

# Određivanje alergena badema i lješnjaka u uzorcima čokolade ELISA metodom

---

Sabljić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University North / Sveučilište Sjever**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:664683>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





**Sveučilište  
Sjever**

**Završni rad br. 20/PREH/2022**

**Određivanje alergena badema i lješnjaka u uzorcima  
čokolade ELISA metodom**

**Petra Sabljic, 0336041595**



# Sveučilište Sjever

**Odjel za Prehrambenu tehnologiju**

**Završni rad br. 20/PREH/2022**

## **Određivanje alergena badema i lješnjaka u uzorcima u čokolade ELISA metodom**

**Student**

Petra Sabljic,0336041595

**Mentor**

izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj

Koprivnica, lipanj 2022. godine

# Prijava završnog rada

## Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL Odjel za prehrambenu tehnologiju

STUDIJ preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija

PRISTUPNIK Petra Sabljčić

MATIČNI BROJ 0336041595

DATUM 01.07.2022.

KOLEGIJ Osnove biokemije

NASLOV RADA Određivanje alergena badema i lješnjaka u uzorcima čokolade ELISA metodom

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Determination of almond and hazelnut allergens in chocolate samples by using the ELISA method

MENTOR Bojan Šarkanj

ZVANJE izv.prof.dr.sc.

ČLANOVI POVJERENSTVA

- Ivana Dodlek Šarkanj, pred., predsjednica
- izv.prof.dr.sc. Krunoslav Hajdek, član
- izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj, mentor
- dr.sc. Marija Kovač Tomas, pred., zamjena člana
- 

## Zadatak završnog rada

BROJ 20/PREH/2022

OPIS

Zadatak ovog rada je provjeriti prisutnost alergena badema i lješnjaka u uzorcima čokolade koji se nalaze na tržištu Republike Hrvatske, te provjeriti ispravnost deklariranih alergena na ambalaži. Određivanje alergena će se odraditi ELISA metodom, te time primijeniti znanja iz kolegija OSnove biokemije o funkcioniranju takvog imunoenzimskog testa.

ZADATAK URUČEN 1.7.2022.

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE  
SIEVER





# **Predgovor**

Cilj ovog rada bio je vidjeti da li su proizvođači čokolada iskreni na svojim deklaracijama. U fokus se stavljaju alergeni badema i lješnjaka koji moraju biti napisani na deklaracijama, u sastavu ili u mogućim tragovima. Prisutnost alergena u čokoladama dokazuje se ELISA metodom. ELISA metoda je efikasna i jednostavna metoda kojom se potvrđuje prisutnost određenih antigena.

## Sažetak

Alergijske bolesti su oduvijek bile prisutne kod ljudi i mogu izazvati jake reakcije kod pojedinaca. U današnje doba, sve više stanovništva, a pogotovo djeca obolijevaju od alergija na određenu hranu. Orašasti plodovi, među kojima su i badem i lješnjak, uzroci su teških alergijskih reakcija. Od izrazite je važnosti da svi proizvodi, koji sadrže ili mogu sadržavati alergene badema i lješnjaka, imaju deklarirane alergene da oboljeli znaju koje proizvode trebaju izbjegavati. Cilj ovog rada bio je određivanje alergena badema i lješnjaka ELISA metodom na 15 uzoraka čokolade. Na 11 uzoraka čokolade su bili navedeni uzorci tragova badema i lješnjaka, dok na 4 nisu.

Na ispitivanim uzorcima čokolade na alergene badema u potpunosti je ispoštovana deklaracija, dok na uzorcima čokolade analiziranim na alergen lješnjaka nije u potpunosti ispoštovana deklaracija i smatra se rizična za konzumaciju od strane potrošača koji pate od alergije na alergen lješnjaka.

Ključne riječi: alergija, alergija na hranu, čokolada, badem, lješnjak, ELISA metoda, zakonodavstvo

## Summary

Allergic diseases have always been present in humans and can cause strong reactions in individuals. Nowadays, more and more people, especially children, suffer from allergies to certain foods. Nuts, including almond and hazelnut, are the cause of severe allergic reactions. It is extremely important that all products, which contain or may contain almond and hazelnut allergens, have declared allergens so that sufferers know which products they should avoid. The goal of this work was to determine almond and hazelnut allergens using the ELISA method on 15 chocolate samples.

The chocolate samples tested for almond allergens fully complied with the declaration, while the chocolates samples analyzed for the hazelnut allergen did not fully comply with the declaration and are considered risky for consumption by consumers suffering from hazelnut allergy.

Key words: allergy, food allergy, chocolate, almond, hazelnut, ELISA method, legislation



## **Popis korištenih kratica**

ELISA – Imunoenzimska metoda (*eng. Enzyme – linked immunosorbent assay*)

FAO – Organizacija za prehranu i poljoprivredu (*eng. Food and Agriculture Organisation*)

LDL – Lipoproteini male gustoće (*eng. Low Density Lipoprotein*)

PBS – Fosfatna puferska otopina (*eng. Phosphate-Buffered saline*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (*eng. World Health Organization*)

# Sadržaj

1.UVOD.....	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.2. Alergije.....	2
2.2. Alergije na hranu.....	2
2.3. Badem ( <i>Amygdalus communis L.</i> ).....	3
2.4.Lješnjak ( <i>Corylus avellana</i> ).....	5
2.5.ELISA metoda.....	6
2.5.1.“Sendvič“ ELISA.....	6
2.5.2. Kompetitivna ELISA.....	7
2.6. Zakonodavstvo.....	8
3. PRAKTIČNI DIO.....	11
3.1. Materijali.....	11
3.1.1. Uzorci.....	11
3.1.2. Reagensi i priloženi materijali.....	11
3.1.3. Laboratorijska oprema.....	12
3.2. Princip testa.....	13
3.2.1. Princip „sendvič“ ELISA metode.....	13
3.2.2. Priprema uzoraka.....	13
3.2.3. Izvođenje testiranja.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	15
4.1. Rezultati.....	15
4.2. Rasprava.....	19
5.ZAKLJUČAK.....	21
6.LITERATURA.....	22
6.2. Popis slika.....	23
6.2. Popis tablica.....	24



# 1.UVOD

Danas, gotovo svaka treća osoba mora izbjegavati određene stvari (biljke, životinje, hranu,..) zbog prevelike preosjetljivosti koje one izazivaju. Bolest takve prirode naziva se alergija koju izazivaju određeni alergeni. Neki najčešći alergeni kod ljudi su bjelančevine peludi, kemijske tvari pod koje se ubrajaju antibiotici, grinje i naravno određena hrana [1]. Alergeni mogu izazvati sitne simptome, ali mogu izazvati i opasne reakcije. Za što uspješnije suzbijanje alergijske reakcije osoba treba razviti što više IgE protutijela koja pomažu kod alergijskih reakcija [2].

Alergičnost na hranu jedna je od najčešćih alergija kod stanovništva. Podaci pokazuju da čak oko 20 milijuna ljudi u Europi imaju alergiju na neku namirnicu. Unutar tih 20 milijuna 5-8% alergičara na hranu su upravo djeca. Djeca u ranoj predškolskoj dobi se uglavnom riješi alergija [3].

Badem je kultura koju su uveli Grci nekoliko stoljeća prije Krista [4]. Iz Grčke, današnji uzgoj ove kulture raširen je na gotovo sve kontinente, ali najveći uzgoj je u Italiji, Maroku, Iranu, Tunisu, Španjolskoj i SAD-u (najviše Kalifornija) [5]. Što se tiče samog uzgoja u Hrvatskoj, prema FAO u Hrvatskoj vrste badema imaju dobre biološke karakteristike i dobru otpornost na bolesti [5]. Jedan je od čestih alergena koji izazivaju alergije.

Lješnjak je kultura koja se konzumira diljem svijeta. Smatra se da potiče iz Male Azije, a danas se najviše uzgaja na području južne Europe, Sjeverne Amerike i uz obale Sredozemnog i Crnog mora [6]. U Hrvatskoj se lješnjak uzgaja i to najviše u Istri, no Istra ima dosta sušnih i jako toplih razdoblja pa je veličina jezgre manja [5]. Uz badem, lješnjak također kod velikog postotka stanovništva izaziva alergije.

Kod analitike određenih namirnica, najčešće se koriste tzv. „screening“ metode među kojima je najpoznatija i najkorištenija ELISA metoda [7]. Ova metoda razvijena je da uoči i najmanje količine određenih sastojaka u pojedinim namirnicama [8]. Prisutnost alergena se može očitati kroz promjenu boje supstrata ili očitavanje čitača [7]. ELISA metoda koristi se na više načina, ali „sendvič“ i kompetitivna ELISA su najraširenije [9].

Zbog opasnih situacija do kojih alergeni mogu dovesti ljudski organizam njihovom konzumacijom, postoje uredbe i pravilnici koji proizvođačima daju do znanja da se tvari opasne po život potrošača moraju staviti na deklaracije. Oni, osim što proizvođače tjeraju na pisanje pravilnih deklaraciji, govore im kako da budu označeni tj. kako moraju biti upečatljivi oku potencijalnog kupca tog proizvoda [10].

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.2. Alergije**

Alergija ili atopija je prejak reakcija imunološkog sustava na neopasne tvari [1]. Alergija se još naziva bolešću neposredne preosjetljivosti. Ako se preosjetljivost često pojavljuje tada osoba boluje od kronične alergije koja može dovesti do oštećenja tkiva, respiratornih problema, kardiovaskularnih problema i gastrointestinalnih problema [2]. Preosjetljivost koja se pojavljuje kod određenih osoba izazvana je specifičnim antigenima koji se nazivaju alergeni. Antigeni koji izazivaju reakcije neposredne preosjetljivosti (alergeni) jesu bjelančevine ili kemijske tvari vezane za bjelančevine [2]. Većina alergena su proteini i to glikoproteini [3]. Za sada još uvijek nije moguće predvidjeti hoće li neka bjelančevina izazvati preosjetljivost kod pojedinaca, ali postoje određene karakteristike koje povezuju najčešće alergene [2]. Te karakteristike se odnose na veličinu molekularne mase koja je slična. Uz molekularnu masu, tu je i izražena topljivost u tjelesnim tekućinama. Organizam izložen nekom alergenu može izazvati razne reakcije, ali najčešće su one koje potiču nastajanje IgE protutijela [3]. Stvaranje upravo tih protutijela, ključan je faktor koji dalje definira dozu IgE protutijela. Ljudski organizam sadrži vrste imunoglobulina koje se nazivaju izotopi. Zdrav organizam stvara normalne količine izotopa imunoglobulina IgA, IgM i IgG, dok su količine IgE protutijela izrazito niske. Za razliku od zdrave, osoba koja boluje od atopije stvara ekstremno velike količine IgE protutijela. Nastajanje IgE protutijela je od nevjerojatne nužnosti jer su oni ti koji osiguravaju prepoznavanje antigena u reakciji neposredne preosjetljivosti [2]. Alergijske reakcije imaju dvije faze, neposrednu reakciju i reakciju kasne faze. Neposredna faza je prva i karakterizira ju crvenilo i oteklina. Nakon toga, slijedi reakcija kasne faze koja se može pojaviti bez prethodno vidljive neposredne reakcije i ta reakcije svoju maksimum postiže za 24 sata.

### **2.2. Alergije na hranu**

Unos hrane neophodan je za funkcioniranje organizma, no neke vrste hrane izazivaju nepoželjne reakcije [3]. Alergije na hranu jesu reakcije neposredne preosjetljivosti na unesenu hranu [2]. Mnoge alergije na hranu nestanu s godinama, no preosjetljivost na kikiriki ili meso ribe često su dugotrajne [3]. Alergeni hrane su bjelančevine koje su u žitaricama, ribama, rakovima,

mekušcima, kikirikiju, soji, mlijeku, orašastom voću i sjemenkama sezama [11]. Kod pojave alergije veliku ulogu ima i sama genetika osobe tj. genetsko nasljeđe [11]. Osim genetike, alergije na određenu hranu ovise i o rasi i području tj. lokaciji na kojoj osoba prebiva. „U skandinavskim zemljama dominira alergija na rubu (39% djece); u SAD alergija na mlijeko (65%), čokoladu i kolače (45%), kikiriki (33%), žitarice (30%), jaja (25%), orahe (23%); u Izraelu na alergene iz voća i povrća (breskve 75%, badem 39%, sjemenke suncokreta 35%, kikiriki 30%); u Francuskoj na alergene iz bjelanjka jajeta (46%), kikiriki (40%), senf (20%), mlijeko (7,5%)“ [3]. Rasprostranjenost alergije na određenu hranu drugačija je na svakom kontinentu i zemljama, a može ovisiti i o prehrani. Alergije na hranu mogu biti blage, ali i neugodne to ovisi o pojedincu. Mogu biti neugodne i ostaviti dugotrajne posljedice, rijetko mogu imati i poguban ishod [3].

### **2.3. Badem (*Amygdalus communis* L.)**

Badem je namirnica koju koristi veliki postotak stanovništva. Da bi uzgoj badema bio uspješan važni su parametri poput temperature, vode i tla. Ovo je kultura koja zahtjeva puno svijetla i topline da bi kvaliteta bila dobra [4]. Visoki prihodi se mogu ostvariti samo ako kultura ima dovoljno padalina jer njima se prihod može povećati i do 40%, no ako padalina nema badem dobro podnosi sušu i upravo zbog toga je dobio naziv „kralj sušnih područja“ [4]. Što se tiče tla, tlo mora biti bogato hranjivim tvarima (N, P, Fe i K) i bogata humusom [4].

Badem je kultura bogata hranjivim tvarima poput proteina, vlakana, minerala, vitamina [12]. Od minerala najzastupljeniji su kalcij (Ca), bakar (Cu), magnezij (Mg), željezo (Fe) i cink (Zn) [12]. Uz minerale, badem je bogat vitaminom E koji je važno unositi u organizam jer ima antioksidativna svojstva [13]. Badem je namirnica s visokim udjelom masnoće gdje najveći udio zauzimaju mononezasićene masti i to 9g, dok polinezasićenih masti ima 3,5g u jednoj porciji [13]. Jedna porcija badema teži oko 30-ak grama i ima oko 160 kalorija [15]. U jednom serviranju, može se naći 14 g masnoća, 4g vlakana, 76mg kalcija, 77mg magnezija, 7mg vitamina E i još puno hranjivih tvari.



Slika 2.2. Bademova jezgra [29]

Badem je zbog svojih nutritivnih vrijednosti kultura koja može pomoći kod određenih zdravstvenih tegoba. Redovita konzumacija badema može smanjiti rizik od bolesti kardiovaskularnog sustava [13]. Mnoga istraživanja su dala rezultate da bademi mogu smanjiti LDL kolesterol. LDL (lipoproteini male gustoće) je kolesterol koji je zaslužan za začepljenje krvnih žila i iz toga razloga nosi naziv „loš kolesterol“ [16]. Uz sve to može smanjiti rizik od dijabetesa i odličan je za probavni sustav [13].

Badem se ubraja u skupinu orašastih plodova, unutar te skupine postoje mnoge vrste koje izazivaju alergije. Među njima je i badem. Badem je kultura koja se koristi za mnoge namirnice poput čokolada, raznih deserata, mlijeko od badema, dodaje se u razne salate i pahuljice [17]. Prvi simptomi kod alergičara mogu se pojaviti nekoliko minuta nakon unosa badema u organizam [17]. Prvi simptom može biti osip ili anafilaksija (teška alergijska reakcija opasna po život), naravno to ovisi o pojedincu [17]. Istraživanja su pokazala da alergije na bademe i na druge orašaste plodove imaju jako veliki postotak anafilakcijskih slučajeva [17]. Osim osipa i anafilaksije mogu se pojaviti i drugi simptomi poput svrbež oko očiju, u grlu i na koži, tegobe respiratornog sustava, proljeva, bolova u abdomenu, grčeva i tegoba kod gutanja [17]. Od velike je važnosti znati kako postupiti u slučajevima unosa badema u organizam. Alergičari trebaju izbjegavati bademe i sve proizvode sa njima, a za slučajeve nenamjernog unosa trebaju imati uz sebe EpiPen (automatska injekcija adrenalina kod teških alergijskih reakcija) [18]. Zdrave osobe koje zadobiju neke od navedenih simptoma kod konzumacije badema trebaju odmah otići na hitnu i kasnije obaviti alergološko testiranje radi potvrde na badem i potencijalno druge namirnice ) [18]. Glavni skladišni protein badema je amandin. Ima 8 prirodnih alergena badema (*Prunus dulcis* ) od kojih su 4 svrstani u popis alergena WHO – IUIS – a (Pru du 3, Pru du 4, Pru du 5 i Pru du 6 – amandin) [19].

## 2.4.Lješnjak (*Corylus avellana*)

Lješnjak je plod lijeske, grm ili drvo, koji je unutar čvrste ljuske [6]. Postoje mnoge sorte ove kulture, ali dvije najčešće uzgajane sorte su Rimski i Istarski duguljasti lješnjak. Ljeska je biljka koja ne uspijeva u sušnim područjima, upravo zbog toga zahtjeva veliku vlažnost [6]. Važna stavka kod uzgoja ove biljke je tlo. Tlo mora biti obogaćeno mineralnim i hranjivim tvarima, ne bi smjelo biti kiselo i lužnato (pH 5-8) i mora biti vlažno [6].



*Slika 2.4. Prikaz lijeske i nezrelog ploda [30]*

Kao i ostali orašasti plodovi, lješnjak je izrazito nutritivna namirnica. Sadrži masnoće, ugljikohidrate, vlakna, proteine, minerale i vitamine. Najviši postotak tvari zauzimaju masnoće i to mononezasićene masnoće [14]. U nešto manjoj količini sadrži i polinezasićene masnoće [14]. U jednom serviranju (oko 30-ak g) lješnjak pruža oko 4 g proteina [14]. Od vitamina sadrži vitamin E i vitamin B6 i B9 u nešto manjim količinama, a od minerala magnezij, bakar, fosfor, cink, željezo i kalij [14]. Lješnjak je kalorična namirnica jer u jednoj porciji sadrži oko 180 kalorija [14].

Zbog svojeg nutritivnog sastava smatra se da ima pozitivan učinak na zdravlje čovjeka [14]. Preporuča se konzumirati ga jer pomaže kod pretilih osoba da smanje tjelesnu masu i dijabetičara [14]. Pruža antioksidanse, može pomoći kod snižavanja LDL kolesterola zbog nezasićenih masnih kiselina [14]. Vitamin B9 se koristi kod sprječavanja začepljenja arterija pa se smatra da pomaže i kod kardiovaskularnih oboljenja [20]. Osim konzumacije kod tegoba i oboljenja, konzumacija lješnjaka jača memoriju i potiče rad mozga [20].

Lješnjak izaziva jednu od najčešćih alergija na hranu. U Europi i SAD- u veliki postotak ljudi alergično je na lješnjak [21]. Ova alergija sve pojavljuje već u djetinjstvu pa velik broj alergičara su djeca. Simptomi mogu biti blagi pa sve do onih koji su opasni po život. Najčešći simptomi su blagi osip, oticanje usana i lica, povraćanje, dijareja, respiratorne tegobe [21]. Teži oblici alergije mogu dovesti i do anafilaktičkog šoka [21]. Lješnjak je popularna namirnica u



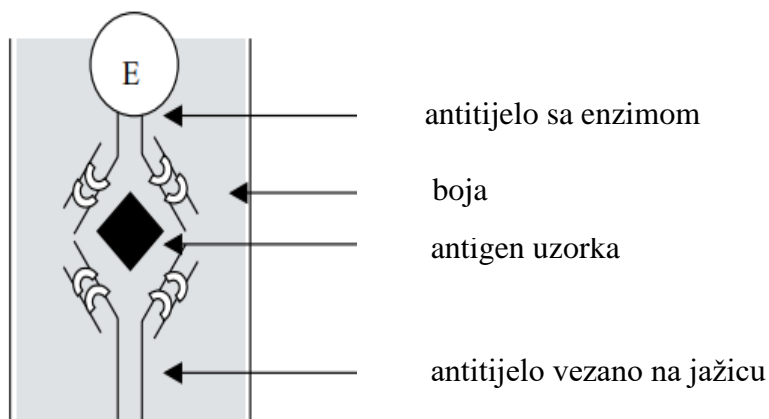
prehrambenoj industriji. Upravo zbog toga alergičari ne bi trebali unositi lješnjake u svoj organizam kao ni proizvode od njih ili sa njima u sastavu [21]. U slučaju unosa alergena u organizam osoba treba otići na hitnu ili upotrijebiti EpiPen (automatska injekcija adrenalina kod teških alergijskih reakcija) [21]. Ako je osoba alergična na neki od ostalih orašastih plodova preporuča se testiranja i na lješnjak i ostale da ne bi došlo do kobne situacije. Molekule alergena lješnjaka su (Kor a 1, Kor a 2, Kor a 8, Kor a 9, Kor a 10, Kor a 11, Kor a 12, Kor a 14, i Kor a TLP) [22].

## **2.5.ELISA metoda**

Potkraj 20. stoljeća, kod određivanja dijagnoza i liječenja u medicini su se upotrebljavale metode sa obilježnim antigenima [23]. Koristili su se radioimunska analiza i imunofluorescentni test. Upravo zbog negativnih strana tih analiza (visoka cijena i posebni uvjeti laboratorija za rad s radioaktivnim izotopima), nastao je novi imunoenzimski test pod nazivom ELISA (eng. Enzyme-linked immunosorbent assay) [23]. ELISA je imunoenzimski metoda kojom se određuje prisutnost i količina antigena [9]. Testom se određuje broj antigena u biološkim uzorcima (HIV infekcija, test na trudnoću) [24]. Osim u medicini, ova metoda koristi se i u analitici hrane kod određivanja alergena, mikotoksina, antibiotika ili drugih kontaminanata [9]. Ona je izrazito osjetljiva, brza, ali i sigurna metoda kojom se mogu ustanoviti niske koncentracije analita ispitivanog uzorka. Metoda se odvija na pločama sa 96 jažica, a reakcija se vidi promjenom boje supstrata [7]. Za odvijanje ELISA metode potrebno je imati površinu na koju je vezan antigen, same uzorke, konjugat koji je antigen sa vezanim enzimom, otopinu za ispiranje koja uklanja sve što se u reakciji nije vezalo, supstrat koji je zaslužan za obojenje i stop otopinu koja je odgovorna za prekid reakcije [23]. Kod utvrđivanja koncentracije analita ELISA metodom najčešće se koriste „sendvič“ ili kompetitivna ELISA [9].

### **2.5.1.“Sendvič“ ELISA**

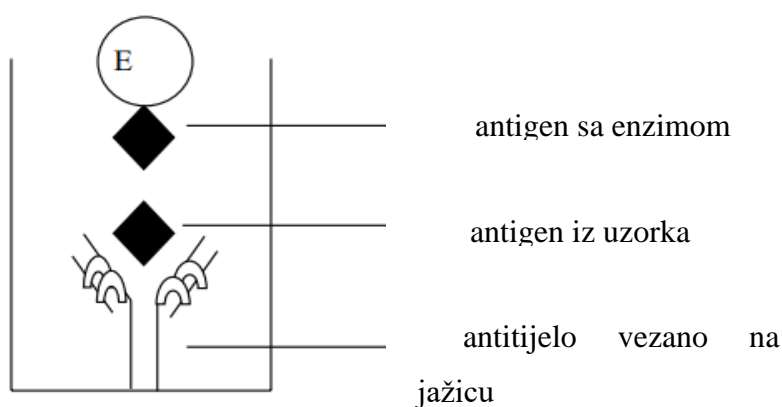
Kod imunološkog testiranja, „sendvič“ ELISA je najupotrebljivija vrsta metode [25]. Na jažice u kojima se nalazi antitijelo veže se antigen iz uzorka. Dodan antigen se ispiru unaprijed pripremljenom otopinom i zatim se dodaje konjugat koji na sebi nosi vezani enzim. Nakon konjugata, dodaje se supstrat koji reagira sa prethodnim dodanim enzimom i dolazi do obojenja [23]. Obojenje je znak da se u ispitivanom uzorku nalazi antigen, a intenzitet boje daje informaciju od količini antigena u uzorku [26].



Slika 2.5.1. Prikaz „sendvič“ metode [23]

### 2.5.2. Kompetitivna ELISA

Kompetitivna ELISA započinje već vezanim antitijelom na jažicu. U jažicu se doda uzorak, nakon kojeg se dodaje konjugat [23]. Antigen iz uzorka se veže na antitijelo koje se nalazi unutar jažice. Zbog vezanja antigena, antigen sa enzimom se ne može vezati i onda se on ispiri. Za razliku od „sendvič“ ELISE, kompetitivna metoda nema obojenje. Neće doći do obojenja jer dolazi do ispiranja konjugata i time se boja supstrata ne mijenja. Prisutnost antigena u kompetitivnoj metodi potvrđuje se bezbojnim supstratom [23].



Slika 2.5.2. Prikaz kompetitivne metode [23]

## 2.6. Zakonodavstvo

Svaka hrana koju konzumira krajnji potrošač mora biti zdravstveno ispravna i potrošač mora u svakom trenutku znati sastav hrane koju konzumira [27]. Subjekt u poslovanju s hranom ima odgovornost da potrošaču pruža točnost informacija i jamči ispravnost hrane prema svim važećim zakonima i propisima [10]. Sve informacije potrošaču nudi deklaracija koja mora navesti sastav i identitet hrane, nutritivne vrijednosti i potencijalne alergene [27].

„Kada se koriste u proizvodnji hrane i prisutni su u toj hrani, određeni sastojci ili druge tvari ili proizvodi (kao što su pomoćne tvari u procesu proizvodnje) mogu uzrokovati alergije ili netolerancije kod nekih osoba, a neke od tih alergija ili netolerancija predstavljaju opasnost za zdravlje potrošača. Važno je navesti informacije o prisutnosti prehrambenih aditiva, pomoćnih tvari u procesu proizvodnje i drugih tvari ili proizvoda za koje je znanstveno dokazano da uzrokuju alergije ili netolerancije kako bi se omogućilo potrošačima, posebno onima koji pate od alergije ili netolerancije na hranu, da budu informirani kako bi donijeli odluke koje su sigurne za njih“ [28].

„Tvari ili proizvodi koji uzrokuju alergije ili netolerancije:

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

- ❖ glukoernih sirupa na bazi pšenice, uključujući dekstrozu (1);
- ❖ maltodekstrina na bazi pšenice (1);
- ❖ glukoernih sirupa na bazi ječma;
- ❖ žitarica koje se upotrebljavaju za proizvodnju alkoholnih destilata, uključujući etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla.

2. Rakovi i proizvodi od rakova.

3. Jaja i proizvodi od jaja.

4. Riba i riblji proizvodi, osim:

- ❖ riblje želatine koja se koristi kao nosač za vitamine i karotenoide;
- ❖ riblje želatine ili ribljeg mjehura koji se upotrebljavaju kao sredstvo za bistrenje piva i vina.

5. Kikiriki i proizvodi od kikirikija.

6. Zrna soje i proizvodi od soje, osim:

- ❖ potpuno rafiniranog sojinog ulja i masti (1);

- ❖ prirodnih miješanih tokoferola (E306), prirodnog D-alfa tokoferola, prirodnog D-alfa tokoferol acetata i prirodnog D-alfa tokoferol sukcinata od soje;
- ❖ biljnih fitosterola i fitosterol estera od sojinog ulja;
- ❖ biljnog stanol estera proizvedenog od biljnih sterola dobivenih od sojinog ulja.

7. Mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući laktozu), osim:

- ❖ sirutke koja se upotrebljava za proizvodnju alkoholnih destilata, uključujući etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla;
- ❖ laktitola.

8. Orašasto voće, tj. bademi (*Amygdalus communis* L.), lješnjaci (*Corylus avellana*), orasi (*Juglans regia*), indijski oraščići (*Anacardium occidentale*), pekan orasi (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), brazilski orasi (*Bertholletia excelsa*), pistacije (*Pistacia vera*), makadamije ili kvinslandski orasi (*Macadamia ternifolia*) te njihovi proizvodi, osim orašastog voća koje se upotrebljava za proizvodnju alkoholnih destilata, uključujući etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla.

9. Celer i njegovi proizvodi.

10. Gorušica i proizvodi od gorušice .

11. Sjeme sezama i proizvodi od sjemena sezama.

12. Sumporni dioksid i sulfiti pri koncentracijama većim od 10 mg/kg ili 10 mg/L računati kao ukupni SO<sub>2</sub>, koji su u proizvodima pripremljenim za konzumaciju ili rekonstituiranim u skladu s uputama proizvođača.

13. Lupina i proizvodi od lupine.

14. Mekušci i proizvodi od mekušaca “. [28]

„Tvari ili proizvodi navedeni u Prilogu I. moraju ispunjavati sljedeće zahtjeve: moraju biti navedeni u popisu sastojaka u skladu s pravilima utvrđenima u članku 18. stavku 1. s jasnom uputom na naziv tvari ili proizvoda kako su navedeni u Prilogu II.; i naziv tvari ili proizvoda, kako su navedeni u Prilogu II., treba biti naglašen uporabom vrste pisma koje se jasno razlikuje od vrste pisma kojim je pisan ostatak popisa sastojaka, na primjer različitim slovima, stilovima ili bojama u pozadini“. [28]

Primjer 1: **lješnjak**

Primjer 2: lješnjak

Primjer 3: lješnjak

Primjer 4: lješnjak

Primjer 5: LJEŠNJAK

Primjer 6: lješnjak

*Slika 2.6.1. Prikaz pravilnog označavanja alergena na deklaraciji [31]*

## 3. PRAKTIČNI DIO

### 3.1. Materijali

Uzorci su odabrani metodom slučajnog uzorkovanja. Kupljeni su u Republici Hrvatskoj u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji početkom travnja 2022. godine. Završni rad je odrađen u Kemijskom i senzoričkom laboratoriju Koestlin d.d., Tvornica keksa i vafla Bjelovar.

#### 3.1.1. Uzorci

Za potrebe ovog istraživanja upotrijebljeno je 15 različitih uzoraka čokolade. Svi korišteni uzorci dolaze od različitih proizvođača. Uzorci su nasumično označeni od 1 do 15. Prvih 11 uzoraka imalo je deklarirane tragove badema i lješnjaka, dok zadnja 4 nisu.



*Slika 3.1.1. Usitnjeni uzorci čokolada*

#### 3.1.2. Reagensi i priloženi materijali

Određivanje alergena se provodilo pomoću Veratox – kvantitativnog testa za određivanje alergena badema i lješnjaka. Test se morao napraviti do isteka valjanosti i morao je biti pohranjen na temperaturama od 2-8°C.

Materijal:

1. 48 mikro-jažica obloženih protutijelima,
2. 48 crvenih mikro-jažica za miješanje,
3. 5 žuto označenih bočica od 1,5 mL koje sadrže kontrolne uzorke (0, 2,5, 5,10 i 25 ppm),
4. 2 bočice označene plavom bojom (5 mL koje sadrže enzim (konjugat),
5. zeleno označena bočica sa K-blue supstrata od 24 mL,

6. crveno označena bočica sa Red Stop otopinom od 32 mL,
7. kutijica sa 10 mM PBS prahom,
8. PBS – Tween reagens za ispiranje volumena 40 mL,
9. čašica ekstrakcijskog aditiva,
10. odmjerena žličica za aditiv.



*Slika 3.1.2. Materijali Veratox testa*

### **3.1.3. Laboratorijska oprema**

Laboratorijski pribor:

1. 15 Erlenmeyerevih tikvica volumena od 250 mL,
2. menzura od 100 mL,
3. menzura od 25 mL,
4. tarionik i tučak,
5. 15 Erlenmeyerevih tikvica od 100 mL,
6. magneti,
7. termometar,
8. 2 čase volumena 1000 mL,
9. filter papir,
10. 15 ljevaka,
11. pipeta,
12. 12 kanalna pipeta,
13. nastavci za pipete,
14. boca za otopinu za ispiranje,
15. boca za ekstrakcijsku otopinu,
16. držač za jažice,
17. štoperica.

Aparati:

1. analitička vaga,
2. vodena kupelj,
3. NEOGEN Microwel Strip Reader.

## **3.2. Princip testa**

### **3.2.1. Princip „sendvič“ ELISA metode**

Određivanje alergena provodilo se ELISA metodom, točnije „sendvič“ ELISA metodom. Za navedenu metodu korištene su jažice koje sadrže protutijela i na koje se uzorak vezao. Uzorci su stavljeni u jažice redom kako su navedeni u tablicama 1. i 2. No, u prvih 5 jažica nisu se stavljali uzorci već standardne koncentracije koje su sastavni dio Veratox kita za određivanje alergena badema i lješnjaka. Standardi dolaze u koncentracija od 0, 2,5, 5, 10 i 25 ppm. One su od iznimne važnosti jer se pomoću njih dobiva baždarna krivulja standardnih otopina alergena.

### **3.2.2. Priprema uzoraka**

Uzorak koji se testira prikuplja se u skladu s propisanim tehnikama uzimanja uzoraka. Uzorak je usitnjen i promiješan prije ekstrakcije.

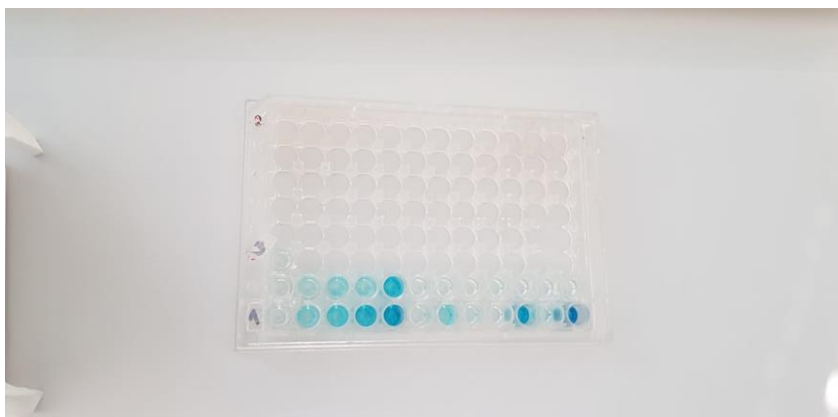
Prvi korak je priprema ekstrakcijske otopine koja se priprema na 1000 mL destilirane vode. Zatim se zagrijava na 60 °C u vodenoj kupelji. Uzorak koji se testira mora se usitniti što više moguće nakon čega se važe 5 g uzorka i stavlja u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL. U tikvicu gdje se nalazi uzorak, dodaje se odmjerna žličica ekstrakcijskog aditiva i 125 mL zagrijane ekstrakcijske otopine (kod određivanja alergena na nižem pragu detekcije dodaje se 50 mL ekstrakcijske otopine). Tikvica se prekriva aluminijskom folijom i stavlja se u vodenu kupelj, koja je zagrijana na 60 °C, na 15 minuta. Nakon 15 minuta, tikvica se vadi iz vodene kupelji da se ohladi. Dok se uzorak u tikvici ohladi, on se filtrira pomoću filter papira u manju tikvicu od 100 mL. Profiltrirani uzorak se ostavlja na sobnoj temperaturi do testiranja.



### 3.2.3. Izvođenje testiranja

Prije početka testiranja, reagensi moraju odstajati nekoliko minuta na sobnoj temperaturi.

Iz kita se uzimaju crveno označene jažice za miješanje u koji će ići svaki uzorak, ali se uzima dodatnih 5 jažica za kontrole koje se stavljaju u držač. Prvi red jažica se označava sa „1“ te se stavlja u držač. Svaki reagens se dobro promućka prije početka upotrebe. U prvih 5 crveno označenih jažica za miješanje dodaje se 150  $\mu\text{L}$  kontrola. Zatim se u ostale jažice dodaju uzorci (150  $\mu\text{L}$ ). Sljedeći korak je da se 12 kanalnom pipetom prenese 100  $\mu\text{L}$ , kontrola i uzoraka, u jažice koje su obložene protutijelima. Držač jažica zatim treba vući po podlozi 10 sekundi nakon čega se sve inkubira 10 minuta. Kada vrijeme inkubacije završi, jažice se ispiru puferom za ispiranje i taj se postupak ponavlja 5 puta. Isprane jažice se zatim okreću naopako dok se ne ukloni sva tekućina. Zatim se 12 kanalnom pipetom otpipetira 100  $\mu\text{L}$  konjugata u jažice koje se miješaju klizeći držačem 20 sekundi. Slijedi inkubacija od 10 minuta. Nakon inkubacije jažice se ispiru istim postupkom kao nakon prve inkubacije. Nakon inkubacije, 12 kanalnom pipetom se uzme 100  $\mu\text{L}$  supstrata koji se dodaje u jažice koje se miješaju 20 sekundi. Sve se inkubira 10 minuta. Sa novim nastavcima otpipetira se 100  $\mu\text{L}$  Red Stop otopine i sve se miješa 20 sekundi. Zatim se stavlja u čitač mikrotitracijskih ploča sa filterom od 650 nm. Dobiveni rezultati se očitavaju.



*Slika 3.2.2. Prikaz promjene boje u jažicama nakon dodane Red Stop otopine*

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

U ovom radu analizirano je 15 uzoraka čokolade na prisutnost alergena badema i lješnjaka. Uzorci su odabrani nasumično i poredani su od 1 do 15. Korišteni uzorci su od različitih proizvođača, različitih su vrsta čokolada i sadrže različite sastojke.

Tablica 1. Opis uzoraka sa navedenim rokom trajanja i lotom

<b>BROJ UZORKA</b>	<b>UZORAK</b>	<b>ROK TRAJANJA</b>	<b>LOT</b>
U1.	Bijela čokolada	23.01.2023.	0TM2120371
U2.	Mliječna čokolada s kokosom i mliječnim punjenjem	10.07.2022.	H3P3100917
U3.	Mliječna čokolada	10.09.2022.	H2P1100912
U4.	Tamna čokolada 70% kakao s mentom	10.09.2022.	/
U5.	Mliječna čokolada s rižom	28.11.2022.	L1271 11
U6.	Bijela čokolada s kokosom i krispyjem	15.12.2022.	L2107112
U7.	Tamna čokolada	06.2023.	1176
U8.	Mliječna čokolada	20.4.2023.	L29116A
U9.	Mliječna čokolada	21.11.2022.	L1264 11
U10.	Mliječna čokolada s alpskim mlijekom s mliječnom kremom i keksom	21.12.2022.	OHE 0315121
U11.	Mliječna čokolada s draže proizvodom	20.07.2022.	L2103192
U12.	Mliječna čokolada	27.09.2022.	L045LG - - 12
U13.	Mliječna čokolada sa alpskim mlijekom	31.01.2023.	L420249
U14.	Mliječna čokolada s mliječnim punjenjem	07.09.2022.	L025LA - - 3
U15.	Mliječna čokolada punjena kremom sa okusom jagode i jogurta	31.12.2022.	L 314949

Kod odabira uzoraka za analiziranje, važno je bilo odabrati uzorke koji su na deklaraciji imali deklarirane alergene badema i lješnjaka u tragovima ili ih nisu imali deklarirane u sastavu. Oznake uzoraka ne prate neki određeni redoslijed već su nasumično stavljeni u tablicu.

Tablica 2. Opis uzoraka i njihove deklaracije

<b>BROJ UZORKA</b>	<b>UZORAK</b>	<b>INFORMACIJE O HRANI VEZANE UZ PRISUTNOST ALERGENA BADEMA I LJEŠNJAKA * (prepisano sa deklaracija)</b>
U1.	Bijela čokolada	„Obrano <b>mljeko</b> u prahu, sirutka u prahu ( <b>mljeko</b> ), <b>mlječna</b> mast, emulgator ( <b>sojin</b> lecitin). Može sadržavati orašasto voće.“
U2.	Mlječna čokolada s kokosom i mlječnim punjenjem	„Punomasno <b>MLIJEKO</b> u prahu, obrano <b>MLIJEKO</b> u prahu, <b>LAKTOZA</b> , bezvodno <b>MLIJEČNA</b> mast, emulgatora: lecitin ( <b>SOJA</b> ). Može sadržavati tragove kikirikija, orašastog voća, žitarice koje sadrže gluten i jaja.“
U3.	Mlječna čokolada	„Punomasno <b>MLIJEKO</b> u prahu, emulgator: lecitin ( <b>SOJA</b> ). Može sadržavati tragove kikirikija, orašastog voća, žitarice koje sadrže gluten i jaja.“
U4.	Tamna čokolada 70% kakao s mentom	„Emulgator: ( <b>sojin</b> lecitin). Može sadržavati lješnjak, kikiriki, orašasto voće, mljeko, žitarice koje sadrže gluten.“
U5.	Mlječna čokolada s rižom	„ <b>Punomasno mljeko u prahu</b> , emulgator: <b>sojin lecitin</b> . Može sadržavati lješnjak, badem, kikiriki, jaja i pšenični gluten.“
U6.	Bijela čokolada s kokosom i krispyjem	„ <b>Punomasno mljeko u prahu</b> , <b>pšenično brašno</b> , <b>pšenični slad</b> , emulgator: <b>sojin lecitin</b> . Može sadržavati lješnjake, bademe, kikiriki, pistacije i jaja u tragovima.“
U7.	Tamna čokolada	„ <b>Mlječna</b> mast, emulgator: lecitin ( <b>soja</b> ), pasta od <b>kikirikija</b> . Proizvod može sadržavati orašasto voće, jaja i žitarice koje sadrže gluten.“
U8.	Mlječna čokolada	„Punomasno <b>mljeko</b> u prahu, sirutka u prahu ( <b>mljeko</b> ), emulgator <b>sojin</b> lecitin. Može sadržavati lješnjake, bademe, kikiriki i gluten.“
U9.	Mlječna čokolada	„ <b>Punomasno mljeko u prahu</b> , <b>sirotka u prahu</b> , emulgator <b>sojin lecitin</b> . Može sadržavati kikiriki, bademe, lješnjak, , jaja i gluten.“
U10.	Mlječna čokolada s alpskim mlijekom s mlječnom kremom i keksom	„ <b>Pšenično</b> brašno, obrano <b>mljeko</b> u prahu, sirutka u prahu (iz <b>mlijeka</b> ), <b>mlječna</b> mast, emulgator ( <b>sojin</b> lecitin). Može sadržavati orašasto voće.“
U11.	Mlječna čokolada s draže proizvodom	„ <b>Punomasno mljeko u prahu</b> , emulgator: <b>sojin lecitin</b> . Može sadržavati lješnjake, bademe, pistacije, kikiriki, jaja i gluten u tragovima.“
U12.	Mlječna čokolada	„ <b>MLIJEKO</b> u prahu, emulgator: lecitin ( <b>SOJA</b> ).“
U13.	Mlječna čokolada sa alpskim mlijekom	„ <b>Slatko vrhnje</b> u prahu, punomasno <b>mljeko</b> u prahu, <b>mlječna</b> mast, emulgator: lecitin ( <b>soja</b> ). Proizvod može sadržavati u tragovima kikiriki, orahe, gluten i jaja.“
U14.	Mlječna čokolada s mlječnim punjenjem	„Punomasno <b>MLIJEKO</b> u prahu, emulgato: lecitin ( <b>SOJA</b> ), obrano <b>MLIJEKO</b> u prahu, ekspanzirane žitarice ( <b>JEČAM</b> , <b>PŠENICA</b> , <b>PŠENICA</b> (pir)), bezvodna <b>MLIJEČNA</b> mast, emulgator: lecitin <b>SOJA</b> .“

U15.	Mliječna čokolada punjena kremom sa okusom jagode i jogurta	„Jogurt u prahu od nemasnog <u>mlijeka</u> , <u>slatko vrhnje</u> u prahu, punomasno <u>mlijeko</u> u prahu, <u>mliječna mast</u> , emulgator: lecitin ( <u>soja</u> ). Proizvod može sadržavati u tragovima kikiriki, orahe, gluten i jaja.“
------	---	---

Uzorci označeni do broja 11 su uzorci koji su imali deklarirane tragove alergena badema i lješnjaka, analize alergena su rađene na opsegu kvantifikacije 2,5 – 25 ppm. Uzorci označeni od 12-15 nemaju navedene tragove spomenutih alergena i rađeni su na opsegu kvantifikacije 1 – 10 ppm.

Tablica 3. Udio alergena badema u uzorcima

<b>BROJ UZORKA</b>	<b>OPSEG KVANTIFIKACIJE [mg/kg (ppm)]</b>	<b>UDIO ALERGENA BADEMA [mg/kg (ppm)]</b>
U1.	2,5 - 25	<2,5
U2.	2,5 - 25	2,9
U3.	2,5 – 25	<2,5
U4.	2,5 - 25	<2,5
U5.	2,5 - 25	24,3
U6.	2,5 - 25	<2,5
U7.	2,5 - 25	<2,5
U8.	2,5 - 25	<2,5
U9.	2,5 - 25	<2,5
U10.	2,5 - 25	<2,5
U11.	2,5 - 25	10,6
U12.	1- 10	<1
U13.	1- 10	<1
U14.	1 – 10	<1
U15.	1 - 10	<1

Iz tablice 3. vidimo da ni jedan uzorak čokolade koji su imali deklarirane tragove badema ne sadrži udio alergena badema veći od 25 ppm.

Osam uzoraka čokolade koji su imali deklarirane tragove badema ima rezultate manje od 2,5 ppm.

Tri uzorka čokolade koji su imali deklarirane tragove badema imaju vrijednosti alergena unutar opsega kvantifikacije 2,5-25 ppm.

Četiri uzorka čokolade, na kojima nisu deklarirani tragovi badema sadrže udio alergena manje od 1 ppm.

Tablica 4. Udio alergena lješnjaka u uzorcima

<b>BROJ UZORKA</b>	<b>OPSEG KVANTIFIKACIJE [mg/kg (ppm)]</b>	<b>UDIO ALERGENA LJEŠNJAKA [mg/kg (ppm)]</b>
U1.	2,5 - 25	<2,5
U2.	2,5 - 25	>25
U3.	2,5 – 25	>25
U4.	2,5 - 25	<2,5
U5.	2,5 - 25	>25
U6.	2,5 - 25	7,2
U7.	2,5 - 25	<2,5
U8.	2,5 - 25	>25
U9.	2,5 - 25	24,3
U10.	2,5 - 25	> 25
U11.	2,5 - 25	> 25
U12.	1-10	<1
U13.	1-10 / 2,5-25	>25
U14.	1 – 10	<1
U15.	1 – 10 / 2,5 -25	>25

U tablici 4. navedeni su rezultati analize tragova lješnjaka na uzorcima čokolade. Osam uzoraka čokolade ima vrijednosti alergena lješnjaka veće od 25 ppm, od toga šest uzoraka ima navedene tragove lješnjaka na deklaraciji i dva uzorka nemaju navedene tragove lješnjaka na deklaraciji.

Tri uzorka čokolade koji su imali deklarirane tragove lješnjaka ima rezultate analize manje od 2,5 ppm.

Dva uzorka čokolade koji su imali deklarirane tragove lješnjaka imaju vrijednosti alergena unutar opsega kvantifikacije 2,5-25 ppm

Dva uzorka čokolade, na kojima nisu deklarirani tragovi lješnjaka, sadrže udio alergena manje od 1 ppm.

## **4.2. Rasprava**

Analizirano je 15 uzoraka čokolade, odabrano metodom slučajnih uzoraka sa police trgovina i analizirano na alergen badema i lješnjaka. Navedene tragove alergena badema i lješnjaka na deklaraciji imalo je 11 uzoraka čokolade dok su preostala 4 uzorka čokolade bez deklariranih tragova alergena badema i lješnjaka.

Proizvođač ili subjekt u poslovanju s hranom dužan je informirati potrošače o prisutnosti pojedinih alergena u gotovom proizvodu koje stavlja na tržište Uredbom (EU).br. 1169/2011 Europskog parlamenta i vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani. Uredbom je određeno deklariranje i navođenje alergena na ambalaži, dok vrijednosti analiza pojedinih alergena nisu definirane uredbom. Iz toga razloga proizvođači su prepušteni sami sebi, kako deklarirati prisutne alergene na ambalaži, a da navođenje alergena bude ispravno.

Za potrošače koji pate od alergije na hranu, važno je točno navođenje alergena koji su prisutni u proizvodu koji konzumiraju te da budu pravilno informirani kako bi mogli donijeti odluku koju hranu smiju konzumirati, a koju ne.

Iz navedenih razloga sve više se podiže svijest potrošača i samih proizvođača, pa se provode česta istraživanja i ispitivanja hrane koja je dostupna na tržištu. U tu svrhu je provedeno i ovo ispitivanje prisutnosti alergena badema i lješnjaka na 15 uzoraka čokolade s tržišta Republike Hrvatske, odabranih metodom slučajnog uzorka.

Iz ispitivanja može se zaključiti da ni jedan uzorak čokolade koji su imali deklarirane tragove badema, ne sadrži udio alergena badema veći od gornjeg praga opsega kvantifikacije 25 ppm, a osam uzoraka ima rezultate manje od donjeg praga opsega kvantifikacije 2,5 ppm, tri uzorka ima rezultate unutar opsega kvantifikacije 2,5-25 ppm.

Četiri uzorka čokolade, na kojima nisu deklarirani tragovi badema je udio alergena manji od 1 ppm, time je potvrđeno da nema prisutnosti alergena badema i ispoštovana je deklaracija.

Od 11 uzoraka čokolade koji su imali deklarirane tragove lješnjaka šest uzoraka ima vrijednosti alergena lješnjaka veće od gornjeg praga opsega kvantifikacije 25 ppm, analizom je potvrđeno je prisustvo alergena lješnjaka.

Tri uzoraka čokolade koji su imali deklarirane tragove lješnjaka ima rezultate analize manje od donjeg praga opsega kvantifikacije 2,5 ppm.

Dva uzorka čokolade koji su imali deklarirane tragove lješnjaka imaju vrijednosti alergena unutar opsega kvantifikacije 2,5-25 ppm, potvrđeno je prisustvo tragova alergena lješnjaka.

Četiri uzorka čokolade, na kojima nisu deklarirani tragovi lješnjaka analizom je utvrđeno da dva uzorka čokolade ima vrijednosti alergena lješnjaka veće od gornjeg praga opsega kvantifikacije 25 ppm, potvrđeno je prisustvo alergena lješnjaka i nije ispoštovana deklaracija.

Dva uzorka čokolade, na kojima nisu deklarirani tragovi lješnjaka, sadrže udio alergena manje od 1 ppm, time je potvrđena prisutnost alergena lješnjaka i ispoštovana je deklaracija.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Na ispitivanim uzorcima čokolade na alergen badema u potpunosti je ispoštovana deklaracija, bilo da se radi o deklariranim tragovima ili bez prisustva alergena badema što dokazuje da su proizvodi pouzdani za konzumaciju.
2. Na ispitivanim uzorcima čokolade na alergen lješnjaka nije u potpunosti ispoštovana deklaracija s obzirom na dobivene rezultate. Smatra se da je konzumacija ovih proizvoda rizična za populaciju potrošača koji pate od alergije na lješnjak.
3. Zakonskom regulativom ne postoji prag za definiranje prisustva alergena u gotovom proizvodu za konzumaciju.
4. Ne namjerna kontaminacija, treba se svesti na najmanju moguću mjeru, čišćenjem i organiziranjem proizvodnje u tehnološkom smislu.



## 6.LITERATURA

- [1] HZJZ: <https://www.hzjz.hr/sluzba-zdravstvena-ekologija/alergije-kad-preburno-reagira-imosni-sustav/>, dostupno 05.05.2022.
- [2] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai: Stanična i molekularna imunologija, Medicinska naklada, 8. izdanje, 2018.
- [3] R. Grujić: Alergeni u hrani – prisustvo, rizici i upravljanje u prehrambenoj industriji, Journal of Engineering & Processing Management, br. 7, 2015., str. 7-25
- [4] <https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/lijeska-13/>, dostupno 28.04.2022.
- [5] <https://www.fao.org/3/x5337e/x5337e09.htm>, dostupno 27.04.2022.
- [6] <https://www.vrtlarica.hr/ljesnjak-sadnja-uzgoj/>, dostupno 28.04.2022.
- [7] M. Runje, Ž. Cvrtila: ELISA u analitici hrane, Meso, br. 2, ožujak – travanj 2006., str. 92-95
- [8] J. Costa, P. Ansari, I. Mafra, M. Beatriz, S. Baumgartner: Development of sandwich ELISA - type system for the detection and quantification of hazelnut in model chocolates, Food Chemistry, br. 173, listopad 2014., str. 257-265
- [9] A. Butorac i sur.: Analitičke metode u forenzici hrane, Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition, br. 8, 2013., str- 90-101
- [10] S. Kolarić Kravar: Informacije o alergenima na hrani, 10. stručni skup „Funkcionalna hrana u Hrvatskoj“, Zagreb, 2017.
- [11] O. Koprivnjak: Kvaliteta, sigurnost i konzerviranje hrane, Studio TiM, Rijeka, 2014.
- [12] <https://www.almonds.com/>, dostupno 29.04.2022.
- [13] <https://www.verywellfit.com/almond-nutrition-facts-calories-and-health-benefits-4108974>, dostupno 29.04.2022.
- [14] <https://www.verywellfit.com/hazelnut-nutrition-facts-4628471>, dostupno 28.04.2022.
- [15] <https://www.livescience.com/51627-almonds-nutrition.html>, dostupno 01.05.2022.
- [16] <https://www.dietpharm.com/blog/povisen-kolesterol-kada-je-razlog-za-brigu/>, dostupno 01.05.2022.
- [17] <https://www.thermofisher.com/allergy/us/en/allergen-fact-sheets.html?allergen=almond>, dostupno 02.05.2022.
- [18] <https://www.medicalnewstoday.com/articles/327033#treatments>, dostupno 02.05.2022.
- [19] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6266711/>, dostupno 10.07.2022.
- [20] <https://hr.healthandmedicineinfo.com/fols-ure-in-der-7BR>, dostupno 02.05.2022.
- [21] <http://www.food-info.net/hr/intol/hazelnut.htm>, dostupno 02.05.2022.
- [22] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25751378/>, dostupno 10.07.2022.

[23] S. Đurišić, S. Lava, T. Petrović, S. Savić-Jevđenić, D. Lupulović: Immunoenzyme: Elisa diagnostics in veterinary medicine, Veterinarski glasnik, br. 1-2, 2003., str. 63-72

[24] C. Horlock: Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA), British Society of immunology, 2016.

Izvor:

[file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/Enzymelinked%20immunosorbent%20assay%20\(ELISA\).pdf](file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/Enzymelinked%20immunosorbent%20assay%20(ELISA).pdf), dostupno 10.07.2022.

[25] M. Besler, : Determination of Hidden Allergens in Foods by Immunoassays, Internet Symposium on Food Allergens, br. 4, 2002., str. 1-18

[26] U. Immer, M. Lacorn: Enzyme – linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in food, Handbook of Food Allergen Detection and Control, 2015., str. 199-217

[27] M. Horvatović: Imunoenzimska metoda u određivanju alergena mlijeka, Završni rad, PBF, Zagreb, 2018.

[28] UREDBA (EU) br. 1169/2011 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani, Službeni list Europske Unije, L 304/18, str. 168-213

## 6.2. Popis slika

[29] Slika 2.2. Bademova jezgra

Izvor: <https://zdravi-ducen.hr/wp-content/uploads/2018/03/BADEM.jpg>

[30] Slika 2.4. Prikaz lijeske i nezrelog ploda

Izvor: <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2015/08/lijeska-0001.jpg>

[23] Slika 2.5.1. Prikaz „sendvič“ metode

Izvor: S. Đurišić, S. Lava, T. Petrović, S. Savić-Jevđenić, D. Lupulović: Immunoenzyme: Elisa diagnostics in veterinary medicine, Veterinarski glasnik, br. 1-2, 2003., str. 63-72

[23] Slika 2.5.2. Prikaz kompetitivne metode

Izvor: S. Đurišić, S. Lava, T. Petrović, S. Savić-Jevđenić, D. Lupulović: Immunoenzyme: Elisa diagnostics in veterinary medicine, Veterinarski glasnik, br. 1-2, 2003., str. 63-72

[10] Slika 2.6.1. Prikaz pravilnog označavanja alergena na deklaraciji

Izvor: S. Kolarić Kravar: Informacije o alergenima na hrani, 10. stručni skup „Funkcionalna hrana u Hrvatskoj“, Zagreb, 2017.

[34] Slika 3.1.1. Usitnjeni uzorci čokolada

Izvor: vlastita fotografija

[35] Slika 3.1.2. Materijali Veratox testa

Izvor: vlastita fotografija

[36] Slika 3.2.2. Prikaz promjene boje u jažicama nakon dodane Red Stop otopine

Izvor: vlastita fotografija

## **6.2. Popis tablica**

[37] Tablica 1. Opis uzoraka sa navedenim rokom trajanja i lotom

[38] Tablica 2. Opis uzoraka i njihove deklaracije

[39] Tablica 3. Udio alergena badema u uzorcima

[40] Tablica 4. Udio alergena lješnjaka u uzorcima

MARKON  
ALICEBAIHO

Sveučilište  
Sjever



SVEUČILIŠTE  
SJEVER

### IZJAVA O AUTORSTVU

I

### SUGLASNOST ZA JAVNU OBJAVU

Završni/diplomski rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, PETRA SABLIJIC (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom ODREĐIVANJE ALERGENI BILJAKA I LJEŠNIKA U UZORCIMA ČOKOLADE ELISA METODOM (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:  
(upisati ime i prezime)

Petra Sabljic  
(vlastoručni potpis)

Sukladno Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Ja, PETRA SABLIJIC (ime i prezime) neopozivo izjavljujem da sam suglasan/na s javnom objavom završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom ODREĐIVANJE ALERGENI BILJAKA I LJEŠNIKA (upisati naslov) čiji sam autor/ica. U UZORCIMA ČOKOLADE ELISA METODOM

Student/ica:  
(upisati ime i prezime)

Petra Sabljic  
(vlastoručni potpis)

**8.7%**PlagScan by Turnitin Results of plagiarism analysis from 2022-07-13 10:56 UTC

Određivanje alergena badema i lješnjaka u uzorcima čokolade ELISA metodom\_BS2.docx

Date: 2022-07-13 10:53 UTC

 All sources 38
  Internet sources 27
  Organization archive 6
  Plagiarism Prevention Pool 2

<input checked="" type="checkbox"/> [0]	<a href="https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32011R1169">eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32011R1169</a>	5.2%	38 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [1]	<a href="https://repozitorij.pbf.unizg.hr/en/islandora/object/pbf:3267/datastream/PDF/view">repozitorij.pbf.unizg.hr/en/islandora/object/pbf:3267/datastream/PDF/view</a>	6.3%	41 matches 1 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/> [3]	<a href="https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_01_8_140.html">narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_01_8_140.html</a>	4.9%	32 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [4]	<a href="https://core.ac.uk/download/pdf/197898173.pdf">core.ac.uk/download/pdf/197898173.pdf</a>	3.0%	27 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [5]	<a href="https://cizinci.npi.cz/wp-content/uploads/2019/09/hr-aler.pdf">cizinci.npi.cz/wp-content/uploads/2019/09/hr-aler.pdf</a>	4.9%	28 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [6]	<a href="https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:2688/datastream/PDF/view">repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:2688/datastream/PDF/view</a>	2.1%	20 matches 1 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/> [8]	<a href="https://www.dekalform.hr/downloads/Vodic_za_oznacavanje_reklamiranje_i_prezentiranje_hrane.pdf">www.dekalform.hr/downloads/Vodic_za_oznacavanje_reklamiranje_i_prezentiranje_hrane.pdf</a>	1.6%	16 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [9]	<a href="https://www.racunovodstvo-porezi.hr/sites/default/files/casopisprivitak/ripup_11_-_2016-193.pdf">www.racunovodstvo-porezi.hr/sites/default/files/casopisprivitak/ripup_11_-_2016-193.pdf</a>	1.6%	15 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [10]	<a href="https://www.hgk.hr/documents/zahitjevi-za-informiranje-potroscaca595a343de9a25.pdf">www.hgk.hr/documents/zahitjevi-za-informiranje-potroscaca595a343de9a25.pdf</a>	0.3%	7 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [11]	<a href="https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:3466/datastream/PDF/download">repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:3466/datastream/PDF/download</a>	0.9%	10 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [12]	<a href="https://www.ktc.hr/alergeni/">www.ktc.hr/alergeni/</a>	1.5%	14 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [13]	<a href="https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2006_04_41_1399.html">narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2006_04_41_1399.html</a>	1.3%	13 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [14]	<a href="https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:255/preview">repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:255/preview</a>	1.1%	11 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [15]	<a href="https://shadowdaleraven.wordpress.com/2016/02/22/mikamanija-moras-probati-sve-recenzija-prvih-4-mjecnja-orec-karamela-i-triolada/">shadowdaleraven.wordpress.com/2016/02/22/mikamanija-moras-probati-sve-recenzija-prvih-4-mjecnja-orec-karamela-i-triolada/</a>	0.2%	7 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [16]	<a href="https://glosbe.com/hr/de/Intolerancija%20na%20hranu">glosbe.com/hr/de/Intolerancija na hranu</a>	0.0%	1 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [17]	<a href="https://core.ac.uk/download/pdf/198100864.pdf">core.ac.uk/download/pdf/198100864.pdf</a>	0.7%	5 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [18]	<a href="https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:170/datastream/PDF/view">repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:170/datastream/PDF/view</a>	0.7%	5 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [19]	from a PlagScan document dated 2021-08-31 09:03	0.6%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [20]	<a href="https://hrcak.srce.hr/file/278904">hrcak.srce.hr/file/278904</a>	0.5%	4 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [21]	<a href="https://core.ac.uk/download/pdf/197508722.pdf">core.ac.uk/download/pdf/197508722.pdf</a>	0.4%	5 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [22]	<a href="https://www.kras.hr/bih/proizvodi/cokolade/cokaa/cokaa-mlijeko">www.kras.hr/bih/proizvodi/cokolade/cokaa/cokaa-mlijeko</a>	0.1%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [23]	<a href="https://www.researchgate.net/publication/342589895_Translation_and_Translation_Analysis_of_an_Original_Scientific_Paper_from_the_Dor">www.researchgate.net/publication/342589895_Translation_and_Translation_Analysis_of_an_Original_Scientific_Paper_from_the_Dor</a>	0.3%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [24]	<a href="https://prirodasidrustvo.hr/shop/cijena/anidor-tamna-okolada-70-kakao-s-mentom-85g">prirodasidrustvo.hr/shop/cijena/anidor-tamna-okolada-70-kakao-s-mentom-85g</a>	0.1%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/> [25]	"Završni_rad_IVana_Medar.pdf" dated 2021-08-12	0.3%	1 matches

✓ [26]	 "doktorat Jasenka.docx" dated 2020-01-19 <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.2%</span> 2 matches
✓ [27]	 core.ac.uk/download/pdf/197897014.pdf <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.2%</span> 1 matches
✓ [28]	 "Laktoza u mlijeku i mliječnim proizvodima.docx" dated 2022-03-22 <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.2%</span> 2 matches  2 documents with identical matches
✓ [31]	 "Mediteranska prehrana zadnja verzija1.docx" dated 2021-09-11 <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.2%</span> 2 matches
✓ [32]	 "Balašć Patricia SeminarSKI rad - Brze metode za detekciju mikroorganizama.docx" dated 2022-04-21 <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.1%</span> 1 matches  4 documents with identical matches
✓ [37]	 from a PlagScan document dated 2019-04-25 10:11 <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.2%</span> 1 matches
✓ [38]	 annona.hr/shop/slatkisi-i-grickalice/slatkisi/cokolade/mlika-creambiscuit-cokolada-100g/ <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.1%</span> 1 matches
✓ [39]	 publons.com/journal/36838/croatian-journal-of-food-technology-biotechnology-/ <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.2%</span> 1 matches
✓ [40]	 "Završni_rad_Kombucha (1).docx" dated 2021-09-09 <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.1%</span> 1 matches
✓ [41]	 docplayer.rs/221259636-Fizikalno-kemijska-i-tehnološka-uspredba-kefira-i-jogurta.html <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.1%</span> 1 matches
✓ [42]	 hr.brands-of-germany.com/en-dk/products/lindt-lindor-schokoladen-kugeln-vollmilch-137g-4-83oz <span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">0.0%</span> 1 matches

31 pages, 6066 words

PlagLevel: 8.7% selected / 12.6% overall

73 matches from 43 sources, of which 29 are online sources.

#### Settings

Data policy: Compare with web sources, Check against my documents, Check against my documents in the organization repository, Check against organization repository, Check against the Plagiarism Prevention Pool

Sensitivity: Medium

Bibliography: Consider text

Citation detection: Reduce PlagLevel

Whitelist: --