

# Količina alergena u mesnim proizvodima

---

Poljanec, Ivna

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:351915>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Ivna Poljanec

850/USH

**KOLIČINA ALERGENA U  
MESNIM PROIZVODIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Odjelu za veterinarsko javno zdravstvo Hrvatskog veterinarskog instituta pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Jelke Pleadin te u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Nade Vahčić, red.prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Nadi Vahčić na stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem voditeljici izv.prof.dr.sc. Jelki Pleadin na pomoći, korisnim savjetima i susretljivosti tijekom izrade diplomskog rada, kao i ostalim djelatnicima Hrvatskog veterinarskog instituta na pomoći i izdvojenom vremenu tijekom izvođenja praktičnog dijela rada.*

# 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

## KOLIČINA ALERGENA U MESNIM PROIZVODIMA

*Ivna Poljanec, 850/USH*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je analizirati prisutnost alergena glutena, soje, proteina mlijeka i gorušice u različitim vrstama mesnih proizvoda te istražiti označavaju li proizvođači eventualno prisutne alergene u skladu sa važećom zakonskom regulativom. Određivanje alergena provedeno je primjenom ELISA metode na pedeset i jednom uzorku različitih mesnih proizvoda različitih proizvođača zastupljenih na tržištu Republike Hrvatske. Rezultati istraživanja pokazali su kako se najviša razina glutena nalazi u hrenovkama ( $63,73 \text{ mgkg}^{-1}$ ), proteina mlijeka u paštetama ( $380,42 \text{ mgkg}^{-1}$ ), soje također u paštetama ( $25,7 \text{ mgkg}^{-1}$ ) i gorušice u kobasicama za pečenje ( $14 \text{ mgkg}^{-1}$ ). U šest proizvoda određeni su alergeni, a da njihova prisutnost nije bila navedena na deklaraciji. Rezultati istraživanja upućuju na važnost sustavne kontrole alergena u mesnim proizvodima u svrhu zaštite zdravlja i interesa potrošača.

**Ključne riječi:** alergeni, mesni proizvodi, ELISA metoda

**Rad sadrži:** 62 stranice, 14 slika, 15 tablica, 45 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Nada Vahčić

**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. Jelka Pleadin, znan. savj., HVI, Zagreb

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković
2. Prof.dr.sc. Nada Vahčić
3. Izv.prof.dr.sc. Jelka Pleadin
4. Doc.dr.sc. Martina Bituh (zamjena)

**Datum obrane:** 20. srpanj 2017.

## 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

### ALLERGENS IN MEAT PRODUCTS

*Ivna Poljanec, 850/USH*

**Abstract:** The aim of this study was to determine the presence of allergens gluten, soy, milk and mustard in different samples of meat products and compare compliance between the informations on declarations and the current legislative. Determination of allergens was carried out with ELISA method on fifty-one sample of different meat products from Croatian market. The results of study showed that the highest concentration of gluten were found in hot dog sausages ( $63,73 \text{ mgkg}^{-1}$ ), milk in pâtés ( $380,42 \text{ mgkg}^{-1}$ ), soy also in pâtés ( $25,7 \text{ mgkg}^{-1}$ ) and mustard in grill sausages ( $14 \text{ mgkg}^{-1}$ ). In six products, allergens were found but not declared on package. The results point out the importance of systematic analysis of meat products on market in order to improve protection of consumers health and interest.

**Keywords:** allergens, meat products, ELISA method

**Thesis contains:** 62 pages, 14 figures, 15 tables, 45 references

**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. Nada Vahčić, Full professor

**Technical support and assistance:** PhD. Jelka Pleadin, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

**Reviewers:**

1. PhD. Ksenija Marković, Associate professor
2. PhD. Nada Vahčić, Full professor
3. PhD. Jelka Pleadin, Associate professor
4. PhD. Martina Bituh, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 20<sup>th</sup> July 2017

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>  | <b>2</b>  |
| 2.1. ALERGIJE NA HRANU .....   | 2         |
| 2.1.2. Mehanizam IgE posredovanih alergijskih reakcija.....  | 3         |
| 2.2. ALERGENI IZ HRANE .....   | 4         |
| 2.2.1. Žitarice koje sadrže gluten i njihovi proizvodi .....                                       | 5         |
| 2.2.2. Soja i proizvodi od soje .....  | 6         |
| 2.2.3. Mlijeko i mliječni proizvodi .....  | 8         |
| 2.2.4. Gorušica i proizvodi od gorušice .....  | 8         |
| 2.3. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA U HRANI .....   | 9         |
| 2.3.1. Analiza proteina.....   | 9         |
| 2.3.2. DNA analize .....   | 10        |
| 2.4. ELISA METODA U ODREĐIVANJU ALERGENA U HRANI.....  | 11        |
| 2.5. ALERGENI U MESNIM PROIZVODIMA .....   | 14        |
| 2.6. UPRAVLJANJE ALERGENIMA U PREHRAMBENOM LANCU .....   | 16        |
| 2.6.1. Zakonski okvir Europske unije .....   | 17        |
| 2.6.2. Informacije o prisutnosti alergena u prehrambenim proizvodima .....                         | 17        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>   | <b>19</b> |
| 3.1. MATERIJAL.....  | 19        |
| 3.1.1. Uzorci .....  | 19        |
| 3.1.2. Oprema i pribor .....   | 20        |
| 3.1.3. Sadržaj kita i reagensa za određivanje glijadina/glutena.....                               | 22        |
| 3.1.4. Sadržaj kita i reagensa za određivanje soje.....  | 23        |
| 3.1.5. Sadržaj kita i reagensa za određivanje proteina mlijeka .....                               | 23        |
| 3.1.6. Sadržaj kita i reagensa za određivanje gorušice.....  | 24        |
| 3.2. METODE .....  | 25        |
| 3.2.1. Određivanje koncentracije glijadina/glutena u mesnim proizvodima .....                      | 25        |
| 3.2.1.1. Provedba metode za određivanje koncentracije glijadina/glutena u mesnim proizvodima ..... | 26        |
| 3.2.2. Određivanje koncentracije soje u mesnim proizvodima .....                                   | 28        |
| 3.2.2.1. Provedba metode za određivanje koncentracije soje u mesnim proizvodima .....              | 29        |
| 3.2.3. Određivanje koncentracije proteina mlijeka u mesnim proizvodima.....                        | 30        |
| 3.2.3.1. Provedba metode za određivanje koncentracije proteina mlijeka u mesnim proizvodima.....   | 31        |
| 3.2.4. Određivanje koncentracije gorušice u mesnim proizvodima .....                               | 33        |
| 3.2.4.1. Provedba metode za određivanje koncentracije gorušice u mesnim proizvodima .....          | 33        |
| 3.2.5. Validacija ELISA metode za određivanje alergena u hrani .....                               | 35        |
| 3.2.5.1. Određivanje validacijskih parametara.....   | 36        |
| 3.2.6. Statistička obrada podataka .....   | 37        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1. REZULTATI VALIDACIJE METODE .....   | 39        |
| 4.2. KOLIČINA ALERGENA U MESNIM PROIZVODIMA.....   | 43        |
| 4.3. DESKRIPTIVNA STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....  | 55        |
| <b>5. ZAKLJUČCI.....</b>   | <b>58</b> |





# 1. UVOD

Alergije na hranu predstavljaju važan javnozdravstveni problem u razvijenim zemljama. U zadnjem desetljeću primijećen je porast učestalosti i ozbiljnosti alergijskih reakcija. Razlog za porast slučajeva alergija na hranu zadnjih godina nije još u potpunosti poznat. Pretpostavlja se kako promjene u načinu života, a samim time i promjene prehrambenih navika i načina pripreme hrane te složen sastav prehrambenih proizvoda vjerojatno imaju utjecaja, dok neki autori kao objašnjenje predlažu „higijensku hipotezu“. Alergije na hranu mogu se manifestirati širokim spektrom simptoma koji mogu varirati, od kroničnih gastrointestinalnih problema do ozbiljnih, po život opasnih anafilaktičkih reakcija.

S obzirom da ne postoji sigurna i učinkovita terapija u liječenju alergija na hranu, jedina prevencija neželjenih imunoloških reakcija u alergičnih osoba je potpuno izbjegavanje hrane na koju su osjetljivi. Stoga je pravilno deklariranje hrane i pružanje potpunih, točnih i lako razumljivih informacija nužno kako bi alergične osobe svoj odabir hrane mogle prilagoditi svojim prehrambenim potrebama. Prema važećem zakonodavstvu Europske unije, svi sastojci prehrambenih proizvoda moraju biti deklarirani s posebnim naglaskom na alergene. Osim što alergeni mogu biti prisutni namjerno, kao sastojak proizvoda, oni se u proizvodu mogu naći i kao posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje.

U mesnoj industriji koriste se različiti proteini biljnog i životinjskog porijekla s ciljem postizanja željenih tehnoloških i organoleptičkih svojstava, nutritivne vrijednosti te niže cijene proizvoda. Gluten, soja, proteini mlijeka i gorušica najčešće se koriste, a ujedno pripadaju skupini osnovnih alergena hrane. Njihova prisutnost u mesnim proizvodima, ukoliko nisu jasno istaknuti na deklaraciji proizvoda, može predstavljati potencijalnu opasnost po zdravlje potrošača alergičnih na te sastojke.

U svrhu detekcije prisutnosti alergena u prehranbenim proizvodima nužno je provoditi analize pouzdanim analitičkim metodama. Njihova primjena nužna je radi provjere usklađenosti sa deklaracijama i zaštite zdravlja i interesa potrošača. Trenutno najčešće korištena metoda za detekciju alergena u hrani je ELISA čije su prednosti jednostavnost, osjetljivost i specifičnost.

U ovom radu, primjenom ELISA metode, analizirat će se prisutnost alergena glutena, soje, gorušice i proteina mlijeka u različitim vrstama mesnih proizvoda različitih proizvođača, zastupljenih na tržištu Republike Hrvatske. Ujedno će se istražiti označavaju li proizvođači eventualno prisutne alergene u skladu sa važećom zakonskom regulativom.

## 2. TEORIJSKI DIO

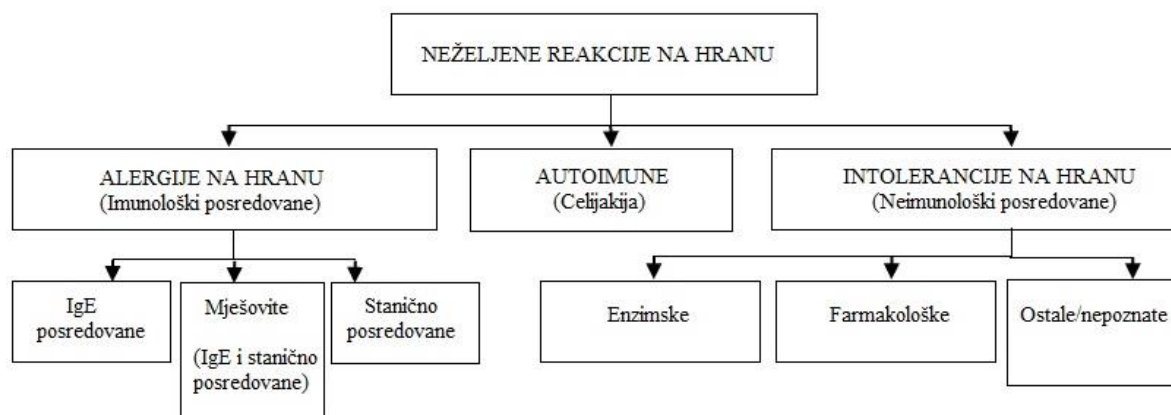
### 2.1. ALERGIJE NA HRANU

Alergije na hranu poznate su već dugo, no tek su krajem 20. stoljeća prepoznate kao važan javnozdravstveni problem. Istraživanja u zadnjih desetak godina pokazala su kako 4-8 % djece i 2-4 % odraslih u razvijenim zemljama pati od alergija na hranu što znatno smanjuje njihovu kvalitetu života (Ward, 2015). Pojavnost alergija na hranu mijenja se s dobi, a mijenjaju se i alergeni koji je izazivaju. Češće su u prvim godinama života zbog još nedovoljne zrelosti imunološkog sustava. Kod djece, česte su alergije na mlijeko, jaja, kikiriki, soju, pšenicu, morsku ribu, a kod odraslih na kikiriki, orašaste plodove, morsku ribu i voće. Alergije na hranu mogu se javiti u svakoj životnoj dobi, a javit će se češće u osoba koje već imaju sklonost alergijama na druge supstancije (tzv. atopične konstitucije) (HAH, 2009).

Alergija na hranu definirana je kao štetna, imunološki posredovana reakcija koja se javlja kao posljedica konzumacije ili kontakta s određenom hranom. Pogađa osobe koje su osjetljive ili senzibilizirane na specifični alergen iz hrane koji je inače normalno toleriran od ostatka populacije. Za osobe alergične na određeni sastojak hrane, konzumacija tog sastojka, čak i u minimalnim količinama ( $10-100 \text{ mgkg}^{-1}$ ) može prouzročiti po život opasne reakcije (Ward, 2015).

Općenito, hrana može prouzrokovati različite tipove štetnih reakcija (Slika 1), no s aspekta javnog zdravlja i sigurnosti hrane, najznačajnije su one prilikom kojih imunološki sustav stvara IgE antitijela kao posljedica alergena iz hrane (FDE, 2013). Takve reakcije povezuju se s brzim razvojem simptoma (reakcija tipa I ili trenutna preosjetljivost), najčešće u roku od nekoliko minuta do dva sata. Simptomi stanično-posredovanih reakcije se razvijaju nakon nekoliko sati ili dana (reakcije tipa IV ili kasna preosjetljivost), a te reakcije mogu imati ulogu i u celijakiji. Simptomi alergija na hranu uključuju: probavne smetnje (povraćanje, proljev), probleme respiratornog sustava (rinitis, astma), probleme s krvožilnim sustavom (edem, hipotenzija), kožni simptomi (urtikarija, atopički dermatitis), a u nekim slučajevima po život opasni anafilaktički šok (Alves i sur., 2016).

Pritom je nužno razlikovati alergiju od intolerancije jer se u praksi često zamjenjuju, iako se radi o različitim problemima. Kod intolerancije ne dolazi do reakcije antigen-antitijelo i uglavnom se pojavljuje radi urođenih enzimskih defekata kod ljudi (Martinis, 2004). Uključuje reakcije na različite komponente hrane, poput laktoze, histamina ili na različite aditive u hrani (Lawley i sur., 2008).



**Slika 1.** Podjela neželjenih reakcija na hranu (EFSA, 2014)

### 2.1.2. Mehanizam IgE posredovanih alergijskih reakcija

Prema klasifikaciji po Gellu i Coombsu, imunološki mehanizmi alergijskih reakcija se dijele u 4 tipa, a medijatori koji nastaju u tim reakcijama dovode do oštećenja tkiva i kliničkih manifestacija (Anonymous 1, 2014). Prema istoj klasifikaciji, kao što je ranije navedeno, većina alergijskih reakcija na hranu pripada reakcijama tipa I (iako su reakcije tipa III i IV isto uobičajene) (Poms i sur., 2004).

Općenito, čovjekov imunološki sustav stvara imunoglobuline, poput IgA, IgG, IgM i IgE koji imaju sposobnost prepoznavanja i vezanja stranih molekula poput onih u mikroorganizmima, parazitima te tvari iz okoline poput peluda ili proteina iz hrane (Mills i sur., 2009). Prilikom alergijske reakcije preosjetljivosti tipa I tijelo stvara IgE odgovor protiv određenih stranih tvari poput alergena iz hrane što dovodi do alergijskih reakcija na hranu (Lawley i sur., 2008).

Sve alergijske reakcije sastoje se od dvije faze; senzibilizacije i izazivanja reakcije. Tijekom faze senzibilizacije, prilikom koje je osoba prvi put izložena antigenu (alergenu), imunološki sustav (B stanice) prepoznaje alergeni sastojak hrane (gotovo uvijek protein) kao stranu tvar, što rezultira nizom metaboličkih reakcija koje dovode do stvaranja IgE antitijela i njihovu distribuciju kroz tijelo. Svaki alergeni protein može imati više strukturalnih aktivnih strana ili konformacijskih epitopa koji reagiraju sa čovjekovim imunološkim sustavom. IgE se vežu za površinu specifičnih tipova stanica, uglavnom mastocita (Crevel i Cochrane, 2008). U navedenoj prvoj fazi nema simptoma, međutim ponovnim unosom dotičnog alergena u organizam dolazi do reakcije (Taylor i Hefle, 2001). U fazi izazivanja reakcije, alergen se povezuje s IgE antitijelom vezanim na površinu mastocita u tkivima ili bazofila u krvi i potiče

izlučivanje kemijskih medijatora poput histamina. Medijatori se otpuštaju u tkiva i krv i uzrokuju simptome alergijskih reakcija što se odvija prilikom svakog sljedećeg izlaganja alergenu (FAO, 2001).

## **2.2. ALERGENI IZ HRANE**

Alergeni iz hrane su uglavnom proteini, iako postoji mogućnost da se drugi sastojci hrane ponašaju kao hapteni, male molekule koje ulaze u interakciju s proteinima iz hrane ili proteinima tijela i izazovu da isti postanu alergeni (FAO, 2001). Većina alergena iz hrane su alergeni tipa I, proteini ili glikoproteini topljivi u vodi veličine 10-70 kD otporni na toplinu, želučanu kiselinu i proteaze (primjerice kazein iz mlijeka, vilicin iz kikirikija ili ovomukoid iz jaja) (Alves i sur., 2016). Mogu nepromijenjeni ući u organizam (čak i nakon termičke obrade) te zbog svoje izuzetne otpornosti, kod senzibiliziranih osoba izazvati sistemske alergijske reakcije. Ovakvi alergeni nazivaju se kompletnim nutritivnim alergenima (Pevec, 2007).

Alergeni tipa II (nekompletni) su termolabilni i osjetljivi na procese u probavnom sustavu, stoga se vrlo brzo denaturiraju. Uzrokuju simptome jedino kad je hrana konzumirana sirova, a lokalizirani su jedino na sluznicu usne šupljine jer daljnjim prolazom kroz probavni trakt dolazi do gubitka alergogenih svojstava, stoga u principu nemaju sposobnost senzibilizacije organizma. Međutim, u organizmu koji je prethodno (inhalacijskim ili kontaktnim putem) senzibiliziran na neki križno-reaktivni alergen, mogu izazvati simptome. Primjer nekompletnog nutritivnog alergena je Mal d 1 iz jabuke, koji inducira simptome oralnog alergijskog sindroma u osoba senzibiliziranih na Bet v 1 iz breze (Pevec, 2007).

Unatoč tome što je poznato otprilike 170 sastojaka koji uglavnom uzrokuju alergijske reakcije (iako u teoriji svaka hrana može izazvati alergiju ukoliko je osoba na nju osjetljiva), većina alergijskih reakcija posljedica je konzumacije alergena iz skupine „osnovnih alergena“ (Burks i sur., 2012). Zakonodavstvo Europske unije naglašava četrnaest specifičnih alergena koji se koriste (kao sastojci ili pomoćne tvari) u proizvodnji ili pripremi hrane (uključujući i pića) i prisutni su u gotovom proizvodu čak i u promijenjenom obliku, a o čijoj prisutnosti informacije moraju biti pružene potrošaču (Vodič, 2015). Slična regulativa postoji primjerice u SAD-u, Kanadi, Australiji i Novom Zelandu.

Popis tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili netolerancije nalazi se u Prilogu II. Uredbe (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani (u daljnjem tekstu: Uredba (EU) br. 1169/2011).

Popis uključuje: 1. Žitarice koje sadrže gluten (pšenica, raž, ječam, zob, pir, kamut ili njihovi križanci, te proizvodi od tih žitarica); 2. Rakovi i proizvodi od rakova; 3. Jaja i proizvodi od jaja; 4. Riba i riblji proizvodi; 5. Kikiriki i proizvodi od kikirikija; 6. Zrna soje i proizvodi od soje; 7. Mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući laktozu); 8. Orašasto voće, tj. bademi, lješnjaci, orasi, indijski oraščići, pekan orasi, brazilski orasi, pistacije, makadamije ili kvinslandski orasi te njihovi proizvodi; 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>; 13. Lupina i proizvodi od lupine; 14. Mekušci i proizvodi od mekušaca, uz neke iznimke (Uredba, 2011).

### **2.2.1. Žitarice koje sadrže gluten i njihovi proizvodi**

Gluten je smjesa proteina netopivih u vodi koji se nazivaju glutelinima i prolaminima (HAH, 2009). Kada je riječ o glutenu, najčešće govorimo o pšeničnom glutenu koji je definiran kao elastičan protein koji se sastoji uglavnom od glutenina i glijadina (prisutni su i albumini i globulini), a predstavlja ostatak nakon ispiranja škroba iz pšeničnog brašna. Glijadini pripadaju skupini skladišnih proteina bogatih prolaminima (EFSA, 2014).

U literaturi se uglavnom govori o alergiji na pšenicu, međutim i druge žitarice kao što su ječam, raž, zob, krupnik ili pir ili spelta, kamut ili njihovi hibridi, a koje sadrže slične prolaminske frakcije, također izazivaju alergijske reakcije, te ukoliko je detektirana alergija na pšenicu, savjetuje se izbjegavanje i navedenih žitarica (HAH, 2009). Hibridi poput tritikala (pšenoraži) ili derivati poput slada također sadrže gluten. Prolaminske frakcije prisutne su u raži kao sekalin, hordein u ječmu i avenin u zobi i kolektivno se nazivaju „gluten“ (Biesiekierski i sur., 2013). Unatoč tome što zob sadrži male količine prolaminske frakcije (avenina) i ne predstavlja opasnost, prilikom prerade se često kontaminira žitaricama koje sadrže gluten (najčešće ječam), stoga se osjetljivim osobama preporuča izbjegavanje zobi. Važno je napomenuti kako i drugi proteini iz žitarica (koje sadrže i ne sadrže gluten) mogu uzrokovati alergijske reakcije, no naglasak je na žitaricama koje sadrže gluten, prateći Prilog II. Uredbe (EU) br. 1169/2011 (EFSA, 2014).

Najraširenija primjena glutena je u pekarskoj industriji, no njegova se vrlo često primjenjuje prilikom proizvodnje mnogih drugih prehrambenih proizvoda zbog različitih korisnih svojstava (utjecaj na teksturu, senzorska svojstva, toplinsku stabilnost) i niže cijene nego što je imaju primjerice proteini soje ili mlijeka (Day i sur., 2006).

Općenito, poremećaji vezani uz gluten dijele se u tri osnovna oblika: alergijski (alergija na pšenicu, anafilaksija uzrokovana vježbanjem i pekarska astma), autoimuni (celijakija) i vjerojatno imunološki posredovani (ne-celijakična preosjetljivost na gluten) (Mišak, 2014). Celijakija je autoimuna bolest koju karakterizira specifična preosjetljivost organizma na prolaminsku frakciju glutena. Kada osoba oboljela od celijakije unese hranu koja sadrži gluten, on potiče imunološki sustav na reverzibilno uništavanje mukoze tankog crijeva. Klinička iskustva ukazuju da alergija na pšenicu nije česta pojava, no nema točnih brojčanih podataka kojima bi se izrazila učestalost (HAH, 2009). Alergija na pšenicu može biti IgE-posredovana te se može očitovati kao urtikarija, angioderma, anafilaksija, mučnina, povraćanje, dijareja, alergijski rinitis i začepljenje bronhija. Alergija može biti i neposredovana IgE antitijelima (reakcija kasne preosjetljivosti), a razvija se nekoliko sati ili dana nakon unosa antitijela. Iako postoje vanjske sličnosti između alergije posredovane IgE antitijelima i drugih neželjenih reakcija na proteine žitarice, potrebno ih je međusobno razlikovati (HAH, 2009).

U svakodnevnom životu, život s celijakijom i alergijom na gluten je sličan – jedini uspješan tretman za obje bolesti je izbjegavanje hrane koja sadrži gluten te zamjena tih žitarica sa proizvodima koji ne sadrže glutenske proteinske frakcije, kao što su riža ili kukuruz. Proizvođači hrane moraju imati dobre sustave kontrole i sljedivosti, te pravilno označavati prisustvo potencijalnih alergena u hrani, kako kod ljudi koji su alergični ne bi izazvali neželjenu alergijsku reakciju te kako bi takve osobe mogle provoditi kvalitetne restriktivne ili eliminacijske dijete (HAH, 2009).

U tu svrhu, Europska komisija izdala je Provedbenu uredbu Komisije (EU) br. 828/2014 od 30. srpnja 2014. o zahtjevima za informiranje potrošača o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani u (u daljnjem tekstu: Provedbena uredba Komisije (EU) br. 828/2014) prema kojoj se hrana može označavati kao:

- “bez glutena” (ako je sadržaj glutena u hrani kao gotovom proizvodu manji od 20 mgkg<sup>-1</sup>)
- “vrlo mali sadržaj glutena” (ako ne sadržava količinu glutena višu od 100 mgkg<sup>-1</sup> u gotovom proizvodu) (Provedbena uredba, 2014).

### **2.2.2. Soja i proizvodi od soje**

Soja (*Glycine max*) je jestiva leguminoza iz porodice *Fabaceae*. Zrno soje sadrži oko 20 % ulja i 38-40 % proteina (EFSA, 2014). Proizvodi soje bogati su na proteinima i esencijalnim

aminokiselinama stoga se često uvode u prehranu u najranijoj životnoj dobi, posebice kod djece koja pokazuju intoleranciju ili alergiju na kravlje mlijeko (HAH, 2009). Soja i proizvodi (soja sos, tofu, tempeh i mnogi drugi) konzumiraju se najčešće u Aziji i SAD-u, a česta su namirnica u vegetarijanskoj prehrani. Soja i prerađevine soje također se koriste u prehrambenoj industriji u svrhu poboljšanja teksture, stabilizacije emulzija te kao jeftini izvor proteina, osobito prilikom proizvodnje mesnih, pekarskih i konditorskih proizvoda (EFSA, 2014).

Alergija na soju i njene proizvode manifestira se na razne načine – od enterokolitisa pa sve do trenutnih IgE-posredovanih reakcija, koje mogu uzrokovati pojavu akni, angioderme, rinitisa, dijareju, začepjenja nosa i atopijski dermatitis (HAH, 2009). Šest proteina u soji prepoznati su kao alergeni: proteini ljuske (Gly m 1 and Gly m 2), profilin (Gly m 3), a transportni protein (Gly m 4),  $\beta$ -konglicinin (Gly m 5) i glicinin (Gly m 6) (Taylor i sur., 2015). Međutim, čini se da za razliku od kikirikija, koji kao i soja pripada porodici leguminoza, alergija na soju vrlo rijetko izaziva ozbiljne reakcije koje mogu dovesti do anafilaktičkog šoka i smrti. Neke studije su pokazale da je potrebna 100 puta veća koncentracija sojinih proteina u odnosu na koncentraciju drugih alergena kako bi se izazvala ista alergijska reakcija organizma (HAH, 2009). Većina osoba alergičnih na soju razvije otpornost za života (EFSA, 2014). S obzirom da je prevalencija alergija na soju mala i simptomi uglavnom blagi, neki autori predlažu isključivanje soje sa liste glavnih alergena (Taylor i sur., 2015).

Radi visokog udjela ulja u zrnju soje, soja se uzgaja i radi proizvodnje ulja. Rafinirano sojino ulje ne izaziva alergijske reakcije i sadrži izrazito male količine sojinih proteina/alergena. Vrlo često korištena prerađevina soje je sojin lecitin, koji se koristi kao stabilizator i emulgator prilikom proizvodnje hrane, lijekova i drugih proizvoda. Lecitin je kompleksna smjesa fosfolipida, glikolipida i masnih kiselina, ali prilikom proizvodnje lecitina moguć je zaostatak proteina koji mogu prouzročiti alergijske reakcije u osjetljivih osoba (EFSA, 2014).

Potrebno je posebno obratiti pozornost čitanje deklaracija jer su proizvodi iz soje postali najčešće korišteni aditivi u suvremenoj industrijskoj proizvodnji hrane, s naznakom da ne izazivaju svi proizvodi jednake reakcije (HAH, 2009). Istraživanja su pokazala kako termičko tretiranje, visoki hidrostatski tlak i fermentacija mogu smanjiti alergenost sojinih proteina (EFSA, 2014).



### 2.2.3. Mlijeko i mliječni proizvodi

Mlijeko i mliječni proizvodi izvor su proteina, masti, vitamina i minerala i imaju važnu ulogu u prehrani. Unatoč navedenom, mlijeko i mliječni proizvodi mogu kod pojedinaca izazvati alergiju ili intoleranciju. Alergija na mlijeko predstavlja neželjenu imunološku reakciju na proteine mlijeka različitih vrsta sisavaca, osobito na kravlje, kozje i ovčje, pretežito kod djece (EFSA, 2014). Mliječni šećer (laktoza) razlog je pojave intolerancije ili nepodnošenja laktoze zbog nedostatka enzima laktaze u probavnom sustavu koja razgrađuje laktozu. Sastojci mlijeka, koji se koriste kao aditivi u mnogim prehrambenim proizvodima, također su izvor alergije i/ili intolerancije, stoga je veliki broj hrane skriveni izvor alergena (HAH, 2009).

Proteini mlijeka dijele se na proteine sirutke (beta-laktoglobulin i alfa-laktoalbumin kao glavni alergeni) te kazein (alergeni  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\kappa$  kazeini) (Immer i Lacorn, 2015). Reakcija na proteine iz mlijeka u ljudskom organizmu uključuje imunološku reakciju. Najviše su izložena dojenčad i mala djeca, budući da su proteini mlijeka prvi strani proteini s kojima se susreće organizam dojenčeta. Na sreću, preosjetljivost na mlijeko često nije trajni poremećaj (HAH, 2009).

### 2.2.4. Gorušica i proizvodi od gorušice

Gorušica pripada porodici kupusnjača i premda postoji četrdesetak različitih podvrsta, u prehrani se upotrebljava sjeme tri osnovna tipa gorušice: crna gorušica (*Brassica nigra* L.), zatim smeđa (*Brassica juncea* L.) te bijela gorušica (*Sinapis alba* L.). Prah gorušice koji se obično koristi mješavina je mljevenog zrna bijele i crne gorušice. Najpoznatiji proizvod gorušice je senf koji se najčešće upotrebljava kao dodatak jelima, u pripremi mesnih jela ili umaka. Najznačajnija tvar je glikozid sinigrin, koji se u vodi uz sudjelovanje enzima mirozina, koji se također nalazi u sjemenci, razgrađuje u alilno gorušičino ulje i groždani šećer. Osim navedenog, u sjemenci se nalazi masno ulje, bjelančevine i sluz (HAH, 2009).

Dva glavna alergena u gorušici (Sin a 1 i Bra j 1) su slična i pripadaju bjelančevinama (2 S albuminima), koje su otporne na visoke temperature i enzimatsku razgradnju. Alergijske reakcije na gorušicu uključuju poremećaje od opasnog anafilaktičkog šoka da oralnog alergijskog sindroma, preko povraćanja, teškoća u disanju, oticanja, mučnine, žarenja. Gorušica se smatra jednim od najčešćih alergena u određenim europskim zemljama. Poznate su alergijske reakcije izazvane vrlo malim količinama gorušice (oko 1 mg), a u nekim slučajevima dovoljna je samo kontaminacija posuđa za kuhanje (HAH, 2009).

## 2.3. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA U HRANI

Pouzdana metode za detekciju i kvantifikaciju alergena u hrani nužne su kako bi se osigurala usklađenost deklaracija sa zakonskom regulativom vezanom za označavanje hrane. Primjenjuju se različiti pristupi kako bi se detektirala prisutnost alergeni sastojaka u prehrambenim proizvodima, ovisno o alergenu koji se želi odrediti, matriksu i primjenjenim tehnološkim postupcima, stoga se ne može svaka metoda primijeniti u svaku svrhu. Nekim metodama se određuje specifični alergeni protein ili njih nekoliko (direktna analiza), dok se nekima određuje DNA kao indikator alergena sastojka (indirektna analiza) (EFSA, 2014). Određivanje alergena u hrani može biti ponekad komplicirano jer su često prisutni u tragovima i maskirani drugih komponentama hrane (Poms i sur., 2004). S obzirom na navedeno, analitičke metode moraju biti vrlo specifične, osjetljive, robusne i pouzdane (Taylor i sur., 2009).

**Tablica 1.** Pregled najčešće korištenih metoda za analizu alergena u hrani (prilagođeno prema EFSA, 2014)

| Analiza proteina                 |   | Analiza DNA       |
|----------------------------------|---|-------------------|
| <i>Fizikalno-kemijske metode</i> | <i>Imunološke metode</i>                  | <i>PCR metode</i> |
| (1D/2D) SDS elektroforeza        | ELISA                                     | End-point PCR     |
| HPLC                             | Imunoblotting                             | Real-time PCR     |
| Kapilarna elektroforeza          | „Rocket“ imunoelektroforeza               | PCR-ELISA         |
| Masena spektrometrija            | „Lateral-flow“ uređaj                     | DNA biosenzori    |
|                                  | Imunokromatografske trakice („dipsticks“) | DNA mikročipovi   |
|                                  | Dot-immunoblotting                        |                   |
|                                  | Proteinski biosenzori                     |                   |
|                                  | Proteinski mikročipovi                    |                   |

### 2.3.1. Analiza proteina

Analiza proteina najčešće se provodi imunološkim metodama (najviše ELISA metodom), a primjenjuju se i fizikalno-kemijske metode (Tablica 1). Imunološke metode podrazumijevaju primjenu antitijela za prepoznavanje specifičnog alergena proteina (EFSA, 2014). Pritom se koriste različiti tipovi antitijela koja mogu biti monoklonalna i poliklonalna. Monoklonalna su

visoko specifična za određeni epitop ciljanog antigena, primjerice R5 antitijelo protiv određenog epitopa glijadina/glutena koje se koristi u ELISA metodi. Poliklonalna nisu specifična, već imaju mogućnost prepoznavanja više epitopa na proteinu i otporniji su na modifikacije proteina, a ujedno im je cijena proizvodnje niža stoga se češće koriste u testovima za analizu alergena (Monaci i Visconti, 2010). Serum poliklonalnih antitijela može se koristiti za detekciju jednog proteina ili smjese alergernih proteina iz hrane (Taylor i sur., 2009).

Analiza imunološkim metodama može se provoditi direktno na smjesu proteina ELISA metodom, „lateral-flow“ uređajima, imunokromatografskim trakicama, „rocket“ imunoelektroforezom, dot-imunoblottingom te proteinskim mikročipovima ili biosenzorima, koje predstavljaju brze „screening“ metode (EFSA, 2014). S obzirom da se one provode bez prethodne separacije proteina, može doći do križne reaktivnosti s drugim alergenima ili drugim komponentama hrane i dovesti do lažno pozitivnih rezultata (Monaci i Visconti, 2010). Analiza imunološkim metodama može uključivati i prethodnu separaciju proteina jedno- ili dvodimenzionalnom elektroforezom, HPLC metodom ili kapilarnom elektroforezom proteina, popraćenom imunoblottingom (EFSA, 2014).

Masena spektrometrija (*engl.* Mass Spectrometry, MS) je analitička metoda koja razdvaja ione u plinskoj fazi pod visokim vakuumom uslijed utjecaja električnog ili magnetskog polja, a razdvojeni ioni se detektiraju prema omjeru mase i naboja  $m/z$ . Na temelju snimljenog spektra moguće je odrediti sastav ispitivanog uzorka. Masena spektrometrija, u kombinaciji s tehnikama poput 2D-elektroforeze (SDS-PAGE) ili kromatografije (tekućinske ili plinske) za preliminarnu separaciju proteina, uz korištenje baze podataka alergena za njihovu identifikaciju, predstavlja pouzdanu metodu za detekciju i identifikaciju alergena (EFSA, 2014). Najveći potencijal ove metode leži u mogućnosti istovremene analize više alergena (screening). Također, za razliku od imunoloških metoda, procesiranje hrane manje utječe na samu analizu s obzirom da MS detektira masu, a ne strukturu proteina koja se često mijenja tijekom procesiranja. Nedostatci ove metode su još uvijek veliki troškovi opreme i potreba za stručnim osobljem (FDE, 2013).

### **2.3.2. DNA analize**

Metode temeljene na DNA analizi ne analiziraju protein direktno već detektiraju gen koji kodira za taj protein (Monaci i Visconti, 2010). Od metoda koje se temelje na analizi DNA najčešće se upotrebljava PCR metoda (lančana reakcija polimeraze, *engl.* Polymerase Chain

Reaction) i njene modifikacije (Butorac i sur., 2013). Često se provodi kao verifikacijska metoda nakon provedene ELISE. Indirektne metode bazirane na detekciji specifične sekvence DNA koriste se kad direktne metode za određivanje alergena nisu prikladne (npr. hrana koja sadrži nizak udio proteina ili procesirana hrana velikim modifikacijama nativnih proteina) (EFSA, 2014).

End-point PCR je kvalitativna metoda koja koristi detekciju umnožene ciljane DNA najčešće pomoću elektroforeze u agaroznom gelu ili kapilarne elektroforeze dok real-time PCR omogućava semi-kvantitativno/kvantitativno određivanje alergena u hrani (Monaci i Visconti, 2010). DNA metode su specifične i osjetljive, no ponekad mogu dovesti do pogrešnih rezultata. S obzirom da su alergeni proteini, procesiranje hrane može utjecati na nukleinske kiseline i proteine. Također, udio alergen-kodirajuće DNA ne kolerira uvijek s količinom alergena prisutnim u hrani (Alves i sur., 2015). Ciljana sekvenca DNA nije nužno locirana u genima koji kodiraju za alergeni protein stoga analiza detektira genomsku DNA određenog sastojka, ali ne ukazuje nužno na prisutnost proteina odgovornog za alergijsku reakciju (EFSA, 2014). Postoje određeni problemi prilikom detekcije alergena životinjskog porijekla jer PCR ne može razlikovati DNA porijeklom iz nealergene govedine i alergenog mlijeka ili nealergene piletine i alergenih jaja (FDE, 2013).

#### **2.4. ELISA METODA U ODREĐIVANJU ALERGENA U HRANI**

ELISA metoda (*engl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je imunološka metoda razvijena sedamdesetih godina 20. stoljeća iz RAI (*engl.* Radioimmunoassay) metode i ubrzo se počela naširoko primjenjivati u biokemiji i medicini zahvaljujući specifičnosti, osjetljivosti i jednostavnosti korištenja (Schubert-Ullrich i sur., 2009). ELISA metodom određuje se prisutnost i količina bioloških parametara (antitijela ili antigena) na način da je jedan od imunoreaktanata imobiliziran na krutu podlogu. Kao kruta podloga primjenjuju se polistirenske mikrotitracijske ploče četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica (Crowther, 2001). Metoda se temelji na vezanju antitijela ili antigena iz uzorka te mjerenju intenziteta obojenja produkta reakcije koji nastaje interakcijom enzima i dodanog supstrata na spektrofotometrijskom čitaču. Ovom metodom moguće je odrediti vrlo nisku koncentraciju analita od primjerice nekoliko  $\text{ng kg}^{-1}$  ispitivanog uzorka. Postoje više vrsta tehnika imunološkog određivanja pomoću testa ELISA: indirektna, sendvič, konkurentna i nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča. Primjena testa ELISA je vrlo raširena u analitici hrane i koristi se u mnoge svrhe, primjerice za određivanje alergena u

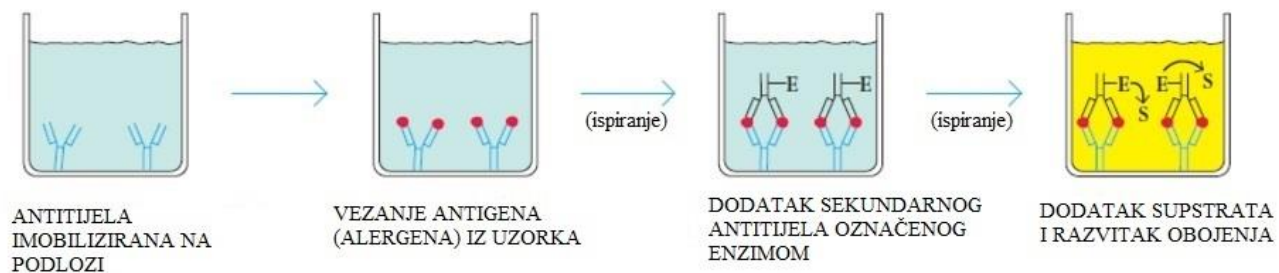
hrani, pesticida, mikotoksina, antibiotika ili detekciju prisutnosti mikroorganizama (Butorac i sur., 2013).

ELISA je najčešće korištena metoda za rutinske analize koja se primjenjuje za detekciju i kvantifikaciju alergena u hrani (Schubert-Ullrich i sur., 2009). Najčešće podrazumijeva korištenje imunoglobulin G (IgG) antitijela iz sisavaca koje služe za detekciju alergeni proteina. Upotreba IgG antitijela omogućava proizvodnju dovoljnih količina antitijela i smanjuje varijabilnost do koje dolazi prilikom upotrebe ljudskog IgE seruma (Baumert, 2014). Razvijeni su ELISA kitovi za detekciju određenog alergena (poput Ara h 1 iz kikirikija, lizozima, kazeina i laktoglobulin iz mlijeka) ili grupe alergeni proteina (poput ukupni proteina mlijeka, prolamina, proteina kikirikija ili badema) (Alves i sur., 2015).

Za detekciju alergena u hrani komercijalno su dostupne sandwich i kompetitivna ELISA, obje sa direktnim ili indirektnim određivanjem (EFSA, 2014). Koja vrsta će se koristiti, uglavnom ovisi o veličini molekule analita, ali se u većini slučajeva za detekciju alergena koristi se sandwich ELISA. (Immer i Lacorn, 2015).

Princip „sandwich“ ELISA metode temelji se na vezanju antigena iz uzorka hrane sa specifičnim antitijelom imobiliziranim u suvišku na čvrstoj podlozi (EFSA, 2014). Dodatkom otopine uzorka na pločicu s jažicama, prisutni antigen specifično se veže za antitijela tvoreći antigen-antitijelo kompleks. Nakon određenog vremena inkubacije i ispiranja prilikom kojeg se odstranjuju nevezane komponente, dodaje se sekundarno antitijelo vezano na enzim (najčešće peroksidazu ili alkalnu fosfatazu). Taj enzimski konjugat se veže za Ab-Ag-kompleks te se formira antitijelo-antigen-antitijelo kompleks („sendvič“). Dva IgG vezujuća epitopa moraju biti prisutna na alergenu proteinu kako bi se vezalo i primarno i sekundarno antitijelo. Nakon dodatka supstrata (kromogena) dolazi do razvitka boje čiji je intenzitet direktno proporcionalan koncentraciji alergena u uzroku. Kvantifikacija se postiže usporedbom apsorbancije uzorka s apsorbancijom na krivulji standarda. (Immer i Lacorn, 2015 i Baumert, 2014).

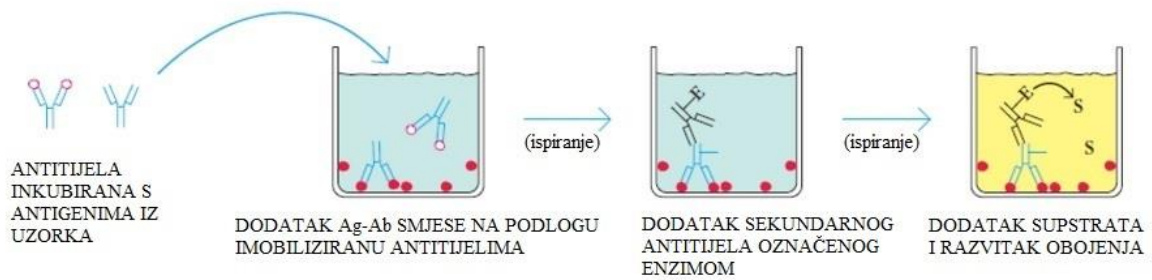
Sandwich ELISA (Slika 2) je najčešći tip za detekciju alergena u hrani jer su alergeni proteini velike molekule koji imaju uglavnom više od jednog epitopa. Postoji i „indirektna“ sandwich metoda, koja se koristi ukoliko nije dostupno sekundarno analit-specifično antitijelo označeno enzimom stoga se koristi sekundarno antitijelo neke druge vrste (Schubert-Ullrich i sur., 2009).



**Slika 2.** Princip sandwich ELISA metode (Anonymous 2, 2015)

Kompetitivna ELISA (Slika 3) temelji se na vezanju antigena (alergenog proteina od interesa) na površinu pločice s jažicama. Uzorak hrane prethodno se inkubira s alergen-specifičnim IgG antitijelima, što omogućava vezanje antitijela s alergenima prisutnima u uzorku. Otopina se potom dodaje na pločicu s antigenima, a alergeni protein iz uzorka kompetitivno inhibira vezanje IgG na pločicu. Nakon nekoliko koraka ispiranja radi uklanjanja nevezanih komponenti, dodaje se sekundarno antitijelo vezano s enzimom nakon čega slijedi dodatak supstrata što rezultira obojenim produktom. Za razliku od sandwich ELISA metode, intenzitet boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji alergena u uzorku. Drugim riječima, što je više obojenog produkta, niža je koncentracija alergena u uzorku jer je manje prisutnih alergena koji se natječu s antigenom vezanim na pločicu za vezanje s IgG antitijelom.

Za izvedbu kompetitivne ELISA-e potreban je samo jedan epitop na alergenom proteinu za vezanje s IgG antitijelom što čini ovaj tip metode korisnim za detekciju uzoraka koji su prošli fermentaciju ili hidrolizu (primjerice analiza glutena u pivu) i u kojem proteini mogu biti djelomično razgrađeni, odnosno omogućava detekciju manjih fragmenata peptida. Posljedica hidrolize proteina može biti uništavanje epitopa što rezultira smanjenjem slobodnih epitopa za detekciju sandwich ELISA-om (Baumert, 2014). Ukoliko nema dostupnog enzima označenog analit specifičnog antitijela, može se provesti indirektno određivanje (EFSA, 2014).



**Slika 3.** Princip kompetitivne ELISA metode (Anonymous 3, 2015)

Prednosti ELISA metode su jednostavno korištenje, niski troškovi, osjetljivost, brza i automatizirana analiza te nizak limit detekcije/kvantifikacije u rasponu od 0.05 do 10 mgkg<sup>-1</sup> ovisno o alergenu i matriksu (EFSA, 2014).

Nedostaci su nemogućnost određivanja više alergena po jednoj analizi, mogućnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata, dugotrajna priprema uzorka i trajanje analize od dva do tri sata, a na rezultate mogu utjecati matriks hrane (npr. vezanje alergena na druge proteine ili ugljikohidrate), procesiranje hrane te razlike u kitovima zavisno od proizvođača (Monaci i Visconti, 2010).

## 2.5. ALERGENI U MESNIM PROIZVODIMA

Prilikom proizvodnje mesnih proizvoda koriste se različiti aditivi biljnog i životinjskog porijekla radi poboljšanja tehnoloških svojstava mesnih proizvoda, niže cijene proizvodnje i povećanja prinosa. Najčešći aditivi biljnog porijekla uključuju različite vrste brašna, škroba, vlakana i biljnih proteina (poput proteina soje i pšenice), dok su od aditiva životinjskog porijekla najčešće korišteni plazma, kolagen i mlijeko (kazeinat, sirutka, mlijeko u prahu i sl.) (Petrašová i sur., 2015). Njihova primjena je zakonski regulirana ne samo radi zaštite interesa potrošača već radi mogućeg utjecaja navedenih aditiva na njihovo zdravlje.

Proteini se vrlo često dodaju u mesne proizvode iz niza razloga. Imaju sposobnost stabilizacije emulzija jer otopljeni proteini imaju hidrofilnu i lipofilnu grupu u molekuli stoga djeluju kao emulgatori i stabiliziraju dvije faze koje se ne miješaju tijekom termičkog tretiranja. Također povećavaju sposobnost vezanja vode pomoću vodikovih veza čime povećavaju čvrstoću i sočnost proizvoda. Neki proteini djeluju pozitivno na okus završnog proizvoda ili se dodaju radi povećanja ukupnog udjela proteina u proizvodu radi zadovoljavanja zakonske regulative (Feiner, 2006).

Kako je ranije navedeno, gluten je zajedničko ime za elastični i ljepljivi protein iz pšenice, ječma, raži, zobi i pira. Glijadin je ljepljive teksture dok je glutenin elastičan i hidratiziran, a zajednički tvore trodimenzionalnu mrežu. Omjeri navedenih proteina variraju ovisno o vrsti žitarice i vremenu žetve. Gluten predstavlja najjeftiniji izvor proteina stoga se na široko primjenjuje u proizvodnji mesnih proizvoda poput kobasica zahvaljujući izvrsnoj sposobnosti vezanja vode (SVV) i mogućnosti emulzije masti. Pšenični gluten često se dodaje prilikom proizvodnje kobasica radi povećanja ukupnog udjela proteina i redukcije troškova (Feiner, 2006).

Od svih proteina koji se koriste u mesnoj industriji, proteini soje se najviše primjenjuju zbog njihove izvrsne sposobnosti vezanja vode, povećanja stabilnosti emulzija i prinosa. Također imaju visoku biološku vrijednost i lako su probavljivi, a njihov utjecaj na boju i okus završnog proizvoda je minimalan (Feiner, 2006). Zbog navedenih pozitivnih karakteristika, proteini soje često se koriste i prilikom proizvodnje funkcionalnih proizvoda od mesa (Grujić i sur., 2012).

Prilikom proizvodnje mesnih proizvoda, proteini soje dodaju se u obliku sojinog brašna, teksturiranih biljnih proteina te sojinih koncentrata ili izolata (Feiner, 2006). Svaki od tih sojinih proizvoda ima drugačija funkcionalna svojstva, stoga se svaki od njih primjenjuje za različite mesne proizvode (Belloque i sur., 2002). Primjerice, sojini proteinski preparati (koncentrati i izolati) imaju sposobnost vezanja i zadržavanja prirodne arome i vlage u proizvodima i nakon smrzavanja, odmrzavanja i ponovne toplinske obrade. Teksturirani sojini proteini imaju neutralan okus i utječu na formiranje karakteristične strukture, koja doprinosi poboljšanju nutritivnog profila standardnih prehrambenih proizvoda i ponudi alternativnih mogućnosti za razvoj novih proizvoda (Grujić i sur., 2012).

Proteini mlijeka pozitivno utječu na sočnost, sposobnost stvaranja gela i okus mesnih proizvoda. Najčešće se dodaju u obliku kazeinata, sirutke, mlijeka u prahu i sl. (Petrášová i sur., 2015). Kazein je najzastupljeniji protein mlijeka i čini oko 80 % ukupnih proteina mlijeka. Najčešće se u mesne proizvode dodaje u obliku kazeinata, koji se proizvode izdvajanjem kazeina iz obranog mlijeka pomoću kiseline. Ima odličnu sposobnost emulgiranja masti koje su stabilne čak i prilikom toplinskih tretmana pri visokim temperaturama (sterilizacija). Nedostaci kazeinata su mala sposobnost zadržavanja vode i visoka cijena (Feiner, 2006).

Proteini sirutke čine oko 20 % od ukupnih proteina mlijeka, mnogo su jeftiniji od kazeinata i često se koriste u mesnoj industriji (Petrášová i sur., 2015). Najčešće se dodaju u



obliku koncentrata proteina sirutke čija je upotreba vrlo raširena u proizvodnji mesnih proizvoda. Lako su topljivi, stabilni pri promjenama pH, imaju veliku sposobnost stvaranja gela (pri nižim temperaturama) i djeluju pozitivno na okus mesnih proizvoda (Feiner, 2006).

Gorušica se u mesne proizvode dodaje kao začim, no istraživanja su pokazala kako se gorušica može koristiti kao prirodni antioksidans u svrhu sprječavanja lipidne oksidacije mesnih proizvoda odnosno produžetka stabilnosti i kvalitete proizvoda (Karwowska i sur., 2013). Također je razmatrana kao alternativa nitratima i nitritima u mesnim proizvodima, no još su potrebna dodatna istraživanja (Gassara i sur., 2016).

## **2.6. UPRAVLJANJE ALERGENIMA U PREHRAMBENOM LANCU**

Osim što alergeni mogu biti namjerno prisutni u proizvodu, poznato je kako se u hrani mogu nalaziti i slučajno kao posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje, prerade ili rukovanja hranom. Takvi skriveni alergeni predstavljaju rizik za potrošača alergičnog na određenu hranu (Crevel i Cochrane, 2014). Sljedivost je ključna komponenta upravljanja sigurnošću hrane u slučaju prisutnosti alergena jer omogućava proizvođačima da identificiraju sastojak/proizvod koji ih sadrži, a nije naznačen te ih efikasno povuku s tržišta (Millard i sur., 2015). Alergeni su i dalje jedan od glavnih razloga povlačenja proizvoda s tržišta, unatoč novoj zakonskoj regulativi (Crevel i Cochrane, 2014). Prema godišnjem izvješću RASFF-a iz 2015. godine, dvostruko je više obavijesti vezano uz alergene postavljeno u 2015. u odnosu na 2013. godinu, a osobito je primijećen porast prisustva proteina mlijeka u proizvodima (RASFF, 2016).

Određivanje koncentracije alergena u proizvodima ispod koje većina osjetljivih potrošača nije u riziku od pojave alergijskih reakcija privukla je mnogo pozornosti od strane regulatornih tijela, udruga potrošača i prehrambenih industrija u Europi (EFSA, 2014). Unatoč tome, još uvijek nije postignut dogovor kako interpretirati te vrijednosti u kontekstu javnog zdravstva s obzirom da one ovise o različitim faktorima, osobito o osjetljivosti pojedinca (FDE, 2013). Različite granične vrijednosti su razmatrane, no zasad još uvijek nisu zakonski određene, osim za sulfite iznad  $10 \text{ mgkg}^{-1}$  i gluten iznad  $20 \text{ mgkg}^{-1}$  (Immer i Lacorn, 2010).

Znanstveni panel za alergije na hranu Njemačkog društva za alergologiju i kliničku imunologiju i Udruženje njemačkih alergologa predlaže granicu od  $10\text{--}100 \text{ mgkg}^{-1}$  alergene hrane ili  $1\text{--}10 \text{ mgkg}^{-1}$  proteinske frakcije alergene hrane (ovisno o njenoj alergenosti) kako bi

se zaštitili osjetljivi potrošači od ozbiljnih alergijskih reakcija. Niže granice trebale bi se primjenjivati za hranu koja izaziva jake reakcije, poput kikirikija (Alves i sur., 2015).

### **2.6.1. Zakonski okvir Europske unije**

Donošenjem Uredbe (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani od strane Europske komisije, izmijenila se dotadašnja zakonska regulativa vezana uz označavanje hrane, uključujući i zahtjeve vezane uz označavanje alergena. U slučaju da država članica ne donese nacionalni propis o načinu navođenja alergena, isti se moraju navoditi prema pravilima utvrđenim u Uredbi (EU) br. 1169/2011 i jednaki su za pretpakiranu i nepretpakiranu hranu. Nova pravila počela su se primjenjivati od 13. prosinca 2014. godine (Vodič, 2015).

U Republici Hrvatskoj važeći je Zakon o informiranju potrošača o hrani kojim se omogućuje provedba Uredbe (EU) br. 1169/2011 te Provedbene uredba Komisije (EU) br. 828/2014 (Zakon, 2013).

### **2.6.2. Informacije o prisutnosti alergena u prehrambenim proizvodima**

Komunikacija s potrošačima za prehrambenu industriju od iznimne je važnosti, a najbolji način za to je deklaracija na hrani. Proizvođači, međutim, nemaju potpunu slobodu u označavanju hrane jer je neke podatke obavezno navesti na deklaraciji dok je neke zabranjeno navoditi.

Među podacima koje je obavezno navoditi, sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011, subjekti u poslovanju hranom obavezni su navesti i tvari koje mogu izazivati alergije i intolerancije. Važno je pružiti točne informacije o prirodi i sastavu hrane kako bi potrošač mogao donijeti ispravnu odluku pri kupnji hrane i prilagoditi je svojim prehrambenim potrebama. Kako je ranije navedeno, važeće zakonodavstvo naglašava četrnaest specifičnih alergena o čijoj prisutnosti informacije moraju biti pružene potrošaču.

Ukoliko je riječ o pretpakiranoj hrani, alergeni se navode u popisu na odgovarajućem mjestu, uzimajući u obzir padajući redoslijed navođenja sastojaka s obzirom na masu te naglašeno uporabom vrste pisma koja se jasno razlikuje od vrste pisma kojim je pisan ostatak popisa sastojaka (različitim slovima, stilovima ili bojama u pozadini). Budući da za većinu nepretpakirane hrane nije propisana obveza navođenja popisa sastojaka, informacije koje se navode moraju uključivati riječ "sadrži" nakon koje slijede nazivi specifičnih alergena (Vodič, 2015). Ukoliko postoji mogućnost nenamjerne prisutnosti u hrani tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili intolerancije, proizvođači, mogu upotrebljavati navod „može sadržavati“,

no takve oznake ne smiju biti zamjena za dobru higijensku praksu. Potrošači ih često pogrešno interpretiraju, što ih dovodi u rizik ukoliko ignoriraju napisano ili ih s druge strane ograničava u kupnji sigurnog proizvoda (Daly, 2015). S obzirom da alergeni mogu uzrokovati reakcije u vrlo malim količinama i vrlo široku upotrebu navoda „može sadržavati“ od strane mnogih proizvođača, neki autori predlažu razmatranje same Uredbe (EU) br. 1169/2011 i strože definiranje granica za označavanje alergena u hrani (Reese i sur., 2015).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Uzorci

Određivanje alergena provedeno je na pedeset i jednom uzorku različitih mesnih proizvoda različitih proizvođača zastupljenih na tržištu Republike Hrvatske. Proizvodi su u tablici 2 razvrstani prema sistematizaciji propisanoj Pravilnikom o mesnim proizvodima (Pravilnik, 2012).

**Tablica 2.** Mesni proizvodi analizirani u radu svrstani prema sistematizaciji propisanoj Pravilnikom o mesnim proizvodima (Pravilnik, 2012)

| <i>Kategorija</i>   | <i>Skupina</i>              | <i>Podskupina</i>           | <i>Naziv</i>    | <i>Proizvođači</i>                    | <i>Broj uzoraka</i>  |          |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------------------|--|----------|
| <b>Proizvodi od cijelih ili izrezanih komada ili mljevenog mesa</b> | Proizvodi od mljevenog mesa | Mesni pripravci             | Ćevapčići       | Stanić d.o.o.<br>Billa<br>Spar<br>Aro | 5  |          |
|   |                             |                             | <b>Kobasice</b> | Toplinski obrađene kobasice           | Obarene kobasice   | Hrenovka |
|   |                             | Pariška                     | PIK Vrbovec     |                                       | 3  |          |
|   |                             | Polutrajne kobasice         | Kranjska        |                                       | PIK Vrbovec<br>Vugrinec<br>Mesnice Ravlić<br>Mesnice Francek<br>Cerovski | 6        |
|   |                             |                             | Tirolska        |                                       | PIK Vrbovec<br>Sljeme  | 4        |
|   |                             | Kobasice od mesa u komadima | Šunka u ovitku  |                                       | Gavrilović<br>Aro<br>PIK Vrbovec   | 3        |

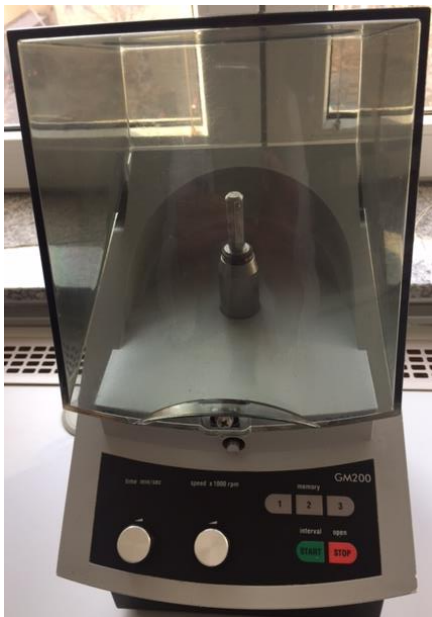
|   |                 |                 |                        |   |   |
|---|-----------------|-----------------|------------------------|---|---|
|   |                 | Kuhane kobasice | Pašteta                | Spar<br>K plus                                    | 6 |
|   | Svježe kobasice |                 | Kobasica za<br>pečenje | PIK Vrbovec<br>Mesnica Šfar<br>MM Medven<br>Pivac | 5 |
| <b>Mesni proizvodi u<br/>komadima</b>   |                 |                 | Kuhana<br>šunka        | Tradicionalna<br>hrana<br>PIK Vrbovec             | 3 |
| <b>Proizvodi od usitnjenog<br/>mesa</b> |                 |                 | Mesni<br>doručak       | Gavrilović<br>Spar<br>Gala<br>Billa               | 4 |
| <b>Čvarci</b>                           |                 |                 | Čvarci                 | MM Medven<br>Billa<br>Konzum                      | 4 |

### 3.1.2. Oprema i pribor

- kemijski analizator, *ChemWell 2910, Awareness Technology Inc.*, SAD
- digitalna vaga, *AND GF 2000*, Njemačka
- vodena kupelj, *Thermo Haake SWB 25*, Njemačka
- centrifuga, *Universal 120R, Hettich*, Njemačka
- mlin, *TECATOR Cylotec 1093 Sample Mill, Höganäs*, Švedska
- homogenizator, *Grindomix GM 200, Retsch*, Njemačka
- hladnjak 2-8 °C, *LTH*, Slovenija
- jednokanalne i multikanalne mikropipete 10-100 µL i 100-1000 µL, *Eppendorf Research*, Njemačka
- epruvete



**Slika 4.** Automatizirani ELISA uređaj, kemijski analizator *ChemWell 2910*, *Awareness Technology Inc.*



**Slika 5.** Homogenizator *Grindomix GM 200*, *Retsch*, Njemačka

### 3.1.3. Sadržaj kita i reagenasa za određivanje glijadina/glutena

#### Sadržaj kita:

Kemikalije za ovu metodu sadržane u kitu RIDASCREEN®GLIADIN, R-Biopharm, Njemačka:

- mikrotitracijska ploča sa 96 jažica (12 redova sa po 8 jažica)
- 6 standardnih vodenih otopina glijadina (svaka 1,3 mL) koncentracije: 0  $\mu\text{gL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{gL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{gL}^{-1}$ , 20  $\mu\text{gL}^{-1}$ , 40  $\mu\text{gL}^{-1}$ , 80  $\mu\text{gL}^{-1}$
- konjugat (1,2 mL) – koncentrat peroksidaza konjugiranog antitijela
- supstrat (7 mL) – sadrži urea peroksidaza
- kromogen (7 mL) – sadrži tetrametilbenzidin
- stop otopina – 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (14 mL)
- otopina za razrjeđivanje uzoraka (60 mL) – 5x koncentrirana
- pufer za ispiranje (100 mL) – 10x koncentrirani

#### Dodatni reagensi:

- destilirana ili deionizirana voda
- obrano mlijeko u prahu
- koktel otopina
- 80 % etanol – u 120 mL etanola p.a. dodati 30 mL destilirane vode i dobro promiješati

ili

- RIDA® ekstrakcijska otopina
- 68% otopina 2-propanola – u 68 mL 2-propanola p.a. dodati 32 mL destilirane vode i dobro promiješati

### 3.1.4. Sadržaj kita i reagenasa za određivanje soje

#### Sadržaj kita:

Kemikalije za ovu metodu sadržane u kitu RIDASCREEN®FAST SOYA, R-Biopharm, Njemačka:

- mikrotitracijska ploča sa 48 jažica (6 redova sa po 8 jažica)
- 5 standardnih vodenih otopina proteina soje (svaka 1,3 mL) koncentracije: 0 mgL<sup>-1</sup>, 2,5 mgL<sup>-1</sup>, 5 mgL<sup>-1</sup>, 10 mgL<sup>-1</sup>, 20 mgL<sup>-1</sup>
- enzimski konjugat (peroksidaza konjugirano antitijelo) (0,7 mL) - 11 x koncentrirani
- crveni kromogen Pro, (substrat/kromogen) (10 mL)
- stop otopina – 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (14 mL)
- alergen ekstrakcijski pufer (125 mL) – 10 x koncentrirani
- pufer za ispiranje (100 mL) – 10 x koncentrirani
- ekstraktor 3 (30 mL)

#### Dodatni reagensi:

- destilirana ili deionizirana voda
- za uzorke hrane koja sadrži tanine i polifenole potrebni su: kazein (Sigma C5890) i polivinilpirolidon (PVP) K15 ili K17 (AppliChem A2258)

### 3.1.5. Sadržaj kita i reagenasa za određivanje proteina mlijeka

#### Sadržaj kita:

Kemikalije za ovu metodu sadržane u kitu RIDASCREEN®FAST Milk, R-Biopharm, Njemačka:

- mikrotitracijska ploča sa 48 jažica (6 redova sa po 8 jažica)
- 5 standardnih vodenih otopina mliječnih proteina (svaka 1,3 mL) koncentracije: 0 mgL<sup>-1</sup>, 2,5 mgL<sup>-1</sup>, 7,5 mgL<sup>-1</sup>, 22,5 mgL<sup>-1</sup>, 67,5 mgL<sup>-1</sup>



- konjugat (0,7 mL) - 11 x koncentrirani
- substrat/kromogen (10 mL)
- stop otopina – 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (14 mL)
- 3x ekstraktor 2 (30 mL) - 2 x koncentrirani
- alergeni ekstrakcijski pufer (100 mL) – 10 x koncentrirani
- aditiv 1 (2g)
- konjugirani pufer (7 mL)

Dodatni reagensi:

- destilirana voda
- 1 M klorovodična kiselina
- 1 M natrijev hidroksid

**3.1.6. Sadržaj kita i reagenasa za određivanje gorušice**

Sadržaj kita:

Kemikalije za ovu metodu sadržane u kitu RIDASCREEN®FAST Senf/Mustard, R-Biopharm, Njemačka:

- mikrotitracijska ploča sa 48 jažica (6 redova sa po 8 jažica)
- 5 standardnih vodenih otopina gorušice (svaka 1,3 mL) koncentracije: 0 mgL<sup>-1</sup>, 0,5 mgL<sup>-1</sup>, 1,5 mgL<sup>-1</sup>, 4,5 mgL<sup>-1</sup>, 13,5 mgL<sup>-1</sup>
- enzimski konjugat (peroksidaza konjugirano antitijelo) (6 mL)
- crveni kromogen Pro (substrat/kromogen) (10 mL)
- stop otopina – 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (14 mL)
- RIDASCREEN® Allergen ekstrakcijski pufer (125 mL) – 10 x koncentrirani
- RIDASCREEN® pufer za ispiranje (100 mL) – 10 x koncentrirani

### Dodatni reagensi:

- destilirana ili deionizirana voda

## **3.2. METODE**

U uzorcima mesnih proizvoda određivan je udio alergena glutena, soje, proteina mlijeka i gorušice. Nakon uzorkovanja, uzorci su homogenizirani pomoću homogenizatora (Grindomix GM 200, Retsch) i pohranjeni na + 4 °C do provedbe analize. Na istima je određivan je udio navedenih alergena validiranom sandwich ELISA metodom. ELISA metoda provedena je pomoću kita za gluten/soju/mlijeko/gorušicu po naputcima proizvođača kita R-Biopharm (Darmstadt, Njemačka).



**Slika 6.** Homogenizirani uzorci mesnih proizvoda

### **3.2.1. Određivanje koncentracije glijadina/glutena u mesnim proizvodima**

#### ➤ *PRINCIP METODE*

ELISA metoda provedena je prema uputama proizvođača kita RIDASCREEN® Gliadin, R-Biopharm, Njemačka. Princip testa je antigen-antitijelo reakcija. Jažice mikrotitracijske ploče obložene su specifičnim antitijelima protiv gliadina. Dodatkom standardne otopine ili otopine uzorka u jažicu, prisutni gliadin specifično se veže za antitijela. Rezultat je antitijelo-antigen kompleks. U koraku ispiranja nevezane komponente se odstranjuju. Slijedi dodatak konjugiranog antitijela vezanog na peroksidazu te se taj enzimski konjugat se veže za Ab-Ag-kompleks. Formira se antitijelo-antigen-antitijelo kompleks („sendvič“). Sav nevezani konjugat uklanja se u koraku ispiranja, nakon čega slijedi dodatak supstrata i kromogena te

slijedi inkubacija. Vezani enzimski konjugat konvertira bezbojni kromogen u plavi produkt. Dodatak stop otopine omogućuje promjenu boje iz plave u žutu. Slijedi fotometrijsko mjerenje pri valnoj dužini od 450 nm. Apsorbancija je proporcionalna koncentraciji gliadina u uzorku.

### Priprema reagenasa

Otopina za razrjeđivanje uzoraka je 5x koncentrirana. Samo količinu potrebnu za analizu treba razrijediti u omjeru 1:5 (1+4) sa destiliranom vodom (npr. 3 mL koncentrata + 12 mL destilirane vode = dovoljno za pripremu 10 uzoraka).

Antitijelo enzimski konjugat je 11x koncentrirani. Budući da je razrijeđeni konjugat ograničene stabilnosti, samo količina trenutno potrebna u analizi se razrjeđuje. Prije pipetiranja konjugat je potrebno pažljivo protresti. Konjugat je potrebno razrijediti u omjeru 1:11 (1+10) sa destiliranom vodom (npr. 200 µL koncentrata konjugata + 2 mL destilirane vode) – dovoljno za 2 reda jažica.

Pufer za ispiranje je 10x koncentrirani. Prije upotrebe potrebno ga je razrijediti u omjeru 1:10 (1+9) sa destiliranom vodom (npr. 100 mL koncentriranog pufera sa 900 mL destilirane vode). Prije razrjeđivanja, potrebno je otopiti eventualno nastale kristale inkubiranjem pufera u vodenoj kupelji na 37 °C. Razrijeđeni pufer stabilan je na 2-8 °C 4 tjedna.

### *3.2.1.1. Provedba metode za određivanje koncentracije gliadina/glutena u mesnim proizvodima*

#### **1. Priprema uzoraka mesnih proizvoda:**

Izvaže se 0,25 g homogenog uzorka i doda 2,5 mL Rida<sup>®</sup> ekstrakcijske otopine, epruveta se zatvori i dobro promiješa. Uzorci se zatim inkubiraju 15 min na 60 °C i hlade nakon čega se dodaje 7,5 mL 68% 2-propanola. Epruvete se zatvore i inkubiraju 10 min u vodenoj kupelji na 60 °C. Zatim se centrifugiraju se 10 min (2500 rpm) na sobnoj temperaturi (20-25 °C) a, supernatant se koristi u analizi.

Supernatant se razrijedi u omjeru 1:12,5 (1+11,5) odnosno 80 µL uzorka + 920 µL otopine za razrjeđivanje uzoraka. Za analizu se koristi 100 µL tako pripremljene otopine uzorka.

## 2. Test procedura:

Pripremi se mikrotitracijska ploča sa dovoljnim brojem jažica tako da standardi i uzorci budu postavljeni u duplikatima te se odredi položaj svakog od njih. Doda se 100  $\mu\text{L}$  otopine standarda i pripremljenih uzoraka po određenom redoslijedu u duplikatima u jažice i inkubira 30 min na sobnoj temperaturi (20-25  $^{\circ}\text{C}$ ). Cjelokupni sadržaj tekućine se ukloni iz jažica; u sve jažice se doda 250  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje i ponovno se ukloni tekućina; ispiranje se ponavlja 3 puta.

Potom se doda 100  $\mu\text{L}$  razrijeđenog enzimskog konjugata u svaku jažicu i lagano promiješa i inkubira 30 min na sobnoj temperaturi (20-25  $^{\circ}\text{C}$ ). Cjelokupni sadržaj tekućine se ukloni iz jažica; u sve jažice se doda 250  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje i ponovno se ukloni tekućina; ispiranje se ponavlja 3 puta.

Doda se 50  $\mu\text{L}$  supstrata i 50  $\mu\text{L}$  kromogena u svaku jažicu i lagano promiješa te inkubira u mraku na sobnoj temperaturi 30 minuta. Zatim se doda 100  $\mu\text{L}$  stop otopine u svaku jažicu, ploča se lagano protrese i mjeri pri valnoj duljini od 450 nm. Očitava se unutar 30 minuta nakon dodatka stop otopine.

## 3. Izračunavanje koncentracije analita:

Nakon analize pristupa se određivanju koncentracije gliadina/glutena u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke dijele se s apsorbancijom prvog odnosno nultog standarda (0  $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$ ) i množe se sa 100, te se dobiju postotci apsorbancije B / B0. Prema tome nulti standard je jednak 100%.

$$\frac{\text{apsorbancija standarda (ili uzorka)}}{\text{apsorbancija nultog standarda}} \cdot 100 = \% \text{ apsorbancije}$$

Koncentracija gliadina/glutena u uzorcima očitava se iz baždarne krivulje koja se stvara pomoću softwera kemijskog analizatora ChemWell 2910. Očitani rezultati pomnoženi su s faktorom razrjeđenja 500. Koncentracija gliadina je u  $\mu\text{g}\text{kg}^{-1}$  (ppb) i množi se sa faktorom razrjeđenja 500. Tako dobiveni rezultat zatim se množi sa 2 kako bi se dobila koncentracija glutena jer gliadin obično predstavlja 50% proteina prisutnih u glutenu.

### 3.2.2. Određivanje koncentracije soje u mesnim proizvodima

#### ➤ PRINCIP METODE

ELISA metoda provedena je prema uputama proizvođača kita RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST Soya, R- Biopharm, Njemačka. Princip testa je antigen-antitijelo reakcija. Jažice mikrotitracijske ploče obložene su specifičnim antitijelima protiv sojinih proteina. Dodatkom standardne otopine ili otopine uzorka u jažicu, prisutni sojini proteini specifično se vežu za antitijelo. Rezultat toga je antitijelo-antigen-kompleks. U koraku ispiranja nevezane komponente se odstranjuju. Zatim se dodaje antitijelo vezano na peroksidazu (enzimski konjugat). Taj enzimski konjugat se veže za antitijelo-antigen-kompleks te se stvara antitijelo-antigen-antitijelo kompleks („sendvič“ ELISA). Supstrat/kromogen se dodaje nakon uklanjanja nevezanog enzimskog konjugata u koraku ispiranja. Vezani enzimski konjugat mijenja kromogen u plavi produkt. Dodatak stop otopine uzrokuje promjenu boje iz plave u žutu. Slijedi fotometrijsko mjerenje pri 450 nm. Apsorbancija je proporcionalna koncentraciji sojinih proteina u uzorku.

#### Priprema reagenasa

Alergen ekstrakcijski pufer – prije razrjeđivanja koncentriranog pufera potrebno je dobro otopiti sve kristale u puferu odnosno, zagrijati ga u vodenoj kupelji na 37 °C da se skroz otopi i dobro ga promiješati. Nakon toga, zagrijani koncentrirani pufer potrebno je razrijediti vodom u omjeru 1:10 (1+9) – 100 mL pufera + 900 mL vode. Razrijeđeni pufer stabilan je na temp. 2-8 °C oko 12 tjedana (~ 3 mjeseca)

Antitijelo enzimski konjugat je 11 x koncentrirani. Budući da razrijeđeni enzimski konjugat ima ograničenu stabilnost potrebno je razrijediti samo onu količinu koja nam je potrebna za analizu. Prije pipetiranja koncentrirani enzimski konjugat potrebno je pažljivo promiješati. Razrijeđuje se u omjeru 1:11 (1+10) sa destiliranom vodom – 200 µL koncentrata + 2 mL destilirane vode.

Pufer za ispiranje – prije razrjeđivanja koncentriranog pufera potrebno je dobro otopiti sve kristale u puferu odnosno, zagrijati ga u vodenoj kupelji na 37 °C da se skroz otopi i dobro ga promiješati. Nakon toga, zagrijani koncentrirani pufer potrebno je razrijediti vodom u omjeru 1:10 (1+9) – 100 mL pufera + 900 mL vode. Razrijeđeni pufer stabilan je na temp. 2-8 °C oko 4 tjedna

### *3.2.2.1. Provedba metode za određivanje koncentracije soje u mesnim proizvodima*

#### **1. Priprema uzoraka mesnih proizvoda:**

Izvaže se 1 g homogeniziranog uzorka i doda 2,5 mL ekstraktora 3 i 17,5 mL razrijeđenog i prethodno zagrijanog na 60 °C alergen ekstrakcijskog pufera. Dobro se promiješa i ekstrahira 10 min u kipućoj vodenoj kupelji. Uzorci se brzo ohlade ( u ledenoj kupelji) i centrifugiraju 10 min / 2500 rpm / 4 °C ili filtriraju. Ekstrakt se mora razrijediti u omjeru 1:5 (1+4) sa razrijeđenim alergen ekstrakcijskim puferom (100 µL ekstrakta uzorka + 400 µL alergen ekstrakcijskog pufera. Za analizu se koristi 100 µL razrijeđenog ekstrakta po jažici.

#### **2. Test procedura:**

Pripremi se mikrotitracijska ploča sa dovoljnim brojem jažica tako da standardi i uzorci budu postavljeni u duplikatima te se odredi položaj svakog od njih. Zatim se doda 100 µL otopine standarda i pripremljenih uzoraka po određenom redoslijedu u duplikatima u jažice i inkubira 10 min na sobnoj temperaturi (20-25 °C). Cjelokupni sadržaj tekućine se ukloni iz jažica te se u sve jažice doda 250 µL pufera za ispiranje i ponovno se ukloni tekućina; ispiranje je se ponavlja 3 puta.

Potom se doda 100 µL razrijeđenog enzimskog konjugata u svaku jažicu i lagano promiješa te inkubirati 10 min na sobnoj temperaturi (20-25 °C). Cjelokupni sadržaj tekućine se ukloni iz jažica, zatim se u sve jažice doda 250 µL pufera za ispiranje i ponovno se ukloni tekućina, a ispiranje je potrebno ponoviti 3 puta.

Doda se 100 µL crvenog kromogena u svaku jažicu i lagano promiješa te inkubira u mraku na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim se doda 100 µL stop otopine u svaku jažicu, ploča se lagano protrese i mjeri pri valnoj duljini od 450 nm. Očitava se unutar 10 minuta nakon dodatka stop otopine.

#### **3. Izračunavanje koncentracije analita:**

Nakon analize pristupa se određivanju koncentracije proteina soje u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke dijele se s apsorbancijom prvog odnosno nultog standarda ( $0 \mu\text{gL}^{-1}$ ) i množe se sa 100, te se dobiju postotci apsorbancije B / B0. Prema tome nulti standard je jednak 100%.

$$\frac{\text{apsorbancija standarda (ili uzorka)}}{\text{apsorbancija multog standarda}} \times 100 = \% \text{ apsorbanije}$$

Koncentracija proteina soje u uzorcima očitava se iz baždarne krivulje koja se stvara pomoću softwera kemijskog analizatora ChemWell 2910. Faktor razrjeđenja iznosi 100, međutim, već je uzet u obzir od strane proizvođača kita te se koncentracija sojinih proteina u uzorcima može direktno očitati iz baždarne krivulje.

### 3.2.3. Određivanje koncentracije proteina mlijeka u mesnim proizvodima

#### ➤ *PRINCIP METODE*

ELISA metoda provedena je prema uputama proizvođača kita RIDASCREEN®FAST Milk, R- Biopharm, Njemačka. Jažice mikrotitracijske ploče obložene su specifičnim antitijelima protiv kazeina i β-laktoglobulina. Dodatkom standardne otopine ili otopine uzorka u jažicu, prisutni mliječni proteini specifično se vežu za antitijela. U koraku ispiranja nevezane komponente se odstranjuju. Zatim se dodaje antitijelo vezano na peroksidazu. Taj enzimski konjugat se veže za Ab-Ag-kompleks. Formira se antitijelo-antigen-antitijelo kompleks („sendvič“). Sav nevezani konjugat uklanja se u koraku ispiranja. Detekcija mliječnih proteina događa se dodatkom substrats/kromogena. Enzimski konjugat konvertira kromogen u plavi produkt. Dodatak stop otopine omogućuje promjenu boje iz plave u žutu. Slijedi fotometrijsko mjerenje pri valnoj dužini od 450 nm. Apsorbancija je proporcionalna koncentraciji mliječnih proteina u uzorku. Rezultat se izražava u mg/kg mliječnih proteina.

#### Priprema reagenasa

Alergen ekstrakcijski pufer – prije razrjeđivanja koncentriranog pufera potrebno je dobro otopiti sve kristale u puferu odnosno, zagrijati ga u vodenoj kupelji na 37 °C da se skroz otopi i dobro ga promiješati. Nakon toga, zagrijani koncentrirani pufer potrebno je razrijediti vodom u omjeru 1:10 (1+9) – 100 mL pufera + 900 mL vode. Razrijeđeni pufer stabilan je na temp. 2-8 °C oko 12 tjedana (~ 3 mjeseca)

Za pripremu Alergen ekstrakcijskog pufera koji sadrži Aditiv 1 (A-AEP) potrebno je izvagati 1,35 g Aditiva 1 u staklenoj tikvici i dodati 15 mL 1M NaOH. Miješati sve dok se aditiv 1 ne otopi. Zatim u menzuru dodati 700 mL razrijeđenog alergen ekstrakcijskog pufera. Dodati 15

mL Aditiv 1 otopine miješajući konstantno, ukoliko je potrebno, ostatke Aditiv 1 otopine isprati sa razrijeđenim alergen ekstrakcijskim puferom. Potrebno je podesiti pH Aditiv 1 alergen ekstrakcijskog pufera (A-AEP) na 9 dodatkom 1 M HCl i dopuniti menzuru do 750 mL sa razrijeđenim alergen ekstrakcijskim puferom. 750 mL A-AEP je dovoljno za 45 uzoraka. Pufer se može koristiti približno 3 tjedna na sobnoj temperaturi (20-25 °C) – ne pohraniti pufer u frižideru. Za pohranu pufera koristiti potpuno čistu bocu bez prašine kako zrnca prašine ne bi pospješila kristalizaciju pufera. Ukoliko je kristaliziran, pufer je potrebno baciti.

Ekstraktor 2 je 2x koncentrirani i treba se razrijediti u omjeru 1:2 (1+1) sa destiliranom vodom (npr. 30 mL Ekstraktor 2 + 30 mL destilirane vode). Potpuno razrijeđen Ekstraktor 2 je dovoljan za analizu 45 uzora i stabilan je oko 3 mjeseca na sobnoj temperaturi (20-25 °C).

Konjugat je 11x koncentrirani. Budući da razrijeđeni konjugat je ograničene stabilnosti, samo količina trenutno potrebna u analizi se razrjeđuje. Prije pipetiranja konjugat je potrebno pažljivo protresti. Konjugat je potrebno razrijediti u omjeri 1:11 (1+10) sa konjugiranim puferom (npr. 200 µL koncentrata konjugata + 2 mL konjugiranog pufera) – dovoljno za 2 reda jažica.

Pufer za ispiranje je 10x koncentrirani. Prije upotrebe potrebno ga je razrijediti u omjeru 1:10 (1+9) sa destiliranom vodom (npr. 100 mL koncentriranog pufera sa 900 mL destilirane vode). Prije razrjeđivanja, potrebno je otopiti eventualno nastale kristale inkubiranjem pufera u vodenoj kupelji na 37 °C. Razrijeđeni pufer stabilan je na 2-8 °C 4 tjedna.

### *3.2.3.1. Provedba metode za određivanje koncentracije proteina mlijeka u mesnim proizvodima*

#### **1. Priprema uzoraka mesnih proizvoda:**

Izvaže se 1 g homogeniziranog uzorka i doda 4 mL razrijeđenog Ekstraktora 2, dobro se promiješa, začepi epruvetu/tikvicu i kuha 10 min u kupelji na 100 °C. Malo se ohladi uzorak i doda 16 mL zagrijanog (60°C) A-AEP prokuhanom uzorku. Uzorci se zatim dobro promiješaju te ekstrahiraju 10 min na 60 °C u vodenoj kupelji. Uzorci se ohlade (u ledenoj kupelji) i centrifugiraju 10 min/2500g. Supernatant se filtrira te se uzorci razrijede se u omjeru 1:5 (1+4) sa razrijeđenim Alergen ekstrakcijskim puferom bez Aditiva 1 npr. 100 µL + 400 µL. Takav razrijeđeni uzorak koristi se za analizu (100 µL).



## 2. Test procedura:

Pripremi se mikrotitracijska ploča sa dovoljnim brojem jažica tako da standardi i uzorci budu postavljeni u duplikatima te se odredi položaj svakog od njih. Zatim se doda 100  $\mu\text{L}$  otopine standarda i pripremljenih uzoraka po određenom redoslijedu u duplikatima u jažice i inkubira 10 min na sobnoj temperaturi (20-25  $^{\circ}\text{C}$ ). Cjelokupni sadržaj tekućine se ukloni iz jažica, zatim se u sve jažice se doda 250  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje i ponovno se ukloni tekućina, a ispiranje je potrebno ponoviti 3 puta.

Doda se 100  $\mu\text{L}$  razrijeđenog enzimskog konjugata u svaku jažicu i lagano promiješa te inkubira 10 min na sobnoj temperaturi (20-25  $^{\circ}\text{C}$ ). Cjelokupni sadržaj tekućine se ukloni iz jažica, zatim se u sve jažice doda 250  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje i ponovno se ukloni tekućina, a ispiranje je potrebno ponoviti 3 puta

Doda se 100  $\mu\text{L}$  crvenog kromogena u svaku jažicu i lagano promiješa te inkubira u mraku na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim se doda 100  $\mu\text{L}$  stop otopine u svaku jažicu, ploča se lagano protrese i mjeri pri valnoj duljini od 450 nm. Očitajte unutar 10 minuta nakon dodatka stop otopine.

## 3. Izračunavanje koncentracije analita:

Nakon analize pristupa se određivanju koncentracije mliječnih proteina u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke dijele se s apsorbancijom prvog odnosno nultog standarda ( $0 \mu\text{gL}^{-1}$ ) i množe se sa 100, te se dobiju postotci apsorbancije B / B0. Prema tome nulti standard je jednak 100%.

$$\frac{\text{apsorbancija standarda (ili uzorka)}}{\text{apsorbancija nultog standarda}} \cdot 100 = \% \text{ apsorbancije}$$

Koncentracija mliječnih proteina u uzorcima očitava se iz baždarne krivulje koja se stvara pomoću softwera kemijskog analizatora ChemWell 2910. Faktor razrjeđenja za uzorke iznosi 100, međutim već je uzet u obzir od strane proizvođača kita, te se koncentracija mliječnih proteina u uzorcima može direktno očitati iz baždarne krivulje.

### 3.2.4. Određivanje koncentracije gorušice u mesnim proizvodima

#### ➤ *PRINCIP METODE*

ELISA metoda provedena je prema uputama proizvođača kita RIDASCREEN®FAST Senf/Mustard, R- Biopharm, Njemačka. Princip testa je antigen-antitijelo reakcija. Jažice mikrotitracijske ploče obložene su specifičnim antitijelima protiv gorušice. Dodatkom standardne otopine ili otopine uzorka u jažicu, prisutni gorušičini proteini specifično se vežu za antitijelo. Rezultat toga je antitijelo-antigen-kompleks. U koraku ispiranja nevezane komponente se odstranjuju. Zatim se dodaje antitijelo vezano na peroksidazu (enzimski konjugat). Taj enzimski konjugat se veže za antitijelo-antigen-kompleks te se stvara antitijelo-antigen-antitijelo kompleks (sendvič ELISA). Supstrat/kromogen se dodaje nakon uklanjanja nevezanog enzimskog konjugata u koraku ispiranja. Vezani enzimski konjugat mijenja kromogen u plavi produkt. Dodatak stop otopine uzorkuje promijenu boje iz plave u žutu. Slijedi fotometrijsko mjerenje pri 450 nm. Apsorbancija je proporcionalna koncentraciji gorušice u uzorku.

#### Priprema reagenasa

RIDASCREEN® Allergen ekstrakcijski pufer – prije razrjeđivanja koncentriranog pufera potrebno je dobro otopiti sve kristale u puferu odnosno, zagrijati ga u vodenoj kupelji na 37 °C da se skroz otopi i dobro ga promiješati. Nakon toga, zagrijani koncentrirani pufer potrebno je razrijediti vodom u omjeru 1:10 (1+9) – 100 mL pufera + 900 mL vode. Razrijeđeni pufer stabilan je na temp. 2-8 °C oko 12 tjedana (~ 3 mjeseca)

RIDASCREEN® pufer za ispiranje – prije razrjeđivanja koncentriranog pufera potrebno je dobro otopiti sve kristale u puferu odnosno, zagrijati ga u vodenoj kupelji na 37 °C da se skroz otopi i dobro ga promiješati. Nakon toga, zagrijani koncentrirani pufer potrebno je razrijediti vodom u omjeru 1:10 (1+9) – 100 mL pufera + 900 mL vode. Razrijeđeni pufer stabilan je na temp. 2-8 °C oko 4 tjedna

#### *3.2.4.1. Provedba metode za određivanje koncentracije gorušice u mesnim proizvodima*

##### **1. Priprema uzoraka mesnih proizvoda:**

Izvaže se 1 g homogeniziranog uzorka i doda 20 mL razrijeđenog RIDASCREEN® Allergen ekstrakcijskog pufera (pufer mora biti prethodno ugrijan na oko 60°C). Dobro se promiješa i

ekstrahira 10 min u vodenoj kupelji na 60 °C i povremeno se promiješa. Zatim se centrifugira 10 min / 2500 rpm / 4 °C ili se filtrira. Za analizu se koristi 100 µL supernatanta ili filtrata po jažici.

## 2. Test procedura:

Pripremi se mikrotitracijska ploča sa dovoljnim brojem jažica tako da standardi i uzorci budu postavljeni u duplikatima te se odredi položaj svakog od njih. Zatim se doda 100 µL otopine standarda i pripremljenih uzoraka po određenom redoslijedu u duplikatima u jažice i inkubira 10 min na sobnoj temperaturi (20-25 °C). Cjelokupni sadržaj tekućine se ukloni iz jažica te se u sve jažice doda 250 µL pufera za ispiranje i ponovno se ukloni tekućina, a ispiranje je potrebno ponoviti 3 puta.

Doda se 100 µL enzimskog konjugata u svaku jažicu i lagano promiješa te inkubira 10 min na sobnoj temperaturi (20-25 °C). Cjelokupni sadržaj tekućine se ukloni iz jažica, zatim se u sve jažice doda 250 µL pufera za ispiranje i ponovno se ukloni tekućina, a ispiranje se ponavlja 3 puta.

Doda se 100 µL crvenkaste otopine supstrata /kromogena u svaku jažicu i lagano promiješa te inkubira u mraku na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim se doda 100 µL stop otopine u svaku jažicu, ploča se lagano protrese i mjeri pri valnoj duljini od 450 nm. Očitava se unutar 10 minuta nakon dodatka stop otopine.

## 3. Izračunavanje koncentracije analita:

Nakon analize se pristupa određivanju koncentracije gorušice u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke dijele se s apsorbancijom prvog odnosno nultog standarda (0 µg<sup>-1</sup>) i množe se sa 100, te se dobiju postotci apsorbancije B / B0. Prema tome nulti standard je jednak 100%.

$$\frac{\text{apsorbancija standarda (ili uzorka)}}{\text{apsorbancija nultog standarda}} \cdot X 100 = \% \text{ apsorbancije}$$

Koncentracija gorušice u uzorcima očitava se iz baždarne krivulje koja se stvara pomoću softwarea kemijskog analizatora ChemWell 2910. Faktor razrjeđenja za uzorke iznosi 20,

međutim već je uzet u obzir od strane proizvođača kita, te se koncentracija gorušice u uzorcima može direktno očitati iz baždarne krivulje.

### **3.2.5. Validacija ELISA metode za određivanje alergena u hrani**

Validacija analitičkih metoda postupak je kojim se dokazuje da metoda služi svrsi, a zahtijeva je zakonodavstvo, ali i analitička djelatnost. Validirane metode u najvećoj će mjeri osigurati pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Za prosudbu valjanosti odnosno prikladnosti određivanja alergena ELISA metodom najznačajniji su parametri: limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), selektivnost, ponovljivost, iskorištenje i unutarlaboratorijska obnovljivost, a način provedbe validacije, tumačenja validacijskih rezultata te njihove prihvatljivosti definiran je Pravilnikom o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (Pravilnik, 2005).

Limit detekcije/kvantifikacije najmanja je količina analita u uzorku koja se može detektirati/kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. LOQ je najniža koncentracija koja se može odrediti sa prihvatljivom preciznošću odnosno ponovljivošću. LOD i LOQ vrijednosti trebaju biti što manje, a svakako manje od najveće dopuštene ili preporučene količine za pojedini alergen (primjerice za gluten ili sulfite) ili u odnosu na neke druge preporučene količine ukoliko vrijednosti nisu definirane.

Specifičnost /selektivnost svojstvo je metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit. Metoda kojom se može određivati više komponenata istodobno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom.

Preciznost se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost pri čemu uvjeti uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu, kratko razdoblje.

Iskorištenje (*engl.* recovery) je postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka, a određuje se tijekom vrednovanja metode, ako potvrđeni referentni materijal nije dostupan. Obnovljivost unutar laboratorija (reproducibilnost) je preciznost dobivena u istom laboratoriju pod propisanim (unaprijed određenim) uvjetima (npr. metoda, materijal koji se ispituje, analitičari, okoliš) u opravdanim vremenskim razmacima.

### 3.2.5.1. Određivanje validacijskih parametara

U ovom radu, sa svrhom validacije ELISA metoda za određivanje koncentracije alergena u mesnim proizvodima određivani su limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ) i iskorištenje, a selektivnost (specifičnost) definirana je od strane proizvođača ELISA kitova.

U postupku validacije metode za određivanje **glijadina (glutena)**, određivanje LOD provedeno je na način da su devet različitih matriksa koje ne sadrže glijadin (sirup od malina, kukuruz, zob, heljdino brašno, kobasice, kukuruz, riža, tajlandska riža i indijska riža) ekstrahirana po 10 puta te je mjerenje provedeno u duplikatima. Nakon provedenog analitičkog postupka, određena je srednja vrijednost koncentracija glijadina te standardna devijacija. LOD ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) je jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti tri standardne devijacije istih određivanja za glijadin. LOQ ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) je jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti šest standardnih devijacija istih određivanja za glijadin. Iskorištenje je utvrđeno obogaćivanjem uzoraka koji su pripremani po uputi proizvođača kita RIDASCREEN®GLIADIN ekstrahiranih sa „koktel“ otopinom, te je utvrđen omjer teoretske i dobivene koncentracije gliadina (glutena). Metoda je specifična jer monoklonsko antitijelo R5 iz kita RIDASCREEN®GLIADIN reagira sa svim frakcijama gliadina iz pšenice i prolamina iz riže i ječma na razini od 100%. Nisu primijećene ni križne reaktivnosti sa sojom, zobi, kukuruzom, rižom, heljdom.

Određivanje LOD u postupku validacije metode za određivanje **proteina soje**, provedeno je na način da su tri različita matriksa bez soje (smjesa za kruh, čokolada, kobasice) ekstrahirani su po 10 puta te je mjerenje provedeno u duplikatima. LOD ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) je jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti tri standardne devijacije istih određivanja za proteine soje. Za određivanje LOQ vrijednosti tri različita uzorka obogaćena su na razinu standarda 2 ( $2,5 \text{ mgkg}^{-1}$  sojinih proteina). Svaki uzorak bio je ekstrahiran 10 puta i mjerenje je provedeno u duplo. LOQ ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) je jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti šest standardnih devijacija istih određivanja za proteine soje. Iskorištenje je utvrđeno obogaćivanjem uzoraka smjese za kruh, kečapa, margarina, kreme od lješnjaka i kobasica te je utvrđen omjer teoretske i dobivene koncentracije proteina soje. Antitijelo iz RIDASCREEN®FAST Soya specifično detektira visokoprocisane sojine proteine. U hrani, sojini proteini prisutni su u prirodnom ili denaturiranom obliku. Kako bi bili sigurni u potpunu detekciju sojinih proteina pomoću antitijela, svi uzorci moraju se kuhati 10 min na  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  kako bi se potencijalno prirodni oblik proteina preveo u denaturiranu formu.

U postupku validacije metode za određivanje **proteina mlijeka**, određivanje LOD provedeno je na način su četiri različita matriksa bez mliječnih proteina (keksi, domaća čokolada, kobasice, bijelo vino) ekstrahirana su po 10 puta te je mjerenje provedeno u duplikatima. LOD ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) je jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti tri standardne devijacije istih određivanja za proteine mlijeka, a LOQ ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) je jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti šest standardnih devijacija istih određivanja. Određivanje iskorištenja provedeno je analizom uzoraka obogaćenih sa NIST SRM 1549 (obrano mlijeko u prahu) koje sadrži 36,7% mliječnih proteina. Za određivanje iskorištenja korišteni su procesirani i neprocesirani uzorci. Obogaćeni uzorci analizirani su prema uputi proizvođača kita te je utvrđen omjer teoretske i dobivene koncentracije proteina mlijeka. Antitijela iz RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Milk kita specifično detektiraju  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\kappa$ -kazeine te  $\beta$ -laktoglobuline kravljeg, goveđeg, ovčjeg i bizonovog mlijeka.

Pri validaciji metode za određivanje **gorušice**, za određivanje LOD vrijednosti četiri različita matriksa bez gorušice (keksi, domaća čokolada, mljeveno meso, keksi) ekstrahirana su po 10 puta te je mjerenje provedeno u duplikatima. LOD ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) je jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti tri standardne devijacije istih određivanja za količinu gorušice, a LOQ ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) je jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti šest standardnih devijacija istih određivanja. Određivanje iskorištenja provedeno je analizom obogaćenih uzoraka. Uzorak za obogaćivanje sadržavao je 4 različite vrste gorušice (žuta, bijela, smeđa i crna gorušica). Uzorci su pripremani po uputi proizvođača kita RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Senf/Mustard te je utvrđen omjer teoretske i dobivene količine gorušice. Antitijela iz kita RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Senf/Mustard specifično detektiraju sve vrste gorušice (žuta, bijela, smeđa i crna gorušica).

### **3.2.6. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada rezultata provedena je pomoću Microsoft Excel programa (verzija 2016) i uključuje izračun srednje vrijednosti i standardne devijacije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Prilikom proizvodnje mesnih proizvoda koriste se različiti proteini biljnog i životinjskog porijekla s ciljem postizanja željenih tehnoloških i organoleptičkih svojstava, nutritivne vrijednosti te povećanja prinosa. Među najčešće korištenima su gluten, soja, proteini mlijeka i gorušica (Feiner, 2006). Navedeni proteini ujedno pripadaju i skupini osnovnih alergena iz hrane. Njihova primjena je zakonski regulirana ne samo radi zaštite interesa potrošača (s obzirom da se dio proteina mesa zamjenjuje navedenim proteinima što proizvođači mogu zloupotrebjavati) već radi njihovog mogućeg utjecaja njihovo zdravlje. S obzirom na navedeno, njihova prisutnost u mesnim proizvodima, ukoliko nisu jasno istaknuti na deklaraciji proizvoda, može predstavljati potencijalnu opasnost po zdravlje potrošača alergičnih na te sastojke (Petrašová i sur., 2015).

Zakonodavstvo Europske unije naglašava četrnaest specifičnih alergena o čijoj prisutnosti informacije moraju biti pružene potrošaču. To područje uređeno je Uredbom (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani donesenom od strane Europske komisije, koja osim obveznog označavanja alergena naglašava i način na koji alergeni moraju biti deklarirani na prehrambenim proizvodima (Vodič, 2015). U Republici Hrvatskoj važeći je Zakon o informiranju potrošača o hrani kojim se omogućuje provedba navedene Uredbe (Zakon, 2013).

Važeće zakonodavstvo nalaže obavezno označavanje prisutnosti alergena, no još uvijek nisu definirane granične vrijednosti koncentracije alergena u proizvodima ispod koje većina osjetljivih potrošača nije u riziku od pojave alergijskih reakcija (EFSA, 2014). Postoje različiti pristupi i istraživanja, no još uvijek nije postignut dogovor kako interpretirati te vrijednosti u kontekstu javnog zdravstva s obzirom da one ovise o različitim faktorima, osobito o osjetljivosti pojedinca (FDE, 2013). Različite granične vrijednosti su razmatrane, no zasad još uvijek nisu zakonski određene, osim za sulfite iznad  $10 \text{ mgkg}^{-1}$  i gluten iznad  $20 \text{ mgkg}^{-1}$  (Immer i Lacorn, 2009). Njemačko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju i Udruženje njemačkih alergologa predlažu granicu od  $10\text{--}100 \text{ mgkg}^{-1}$  alergene hrane ili  $1\text{--}10 \text{ mgkg}^{-1}$  proteinske frakcije alergene hrane (ovisno o njejoj alergenosti) kako bi se zaštitili osjetljivi potrošači od ozbiljnih alergijskih reakcija. Niže granice trebale bi se primjenjivati za hranu koja izaziva jake reakcije, poput kikirikija (Alves i sur., 2015).

U svrhu detekcije prisutnosti alergena u prehrambenim proizvodima nužno je provoditi analize pouzdanim analitičkim metodama čija je primjena nužna radi provjere

usklađenosti sa deklaracijama i zaštite zdravlja i interesa potrošača. Trenutno najčešće korištena metoda za detekciju alergena u hrani je ELISA čije su prednosti jednostavnost, osjetljivost i specifičnost (EFSA, 2014).

S obzirom da ne postoje granične vrijednosti za deklariranje alergena osim za gluten i sulfite, a i ne postoji standardna metoda za određivanje alergena u hrani, proizvođači imaju na izbor koje će metode koristiti. Navedene metode mogu biti samo kvalitativne ili s druge strane kvantitativne, no ne i dovoljno osjetljive u slučaju prisutnosti niskih koncentracija alergena. Proizvođači u slučaju nenamjerne prisutnosti alergena mogu upotrebljavati navod „može sadržavati“, no takve oznake ne smiju biti zamjena za dobru higijensku praksu. Potrošači ih često pogrešno interpretiraju, što ih dovodi u rizik ukoliko ignoriraju napisano ili ih s druge strane ograničava u kupnji sigurnog proizvoda (Daly, 2015). Znajući kako alergeni mogu uzrokovati reakcije u vrlo malim količinama i vrlo široku upotrebu navoda „može sadržavati“ od strane mnogih proizvođača, neki autori predlažu razmatranje same Uredbe (EU) br. 1169/2011 i strože definiranje granica za označavanje alergena u hrani (Reese i sur., 2015).

U ovom radu pomoću ELISA metode analizirala se prisutnost alergena glutena, soje, gorušice i proteina mlijeka u različitim vrstama mesnih proizvoda različitih proizvođača, zastupljenih na tržištu Republike Hrvatske. Određivanje alergena provedeno je na uzorcima pedeset i jednog proizvoda koji prema sistematizaciji propisanoj Pravilnikom o mesnim proizvodima (Pravilnik, 2012) pripadaju u pet kategorija: proizvodi od cijelih ili izrezanih komada ili mljevenog mesa (n=5), kobasice (n=35), mesni proizvodi u komadima (n=3), proizvodi od usitnjenog mesa (n=4) i čvarci (n=4).

#### **4.1. REZULTATI VALIDACIJE METODE**

Prije analize uzoraka mesnih proizvoda provedena je validacija ELISA metode određivanja koncentracije glutena, soje, proteina mlijeka i gorušice pri čemu su definirani validacijski parametri. Provedeno je određivanje sljedećih validacijskih parametara: limita detekcije, limita kvantifikacije i iskorištenja. Vrijednosti specifičnosti (selektivnosti) metoda određene su od strane proizvođača ELISA kita te su navedene u uputama svakog pojedinog kita.

Rezultati dobiveni u validacijskom postupku prikazani su tablicama 3 i 4. LOD i LOQ vrijednosti prikazane su u **tablici 3**. LOD vrijednost za gluten iznosi  $3 \text{ mgkg}^{-1}$ , za soju  $0,31 \text{ mgkg}^{-1}$ , za proteine mlijeka  $0,7 \text{ mgkg}^{-1}$  i za gorušicu  $0,22 \text{ mgkg}^{-1}$ . LOQ vrijednost za gluten iznosi  $5 \text{ mgkg}^{-1}$ , za soju LOQ  $2,50 \text{ mgkg}^{-1}$ , za proteine mlijeka  $2,5 \text{ mgkg}^{-1}$  i za gorušicu  $0,5$



mgkg<sup>-1</sup>. U **tablici 4** prikazane su vrijednosti iskorištenja koje iznose 100,4 % za gluten, 92 % za soju, 104,2 % za proteine mlijeka i 101,7 % za gorušicu.

Dobiveni rezultati validacije analitičkih metoda u skladu su sa odredbama odnosno validacijskim kriterijima definiranim Pravilnikom o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (Pravilnik, 2005) te se primijenjene metode mogu smatrati prikladnim za određivanje glutena, soje, proteina mlijeka i gorušice kao alergena u mesnim proizvodima.

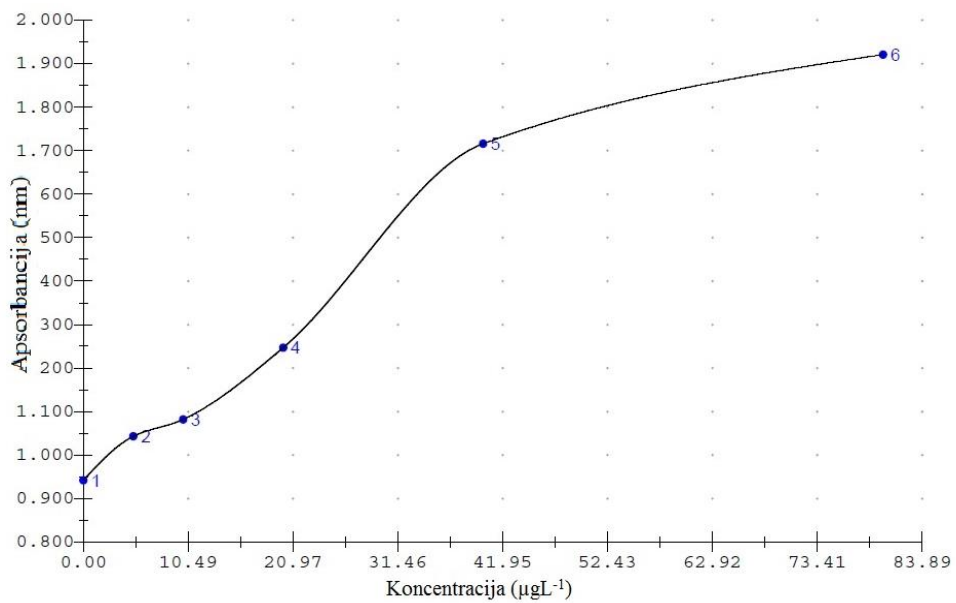
**Tablica 3.** Rezultati LOD i LOQ vrijednosti za ELISA metodu za određivanje alergena u mesnim proizvodima

| Alergen<br>LOD/<br>LOQ | <i>Gluten</i>                |                              | <i>Soja</i>                  |                              | <i>Proteini mlijeka</i>      |                              | <i>Gorušica</i>              |                              |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                        | LOD<br>(mgkg <sup>-1</sup> ) | LOQ<br>(mgkg <sup>-1</sup> ) | LOD<br>(mgkg <sup>-1</sup> ) | LOQ<br>(mgkg <sup>-1</sup> ) | LOD<br>(mgkg <sup>-1</sup> ) | LOQ<br>(mgkg <sup>-1</sup> ) | LOD<br>(mgkg <sup>-1</sup> ) | LOQ<br>(mgkg <sup>-1</sup> ) |
| Vrijednost             | 3,00                         | 5,00                         | 0,31                         | 2,50                         | 0,70                         | 2,50                         | 0,22                         | 0,50                         |

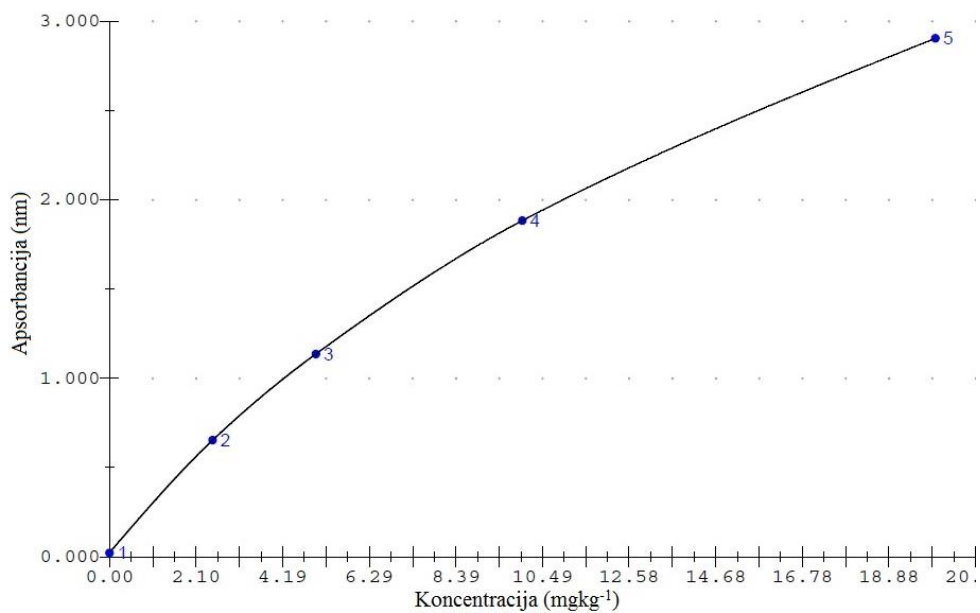
**Tablica 4.** Rezultati određivanja iskorištenja za ELISA metode za određivanje alergena u mesnim proizvodima

| Alergen                 | Mesni proizvod         | Iskorištenje (%) |
|-------------------------|------------------------|------------------|
| <i>Gluten</i>           | Kobasice               | 100,4            |
| <i>Soja</i>             | Kobasice               | 92,0             |
| <i>Proteini mlijeka</i> | Miješano mljeveno meso | 104,2            |
| <i>Gorušica</i>         | Mljeveno meso          | 101,7            |

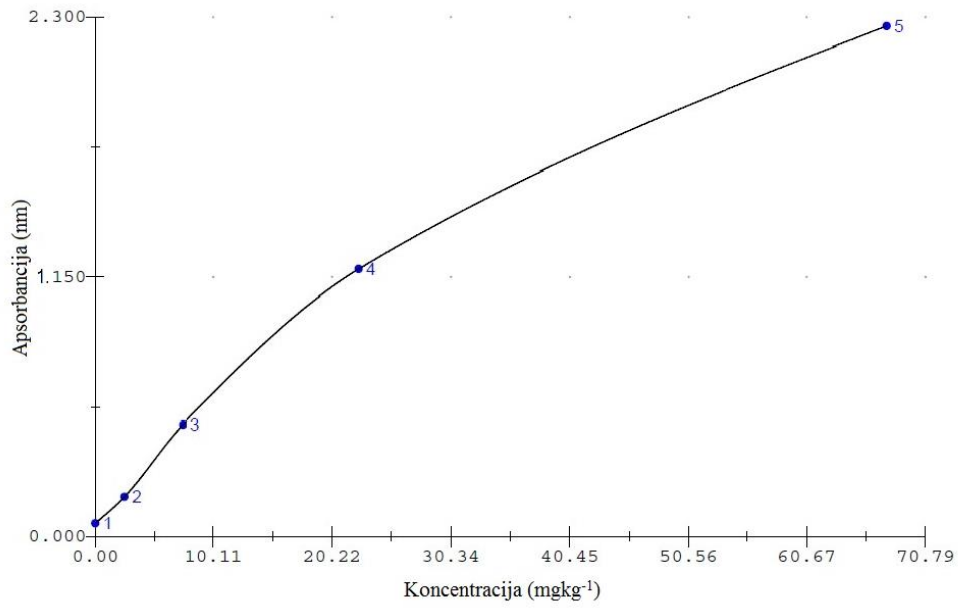
Za određivanje količine alergena u mesnim proizvodima izrađene su baždarne krivulje pomoću standarda za svaki od navedenih alergena. Baždarne krivulje prikazane su slikama 8-10.



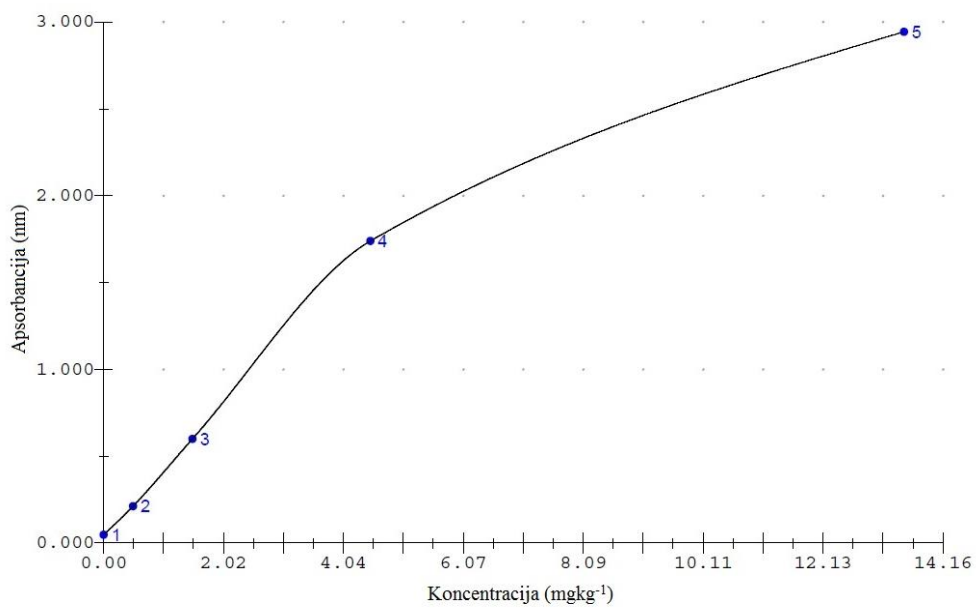
**Slika 7.** Baždarna krivulja određivanja glijadina (glutena)



**Slika 8.** Baždarna krivulja određivanja soje



**Slika 9.** Baždarna krivulja određivanja proteina mlijeka



**Slika 10.** Baždarna krivulja određivanja gorušice

## 4.2. KOLIČINA ALERGENA U MESNIM PROIZVODIMA

U tablicama 5-15 prikazani su rezultati određivanja glutena, soje, proteina mlijeka i gorušice u uzorcima mesnih proizvoda dobiveni kvantitativnom ELISA metodom. U tablicama su također prikazani i navodi vezani uz označavanje alergena koji su se nalazili na deklaracijama na proizvodima.

**Tablica 5** prikazuje količinu alergena u uzorcima čevapčića. Na deklaracijama na proizvodima istaknuto je kako proizvodi ne sadrže alergene. Alergeni nisu određeni niti u jednom uzorku. S obzirom da su ispitivani alergeni određeni ispod LOD/LOQ vrijednosti metode, vjerojatno su posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje čevapčića.

**Tablica 5.** Količina alergena u uzorcima čevapčića određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena   | Gluten (mgkg <sup>-1</sup> ) | Proteini mlijeka (mgkg <sup>-1</sup> ) | Soja (mgkg <sup>-1</sup> ) | Gorušica (mgkg <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------|---|------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| 1      | Čevapčići       | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 2      | Čevapčići       | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 3      | Čevapčići       | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOD                                   | <LOQ                       | <LOD                           |
| 4      | Čevapčići       | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOD                                   | <LOQ                       | <LOQ                           |
| 5      | Čevapčići       | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOQ                         | <LOD                                   | <LOQ                       | <LOQ                           |

**Tablica 6** prikazuje količinu alergena u uzorcima hrenovki. Gluten je određen u dvama uzorcima, u uzorku 5 (22,35 mgkg<sup>-1</sup>) gdje prisutnost nije bila deklarirana i u uzorku 6 (105,11 mgkg<sup>-1</sup>) gdje je deklarirana prisutnost glutena. Proteini mlijeka određeni su samo u uzorku 6 (211,1 mgkg<sup>-1</sup>) s time da prisutnost nije bila deklarirana. Soja je određena u pet uzoraka, u uzorku 3,5,6,7 i 8 u rasponu od 19,95 do 23 mgkg<sup>-1</sup>, a na svim uzorcima prisutnost soje je bila deklarirana. Gorušica je određena samo u uzorku 7 (12,22 mgkg<sup>-1</sup>) na kojem je označena njena moguća prisutnost. Alergeni čija je prisutnost ispod LOD/LOQ vrijednosti metode, vjerojatno su posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje.

**Tablica 6.** Količina alergena u uzorcima hrenovki određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena                              | Gluten (mgkg <sup>-1</sup> ) | Proteini mlijeka (mgkg <sup>-1</sup> ) | Soja (mgkg <sup>-1</sup> ) | Gorušica (mgkg <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------|--|------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| 1      | Hrenovke        | Nisu navedeni u popisu sastojaka.  | <LOQ                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 2      | Hrenovke        | Nisu navedeni u popisu sastojaka.  | <LOQ                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 3      | Hrenovke        | <i>U popisu sastojaka:</i><br><b>Sojin</b> izolat                              | <LOD                         | <LOD                                   | 21,4                       | <LOD                           |
| 4      | Hrenovke        | Biljne bjelančevine  | <LOD                         | <LOQ                                   | <LOQ                       | <LOD                           |
| 5      | Hrenovke        | <i>U popisu sastojaka:</i><br>Proteini <b>soje</b> . Može sadržavati gorušicu. | 22,35                        | <LOD                                   | 20,1                       | <LOD                           |
| 6      | Hrenovke        | <i>U popisu sastojaka:</i><br>Proteini <b>pšenice</b> i <b>soje</b>            | 105,11                       | 211,1                                  | 19,95                      | <LOD                           |

|   |          |  |      |      |       |       |
|---|----------|--|------|------|-------|-------|
| 7 | Hrenovke | <i>U popisu sastojaka:</i><br>Bjelančevine <b>soje</b> .<br>Može sadržavati<br>gorušicu. | <LOQ | <LOD | 22,00 | 12,22 |
| 8 | Hrenovke | <i>U popisu sastojaka:</i><br>Bjelančevine <b>soje</b> .<br>Može sadržavati<br>gorušicu. | <LOD | <LOD | 23,00 | <LOD  |

**Tablica 7** prikazuje količinu alergena u uzorcima pariških kobasica. Sva tri uzorka bila su od istog proizvođača koji na svojim proizvodima ističe kako proizvod ne sadrži alergene. Svi alergeni nalazili su se u količinama ispod LOD/LOQ vrijednosti metode. Prisutni tragovi alergena vjerojatno su posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje.

**Tablica 7.** Količina alergena u uzorcima pariških kobasica određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda  | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena   | Gluten (mgkg <sup>-1</sup> ) | Proteini mlijeka (mgkg <sup>-1</sup> ) | Soja (mgkg <sup>-1</sup> ) | Gorušica (mgkg <sup>-1</sup> ) |
|--------|------------------|---|------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| 1      | Pariška kobasica | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 2      | Pariška kobasica | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 3      | Pariška kobasica | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |

**Tablica 8** prikazuje količinu alergena u uzorcima kranjskih kobasica. Ispitivani alergeni prisutni su u uzorku 2 i to proteini mlijeka ( $4,01 \text{ mgkg}^{-1}$ ), soja ( $20,5 \text{ mgkg}^{-1}$ ) i gorušica ( $4,36 \text{ mgkg}^{-1}$ ) čija prisutnost nije bila navedena na deklaraciji proizvoda. U uzorku 5 određen je gluten čija prisutnost nije bila navedena, ali se nalazi u količinama koju nije obavezno deklarirati ( $9,33 \text{ mgkg}^{-1}$ ). Alergeni čija je prisutnost ispod LOD/LOQ vrijednosti metode, vjerojatno su posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje.

**Tablica 8.** Količina alergena u uzorcima kranjskih kobasica određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda   | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena   | Gluten ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) | Proteini mlijeka ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) | Soja ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) | Gorušica ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) |
|--------|-------------------|---|-------------------------------|---|-----------------------------|---------------------------------|
| 1      | Kranjska kobasica | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOQ                          | <LOD                                    | <LOD                        | <LOD                            |
| 2      | Kranjska kobasica | Nisu navedeni u popisu sastojaka.                   | <LOQ                          | 4,01                                    | 20,5                        | 4,36                            |
| 3      | Kranjska kobasica | Nisu navedeni u popisu sastojaka.                   | <LOD                          | <LOD                                    | <LOD                        | <LOQ                            |
| 4      | Kranjska kobasica | Nisu navedeni u popisu sastojaka.                   | <LOD                          | <LOD                                    | <LOD                        | <LOD                            |
| 5      | Kranjska kobasica | Nisu navedeni u popisu sastojaka.                   | 9,33                          | <LOD                                    | <LOD                        | <LOD                            |
| 6      | Kranjska kobasica | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                          | <LOD                                    | <LOD                        | <LOD                            |

**Tablici 9** prikazuje količinu alergena u uzorcima tirolskih kobasica. Rezultati analize pokazuju kako je od alergena prisutan samo gluten u uzorku 2 u količini od 10,04 mgkg<sup>-1</sup> čija prisutnost nije navedena, ali s obzirom da je ispod 20 mgkg<sup>-1</sup> nije ju obavezno deklarirati. Alergeni čija je prisutnost ispod LOD/LOQ vrijednosti metode, vjerojatno su posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje.

**Tablica 9.** Količina alergena u uzorcima tirolskih kobasica određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda   | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena   | Gluten (mgkg <sup>-1</sup> ) | Proteini mlijeka (mgkg <sup>-1</sup> ) | Soja (mgkg <sup>-1</sup> ) | Gorušica (mgkg <sup>-1</sup> ) |
|--------|-------------------|---|------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| 1      | Tirolska kobasica | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOQ                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 2      | Tirolska kobasica | Mogući tragovi gorušice.                            | 10,04                        | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 3      | Tirolska kobasica | Mogući tragovi celera i gorušice.                   | <LOQ                         | <LOD                                   | <LOQ                       | <LOQ                           |
| 4      | Tirolska kobasica | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOQ                                   | <LOD                       | <LOD                           |



**Tablica 10** prikazuje količinu alergena u uzorcima šunke u ovitku različitih proizvođača. Alergeni nisu određeni niti u jednom uzorku. Alergeni čija je prisutnost ispod LOD/LOQ vrijednosti metode, vjerojatno su posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje.

**Tablica 10.** Količina alergena u uzorcima šunki u ovitku određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena          | Gluten (mgkg <sup>-1</sup> ) | Proteini mlijeka (mgkg <sup>-1</sup> ) | Soja (mgkg <sup>-1</sup> ) | Gorušica (mgkg <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------|--|------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| 1      | Šunka u ovitku  | Može sadržavati tragove soje, pšeničnog glutena i mlijeka. | <LOQ                         | <LOD                                   | <LOQ                       | <LOD                           |
| 2      | Šunka u ovitku  | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene.        | <LOD                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 3      | Šunka u ovitku  | Nisu navedeni u popisu sastojaka.                          | <LOQ                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |

**Tablica 11** prikazuje količinu alergena u uzorcima pašteta. Gluten i gorušica nisu određeni niti u jednom uzorku. Proteini mlijeka određeni su u uzorcima od 1-5 u rasponu od 305,1 mgkg<sup>-1</sup> do 446,1 mgkg<sup>-1</sup>, čija je prisutnost bila deklarirana na svakom uzorku. Soja je određena u uzorku 1,3,4,5 i 6 u rasponu od 24,1 do 28 mgkg<sup>-1</sup>, a prisutnost soje bila je deklarirana na svim uzorcima. Alergeni čija je prisutnost ispod LOD/LOQ vrijednosti metode, vjerojatno su posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje.

**Tablica 11.** Količina alergena u uzorcima pašteta određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena  | Gluten (mgkg <sup>-1</sup> ) | Proteini mlijeka (mgkg <sup>-1</sup> ) | Soja (mgkg <sup>-1</sup> ) | Gorušica (mgkg <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------|--|------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| 1      | Pašteta         | Prisutne <b>sojine i mliječne</b> bjelančevine. Može sadržavati tragove žitarica koje sadrže gluten.                                       | <LOQ                         | 360,9                                  | 28                         | <LOD                           |
| 2      | Pašteta         | <i>U popisu sastojaka:</i> Bjelančevine <b>mlijeka</b> . Može sadržavati tragove <b>soje i pšeničnog glutena</b> .                         | <LOQ                         | 446,1                                  | <LOD                       | <LOD                           |
| 3      | Pašteta         | <i>U popisu sastojaka:</i> <b>Sojina</b> bjelančevina i bjelančevine <b>mlijeka</b> . Može sadržavati tragove žitarica koje sadrže gluten. | <LOQ                         | 305,1                                  | 26,4                       | <LOD                           |

|   |         |  |      |       |      |      |
|---|---------|--|------|-------|------|------|
| 4 | Pašteta | <i>U popisu sastojaka:</i><br><b>Sojina</b> bjelančevina<br>i bjelančevine<br><b>mlijeka</b> . Može<br>sadržavati tragove<br>žitarica koje sadrže<br>gluten. | <LOQ | 416,3 | 24,1 | <LOD |
| 5 | Pašteta | <i>U popisu sastojaka:</i><br><b>Sojina</b> bjelančevina<br>i bjelančevine<br><b>mlijeka</b> . Može<br>sadržavati tragove<br>žitarica koje sadrže<br>gluten. | <LOQ | 373,7 | 24,6 | <LOD |
| 6 | Pašteta | <i>U popisu sastojaka:</i><br>Proteini <b>soje</b> i sojin<br>lecitin. Može<br>sadržavati gluten,<br>jaja, mlijeko i celer u<br>tragovima.                   | <LOQ | <LOD  | 25,4 | <LOD |

**Tablica 12** prikazuje količinu alergena u uzorcima kobasica za pečenje. Gluten je određen samo u uzorku 4 ( $28,96 \text{ mgkg}^{-1}$ ) čija prisutnost nije bila deklarirana. Ostali alergeni određeni su samo u uzorku 5 i to proteini mlijeka ( $27,54 \text{ mgkg}^{-1}$ ) i soja ( $18,24 \text{ mgkg}^{-1}$ ) koji nisu deklarirani i deklarirana gorušica ( $14 \text{ mgkg}^{-1}$ ). Alergeni čija je prisutnost ispod LOD/LOQ vrijednosti metode, vjerojatno su posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje.

**Tablica 12.** Količina alergena u uzorcima kobasica za pečenje određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda     | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena   | Gluten ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) | Proteini mlijeka ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) | Soja ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) | Gorušica ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) |
|--------|---------------------|---|-------------------------------|---|-----------------------------|---------------------------------|
| 1      | Kobasica za pečenje | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOQ                          | <LOD                                    | <LOD                        | <LOD                            |
| 2      | Kobasica za pečenje | Nisu navedeni u popisu sastojaka.                   | <LOQ                          | <LOD                                    | <LOD                        | <LOD                            |
| 3      | Kobasica za pečenje | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                          | <LOD                                    | <LOD                        | <LOD                            |
| 4      | Kobasica za pečenje | Nisu navedeni u popisu sastojaka.                   | 28,96                         | <LOD                                    | <LOD                        | <LOD                            |
| 5      | Kobasica za pečenje | Sadrži gorušicu.                                    | <LOD                          | 27,54                                   | 18,24                       | 14,00                           |

**Tablica 13** prikazuje količinu alergena u uzorcima kuhane šunke. Prisutnost alergena na deklaracijama nije bila navedena. Alergeni nisu određeni niti u jednom uzorku.

**Tablica 13.** Količina alergena u uzorcima kuhane šunke određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena   | Gluten (mgkg <sup>-1</sup> ) | Proteini mlijeka (mgkg <sup>-1</sup> ) | Soja (mgkg <sup>-1</sup> ) | Gorušica (mgkg <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------|---|------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| 1      | Kuhana šunka    | Nisu navedeni u popisu sastojaka                    | <LOD                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 2      | Kuhana šunka    | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |
| 3      | Kuhana šunka    | Proizvođač ističe kako proizvod ne sadrži alergene. | <LOD                         | <LOD                                   | <LOD                       | <LOD                           |

**Tablica 14** prikazuje količinu alergena u uzorcima mesnih doručaka različitih proizvođača. Od alergena je određena samo soja u uzorcima od 1-3 u rasponu od 9,60 do 27,20 mgkg<sup>-1</sup>, a prisutnost soje bila je navedena na svim uzorcima. Alergeni čija je prisutnost ispod LOD/LOQ vrijednosti metode, vjerojatno su posljedica križne kontaminacije prilikom proizvodnje.

**Tablica 14.** Količina alergena u uzorcima mesnih doručaka određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena  | Gluten (mgkg <sup>-1</sup> ) | Proteini mlijeka (mgkg <sup>-1</sup> ) | Soja (mgkg <sup>-1</sup> ) | Gorušica (mgkg <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------|--|------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| 1      | Mesni doručak   | <i>U popisu sastojaka: Sojina</i> bjelančevina. U tragovima može sadržavati gluten i mlijeko.                          | <LOQ                         | <LOD                                   | 25,20                      | <LOD                           |
| 2      | Mesni doručak   | Sadrži <b>sojine</b> proteine. U tragovima može sadržavati mlijeko i žitarice koje sadrže gluten.                      | <LOQ                         | <LOD                                   | 27,20                      | <LOD                           |
| 3      | Mesni doručak   | <i>U popisu sastojaka: Sojina</i> bjelančevina. Može sadržavati tragove pšeničnog glutena, mlijeka, celera i gorušice. | <LOQ                         | <LOD                                   | 9,60                       | <LOD                           |
| 4      | Mesni doručak   | Može sadržavati soju, mlijeko i žitarice koje sadrže gluten u tragovima.   | <LOD                         | <LOD                                   | <LOQ                       | <LOQ                           |

**Tablica 15** prikazuje količinu alergena u uzorcima čvaraka. U svim uzorcima detektirana je samo prisutnost proteina mlijeka u rasponu od 29 do 41 mgkg<sup>-1</sup> čija je prisutnost bila deklarirana.

**Tablica 15.** Količina alergena u uzorcima čvaraka određena ELISA metodom

| Uzorak | Naziv proizvoda | Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena | Gluten (mgkg <sup>-1</sup> ) | Proteini mlijeka (mgkg <sup>-1</sup> ) | Soja (mgkg <sup>-1</sup> ) | Gorušica (mgkg <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------|---|------------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| 1      | Čvarci          | Mlijeko   | <LOQ                         | 41,00                                  | <LOQ                       | <LOD                           |
| 2      | Čvarci          | Mlijeko   | <LOD                         | 35,00                                  | <LOQ                       | <LOD                           |
| 3      | Čvarci          | Mlijeko   | <LOD                         | 29,00                                  | <LOD                       | <LOQ                           |
| 4      | Čvarci          | Mlijeko   | <LOD                         | 33,00                                  | <LOD                       | <LOD                           |

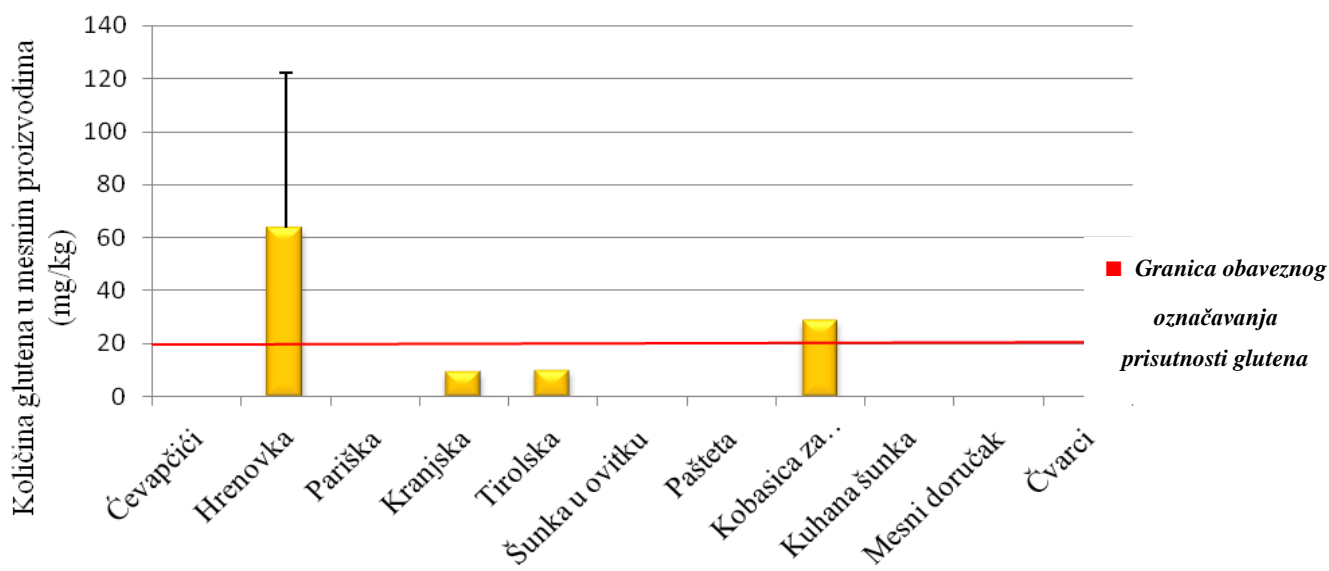
Od ukupno pedeset i jednog analiziranog proizvoda, u šest proizvoda detektirani su alergeni, a da njihova prisutnost nije bila navedena na deklaraciji. Od tri uzorka hrenovki, u jednom uzorku je prisutan gluten (22,35 mgkg<sup>-1</sup>), u drugom uzorku proteini mlijeka (211,1 mgkg<sup>-1</sup>) dok u trećem uzorku gorušica (12,22 mgkg<sup>-1</sup>). U jednom uzorku kranjske kobasice prisutni su nedeklarirani proteini mlijeka (4,01 mgkg<sup>-1</sup>), soja (20,5 mgkg<sup>-1</sup>) i gorušica (4,36 mgkg<sup>-1</sup>). U jednom uzorku kobasice za pečenje prisutan je gluten (28,96 mgkg<sup>-1</sup>), dok u drugom proteini mlijeka (27,54 mgkg<sup>-1</sup>) i soja (18,24 mgkg<sup>-1</sup>).

Uspoređujući deklaracije na proizvodima većih tvrtki mesne industrije i manjih mesnica, vidljivo je kako veće tvrtke deklariraju svoje proizvode sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011 dok mali proizvođači (mesnice) još uvijek ne označavaju svoje proizvode u potpunosti na pravilan način.

### 4.3. DESKRIPTIVNA STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka uključivala je izračun srednje vrijednosti alergena u mesnim proizvodima i njihove standardne devijacije. Rezultati su prikazani grafički slikama 11-14.

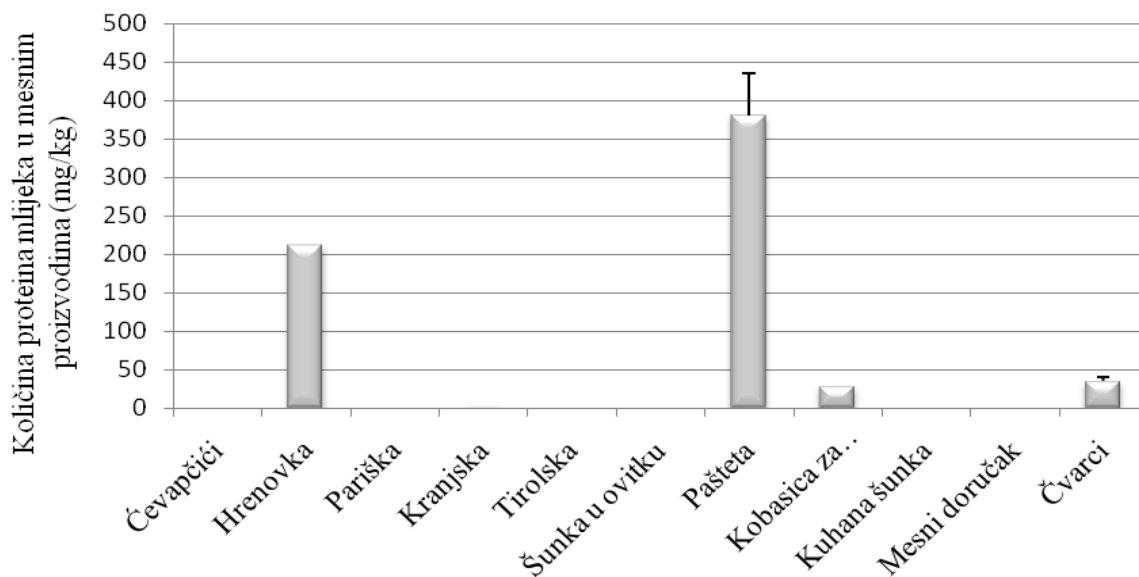
**Slika 11** prikazuje količinu glutena (srednja vrijednost  $\pm$  SD) u mesnim proizvodima. Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako se najviše glutena nalazi u hrenovkama ( $63,73 \pm 58,52$  mgkg<sup>-1</sup>), zatim u kobasicama za pečenje ( $28,96$  mgkg<sup>-1</sup>) te u tirolskoj ( $10,94$  mgkg<sup>-1</sup>) i kranjskoj ( $9,33$  mgkg<sup>-1</sup>) kobasici. Rezultati su očekivani s obzirom da se gluten često koristi pri proizvodnji kobasica jer dodatkom glutena dolazi do povećanja sposobnosti vezanja vode (SVV) i mogućnosti emulzije masti što je izrazito bitno za tu vrstu proizvoda (Feiner, 2006).



**Slika 11.** Količina glutena (srednja vrijednost  $\pm$  SD) u mesnim proizvodima

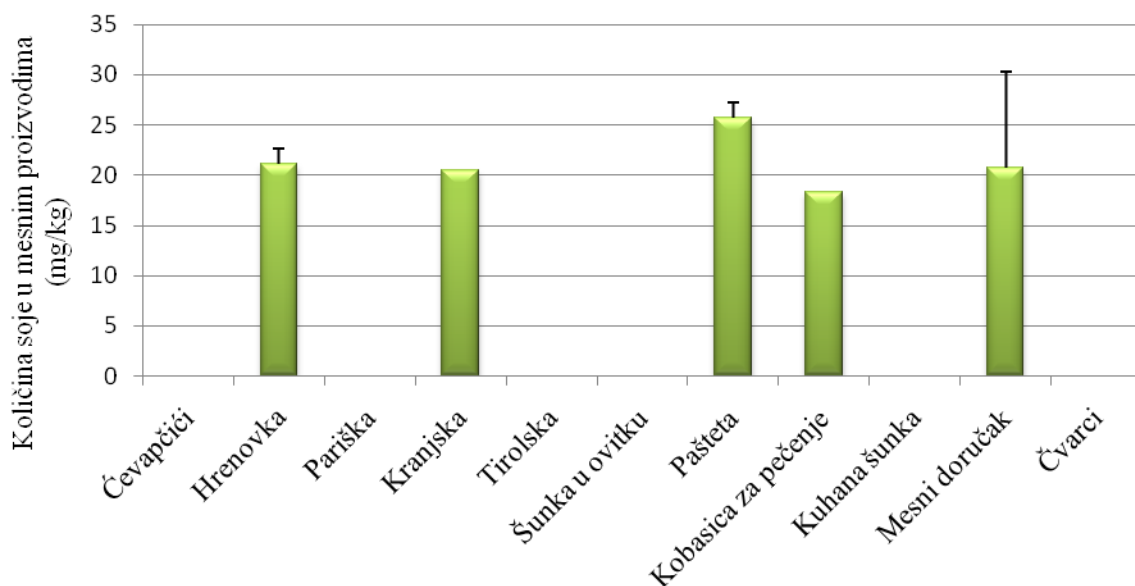
**Slika 12** prikazuje količinu proteina mlijeka (srednja vrijednost  $\pm$  SD) u mesnim proizvodima. Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako se najviše proteina mlijeka nalazi u paštetama ( $380,42 \pm 54,08$  mgkg<sup>-1</sup>), zatim u hrenovkama ( $211,1$  mgkg<sup>-1</sup>), čvarcima ( $34,5 \pm 5$  mgkg<sup>-1</sup>), kobasicama za pečenje ( $27,54$  mgkg<sup>-1</sup>) i kranjskim kobasicama ( $4,01$  mgkg<sup>-1</sup>). Rezultati su očekivani jer proteini mlijeka pozitivno utječu na sočnost, sposobnost stvaranja gela i okus mesnih proizvoda. Imaju odličnu sposobnost emulgiranja masti koje su stabilne čak i prilikom toplinskih tretmana pri visokim temperaturama (sterilizacija), što je važno za proizvode poput paštete (Feiner, 2006).





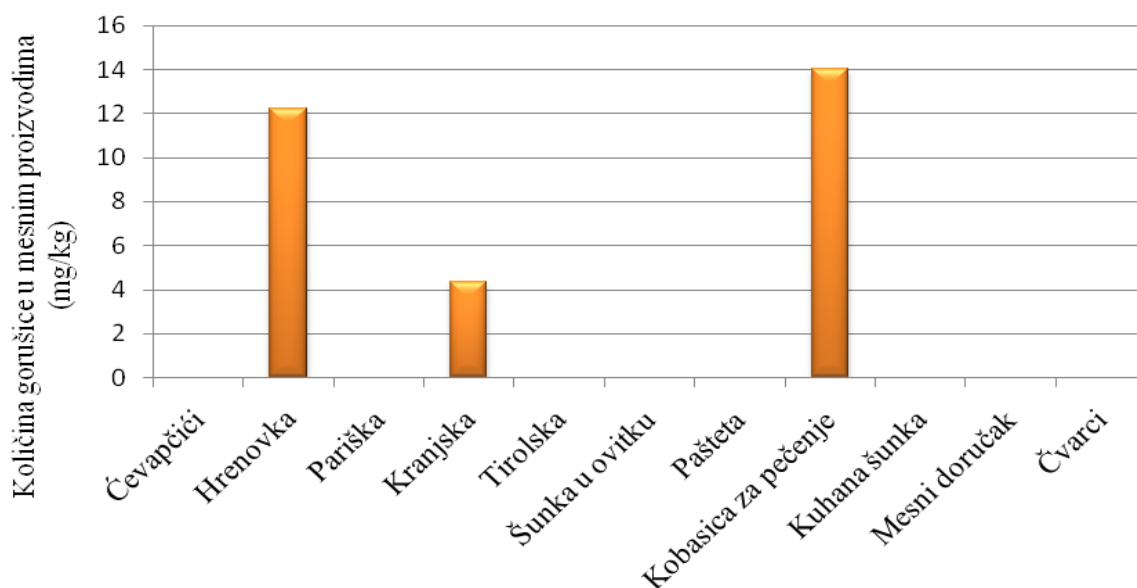
**Slika 12.** Količina proteina mlijeka (srednja vrijednost  $\pm$  SD) u mesnim proizvodima

**Slika 13** prikazuje količinu soje (srednja vrijednost  $\pm$  SD) u mesnim proizvodima. Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako se najviše soje nalazi u paštetama ( $25,7 \pm 1,55 \text{ mgkg}^{-1}$ ), nakon čega slijede hrenovke ( $21,15 \pm 1,49 \text{ mgkg}^{-1}$ ), mesni doručci ( $20,66 \pm 9,63 \text{ mgkg}^{-1}$ ), kranjske kobasice ( $20,5 \text{ mgkg}^{-1}$ ) i kobasice za pečenje ( $18,24 \text{ mgkg}^{-1}$ ). Iz rezultata je vidljivo kako je soja prisutna u proizvodima u otprilike u istim količinama. Od svih proteina koji se koriste u mesnoj industriji, proteini soje se najviše primjenjuju zbog njihove izvrsne sposobnosti vezanja vode, povećanja stabilnosti emulzija i prinosa (Feiner, 2006).



**Slika 13.** Količina soje (srednja vrijednost  $\pm$  SD) u mesnim proizvodima

**Slika 14** prikazuje količinu gorušice (srednja vrijednost) u mesnim proizvodima. Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako se najviše gorušice nalazi u kobasicama za pečenje ( $14 \text{ mgkg}^{-1}$ ), nakon čega slijede hrenovke ( $12,22 \text{ mgkg}^{-1}$ ) te kranjske kobasice ( $4,36 \text{ mgkg}^{-1}$ ). Rezultati su očekivani, s obzirom da se gorušica upotrebljava kao začim u proizvodima poput kobasica (Karwowska i sur., 2013).



**Slika 14.** Količina gorušice (srednja vrijednost) u mesnim proizvodima

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom radu analizirala se prisutnost alergena glutena, soje, gorušice i proteina mlijeka u različitim vrstama mesnih proizvoda različitih proizvođača, zastupljenih na tržištu Republike Hrvatske. Ujedno se istraživalo označavaju li proizvođači eventualno prisutne alergene u skladu sa važećom zakonskom regulativom. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Od ukupno pedeset i jednog analiziranog proizvoda, u šest proizvoda određeni su alergeni, a da njihova prisutnost nije bila navedena na deklaraciji.
2. Uspoređujući deklaracije na proizvodima većih tvrtki mesne industrije i onih manjih proizvođača, vidljivo je kako veće tvrtke deklariraju svoje proizvode sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011 dok mali proizvođači (mesnice) još uvijek ne označavaju svoje proizvode u potpunosti na pravilan način.
3. Rezultati ispitivanja pokazali su kako se najviša razina glutena nalazi u hrenovkama ( $63,73 \text{ mgkg}^{-1}$ ), proteina mlijeka u paštetama ( $380,42 \text{ mgkg}^{-1}$ ), soje također u paštetama ( $25,7 \text{ mgkg}^{-1}$ ) i gorušice u kobasicama za pečenje ( $14 \text{ mgkg}^{-1}$ ).
4. Proizvođači hrane obavezni su pravilno označavati prisutnost potencijalnih alergena u hrani. Uvođenje novog načina deklariranja omogućava osobama alergičnim i/ili preosjetljivim na određene sastojke hrane, sigurne i informirane odluke o hrani koju konzumiraju.
5. Rezultati istraživanja upućuju na važnost sustavne kontrole alergena u mesnim proizvodima u svrhu zaštite zdravlja i interesa potrošača.

## 6. LITERATURA

- Alergije podrijetlom iz hrane (2009) Hrvatska agencija za hranu, Osijek.
- Alves, R.C., Fátima Barroso M., González-García M.B., Oliviera, M.B., Delerue-Matos, C. (2016) New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56** (14), 2304-2319.
- Anonymous 1 (2014) Alergije i druge preosjetljivosti, <<http://www.msdpriurcnici.placebo.hr/msd-priurcnik/imunologija-i-alergije/alergije-i-druge-preosjetljivosti>>. Pristupljeno 15. veljače 2017.
- Anonymous 2 (2015) Sandwich ELISA test. < <http://laboratoryinfo.com/elisa/>>. Pristupljeno 17. veljače 2017.
- Anonymous 3 (2015) Competitive ELISA test. < <http://laboratoryinfo.com/elisa/>>. Pristupljeno 17. veljače 2017.
- Baumert, J.L. (2014) Detecting and Measuring Allergens in Food. U: Risk Management for Food Allergy., (Madsen, C., Crevel, R., Mills, C., Taylor, S., ured.), Elsevier Academic Press, Cambridge, str. 215-225.
- Belloque, J., García, M. C., Torre, M., Marina, M.L. (2002) Analysis of soyabean proteins in meat products: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42**, 507-532.
- Biesiekierski, J.R., Muir, J.G., Gibson, P.R. (2013) Is Gluten a Cause of Gastrointestinal Symptoms in People Without Celiac Disease? *Curr. Allergy Asthma Rep.* **13**, 631–638.
- Burks, A.W., Tang, M., Sicherer, S., Muraro, A., Eigenmann, P.A., Ebisawa, M., Fiocchi, A., Chiang, W., Beyer, K., Wood, R., Hourihane, J., Jones S.M., Lack, G., Sampson, H.A. (2012) ICON: food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**(4), 906-920.
- Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina, V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Hrvat. čas. prehrambenu tehnol. biotehnol. nutr.* **8**, 90-101.
- Crevel, R., Cochrane, S. (2014) Allergens. U: Food Safety Management: a practical guide for the food industry, (Motarjemi, Y., Lelieveld, H., ured.), Academic Press, London/Waltham/San Diego, str. 59-81.
- Crowther, J.R. (2001) The ELISA Guidebook, Humana Press, New Jersey.
- Daly, E. (2015) Improving the use of ‘may contain’ allergen labelling. *Int. Food Hyg.* **26**, 7-9.

- Day, L., Augustina, M.A., Batey, I.L., Wrigley, C.W. (2006) Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 82-90.
- Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods (2001) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rim.
- Feiner, G. (2006) Meat products handbook: Practical science and technology, CRC Press, Boca Ranton/Boston/New York/Washington, str. 89- 139.
- Gassara, F., Kouassi. A. P., Brar, S. K., Belkacemi, K. (2016) Green Alternatives to Nitrates and Nitrites in Meat-based Products-A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 2133-2148.
- Grujić, R., Grujić, S., Vujadinović, D. (2012) Funkcionalni proizvodi od mesa. *Hrana u zdravlju i bolesti.* **1**, 44-54.
- Guidance on Food Allergen Management for Food Manufacturers (2013) Food Drink Europe, Bruxelles.
- Immer, U., Lacorn, M. (2015) Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in food. U: Handbook of Food Allergen Detection and Control, (Flanagan, S., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge/Waltham/Kidlington, str.199-217.
- Karwowska, M., Dolatowski, Z.J. (2013) Antioxidant Effects of Ground Mustard Seed in Model Sausage Type Product. *Food Sci. Technol. Res.* **19**, 23-28.
- Lacorn, M., Immer, U. (2010) Standardization in allergen determination. *Accred. Qual. Assur.* **15**, 207-216.
- Lawley, R., Curtis, L., Davis, J. (2008) The Food Safety Hazard Guidebook, RSC Publishing, London, str. 349-394.
- Martinis, I. (2004) Nutritivna alergija. *Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik*, **10 (52)**, 86-88.
- Millard, P., Paine, S., O'Hagan, S., Hipkiss, J. (2015) Traceability of allergenic foods in the food chain. U: Handbook of Food Allergen Detection and Control, (Flanagan, S., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge/Waltham/Kidlington, str. 19-40.
- Mills, E.N.C., Johnson, P., Alexeev, Y., Breiteneder, H. (2009) Identification and characterization of food allergens. U: Management of Food Allergens, (Coutts, J., Fielder, R., ured.) Wiley-Blackwell, Oxford, str. 42-69.
- Mišak, Z. (2014) Gluten u prehrani: uzrok celijakije ili nešto više. *Pediatr Croat.* **58**, 175-179.

- Monaci, L., Visconti, A. (2010) Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 272-283.
- Petrášová, M., Pospiech, M., Tremlová, B., Javůrková, Z. (2015) Immunofluorescence detection of milk protein in meat products. *Potravinarstvo.* **9**, 101-105.
- Pevec, B. (2007) Homologija alergena-inhalacijski i nutritivni izvori. Knjiga sažetaka simpozija IgE posredovane reakcije između inhalacijskih alergena i njihovih homologa u hrani, Zagreb, str. 10-11.
- Poms, R.E., Klein, C.L., Anklam, E. (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* **21(1)**, 1-31.
- Pravilnik o mesnim proizvodima (2012) *Narodne novine* **131**, Zagreb.
- Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (2005) *Narodne novine* **2**, Zagreb.
- Provedbena uredba (EU) br. 828/2014 o zahtjevima za informiranje potrošača o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani (2014) Službeni list Europske Unije **228**, Strasbourg.
- RASFF Annual Report 2015 (2016) Rapid Alert System for Food and Feed, Bruxelles.
- Reese, I., Holzhauser, T., Schnadt, S., Dölle, S., Kleine-Tebbe, J., Raithel, M., Worm, M., Zuberbier, T., Vieths, S. (2015) Allergen and allergy risk assessment, allergen management, and gaps in the European Food Information Regulation (FIR). *Allergo. J. Int.* **24**, 180-184.
- Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., Baumgartner, S. (2009) Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 69–81.
- Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes (2014) European Food Safety Authority, Parma.
- Taylor, S.L., Remington, B.C., Panda, R., Goodman R.E., Baumert, J.L. (2015) Detection and control of soybeans as a food allergen. U: Handbook of Food Allergen Detection and Control, (Flanagan, S., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge/Waltham/Kidlington, str. 341-366.
- Taylor, S.L., Hefle, S.L. (2001) Food Allergies and Other Food Sensitivities. *Food Technology.* **55 (9)**, 68-83.

- Taylor, S.L., Nordlee, J.A., Niemann, L.M., Lambrecht, D.M. (2009) Allergen immunoassays—considerations for use of naturally incurred standards. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 83–92.
- Uredba (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani (2011) Službeni list Europske Unije **304**, Strasbourg.
- Vodič za informiranje potrošača o nepretpakiranoj hrani (2015) Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb.
- Ward, R. K. (2015) Introduction to food allergy. U: Handbook of Food Allergen Detection and Control, (Flanagan, S., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge/Waltham/Kidlington, str. 1-15.
- Zakon o informiranju potrošača o hrani (2013) *Narodne novine* **56**, Zagreb.