

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Imunoenzimske metode u procjeni kvalitete meda i pčelinjih proizvoda

Immunoenzyme methods in assessment of the quality of honey and bee products

Karla Rotim, Ksenija Marković, Nada Vahčić*

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author: nvahcic@pbf.hr

Sažetak

Imunoenzimska ELISA metoda (engl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) se istražuje u posljednje vrijeme kao brza, jednostavna i visokospecifična analitička metoda za unaprjeđenje i standardizaciju kvalitete meda i pčelinjih proizvoda. Med i pčelinji proizvodi se osim zbog nutritivne vrijednosti učestalo koriste i zbog brojnih pozitivnih bioloških učinaka, a ELISA metoda svoju primjenu u standardizaciji njihove kvalitete može pronaći kod utvrđivanja autentičnosti, botaničkog podrijetla te razlikovanja uzoraka prirodnog meda. Metoda se razvija u svrhu određivanja pčelinjih proteina i peptida, kao što su apalbumin-1 i defensin-1, a koji mogu predstavljati biljege izvornosti. Imunoenzimska ELISA metoda primjenu pronalazi i u određivanju peludi određene biljne vrste u svrhu utvrđivanja botaničkog podrijetla, te pri procjeni kvalitete određivanjem enzima, kao i u svrhu razlikovanja uzoraka prirodnog meda određivanjem specifičnih proteina.

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

Abstract

The Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) has recently been investigated as a fast, simple and highly specific analytical method for improving and standardisation of the quality of honey and bee products. Apart from their nutritive value, honey and bee products are often used due to their numerous positive biological effects, and the ELISA method can find its application in standardisation of their quality through determination of authenticity, botanical origin, and distinguishing natural honey samples. The method is being developed for the purpose of determination of bee-derived proteins and peptides, such as apalbumin-1 and defensin-1, which may be markers of botanical origin. Immunoenzyme ELISA method is also used in determination of pollen of certain plant species for the purpose of determination of botanical origin, and in assessment of quality by determination of enzymes, as well as for the purpose of distinguishing natural honey samples by determination of specific proteins.

Keywords: bee products, ELISA, honey, immunoenzyme method

Uvod

Med odlikuju brojni sastojci jedinstvenih nutritivnih i bioaktivnih svojstava, ovisno o vrsti biljaka od kojih pčele sakupljaju nektar, uključujući fruktozu i glukozu koje su prisutne u najvišem udjelu (80 do 85 %), vodu (15 do 17 %), pepeo (0,2 %), proteine i aminokiseline (0,1 do 0,4 %), te enzime, vitamine i druge sastojke, poput fenolnih spojeva u tragovima (Visweswara Rao i sur., 2016.). Fenolni spojevi, smatra se, najviše utječu na antioksidacijski potencijal meda, a njihov udjel se obzirom na brojne provedene rezultate istraživanja na uzorcima različitih vrsta meda kreće u rasponu vrijednosti od 56 do 500 mgkg⁻¹ meda (Bogdanov i sur., 2008). Najzastupljeniji flavonoidi u medu su flavoni, flavanoli i flavonoli. Poznato je da doprinose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti meda, a povoljni učinci na zdravlje pripisuju se najčešćim flavonoidima; apigeninu, katehinu, krizinu, galanginu, genisteinu, kamferolu, luetolinu, miricetinu i kvercetin, te fenolnim kiselinama koje uključuju kafeinsku, klorogensku, cimetnu, elaginsku, ferulinsku, galnu, p-kumarinsku i p-hidroksibenzojevu kiselinu (Cianciosi i sur., 2018). Fenolni sastav meda uglavnom ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu na temelju kojeg se može provesti klasifikacija i procjena autentičnosti, osobito u slučaju uniflornih vrsta meda. Općenito, ovi spojevi sadrže najmanje dvije hidroksilne skupine i često su povezani sa šećerima, uglavnom glukozom kao i ksilozom, galaktozom, ramnozom, arabinozom i glukoramnozom, a navedeni spojevi su prisutni u medu i u obliku aglikona. Smatra se da se fenolni aglikoni lakše apsorbiraju kroz crijevnu barijeru, u usporedbi sa glikoziliranim fenolnim spojevima (Cianciosi i sur., 2018). Antimikrobna svojstva meda pripisuju se visokom udjelu šećera, niskom pH, udjelu vodikovog peroksida (H₂O₂), metilglioksala (MGO), pčelinjih peptida poput defensina-1 i drugih sastojaka koji su predmet brojnih istraživanja (Stephens i sur., 2010; Brudzynski i sur., 2012; Al-Nahari i sur., 2015; McLoone i sur., 2016; Osés i sur., 2016; Sousa i sur., 2016; Henatsch i sur., 2018; Ghramh i sur., 2019; Al-Brahim i Mohammed, 2020; Nayaka i sur., 2020; Almasaudi, 2021; Fernandes i sur., 2021). Visoki udjeli šećera i nizak udjel vode u medu uzrokuju osmotski stres mikrobnim stanicama, a niske vrijednosti pH inhibiraju rast mnogih mikroorganizama. Međutim, istraživanja upućuju na činjenicu da su i drugi čimbenici u medu odgovorni za njegovo antimikrobno djelovanje (McLoone i sur., 2016).



Pčelinjim proizvodima kao što su matična mliječ i propolis se zahvaljujući njihovom specifičnom sastavu također pripisuju različiti pozitivni učinci na zdravlje te imaju široku primjenu (Šuran i sur., 2016; Oršolić, 2013; Furusawa i sur., 2016). Mliječ izlučuju žlijezde medonosnih pčela za opskrbu matice i ličinki hranom, a osim matične mliječi razlikujemo i radličku te trutovsku mliječ. Matičnu mliječ odlikuje deset puta viši udjel pantotenske kiseline, bipterina i neobiopterina u odnosu na radličku i trutovsku mliječ. Biološka aktivnost matične mliječi, tekućine koja se izlučuje putem hipofaringealne i mandibularne žlijezde mladih pčela radilica, najviše se pripisuje udjelu masnih kiselina, proteina i fenolnih spojeva. Smatra se da matična mliječ učinkovito djeluje na usporavanje degenerativnih promjena, sprječava pojavu i razvoj dijabetesa obnavljanjem oštećenih stanica gušterače, a funkcionalna svojstva uključuju antimikrobnu, protuupalnu, antioksidacijsku, antialergijsku i protutumorsku aktivnost. Svoju primjenu pronalazi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Raširenost uporabe u pojedinim zemljama nadilazi potrebe domaćih tržišta što rezultira povećanim uvozom. Kako bi se postigle pouzdanije i točnije procjene komercijalno dostupnih proizvoda, istražuju se mogućnosti poboljšanja provedbe različitih analitičkih tehnika s ciljem detekcije i kvantifikacije pojedinih specifičnih sastojaka (Furusawa i sur., 2016; Oršolić, 2013; Ramadan i Al-Ghamdi, 2012). Značajan sastavni dio matične mliječi čine proteini koji su u većem dijelu topljivi u vodi. Visok udjel topljivih proteina predstavljaju takozvani glavni proteini matične mliječi (engl. Major Royal Jelly Proteins; MRJPs) za koje se smatra da imaju devet članova. U proteinski sastav matične mliječi uključeni su i proteini povezani s metabolizmom ugljikohidrata kao što su glukoza oksidaza, prethodnik - glukozydaza i glukoza dehidrogenaza (Oršolić, 2013). U matičnoj mliječi prisutne su i mono- i dihidroksi kiseline te dikarboksilne kiseline s 8 i 10 ugljikovih atoma. Udjel hidroksi kiselina s 10 ugljikovih atoma (10-hidroksidecenske kiseline i trans-10-hidroksi-2-decenske kiseline) može biti značajno visok. Navedeni specifični sastojci matične mliječi istražuju se kao biljezi autentičnosti matične mliječi čijim je praćenjem, uz primjenu odgovarajućih analitičkih metoda, ujedno moguće detektirati dodatke matične mliječi u sastav različitih prehrambenih i kozmetičkih proizvoda (Sabatini i sur., 2009). Tijekom određivanja kvalitete matične mliječi značajno je praćenje svježine proizvoda promjenama u udjelu pojedinih sastojaka kao što je enzim glukoza oksidaza na kojeg značajno utječu temperatura i period čuvanja. Udjel enzima glukoza oksidaze se značajno smanjuje nakon čuvanja matične mliječi pri temperaturi od 20 °C. Na navedeno ukazuju rezultati istraživanja Sabatini i suradnika (2009) tijekom kojeg su praćene promjene udjela enzima glukoza oksidaze u uzorcima matične mliječi čuvanim tijekom 24 mjeseca pri temperaturi od 4 °C i 20 °C. Na kraju perioda istraživanja, nakon 24 mjeseca, prisutnost enzima nije detektirana što upućuje na njegovu razgradnju. Promjene u udjelu enzima zabilježene su i tijekom praćenja pri temperaturi od 4 °C, međutim u značajno manjem stupnju u odnosu na promjene pri temperaturi od 20 °C (Sabatini i sur., 2009). Propolis je pčelinji proizvod koji također, obzirom na svoju biološku aktivnost, može ispoljavati pozitivne učinke na zdravlje, a predstavlja smolastu tvar nastalu miješanjem biljnih ekstrakata sakupljenih s cvjetnih pupoljaka od strane pčela s voskom i enzimima. Propolis pčelama osigurava obranu od različitih štetnih utjecaja, štiti ih od razvoja mogućih bolesti, predstavlja materijal za zaglađivanje zidova košnice, te može spriječiti širenje eventualno prisutnih bakterija u košnici prekrivanjem različitih eventualno prisutnih uginulih nametnika. Propolis odlikuju brojni pozitivni biološki učinci kao što su imunomodulacijski, protutumorski, protuupalni, antioksidacijski, antimikrobni i antiparazitski učinak (Šuran i sur., 2016).

Detekcija i određivanje specifičnih sastojaka meda i pčelinjih proizvoda svoju primjenu pronalazi u provođenju različitih vrsta analiza u svrhu kontrole njihove kvalitete, ali i određivanja autentičnosti. U novije vrijeme pri tome se ističu imunoenzimske ili ELISA metode (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), metode iz skupine imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda (Baroni i sur., 2002).

Općenito su imunoenzimske metode utemeljene na svojstvu antitijela da specifično prepoznaje antigen. Njihova primjena je sve učestalija obzirom na visoku razinu specifičnosti i osjetljivosti, relativno jednostavnog postupka izvođenja te relativno niske cijene u odnosu na druge analitičke tehnike u analizi hrane. Upravo imunoenzimska ELISA metoda omogućuje detekciju prisutnosti ciljanih analita ili antigena u hrani te njihovo kvantitativno određivanje. Metoda se temelji na svojstvu antitijela da specifično veže antigen ili haptin iz uzorka, te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije do koje dolazi zbog promjene boje supstrata što ga razgrađuje enzim kojim su označeni pojedini reaktanti (Butorac i sur., 2013; Runje i Cvrtila, 2006). ELISA metoda po principu "sendvič" ELISA testa je jedan od najčešće korištenih imunoenzimskih testova. Uključuje imobilizaciju primarnog antitijela na dno jažica mikrotitrarske ploče, dodavanje standardne otopine ili otopine uzorka pri čemu dolazi do stvaranja veze između antitijela i ciljanog analita ili antigena u analiziranom uzorku, te dodavanje sekundarnog antitijela obilježenog enzimom pri čemu ponovno dolazi do stvaranja veze između antitijela i specifičnog antigena. Tijekom ove faze reakcije sekundarno antitijelo veže se na postojeći antigen-antitijelo kompleks i na taj način se stvara "sendvič" koji podrazumijeva smještaj specifičnog antigena u "sendvič" između primarnog i sekundarnog antitijela. U konačnici se u reakcijsku smjesu dodaje supstrat za enzim što rezultira nastankom obojenog produkta. Nastali intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski, a za ovaj princip testa je karakteristično da je izmjerena apsorbancija direktno proporcionalna udjelu analita. U slučaju takozvanog kompetitivnog ELISA testa, udjel antigena prisutnog u analiziranom uzorku je obrnuto proporcionalan intenzitetu obojenog produkta nastalog dodatkom supstrata. Prednost kompetitivnog ELISA testa je učinkovitost pri kvantitativnim analizama uzoraka koji sadrže niske udjele analita, na primjer u rasponu od 1,2 do 1,8 mgkg⁻¹ uz limit detekcije i do 0,4 mgkg⁻¹ (Besler i sur., 2002; Aydin, 2015). Detekcija specifičnih proteina u uzorcima hrane može se provesti primjenom Western blot metode. Ciljani proteini se razdvajaju na temelju razlika u molekularnoj masi, primjenom SDS-PAGE elektroforeze (engl. Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE) (Butorac i sur., 2013). U analitici i kontroli kvalitete hrane, iz navedene skupine imunoloških, odnosno imunokemijskih metoda, primjenjuju se i optički biosenzori te sve učestalije i jednostavni imunokromatografski test (engl. Lateral Flow Immunochromatographic Test). Optički biosenzori omogućuju detekciju vezanja biomolekula u stvarnom vremenu, a u analizama hrane često se koriste s ciljem detekcije patogenih mikroorganizama te njihovih toksina (Butorac i sur., 2013).

Primjena ELISA metoda u utvrđivanju autentičnosti

Autentičnost meda i pčelinjih proizvoda obično se utvrđuje mjerenjem omjera stabilnih izotopa ugljika i dušika (Ramadan i Al-Ghamdi, 2012). Obzirom da se u pčelarskoj praksi mogu pojaviti slučajevi nepoželjne opskrbe pčela sastojcima koji nisu sastavni dio njihove uobičajene hrane, kao i slučajevi zamjena određenog dijela matične mliječi nekim drugim sastojcima ili pak zamjene cijelog proizvoda nekim drugim sastojcima, u kontroli takovih proizvoda značajno je utvrđivanje autentičnosti. Različiti nepoželjni primjeri patvorenja mogu predstavljati dodatke, na primjer, više od 25 % jogurta, bjelanjka, vode i kukuruznog škroba. Takovi uzorci mogu biti detektirani, temeljem rezultata analiza, određivanjem porasta udjela vlage i udjela šećera, smanjenja udjela masti, proteina i 10-hidroksi-2-decenske kiseline (10-HDA) te nemogućnosti otapanja u lužnatom mediju (Sabatini i sur., 2009; Ramadan i Al-Ghamdi, 2012). Provedena su brojna istraživanja s ciljem utvrđivanja autentičnosti matične mliječi, te je u skladu s dostupnim rezultatima kao jedan od kriterija predložen udjel 10-hidroksi-2-decenske kiseline (10-HDA). Iako udjel 10-hidroksi-2-decenske kiseline (10-HDA) može biti različit u pojedinim uzorcima i obuhvaćati pri tome široki raspon, njeno kvalitativno i kvantitativno određivanje često se primjenjuje pri rutinskim procjenama autentičnosti (Sabatini i sur., 2009; Ramadan i

Al-Ghamdi, 2012). U posljednje vrijeme smatra se da je pri utvrđivanju autentičnosti meda i pčelinjih proizvoda značajno pratiti fiziološku funkciju izvornih specifičnih sastojaka. Na taj način, praćenje udjela proteina i pčelinjih peptida u utvrđivanju autentičnosti meda i pčelinjih proizvoda predstavlja jedan od novorazvijenih načina za unaprjeđenje kvalitete navedenih proizvoda kao funkcionalne hrane (Ramadan i Al-Ghamdi, 2012; Bilikova i sur., 2015).

Svoju primjenu u određivanju proteina u medu i pčelinjim proizvodima pronalaze i ELISA metode, a neke od ciljanih proteinskih sastojaka pri takvim analizama predstavljaju apalbumin-1 te pčelinji peptid defensin-1. Prisutnost apalbumina-1 može predstavljati značajan kriterij za određivanje autentičnosti meda ili pčelinjih proizvoda, pri čemu se najčešće koristi kao biljeg u utvrđivanju izvornosti matične mliječi (Sabatini i sur., 2009; Gobin i sur., 2014).

Apalbumin-1, koji je poznatiji ranije kao rojalaktin, jedan je od najznačajnijih te je ujedno i najzastupljeniji glikoprotein iz skupine glavnih proteina matične mliječi (MRJPs), koji inače broje devet članova. Glikoprotein MRJPs 1 uključuje 432 aminokiselinska ostatka, dio je oligomernog kompleksa, a njegova molekulska masa iznosi 55-57 kDa. Izrazito visoku biološku aktivnost ispoljava potpomaganjem sinteze DNA stanica (hepatocita) štakora, te omogućavanjem produljivanja procesa umnožavanja hepatocita kao i povećanjem proizvodnje albumina. Kao jedan od glavnih proteina matične mliječi, apalbumin-1 predstavlja autentični sastojak čije se određivanje u medu i pčelinjim proizvodima primjenjuje u različite svrhe kao što su procjena kvalitete i autentičnosti, ali i utvrđivanje patvorenja, odnosno zamjena meda jeftinijim industrijskim sirupima kao što su kukuruzni sirup i kukuruzni sirup s visokim udjelom fruktoze, te detekcija u različitim pripravcima koji primjenu pronalaze u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda i kozmetičkih preparata, te u području apiterapije i farmaceutske industrije (Bilikova i Šimuth, 2010; Bilikova i sur., 2015; Shen i sur., 2015; Zhang i sur., 2019). U svrhu kvalitativnog i kvantitativnog određivanja apalbumina-1, u novije vrijeme razvijaju se brze i visokospecifične imunoenzimske metode (Shen i sur., 2015; Zhang i sur., 2019). Prije provedbe ELISA testova pri određivanju apalbumina-1, poliklonska anti-apalbumin-1 antitijela se proizvode procesom imunizacije kunića rekombiniranim apalbuminom-1. Posebnu pažnju treba posvetiti odgovarajućim razrjeđenjima uzoraka za koje se utvrđene poželjne vrijednosti mogu nalaziti u rasponu od 0,1 do 0,01 %. U slučajevima neodgovarajućih razrjeđenja uzoraka meda, šećeri prisutni često u visokim udjelima u analiziranim uzorcima mogu utjecati na smanjenje osjetljivosti metode (Bilikova i Šimuth, 2010; Bilikova i sur., 2015). Odlučujući čimbenik za primjenjivost određenog proteina kao biljega u procjeni kvalitete je njegova toplinska stabilnost. Praćenjem promjena udjela apalbumina-1 u medu pri različitim temperaturama ovisno o pojedinim fazama proizvodnje i skladištenja meda, kako bi se istražio utjecaj temperature na termostabilnost apalbumina-1, uzorci meda su zagrijavani pri temperaturama 30, 60, 80 i 100 °C u trajanju od 40 minuta. Nakon imunoenzimskih ELISA testova, rezultati analiza pokazali su da ne postoji razlika između uzoraka zagrijavanih pri temperaturama od 30, 60 i 80 °C u odnosu na nezagrijavane uzorke. Utvrđeno je da se djelomična razgradnja proteina počinje odvijati pri temperaturi od 100 °C obzirom da su tijekom istraživanja pri navedenoj temperaturi uočene promjene na uzorcima. Rezultati ukazuju da je apalbumin-1 u uvjetima inkubacije pri temperaturi od 80 °C tijekom 40 minuta u uzorcima meda termostabilan. Utvrđena toplinska stabilnost predodređuje ga kao biljeg za objektivne procjene kvalitete meda. Određivanje udjela apalbumina-1 u medu omogućuje ELISA metoda, uspostavljajući se kao vrlo korisna i precizna metoda. Udjel apalbumina-1 smatra se i značajnom informacijom za koju bi bilo poželjno da bude naznačena na ambalaži meda i pčelinjih proizvoda prilikom njihova stavljanja na tržište (Bilikova i Šimuth, 2010; Bilikova i sur., 2015).

Kontrola kvalitete meda može uključivati praćenje udjela pčelinjeg peptida defensina-1 između ostalog i imunoenzimskom ELISA metodom pri čemu su česte analize po principu kompetitivnog ELISA

testa. Pčelinji peptid defensin-1 se uz vodikov peroksid ističe i svojom antibakterijskom aktivnošću te se njegovo određivanje može provoditi pri procjeni kvalitete pojedinih vrsta meda koje se odlikuju svojom antibakterijskom aktivnošću. Ranije poznat kao rojalizin, defensin-1 je prvotno detektiran u matičnoj mliječi, a kasnije u samom medu u kojem predstavlja značajan sastojak za koji se smatra da može predstavljati i biljeg autentičnosti. Poznato je da defensin-1 izlučuje hipofaringealna žlijezda u organizmu pčela, te se smatra da ima izraženu aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija, a u jako rijetkim slučajevima protiv gram-negativnih bakterija. Detektiran je u masnom tkivu pčela tijekom aktivacije njihova imunološkog sustava, u slučajevima zaraznih bolesti pčela, te u pojedinim tkivima nakon učestalih neposrednih štetnih utjecaja iz okoliša obzirom da kao dio imunološkog odgovora putuje do hemolimfe. Izlučevine hipofaringealne žlijezde pčele između ostalog koriste i za proizvodnju matične mliječi i meda. Praćenjem udjela defensina-1 tijekom pojedinih istraživanja, utvrđeno je da udjel defensina-1 u matičnoj mliječi i medu može obuhvaćati široke raspone (Valachova i sur., 2016; Kwakman i Zaat, 2012). Istraživanje Valachove i suradnika (2016) ukazuje na mogućnost primjene kompetitivnog ELISA testa u određivanju defensina-1 u uzorcima meda s ciljem kontrole kvalitete. Obzirom na princip kompetitivnog ELISA testa, osnovno načelo za provedbu testa u svrhu detekcije i kvantifikacije navedenog pčelinjeg peptida predstavljala je kompeticija za vezanje između ciljanog analita ili defensina-1 iz uzorka te konjugiranog antitijela na podlogu sa sadržajem prethodno odgovarajuće pripremljenih poliklonskih antitijela. Obzirom na dostupnost visokospecifičnih antitijela, kao ključnog uvjeta uspješne primjene imunoenzimske metode, istraživanjem je pokazano da razvijena zečja poliklonska anti-defensin-1 antitijela pokazuju visoku izraženu specifičnost prema defensinu-1 bez unakrsnih reakcija s drugim proteinskim sastojcima u medu. Udjel defensina-1 određen imunoenzimskim ELISA testom je varirao (0,04 do 5,17 µgg-1 meda) obzirom na botaničko podrijetlo, ali i unutar istovjetnog botaničkog izvora različitog geografskog podrijetla, a najviši udjeli određeni su u uzorcima multifiornog meda. Primjena brze i visokospecifične ELISA metode u određivanju defensina-1 značajna je i obzirom na saznanja da praćenje udjela navedenog pčelinjeg peptida može ukazivati i na antibakterijski potencijal meda i pčelinjih proizvoda (Valachova i sur., 2016).

Imunokemijske metode u utvrđivanju botaničkog podrijetla

Radi utvrđivanja botaničkog i zemljopisnog podrijetla meda, u posljednje vrijeme usmjerena je velika pažnja zamjeni melisopalinološke ili peludne analize drugim identifikacijskim parametrima pomoću kombinacija analitičkih tehnika i statističkih alata, uključujući određivanje fizikalno-kemijskih parametara, hlapljivih sastojaka, mineralnih tvari, flavonoidnih profila, biomarkera, te DNK metodologiju (De Alda-Garcilope i sur., 2012). U svrhu utvrđivanja mogućnosti korištenja proteina peludi (koji potječu iz medonosnih pčela te iz biljaka, peludi ili nektara) kao kemijskih biljega botaničkog podrijetla meda, u istraživanju Baroni i suradnika (2002) primjenom Immunoblot, odnosno Western blot testa, testa iz skupine imunoloških, odnosno imunokemijskih testova, korištena su poliklonska anti-pelud antitijela proizvedena imunizacijom kunića peludi određenih vrsta suncokreta i eukaliptusa. Prije provedbe samih imunokemijskih testova, odgovarajućim postupcima su najprije posebno proizvedena poliklonska antitijela. U svrhu razdvajanja ciljanih proteina u uzorcima meda, na osnovu razlika u njihovoj molekularnoj masi, uzorci meda su analizirani SDS-PAGE analizom. Visoko specifična anti-pelud antitijela dobivena su imunizacijom uporabom peludi iz odgovarajuće vrste suncokreta, te rezultati istraživanja upućuju na visoki stupanj prepoznavanja proteina iz analiziranih uzoraka meda suncokreta te time i na učinkovitost primijenjene metode. Razmatrajući povezivanje anti-pelud antitijela proizvedenih imunizacijom uz uporabu peludi iz odgovarajuće vrste eukaliptusa sa proteinima iz meda eukaliptusa,



utvrđeno je da navedena antitijela imaju mogućnost povezivanja s proteinima peludi različitih molekularnih masa iz analiziranih uzoraka meda koji sadrže određen udio peludi eukaliptusa. U ovom slučaju primijenjena antitijela pokazala su sklonost povezivanju i sa drugim dobivenim ekstraktima proteina peludi iz analiziranih uzoraka meda. Rezultati istraživanja ukazuju da bi proteini peludi, obzirom da mogu biti prepoznati od strane specifičnih antitijela, mogli pronaći primjenu kao kemijski biljezi za utvrđivanje botaničkog podrijetla meda, te upućuju na daljnja istraživanja imunokemijskih metoda u navedenu svrhu (Baroni i sur., 2002). S ciljem određivanja botaničkog podrijetla meda u istraživanju Baroni i suradnika (2004) primijenjen je i imunoenzimski test, po principu kompetitivnog ELISA testa, u detekciji te kvantifikaciji peludi određene vrste suncokreta u uzorcima meda s granicom detekcije od 10 % te prihvatljivim linearnim odzivom u rasponu od 10 do 90 % peludi suncokreta. Imunoenzimski ELISA metoda primijenjena u navedenom istraživanju je pokazala prikladnu selektivnost te visoku korelaciju sa melisopalinološkom analizom (Baroni i sur., 2004).

Imunokemijske metode u razlikovanju uzoraka prirodnog meda

Imunoenzimski ELISA metoda omogućuje utvrđivanje razlika između uzoraka prirodnog meda i uzoraka meda koji u slučajevima patvorenja sadrže dodane sastojke. Joe i suradnici (2018) razvili su u tu svrhu indirektnu ELISA metodu pri čemu su imunizacijom ženki miša BALB/c posebno proizvedena monoklonska antitijela koja specifično prepoznaju MRJPs, a analize su provedene na uzorcima koji su predstavljali odgovarajuće omjere prirodnog i umjetnog meda. Posebno proizvedena, specifična antitijela pokazala su točnost, osjetljivost i stabilnost te su prepoznata od strane glavnih proteina iz uzoraka prirodnog meda, za razliku od uzoraka umjetnog meda (Joe i sur., 2018). Mogućnost primjene Immunoblot testa ili Western blot testa u imunološkoj karakterizaciji glavnih proteina meda u svrhu razlikovanja pčelinjih zajednica te utvrđivanja patvorenja meda su istražili i Won i suradnici (2009). Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE analizom, završna mjerenja temeljem predhodnih specifičnih vezanja provedena su kemiluminiscencijom. Rezultati istraživanja ukazali su na mogućnost primjene imunološkog, odnosno imunokemijskog testa visoke osjetljivosti i afiniteta za ciljane antigene (Won i sur., 2009).

ELISA metode u odnosu na HPLC i PCR metode

Imunoenzimski metode uz svoje brojne prednosti imaju i određene nedostatke te se u praksi primjenjuju i uz druge analitičke tehnike od kojih su posebno značajne tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. High Performance Liquid Chromatography; HPLC) i lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction; PCR). Navedene tehnike mogu predstavljati potvrdne metode analitičkih rezultata dobivenih imunoenzimskim analizama. Specifičan primjer primjene ELISA testa i HPLC metode kao separacijske metode predstavlja određivanje leptosperina, sastojka koji je karakterističan za posebnu vrstu meda; manuka med (Runje i Cvrtić, 2006; Butorac i sur. 2013; Kato i sur., 2014). Leptosperin je nehlapljiv, njegov udjel visoko korelira s antibakterijskim djelovanjem, a smatra se da se može koristiti i kao biljeg izvornosti manuka meda. Uočene su promjene antibakterijske aktivnosti manuka meda tijekom skladištenja i transporta, te značaj praćenja promjena udjela leptosperina visokospecifičnim metodama, tako i imunoenzimskom ELISA metodom. U svrhu određivanja leptosperina kao ciljanog analita ili antigena u uzorcima manuka meda, provedba ELISA testova predhodno zahtijeva posebnu proizvodnju antitijela sa visokom specifičnošću za vezanje na antigen. U istraživanju Kato i suradnika (2014) primijenjena je i metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti kojom je provedeno fracioniranje uzoraka meda, te su potom pripremljene frakcije analizirane imunoenzimskim ELISA testom po principu kompetitivnog ELISA

testa. Tijekom imunoenzimskih određivanja, korištena su predhodno pripremljena monoklonska antitijela sa visoko izraženom specifičnošću prema prepoznavanju i vezanju na leptosperin iz analiziranih uzoraka manuka meda. Udjel leptosperina u 20 analiziranih uzoraka manuka meda obuhvaćao je raspon od 0,3 do 200 μM , te je utvrđena značajna korelacija sa rezultatima HPLC analiza. Iako su utvrđeni nešto viši udjeli ELISA testom u odnosu na HPLC metodu, istraživanje ukazuje da određivanje leptosperina imunoenzimskom metodom može biti korisno pri utvrđivanju izvornosti manuka meda ili utvrđivanja odstupanja od propisanih zahtjeva kvalitete manuka meda prisutnog na tržištu (Kato i sur., 2014). PCR metoda sve se češće primjenjuje za analize u različitim područjima (Bartlett i Stirling, 2003; Garibyan i Avashia, 2013). Primjena PCR može doprinijeti određivanju botaničkog, zemljopisnog ili genetskog podrijetla analiziranih uzoraka (Tsagkaris i sur., 2021). Temelji se na umnožavanju ciljanih sekvenci DNA djelovanjem DNA polimeraze, a svaki PCR ciklus uključuje tri različite temperaturno ovisne faze (Klančnik i sur. 2012). PCR metode primjenjuju se i u kontroli kvalitete i sigurnosti meda, omogućujući klasifikaciju pojedinih vrsta meda (Chin i sur., 2016), utvrđivanje entomološkog i botaničkog podrijetla meda (Tsagkaris i sur., 2021; Chang-Kyu i sur., 2017; Soares i sur., 2018; Peng Kek i sur., 2017; Peng Kek i sur., 2018, Utzeri i sur., 2022), razlikovanje uniflornog i multiflornog meda (Soares i sur., 2015), te utvrđivanje botaničkog podrijetla multiflornog meda (Bruni i sur., 2015; Wu i sur., 2017). Ipak, uspješno korištenje učinkovitih protokola za ekstrakciju DNA je otežano u slučaju analiza kompleksnih uzoraka kao što je med koji sadrži različite šećere, organske kiseline, fenolne spojeve, pigmente i enzime koji se smatraju PCR inhibitorima, te je potrebno posebnu pažnju posvetiti pripremi uzoraka uz uklanjanje nepoželjnih sastojaka (Soares i sur., 2015).

Zaključci

Određivanje sastojaka primjenom imunoenzimskih ELISA metoda (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) predstavlja jedan od novorazvijenih pristupa za unaprijeđenje kontrole kvalitete meda i pčelinjih proizvoda. Razvoj učinkovitih imunoenzimskih ELISA testova može biti obećavajući u određivanju biljega izvornosti poput proteina i peptida koji potiču od pčela, kao što su apalbumin-1 i defensin-1. Imunoenzimski ELISA metode primjenu mogu pronaći i u utvrđivanju botaničkog podrijetla meda određivanjem peludi određene biljne vrste, praćenju svježine određivanjem enzima, te kontroli specifičnih proteina u svrhu razlikovanja uzoraka prirodnog od umjetnog meda.

Literatura

- Al-Brahim J.S., Mohammed A.E. (2020) Antioxidant, cytotoxic and antibacterial potentials of biosynthesized silver nanoparticles using bee's honey from two different floral sources in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 363-373.
- Almasaudi S. (2021) The antibacterial activities of honey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28 2188-2196.
- Al-Nahari A.A.M., Almasaudi S.B., El-Ghany E.S.M.A., Barbour E., Al Jaouni S.K., Harakeh S. (2015) Antimicrobial activities of Saudi honey against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 521-525.
- 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.
- 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 (24) 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., Šimuth 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.
- 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.
- Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R., Gallmann P. (2008) Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27 677-689.
- Brudzynski K., Abubaker K., Miotto D. (2012) Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chemistry*, 133 329-336.
- 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.
- Chang-Kyu K., Deug-Chan L., Suk-Ho C. (2017) Detection of Korean Native Honey and European Honey by Using Duplex Polymerase Chain Reaction and Immunochromatographic Assay. *Food Science of Animal Resources*, 37 (4) 599-605.
- 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. U: *Advances in Biological Sciences Research, Proceedings of the 2016 International Conference on Biomedical and Biological Engineering*, 417-420., doi.org/10.2991/bbe-16.2016.64.
- Cianciosi D., Forbes-Hernández T. Y., Afrin S., Gasparri M., Reborde-Rodríguez, P., Manna P.P., Zhang, J., Bravo Lamas L., Martínez Flórez S., Agudo Toyos P., Quiles J.L., Giampieri F., Battino M. (2018). Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*, 23 2322-2342.
- De Alda-Garcilope C., Gallego-Picó A., Bravo-Yagüe J.C., Garcinuño-Martínez R.M., Fernández-Hernando P. (2012) Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin "Miel de Granada" according to their mineral content. *Food Chemistry*, 135 1785-1788.
- Fernandes L., Ribeiro H., Oliveira A., Silva A.S., Freitas A., Henriques M., Rodrigues M.E. (2021) Portuguese honeys as antimicrobial agents against *Candida* species. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 11 (2) 130-136.
- 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*, 1 1-9.
- Garibyan L., Avashia N. (2013) Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133 (3) 1-4.
- Gobin I., Vučković D., Lušić D. (2014) Antibakterijska svojstva meda. *Medicina Fluminensis*, 50 (2) 150-157.
- Ghramh H.A., Khan K.A., Alshehri A.M.A. (2019) Antibacterial potential of some Saudi honeys from Asir region against selected pathogenic bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26 1278-1284.
- Henatsch D., den Hartog G.J.M., Duijvestijn A.M., Wolffs P.F., Phielix E., Stokroos R.J., Briedé J.J. (2018) The contribution of α -dicarbonyl compound dependent radical formation to the antiseptic effect of honey. *Journal of Functional Foods*, 45 239-246.
- Joe T., Jeong E., Yoo G., Ahn S., Rhee H.-I., Lee D.-C. (2018) The monoclonal antibody for discrimination of natural against artificial honey. *Food Science & 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.
- Klancnik A., Kovač M., Toplak N., Piskernik S., Jeršek B. (2012) PCR in Food Analysis. *IntechOpen Book Series*, pp. 195-220.
- Kwakman P.H.S., Zaat S.A.J. (2012) Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life*, 64 (1) 48-55.
- McLoone P., Warnock M., Fyfe L. (2016). Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49 161-167.
- Nayaka N.M.D.M.W., Sukrasno I.F., Hartati R., Singgih M. (2020) Antioxidant and antibacterial activities of multiflora honey extracts from the Indonesian *Apis cerana* bee. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 15 (3) 211-217.
- Oršolić N. (2013) Učinkovitost biološki aktivnih sastavnica matične mliječi: Analiza i standardizacija. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 64 445-461.
- Osés S.M., Pascual-Maté A., de la Fuente D., de Pablo A., Fernández-Muino M.A., Sancho M.T. (2016) Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 78 29-33.
- Peng Kek S., 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.
- Peng Kek S., Chin N.L., Tan S.W., Yusof Y. A., Chua L. S. (2018) Comparison of DNA extraction methods for entomological origin identification of honey using simple additive weighting method. *International Journal of Food Science and Technology*, 53 (11) 2490-2499.



- Ramadan 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 - 95.
- Sabatini A.G., Marazzan 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.
- 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*, 16 (2) 155-166.
- Soares S., Amaral J.S., Oliveira M.B.P.P., Mafra I. (2015) Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification. *Food Control*, 48 130–136.
- 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.
- Sousa J.M., de Souza E.L., Marques G., Meireles B., de Magalhães Cordeiro A.T., Gullón B., Pintado M.M., Magnani M. (2016) Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. *Food Research International*, 84 61-68.
- Stephens J.M., Schlothauer R.C., Morris B.D., Yang D., Fearnley L., Greenwood D.R., Loomes K.M. (2010) Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chemistry*, 120 78–86.
- Šuran J., Matanović K., Brozić D., Mašek T., Mačesić 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.
- Utzeri V.J., Ribani A., Taurisano V., Fontanesi L. (2022) Entomological authentication of honey based on a DNA method that distinguishes *Apis mellifera* mitochondrial C mitotypes: Application to honey produced by *A. m. ligustica* and *A. m. carnica*. *Food Control*, 134 108713.
- 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.
- Visweswara Rao P., Thevan Krishnan K., Salleh N., Hua Gan S. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26 657-664.
- 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.
- 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.