



DNK analiza – gotovo rješenje za detektiranje patvorina meda ili...?

dr. sc. Dario Lasić, dipl. ing.
 Voditelj Odjela za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane,
 NZJZ Andrija Štampar

Alarmantna vijest koja se posljednjih mjeseci širi Europom o navodnoj „neautentičnosti“ gotovo cjelokupnog meda koji se prodaje u Njemačkoj, Austriji, Ujedinjenom Kraljevstvu i Finskoj potaknula nas je da si postavimo mnoga pitanja. Prije svega se nameće pitanje kako je moguće da jedna bogata Europa nikako ne može stati na kraj „kemičarima“ – koji slično kao u sportskom doping u uspjevaju biti ispred većine laboratorija i činiti sve veću ekonomsku i nutritivnu štetu – te napokon zaustaviti uvoz sumnjivog meda iz trećih zemalja, ali jednako tako i sumnjivog meda koji, barem načelno, potječe iz Europske unije.

Projekt estonskog start-upa

Dašak nade došao je od estonskih znanstvenika koji su razvili DNK metodologiju koja revolucionizira dosadašnje shvaćanje analitičke provjere patvorenja meda. Naime estonski projekt suradnje između pčelara i istraživača pod okriljem organizacije EU CAP Network, koji je većinski financiran sredstvima EAFRD-a (ukupne vrijednosti više od 400.000 eura tijekom četiriju godina),

uzeo je jedinstven, neciljan pristup želeći analizirati sve tragove DNK iz okruženja za proizvodnju meda, dakle ne samo one koji potječu od peluda. Takva sveobuhvatna slika meda omogućavala bi proizvođačima dokaze o autentičnom podrijetlu meda za pošteno i transparentno natjecanje na tržištu meda. Projekt je dakle predstavio metodologiju koja se temelji na analizama DNK za opisivanje ne samo cjelokupnoga biološkog sastava meda nego i okoliša u kojem pčele traže hranu i proizvode med

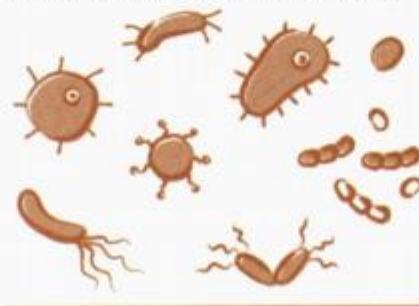
(uključujući pelud i nektar biljaka, bakterije, gljivice, životinje i viruse) te, na temelju toga, za procjenu podrijetla i autentičnosti meda. Danas za 250 eura po uzorku ova estonska tvrtka komercijalno nudi navedenu analizu. Kako to funkcionira prema riječima autora?

- Po zaprimanju uzorka meda u laboratorij najprije se mjere koncentracija HMF-a i postotak vlage te se ekstrahira DNK (biljaka, životinja, bakterija, insekata, gljiva...) i procjenjuje količina i kvaliteta DNK. Tehnologijom sekvenciranja određuju se sekvence DNK, a na temelju toga se analizira sastav svih organizama u medu. Takav DNK sastav meda uspoređuje se s autentičnom bazom podataka profila meda. Med naime sadržava DNK svih vrsta s kojima pčele dolaze u kontakt, a ova DNK analiza može identificirati više od 5000 biljnih vrsta iz uzorka meda. Istraživanje uključuje pelud, nektar i biljke na kojima se javlja medna rosa, odnosno medljikovac. Identificiraju su sve biljke u analizi DNA meda čije se sekvence gena nalaze u svjetskim bazama podataka. Zatim se analiza uspoređuje s drugim profilima meda, to jest procjenjuje se kojih biljnih vrsta ima više ili manje u analiziranom uzorku u odnosu na druge medove.
- Med sadržava DNK patogena (štetnika) kao što su bakterije, gljivice i člankonošci. Ova analiza DNK otkriva 20 važnih patogena i/ili parazita u uzorku meda, a u analizu su uključeni i uzročnici američke i europske gnjiloče legla, nozemoze, vapnenastog legla i drugih bolesti.
- Detekcija patvorenja meda provodi se u dvije faze.

Analiza medonosnih biljaka



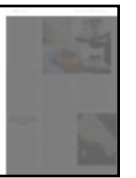
Analiza patogena i pčelinjih parazita



Kvaliteta, izvornost i podrijetlo meda



(Ilustracije su preuzete sa službene mrežne stranice projekta Honey Metagenomic DNA Analysis, MDA.)



Autentični i neprerađeni med sadržava visoke koncentracije nerazgrađene DNK. DNK profil meda uspoređuje se s opsežnom bazom podataka, a odstupanja se mogu pojaviti i u sastavu vrsta i u kvantitativnom omjeru različitih vrsta. Iako svaki med ima jedinstven sastav i ne slični u potpunosti ni jednemu drugom medu, DNK profili autentičnog meda s prirodno raznolikim sastavom dijele određene zajedničke obrasce. Znatna odstupanja u DNK profilima meda identificiraju se metodom strojnog učenja analize podataka, stoga autori tvrde da su promjene i manipulacije DNK profilom meda lako uočljive.

Uistinu sjajno zvuče neki od zaključaka projektnog tima koji tvrde da je projekt omogućio izradu testa na bazi DNK cjelokupnog meda koji će se moći ponuditi proizvođačima i distributerima za analizu botaničkog sastava meda, za praćenje uzročnika bolesti i parazita u medu te za analizu podrijetla i autentičnosti meda, i to ne samo u Estoniji nego i globalno. Projekt je svakako dao određeni poticaj za pčelarsku industriju, pomogao u razvoju laboratorijske stručnosti, donio opsežno generiranje podataka te potaknuo znanstveni interes za analizu DNK meda, koja se već i provodi u nekim ozbiljnijim laboratorijima u Europskoj uniji, ali u druge, specifične svrhe.

Međutim, je li to rješenje za kontrolu meda?

Sad je potrebno produbiti temelj ovakvih navoda jer je riječ o eksperimentalnoj metodi analize DNK, a treba i procijeniti njezinu pouzdanost i mjernu nesigurnost jer svaka metoda ima svoja ograničenja. Stoga kad vas netko sam upozori na ograničenja vlastite metode, možete vjerovati da ju je dobro upoznao jer je procijenio rizike i nepoznanice koje će se nužno događati tijekom analize različitih vrsta meda. Naime svakom je pčelaru, pa i prosječnom potrošaču, jasno da karakteristike meda uvelike variraju ovisno o botaničkom podrijetlu izvora nektara, odnosno o geografskom



položaju pčelinjaka, o sezoni berbe i vremenskim uvjetima, a što u konačnici rezultira vrstama meda različitih okusa, boja i sastava. Stoga treba ponoviti poznatu činjenicu: osim dominantnog sadržaja više vrsta šećera i vode, med u manjoj mjeri sadržava i druge komponente, uključujući esencijalne vitamine i minerale, aminokiseline, proteine i fenolne spojeve, koji pozitivno utječu na njegovu nutritivnu i ekonomsku vrijednost. Upravo se tu nalaze mogući markeri patvorenja ili autentičnog meda jer on sadržava tragove ekološke DNK (eDNK), koji potječu ili od peluda i insekata (uključujući medonosne pčele koje su ga proizvele), ali i od virusa, gljivica i bakterija, koji karakteriziraju mikrobnom okruženje košnice i hologenom (domaćin i svi njegovi simbiotski mikrobi) medonosne pčele. Dakle, poradi složene prirode meda i vrlo različitih načina krivotvorenja, provjera njegove autentičnosti bila je izazovna i potaknula je razvoj nekoliko naprednih analitičkih pristupa. Velika varijacija u fizičkom i kemijskom sastavu prirodnih vrsta meda različitog podrijetla, međutim, uzrokovala je nepouzdana ili pogrešno protumačene rezultate nekoliko analitičkih metoda. Stoga ove testove autentičnosti (kao i sve ostale službene i normirane metode) treba potvrditi u skladu s međunarodno prihvaćenim znanstvenim protokolima i uskladiti

s tijelima za standardizaciju ili s međunarodno priznatim znanstvenim protokolima da bi se osigurali pouzdani rezultati s pravnom vrijednošću. A u ovom trenutku ne postoje usklađeni testovi za autentičnost meda, osim EA-IRMS i EA/LC-IRMS, koji pokrivaju i C4 i C3 biljne šećere. Gledajući s pravne strane, suci uvijek gledaju ovakve detalje, stoga sudski procesi često odu u neželjenom smjeru ako se za analiziranje ne primijene normirane i akreditirane metode.





Neutemeljeni navodi i nedostaci metode

Mnogi su veliki mediji (uključujući i The Guardian), a potom i naši mediji (uključujući i Agroklub), nekritički preuzeli priopćenja Europskog udruženja profesionalnih pčelara (EPBA) prema kojima je velik dio meda na policama europskih supermarketa krivotvoren. Ove tvrdnje temelje se na rezultatima ove još uvijek eksperimentalne metagenomske DNA analize meda (MDA) koju je proveo laboratorij estonskog start-upa Celvia CC AS, a koji su potpuno lišeni znanstvene i pravne vrijednosti, kao što je već navedeno.

Treba stoga napomenuti nekoliko bitnih nedostataka navedene metodologije:

- analitička metoda koja rabi metagenomsku DNA analizu meda (MDA) – za razliku od usklađenih testova EA-IRMS i EA/LC-IRMS – nije validirana ni akreditirana (ISO 17025)
- njezina robusnost i točnost nisu neovisno testirane
- dosad su publicirani rezultati koji nisu uspoređivani s rezultatima drugih laboratorija u usporednim analizama (proficiency testing scheme)
- temelji se na maloj i nepoznatoj bazi podataka (600 medova), koja se uglavnom sastoji od estonskih uzoraka meda.

Spomenuti medicinski laboratorij, osim što nije ni akreditiran za analizu meda (ISO 17025), nije ni odgovorio na primjedbe renomiranih institucija kao što su Institut za pčele u Celleu, Sveučilište u Hohenheimu, Njemački državni institut za pčelarstvo, Njemačka organizacija potrošača Stiftung Warentest i jedan od najboljih laboratorija u Europskoj uniji – Food QS.

„Granični slučaj” ili „neautentičan” ocjena je sukladnosti koju je ovaj neakreditirani medicinski laboratorij dao medu koji nije odgovarao njegovoj malenoj bazi podataka, a prema njegovoj usporedbi temeljenoj na umjetnoj inteligenciji. Pravo je pitanje je li „granični slučaj” rezultat eksperimentalne analize na nepoznatim uzorcima meda ili rezultat laboratorija koji je izvršio ta ispitivanja i objavio svoje nepouzdanе rezultate.

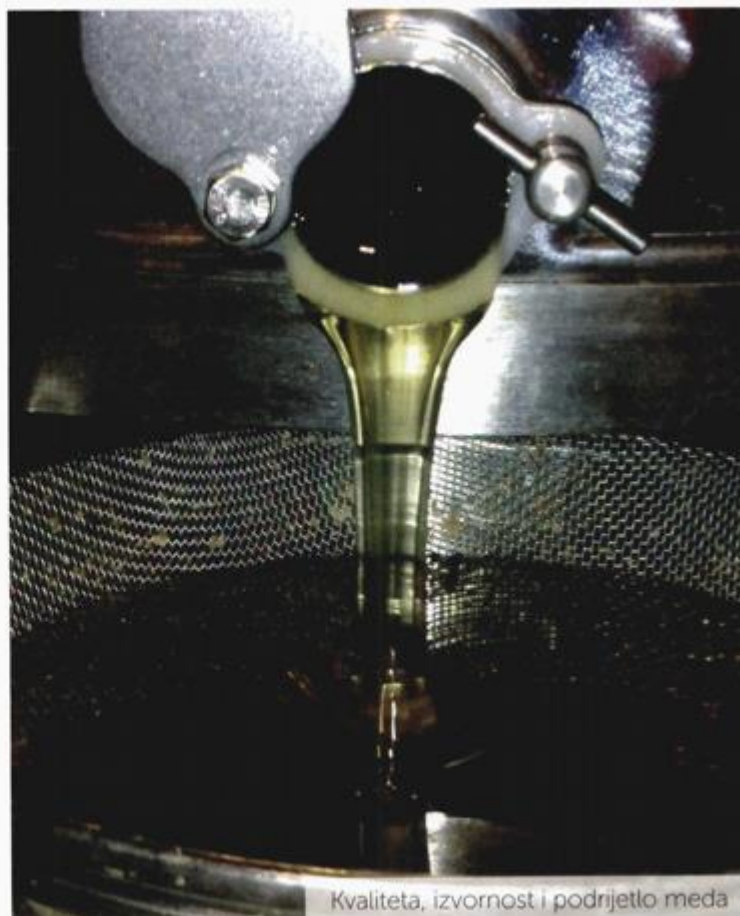
Stoga je i FoodQS, vjerojatno najbolji svjetski laboratorij za testiranje meda (s 25 godina iskustva i više od 10.000 provedenih analiza godišnje), intervenirao u listopadu 2024. službenom izjavom da bi demantirao lažne vijesti o „patvorenome medu”. Obmana koja se brzo proširila medijima o hipotetskom krivotvorenju većine meda koji se distribuira diljem četiriju europskih zemalja zapravo proizlazi iz „testova autentičnosti” koje je proveo estonski start-up metodom analize koja je također nepouzdana.

Vrijeme će pokazati

Je li time odbačena obećavajuća metodologija za rješenje problema patvorenja meda? Nipošto nije! Stoga dok estonski tim (ili neki drugi laboratorij) ne akreditira ovu metodu, dok ju ne podigne na višu razinu, dok ne osigura tisuće različitih medova i mogućih scenarija iz cijelog svijeta – to će i dalje biti samo još jedna eksperimentalna metoda koja obećava. A sve dok se to ne ostvari, treba vjerovati akreditiranim laboratorijima s velikim iskustvom u razvoju metoda za analize meda, s naglaskom na otkrivanje patvorina, a to su primjerice QSI, Eurofins, pa i Intertek. Svi navedeni laboratoriji iz

Njemačke provjeravaju autentičnost meda melisopalinološkom metodom, ali nude i određene pakete usluga, pri čemu treba naglasiti tri metodologije koje provode i koje obuhvaćaju većinu poznatih izvora dodanih šećera, a to su: NMR tehnika (koju karakterizira velika baza medova iz cijelog svijeta), akreditirana analiza izotopa ¹³C (EA-IRMS + LC-IRMS) te HR-MS (koja obuhvaća baze podataka mnogih izvora šećera). Ako su uzorci nakon ovih analiza i dalje sumnjivi, navedeni laboratoriji često sugeriraju da se provedu i dodatne analize da bi se otklonile nedoumice; neke od njih uključuju analize na mednu amilazu, termorezistentnu amilazu, analizu oligosaharida iz sirupa na bazi škroba, određivanje dodane boje karamela (medljikovac / šumski med), detekciju markera rižinog sirupa i šećernog sirupa od repe, kao i detekciju markera krivotvorenja psikoze, ali i druge analize.

Zaključno, vrijeme će pokazati hoće li DNK analiza meda u sprezi s umjetnom inteligencijom polučiti uspjeh na globalnom planu za brzu i nedvojbenu provjeru autentičnosti meda, no dotad se moramo osloniti na sve bolje i opsežnije baze podataka već prokušanih metodologija.



Kvaliteta, izvornost i podrijetlo meda