

# Određivanje prisutnosti alergena lješnjaka u čokoladi i čokoladnim proizvodima

---

Radalj, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:793462>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2018.

Iva Radalj 1002/USH

**ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI  
ALERGENA LJEŠNJAKA U  
ČOKOLADI I ČOKOLADNIM  
PROIZVODIMA**

Rad je izrađen u Krašu, prehrambena industrija d.d., Zagreb, u Laboratoriju za kontrolu zdravstvene ispravnosti hrane pod stručnim vodstvom mr. sc. Dijane Kujundžić uz pomoć dipl. ing. Nataše Marušić te pod mentorstvom dr. sc. Marine Krpan, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Ovom prilikom se najiskrenije zahvaljujem svojoj dragoj mentorici, doc. dr. sc. Marini Krpan, na velikoj pomoći i ustrajnosti u izradi diplomskog rada kao i na ukazanom povjerenju, savjetima i podršci.*

*Također se zahvaljujem svim suradnicima iz prehrambene industrije Kraš, posebno mr. sc. Dijani Kujundžić i dipl. ing. Nataši Marušić na savjetima i velikoj pomoći tijekom izvođenja praktičnog dijela ovog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, braći i prijateljima na neizmjernoj podršci i ljubavi kroz cijeli život, a posebno kroz ove godine studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

## ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI ALERGENA LJEŠNJAKA U ČOKOLADI I ČOKOLADNIM PROIZVODIMA

Iva Radalj, 1002/USH

### Sažetak:

Tijekom ovog istraživanja određeni su potencijalni alergeni lješnjaka u sedam istovrsnih uzoraka čokolada s različitim datumom proizvodnje i sedam različitih uzoraka čokoladnih proizvoda pomoću ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metode te je ispitan stav potrošača o navodima potencijalne prisutnosti alergena lješnjaka na deklaracijama ispitivanih proizvoda. U svim analiziranim uzorcima detektirana je prisutnost alergena lješnjaka, a određeni udjel nije prelazio  $>20 \text{ mg kg}^{-1}$ . Između analiziranih uzoraka u kojima su određeni alergeni lješnjaka, svi proizvodi su sadržavali navod o potencijalnoj prisutnosti alergena lješnjaka na deklaraciji. Iako samo mali broj ispitanika čita deklaracije na proizvodima, utvrđeno je da navod „Može sadržavati tragove lješnjaka“ 63,5 % ispitanika izdvaja kao najpoznatiji. U ovom istraživanju, u šest analiziranih istovrsnih čokoladnih uzoraka i tri uzorka različitih čokoladnih proizvoda, ELISA metodom analizirani su alergeni lješnjaka.

**Cljučne riječi:** alergeni, čokolada, ELISA, lješnjak

**Rad sadrži:** stranica 46, slika 36, tablica 6, literaturnih navoda 21, priloga 1

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Doc. dr. sc. Marina Krpan

**Pomoć pri izradi:** Mr. sc. Dijana Kujundžić

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Ksenija Marković
2. Doc. dr. sc. Marina Krpan
3. Izv. prof. dr. sc. Sanja Vidaček Filipec
4. Prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjena)

**Datum obrane:** 18. 07. 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Quality Control  
Laboratory for Food Quality Control

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### DETERMINATION OF HAZELNUT ALLERGENS IN CHOCOLATES AND CHOCOLATE PRODUCTS

Iva Radalj, 1002/USH

#### **Abstract:**

During this research potential hazelnut allergens are defined in seven of the same chocolate samples with different date of production and seven different chocolate samples using ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) method and consumer attitude on allegations of potential presence of hazelnut allergens on declarations of the tested products was examined. In all analyzed samples hazelnut allergens were detected, but determined content did not exceed amount of  $>20 \text{ mg kg}^{-1}$ . Between analyzed samples in which hazelnut allergens are determined, all products contained a claim on potential presence of hazelnut allergens on declaration. Although only a small number of respondents read product declarations, it was found that the quote „May contain traces of hazelnuts“ 63,5% of respondents claim as best known. In this research, in six of the same analyzed chocolate samples and three samples of different chocolate products, hazelnut allergens are analyzed by ELISA method.

**Keywords:** allergens, hazelnut, ELISA, chocolate

**Thesis contains:** 46 pages, 36 figures, 6 tables, 21 references, 1 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD. Marina Krpan, Assistant professor

**Technical support and assistance:** MSc. Dijana Kujundžić

#### **Reviewers:**

1. PhD Ksenija Marković, Full professor
2. PhD Marina Krpan, Assistant professor
3. PhD Sanja Vidaček Filipec, Associate professor
4. PhD Panjkota Krbavčić, Full professor ( substitute )

**Thesis defended:** 18.07.2018.

## Sadržaj

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....                                      | <b>2</b>  |
| <b>2.1. KONTROLA KVALITETE HRANE</b> .....                         | <b>2</b>  |
| <b>2.2. ALERGENI U HRANI</b> .....                                 | <b>2</b>  |
| 2.2.1. Alergija na tvari iz lješnjaka.....                         | 3         |
| <b>2.3. ZAKONSKA REGULATIVA</b> .....                              | <b>6</b>  |
| <b>2.4. ANALITIČKE METODE U ODREĐIVANJU ALERGENA</b> .....         | <b>9</b>  |
| 2.4.1. ELISA metoda.....   | 13        |
| 2.4.1.1. Sendvič ili direktna ELISA .....                          | 13        |
| 2.4.1.2. Konkurentna ELISA .....                                   | 14        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....                                | <b>16</b> |
| <b>3.1. MATERIJALI</b> .....                                       | <b>16</b> |
| 3.1.1. Uzorci .....  | 16        |
| 3.1.2. Reagensi i pribor .....                                     | 17        |
| 3.1.3. Uređaji i oprema.....                                       | 18        |
| <b>3.2. METODE RADA</b> .....                                      | <b>20</b> |
| 3.2.1. <i>VERATOX® for Hazelnut Allergen</i> ELISA test.....       | 20        |
| 3.2.1.1. Ekstrakcija uzoraka .....                                 | 20        |
| 3.2.1.2. Postupak određivanja.....                                 | 21        |
| 3.2.2. <i>RIDASCREEN® FAST Hazelnut</i> ELISA test.....            | 23        |
| 3.2.2.1. Priprema reagensa .....                                   | 23        |
| 3.2.2.2. Ekstrakcija uzoraka .....                                 | 23        |
| 3.2.2.3. Postupak određivanja.....                                 | 24        |
| 3.2.3. Ispitivanje stavova potrošača o prisutnosti alergena .....  | 25        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....                               | <b>26</b> |
| <b>4.1. UDJEL ALERGENA LJEŠNJAKA ODREĐEN ELISA TESTOVIMA</b> ..... | <b>26</b> |
| <b>4.2. STAVOVI POTROŠAČA O PRISUTNOSTI ALERGENA</b> .....         | <b>34</b> |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>6. LITERATURA</b> .....   | <b>44</b> |
| <b>7. PRILOZI</b> .....  | <b>47</b> |



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Iva Radalj

## 1. UVOD

Posljednjih pola stoljeća u cijelom svijetu zabilježen je porast alergija na hranu. Razlozi za takav epidemiološki trend još su nepoznati, iako postoje čimbenici koji su na to mogli utjecati. S jedne strane, došlo je do promjena u okolišu, a s druge strane napredak u civilizaciji donio je promjene životnih navika. Stanovništvo je pojačano izloženo alergenima u hrani koje je donijela globalizacija, ubrzanje transporta i brojna putovanja. Od orašastih plodova najčešća je alergija na orahe, lješnjake, bademe, pinjole te brazilske, indijske i makadamija oraščiće. Od svih čestih alergena, lješnjak najčešće izaziva teške alergijske reakcije poput anafilaktičkog šoka. Zbog svega navedenog prehrambena industrija ulaže sve više napora u kontrolu i analizu hrane. Najbolji način za sprječavanje alergije je izbjegavanje namirnica koje sadrže alergene. Stoga bi osobe sklone nutritivnoj alergiji trebale pažljivo čitati deklaracije na proizvodima, a proizvođači jasno označavati alergene na deklaraciji.

U analitici hrane koriste se brojne analitičke metode za određivanje alergena u hrani, a najveći potencijal ima imunoenzimski test ELISA koji se temelji na specifičnom vezanju protutijela i antigena (protein lješnjaka).

Cilj ovog rada bio je određivanje alergena lješnjaka u čokoladama i čokoladnim proizvodima pomoću ELISA testa. Također, provedeno je *online* anketiranje potrošača starosti od 19 do 75 godina (104 ispitanika) o prisutnosti alergena u proizvodima od čokolade. Cilj provedenog istraživanja je bio ispitati pojedince o stavovima prisutnosti alergena u hrani, čitanju i razumijevanju deklaracija na prehrambenim proizvodima, a sve u svrhu zaštite potrošača i osiguravanja sigurnosti hrane.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. KONTROLA KVALITETE HRANE**

Globalizacija gospodarstva utjecala je, između ostalog, na prehrambenu industriju. Slobodna trgovina dovela je do velike konkurencije na tržištu proizvođača što je otežalo plasiranje robe domaćih proizvođača i stvorilo potrebu za donošenjem jedinstvenih standarda kvalitete. Stoga je jedan od uvjeta sudjelovanja u trgovanju hranom razmjena informacija svih sudionika u proizvodnom lancu. Pojam sljedivost se definira kao mogućnost identifikacije proizvoda od proizvodnje do potrošača, odnosno identifikacije sirovina i materijala, logističkih informacija, gotovih proizvoda, procesa proizvodnje, skladištenja, transporta i prodaje (Omejec i Pejić Bach, 2007). Sljedivost je neizostavni sustav mehanizama za upravljanje kvalitetom proizvoda.

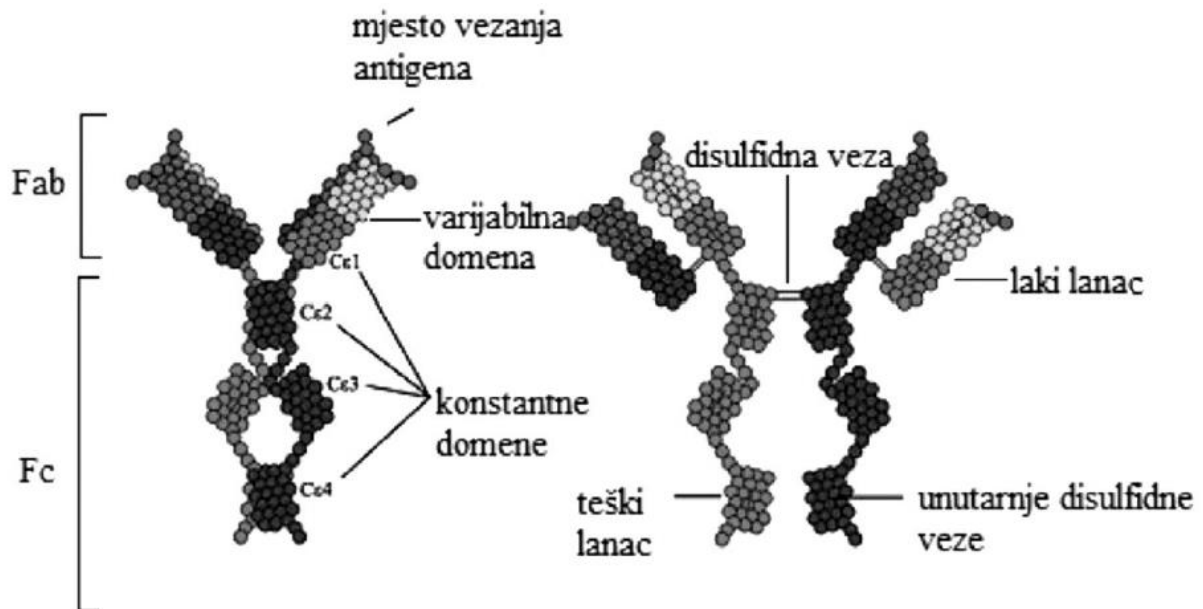
Riječ kvaliteta označava značajku, vrijednost, svojstvo i dolazi od latinske riječi *qualitas*. Kondić i suradnici (2015) u svom radu definiraju kvalitetu kao „stupanj do kojeg skup svojstvenih značajki ispunjava zahtjeve“. Kontrola je provjera nekih karakteristika proizvoda ili proizvoda u cijelosti. Prema tome, autori definiraju kontrolu kvalitete kao „smišljene aktivnosti na osiguranju sukladnosti skupa zahtijevanih značajki kvalitete na konkretnom izlazu iz procesa (pozicija, sklop, proizvod, softver, usluga i sl.)“. Kontrola kvalitete donosi rezultate na temelju kojih se donosi odluka je li neki proizvod dobar ili loš (Kondić i sur., 2015).

Postoje minimalni, referentni i kompatibilni standardi kojima se određuje kvaliteta prehrambenih proizvoda. Koji će se standard kvalitete primijeniti ovisi o sredstvima pojedine države (Omejec i Pejić Bach, 2007).

### **2.2. ALERGENI U HRANI**

Alergeni su „antigeni proteinskog sastava, inače bezopasne tvari, koje induciraju alergijsku reakciju samo kod preosjetljivih ljudi“ (Stipić Marković i sur., 2015). Alergijske reakcije na hranu dijele se na toksične i netoksične reakcije. Toksične reakcije se pojavljuju kod osoba koje pojedu zaraženu hranu, a netoksične reakcije se pojavljuju kod preosjetljivih osoba i dijele se na alergijske i nealergijske. Alergija je obrambena reakcija organizma u stalno doticaju s određenim alergenom (HAH, 2009). Kada obrambeni sustav dođe u kontakt s alergenom,

nastaje burna reakcija između protutijela i alergena. Dolazi do prekomjernog stvaranja protutijela koja pripadaju skupini imunoglobulin E (IgE) i tako dolazi do alergijske reakcije. To se javlja zbog poremećenog imunološkog odgovora u sluznici probavnog trakta (Turkalj i Mrkić, 2012).



Slika 1. Struktura imunoglobulina E (Stipić Marković i sur., 2015)

Imunoglobulin E je od svih imunoglobulina u krvi najmanje zastupljen s obzirom da je gotovo čitav vezan uz receptor na membrani stanica. Molekula IgE građena je od dva teška i dva laka lanca. Svaki od dva navedena lanca sadrži varijabilnu i konstantnu domenu. Prema tome postoje dvije regije: Fab, na koju se veže antigen i Fc, pomoću koje se IgE veže za receptore na membrani (Slika 1.). Molekula imunoglobulina E sadrži 8,3 % ugljikohidrata koji križno reagiraju na preosjetljivost na određeni alergen (Stipić Marković i sur., 2015).

### 2.2.1. Alergija na tvari iz lješnjaka

Lješnjaci se široko koriste u prehrambenoj industriji, posebice u konditorskim proizvodima. Sadrže nekoliko alergenskih proteina koji mogu biti prisutni kao zagađivači u raznim namirnicama i mogu predstavljati ozbiljnu prijetnju potrošačima s dijagnosticiranim alergijama na hranu (Cucu i sur., 2011). Alergija na orašaste plodove (lješnjaci, bademi, orasi, pistacije, pinjole i kesten) i kikiriki manifestira se u oko 1-2 % populacije. Osobe koje su alergične na

kikiriki, mogu biti alergične i na orašaste plodove i obrnuto. Razlog tome je sličnost proteina kikirikija i proteina orašastog voća (HAH, 2009).

Orašasto voće su jedna od najčešćih hrana koja uzrokuje akutne alergijske reakcije, a gotovo svo orašasto voće je povezano s kobnim alergijskim reakcijama (McWilliam i sur., 2015). Alergijska reakcija na lješnjak javlja se vrlo brzo u obliku blage iritacije kože ili opasne anafilaktičke reakcije. U prvom slučaju pojavljuje se osip, crvenilo nosa, suženje očiju ili otežano disanje. U drugom slučaju zatvaraju se dišni putovi, dolazi do oticanja, ubrzanog rada srca ili gubljenja svijesti te je potrebna hitna medicinska pomoć. Imunološki sustav razvija protutijela (imunoglobuline E – IgE) na proteine iz lješnjaka pa prilikom konzumacije lješnjaka dolazi do alergijske reakcije jer protutijela potiču imunološki sustav na lučenje histamina i ostalih tvari u krvotok (HAH, 2009).

Hrvatska agencija za hranu (2009) navodi na koje načine može doći do izlaganja lješnjaku:

1. konzumiranjem hrane koja sadrži lješnjak
2. konzumiranjem hrane koja u sebi sadrži lješnjak kao posljedica nenamjerne kontaminacije tijekom tehnološkog procesa
3. udisanjem prašine koja u sebi sadrži lješnjak

Stoga je za osobe alergične na lješnjak najrizičnija hrana: slastičarski proizvodi, sladoledi i smrznuti deserti, preljevi za salate i razni umaci, čokoladni slatkiši, maslaci od lješnjaka, orijentalna jela (HAH, 2009).

Bilo koja hrana može izazvati alergijsku reakciju, ali je relativno malo proteinskih skupina odgovornih za alergije. Vrste proteina koje uzrokuju većinu alergijskih reakcija podijeljeni su na skupinu I i II alergena hrane. Proteini koji pripadaju skupini I su termostabilni i mogu izazvati teže reakcije. U ovu skupinu spadaju lipidni prijenosni proteini (LTP) i pričuvni proteini sjemena. LTP služe za obranu biljaka od gljivica, virusa i bakterija. Nalaze se u plodovima iz porodice *Rosaceae* gdje spada i lješnjak. Pričuvni proteini sjemena prisutni su u većini orašastog voća i uzrokuju anafilaktičke reakcije. Proteini skupine II uzrokuju blaže reakcije i tu spadaju PR-10 proteini i profilni proteini PR-10 proteini su vrlo rasprostranjeni u biljnom svijetu. Njihove molekule su termolabilne i neotporne na probavne enzime. Bet v1 protein je predstavnik PR-10 proteina i nalazi se u lješnjaku. Profilni proteini su „prisutni u biljkama koje imaju homologiju višu od 75 %“ i izazivaju blaže simptome. Tablica 1. prikazuje

navedene skupine proteina. Specifični alergeni lješnjaka su Cor a8 i Cor a9 te Bet v1, križni alergen lješnjak (Cor a 1.04) (Voskresensky Baričić, 2012).

Tablica 1. Glavne skupine proteina

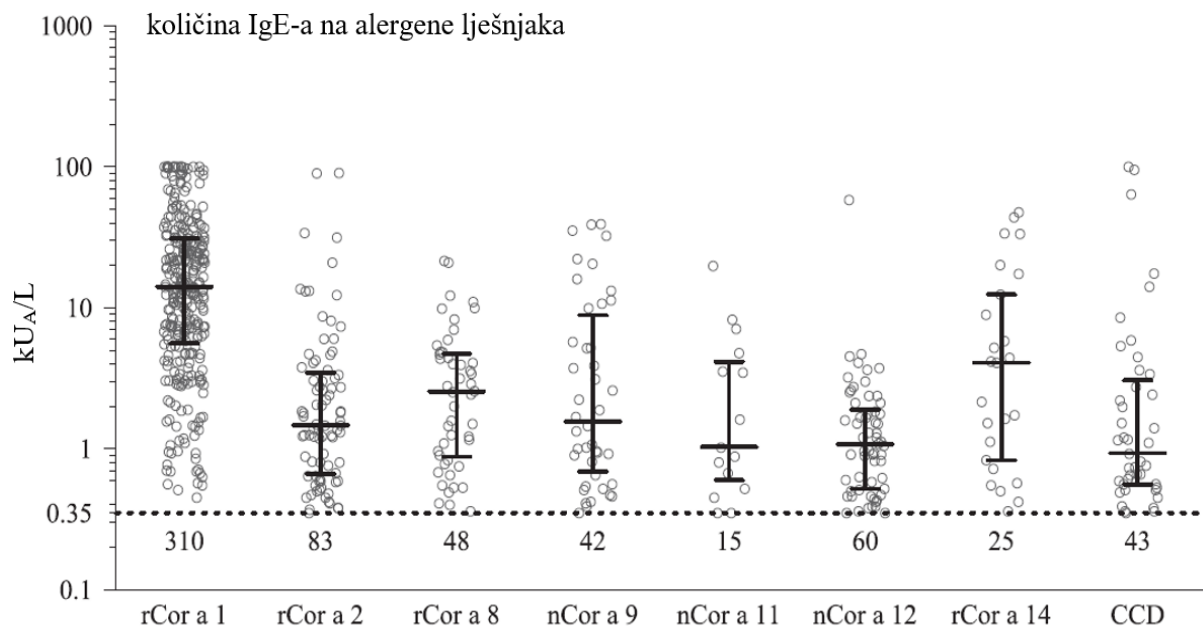
| Obitelj proteina | Svojstva proteina  | Članovi obitelji   |
|------------------|--|--|
| LTP              | Otporni na toplinu i probavu   | Voće, povrće, <b>orašasti plodovi</b> , pelud korova               |
| PR-10            | Neotporni na toplinu   | Pelud stabala, voće, povrće, <b>orašasti plodovi</b>               |
| Profilni         | Visoko križno reaktivni  | Pelud stabala, trava, korov, voće, povrće, <b>orašasti plodovi</b> |
| Pričuvni         | Otporni na toplinu i probavu povezani s teškim sistemskim reakcijama | Mahunarke, <b>orašasti plodovi</b> , sjemenke                      |

Izvor: izrada autorice prema Stipić Marković i sur., 2015.

Organizacija RASFF (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*) u svom godišnjem izvješću za 2016. godinu daje prikaz učestalosti alergena. Prema izvješću orašasti plodovi su na četvrtom mjestu po učestalosti pojava alergijskih reakcija, dok je na prvom mjestu mlijeko, zatim soja, i gluten (RASFF, 2017). Madsen i suradnici (2013) u svom radu ističu da se najviše alergija na lješnjak pojavljuje u središnjoj i sjevernoj Europi.

Godine 2007. započeo je projekt EuroPrevall koji ispituje učestalost i vrstu alergija na području Europe. Lista namirnica nad kojima se provodi ispitivanje podijeljena je u dvije grupe. U prvu grupu spadaju jaja, mlijeko, riba i morski plodovi, kikiriki, lješnjak, breskva, jabuka i celer. U drugoj grupi su sezam, soja, orah, pšenica, kivi i gorušica. U EuroPrevall projekt uključene su zemlje sjeverne, središnje i južne Europe, Kina, Indija i dio Rusije (Voskresensky Baričić, 2012). EuroPrevall je 2015. godine dao rezultate istraživanja koji pokazuju da je alergija na lješnjak jedna od najčešćih alergija na hranu u Europi (32 %). Međutim, razlike između europskih gradova su bile značajne, od 68,4 % u Vilniusu do 5,7 % u Madridu. Isto tako, stanovništvo je uključivalo više ženskih osoba (63,1 %) od muškaraca (36,9 %) (Datema i sur., 2015).

U istraživanju su testirani sljedeći alergeni lješnjaka: Cor 1 (Bet v 1), Cor 2 (profil), Cor 8 (LTP), Cor 9 (11S globulin), Cor 11 (7S globulin), Cor 12 (oleozin) i Cor 14 (2S albumin) te križno reaktivne ugljikohidratne determinante (CCD). Slika 2. prikazuje učestalost pojedinih alergena lješnjaka i CCD. Osjetljivost na Cor a 1 bila je najčešća (74,3 %), slijede Cor a 2 (19,6 %) i CCD (10,2 %).



Slika 2. Učestalost i razina senzibilizacije na pojedine alergene lješnjaka i CCD (Datema i sur., 2015)

### 2.3. ZAKONSKA REGULATIVA

Označavanje hrane jedno je od najsloženijih zakonski uređenih područja vezanih za hranu i ima ulogu u potpunosti informirati potrošače o hrani koju konzumiraju te zaštititi njihovo zdravlje. U Republici Hrvatskoj se primjenjuje nekoliko zakona i pravilnika koji sadrže odredbe kojima se utvrđuje provedba Uredbe (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani. U Prilogu II. Uredbe navedene su tvari ili proizvodi koji uzrokuju alergije ili netolerancije (Uredba, 2011):

1. Žitarice koje sadrže gluten, tj. pšenica, raž, ječam, zob, pir, kamut ili njihovi križanci, te proizvodi od tih žitarica, osim:

- a) glukoznih sirupa na bazi pšenice, uključujući dekstrozu;
- b) maltodekstrina na bazi pšenice;
- c) glukoznih sirupa na bazi ječma;

- d) žitarica koje se upotrebljavaju za proizvodnju alkoholnih destilata, uključujući etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla;
2. Rakovi i proizvodi od rakova;
3. Jaja i proizvodi od jaja;
4. Riba i riblji proizvodi, osim:
- a) riblje želatine koja se koristi kao nosač za vitamine i karotenoide;
- b) riblje želatine ili ribljeg mjehura koji se upotrebljavaju kao sredstvo za bistrenje piva i vina;
5. Kikiriki i proizvodi od kikirikija;
6. Zrna soje i proizvodi od soje, osim:
- a) potpuno rafiniranog sojinog ulja i masti ;
- b) prirodnih miješanih tokoferola (E306), prirodnog D-alfa tokoferola, prirodnog D-alfa tokoferol acetata i prirodnog D-alfa tokoferol sukcinata od soje;
- c) biljnih fitosterola i fitosterol estera od sojinog ulja;
- d) biljnog stanol estera proizvedenog od biljnih sterola dobivenih od sojinog ulja;
7. Mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući laktozu), osim:
- a) sirutke koja se upotrebljava za proizvodnju alkoholnih destilata, uključujući etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla;
- b) laktitola;
8. Orašasto voće, tj. bademi (*Amygdalus communis L.*), lješnjaci (*Corylus avellana*), orasi (*Juglans regia*), indijski oraščići (*Anacardium occidentale*), pekan orasi (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), brazilski orasi (*Bertholletia excelsa*), pistacije (*Pistacia vera*), makadamije ili kvinslandski orasi (*Macadamia ternifolia*) te njihovi proizvodi, osim orašastog voća koje se upotrebljava za proizvodnju alkoholnih destilata, uključujući etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla;
9. Celer i njegovi proizvodi;
10. Gorušica i proizvodi od gorušice;
11. Sjeme sezama i proizvodi od sjemena sezama;
12. Sumporni dioksid i sulfiti pri koncentracijama većim od 10 mg/kg ili 10 mg/L računati kao ukupni SO<sub>2</sub>, koji su u proizvodima pripremljenim za konzumaciju ili rekonstituiranim u skladu s uputama proizvođača;
13. Lupina i proizvodi od lupine;
14. Mekušci i proizvodi od mekušaca.



Pravilnikom o informiranju potrošača o nepretpakiranoj hrani propisuju se opća načela, zahtjevi i odgovornosti u vezi s informacijama o nepretpakiranoj hrani, uključujući informacije o prisutnosti tvari ili proizvoda koji mogu izazvati alergije ili netolerancije (Pravilnik, 2014).

Prema članku 9. Uredbe (EU) 1169/2011 deklaracija zapakirane hrane mora sadržavati sljedeće podatke (Uredba, 2011):

1. naziv hrane;
2. popis sastojaka;
3. sve sastojke ili pomoćne tvari u procesu proizvodnje koji su navedeni u Prilogu II. ili dobiveni od tvari ili proizvoda iz Priloga II. koji uzrokuju alergije ili netolerancije, a koji su upotrijebljeni u procesu proizvodnje ili pripreme hrane i koji su prisutni u gotovom proizvodu, čak i u promijenjenom obliku;
4. količinu određenih sastojaka ili kategorija sastojaka;
5. neto količinu hrane;
6. datum minimalne trajnosti ili „upotrijebiti do” datum;
7. posebne uvjete čuvanja i/ili upotrebe;
8. ime ili naziv i adresu subjekta u poslovanju hranom;
9. zemlju ili mjesto podrijetla;
10. upute za upotrebu ili pripremu, kada u nedostatku takve upute ne bi bila moguća pravilna upotreba hrane;
11. za pića koja sadrže više od 1,2 % vol. alkohola, stvarnu alkoholnu jakost po volumenu;
12. nutritivnu deklaraciju.

Novi način označavanja alergena na deklaraciji primjenjuje se od 13.12.2014. kada naziv tvari ili proizvoda iz Priloga II. Uredbe (EU) 1169/2011 treba biti naglašen uporabom vrste pisma koja se jasno razlikuje od vrste pisma kojim je pisan ostatak popisa sastojaka. Primjeri za to su:

Primjer 1: **lješnjak**

Primjer 2: *lješnjak*

Primjer 3: lješnjak

Primjer 4: lješnjak

Primjer 5: LJEŠNJAK

Primjer 6: lješnjak

## 2.4. ANALITIČKE METODE U ODREĐIVANJU ALERGENA

U analitici hrane koriste se brojne analitičke metode za određivanje imunoenzimskih reakcija. Rezultati tih metoda koriste se u različite svrhe, između ostalog za određivanje alergena. Izbor prave analitičke metode ponajviše ovisi o vrsti uzorka i prirodi informacije koja se traži (Runje i Cvrtila, 2006). Prema Butorac i suradnici (2013) analitičke metode dijele se na: spektroskopske i spektrometrijske metode, separacijske metode, molekularno-genetske metode i biokemijske metode.

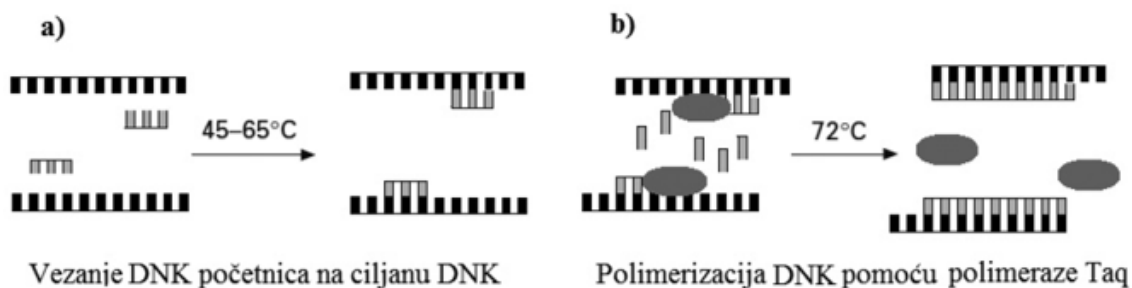
Spektroskopske metode koriste se elektromagnetskim zračenjem za ispitivanje sastava uzorka, a spektrometrijske metode analiziraju čestice. Spektroskopske metode se dijele na spektrometriju masa, nuklearnu magnetnu rezonanciju, infracrvenu spektroskopiju, fluorescentnu spektroskopiju i ultrazvučnu spektroskopiju. U separacijske metode spadaju plinska kromatografija, tekućinska kromatografija i kapilarna elektroforeza. Navedene metode najčešće se koriste za određivanje kakvoće hrane, zemljopisnog podrijetla, aditiva, masnoće, metala i sl. (Butorac i sur., 2013).

Za određivanje alergena u hrani koriste se molekularno-genetske metode i biokemijske metode. Molekularno-genetske metode analiziraju molekule DNK. Dije se na metodu lančane reakcije polimeraze (PCR metoda) i modifikacije, metode temeljene na fizikalnim svojstvima slijeda DNK i elektroforetske metode. Od navedenih molekularno-genetskih metoda za određivanje alergena najpoznatija je PCR metoda. To je jednostavna metoda u kojoj se termostabilni enzimi polimeraze DNK koriste za umnažanje dijela molekule DNK, primjer je Taq polimeraza (slika 3.). Metoda kroz svoje tri faze (denaturaciju, elongaciju i terminaciju) može dobiti milijarde kopija određenog dijela DNK (Butorac i sur., 2013).

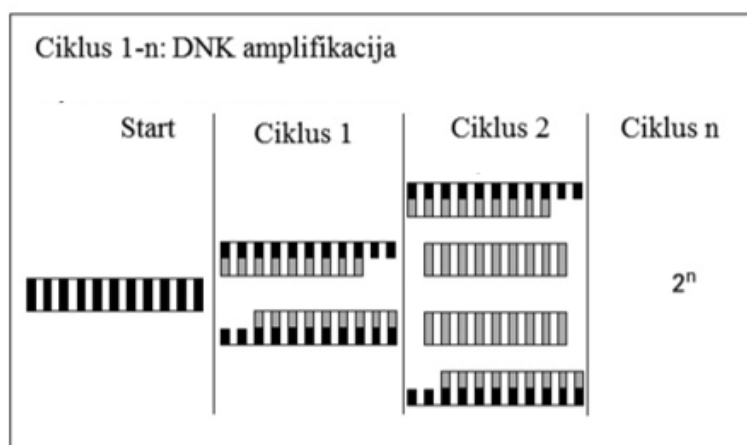
### 1. Faza denaturacije



### 2. Produljenje ciklus 1



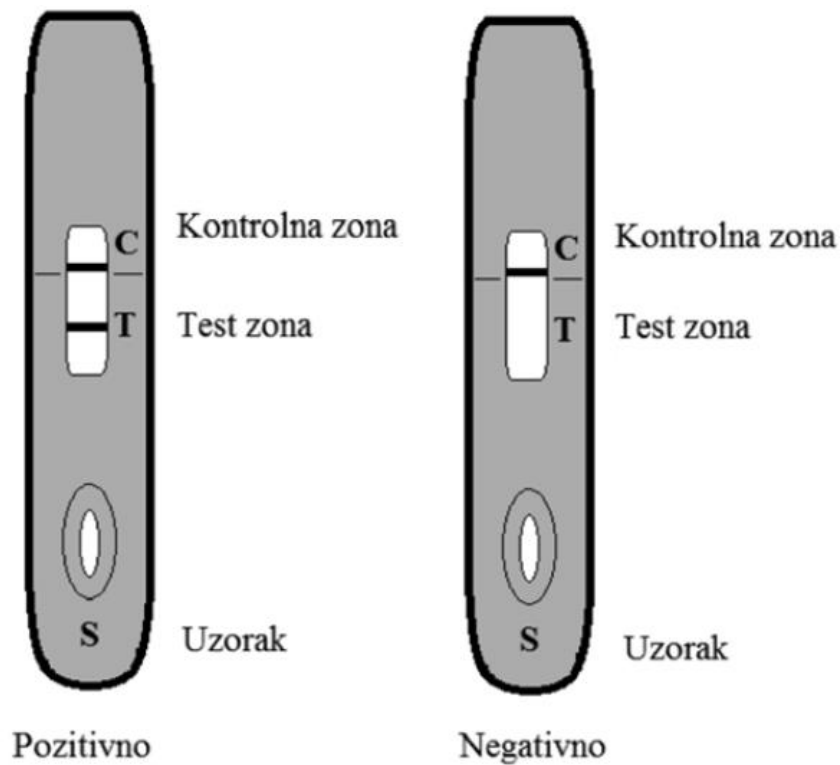
### 3. Faza završetka



Slika 3. PCR metoda (Butorac i sur., 2013)

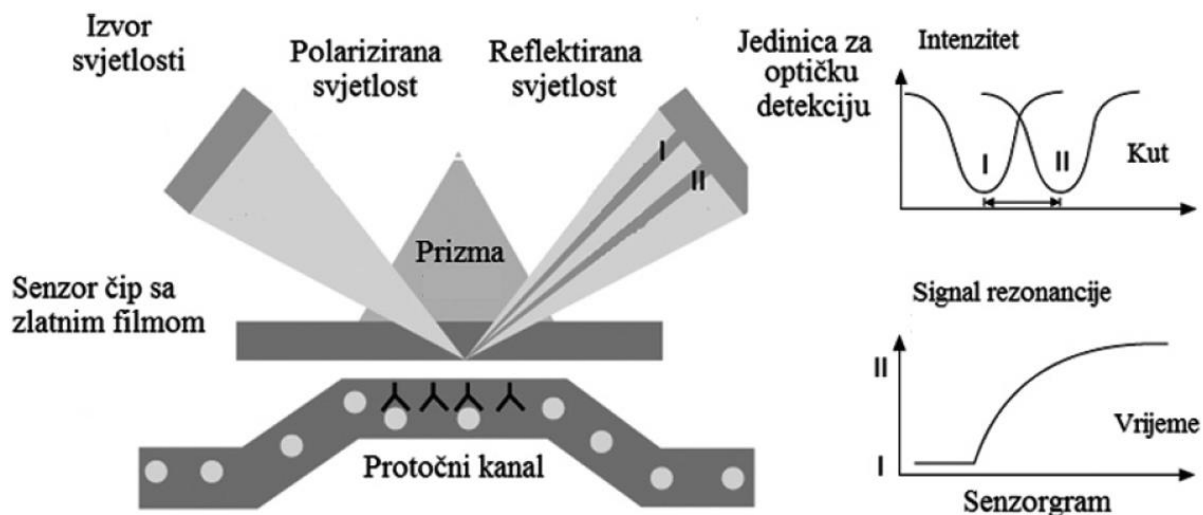
Biokemijske metode određuju imunoenzimske reakcije pri traženju supstancije. Dijelev se na imunokromatografski test, biosenzore, analizu Western blot i ELISA metodu. Imunokromatografski test „temelji se na vezanju antigena iz tekućeg uzorka s protutijelima

apsorbiranim na nitroceluloznu membranu u obliku crte“ (Butorac i sur., 2013). Kada je test pozitivan pojavljuju se dvije crte, a u slučaju negativnog testa samo jedna (slika 4).



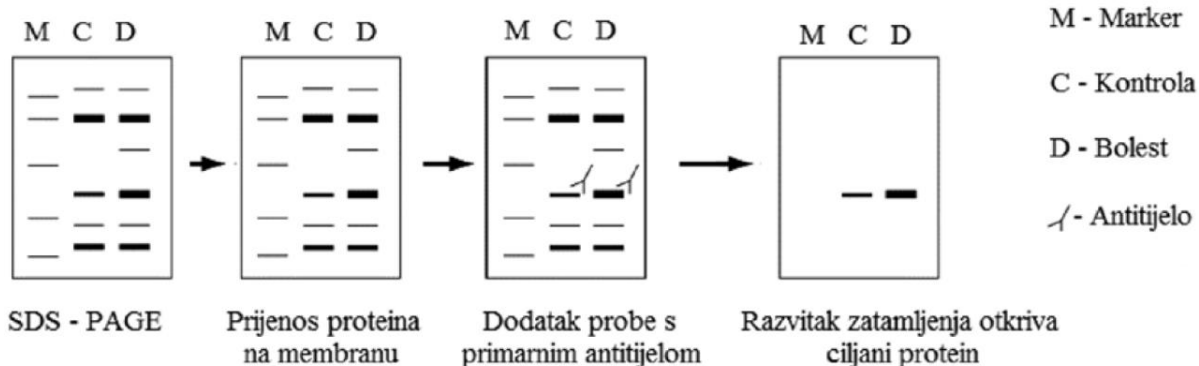
Slika 4. Imunokromatografski test (Butorac i sur., 2013)

U analizi hrane se od biosenzora koriste optički biosenzori (engl. *Surface Plasmon Resonance-SPR*) koji detektiraju vezanje biomolekula na temelju promjene polariziranog svjetla (slika 5.) (Butorac i sur., 2013).



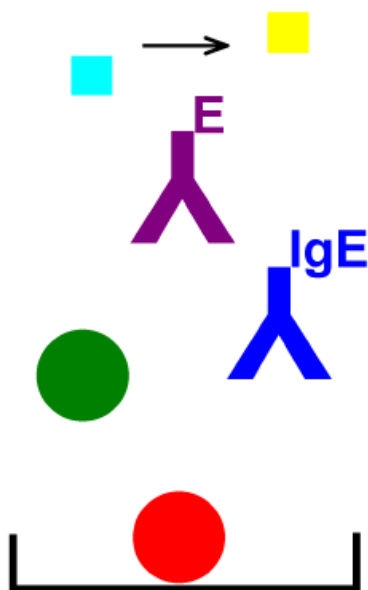
Slika 5. SPR detekcija (Butorac i sur., 2013)

Western blot analiza otkriva proteine iz uzorka. Proteini se razdvajaju natrijev dodecilsulfat-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) i prenose na membranu (slika 6.). Na testu se pojavi tamna linija kad se na primarno protutijelo veže sekundarno protutijelo (Butorac i sur., 2013).



Slika 6. Western blot analiza (Butorac i sur., 2013)

Osim navedenih metoda, za određivanje alergena koriste se metode RAST (engl. *Radio-Allergosorbent Test*) i EAST (engl. *Enzyme-Allergosorbent Test*) koje određuju razinu specifičnih IgE protutijela (slika 7.) (Besler i sur., 2002).



Slika 7. RAST/EAST metoda (Besler i sur., 2002)

#### 2.4.1. ELISA metoda

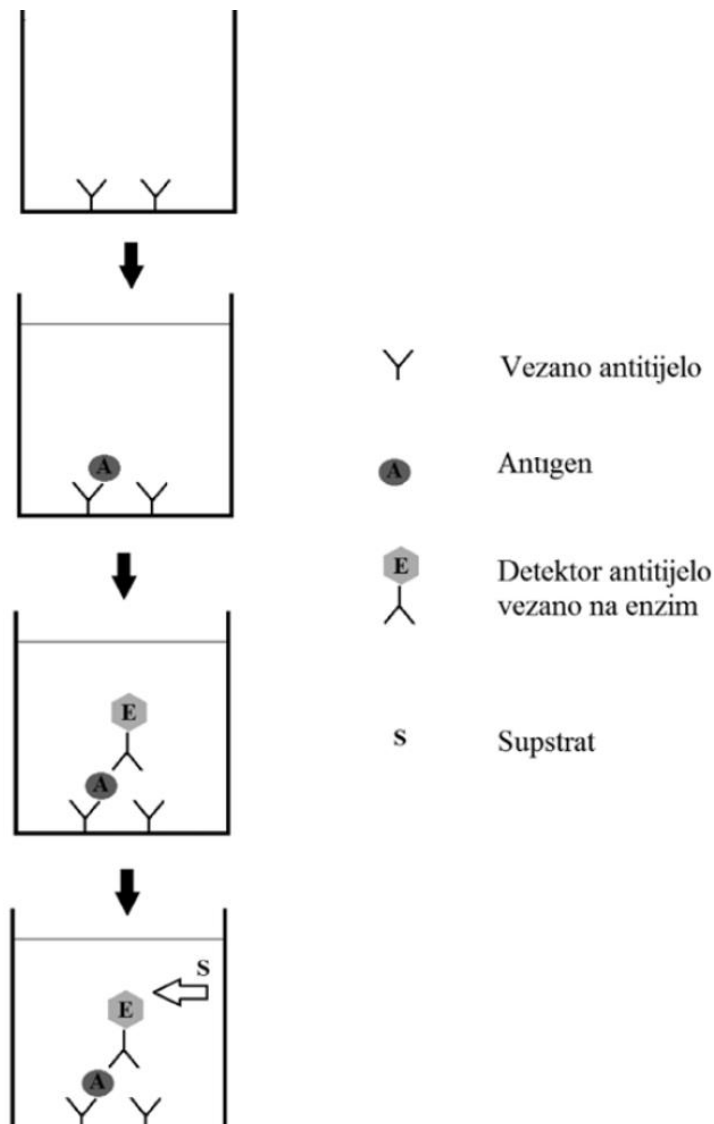
Imunoenzimski test ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) od svih navedenih metoda ima najveći potencijal u otkrivanju alergena u hrani. ELISA metoda je biokemijska metoda, uvedena u istraživanja nakon što se otkrilo da se protutijela ili antigeni mogu vezati za čvrstu podlogu tako da se ne isperu fiziološkom otopinom. U svrhu toga koriste se polistirenske mikrotitracijske pločice četvrtastog oblika s 96 jažica (Runje i Cvrtila, 2006). Pri testiranju protutijelo ili antigen su označeni enzimom. Do reakcije dolazi zbog vezanja protutijela i antigena iz uzorka, a očitava se promjenom boje tijekom spektrofotometrijskog mjerenja (Butorac i sur., 2013).

Postoji više vrsta ELISA metoda: indirektna, sendvič, konkurentna te višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča, a u određivanju alergena najčešće se koriste sendvič i konkurentna ELISA metoda (Butorac i sur., 2013).

##### 2.4.1.1. Sendvič ili direktna ELISA

Sendvič ili direktna ELISA je osjetljivi test kojim se mogu odrediti specifični proteini. Za dno udubljenja mikroploče vezano je poznato specifično protutijelo na koje se veže antigen iz materijala koji se ispituje. Nakon ispiranja dodaje se konjugat kojega čine protutijela vezana

enzimom. Ta protutijela se vežu za antigen koji se vezao za mikroploču i nije ispran (slika 8). Enzim tada stupa u reakciju sa supstratom i pojavljuje se boja (Đurišić i sur., 2003).

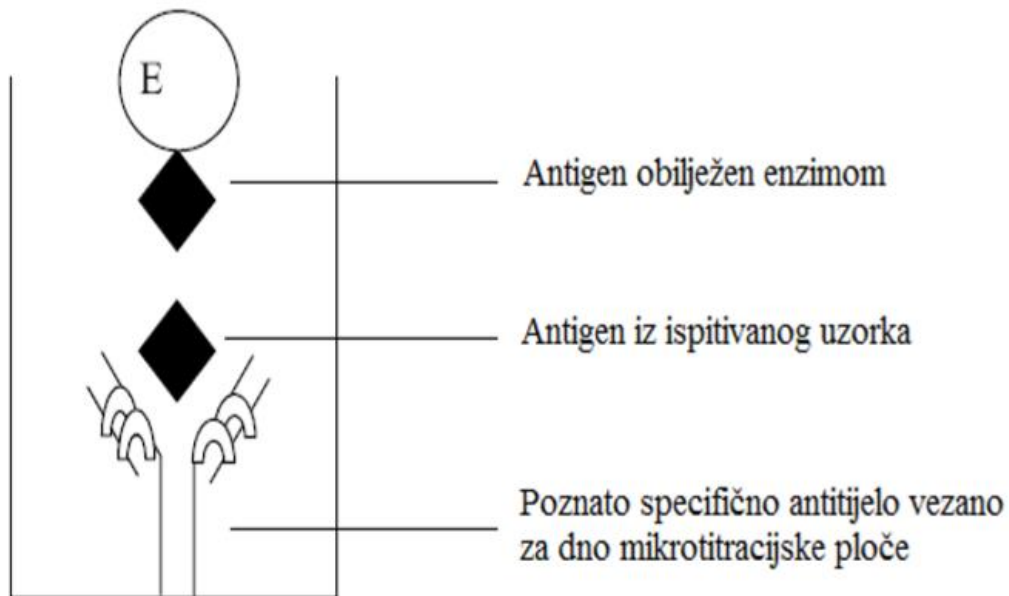


Slika 8. Sendvič ELISA test (Butorac i sur., 2013)

#### 2.4.1.2. Konkurentska ELISA

Poznato specifično protutijelo je, kao i u sendvič metodi, vezano za dno mikroploče (slika 9). U jažice ploče se dodaje materijal koji se ispituje, a zatim konjugat kojeg čini poznati antigen spojen s enzimom. Natjecanje (konkurencija) se odvija između antigena iz materijala koji se ispituje i antigena s enzimom za specifično protutijelo vezano za mikroploču. Prednost ima antigen iz materijala koji se ispituje jer se on prvi dodaje. Antigen će se vezati za protutijelo na mikroploči i onemogućiti vezivanje antigena s enzimom koji će se ispiranjem odstraniti.

Ispiranjem konjugata, odnosno antigena s enzimom, supstrat će ostati bezbojan što znači da je test pozitivan (Đurišić i sur., 2003).



Slika 9. Konkurentna ELISA (Đurišić i sur., 2003).

Brojne su prednosti ELISA metode. To je jednostavna i brza metoda, kapitalni troškovi su niski, ima standardizirani format od 96 jažica, moguća je prenosivost, selektivnost, brzi povrat informacija itd. Neki od nedostataka ove metode su: mogućnost lažno pozitivnih rezultata, nemogućnost analize više alergena odjednom, duže razvojno vrijeme (Hefle, 2006).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci

U ovom istraživanju korišteno je 7 istovrsnih uzoraka čokolade s različitim datumima proizvodnje i 7 različitih čokoladnih proizvoda prehrambene industrije „Kraš“ d.d. Uzorci su označeni rednim brojevima od 1 do 7. Prije ekstrakcije, svaki uzorak je usitnjen i homogeniziran (Slika 10 i Slika 11).



Slika 10. Homogenizirani uzorci 7 istovrsnih čokolada s različitim datumima proizvodnje



Slika 11. Homogenizirani uzorci 7 različitih čokoladnih proizvoda

### 3.1.2. Reagensi i pribor

Testiranje uzoraka provedeno je *VERATOX® for Hazelnut Allergen* i *RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA testovima za kvantitativno određivanje alergena lješnjaka u čokoladnim proizvodima.

*VERATOX® for Hazelnut Allergen* test sastoji se od (Slika 12):

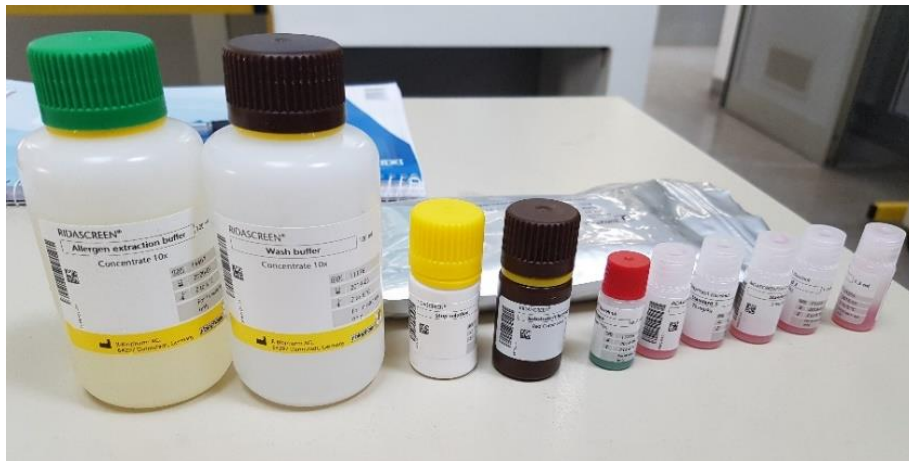
- 48 mikro-jažica obloženih protutijelima
- 48 crveno označenih mikro-jažica za miješanje
- pet žuto označenih bočica (1,5 mL), koje sadrže 0, 2.5, 5, 10 i 25 mg kg<sup>-1</sup> proteina lješnjaka (kontrolni reagens)
- dvije plavo označene bočice (5 mL), koje sadrže enzimom obilježeni konjugat
- zeleno označena bočica (24 mL) otopine K-Blue supstrata
- crveno označena bočica (32 mL) otopine Red Stop
- 10 mM PBS ekstrakcijskog pufera
- koncentrirani PBS-Tween pufer za ispiranje (40 mL)
- ekstrakcijski aditiv (50 g)
- plastične žlice za aditiv.



Slika 12. Sastav *Veratox® for Hazelnut Allergen* ELISA testa

*RIDASCREEN® FAST Hazelnut* test sastoji se od (Slika 13):

- mikrotitracijske pločice s 46 imobiliziranih protutijela
- pet žuto označenih bočica (1,3 mL), koje sadrže 0, 2.5, 5, 10 i 20 mg kg<sup>-1</sup> proteina lješnjaka
- crveno označena bočica (0,7 mL) koncentrata konjugata
- smeđe označena bočica (10 mL) supstrata
- žuto označena bočica (14 mL) Stop otopine
- koncentrat za razrjeđivanje uzoraka (100 mL)
- 10 mM koncentrat fosfatnog pufera za ispiranje (100 mL).



Slika 13. Sastav *RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA testa

### 3.1.3. Uredaji i oprema

Tijekom istraživanja korišteni su sljedeći uredaji:

- *ELISA Stat Fox Microstip Reader* za očitavanje alergena lješnjaka u uzorcima (Slika 14)
- *ChroMate 4300 Microplate ELISA Reader* za očitavanje alergena lješnjaka u uzorcima (Slika 15)
- Analitička vaga (Ohaus Explorer Analytical Balance, New Jersey, SAD)
- Tresilica s vodenom kupelji (Ru-Ve, Njemačka).



Slika 14. *ELISA Stat Fox Microstip Reader*



Slika 15. *ChroMate 4300 Microplate ELISA Reader*

Korišteno je sljedeće posuđe i pribor:

- automatska pipeta
- nosač za jažice, AgraQuant, Romer Labs, Austrija
- odmjerna tikvica od 250 mL
- Erlenmayerova tikvica od 300 mL
- menzura 100 mL
- čaša volumena 100 mL
- naborani filter papir
- držač mikro-jažica
- set mikrojažica obloženih protutijelima
- set crveno označenih mikro-jažica
- automatska pipeta od 100  $\mu$ L
- 12-kanalna automatska pipeta Gilson (Villiers-el-Bel)
- mjerač vremena (NEOGEN)
- bočica za ispiranje (NEOGEN)
- posude za reagense za 12-kanalnu u automatsku pipetu (NEOGEN)
- destilirana voda
- staničevina.

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. *VERATOX*<sup>®</sup> for Hazelnut Allergen ELISA test**

#### 3.2.1.1. Ekstrakcija uzoraka

Uzorci za testiranje prikupljeni su u skladu s prihvaćenim tehnikama uzorkovanja. Uzorak treba biti usitnjen i dobro homogeniziran prije početka ekstrakcije. Koraci u pripremi i ekstrakciji uzorka su sljedeći:

1. Koncentrat ekstrakcijskog pufera iz seta za ELISA test razrijeđen je destiliranom vodom u omjeru 1:10, odnosno otpipetirano je 20 mL koncentrata ekstrakcijskog pufera u tikvicu od 200 mL koja je nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Razrijeđeni ekstrakcijski pufer čuva se u hladnjaku na temperaturi od 2 do 8 °C;

2. Priprema pufera za ispiranje. Koncentrat pufera za ispiranje iz seta za ELISA test razrijeđen je destiliranom vodom u omjeru 1:10, odnosno otpipetiran je 1 mL koncentrata za ispiranje u tikvicu od 10 mL te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Razrijeđeni pufer za ispiranje čuva se u hladnjaku na temperaturi od 2 do 8 °C;
3. Zagrijavanje ekstrakcijske otopine na 60° C uranjanjem u vodenu kupelj;
4. Usitnjavanje reprezentativnog uzorka do veličine finih čestica;
5. Prenosenje 5 g uzorka u Erlenmayerovu tikvicu volumena 300 ml;
6. Dodavanje jedne žlice ekstrakcijskog aditiva;
7. Dodavanje 125 mL zagrijane ekstrakcijske otopine (60°C);
8. Zatvaranje tikvice Parafilmom kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija tijekom ekstrakcije;
9. Ekstrahiranje miješanjem (150 rpm) u vodenoj kupelji (60°C) kroz 15 minuta;
10. Mirovanje uzorka pet minuta kako bi se slegao sadržaj;
11. Filtriranje supernatanta: najmanje 5 mL ekstrakta kroz filter papir. Čisti supernatant koristi se kao uzorak;
12. Hlađenje uzoraka do sobne temperature prije testiranja.

### 3.2.1.2. Postupak određivanja

Prije upotrebe svi reagensi se zagrijavaju na sobnu temperaturu (18-30 °C), a jažice se prije samog korištenja moraju čuvati na temperaturi od 2 do 8 °C. Za sve standarde i uzorke odvoje se crvene i prozirne jažice te se postave na mikrotitracijske pločice. Crvene jažice su kontrolne, one ne sadrže imobilizirana protutijela, a prozirne ih sadrže stoga služe za daljnju analizu. Sljedeći korak je odvajanje po jedne crvene jažice za miješanje za svaki istraživani uzorak i pet crvenih jažica za standarde te ih se postavlja u držač za jažice. Zatim se odvoji jednak broj protutijela obloženih jažica, a ostatak jažica koji se neće koristiti, odmah se sprema u vrećicu s desikantom. Jedan kraj trake jažica s protutijelima označi se sa „1“ te polaže traka u držač za jažice s označenim krajem s lijeve strane.

Prije upotrebe reagensa, svaku bočicu je potrebno protresti, gdje se u crvene mikrojažice otpipetira 150 µL kontrole (0, 2.5, 5, 10 i 25 mg kg<sup>-1</sup>) i 150 µL uzorka odnosno ukupno 12 jažica. Koristeći 12-kanalnu automatsku pipetu, pomiješa se tekućina u jažicama naizmjeničnim uvlačenjem i ispuštanjem tri puta. Potom se prenese 100 µL u jažice obložene

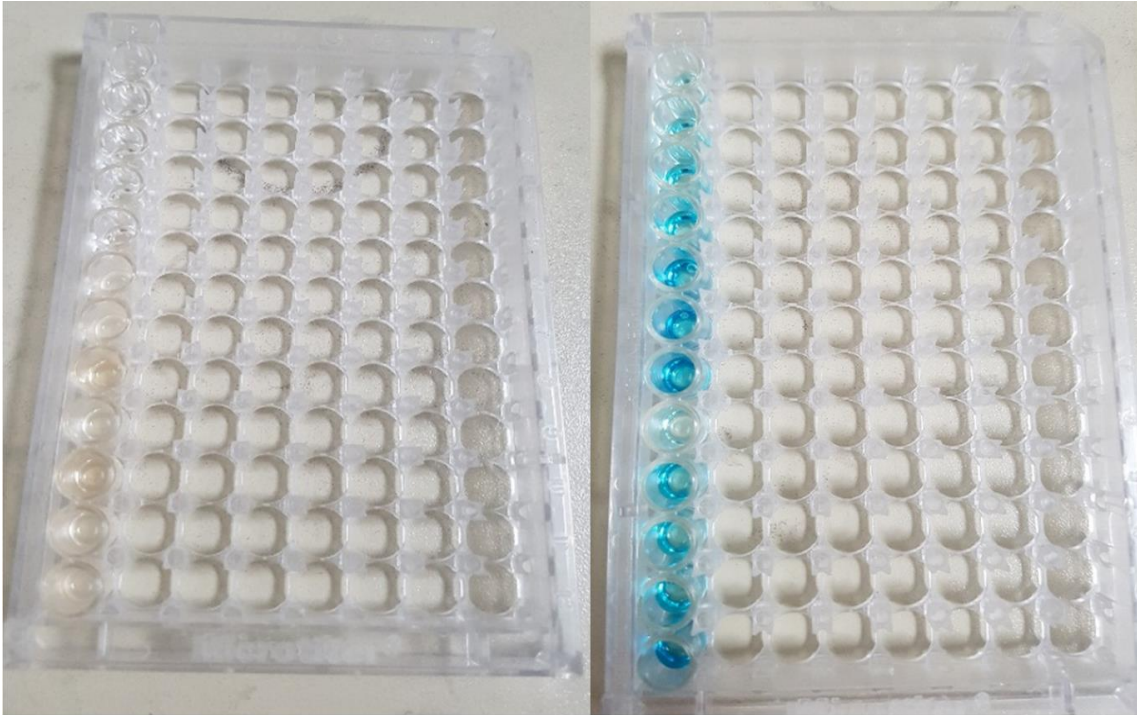
protutijelima te miješa klizeći držačem za mikrojažice pokretima naprijed-natrag po ravnoj površini deset do dvadeset sekundi, pazeći pri tom da ne dođe do prolijevanja reagensa iz jažica. Crveno obložene jažice se odbacuju, a jažice s protutijelima pokrivaju papirnatim ručnikom i inkubiraju na temperaturi od 18 °C.

Slijedi istresanje sadržaja iz jažica s protutijelima, nakon čega se jažice ispune puferom za ispiranje. Ovaj postupak ponavlja se pet puta, a nakon ispiranja, jažice se posuše da bi se pufer za ispiranje u potpunosti uklonio. Proces ispiranja jažica je od velike važnosti za točnost i preciznost postupaka.

Potrebni volumen konjugata se zatim prenosi iz plavo označene bočice u čistu zdjelicu za reagens te novim nastavcima na 12-kanalnoj automatskoj pipeti se pipetira 100 µL supstrata u svaku jažicu. Pomičući pločicu s jažicama pokretima naprijed-natrag po glatkoj površini dvadeset sekundi, provodi se miješanje, a potom inkubiranje deset minuta na sobnoj temperaturi. Slijedi ponovno odbacivanje sadržaja jažica, ispiranje pet puta puferom za ispiranje, dodavanje 100 µL zeleno označenog supstrata te miješanje i inkubacija na sobnoj temperaturi deset minuta. Dodani supstrat uzrokuje promjenu obojenja u jažicama. Otopina *Red Stop* iz crveno označene bočice prenosi se u čistu zdjelicu za reagens novim nastavcima na 12-kanalnoj automatskoj pipeti po 100 µL u svaku jažicu. Navedeno se pomiješa klizeći pokretima naprijed-natrag, a nastavci se odbacuju.

Dno mikrojažica potrebno je obrisati papirnatim ručnikom te očitati rezultat na spektrofotometru mikrotitracijskih pločica koristeći filter 650 nm (engl. *Neogen reader Stat Fax*) u krajnje lijevu poziciju prema gore. Prije očitavanja, ukoliko su prisutni mjehurići zraka u jažicama, potrebno ih je odstraniti kako ne bi utjecali na rezultate istraživanja. Prema uputama proizvođača vizualno se može uočiti u kojim jažicama se nalazi veći, a u kojima manji udjel alergena lješnjaka. Tamnoplave jažice ukazuju na veći udjel alergena lješnjaka za razliku od svijetlo plavih (Slika 16).





Slika 16. Promjena obojenja u jažicama nakon dodatka stop otopine

### 3.2.2. **RIDASCREEN® FAST Hazelnut ELISA test**

#### 3.2.2.1. Priprema reagensa

Svi reagensi pripremaju se neposredno prije provođenja testa.

Priprema konjugata – konjugat se pripremi miješanjem 200  $\mu$ L koncentrata konjugata i 2 mL destilirane vode.

Priprema pufera za ispiranje – prije upotrebe pufer treba biti razrijeđen u omjeru 1:10, tako da se pomiješa 100 mL koncentrata pufera i 900 mL destilirane vode.

#### 3.2.2.2. Ekstrakcija uzoraka

Postupak:

1. Odvaži se 1 g uzorka čokolade u Erlenmayerovu tikvicu od 300 mL, doda 1 g mlijeka u prahu (obrano mlijeko) te 20 mL *Extraction* pufera (60°C, 10 minuta),
2. Inkubacija uzoraka 10 minuta na tresilici na temperaturi od 60°C u vodenoj kupelji,

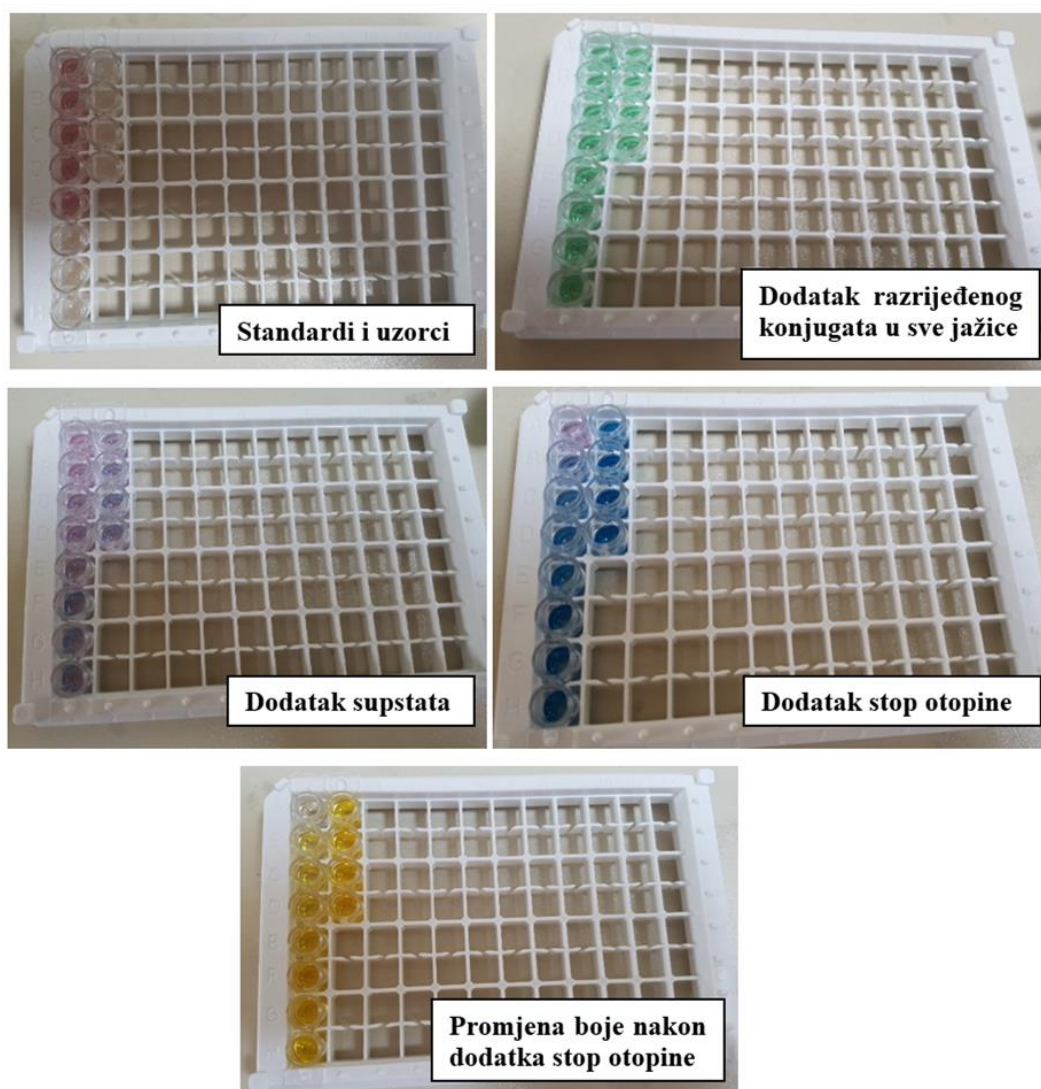


3. Hlađenje na sobnoj temperaturi od pet do deset minuta,
4. Filtracija preko filter papira u tikvicu od 150 mL,
5. Razrijeđeni filtrat mora se odmah koristiti za provođenje testa.

#### 3.2.2.3. Postupak određivanja

100  $\mu\text{L}$  uzorka i 100  $\mu\text{L}$  standarda nanese se u jažice na mikrotitarsku pločicu i inkubira deset minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, tijekom koje je došlo do vezanja uzoraka na imobilizirana protutijela, sadržaj jažica se izbac i ispere dva puta s volumenom od 200  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje. Nakon ispiranja, jažice se posuše da bi se pufer za ispiranje u potpunosti uklonio.

U sljedećem koraku dodaje se pipetom 100  $\mu\text{L}$  razrijeđenog konjugata u jažice i inkubira deset minuta na sobnoj temperaturi pokriveno papirnatim ručnikom za zaštitu od moguće kontaminacije. Slijedi ponovno odbacivanje jažica i ispiranje dvaput puferom za ispiranje. U sljedećem koraku dodaje se 100  $\mu\text{L}$  supstrata te slijedi inkubacija deset minuta na sobnoj temperaturi. U zadnjem koraku dodaje se 100  $\mu\text{L}$  stop otopine, za zaustavljanje reakcije enzima i supstrata, kojom se mijenja boja u jažicama iz svijetlo roze u žutu (Slika 17). Intenzivnije žuto obojenje ukazuje na veći udjel alergena lješnjaka. Nakon dobrog protresanja mikrotitarske pločice, jažice se izdvoje i spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija pri 450 nm.



Slika 17. Postupak određivanja (*RIDASCREEN® FAST Hazelnut*) ELISA test

### 3.2.3. Ispitivanje stavova potrošača o prisutnosti alergena

Za obradu rezultata ankete korišten je statistički program *Microsoft Excel*. U svrhu prikupljanja stavova i mišljenja potrošača o lješnjaku i proizvodima od lješnjaka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije, odnosno o prisutnosti tragova lješnjaka u čokoladama provedeno je *online* anketiranje potrošača starosti od 19 do 75 godina na uzorku od 104 ispitanika. Cilj upitnika bio je ispitati pojedince o prisutnosti alergena u hrani, razumijevanju i čitanju deklaracija, asocijacije na izraze s deklaracijama vezano uz prisutnost alergena te povjerenje prema proizvođačima. Među ispitanicima je bilo potrošača koji su alergični na orašaste plodove pa su oni odgovorili na pitanja koje čokolade konzumiraju i od kojih proizvođača. Anketa se sastoji od 18 pitanja i u potpunosti je anonimna. Primjer upitnika nalazi se u Prilogu 1.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja, pomoću *VERATOX® for Hazelnut Allergen* i *RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA testova određen je udjel alergena lješnjaka u proizvodima od čokolade. Tijekom izrade eksperimentalnog dijela, provedena je anketa gdje su ispitanici stavovi potrošača o lješnjaku i proizvodima od lješnjaka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije.

U ovom poglavlju prikazani su rezultati i analiza *VERATOX® for Hazelnut Allergen* i *RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA testova te provedene ankete, te je provedena rasprava.

Rezultati su prikazani u tablicama i na slikama.

### 4.1. UDJEL ALERGENA LJEŠNJAKA ODREĐEN ELISA TESTOVIMA

Udjel alergena lješnjaka u čokoladnim proizvodima određen *VERATOX® for Hazelnut Allergen* ELISA testom prikazan je u tablicama 2. do 4., a udjel alergena određen *RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA testom u tablicama 5. i 6.

U ovom radu određen je udjel alergena lješnjaka u 7 istih uzoraka čokolade s različitim datumima proizvodnje i 7 različitih čokoladnih proizvoda *VERATOX® for Hazelnut Allergen* i *RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA testovima. Kvantitativni imunološki testovi baziraju se na izradi baždarnе krivulje iz koje se određuje udjel alergena (lješnjaka) u uzorcima prema signalu dobivenom analizom tog uzorka (apsorbancija). Baždarna krivulja prikazuje ovisnost apsorbancije lješnjaka o udjelu u standardnim uzorcima. Korišten je čitač ChroMate 4300 Microplate ELISA Reader koji ima pohranjen program za izračun udjela lješnjaka. Program izrađuje matematičku jednadžbu za baždarnu krivulju na temelju 5 parametara standardnih uzoraka te prema jednadžbi iz vrijednosti apsorbancije, određene testom, izračunava udjel lješnjaka u svakom uzorku. Matematička jednadžba se treba podudarati s baždarnom krivuljom.

ELISA je visoko osjetljiv i specifičan imunoenzimski test koji je u odnosu na druge analitičke metode vrlo jednostavan, brz i primjenjiv ne samo za kvalitativna i semikvantitativna već i za kvantitativna određivanja.

Također, usporedno s rezultatima ELISA testa, tablično su prikazani navodi na deklaracijama pripadajućih analiziranih proizvoda koji su neposredno vezani uz eventualnu prisutnost alergena lješnjaka.

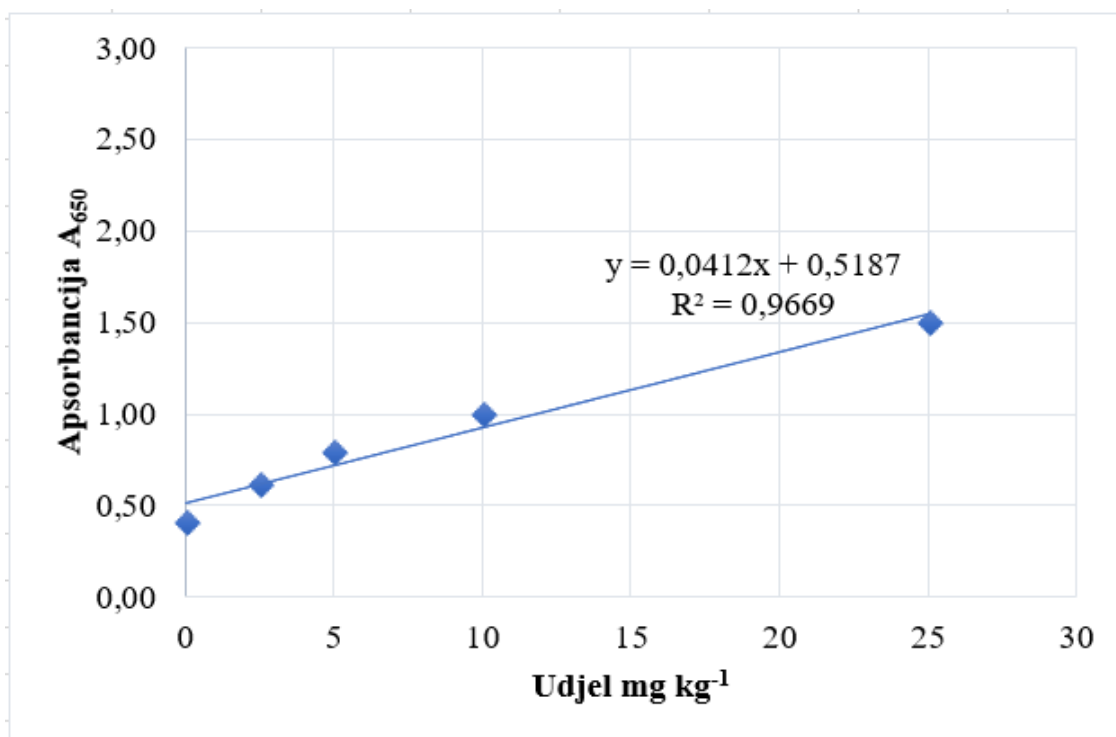
*VERATOX® for Hazelnut Allergen* ELISA test za izradu baždarne krivulje koristi 5 standardnih otopina lješnjaka različitih koncentracija (0, 2.5, 5, 10 i 25 mg kg<sup>-1</sup>) i apsorbanciju izmjerenu pri valnoj duljini od 650 nm (Slika 18. i 19.)

*RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA test za izradu baždarne krivulje koristi 5 različitih standardnih otopina lješnjaka različitih koncentracija (0, 2.5, 5, 10 i 20 mg kg<sup>-1</sup>) i apsorbanciju izmjerenu pri valnoj duljini od 450 nm (Slika 20. i 21.).

Na slikama 18. i 19. prikazane su krivulje otopina standarda alergena lješnjaka prema kojima su određeni udjeli alergena lješnjaka u ispitivanim uzorcima *VERATOX® for Hazelnut Allergen* ELISA testom, pri čemu su rezultati analiza prikazani u tablicama 2. i 3.

Tablica 2. Udjel alergena lješnjaka (mg kg<sup>-1</sup>) u uzorcima (n=7) čokolade

| <b>Uzorak</b> | <b>Udjel alergena lješnjaka<br/>(mg kg<sup>-1</sup>)</b> |
|---------------|--|
| Čokolada 1    | 44,1   |
| Čokolada 2    | 39,9   |
| Čokolada 3    | 35,2   |
| Čokolada 4    | 23,1   |
| Čokolada 5    | 16,1   |
| Čokolada 6    | 23,2   |
| Čokolada 7    | 24   |



Slika 18. Baždarna krivulja standardnih otopina alergena lješnjaka (*VERATOX® for Hazelnut Allergen* ELISA test)

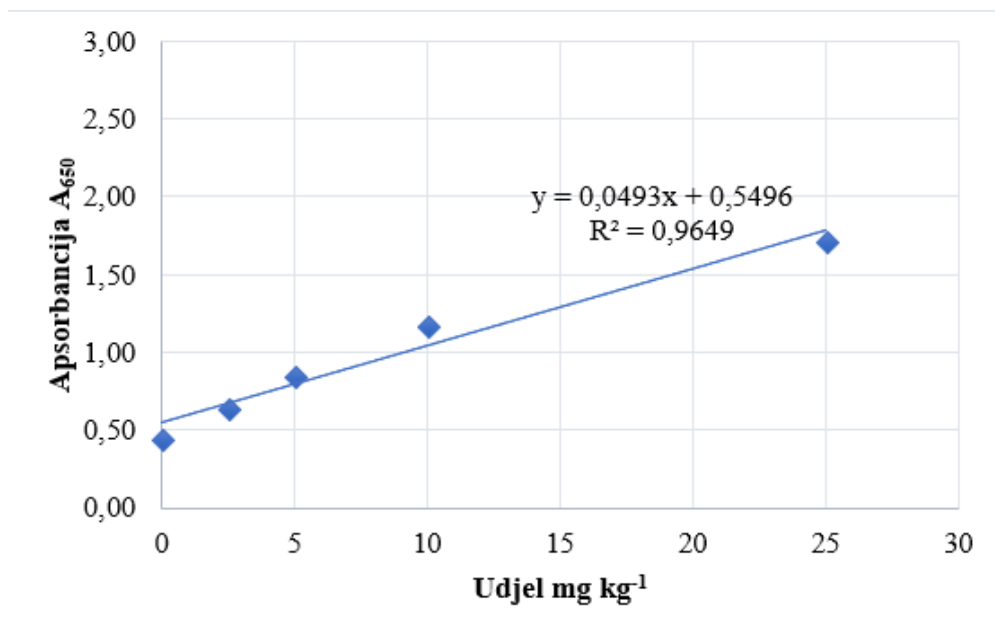
Tablica 3. Udjel alergena lješnjaka (mg kg<sup>-1</sup>) u uzorcima (n=7) čokoladnih proizvoda

| Uzorak                      | Udjel alergena lješnjaka (mg kg <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------|---|
| Mliječna čokolada 1         | 21,1  |
| Mliječna čokolada 2         | 32  |
| Kakao u prahu               | 0,2   |
| Pjenasti desert s čokoladom | 0,7   |
| Čokoladne mrvice            | 7,6   |
| Desert s čokoladom          | 9,7   |
| Mliječna čokolada 3         | 33,1  |

Prvih sedam istovrsnih čokolada sadrže navod „Može sadržavati bademe, gluten, mlijeko, lješnjake, kikiriki“, dok ostalih sedam čokoladnih proizvoda koji su prikazani u Tablici 4., imaju navod koji upućuje na moguće tragove lješnjaka ili drugih orašastih plodova, međutim ne postoji univerzalan navod te se na deklaracijama pojavljuju različite verzije.

Tablica 4. Navodi na deklaraciji analiziranih čokoladnih proizvoda vezani uz prisutnost alergena lješnjaka

| <b>Uzorak</b>               | <b>Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena lješnjaka</b> |
|-----------------------------|--|
| Mliječna čokolada 1         | „Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova.“               |
| Mliječna čokolada 2         | „Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova.“               |
| Kakao u prahu               | „Može sadržavati tragove lješnjaka.“                               |
| Pjenasti desert s čokoladom | „Može sadržavati tragove lješnjaka.“                               |
| Čokoladne mrvice            | „Može sadržavati tragove lješnjaka.“                               |
| Desert s čokoladom          | „Može sadržavati tragove lješnjaka.“                               |
| Mliječna čokolada 3         | „Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova.“               |



Slika 19. Baždarna krivulja standardnih otopina alergena lješnjaka (*VERATOX® for Hazelnut Allergen* ELISA test)

Kako bi se mogao očitati dobiveni udjel lješnjaka, *Neogen ELISA Stat Fox Microstip Reader* čitač prethodno izradi baždarnu krivulju za koju koristi standard lješnjaka u 5 različitih koncentracija i apsorbanciju izmjerenu pri valnoj duljini od 650 nm. Koeficijent baždarne krivulje ( $R^2$ ) za prvih sedam uzoraka iznosio je 0,9669, a za drugih sedam uzoraka iznosio je 0,9649, što upućuje na dobru korelaciju podataka. Tablica 2. prikazuje udjel lješnjaka u čokoladama gdje je najviša koncentracija 44,1 mg kg<sup>-1</sup> određena u uzorku „Čokolada 1“, koji sadrži navod o mogućoj prisutnosti alergena lješnjaka, u „Čokolada 2“ je koncentracija 39,9 mg kg<sup>-1</sup>, a u „Čokolada 3“ je iznosila 35,2 mg kg<sup>-1</sup> što ukazuje na prisutnost alergena lješnjaka.

Tablica 3. prikazuje udjel lješnjaka u čokoladnim proizvodima gdje je najviša koncentracija 33,1 mg kg<sup>-1</sup> iznosila na uzorku „Mliječna čokolada 3“ koja sadrži navod o prisutnosti alergena lješnjaka, „Mliječna čokolada 2“ gdje je koncentracija iznosila 32 mg kg<sup>-1</sup> te „Mliječna čokolada 1“ gdje je koncentracija iznosila 21,1 mg kg<sup>-1</sup>. Ostali proizvodi također sadrže navod o mogućoj prisutnosti lješnjaka, s obzirom da je ovim istraživanjem potvrđena njihova prisutnost. Svaki od ispitivanih čokolada na deklaraciji ima navod koji upućuje na moguće tragove lješnjaka ili drugih orašastih plodova, međutim ne postoji univerzalan navod te se na deklaracijama pojavljuju različite verzije. Koeficijent determinacije baždarne krivulje ( $R^2$ ) iznosio je  $S=0,9659$  što upućuje na bolju korelaciju podataka u usporedbi sa *RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA testom gdje je  $R^2$  iznosio  $S=0,9461$ .

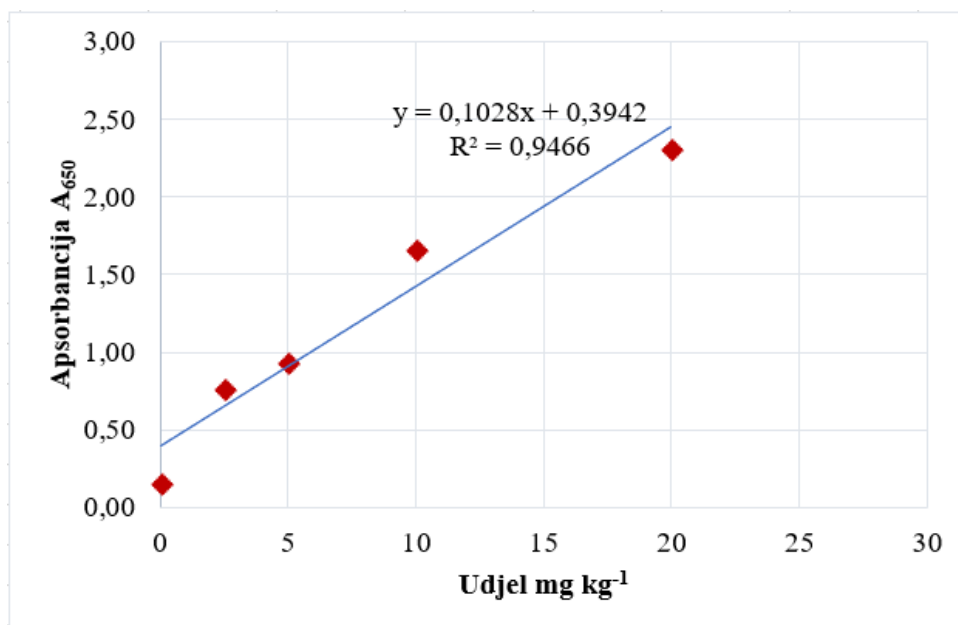
Prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani, subjekt u poslovanju s hranom odgovoran je za označavanje hrane te mora obavezno označiti alergene u popisu sastojaka. U ovom slučaju analizirani proizvodi ne sadrže lješnjak kao sastojak te zbog toga subjekti u poslovanju s hranom nisu obavezni označavati opasnost od alergena lješnjaka ukoliko nisu prisutni. S obzirom da svu odgovornost preuzima subjekt u poslovanju s hranom koji je odgovoran za sastav proizvoda, na njemu je odluka o navođenju odnosno ne navođenju potencijalnih alergena koji se u proizvodima mogu naći u tragovima, a prema uredbi ih nisu obvezni navoditi.

Na slikama 20. i 21. prikazane su baždarne krivulje otopina standarda alergena lješnjaka prema kojima su određeni udjeli lješnjaka u ispitivanim uzorcima *RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA testom, dok tablice 5. i 6. prikazuju rezultate analiza.

Tablica 5. Udjel alergena lješnjaka ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) u uzorcima ( $n=7$ ) čokolade

| <b>Uzorak</b> | <b>Udjel alergena lješnjaka<br/>(<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b> |
|---------------|--|
| Čokolada 1    | >20  |
| Čokolada 2    | >20  |
| Čokolada 3    | >20  |
| Čokolada 4    | >20  |
| Čokolada 5    | 11,31  |
| Čokolada 6    | >20  |
| Čokolada 7    | >20  |

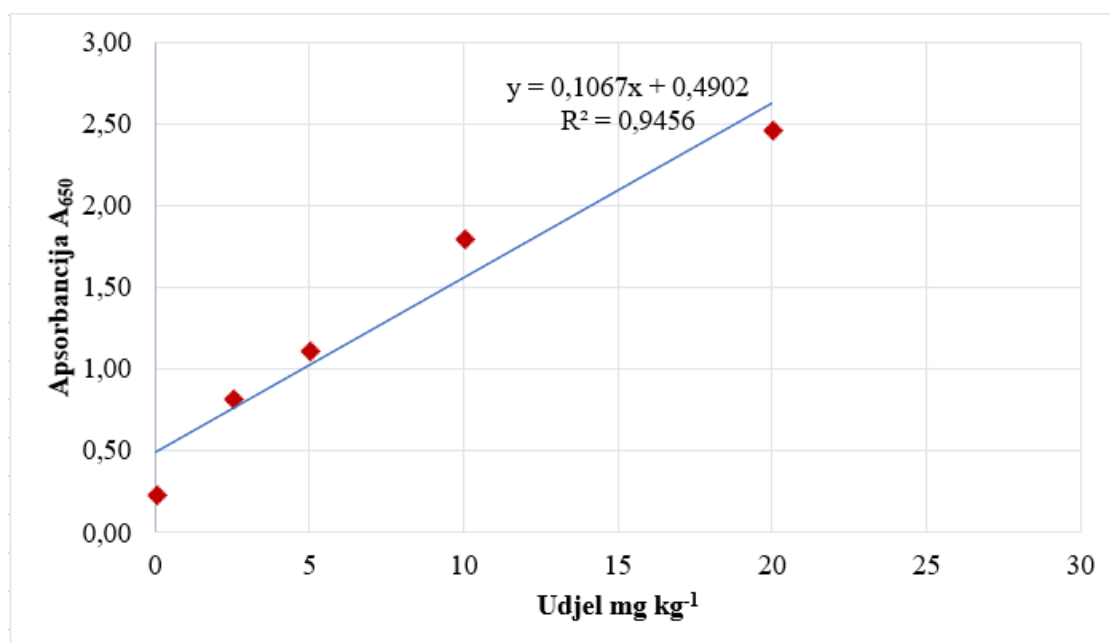




Slika 20. Baždarna krivulja standardnih otopina alergena lješnjaka (*RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA test)

Tablica 6. Udjel alergena lješnjaka ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) u uzorcima ( $n=7$ ) čokoladnih proizvoda

| Uzorak                      | Udjel alergena lješnjaka ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) |
|-----------------------------|--|
| Mliječna čokolada 1         | >20  |
| Mliječna čokolada 2         | >20  |
| Kakao u prahu               | <2,5   |
| Pjenasti desert s čokoladom | >20  |
| Čokoladne mrvice            | 14,03  |
| Desert s čokoladom          | 11,29  |
| Mliječna čokolada 3         | >20  |



Slika 21. Baždarna krivulja standardnih otopina alergena lješnjaka (*RIDASCREEN® FAST Hazelnut* ELISA test)

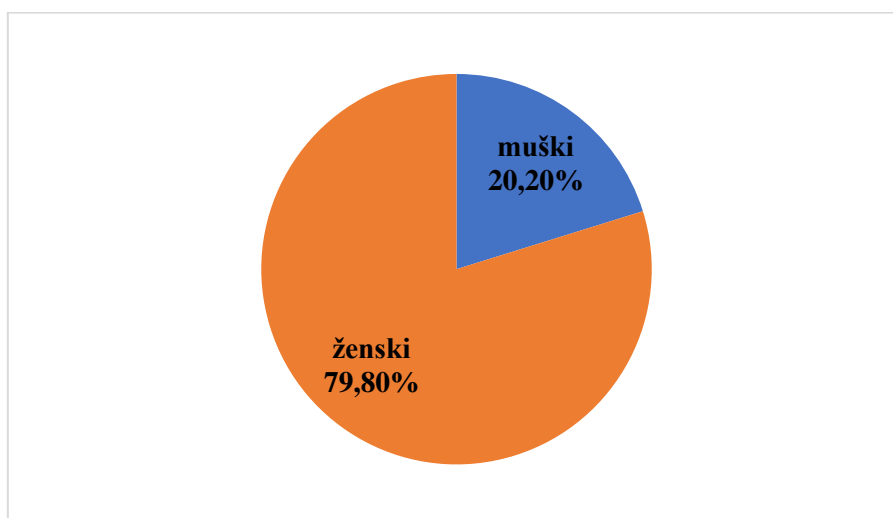
Rezultati udjela lješnjaka određeni su pomoću *ChroMate 4300 Microplate* ELISA Reader koji prethodno izradi baždarnu krivulju za koju koristi standard lješnjaka u pet različitih koncentracija i apsorbanciju izmjerenu pri valnoj duljini od 450 nm. Koeficijent baždarne krivulje ( $R^2$ ) za prvih sedam uzoraka iznosio je 0,9466, a za drugih sedam uzoraka iznosio je 0,9456 što upućuje na dobru korelaciju podataka.

Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 5. i 6. Tablica 5. prikazuje udjel lješnjaka u čokoladama koji je prisutan u udjelu višem od granice detekcije ( $>20 \text{ mg kg}^{-1}$ ). U svim vrstama čokolada, osim u uzorku „Čokolada 5“ u kojem je koncentracija iznosila  $11,31 \text{ mg kg}^{-1}$ , detektiran je određeni udjel lješnjaka. Tablica 6. prikazuje udjel lješnjaka u čokoladnim proizvodima „Mliječna čokolada 1“, „Mliječna čokolada 2“, „Mliječna čokolada 3“ i „Pjenasti desert s čokoladom“ u kojem je udjel lješnjaka viši od granice detekcije ( $>20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), dok je u proizvodima „Kakao u prahu“, „Čokoladne mrvice“ i „Desert s čokoladom“ udjel lješnjaka niži od granice detekcije.

Scheibe i suradnici (2001) su proveli istraživanje u kojem su ELISA metodom analizirali 83 uzorka čokolade dobivene od različitih dobavljača. Iznenadujuće, u 60 uzoraka koncentracija proteina lješnjaka premašila je  $1 \text{ mg na } 100 \text{ g}$ , a niti jedna čokolada nije na deklaraciji imala navedeno da sadrži lješnjak.

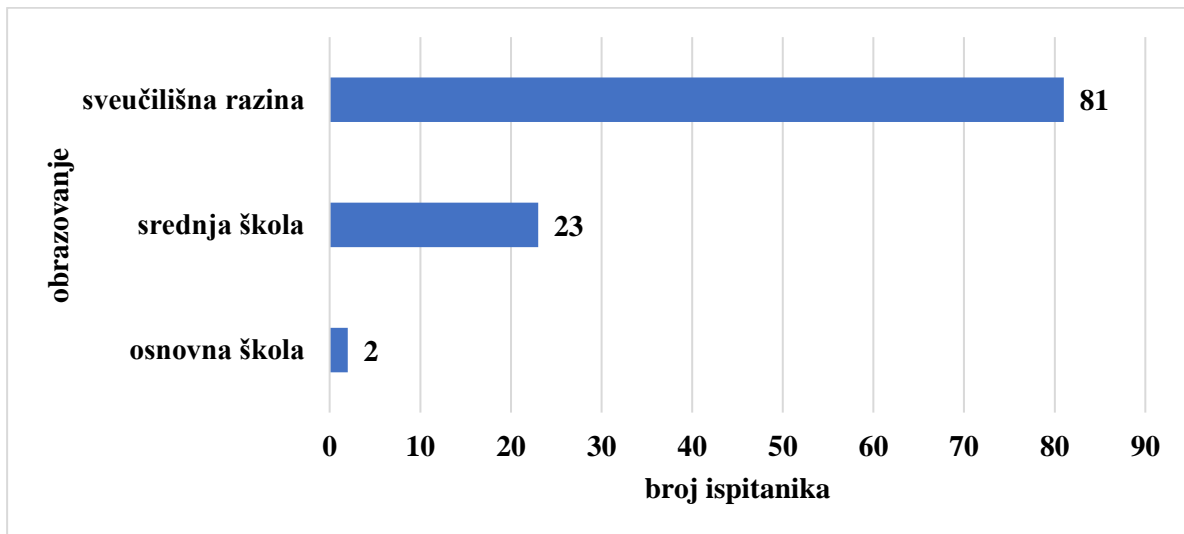
#### 4.2. STAVOVI POTROŠAČA O PRISUTNOSTI ALERGENA

Tijekom ovog istraživanja ispitani su stavovi i mišljenje potrošača o lješnjaku i proizvodima od lješnjaka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije, odnosno o prisutnosti tragova lješnjaka u čokoladama. Anketa je provedena *online*. Svi odgovori upitnika prikazani su grafički i na slikama od 22. do 36.



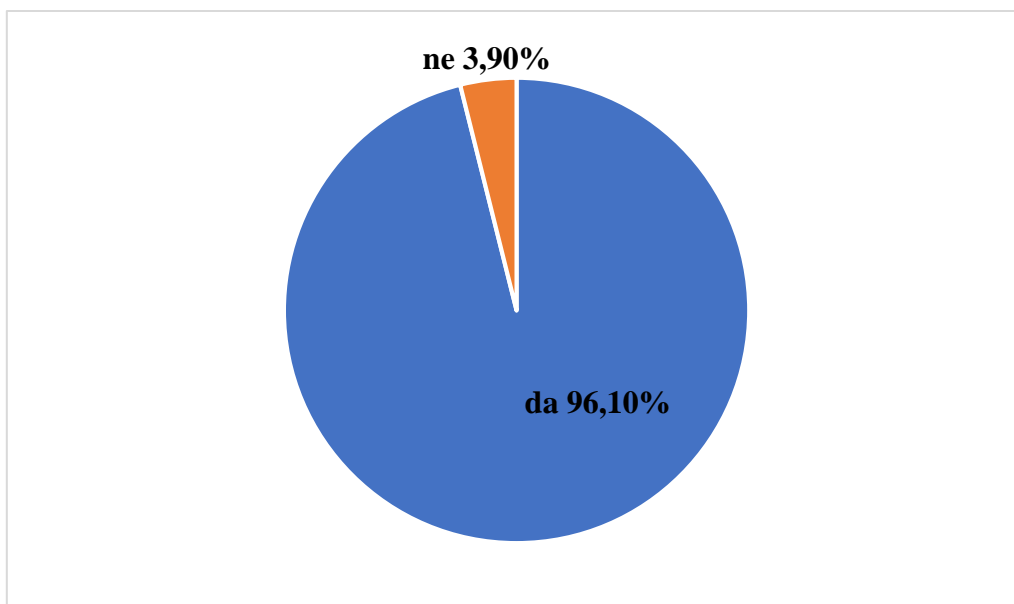
Slika 22. Spol ispitanika

Istraživanje je provedeno na uzorku od 104 ispitanika, od kojih je 21 ženskih ispitanika, a 83 muških ispitanika (Slika 22.). Dob ispitanika je od 19 do 75 godina.



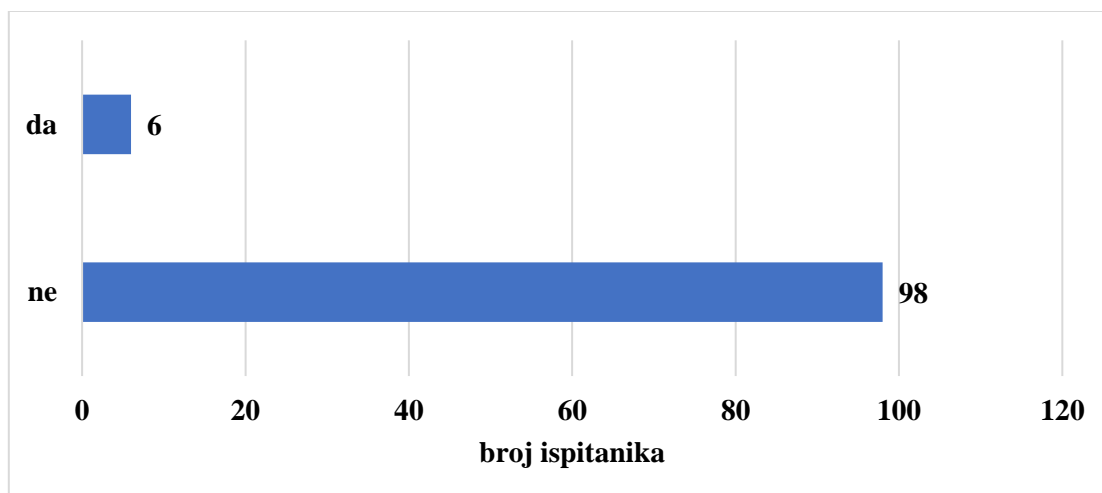
Slika 23. Obrazovanje ispitanika

Od ispitanih najviše ima onih sa sveučilišnim obrazovanjem (77,9 %), slijede ispitanici koji imaju završenu srednju školu (22,1 %) i samo dva ispitanika sa završenom osnovnom školom.



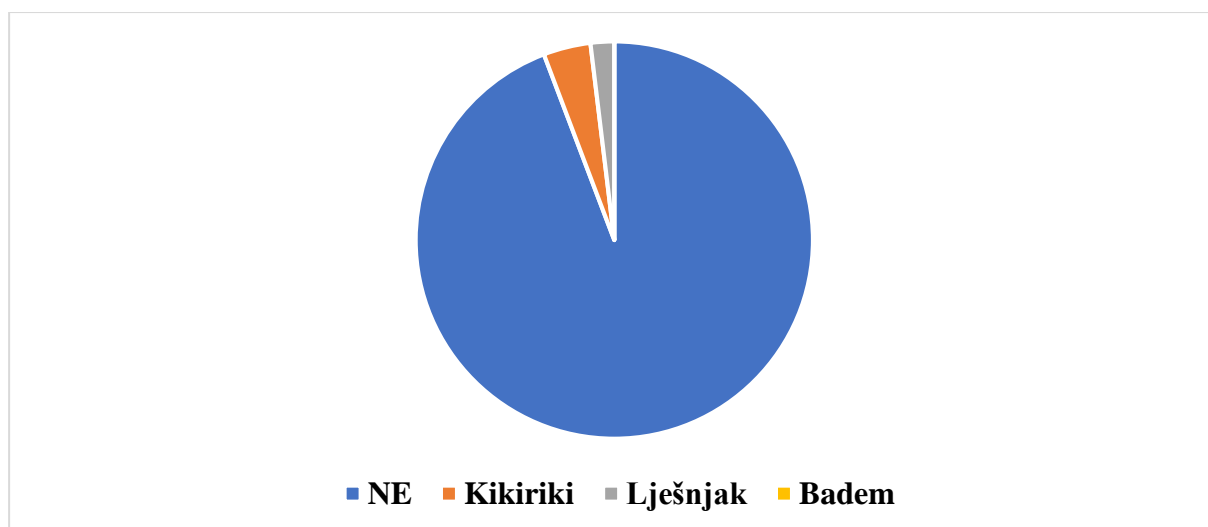
Slika 24. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Da li ste upoznati s pojmom alergeni?“

Rezultati prikazani na slici 24. prikazuju da je 100 ispitanika upoznato s pojmom alergeni, dok njih četvero ne zna što označava taj pojam. Od 104 ispitanika njih šest (5,8%) je alergično na orašaste plodove (Slika 25.).



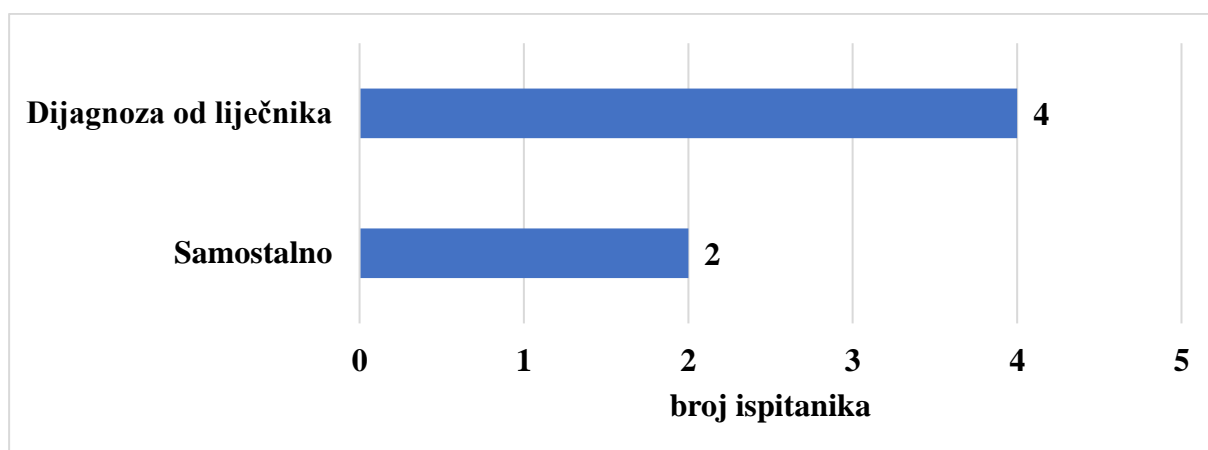
Slika 25. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Jeste li alergični na orašaste plodove?“

Od šest ispitanika koji su alergični na orašaste plodove, njih četvero je alergično na kikiriki, a dvoje na lješnjak. Na badem nema alergičnih ispitanika (Slika 26.). Na pitanje „Ukoliko ste alergični na jedan od navedenih, koje čokolade kupujete?“, četvero ispitanika alergičnih na kikiriki dvoje kupuju sve mliječne čokolade, jedan konzumira samo Milku i Dorinu, jedan Milku s keksom, a jedan Milku Oreo i čokolade od jagode.

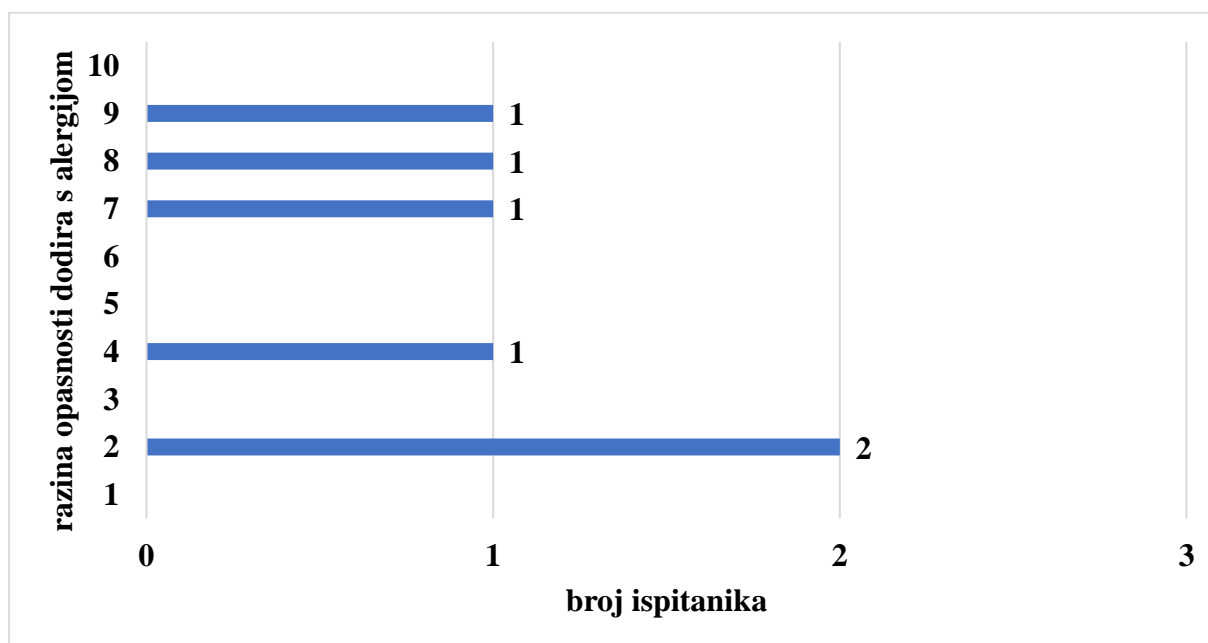


Slika 26. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Na koje ste alergene alergični?“

Od šest alergičnih ispitanika, četvero je dijagnozu dobilo od liječnika, a dvoje je samostalno odredilo dijagnozu (Slika 27.). Ispitanici su na pitanje „Kolika je razina opasnosti za Vas ukoliko dođete u dodir s alergijom?“ mogli odgovoriti stupnjevima skale od 1 do 10, pri čemu je 1 označavalo „blage“, a 10 „opasne po život“. Odgovorilo je šest alergičnih ispitanika. Dvoje ih ima blage posljedice (stupanj 2 na skali), jedan je na stupnju 4, i po jedan na stupnjevima 7, 8 i 9 (Slika 28.).

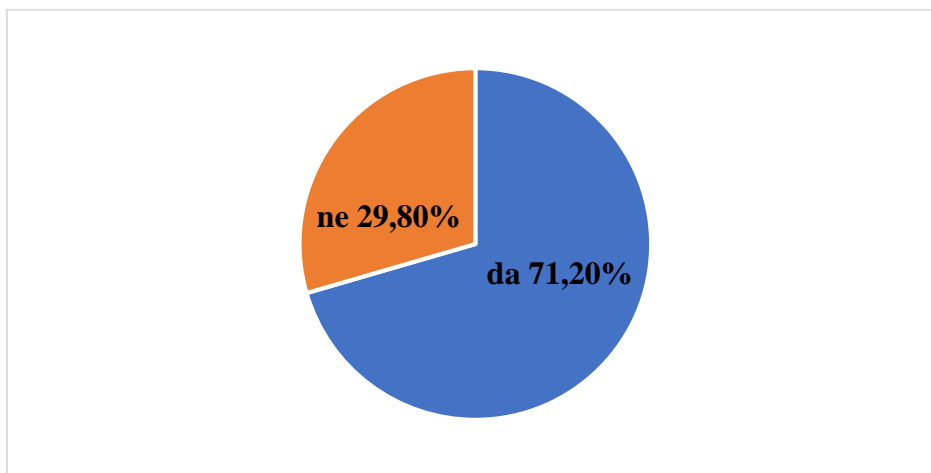


Slika 27. Grafički prikaz odgovora alergičnih ispitanika (n=6) na pitanje „Kako Vam je dijagnosticirana alergija?“



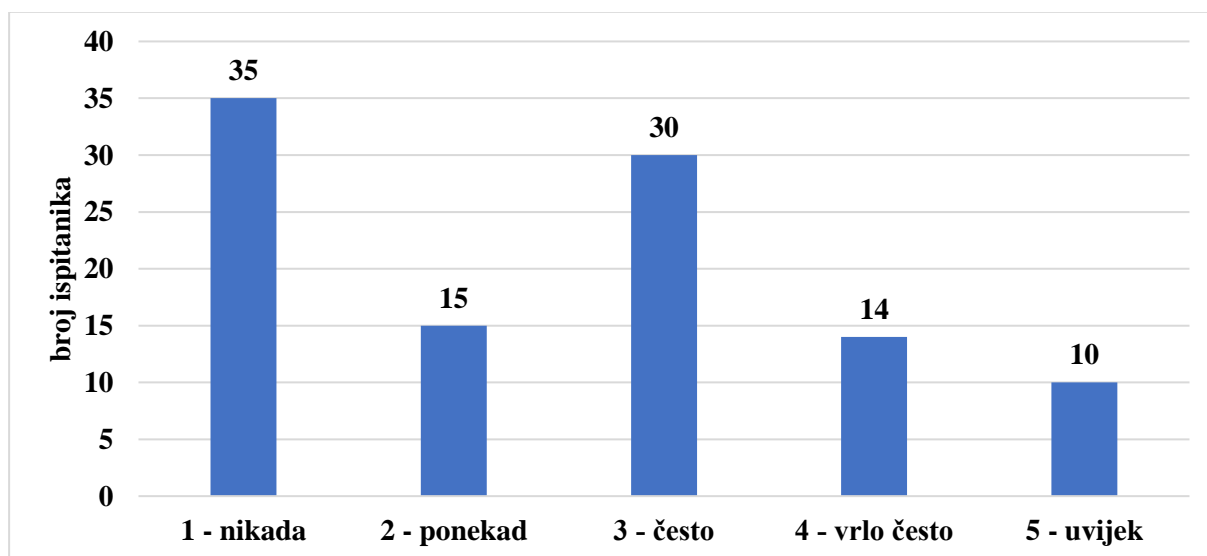
Slika 28. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=6) na pitanje „Kolika je razina opasnosti za Vas ukoliko dođete u dodir s alergijom?“

Od 104 ispitanika, njih 74 (71,2%) je svjesno opasnosti od alergijske reakcije nakon konzumiranja hrane koja sadrži lješnjak, dok njih 31 nije (Slika 29.).



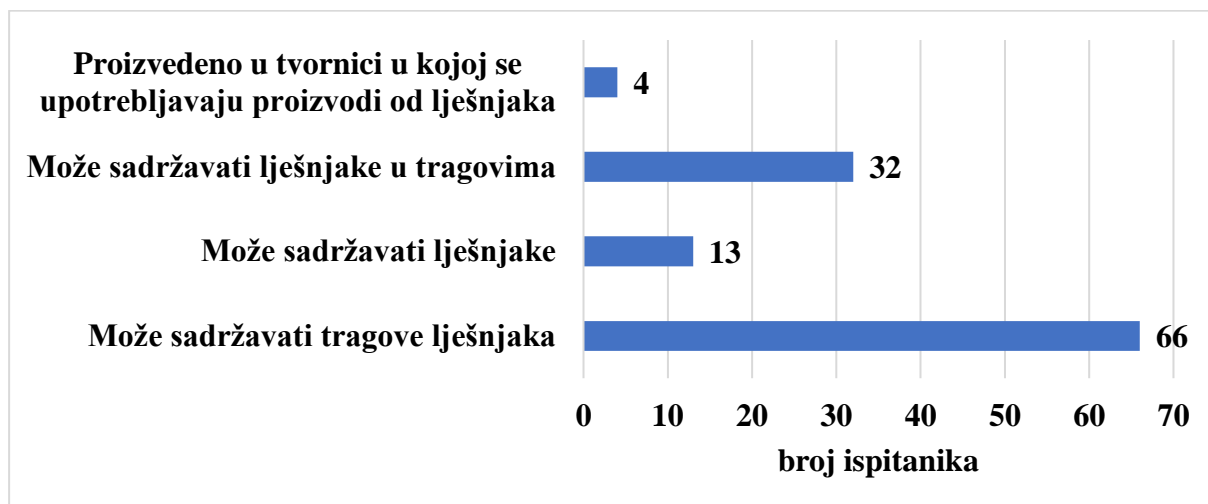
Slika 29. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Jeste li svjesni opasnosti od alergijske reakcije nakon konzumiranja hrane koja sadrži lješnjake?“

Na pitanje „Koliko često čitate informacije na etiketama proizvoda kao što su čokolade?“ ispitanici su mogli odgovoriti stupnjevima skale od 1 do 5, pri čemu je 1 označavalo „nikada“, a 5 „uvijek“. 33,7 % ispitanika nikad ne čita deklaraciju na čokoladama, njih 14,4 % gotovo nikad. Uvijek čita informacije na etiketama 9,6 % ispitanika (Slika 30.).

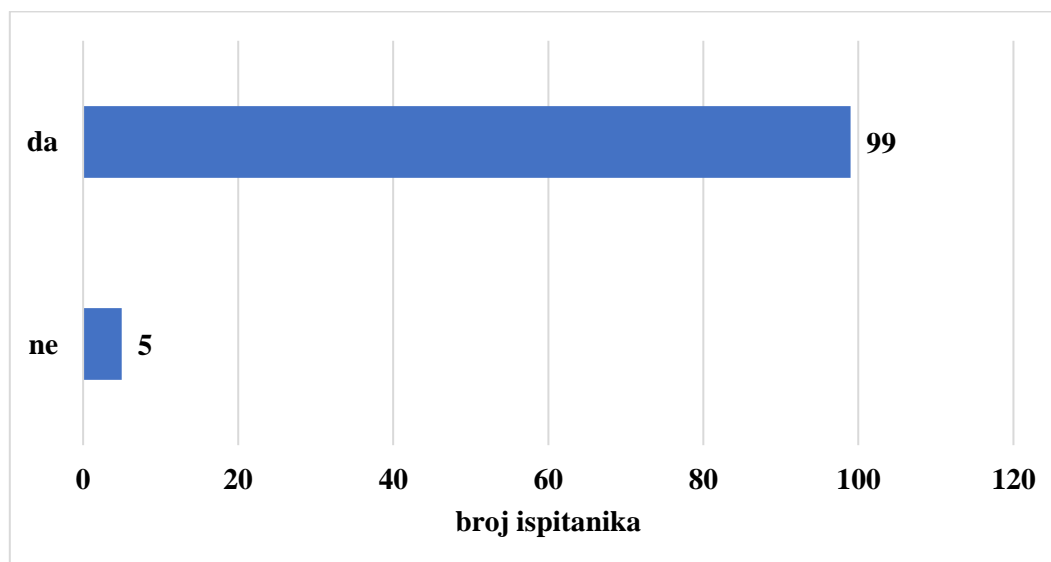


Slika 30. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Koliko često čitate informacije na etiketama proizvoda kao što su čokolade?“

Najpoznatiji izraz na proizvodima poput čokolade je „Može sadržavati tragove lješnjaka“, što je potvrdilo 63,5 % ispitanika. Sljedeći najpoznatiji izraz ispitanicima je „Može sadržavati lješnjake u tragovima“. Trinaest ispitanika odgovorilo je da im je najpoznatiji izraz „Može sadržavati lješnjake“, a samo četvero ispitanika je odabralo „Proizvedeno u tvornici u kojoj se upotrebljavaju proizvodi od lješnjaka“ kao odgovor (Slika 31.).



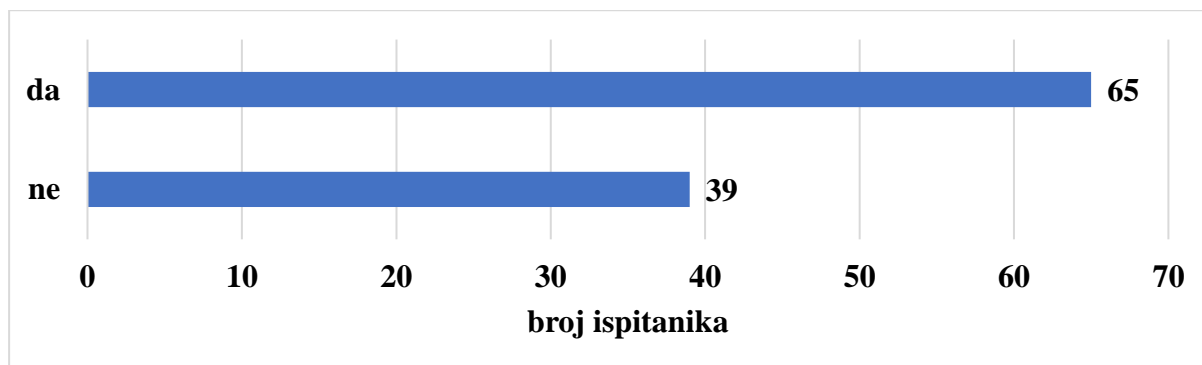
Slika 31. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Zaokružite jedan izraz koji vam je najpoznatiji na proizvodima kao što su čokolade?“



Slika 32. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Ukoliko je na deklaraciji proizvoda kao što su čokolade navedeno "Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova", smatrate li da to uključuje i lješnjake?“

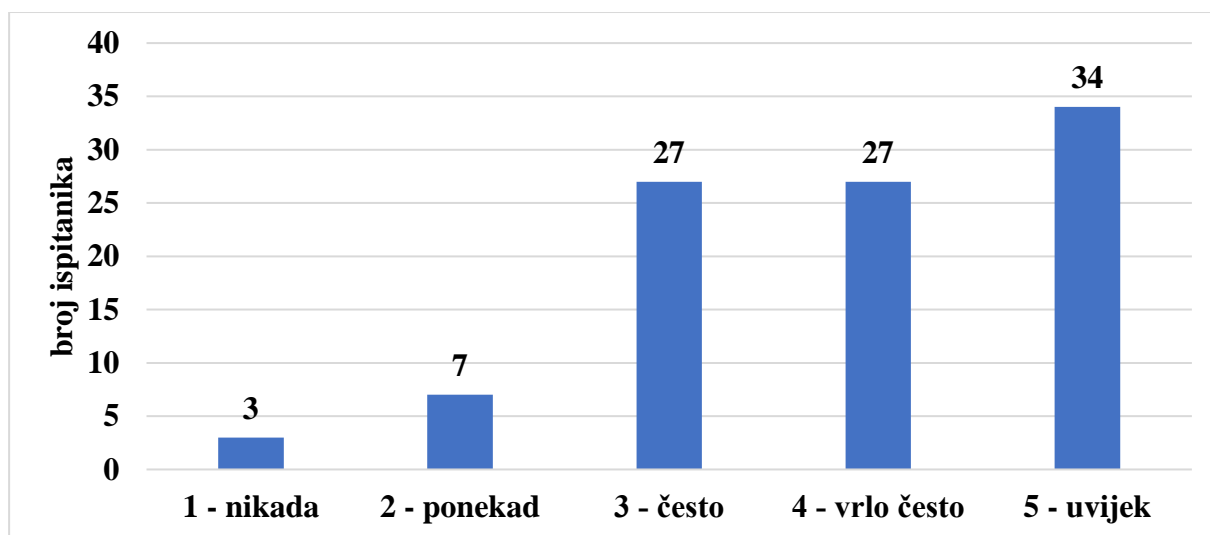


95,2 % ispitanika smatra da se izraz na deklaraciji proizvoda od čokolada „Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova“ odnosi na lješnjake, dok ostali smatraju da se navedeno ne odnosi na lješnjake (Slika 32.). Ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što su čokolade nema navoda o mogućoj prisutnosti lješnjaka 65 ispitanika smatra da taj proizvod ne sadrži tragove lješnjaka (Slika 33.).



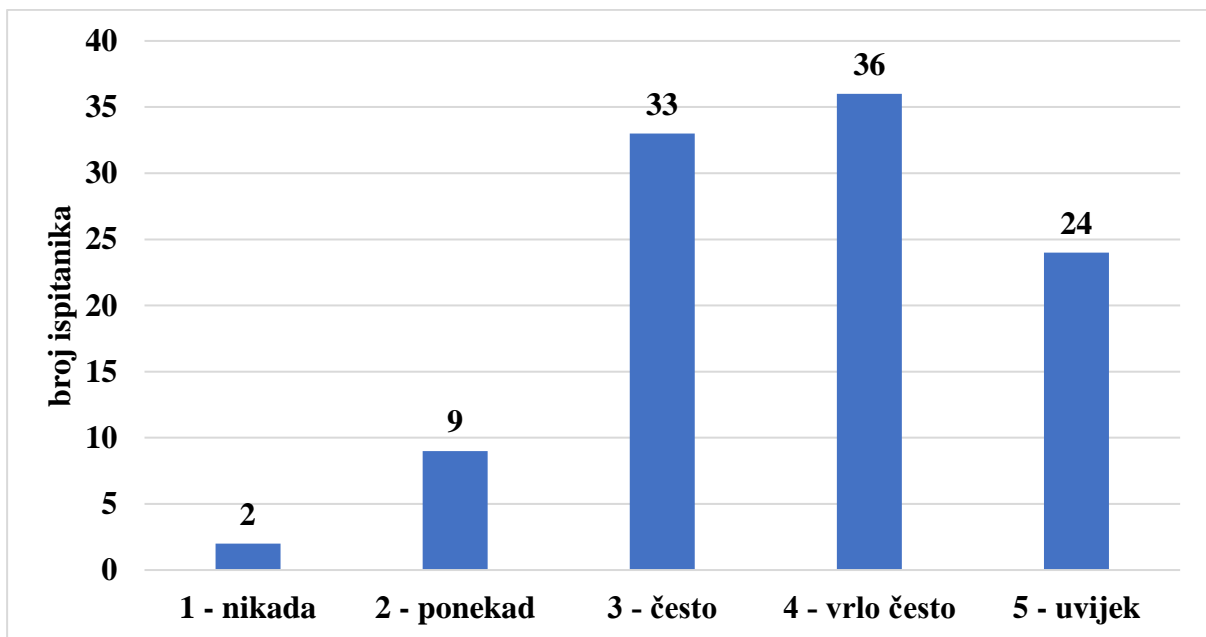
Slika 33. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što su čokolade nema navoda o mogućoj prisutnosti lješnjaka, smatrate li da taj proizvod ne sadrži tragove lješnjaka?“

Na pitanje „Koliko često konzumirate čokolade?“ ispitanici su mogli odgovoriti stupnjevima skale od 1 do 5, pri čemu je 1 označavalo „nikada“, a 5 „uvijek“. Na ovo pitanje odgovorilo je 98 ispitanika. Samo 3 ispitanika nikad ne konzumiraju čokoladu, dok njih 34 uvijek konzumira čokoladu (Slika 34.).



Slika 34. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=98) na pitanje „Koliko često konzumirate čokoladu?“

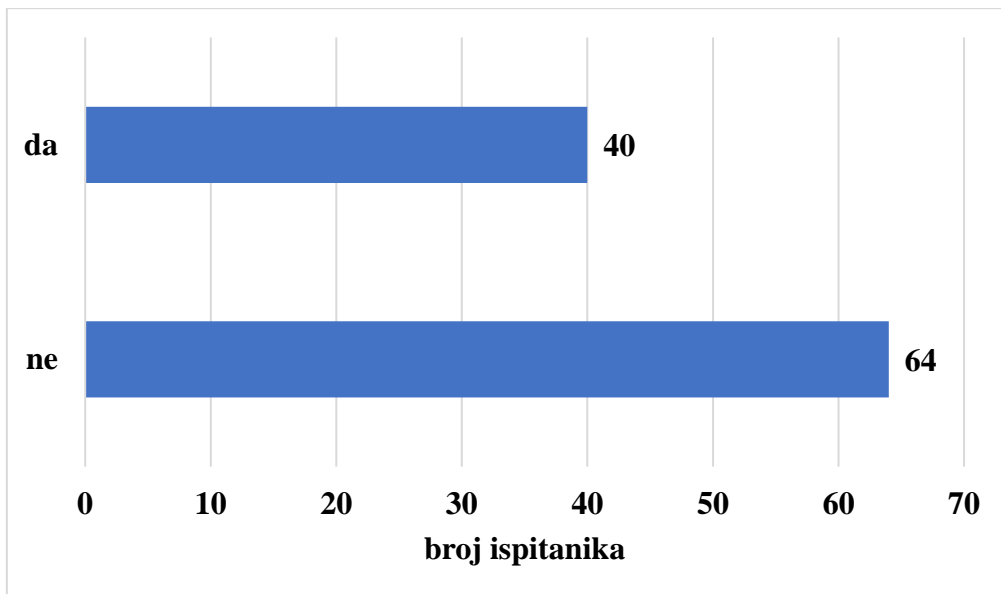
Ispitanici su sami upisivali odgovor na pitanje „Od kojeg proizvođača kupujete čokoladu?“ Odgovorilo je 98 ispitanika od kojih 62 kupuje čokoladu brenda Milka, njih 28 kupuje Kraševe čokolade, a ostatak kupuje čokolade drugih proizvođača. Na pitanje „Navedite koliko često kupujete proizvode kao što su čokolade, a koji sadrže navod o mogućoj prisutnosti lješnjaka?“ ispitanici su mogli odgovoriti stupnjevima skale od 1 do 5, pri čemu je 1 označavalo „nikada“, a 5 „uvijek“. Dva ispitanika nikad ne kupuju proizvode koji mogu sadržavati lješnjake, dok 24 ispitanika uvijek kupuju takve proizvode (Slika 35.).



Slika 35. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Navedite koliko često kupujete proizvode kao što su čokolade, a koji sadrže navod o mogućoj prisutnosti lješnjaka?“

Rezultati prikazani na slici 35. pokazuju da takvi i slični navodi ne utječu na kupovinu proizvoda kao što su čokolade. Prema rezultatima upitnika vidljivo je da navodi o mogućoj prisutnosti lješnjaka nemaju negativne konotacije u svijesti potrošača. Hefle i suradnici (2007) u svom radu navode da osobe s nutritivnim alergijama sve više ignoriraju navode o mogućoj prisutnosti što je posljedica neuređenosti sustava. Tako alergični pojedinci preuzimaju rizik po svoje zdravlje.

61,5% ispitanika ne bi kupilo čokoladu, koja na deklaraciji ne sadrži navod o prisutnosti lješnjaka, osobi za koju znaju da ima alergiju na lješnjak. 38,5% ispitanika bi to ipak napravilo (Slika 36.).



Slika 36. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=104) na pitanje „Ako imate ili poznajete nekoga tko ima alergiju na lješnjak, da li bi kupili čokoladu koja na deklaraciji ne sadrži navod o prisutnosti lješnjaka?“

## 5. ZAKLJUČCI

Obzirom na prikazane rezultate i provedenu raspravu, može se zaključiti sljedeće:

1. Za detekciju potencijalnih alergena lješnjaka korištena je imunoenzimski ELISA metoda. U analiziranim uzorcima prvih sedam istovrsnih čokoladnih uzoraka s različitim datumima proizvodnje detektirani su potencijalni alergeni lješnjaka, a udjel određen ELISA metodom iznosio je  $>20 \text{ mg kg}^{-1}$ .
2. U svim analiziranim uzorcima različitih čokoladnih proizvoda, udjel potencijalnih alergena lješnjaka određenih ELISA metodom iznosio je  $>20 \text{ mg kg}^{-1}$ .
3. Potrošači su dobro upoznati s prisustvom alergena u čokoladnim proizvodima.
4. Od 104 ispitanika njih šest (5,8%) je alergično na orašaste plodove. Od šest ispitanika koji su alergični na orašaste plodove, njih četvero je alergično na kikiriki, a dvoje na lješnjak.
5. Na pitanje „Koliko često čitate informacije na etiketama proizvoda kao što su čokolade“, 33,7% ispitanika nikad ne čita deklaraciju na čokoladama, dok samo 9,6% ispitanika uvijek čita informacije na etiketama.
6. Najpoznatiji navod s deklaracija proizvoda kao što su čokolade bio je: „Može sadržavati tragove lješnjaka“, što je potvrdilo 63,5% ispitanika. Navedeni navod pojavljuje se na deklaracijama različitih čokoladnih proizvoda, odnosno na uzorcima „Kakao u prahu“, „Pjenasti desert s čokoladnom“, „Čokoladne mrvice“ i „Desert s čokoladom“, dok ostali analizirani uzorci ne sadrže navedeni navod.
7. Tijekom ovog istraživanja, u šest analiziranih istovrsnih čokoladnih uzoraka te tri uzorka različitih čokoladnih proizvoda, ELISA metodom analizirani su potencijalni tragovi lješnjaka zato se i na deklaraciji navodi da je moguća prisutnost alergena lješnjaka. S obzirom na proizvodnju je teško ukloniti tragove lješnjaka.

## 6. LITERATURA

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

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.

Cucu, T., Platteau, C., Taverniers, I., Devreese, B., De Loose M., De Meulenaer, B. (2011) ELISA detection of hazelnut proteins: effect of protein glycation in the presence or absence of wheat proteins, *Food Addit Contam.* **28 (1)**, 1-10.

Datema, M. R., Zuidmeer-Jongejan, L., Asero, R., Barreales, L., Belohlavkova, S., de Blay, F., Bures, P., Clausen, M., Dubakiene, R., Gislason, D., Jedrzejczak-Czechowicz, M., Kowalski, M. L., Knulst, A.C., Kralimarkova, T., Le, T.M., Lovegrove, A., Marsh, J., Papadopoulos, N. G., Popov, T., Del Prado, N., Purohit, A., Reese, G., Reig, I., Seneviratne, S.L., Sinaniotis, A., Versteeg, S.A., Vieths, S., Zwinderman, A.H., Mills, C., Lidholm, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Fernández-Rivas, M., Ballmer-Weber, B., van Ree, R. (2015) Hazelnut allergy across Europe dissected molecularly: A EuroPrevall outpatient clinic survey, *The Journal of allergy and clinical immunology.* **136 (2)**, 1-11.

Đurišić, S., Lazić, S., Petrović, T., Savić-Jevđenić, S., Lupulović, D. (2003) Imunoenzimska - ELISA dijagnostika u veterinarskoj medicini, *Veterinarski glasnik.* **57 (1-2)**, 63-72.

HAH (2009) Alergije podrijetlom iz hrane, Hrvatska agencija za hranu, Osijek

Kondić, V., Bojanić, B., Kondić, Ž. (2015) Izbor optimalne varijante kontrole kvalitete rezultata procesa, *Tehnički glasnik.* **9 (2)** 153-158.

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

Hefle, S.L., Furlong, T.J., Niemann, L., Lemon-Mule, H., Sicherer, S., Taylor, S.L. (2007) Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 171-176.

Madsen, C., Crevel, R., Mills, C., Taylor, S. (2013) Risk Management for Food Allergy, 1. izd., Academic Press, Oxford, str. 31.

McWilliam, V., Koplin, J., Lodge, C., Tang, M., Dharmage, S., Allen, K. (2015) The Prevalence of Tree Nut Allergy: A Systematic Review, *Curr Allergy Asthm.* **15 (54)** 1-13.

Omejec, D., Pejić Bach, M. (2007) Sljedivost prehrambenih proizvoda hrvatskih poduzeća, *Zbornik Ekonomskog fakulteta u Zagrebu.* **5**, 43-65.

Pravilnik o informiranju potrošača o nepretpakiranoj hrani (2014) *Narodne novine* **144**, Zagreb

RASFF (2017) The Rapid Alert System for Food and Feed – 2016 annual report, Luxembourg: Publications Office of the European Union, <[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2016.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2016.pdf)>.

Pristupljeno 16. veljače 2018.

Runje, M., Cvrtila, Ž. (2006) ELISA u analitici hrane, *Meso*, **7 (2)**, 92-95.

Scheinbe, B., Weiss, W., Ruëff, F., Przybilla, B., Görg, A. (2001) Detection of trace amounts of hidden allergens: hazelnut and almond proteins in chocolate, *J Chromatogr B*, **756**, 229–237.

Stipić Marković, A., Ivković-Jureković, I., Dodig, S., Batišta, I., Zrinski-Topić, R., Barberić, M., Topalušić, I., Bukovec Megla, Ž., Žižić, V. (2015) Hrvatske smjernice za in vitro dijagnostiku preosjetljivosti posredovane Ige protutijelima, *Acta Med Croatica*, **69**. 75-96.

Turkalj, M., Mrkić, I. (2012) Alergijske reakcije na hranu, *Liječnički vjesnik*, **134 (5-6)**. 168-173.

Uredba (EU) br. 116/2011 Europskog parlamenta i Vijeća (2011) *Službeni list Europske unije* **304**, Europska unija

Voskresensky Baričić, T. (2012) Značenje specifičnih IgE protutijela na komponente alergena hrane biljnog podrijetla u kliničkoj dijagnostici djece senzibilizirane na peludi, doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Rijeka

Zakon o informiranju potrošača o hrani (2016) *Narodne novine* **56**, Zagreb

## 7. PRILOZI

Prilog 1. Upitnik o svjesnosti potrošača o prisutnosti alergena u proizvodima od čokolade

1. Spol: M    Ž
2. Dob:
3. Obrazovanje:
- osnovna škola
  - srednja škola
  - sveučilišna razina (fakultet)
4. Da li ste upoznati što znače alergeni? DA    NE
5. Jeste li alergični na orašaste plodove? DA    NE
6. Na koje alergene ste alergični?
- Kikiriki
  - Badem
  - Lješnjak
  - NE
7. Ukoliko ste alergični na jedan od navedenih, koje čokolade kupujete?
8. Kako Vam je dijagnosticirana alergija?
- Dijagnoza od liječnika
  - Samostalno
9. Kolika je razina opasnosti za Vas ukoliko dođete u dodir sa alergijom?
- 1    2    3    4    5    6    7    8    9    10
- (1-blage, 10-opasne po život)



10. Jeste li svjesni opasnosti od alergijske reakcije nakon konzumiranja hrane koja sadrži lješnjake? DA NE

11. Koliko često čitate informacije na etiketama proizvoda kao što su čokolade?

1      2      3      4      5  
(1-nikada, 5-uvijek)

12. Zaokružite jedan izraz koji vam je najpoznatiji na proizvodima kao što su čokolade?

- Može sadržavati tragove lješnjaka
- Može sadržavati lješnjake
- Može sadržavati lješnjake u tragovima
- Proizvedeno u tvornici u kojoj se upotrebljavaju proizvodi od lješnjaka

13. Ukoliko je na deklaraciji proizvoda kao što su čokolade navedeno "Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova", smatrate li da to uključuje i lješnjake? DA NE

14. Ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što su čokolade nema navoda o mogućoj prisutnosti lješnjaka, smatrate li da taj proizvod ne sadrži tragove lješnjaka? DA NE

15. Koliko često konzumirate čokoladu?

1      2      3      4      5  
(1-nikada, 5-uvijek)

16. Od kojeg proizvođača najčešće kupujete čokoladu?

17. Navedite koliko često kupujete proizvode kao što su čokolade, a koje sadrže navod o mogućoj prisutnosti lješnjaka?

1      2      3      4      5  
(1-nikada, 5-uvijek)

18. Ako imate ili poznajete nekoga tko ima alergiju na lješnjak, da li bi kupili čokoladu koja na deklaraciji ne sadrži navod o prisutnosti lješnjaka? DA NE