarnog antitijela obilježenog enzimom i njegovo vezanje na postojeći antitijelo–antigen kompleks, te na kraju dodatak supstrata specifičnog za enzim i nastanak bojenog produkta, uz postupke ispiranja između svake od navedenih faza reakcije (Pokhrel, 2015).

## 2.2. Primjeri primjene imunoenzimskih metoda u prehrambenoj industriji

### 2.2.1. Imunoenzimske metode u određivanju alergena u hrani

Alergija ili preosjetljivost (hipersenzitivnost) na hranu reakcija je organizma na neki od sastojaka hrane koji za posljedicu ima promjenu imunološkog odgovora organizma. Preosjetljivost na hranu može biti alergijska ili nealergijska (Johansson i sur., 2001). Prilikom kontakta organizma s alergenom tvari, obrambeni sustav se mijenja i dolazi do reakcije između alergena (najčešće proteina iz hrane) i alergen specifičnih antitijela, prethodno proizvedenih od strane imunološkog sustava organizma osjetljivih pojedinaca (Bock i sur., 2001). Kod reakcija posredovanih imunoglobulinima E (IgE), simptomi se pojavljuju u roku od nekoliko minuta do sat vremena nakon konzumiranja hrane. Simptomi se obično vežu uz smetnje u probavnom (akutno povraćanje, bol u trbuhu i dijareja) i dišnom sustavu (kašalj, promjena glasa i promuklost) te razne promjene na koži poput ekcema, osipa, akutne urtikarije ili angioedema. Dodatno se mogu pojaviti i poteškoće poput hipotenzije i disritmije, a anafilaksija može uključivati sve navedene simptome i sustave (Sampson i sur., 1992). Nutritivni alergeni su po kemijskome sastavu najčešće proteini molekulske mase iznad 100 000 kD ili tvari vezane na proteine (haptene) (Čvorišćec i sur., 2001).

Kao tvari ili proizvodi koji uzrokuju alergije i netolerancije navode se:

- žitarice koje sadrže gluten, tj. pšenica, raž, ječam, zob, pir, kamut ili njihovi križanci, te proizvodi od tih žitarica;
- rakovi i proizvodi od rakova;
- jaja i proizvodi od jaja;
- riba i riblji proizvodi;
- kikiriki i proizvodi od kikirikija;
- zrna soje i proizvodi od soje;
- mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući laktozu), osim: sirutke koja se upotrebljava za proizvodnju alkoholnih destilata (uključujući etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla) i laktitola;
- orašasto voće, tj. bademi, lješnjaci, orasi, indijski oraščići, pekan orasi, brazilski orasi, pistacije, makadamije ili kvinslandski orasi te njihovi proizvodi;
- celer i njegovi proizvodi;
- gorušica i proizvodi od gorušice;

- sjeme sezama i proizvodi od sjemena sezama;
- sumporni dioksid i sulfiti pri koncentracijama većim od 10 mg kg<sup>-1</sup> ili 10 mg L<sup>-1</sup> računati kao ukupni SO<sub>2</sub>;
- lupina i proizvodi od lupine;
- mekušci i proizvodi od mekušaca (Uredba EU br. 1169, 2011).

Imunološki, odnosno imunokemijski testovi najčešće su metode koje se koriste za određivanje alergena u prehrambenih proizvodima, a pogodni i učestali su za određivanje alergena u hrani zbog osjetljivosti, specifičnosti i granice detekcije. Imunoenzimska ELISA metoda jedna je od imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda koja koristi enzimom obilježena antitijela za detekciju ciljanog analita, u ovom slučaju alergena, pri čemu enzim sudjeluje u nastanku obojene reakcije koja omogućuje mjerenje signala i određivanje ciljanog analita, na primjer alergena. U analitici prehrambenih proizvoda, za određivanje alergena najviše se koriste ELISA metode po principu "sandvič" i konkurentnog testa. Skriveni alergeni u hrani problem su s kojim se u posljednje vrijeme susreću i osobe s alergijama na hranu i prehrambena industrija. Kako bi se odredili tragovi alergena u hrani, bilo je potrebno povećati osjetljivost ELISA testa, a to je omogućeno uporabom posebno proizvedenih sekundarnih antitijela. Razvijene su ELISA metoda za detekciju i kvantifikaciju bilo čitavih proteinskih ekstrakata hrane, bilo određenih prehrambenih alergena, za različite vrste namirnica poput badema, kravljeg mlijeka, lješnjaka, kikirikija, soje, pšenice (Besler, 2002). Budući da osjetljivi pojedinci često reagiraju na različite alergene hrane time se dodatno otežava izbor metode. Obzirom da se većina prehrambenih proizvoda termički obrađuje, procesi proizvodnje hrane poput prženja i ekstruzije mogu imati značajan utjecaj na topljivost i ekstrakciju ciljanih proteina, kao i na sposobnost antitijela koja se koriste u imunoenzimskim ELISA testovima da ih prepoznaju. Na rezultate analize alergena u hrani mogu utjecati interakcije sa sastojcima u uzorku hrane (npr. polifenoli i tanini), smanjena topljivost i reaktivnost toplinski denaturiranih proteina, te razlike u proteinskom profilu uzoraka različitih obzirom na vrstu, sortu ili zemljopisno podrijetlo (Abbott i sur., 2010). Posebna pozornost posvećuje se alergijama na kikiriki, a potencijalni rizik za pojedince s alergijom na kikiriki može se pojaviti zbog učestale konzumacije namirnica koje sadrže kikiriki, nepravilnog označavanja te kontaminacije kikirikijem sirovina ili u proizvodnji. (Koppelman i sur., 1996; Whitaker i sur., 2005). Upravo iz tog razloga potrebne su pouzdane metode određivanja alergena kikirikija za osiguranje usklađenosti s označavanjem hrane i poboljšanja zaštite potrošača. Međutim, detekcija alergena u hrani

može biti vrlo otežana, budući da su alergeni često prisutni u tragovima i mogu biti maskirani matriksom hrane (Poms i sur., 2004). Mehanizam nastanka alergije na proteine kikirikija još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no poznato je da je to jedan od najčešćih oblika reakcije posredovane IgE (EFSA, 2014). Najčešća metoda za određivanje proteina kikirikija koja se koristi je ELISA metoda zbog visoke preciznosti, jednostavnog rukovanja i dobrog potencijala za standardizaciju (Poms i sur., 2004). Na tržištu su dostupni setovi za provedbu ELISA testova različitih proizvođača koji za detekciju pojedinih alergena koriste različite principe testa, a najviše se izdvajaju "sandvič" i konkurentni ELISA test. Antitijela koja se primjenjuju u ELISA testu proizvode se imunizacijom različitih životinja donora (zec, miš, koza, konj, ovca, kokoš) (Poms i sur., 2005). Korištenjem monoklonskih antitijela moguće je detektirati pojedine epitope antigena (alergena), dok je korištenjem poliklonskih antitijela moguća detekcija svih epitopa koje nosi alergeni (Goodwin, 2004). Zbog razlika u komercijalno dostupnim ELISA testovima i pripreme samog uzorka, te pH primijenjenog ekstrakcijskog pufera dostupnog u setu, utječe se na učinkovitost ekstrakcije proteina iz matriksa uzorka, koja je izuzetno značajna za daljnju analizu. Testovi pojedinih proizvođača se također razlikuju obzirom na otopine standarda kikirikija koje se koriste za izradu baždarne krivulje. Neki testovi kao standard koriste pročišćeni ekstrakt proteina kikirikija, a neki sadrže ukupni topljivi ekstrakt proteina kikirikija (Zeleny i Schimmel, 2010). Za detekciju alergena u *in vitro* uvjetima osjetljivost, limit detekcije i kvantifikacije analitičkog sustava trebali bi biti dovoljno niski kako bi se omogućila detekcija alergena u uzorku koja potencijalno može izazvati alergijsku reakciju kod hipersenzibiliziranih osoba. Zbog toga bi granice detekcije komercijalno dostupnih ELISA testova za detekciju pojedinih alergena u hrani trebale biti od 1 do 100 mg kg<sup>-1</sup>. Na tržištu su dostupni ELISA testovi za određivanje alergena kikirikija s limitom detekcije za najčešće alergene kikirikija Ara h 1 od 0,1 mg kg<sup>-1</sup>, za Ara h 2 od 20,5 mg kg<sup>-1</sup> te za proteine kikirikija 2,5 mg kg<sup>-1</sup>. Limit kvantifikacije za Ara h 1 i Ara h 2 varira u rasponu od 1 do 20 mg kg<sup>-1</sup>, odnosno od 1 do 15 mg kg<sup>-1</sup>, te od 3,3 do 90 mg kg<sup>-1</sup> za proteine kikirikija (Fielder i sur., 2010). Pomès i suradnici (2003) određivali su udio alergena kikirikija Ara h 1 ELISA metodom u 83 različita prehrambena proizvoda. Detektirani udio alergena Ara h 1 kretao se u rasponu od 0,1 µg g<sup>-1</sup> do 500 µg g<sup>-1</sup>. Utvrđeno je da se ova metoda može koristiti za praćenje eventualne kontaminacije alergenom Ara h 1 tijekom procesa proizvodnje te za određivanje najniže količine (0,2 mg) pri kojoj dolazi do povećanja reaktivnosti organizma s određenim antigenom u osoba s nutritivnom alergijom na kikiriki (Pomès i sur., 2003).

Prednosti ELISA metode u određivanju alergena su brzo i jednostavno korištenje, prikladan i standardiziran format određenog broja jažica, osjetljivost, selektivnost na tragove alergena, dostupnost reagensa, brza obrada podataka, niski početni troškovi i prenosivost. Nedostaci su dugotrajno razvojno vrijeme, moguća križna kontaminacija, učinci matriksa hrane, mogući lažno pozitivni rezultati, te nemogućnost analiza više sastojaka istovremeno (Koppelman i Hefle, 2006).

### 2.2.2. Imunoenzimske metode u određivanju kontaminanata i rezidua

Imunoenzimske ELISA metode se često upotrebljavaju pri određivanju tragova kontaminanata i rezidua u prehrambenim proizvodima upravo zbog svoje visoke osjetljivosti, jednostavnosti i brzine izvođenja. Zbog niza prednosti ELISA testova, poput visoke osjetljivosti, preciznosti, malih troškova, kratkog vremena analize, jednostavnosti, ali i činjenice da ti testovi ne zahtijevaju skupu opremu niti pripremu uzoraka u više koraka, ELISA testovi se mogu koristiti u svrhu određivanja akrilamida u različitim prehrambenim proizvodima (Oracz i sur., 2011). Posljednjih se godina intenzivno istražuje mehanizam nastajanja akrilamida u hrani, njegovi učinci u organizmu, procjena izloženosti, kao i eventualni mehanizmi sprečavanja odnosno smanjenja nastanka akrilamida pri obradi hrane (HAH, 2013). Akrilamid ( $C_3H_5NO$ ) je kemijski spoj bijele boje bez mirisa koji dolazi u formi kristala (Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016). Akrilamid se već dugi niz godina primjenjuje u brojnim industrijama, a o tom sastojku se više počelo govoriti od 2002. godine kada je u sklopu istraživanja, koje su provodili znanstvenici Sveučilišta u Stockholmu u suradnji sa Švedskom agencijom za hranu (engl. *National Food Agency*, NFA), otkrivena njegova prisutnost u hrani bogatoj škrobom obrađenoj pri visokim temperaturama. Daljnjim istraživanjima potvrđeno je da akrilamid nastaje u mnogim namirnicama pripremljenim procesima prženja ili pečenja, dok s druge strane, u sirovim i kuhanim namirnicama uopće nije prisutan. Neke od rizičnih namirnica u kojima češće dolazi do stvaranja akrilamida su orašasti plodovi, soja, suho voće, kava, pekarski proizvodi te prženi i pečeni krumpir (HAH, 2013). Akrilamid se od 1994. godine nalazi na popisu Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) kao vjerojatno kancerogena tvar za ljude što znači da njegova kancerogena svojstva nisu još do kraja istražena (HAH, 2013). ELISA metoda i njena primjena u određivanju akrilamida zahtjeva sintezu specifičnih antitijela. Izolacijom akrilamid vezajućih antitijela omogućeno je kvantitativno određivanje akrilamida u hrani. Zbog niske molekulske mase, akrilamid ne može sam izazvati sintezu

specifičnih antitijela, međutim, razvojem metoda je omogućeno povezivanje na imunostimulirajuće proteinske nosače koji potom stimuliraju sintezu antitijela (HAH, 2013).

U svrhu zaštite potrošača i sprječavanja širenja antibiotičke rezistencije, određivanje rezidua antibiotika u uzorcima životinjskog podrijetla, postalo je nužnim. Kontrola rezidua antibiotika i njihove najveće dopuštene količine u pojedinim organima, mlijeku i tkivima životinjskog podrijetla regulirana je na razini Europske unije. U tu svrhu koristi se, između ostaloga, i ELISA metoda. ELISA test je najčešće korištena imunoenzimska metoda u kontroli rezidua antibiotika. Temelji se na osjetljivosti enzimske reakcije između antitijela i antigena čija se reakcija mjeri spektrofotometrijski. Antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim mikroorganizmima inhibirajući im razvoj ili uništavajući ih. Utvrđeno je da se ELISA metoda može smatrati preciznom, dovoljno osjetljivom i pogodnom metodom za određivanje rezidua tetraciklinskih antibiotika u mišićnom tkivu životinja. Orijentacijske metode (engl. *screening methods*) omogućavaju obradu velikog broja uzoraka u što kraćem vremenu te detekciju svih potencijalno pozitivnih uzoraka. Pozitivni uzorci dalje se analiziraju kvantitativnom potvrdnom metodom koja omogućuje jasnu identifikaciju i kvantifikaciju analita (Makovec i sur., 2014). Ostaci antibiotika u namirnicama životinjskog podrijetla zabrinjavaju Regulatorne agencije kao i potrošače, stoga su pouzdane, brze, selektivne i osjetljive metode poput "*screening metoda*" nužne kako bi se osigurala sigurnost hrane (Chafer-Pericas i sur., 2010).

Kontrola mikotoksina u hrani i hrani za životinje postala je vodeći cilj za proizvođače, zakonodavna tijela i znanstvenike širom svijeta, a sve u svrhu zaštite zdravlja potrošača i smanjenja ekonomskih gubitaka. Ona za prehrambene proizvode predstavlja proces koji se sastoji od uzorkovanja, pripreme uzoraka, ekstrakcije mikotoksina iz matriksa, identifikacije i kvantifikacije mikotoksina. S obzirom na raznolikost kemijskih struktura, korištenje samo jedne tehnike za analizu mikotoksina nije dovoljno, te je stoga razvijen i validiran velik broj analitičkih tehnika (Köppen i sur., 2010). Mikotoksini (grč. *mykes-gljiva, toxicon-otrov*) su toksični proizvodi sekundarnog metabolizma nekih vrsta plijesni. Mogu imati kancerogena, mutagena, imunotoksična i teratogena svojstva. Način unosa mikotoksina u ljudski organizam uglavnom je putem kontaminirane hrane, a rjeđe udisanjem ili transdermalnim putem. Bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikotoksikoze (Köppen i sur., 2010). Analitičke tehnike koje se koriste pri određivanju mikotoksina u hrani mogu se podijeliti na kromatografske, imunoenzimske i brze testove. Neki od

postupaka ekstrakcije mikotoksina iz uzoraka hrane su tekućinsko-tekućinska ekstrakcija, kruto-fazna ekstrakcija, ekstrakcija superkričnim tekućinama, gel kromatografija i imunoafinitetno pročišćavanje. Prednosti i nedostaci nekih analitičkih tehnika koje se koriste pri određivanju mikotoksina prikazani su u Tablici 1 (Lattanzio i sur., 2009; Pleadin i sur., 2018). Pri određivanju mikotoksina primijenjuje se i imunoenzimska ELISA metoda. Često se koristi u obliku velikog broja komercijalno dostupnih testova za detekciju i kvantifikaciju glavnih mikotoksina kao što su aflatoksini, okratoksini, zearalenon, deoksinivalenol, fumonizini, T-2 toksin. Komercijalni ELISA testovi sadrže potrebne reagense i materijale. Međutim, set može detektirati samo jedan mikotoksin te je predviđen za jednokratnu uporabu. Validacija ovih testova uključuje procjenu analitičkog raspona, limit detekcije, osjetljivost, točnost i preciznost postupka kod različitih kontaminiranih uzoraka hrane. Jedan od imunoreagensa je obično imobiliziran na dnu i zidovima jažica. Princip ELISA testa omogućuje učinkovito odvajanje vezanih i slobodnih komponenata analitičkog sustava nakon imunokemijske reakcije. Obzirom da su mikotoksini monovalentni antigeni, obično se koristi kompetitivna ELISA tehnika (Alshannaq i Yu, 2017 Pleadin i sur., 2018; Siegel i Babuscio, 2011). Prednost ELISA tehnike je njezina jednostavnost uporabe iako postoji mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata zbog unakrsnih reakcija, ali i zbog uporabe istog seta na različitim uzorcima hrane, ili lažno negativnih rezultata zbog inhibicije antitijela od strane sastojaka uzorka (Siegel i sur., 2011).



**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci analitičkih tehnika koje se koriste pri određivanju mikotoksina (Lattanzio i sur., 2009; Pleadin i sur., 2018)

Metoda	Prednosti	Nedostaci
GC <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-simultano određivanje više mikotoksina</li> <li>-dobra osjetljivost metode</li> <li>-potvrдна metoda (MS detektor)</li> <li>-mogućnost automatizacije (<i>autosampler</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-potrebna derivatizacija</li> <li>-skupa oprema</li> <li>-<i>carry-over</i> efekt</li> <li>-varijacije u reproducibilnosti i Ponovljivosti</li> </ul>
HPLC <sup>2</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-dobra osjetljivost, selektivnost i ponovljivost metode</li> <li>-mogućnost automatizacije (<i>autosampler</i>)</li> <li>-kratko vrijeme trajanje analize</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-skupa oprema</li> <li>-mogućnost potrebe derivatizacije</li> <li>-potrebno znanje stručnjaka</li> </ul>
LC/MS <sup>3</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-simultano određivanje više mikotoksina</li> <li>-dobra senzitivnost metode</li> <li>-potvrдна metoda (MS detektor)</li> <li>-mogućnost automatizacije (<i>autosampler</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-vrlo skupa oprema</li> <li>-potrebno znanje stručnjaka</li> </ul>
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> <li>-dobra senzitivnost metode</li> <li>-pogodna kao <i>screening</i> metoda</li> <li>-simultano određivanje više mikotoksina</li> <li>-jeftina oprema</li> <li>-dostupnost službenih metoda</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>cross-reaktivnost</i> sa srodnim mikotoksinima</li> <li>-mogućnost interferencija u matriksu</li> <li>-mogućnost lažnih pozitivnih/negativnih rezultata</li> <li>-potrebna potvrдна metoda</li> </ul>
Brzi testovi	<ul style="list-style-type: none"> <li>-brze i jednostavne metode</li> <li>-jeftina oprema</li> <li>-pogodne kao <i>screening</i> metode</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-mogućnost lažnih pozitivnih/negativnih rezultata</li> <li>-nedostatak validiranih metoda</li> <li>-<i>cross-reaktivnost</i> sa srodnim Mikotoksinima</li> </ul>

<sup>1</sup> engl. *Gas Chromatography*, GC, <sup>2</sup> engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC, <sup>3</sup> engl. *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*, LC/MS

### 2.2.3. Imunoenzimske metode u procjeni autentičnosti prehrambenih proizvoda

Autentičnost hrane (izvornost) podrazumijeva vjerodostojnost svih podataka istaknutih na oznakama hrane (deklaraciji) i to od naziva hrane, popisa sastojaka, neto količine punjenja ambalaže ili podrijetla. Proizvođač je dužan udovoljiti svim važećim propisima definiranog naziva hrane. Odstupanja od tvrdnji i navoda na deklaraciji smatraju se nesukladnostima s propisima o hrani koji se u slučaju dokazane namjere mogu smatrati prijevarom. Patvorenje hrane uključuje upotrebu sirovina ili sastojaka koji su niže kakvoće te posljedično i niže cijene proizvoda te prodaju proizvoda pod lažnim nazivom (Asensio i sur., 2008).

Imunoenzimska ELISA metoda je dobro prilagođena za određivanje autentičnosti hrane obzirom da je osjetljiva i specifična te brza, jeftina i lako izvediva. Ulaganje u opremu je manje zahtjevno u odnosu na druge tehnike. Usprkos pojedinim nedostacima primjene ELISA metode u ovom području, ova tehnika može, u kombinaciji s drugim analitičkim tehnikama, potrošačima osigurati zaštitu od nepoštene prakse u prehrambenoj industriji (Asensio i sur., 2008).

Meso je osnovna namirnica animalnog podrijetla te se dobiva klanjem različitih vrsta životinja, odnosno odstrelom ili klanjem divljači. U užem smislu meso predstavlja skeletno mišićje životinja za klanje i divljači s priležećim kostima, hrskavicama, masnim tkivom, limfnim žlijezdama, limfnim i krvnim žilama i živcima. S druge strane u širem smislu, mesom smatramo i jestive dijelove trupa zaklane životinje (iznutrice, masno tkivo, krv). Meso je u prehrani najvažniji izvor proteina (Živković, 1986), a osim proteina izvor je i omega-3 masnih kiselina, vitamina B<sub>12</sub> i željeza, sadrži mineralne tvari, te fosfor, kalij, cink (Grujić i sur., 2012). Utvrđivanje patvorenja proizvoda od mesa nedeklariranim vrstama mesa vrlo je značajno s različitih stajališta. Patvorenje hrane, na način da njezin sastav odstupa od navedenog na deklaraciji može također imati negativne posljedice na zdravlje potrošača. Konzumiranje proizvoda koji sadrže nedeklarirane animalne ili biljne proteine lako može uzrokovati i alergijske reakcije kod osjetljivih pojedinaca (Asensio i sur., 2008). Imunoenzimska ELISA metoda je jedna od najkorištenijih metoda za procjenu autentičnosti i detekciju vrsta mesa, a razlog tome je specifičnost i osjetljivost izvođenja tehnike, ali i brzina i analiza velikog broja uzoraka (Asensio i sur., 2008). Imunoenzimska ELISA metoda predstavlja vrlo osjetljivu metodu koja uključuje vezanje ciljanih analita ili topljivih antigena na čvrstu podlogu, te naknadno ispiranje nevezanog materijala. Za provedbu testa koriste se mikrotitarske ploče sa određenim brojem,

najčešće 96 (12 x 8) jažica, te antitijela označena enzimom, često peroksidazom. Za svaki imunološki, odnosno imunokemijski postupak je značajno da je jedan od čimbenika reakcije poznat da bi se pomoću njega drugi mogao detektirati. Zbog sastojaka koji mogu utjecati na pojavu "lažno negativnih" odnosno "lažno pozitivnih" rezultata uvijek je potrebno uključiti kontrolne uzorke (Naglić i Hajsig, 1993). ELISA metodom ne utvrđuje se isključivo vrsta mesa nego i različiti biljni proteini koji se često koriste kao dodatni sastojci u mesnoj industriji. Korištenjem primjerenih antitijela i standarda, ELISA testom moguće je odrediti proteine soje, proteine graška i gluten u toplinski obrađenim mesnim proizvodima (Runje i Cvrtila, 2006). ELISA metoda se pokazala korisnom u određivanju niskih koncentracija alergena soje te se stoga može koristiti u kontroli kvalitete prehrambenih proizvoda. Prema istraživanju Janković i suradnika (2015) ukazano je da je neophodna kontrola prisustva proteina soje i glutena u mesnim proizvodima jer je u 29,6 % slučajeva prisutnost ovih alergena utvrđena u mesnim proizvodima, ali nije naznačena na njihovoj deklaraciji, što predstavlja visok rizik za potrošače. Proteini soje često se dodaju u hranu zbog svojih nutritivnih i funkcionalnih svojstava i ne navode na deklaraciji te na taj način dolazi do patvorenja koja uzrokuju potencijalnu opasnost za zdravlje, najviše za osobe sklone alergijama. Upravo zbog toga, ELISA metoda se koristi za detekciju ove zamjene proteina i sprječavanje namjernog ili nenamjernog povišenja cijene (Asensio i sur., 2008). Utvrđivanje vrste mesa u toplinski obrađenim ili neobrađenim prehrambenim proizvodima predstavlja jednu od primjena ELISA testova. Svaki pouzdani test, a posebice ako je jednostavan, brz i jeftin, poput ELISA testa, od iznimnog je značaja u postupcima utvrđivanja vrste mesa u današnje vrijeme kada je zbog mnoštva razloga, deklariranje vrste mesa u pojedinim namirnicama obavezno (Runje i Cvrtila, 2006). ELISA testovi, koji se mogu odvijati prema principu "sendvič", konkurentnih, direktnih i indirektnih testova, pogodni su za detekciju vrste mesa u prehrambenim proizvodima. Pojedini primjenu pronalaze za analize uzoraka sirovog mesa, a različiti komercijalno razvijeni testovi pogodni su za analize toplinski obrađenih uzoraka pri čemu istovremeno ne omogućuju određivanje vrste mesa u sirovim uzorcima. Naime, strukture antigena svojstvene za vrstu mesa tijekom toplinske obrade podliježu strukturnim promjenama (dolazi do razaranja strukture proteina) te posljedično antitijelo ne prepoznaje ciljani analit ili antigen (Hofmann i sur., 1996). Istraživanjem učinkovitosti ELISA testa utvrđena je pouzdanost rezultata u uzorcima u kojima je količina tražene vrste mesa bila viša od 1 %. ELISA test koristan je i prihvatljiv i kod određivanja sadržaja mesa piletine, konja i kлокana s granicom detekcije od 1 %, dok je za kvantitativnu analizu svinjskog mesa pogodan samo za uzorke koji sadrže između 1 % i 5 % svinjskog

mesa (Runje i Cvrtila, 2006). Macedo-Silva i suradnici (2000), nakon istraživanja uz primjenu ELISA metode za detekciju različitih vrsta mesa u uzorcima hamburgera, zaključuju kako je ELISA metoda korisna u kontroli kvalitete hamburgera te se može koristiti kao metoda standardiziranja mesnih proizvoda.

Riba i riblji proizvodi zauzimaju značajno mjesto u prehrani, između ostalog zbog lake probavljivosti, povoljnog omjera aminokiselina te bogatog sadržaja vitamina i mineralnih tvari. Iako riba i riblji proizvodi zauzimaju posebno mjesto u prehrani te se odlikuju povoljnim učincima na zdravlje ljudi, različiti kemijski, biokemijski i mikrobiološki procesi odmah nakon ulova uvjetuju postmortalne promjene koje dovode u pitanje njezinu svježinu, zdravstvenu ispravnost, kvalitetu i održivost. Upravo iz tog razloga su načini prerade i kontrole ribljeg mesa najčešće znatno rigorozniji u odnosu na druge vrste mesa. Postmortalnom bakterijskom dekarboksilacijom esencijalne aminokiseline histidina koju provodi enzim histidin-dekarboksilaza u ribi se oblikuje histamin, jedan od najproučavanijih biogenih amina koji može negativno utjecati na zdravlje ljudi. Histamin igra važnu ulogu u samom imunološkom sustavu te drugim fiziološkim i patološkim procesima. Neželjeni simptomi se kod osjetljivih pojedinaca javljaju kao posljedica konzumacije hrane s visokom koncentracijom histamina (Kapo i sur., 2018). Kapo i suradnici (2018) analizirali su prisustvo i udio histamina u uzorcima konzervirane ribe (tunjevina, sardina, sardina s rajčicom, skuša i haringa), paštete od ribe (tuna, losos i posna pašteta od tune) i svježe ribe (lokorda, divovske lignje, tuna i srdela) ELISA metodom, a dobiveni rezultati potvrđuju potrebu za stalnom kontrolom prisustva histamina u namirnicama bogatim proteinima (riba, sir, mlijeko, meso), čime se nastoji osigurati prevencija nepovoljnih utjecaja na zdravlje osjetljivih pojedinaca. U navedenom istraživanju, za određivanje histamina korišten je test čiji se princip zasniva na antigen-antitijelo reakciji, te koji je sadržavao standarde histamina u koncentracijama 0, 1, 2, 4, 8 i 12 mg kg<sup>-1</sup>. ELISA metoda učinkovito je primijenjena te su dobiveni rezultati pokazali da je 84 od 86 analiziranih uzoraka sadržavalo manje od 100 mg kg<sup>-1</sup> histamina što je bilo u skladu s regulativom. Prepoznavanje vrste ribe nakon prerade je jako otežano i odvija se uz dosta poteškoća, ali je vrlo značajno u određivanju autentičnosti proizvoda obzirom da, nakon što su morfološke karakteristike tijekom prerade uklonjene, postoji velika opasnost da se dijelovi ribe i ribljih proizvoda visoke kvalitete i cijene zamijene ribom i dijelovima ribe lošije kvalitete uz istu ili pak višu cijenu te lažnom deklaracijom. Od iznimnog je značaja da laboratoriji za kontrolu hrane posjeduju raspoložive metode za utvrđivanje određenih sastojaka kako bi se spriječile nepoželjne radnje u preradi i prodaji ribe i ribljih proizvoda te kako bi se olakšala kontrola sadržaja histamina. Iako je

sama detekcija vrste ribe otežana i rjeđe se provodi zbog raznolikosti vrsta, upravo imunoenzimski ELISA metoda predstavlja jednu od tehnika koja analitičarima omogućuje detekciju vrste. Imunoenzimski ELISA testovi koji primjenu pronalaze u analitici ribe i ribljih proizvoda, odlikuju se jednostavnošću i niskom cijenom, a nedostatak im je smanjena točnost pri određivanju histamina u proizvodima dobivenima soljenjem i dozrijevanjem u salamuri, kao i činjenica da zahtijevaju različite postupke pripreme uzoraka, te iako su setovi prijenosni, nisu prikladni za analize izvan laboratorija (Asensio i sur., 2008; Janči, 2016).

Mlijeko je nutritivno vrijedna namirnica koja pozitivno utječe na zdravlje potrošača. Kako bi dobili zdravstveno ispravno mlijeko bez štetnih mikroorganizama, ali i kako bismo utvrdili tehnološku ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda, kao i njihovu autentičnost, važan preduvjet za dobivanje ispravnog proizvoda jesu analize poput ELISA metode. Utvrđivanje autentičnosti mlijeka i mliječnih proizvoda značajno je kako bi se izbjeglo patvorenje i osigurala ispravna deklaracija na pakiranjima (Xue i sur., 2011). Vrste korištenog mlijeka u proizvodnji sira i drugih mliječnih proizvoda potrebno je navesti na proizvodu. U svrhu dokazivanja autentičnosti i detekciju vrste mlijeka, kao pouzdane, brze, jednostavne i osjetljive analitičke metode izdvajaju se imunoenzimski ELISA metode. ELISA metode koje svoju primjenu pronalaze u tu svrhu, obzirom na princip testa, su direktna, konkurentna i "sandvič" metoda koje omogućuju detekciju dodataka niskih udjela kravljeg mlijeka u ovčje ili kozje mlijeko. Primjenjuje se i ELISA metoda po principu indirektnog testa, uz antitijela specifična za goveđi  $\beta$ -kazein tijekom kvalitativne i kvantitativne kontrole dodatka kravljeg mlijeka u sireve gdje se ne navodi sadržaj kravljeg mlijeka na deklaraciji proizvoda (Hurley i sur., 2004; López-Calleja i sur., 2006; Asensio i sur., 2008). Prema Song i suradnicima (2010) indirektna ELISA metoda prikladna je za utvrđivanje patvorenja kozjeg mlijeka kravljim mlijekom. Rezultati koji su dobiveni istraživanjem pokazuju da blokirana antitijela jedva pokazuju reaktivnost s goveđim  $\alpha$ ,  $\kappa$ -kazeinom i mliječnim proteinom sirutke. Patvoreni uzorci kozjeg mlijeka (od pasmina Saanen i Guanzhong) proizveli su sličnu titracijsku krivulju što označuje da njihovi kazeini imaju slično imunogeno djelovanje. Granice detekcije navedene metode bile su 2 % za različite vrste mlijeka, uključujući sirovo mlijeko, termički obrađeno mlijeko i kozje kazeine. Primijenjena ELISA metoda omogućuje utvrđivanje patvorenja u rasponu od 2 % do 50 %. Osim utvrđivanja autentičnosti mlijeka i mliječnih proizvoda, postoje brojni imunoenzimski ELISA testovi razvijeni za određivanje alergena mlijeka s osjetljivošću do 1 mg kg<sup>-1</sup> (Poms i sur., 2004). Većina testova temelji se na principu konkurentnog ELISA testa i detekciji kazeina, BSA (engl. *bovin serum albumin*), *beta-*

laktoglobulina ili proteina sirutke uz granicu detekcije između 0,1 i 5 mg kg<sup>-1</sup> (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2014). U fermentiranim mliječnim proizvodima linearni epitopi mogu biti hidrolizirani, ali zadržavaju alergijski učinak. Epitopi otpušteni od "roditeljskih" proteina mogu ostati nedetektirani kod uobičajeno korištene imunoenzimske ELISA metode po principu "sandvič" ELISA testa (de Luis i sur., 2007). Međutim, ELISA metoda po principu konkurentnog testa može biti uspješno primijenjena za detekciju "skrivenih" peptida u kompleksnim uzorcima u sličnim uvjetima (Monaci i sur., 2006).

Sve je veći broj istraživanja koja se odnose na utvrđivanje autentičnosti voćnih sokova. Voćni sokovi su polidisperzni sustavi koji se razlikuju po veličini čestica tkiva voća i njihovoj topljivosti u vodi, a većinom sadrže oko 11 % topljivih tvari (Levaj, 2013). Mogu se razlikovati prema sirovini od koje su proizvedeni, kemijskom sastavu i načinu pakiranja. Sve navedeno usko je povezano s kvalitetom gotovog proizvoda. Učestalo praćenje kvalitete sirovina, proizvodnog procesa i gotovog proizvoda od presudnog je značaja kako bi se dobio proizvod siguran za potrošača, ujednačenog kemijskog sastava i senzorskih svojstava. Posebno se ističe kontrola kvalitete sokova od agruma. Kako bi se osigurala autentičnost proizvoda, ali i osiguralo da potrošači zadrže povjerenje, potrebne su osjetljive analitičke metode za detekciju sastojaka koje sadrže voćni sokovi. Sass-Kiss i Sass (2002) su tijekom istraživanja peptida grejpa, limuna i naranče proizveli poliklonalna antitijela specifična za karakteristične peptide kore grejpa i naranče. Specifično razvijena i proizvedena antitijela mogu pronaći svoju primjenu u imunološkim, odnosno imunokemijskim metodama određivanja pojedinih sastojaka u voćnim sokovima (Asensio i sur., 2008). Sass-Kiss i Sass (2002) su tijekom navedenog istraživanja peptida grejpa, limuna i naranče primijenili jednu od imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda, Western blot metodu uz prethodno razdvajanje pet peptida iz soka i jednog peptida iz kore primjenom SDS poliakrilamidne elektroforeze (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Utvrđeno je da su peptidi molekulske mase 46, 62 i 82 kDa detektirani isključivo u uzorcima pripremljenim iz soka grejpa i limuna, dok je u narančinom soku detektiran jedino peptid molekulske mase 82 kDa. Rezultati ukazuju da pojedina razvijena specifična poliklonska antitijela, kao i peptidi detektirani u soku i kori mogu pronaći svoju primjenu prilikom utvrđivanja autentičnosti soka od grejpa.

### **3. ZAKLJUČAK**

1. Imunoenzimske ELISA metode (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; ELISA) sve više pronalaze primjenu u analitici hrane, a obzirom da su visoko osjetljive i selektivne, omogućuju određivanje vrlo niskih koncentracija ciljanih analita.
2. ELISA metode obuhvaćaju široku primjenu u analitici hrane te se koriste za određivanje potencijalnih alergena, različitih kontaminanata i rezidua, a brojne su prednosti njihove uporabe u procjeni autentičnosti prehrambenih proizvoda.
3. Imunoenzimske ELISA metode mogu zbog svojih prednosti u odnosu na druge analitičke tehnike i metode, usprkos pojedinim nedostacima, pružiti koristan alat u svrhu kontrole kvalitete i sigurnosti hrane.

#### 4. LITERATURA

Abbott M., Hayward S., Ross W., Benreheb Godefroy S., Ulberth F., Van Hengel A.J., Roberts J., Akiyama H., Popping B., Yeungi J.M., Wehling P., Taylor S.L., Poms R.E., Delahaut P. (2010) Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: Community guidance and best practices. *Journal of AOAC International* **93**: 442-450.

Alshannaq A., Yu J.H. (2017) Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **14**: 632-652.

Asensio L., González I., García T., Martín R. (2008) Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* **19**: 1–8.

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.

Badanjak Sabolović M., Rimac Brnčić S. (2016) Utjecaj procesa pripreme na udio akrilamida u prerađenoj hrani. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11(1- 2)**: 79-84.

Besler M., Kasel U., Wichmann G. (2002) Review: Determination of hidden allergens in foods by immunoassays. *Internet Symposium on Food Allergens* **4**: 1–18.

Bock S.A., Munoz-Furlong A., Sampson H.A. (2001) Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **107**: 191–193.

Bonwick G.A., Smith C.J. (2004) Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *International Journal of Food Science and Technology* **39**: 817-827.

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**: 90-101.



Cellsignal (2001) Cell Signaling Technology, <https://www.cellsignal.com/applications/elisa/types-of-elisa-tests>, Pristupljeno 13. travnja 2021.

Chafer-Pericas C., Maquiera A., Puchades R. (2010) Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry* **29(9)**: 1038-1049

Čvorišćec B., Marković-Stipić A., Ostojić V. (2001) Genetički preinačene namirnice -novi izvor alergena? U: Genetički preinačena hrana-zdravstveni rizik, da ili ne? Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb.

de Luis R., Perez M. D., Sanchez L., Lavilla M., Calvo M. (2007) Development of two immunoassay formats to detect beta-lactoglobulin: influence of heat treatment on betalactoglobulin immunoreactivity and assay applicability in processed food. *Journal of Food Protection* **70**: 1691 - 1697.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2014) Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal* **12**: 72-82.

European Food Safety Authority (EFSA) (2014) Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal* **12(11)**: 112–116.

Fielder R., Higgs W., Barden K. (2010) Nutt allergen detection. U: *Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists*, Popping B., Diaz-Amigo C., Hoenicke K. J., ur., Wiley & Sons, Inc, str. 377–406.

Goodwin P. R. (2004) Food allergen detection methods: A coordinated approach. *Journal of AOAC International* **87(6)**: 1383–1390.

Grujić R., Grujić S., Vujadinović D. (2012) Funkcionalni proizvodi od mesa. *Hrana u zdravlju i bolesti* **1**: 44-54.

HAH (2013) Hrvatska agencija za hranu, [<https://www.hah.hr/wp-](https://www.hah.hr/wp-)

<content/uploads/2015/10/Znanstveno-izvjesce-o-rezultatima-istrazivanja-akrilamida-u-hrani-za-2014-godinu.pdf>> Pristupljeno 26. travnja 2021.

Hefle S. (2006) Methods for detecting peanuts in food. U: Detecting allergens in food Koppelman S.J., Hefle S.L., ur., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 185-200.

Hofmann K., Fischer K., Muller E., Kemper V. (1996) Experiments to demonstrate the effectiveness of heat treatments applied to canned meats and meat-and-bone meals. *Fleischwirtschaft* **76(9)**: 920-923.

Hurley I.P., Coleman R.C., Ireland H.E., Williams J.H. (2004) Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *Journal of Dairy Science* **87**: 543-549.

Janči T. (2016) Mogućnost primjene Raman spektroskopije pri kontroli kvalitete ribe. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Janković V., Matekalo-Šverak V., Lakičević B., Spirić B., Petronijević R. (2015) Soybean and gluten in meat products – costumer protection strategy. *Procedia Food Science* **5**: 121-124.

Johansson S. G., Hourihane J. O., Bousquet J. (2001) A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from EAACI nomenclature task force. *Allergy* **56**: 813-824.

Kapo N., Kriještorac I., Smajlović A. (2018) Detekcija histamina u uzorcima konzervirane i svježe ribe. *Prvi hrvatski časopis o mesu* **325**: 325-328.

Koppelman S.J., Bleeker-Marcelis H., Duijn G., Hessing, M. (1996) Detecting peanut allergens. The development of an immunochemical assay for peanut proteins. *World of Ingredients* **12**: 35–38.

Koppelman S.J., Lakemond C.M., Vlooswijk R., Hefle S.L. (2004) Detection of soy protein in processed food: literature overview and new experimental work. *Journal of AOAC International* **87**: 1398-1407.

Koppelman S.J., Hefle S.L. (2006) Detecting allergens in food, 1. izd., CRC Press, Boca Raton, Boston, New York, Washington DC; Woodhead Publishing Limited, Cambridge England.

Köppen R., Koch M., Siegel D., Merkel S., Maul R., Nehls I. (2010) Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. Applied Microbiology and Biotechnology **86**: 1595-1612.

Lattanzio V. M. T., Pascale M., Visconti A. (2009) Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. Trends in Analytical Chemistry **28(6)**: 758-768.

Levaj B. (2013) Prehrambene tehnologije namirnica biljnog podrijetla, Prehrambeno – biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

López-Calleja J.M., Gonzáles I., Fajardo V., Hernández P.E., García T., Martín R. (2006) Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. International Dairy Journal **17**: 87-93.

Macedo-Silva A., Barbosa S.F.C., Alkmin M.G.A., Vaz A.J., Shimokomaki M., Tenuta-Filho A. (2000) Hamburger meat identification by dot-ELISA. Meat Science **56**: 189-192.

Makovec S., Kos B., Šušković J., Bilandžić N. (2014) Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **9(1-2)**: 7-16.

Marinculić A., Habrun B., Barbić Lj., Beck R. (2009) Biološke opasnosti u hrani. HAH-Hrvatska agencija za hranu, str. 28.

Monaci L., Tregoat V., Hengel A., Anklam E. (2006) Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. European Food Research and Technology **223**: 149-179.

Naglić T., Hajsig D. (1993) Veterinarska imunologija. Udžbenik Sveučilišta u Zagrebu. Školska knjiga, Zagreb.

Oracz J., Nebesny E., Zyzelewicz D. (2011) New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta* **86**: 23–34.

Pleadin J., Vasilj V., Petrović D. (2018) Mikotoksini – Pojavnost, prevencija i redukcija, Sveučilište u Mostaru, Mostar.

Yeung J. (2006) Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in foods. U: *Detecting allergens in food*, Koppelman S.J., Hefle S.L., ur., Woodhead Publishing, Cambridge, str. 109-124.124.

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

Pomés A., Helm R. M. Bannon, G. A., Burks A. W., Tsay A., Chapman M. D. (2003) Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**: 640–645.

Poms R.E., Klein C.L., Anklam E. (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants* **21**: 1–31.

Poms R.E., Delahaut P. (2010) Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: Community guidance and Best practices. *Journal of AOAC International* **93**: 442-450.

Poms R. E., Agazzi M. E., Bau A., Brohee M., Capelletti C., Nørgaard J., Anklam E. (2005) Inter laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate. *Food Additives and Contaminants* **22(2)**: 104 – 112.

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

Sampson H.A., Mendelson L., Rosen J.P. (1992) Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *The New England Journal of Medicine* **327**: 380–384.

Sass-Kiss A., Sass M. (2002) Distribution of various peptides in citrus fruits (grapefruit, lemon and orange). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 2117-2120.

Sharma H.P., Bansil S., Uygungil B. (2015) Signs and symptoms of food allergy and food-induced anaphylaxis. *Pediatric Clinics of North America* **62**: 1-16.

Siegel D., Babuscio T. (2011) Mycotoxin management in European cereal trading sector. *Food Control* **22**: 1145-1153.

Song H., Xue H., Han Y. (2010) Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control* **22**: 883-887.

Uredba (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća (2011) Službeni list Europske unije L **304** (SL L 304/2011).

Whitaker T.B., Williams K.M., Trucksess M.W., Slate A.B. (2005) Immunochemical analytical methods for the determination of peanut proteins in foods. *Journal of AOAC International* **88**: 161–174.

Xue L., Li G.P., Liu Q., Wang H.H., Liu C., Ding X., He S., Jiang H. (2011) Inorganic chemistry **50**: 3680-3690.

Zeleny R., Schimmel H. (2010) Towards comparability of ELISA results for peanut proteins in food: A feasibility study. *Food Chemistry* **123**: 1343–1351.

Živković J. (1986) Higijena i tehnologija mesa. II dio. Kakvoća i prerada. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, GRO "Tipografija", Đakovo.

## 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.*

Handwritten signature of Ena Čvrdlo in black ink on a light blue background.

---

ime i prezime studenta