

Prisutnost genetski modificirane soje, kukuruza i pšenice na području Republike Hrvatske

Vukorepa, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:482251>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Petra Vukorepa

**PRISUTNOST GENETSKI MODIFICIRANE SOJE,
KUKURUZA I PŠENICE NA PODRUČJU REPUBLIKE
HRVATSKE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, svibanj, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za prehranu
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam
Nastavni predmet: Opasnosti vezane uz hranu
Tema rada je prihvaćena na III. izvanrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj 2016./2017. godini održanoj 3. srpnja 2017.
Mentor: doc. dr. sc. *Bojan Šarkanj*
Pomoć pri izradi: *Biljana Crevar*, dipl. ing.

PRISUTNOST GENETSKI MODIFICIRANE SOJE, KUKURUZA I PŠENICE NA PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE *Petra Vukorepa, 245-DI*

Sažetak: Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije genetski modificiran organizam (GMO) podrazumijeva organizme (biljke, životinje ili mikroorganizme) kojim je genetski materijal promijenjen na način koji se inače ne odvija prirodnim putem procesom rekombinacije. Genetski modificirana (GM) hrana podrazumijeva hranu proizvedenu od genetskih modificiranih biljaka ili životinja. U ovom radu je određena prisutnost genetski modificirane soje, kukuruza i pšenice na tržištu Republike Hrvatske. Uzorkovano je po 40 uzoraka soje, 40 uzoraka kukuruza te 20 uzoraka pšenice i ispitana prisutnost CP4 EPSPS (5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintetaza) proteina pomoću LFD testa, kao markera za genetsku inserciju *cp4 epsps* gena u transgenim biljkama. Iako je prema legislativi u Republici Hrvatskoj dopušteno do 0,9% GM sastojaka u hrani, rezultati istraživanja svih uzoraka su negativni što znači da uzorci nisu sadržavali navedeni protein, odnosno GMO.

Ključne riječi: GMO, CP4 EPSPS protein, soja, kukuruz, pšenica, LFD test

Rad sadrži: 39 stranica
11 slika
4 tablica
0 priloga
70 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Tomislav Klapeć</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Bojan Šarkanj</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Marko Jukić</i> | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 30. svibnja 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food and Nutrition Research
Subdepartment of Nutrition
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Nutrition science

Course title: Foodborne hazards

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. III held on July 3rd 2017.

Mentor: *Bojan Šarkanj*, assistant prof.

Technical assistance: *Biljana Crevar*, M.Sc.

THE PRESENCE OF GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN, MAIZE AND WHEAT IN THE REPUBLIC OF CROATIA

Petra Vukorepa, 245-DI

Summary: According to the World Health Organization (WHO) definition, genetically modified organisms (GMOs) include organisms (plants, animals or microorganisms) in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination. Genetically modified (GM) foods refer to foods produced from genetically modified plants or animals. The aim of this study was to examine whether genetically modified soybean, maize and wheat were present on the market of the Republic of Croatia. Forty samples of soybean, 40 maize samples, and 20 wheat samples were tested by LFD test for the presence of CP4 EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase) protein as marker for genetic insertion of *cp4 epsps* gene in transgenic plants. Although, according to Croatian legislation, up to 0.9 % of GM ingredients are allowed in food, all samples were negative, meaning that the samples did not contain the specified protein, i.e. GMOs.

Key words: GMO, CP4 EPSPS protein, soybean, maize, wheat, LFD test

Thesis contains: 39 pages
11 figures
4 tables
0 supplements
70 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Tomislav Klavec</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Bojan Šarkanj</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Mario Jukić</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: May 30, 2018

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se svom mentoru doc. dr. sc. Bojanu Šarkanju na ukazanom povjerenju i pruženoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Također od srca se zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci tijekom studija kao i kolegicama Valentini i Ružici na pruženoj pomoći prilikom prikupljanja uzoraka.

Sadržaj

UVOD	1
TEORIJSKI DIO	3
2.1. GENETSKI MODIFICIRANI ORGANIZMI	4
2.1.1. Pozitivni učinci.....	5
2.1.2. Potencijalni rizik genetski modificirane hrane	6
2.1.3. Zakonska regulativa	9
2.1.4. Svjetski trendovi.....	13
2.4. PROTEIN CP4 EPSPS.....	14
2.3. PROBAVLJIVOST CP4 EPSPS I Cry1Ab PROTEINA	17
2.4. ANALIZA GMO U SIROVINAMA I SASTOJCIMA HRANE	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.3. ZADATAK.....	22
3.4. MATERIJALI I METODE.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA	35

Popis oznaka, kratica i simbola

Ala	Alanin
Arg	Arginin
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	Imunoanalitička metoda s antitijelima (eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (eng. <i>European Food Safety Authority</i>)
EPSPS	5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaza
Gln	Glutamin
GM	Genetski modificiran
GMO	Genetski modificiran organizam (eng. <i>Genetically modified organism</i>)
HT	Svojstvo toleriranja herbicida (eng. <i>Herbicide tolerant</i>)
His	Histidin
K_i	Konstanta disocijacije kompleksa enzim-inhibitor
K_m	Michaelis-Menten konstanta
Leu	Leucin
LFD	Test lateralnog protoka (eng. <i>Lateral flow device</i>)
OECD	Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. <i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>)
PCR	Lančana reakcija polimerazom (eng. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PEP	Fosfoenol piruvat
Pro	Prolin
RR	Genetski modificirani usjevi tolerantni na glifosat koji je aktivni sastojak Monsantoovog herbicida Roundup (eng. <i>Roundup Ready</i>)
S3P	5-hidroksilšikimat-3-fostat
Ser	Serin
SGF	Simulirana gastrična otopina (eng. <i>Simulated Gastric Fluid</i>)
SIF	Simulirana intestinalna otopina (eng. <i>Simulated Intestinal Fluid</i>)
Thr	Treonin
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organization</i>)

UVOD

Genetski modificirana hrana podrazumijeva hranu proizvedenu od genetskih modificiranih biljaka ili životinja. Pomoću DNA rekombinantne tehnologije, geni se mogu prenositi iz jednog organizma u drugi. Postoje brojni razlozi koji govore u korist genetski modificiranih organizama. Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agriculture Organization*), pothranjeno je 795 milijuna ljudi u svijetu a kako bi se smanjila nestašica gladi, povećavaju se zahtjevi za proširenjem usjeva na kultiviranim područjima (FAO, 2015). Nasuprot tome, negativne strane genetski modificirane hrane vezane su za brigu ljudi za zdravlje i okoliš. Tri najveća rizika uključuju toksičnost, alergije i genetičke opasnosti a uzroci navedenih opasnosti mogu biti ubačeni gen te posljedično tome ekspresija proteina, pleiotropski efekt produkta genske ekspresije ili potencijalna disrupcija prirodnog gena. Trenutno postoji više od 200 različitih GM usjeva s različitom ekspresijom osobina na tržištu kojim je odobrena konzumacija za prehranu ljudi i životinja. Toleriranje herbicida je svojstvo koje dominira od samih početaka komercijalizacije GM usjeva i široko je korišteno u biljci soje. Takvi GM usjevi mogu tolerirati više herbicida kao što su glifosat i amonijev glufosinat i pokazuju otpornost prema različitim štetnicima. Procjena okolišnih rizika koji se povezuju s genetskim inženjerstvom biljaka uzima u obzir vrstu biljke, vrstu gena, protein ili genski produkt koji nastaje, fenotip transgena kao i namjenu korištenja biljke koja podliježe navedenom procesu. Prema trenutno važećoj legislativi u Europi (Uredba Europske Zajednice br. 1830/2003 o sljedivosti i označavanju genetski modificiranih organizama) maksimalno je dozvoljeno 0,9% GM sastojaka u proizvodu namijenjenom za ljudsku upotrebu (EC, 2003a). U ovom radu uzorkovano je po 40 uzoraka soje, 40 uzoraka kukuruza te 20 uzoraka pšenice koji su prikupljeni iz svih županija Republike Hrvatske. U uzorcima je određena prisutnost CP4 EPSPS proteina koji služi kao marker za genetsku inserciju *cp4 epsps* gena u transgenim biljkama.

TEORIJSKI DIO

2.1. GENETSKI MODIFICIRANI ORGANIZMI

Genetska modifikacija je molekularno biološka tehnika koja je rezultat promjena u genetskom materijalu svih vrsta živućih organizama. Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, genetski modificiran organizam podrazumijeva organizme (biljke, životinje ili mikroorganizme) kojim je genetski materijal promijenjen na način koji se ne odvija prirodnim putem procesom rekombinacije (WHO, 2016). Genetski modificirana hrana podrazumijeva hranu proizvedenu od genetskih modificiranih biljaka ili životinja. Pomoću DNA rekombinantne tehnologije, geni se mogu prenositi iz jednog organizma u drugi. Prvi primjer genetski modificiranog organizma datira iz 19. stoljeća kad je nastao tritikal. Tritikal je nastao križanjem pšenice i raži te se koristio u pripremi kruha i tjestenine. Budući da je takav hibrid bio sterilan, kemičari su dodavali kolhicin kako bi proizveli fertilne embrionalne stanice. Iako to predstavlja primitivnu definiciju GMO-a, znanstvenici koriste pojam biotehnološki modificiran organizam koji vjerodostojnije objašnjava definiciju GMO-a (Oliver, 2014).

Podrijetlo rekombinantne tehnologije DNA seže u 1973. godinu kad su znanstvenici otkrili da se genetski materijal može prenositi između različitih vrsta (Cohen i sur., 1973). Neovisna skupina znanstvenika je proizvela prve modificirane biljke otporne na antibiotik a to su petunije i duhan koje su znanstvenici u Kini kasnije komercijalizirali. Daljnji primjeri genetskih modificirani biljaka uključuju rajčicu, repu, pamuk, soju, krumpir, jagode i mrkvu (Zhang i sur., 2016).

Moderni biotehnološki pristup omogućava prenošenje gena iz prokariota ili eukariota biljaka ili životinja u biljni genom. Bakterija *Bacillus thuringiensis* je prvi primjer genetski modificiranog organizma koji je imao široku primjenu pa je čak dobio ime *Bacillus thuringiensis* (Bt) tehnologija. Duhan i rajčica su prve biljke u koje je prenesen gen bakterije *Bacillus thuringiensis* te su prateći taj trend mnogi drugi usjevi razvijeni (Fischhoff i sur., 1987).

Genetski modificiran kukuruz koji sadrži gen bakterije *Bacillus thuringiensis* izražava Cry1Ab ineksticidni protein. Potvrđeno je da spomenuti gen djeluje toksično prema lepidopterima kao što su *Helicoverpa punctigera* (Slika 1), *Helicoverpa zea* i *Pectinophora gossypiella* (Tabashnik, 1994).

Nekoliko GM usjeva koji sadrže gene *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ac*, *cry1Ab*, *cry2Aa*, *cry2Ac*, *cry1F*, *epsps* i *vip-3a*), kodira za insekticidne proteine. Molekulska težina im varira između 65 kDa i 88 kDa te je poznato da djeluju letalno prema dipteranima, koleopteranima i lepidopteranima. Toleriranje herbicida je svojstvo koje dominira od samih početaka komercijalizacije GM usjeva i široko je korišteno u biljci soje. Takvi GM usjevi mogu tolerirati

više herbicida kao što su glifosat i amonijev glufosinat i pokazuju otpornost prema različitim štetočinama. Primjeri su *Bacillus thuringiensis* kukuruz u Kanadi i Argentini, HT kukuruz u Kanadi, RR soja u Argentini. Prva generacija GM usjeva sadrži samo jedan gen iz *Bacillus thuringiensis*, a druga i treća generacija GM usjeva sadrže višestruke gene i kopije tih gena kako bi postigli što dužu otpornost. U najčešće komercijalizirane GM usjeve ubrajaju se soja, kukuruz, pšenica, pamuk, uljana repica, riža i krumpir (Kamle i Ali, 2013).



Slika 1 *Helicoverpa punctigera* (Rhode, 2011)

2.1.1. Pozitivni učinci

Postoje brojni razlozi koji govore u korist genetski modificiranih organizama. Prema podacima Organizacije za hranu i agrikulturu, pothranjeno je 795 milijuna ljudi u svijetu. Zemlje u razvoju čine najveći broj pothranjenih osoba (780 milijuna ljudi). Kako bi se smanjila nestašica hrane, povećavaju se zahtjevi za proširenjem usjeva na kultiviranim područjima. Trenutna stopa rasta usjeva je manja od 1,7% a trebala bi biti 2,4% kako bi se zadovoljili zahtjevi za potrebama populacije i poboljšali nutritivni standardi. Za postizanje većih prinosa u poljoprivredi, potrebna su veća ulaganja u gnojivo, vodu, pesticide i/ili genetska poboljšanja. Okolišni čimbenici također mogu utjecati na proizvodnju GM usjeva. Klimatske promjene, ubrzana urbanizacija, ograničeni resursi vode, degradacija i salinizacija zemlje mogu doprinijeti smanjenim prinosima u poljoprivredi. Konvencionalno križanje se oslanja na križanje dviju roditeljskih jedinki u nadi za ekspresijom željenog svojstva. Uzgajivači zatim križaju potomstvo s roditeljskom jedinkom te cijeli taj proces može trajati i do 15 godina prije nego se postigne željena osobina potomstva. Današnje metodologije i razvoj genetski modificirane hrane osiguravaju optimalne strategije za postizanje prikladne globalne sigurnosti hrane. Proizvodnja soje, kukuruza, pamuka i soje se povećala u SAD-u u razdoblju od 1996. godine pa do 2012. godine za čak 370 milijuna tona usjeva. Uočena je velika

financijska dobit od 2006. godine do 2012. godine zahvaljujući razvoju genetski modificirane hrane jer je povećana otpornost na štetočine i korov a smanjena upotreba pesticida i herbicida. Osim boljih prinosa i okolišno prihvatljivijeg uzgoja, znanstvenici istražuju i druge primjene u nutricionizmu i farmaciji. Ispitano je tako djelovanje nekoliko vrsta usjeva kao što su riža, kukuruz, soja i krumpir te ih opisuju kao potencijalne nositelje jestivih "cjepiva" protiv toksina bakterije *Escherichie coli*, virusa hepatitisa B ili bakterije *Heliobacter pylori* (Zhang i sur., 2016).

2.1.2. Potencijalni rizik genetski modificirane hrane

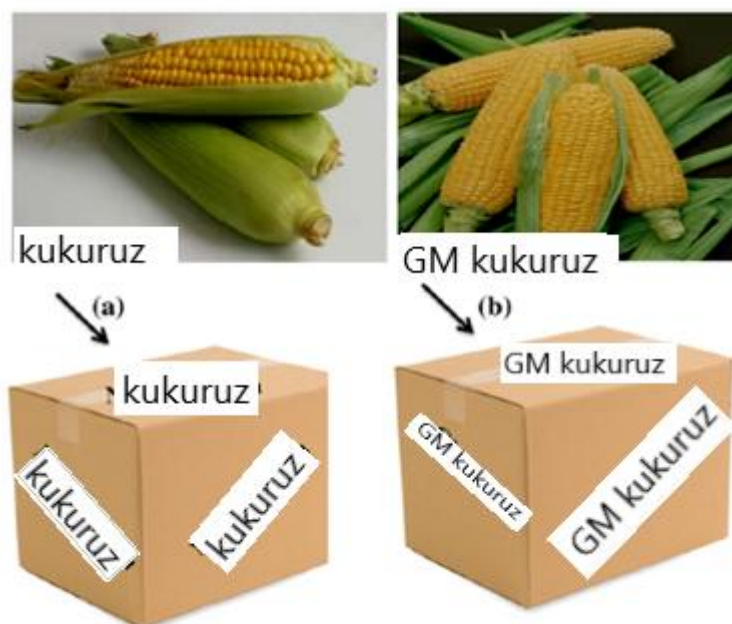
Negativne strane genetski modificirane hrane vezane su za zabrinutost ljudi za zdravlje i okoliš. Laicima je teško objasniti biotehnološke metode uključene u proces GMO te se znanstvenici trude pobiti sve netočne navode vezane za etičke principe tradicionalnog procesa križanja. Tri najveća rizika uključuju toksičnost, alergije i genetičke opasnosti. Uzroci navedenih opasnosti mogu biti ubačeni gen te posljedično tome ekspresija proteina, pleiotropski efekt produkta genske ekspresije ili potencijalna disrupcija prirodnog gena. Primjer opasnosti u hrani predstavlja kukuruz "Starlink" koji se prvi put spominje 1998. godine u SAD-u (Zhang i sur., 2016). Znanstvenici su htjeli razviti otpornost na pojedine insekte te su biljku obogatili genom iz bakterije *Bacillus thuringiensis* (Zhang i sur., 2016). Ubačeni gen kodira za protein Cry9c koji uzrokuje snažnu alergijsku reakciju kod osjetljivih pojedinaca. Sljedeći primjer opasnosti u hrani uključuje GM soju koja je izazvala alergijsku reakciju kod potrošača koji su alergični na brazilski orah (Zhang i sur., 2016). Kako bi poboljšali nutritivnu vrijednost soje koja sadržava vrlo malo aminokiselina sa sumporom, znanstvenici su ubacili gen 2S albumina bogatog metioninom iz endosperma brazilskog oraha (Nordlee i sur, 1996). Ispitanici podvrgnuti standardnom kožnom prick testu koji su alergični na ekstrakt brazilskog oraha, su pokazali sličnu reakciju na ekstrakt transgene soje koja je sadržavala rekombinantni protein (Želježić, 2004). Ekološki rizici odnose se na željena svojstva biljaka kao što su otpornost na štetočine i toleriranje herbicida. Usjevi koji su otporni na insekte sadrže gen koji dovodi do ekspresije CRY proteina a usjevi koji su tolerantni za herbicide pokazuju ekspresiju enzima koji imaju zaštitni učinak protiv herbicida (glifosfat). Zahvaljujući tim strategijama, smanjen je trošak za zaštitu usjeva od insekata i korova. Postavlja se pitanje hoće li za nekoliko godina prirodnom evolucijom doći do razvoja organizama koji će nadjačati transgenske vrste (Bawa i sur., 2013). Drugi problem uključuje biljke otporne na napad insekata koje mogu smanjiti broj kukaca, dok će se time smanjiti broj većih kukaca, glodavaca i gmazova što može narušiti prirodnu ravnotežu hranidbenog lanca (Zhang i sur., 2016).

Kod GM biljaka potrebno je ubaciti gen marker koji omogućava selekciju stanica koje su uspješno ugradile gen za željeno svojstvo (transformirane stanice) i započele s njegovom transkripcijom od onih koje to nisu. Gen marker nije nužan za izražavanje željenog svojstva i ne utječe na njega te se u tu svrhu upotrebljavaju genski markeri antibiotske rezistencije kod GM biljaka (Tabashnik i sur., 1994). Najčešće se kao marker rabi gen *npt II* koji je odgovoran za rezistenciju na kanamicin i neomicin. Navedeni gen kodira sintezu enzima neomicinfosfotransferaze II koja transformiranim stanicama omogućuje inaktivaciju kanamicina i neomicina (Želježić, 2004). Europska agencija za sigurnost hrane (panel za GMO i biološke opasnosti) je na zahtjev Europske komisije iznijela znanstveno mišljenje o upotrebi genskih markera antibiotske rezistencije kod GM biljaka. Znanstvenici su donijeli zaključak o mogućnosti štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje i okoliš upotrebom svakog pojedinačnog genskog markera. Njihovo mišljenje je nadalje poslužilo kao podloga za procjenu sigurnosti pojedinačne GM biljke i proizvoda. Dva su važna gena koji su markeri antibiotske rezistencije u GM biljkama odobreni od strane Europske agencije za sigurnost hrane: *aph(3')-IIa = nptII*, koji daje otpornost na kanamicin/neomicin, i *ant-(3'')-Ia = aadA*, koji daje otpornost na streptomycin/spectinomycin. Drugi navedeni gen nije eksprimiran u GM biljkama budući da je ekspresija regulirana bakterijskim promotorom koji nije aktivan u biljkama. EFSA je zaključila da nije vjerojatno štetno djelovanje na ljude i okoliš uslijed prijenosa ovih genskih markera s GM biljaka na bakterije (EFSA, 2009).

Za sada je poznata činjenica o postojanju 53 usjeva koji posjeduju najmanje jedan gen koji je sastavni dio ovog istraživanja (*epsps gen* ili *cry1Ab gen*). Velika zabrinutost proizlazi iz toga što se odobrenje za 8 usjeva od navedenih 47 usjeva pojavilo tek nakon što su se usjevi počeli koristiti za konzumaciju (Zdziarski i sur., 2014).

Kartagenski protokol o biološkoj sigurnosti je međunarodni sporazum kojim se nastoji očuvati biološka raznolikost od potencijalnog rizika uzrokovanog genetski modificiranim organizmima koji su rezultat moderne biotehnologije. Cilj protokola uključuje preventivni pristup na području sigurnog prijevoza genetski modificirane hrane preko internacionalnih granica i označavanja GM hrane (**Slika 2**). Države koje su potpisale navedeni sporazum imaju mogućnost zabrane uvoza GM hrane kad postoji razlog za zabrinutost za ljudsko zdravlje (Kamle i Ali, 2013). Vlada, znanstvena tijela zadužena za sigurnost hrane, prehrambena industrija, laboratoriji za testiranje i proizvođači usjeva zajednički dogovaraju vrste GMO-a koje su dopuštene kao hrana, kao i maksimalne dopuštene količine u hrani do koje se ne moraju deklarirati. Pregovaranje oko dozvoljenih GMO-a na tržištu Europske unije započinje preko EFSA-inog Panela za genetski modificirane organizme, koji dalje daje preporuke, mišljenja i procjene regulatornim tijelima, a sukladno okviru za procjenu rizika u pitanjima sigurnosti hrane (EC, 2002).

Postoji nekoliko različitih metoda za testiranje genetski modificiranih proizvoda. Sirovine i procesirani proizvodi koji sadrže GMO mogu se identificirati testiranjem prisutnosti ubačenog gena ili detekcijom eksprimiranog proteina (Schreiber, 1999).



Slika 2 Slikoviti prikaz prijedloga pravilnog označavanja GM usjeva koji nije genetski modificiran (a) ili je genetski modificiran (b) (Kamle i Ali, 2013)

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije sa stajališta kupaca, GM hrana nije pokazala direktan koristan učinak jer nije značajno jeftinija, nema duži vijek trajanja i nema poboljšan ukus (WHO, 2014). U preglednom radu Zdziarski i sur. (2014) su usporedili ispitivanje usjeva s jednim ili više specifičnih osobina koje su zajedničke komercijaliziranim GM usjevima kao što su toleriranje herbicida (*epsps* gen) i otpornost na insekte (*cry1Ab* ili *cry38b1* gen) (Zdziarski i sur, 2014). Na tu temu je prethodno provedeno 21 istraživanje, dok je 18 studija (86%) istraživalo usjeve koji su odobreni za konzumaciju ljudi i životinja bilo gdje u svijetu. Tih 18 studija je istraživalo svega devet od 47 odobrenih GM usjeva za koje je poznato da posjeduju barem jednu željenu osobinu. Glavni nedostatak svih istraživanja je manjak definicije toksičnosti ili znakova patologije. Niti jedno istraživanje nije objasnilo razlog izbora metoda koje su korištene niti su došli do zaključka koja je razlika između životinja koje su hranjene genetski modificiranom ili hranom koja nije genetski modificirana. Nekolicina studija nije provelo daljnja ispitivanja nakon zaključka o nepostojanju značajnih razlika u ishrani životinja. Međutim, odsustvo značajne razlike u preliminarnom istraživanju ne znači da je nema što bi se moglo potvrditi daljnjim istraživanjima. Samo pet studija je uzelo u obzir OECD 408 smjernice koje su osmišljene za testiranje karcinogenosti sastojaka (Zdziarski i sur., 2014). Prema rezultatima istraživanja koje su proveli Qi i sur. (2012), GM hrana je

jednako sigurna za konzumaciju kao i konvencionalna hrana. Istraživanje je provedeno na štakorima u trajanju od 90 dana, tijekom kojih je ispitan utjecaj GM hrane na tjelesnu masu, rast štakora i utjecaj na zdravlje. Štakori su bili podijeljeni u grupe koje su hranjene GM sojom, konvencionalnom sojom i uobičajenom hranom (Qi i sur., 2012). Sljedeće istraživanje koje su proveli Liu i suradnici (2012), uključivalo je prehranu štakora GM kukuruzom (BT38) koji je eksprimirao gen *Cry1Ac-M*. Nije uočena nikakva razlika u odnosu na kukuruz koji nije genetski modificiran po pitanju tjelesne mase, konzumacije hrane ili toksičnih učinaka. GM pšenica otporna na sušu koja sadrži gen *T349* i pšenica koja sadrži gen *TaDREB4* nije pokazala štetan utjecaj na imuni sustav miša u odnosu na konvencionalnu rižu (Liang i sur., 2013). Pellegrino i suradnici (2018) pokazali su meta analizom podataka tijekom 21. godine uzgoja GM kukuruza na tržištu da isti ne predstavlja opasnost, štoviše smatra se uglavnom jednako vrijednim ili boljim od konvencionalnog, nemodificiranog kukuruza.

2.1.3. Zakonska regulativa

S obzirom na važnost slobodnog protoka sigurne i zdravstveno ispravne hrane i hrane za životinje koja značajno doprinosi zdravlju i dobrobiti građana te njihovim socijalnim i ekonomskim interesima Vijeće Europske unije zajedno s Europskim parlamentom je donijelo Uredbu o GM hrani i hrani za životinje (EC, 2003b). Cilj Uredbe uključuje osiguranje visoke razine zaštite ljudi i utvrđivanje odredbi za označavanje i postupaka Zajednice za nadzor GM hrane i hrane za životinje. Označavanje GM hrane je obavezno ukoliko hrana koja sadrži GMO, ili se od njih sastoji, ili je proizvedena od GMO-a ili sadrži od njih proizvedene sastojke u količini većoj od 0,9% (EC, 2003b). Označavanje treba uključivati objektivnu informaciju u pogledu toga da li hrana ili hrana za životinje sadrži genetski modificirane organizme, sastoji se od njih ili je od njih proizvedena. Takvi proizvodi trebaju biti označeni riječi „genetski modificiran” ili „proizveden od genetski modificiranog (*naziv sastojka*)” a mora se nalaziti na popisu sastojaka u zagradama odmah nakon naziva dotičnog sastojka. Kad je sastojak označen nazivom kategorije, riječi „sadrži genetski modificirani (*naziv organizma*)” ili „sadrži (*naziv sastojka*) proizveden od genetski modificiranog (*naziv organizma*)” mora se nalaziti na popisu sastojaka; kad ne postoji popis sastojaka, riječi „genetski modificiran” ili „proizveden od genetski modificiranog (*naziv organizma*)” mora biti jasno naveden na deklaraciji. Ako se hrana prodaje u rinfuznom obliku ili kao zapakirana hrana u maloj ambalaži (< 10 cm²), informacije tražene ovim stavkom moraju biti trajno i vidljivo istaknute ili na hrani ili odmah uz nju ili na pakiranju, slovima koja su dovoljno velika da se lako identificiraju i čitaju. Označavanje GM hrane nije obavezno ukoliko hrana koja sadrži GMO, ili se od njih sastoji, ili je proizvedena od GMO-a ili sadrži od njih proizvedene sastojke u količini manjoj od 0,9% jer se u tom slučaju može smatrati slučajnom tehnološkom kontaminacijom (EC, 2003a).

Područje primjene navedenog članka se odnosi na hranu koja se kao takva dostavlja krajnjem potrošaču ili dobavljačima na veliko u Europskoj Zajednici koja sadrži genetski modificirane organizme ili se od njih sastoji, ili je proizvedena od genetski modificiranih organizama ili sadrži od njih proizvedene sastojke. GM hrana ne smije imati nepovoljan učinak na zdravlje ljudi, životinja i okoliš te dovesti potrošača u zabludu. GM hrana ne smije biti nutritivno nepovoljna za potrošača u odnosu na hranu koja nije genetski modificirana i kao takva se smije staviti na tržište jedino ako su ispunjeni svi odgovarajući zahtjevi koji se potom dostavljaju nadležnom tijelu države članice. GM hrana za životinje uključuje GMO za uporabu kao hrana za životinje, hranu za životinje koja sadrži GMO ili se od njih sastoji i hranu za životinje proizvedenu od genetski modificiranih organizama. GM hrana za životinje ne smije imati nepovoljne učinke na zdravlje ljudi, životinja i okoliš. Ne smije štetiti potrošaču ili ga dovesti u zabludu umanjivanjem razlikovnih karakteristika životinjskih proizvoda. Kad je vjerojatno da će se proizvod upotrebljavati i kao hrana i kao hrana za životinje, podnosi se samo jedan zahtjev u skladu s člancima 5 i 17 i za njega se donosi samo jedno mišljenje Europske agencije za sigurnost hrane i jedna odluka Zajednice a Agencija razmatra treba li zahtjev za odobrenja podnijeti i za hranu i hranu za životinje (EC, 2003a,b).

Hrvatski Sabor je donio odluku o proglašenju Zakona o izmjenama i dopunama Zakona o GMO (HS, 2018). Novim zakonom se omogućuje stavljanje na tržište GMO-ova u svrhu uzgoja GMO-ova što znači da je GM reprodukcijски biljni materijal dostupan trećim stranama za uzgoj GMO-ova biljnog podrijetla. Ovim se Zakonom utvrđuje okvir za provedbu Uredbe Europske unije br. 1829/2003 (EC, 2003b) o GM hrani i hrani za životinje i Uredba br. 1830/2003 (EC, 2003a) o sljedivosti i označavanju GMO-ova i sljedivosti prehrambenih proizvoda i hrane za životinje proizvedenih od GMO-ova. Ministarstvo poljoprivrede je nadležno za stavljanje na tržište reprodukcijskog materijala poljoprivrednog bilja u svrhu uzgoja GM poljoprivrednih kultura. Uporaba GMO-a obavlja se na način kojim se sprječava ili na najmanju mjeru smanjuje opasnost za bioraznolikost, vodeći računa o opasnostima za zdravlje ljudi, životinja i okoliš. Nacionalni referentni laboratorij kojeg ovlašćuje Ministarstvo zdravlja je zaduženo za ispitivanje, kontrolu i praćenje GMO-a i proizvoda koji sadrže i/ili se sastoje ili potječu od GMO-a. Vlada Republike Hrvatske će na prijedlog nadležnog tijela privremeno ili trajno ograničiti ili zabraniti uvoz i uporabu GMO-a ili proizvoda koji sadrže i/ili se sastoje ili potječu od GMO-a u slučaju nedostatka znanstvenih informacija i znanja o mogućim razmjerima negativnih posljedica na bioraznolikost, okoliš i/ili zdravlje ljudi. Ograničena uporaba GMO-a uvrštava se u jednu od četiri razine opasnosti na temelju udovoljavanja propisanim mjerama sigurnosti i propisanim uvjetima:

- prva razina opasnosti, odnosi se na ograničenu uporabu gdje je rizik zanemariv,
- druga razina opasnosti, odnosi se na ograničenu uporabu gdje su rizici mali,

- treća razina opasnosti, odnosi se na ograničenu uporabu gdje su rizici značajni
- četvrta razina opasnosti, odnosi se na ograničenu uporabu u kojima su rizici veliki.

Na temelju članka 27 genetski modificiran reprodukcijski biljni materijal dopušteno je uvoditi u okoliš samo na površinama koje će na prijedlog Ministarstva poljoprivrede i šumarstva Uredbom utvrditi Vlada RH. Nije dopušteno uvođenje GMO-a u okoliš u zaštićenim područjima i u područjima ekološke mreže, područjima namijenjenim ekološkoj proizvodnji poljoprivrednih proizvoda i ekološkim oblicima turizma te područjima koja predstavljaju zaštitne zone utjecaja. Vijeće za GMO koje je osnovala Vlada RH:

- prati stanje i razvoj na području korištenja genetske tehnologije i uporabe GMO-a,
- prati stručno-znanstvena postignuća i daje mišljenja i poticaje u svezi s uporabom genetske tehnologije i uporabom GMO-a,
- daje mišljenja u svezi sa socijalnim, etičkim, tehničkim i tehnološkim, znanstvenim i drugim uvjetima korištenja GMO-a,
- savjetuje nadležna tijela o pitanjima vezanim za uporabu GMO-a i genetske tehnologije,
- izvješćuje javnost o stanju i razvoju na području uporabe genetske tehnologije i uporabe GMO-a, te o svojim stajalištima i mišljenjima.

Vijeće imenuje na vrijeme od četiri godine Odbor za ograničenu uporabu GMO-a i Odbor za uvođenje GMO-a u okoliš koji daju mišljenja o uporabi GMO-a u upravnim postupcima i drugim postupcima sukladno ovom Zakonu, i prijedloge u pripremi propisa o uporabi GMO-a (HS, 2018).

Monitoring uključuje osmišljeno i sustavno praćenje i nadziranje GMO-a i okoliša, ograničene uporabe GMO-a, postupaka namjernog uvođenja GMO-a u okoliš i stavljanja GMO-a i proizvoda koji sadrže i/ili se sastoje od GMO-a na tržište, te mogućih štetnih posljedica sukladno propisima. Cilj monitoringa je identificirati nastanak štetnih učinaka GMO-a ili njegove uporabe na zdravlje ljudi i okoliš koji nisu predviđeni u procjeni rizika za okoliš. Ukoliko se u tijeku praćenja stanja utvrde promjene u okolišu, potrebno je utvrditi jesu li promjene posljedica GMO-a ili su posljedice drugih okolišnih čimbenika. Plan monitoringa mora uzeti u obzir svojstva GMO-a i opseg njegove namjene, te mora biti detaljan za svaki pojedinačni slučaj uzevši u obzir procjenu rizika za okoliš. Plan također, mora obuhvatiti opći nadzor i praćenje neočekivanih štetnih učinaka i odrediti subjekte koji će provoditi različite zadatke na temelju plana monitoringa. Cilj monitoringa GMO-a nakon stavljanja na tržište mora potvrditi točnost svih pretpostavki navedenih u procjeni rizika za okoliš i uočiti pojavu štetnih učinaka GMO-a koji nisu predviđeni u procjeni rizika za okoliš ili zdravlje ljudi. Nadležna inspeksijska tijela po potrebi mogu provesti inspeksijski nadzor i druge oblike

kontrole kako bi osigurala poštivanje odredaba navedenog Pravilnika objavljenog u Narodnim novinama 110/08 (MZSS, 2008).

2.1.4. Svjetski trendovi

Trenutni trend uključuje kombinaciju dva ili više pojedinih GM događaja što je omogućilo proizvođačima fleksibilnost i poboljšani rad. Trenutno postoji više od 200 različitih GM usjeva s različitom ekspresijom osobina na tržištu kojim je odobrena konzumacija za prehranu ljudi i životinja. Dvostruke ili višestruke željene osobine postaju sve veći trend (James, 2013). Preko 16 milijuna poljoprivrednika diljem svijeta sadi GM usjeve koji prekrivaju više od 160 milijuna hektara zemlje (James, 2011). Na takav način, moderna biotehnologija može doprinijeti gospodarskom prosperitetu zapošljavajući ljude u primarnom sektoru (Gupta, 2000).

Mnoge regulative vezane uz hranu ne zahtijevaju dodatna istraživanja za inserciju više različitih gena ukoliko su ti geni odobreni za upotrebu u istoj vrsti biljke (EFSA, 2010). Međutim, učinak dvaju ili više gena koji djeluju zajedno nije poznat. Primjerice, dva proteina koja djeluju kao insekticidi mogu imati sinergističko ili pojačano djelovanje (Schnepf i sur., 1998). Pretpostavka je da će se u skoroj budućnosti provoditi istraživanja toksičnosti usjeva koji sadrže nekoliko GM komponenti. Zasad je SAD glavni proizvođač genetski modificirane hrane (**Tablica 1**) a slijede Brazil, Argentina, Kanada, Indija i Kina (James, 2012). Očekuje se da će u Brazilu porasti udio usjeva koji sadrže gen za toleranciju herbicida (koji trenutno iznosi 63,1%), gen za otpornost na insekte (16,5%) ili oba gena (20,4%). Iz tog razloga su mali ili srednji proizvođači zabrinuti jer multinacionalne tvrtke dominiraju na tržištu zahvaljujući velikom ekonomskom dobitku (Marinho i sur., 2014).

Tablica 1 Prikaz zemalja s najvećim udjelom GM usjeva (James, 2012)

Država	Područje (milijun ha)		
	2012	2011	2010
SAD	69,5	69,0	66,8
Brazil	36,6	30,3	25,4
Argentina	23,9	23,7	22,9
Indija	10,8	10,6	9,40
Kina	4,00	3,90	3,50
Sveukupno	156	148	137

Europska unija, na čelu sa Španjolskom, je prateći trend genetski modificiranih usjeva dosegla razinu od 28% ukupne svjetske proizvodnje (James, 2011). Općenito gledajući, genetski modificirani usjevi su najbrže usvojena tehnologija koja može doprinijeti osiguranju dovoljne količine hrane u budućnosti (James, 2011).

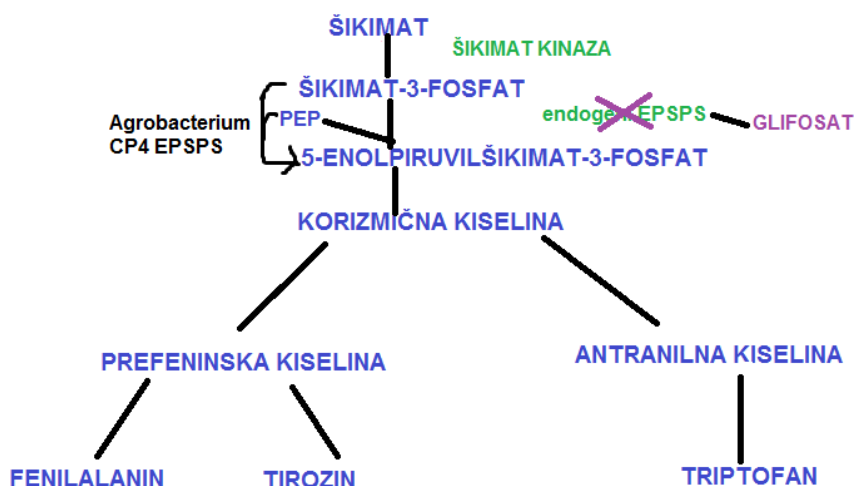
2.4. PROTEIN CP4 EPSPS

5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaza spada u skupinu enzima koji su zajednički biljkama i mikroorganizmima. EPSPS enzimi su izolirani iz oba izvora te su njihova svojstva detaljno proučavana. Bakterijski i biljni enzimi su monofunkcionalni s molekulskom masom od 44-48 kDa (Kishore i sur., 1988).

EPSPS proteini kataliziraju prijenos enolpiruvilne skupine s fosfoenol piruvata (PEP) na 5-hidroksilšikimat-3-fosfat (S3P). To je jedini poznati metabolički produkt i 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat je predzadnji produkt šikimatskog puta. Šikimatska kiselina je supstrat za biosintezu aromatskih aminokiselina (fenilalanin, triptofan, tirozin), kao i mnogih sekundarnih metabolita (tetrahidrofolat, ubikinon i vitamin K). EPSPS proteini i šikimatski metabolički put su prisutni kod sisavaca, riba, ptica, gmazova i insekata (Alibhai i Stallings, 2001).

Procijenjeno je da aromatske molekule koje su nastale šikimatskim metaboličkim putem predstavljaju i do 35% suhe tvari biljke (Franz i sur., 1997). Protein CP4 EPSPS je izoliran iz bakterije *Agrobacterium* sp. soja CP4 i sastoji se od jednog polipeptidnog lanca kojeg čini 455 aminokiselina. CP4 EPSPS protein odlikuje smanjen afinitet za glifosat što ga razlikuje od biljaka koje endogeno sadrže EPSPS enzime. Kod biljaka koje ga ne toleriraju glifosat se veže za endogene EPSPS enzime (**Slika 3**) i sprječava biosintezu 5-enolpiruvil-šikimat-3-fosfata te zbog toga biljka ne proizvodi esencijalne aminokiseline i sekundarne metabolite (Steinrucken i Amrhein, 1980). GM biljke koje ekspimiraju protein CP4 EPSPS su *Beta vulgaris* (šećerna repa), *Brassica napus* (uljana repica), *Brassica rapa* (repa), *Glycine max* (soja), *Medicago sativa* (lucerna), *Zea mays* (kukuruz) i *Triticum aestivum* (pšenica)(ISAAA, 2018).

Inhibicija aktivnosti EPSPS enzima podrazumijeva formiranje trostrukog kompleksa EPSPS-S3P-glifosata. Vežanje glifosata se odvija nakon formiranja binarnog EPSPS-S3P kompleksa i učinkovito blokira vežanje PEP-a te sprječava reakciju S3P-a i PEP-a kataliziranu EPSPS-om.



Slika 3 Shematski prikaz šikimatskog metaboličkog puta

Protein CP4 EPSPS ima puno veći afinitet za PEP nego za glifosat te zbog toga preferira vezanje PEP-a čak i u prisutnosti glifosata. Proces glikolize se nastavlja kao u odsustvu glifosata. Razlika u afinitetu za vezanje glifosata je osnova toleriranja glifosata u transformiranim biljkama koje sadrže *cp4 epsps* gen. Enzimi CP4 EPSPS nastavljaju svoju funkciju u prisutnosti glifosata proizvodeći aromatske aminokiseline i druge metabolite koji su potrebni za normalni rast i razvoj biljke (Franz i sur., 1997). Najveća zabilježena razina ekspresije CP4 EPSPS proteina zabilježena je u listu soje (**Tablica 2**) a iznosila je 798 $\mu\text{g/g}$ dok su vrijednosti u drugim biljkama bile značajno niže (Alibhai i Stallings, 2001). Dvanaest zemalja su odobrile barem jednu od 30 biljnih linija koje izražavaju protein CP4 EPSPS (eng. *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*). Vrlo je važno poznavati biologiju netransformiranih biljnih vrsta ili biljaka koje su „domaćini“ što je ujedno i polazna točka za procjenu okolišnog rizika GM biljaka (OECD, 2006). Informacije o biologiji biljke „domaćina“ mogu se koristiti za identificiranje specifičnih biljnih karakteristika koje uzrokuje ubačeni gen a može štetno utjecati na prirodno stanište biljke ili na interakciju biljke s drugim organizmima. Sve biljne vrste koje su genetski modificirane i eksprimiraju *cp4 epsps* gen imaju potencijal „volontirati“ kao korov u predstojećim vegetacijskim sezonama i demonstrirati sposobnost opstajanja u različitim okolišnim uvjetima. Osobine koje utječu na sposobnost biljke volontera“ su jednake onima koje se odnose na karakteristike korova općenito a tu su dormancija sjemenki i konkurentnost (Baker, 1974).

Tablica 2 Najveća zabilježena razina ekspresije CP4 EPSPS proteina u biljnom tkivu (Alibhai i Stallings, 2001)

Vrsta	Transformacijski događaj	Tkivo	Najviše zabilježena ekspresija (ug/g)
<i>Beta vulgaris</i>	GTSB77	Vrh	370
<i>Brassica napus</i>	GT73	List	70
<i>Brassica rapa</i>	ZSR500/502	Sjemenka	53
<i>Glycine max</i>	GTS-40-3-2	List	798
<i>Medicago sativa</i>	J101 x J163	Stočna hrana	390
<i>Gossypium hirsutum</i>	MON88913	Sjemenka	550
<i>Zea mays</i>	MON88107	Pelud	280

Dostupni podaci upućuju na nepovezanost između ekspresije CP4 EPSPS proteina i povećanog kapaciteta preživljavanja nepovoljnih zimskih uvjeta koji bi promijenili prevalenciju biljaka „volontera“ u predstojećim vegetacijskim sezonama (OECD, 1997; 2000; 2001; 2003; 2008; OGTR 2008). Brojni su razlozi zbog kojih *cp4 epsps* gen može dospjeti u neciljno područje kao što su slučajno otpuštanje sjemenki u okoliš tijekom transporta, uzgoj GM biljaka izvan kultiviranih područja, prijelaz gena iz GM biljke do usjeva iste biljne vrste. Dok se sve biljke mogu smatrati korovom u određenom kontekstu, niti jedan usjev GM biljke koji je otporan na glifosat nije problematičan ili invazivan izvan agrokulturalnog sustava. Ekspresija *cp4 epsps* gena jedino utječe na sposobnost biljke za preživljavanje ako je tretirana glifosatom (Sammons i Gaines 2014). Razmnožavanje transgenih vrsta sa biljnim vrstama koje nisu genetski modificirane je posredovan peludom. Proizvodnja hibrida koji su sposobni za opstanak ovisi o blizini GM biljaka i spolnoj kompatibilnosti GM biljaka i „divljih“ vrsta. Nema dokaza da ekspresija CP4 EPSPS proteina kod GM biljaka može utjecati na promjenu postojećih gena (Mallory-Smith i Zapiola, 2008; Warwick i sur., 2008). Svakako, introgresija tolerancije glifosata u kompatibilnu vrstu može uzrokovati probleme u agrikulturalnom ili peri-agrikulturalnom sustavu (Mallory-Smith i Zapiola, 2008; Warwick i sur., 2008).

Podaci upućuju na činjenicu da se CP4 EPSPS protein brzo razgrađuje u probavnom sustavu sisavaca i ne uzrokuje alergenoost i toksičnost kod drugih organizama. Procjenitelji rizika su uzeli u obzir sličnost strukture i funkciju *cp4 epsps* gena s drugim biljnim endogenim EPSPS enzimima. Enzimska aktivnost *cp4 epsps* gena je visoko specifična i ekvivalentna ostalim EPSPS proteinima u biljkama i mikroorganizmima te ne utječe na promjenu metaboličkog produkta EPSPS enzima kod GM organizama. Procjenitelji rizika su razmotrili mogućnost utjecaja *cp4 epsps* gena u GM biljci koja može imati štetan utjecaj na druge organizme. Fenotipske karakteristike GM biljke, kao i analize strukture i nutritivne analize dokazuju nepostojanje štetnog ili neočekivanog utjecaja GM biljke na druge organizme. Kako

bi se ispunili zahtjevi za odobrenjem GM hrane i proizvoda od GM biljaka, GM biljke se podvrgavaju detaljnim analizama sastava a izbor analize ovisi o prirodi proizvoda (CFIA, 1995; EFSA, 2003). Genetski modificirani usjevi koji su tolerantni na glifosat su prošli sve analize koje se odnose na sirovi protein, sirove masnoće, vlakna, vlagu i pepeo, aminokiseline, masne kiseline, sekundarne metabolite koji mogu biti toksični i antinutritivne tvari (glukozinolati i eručna kiselina u repi i inhibitori tripsina u soji). Prikupljeni podaci mogu ukazivati na prisutnost ili odsutnost bilo kakvih nenamjernih promjena GM biljaka (CAC 2003; Nickson i Hammond 2002; Nida i sur., 1996; Ridley i sur., 2002; Taylor i sur., 1999).

2.3. PROBAVLJIVOST CP4 EPSPS I Cry1Ab PROTEINA

Skupina znanstvenika je provela istraživanje *in vitro* digestijom eksprimiranih proteina simuliranom gastričnom otopinom (SGF) i simuliranom intestinalnom otopinom (SIF) kako bi proučili alergенost sastojaka hrane dobivenih različitim biotehnoškim modifikacijama (Okunuki i sur., 2001). Za primjere eksprimiranih proteina izabrani su CP4 EPSPS izoliran iz *Agrobacterium* sp. koji je eksprimiran u genetski modificiranoj soji (**Tablica 3**) i Cry 1Ab izoliran iz *Bacillus thuringiensis* koji je eksprimiran u GM kukuruzu. Znanstvenici su prvo ispitali probavljivost čistog CP4 EPSPS i Cry 1Ab proteina pomoću SGF-a. Oba proteina su probavljena unutar 60 sekundi a nakon postupka zagrijavanja probavljivost se blago povisila. Potom su ispitali digestiju ekstrakta oba proteina u genetski modificiranim namirnicama i rezultati su ukazivali na isto vrijeme probavljivosti kao i kod čistih proteina. Vrijeme probavljivosti oba proteina postupkom SIF-a je iznosilo 240 minuta ali se postupkom zagrijavanja smanjilo na svega 5 sekundi. Ispitano je i vrijeme probavljivosti ekstrakta oba proteina SIF postupkom koje je bilo jednako vremenu probavljivosti čistih proteina. Iz navedenih rezultata, može se zaključiti da se probavljivost oba proteina povećava zagrijavanjem što utječe na njihovu alergенost u genetski modificiranim namirnicama koja je vrlo niska (Okunuki i sur., 2001).

Tablica 3 Vrijeme probavljivosti termički netretiranog CP4 EPSPS proteina izoliranog iz GM soje inkubacijom u simuliranom gastričnom fluidu (Okunuki i sur., 2001)

Vrijeme inkubacije (s)	Preostala količina (%)
0	100
5	11,0
10	3,10
20	N.D.

2.4. ANALIZA GMO U SIROVINAMA I SASTOJCIMA HRANE

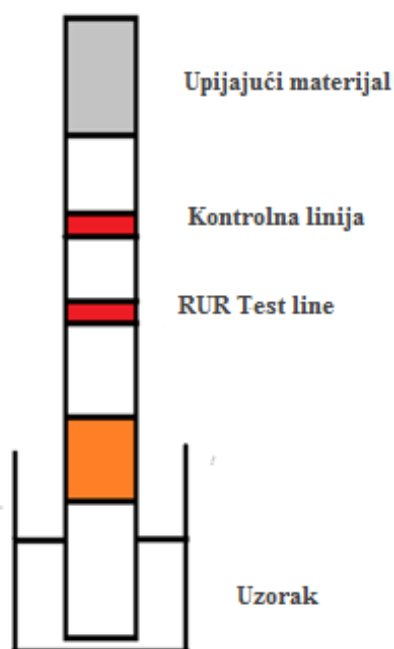
Uzorak i postupak uzorkovanja su vrlo važni za testiranje GMO u sirovinama i sastojcima hrane kako bi se izbjegli problemi nehomogenosti. Plan uzorkovanja bi trebao osigurati statistički reprezentativan uzorak a količina uzorka mora biti dovoljna za postizanje primjerene osjetljivosti. Iako nisu razvijeni točno određeni protokoli za detektiranje biotehnoški unaprijeđenih žitarica, istraživači se služe planovima američke vlade koje je objavila agencija za inspekciju žitarica, peradi i stoke (GIPSA, eng. *Grain Inspection, Packers and Stockyards Administrations*). Optimalna strategija uzorkovanja uključuje ravnotežu između osjetljivosti, cijene i pouzdanosti a koordinirana je smjernicama komisije Codexa Alimentariusu kako bi se osigurala primjerenost testiranja (Ahmed, 1999). Svaki genetski modificiran organizam zahtijeva referentni materijal. Žitarice koje imaju izmijenjen DNA ili eksprimirane proteine koriste se kao referentni materijal. Zahtjevi koje uzorci moraju ispuniti odnose se na konzistentnost i stabilnost tijekom dužeg vremenskog perioda. Dostupnost referentnih materijala je trenutno ograničena zbog cijene i brige oko intelektualnog vlasništva. Institut referentnih materijala i mjerenja u istraživačkom centru u Belgiji (IRMM) nudi ograničen broj referentnih materijala za genetski modificiranu soju, kukuruz i pšenicu (Ahmed, 2002).

Najprecizniji testovi za dokazivanje prisutnosti mutacija su testiranja provedena molekularno-biološkim metodama poput sekvenciranja gena ili samo određenog odsječka (PCR-om), ali zbog svojeg relativno visokog troška pripreme uzoraka (izolacije DNA) te cijene potrošnog materijala za rad uređaja (kao i samih uređaja), koriste se uglavnom kao potvrdna metoda, dok su jeftinija alternativa imunoanalitičke metode koje su dobre za brzi monitoring (Ahmed, 1995; Želježić, 2004).

Imunoanalitičke tehnike s antitijelima su vrlo dobre za kvalitativnu i kvantitativnu detekciju mnogih vrsta proteina u matrici kompleksa ukoliko je analit od interesa poznat. Imunoanalitičke tehnike se primjenjuju na svježim uzorcima hrane jer zahtijevaju očuvanje terciarne i kvarterne strukture proteina. Princip detekcije uključuje vezanje antitijela za protein kodiran od gena koji je ubačen u transferiranu stanicu (Želježić, 2004). Monoklonska (visokospecifična) i poliklonska (niskospecifična) antitijela se mogu koristiti ovisno o potrebnoj količini i ovisno o specifičnosti detekcije sustava (antitijela koja se vežu za cijele proteine ili određenu peptidnu sekvencu). Iz uzorka hrane se izoliraju ukupni proteini koji se vežu na čvrstu fazu. Potom se navedenim proteinima, dodaju primarna antitijela koja su specifična za eksprimirani protein koji se sintetizira u GM biljci. Nakon ispiranja nevezanih antitijela, dodaju se sekundarna antitijela obilježena s određenim enzimom. Pojavu obojenja

koja upućuje na prisutnost eksprimiranog proteina uzrokuje vezanje sekundarnog antitijela na primarno uz dodatak supstrata (Želježić, 2004).

Imunoanalitičke tehnike s antitijelima pričvršćene na čvrstu fazu se koriste u dvije izvedbe. Prva izvedba podrazumijeva kompeticijsko ispitivanje u kojem se detektor i analit natječu za vezanje antitijela, ili „sandvič“ ELISA u kojem se analit nalazi između detektora antitijela i hvatača antitijela (Cohet i sur., 1998). Obojeni ELISA „sandvič“ potom prelazi u donji dio trake kroz poroznu membranu koja sadrži dva hvatača. Prvi hvatač je specifičan za transgeni protein, dok je drugi hvatač specifičan za obilježeno antitijelo. Prisutnost kontrolne linije na membrani ukazuje na negativni rezultat, dok prisutnost dvije linije ukazuje na pozitivni rezultat. S obzirom na kompleksnost uzoraka hrane, praktični pristup za validaciju rezultata podrazumijeva upotrebu standardnih referentnih materijala s poznatom koncentracijom GMO koja je slična uzorku testa. U Europi postoji 38 laboratorija koji surađuju u području validacije metoda i provjeravaju točnost rezultata i preciznosti ELISA tehnike s monoklonskim antitijelima koja se vežu za protein CP4 EPSPS i s poliklonskim antitijelima konjugiranim s peroksidazom iz hrena (HRP, eng. *Horseradish peroxidase*) za detekciju RR (eng. Roundup Ready) soje (Lipp, 2000). ELISA tehnike su pogodne za određivanje GMO u sirovinama, poluprocesiranoj i procesiranoj hrani koja osigurava zaštitu eksprimiranog proteina od degradacije. Navedena metoda ima smanjenu sposobnost detekcije od PCR metode i manje je osjetljiva za testiranje gotove hrane s puno sastojaka posebice ukoliko je prag za detekciju nizak (Ahmed, 1995). Trenutno postoji nekoliko vrsta ELISA tehnika a to su „sandvič“ ELISA, kompeticijska, indirektna i nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitacijskih pločica (Butorac i sur., 2013). Metodologija „sandvič“ ELISA testa uključuje vezanje antitijela na čvrstu podlogu (najčešće mikrotitarsku ploču) tako da se ne ispiru puferiranom fiziološkom otopinom. Zatim se dodaje uzorak i ukoliko u uzorku postoji antigen (analit koji tražimo) on se veže za antitijelo. Nakon toga se dodaje antitijelo za detekciju koje se veže s druge strane za antigen, te dodaje se otopina sa sekundarnim antitijelom i enzimom koje se veže na antitijelo za detekciju, te se na kraju dodaje supstrat koji se pomoću enzima prevodi u vidljivu promjenu boje. Reakcija se očitava prema promjeni boje supstrata što ga enzim razgrađuje. Rezultate je moguće očitati golim okom ili mjerenjem absorbancije spektrofotometrom.



Slika 4 Shematski prikaz LFD testa za detekciju CP4 EPSPS proteina

LFD testovi (**Slika 4**) su varijacija ELISA-e koji umjesto mikrotitracijskih pločica koriste trake. Potom se postavljaju u epruvetu koja sadrži ekstrakt biljnog tkiva u kojem se nalazi transgeni protein kojeg traka adsorbira i kapilarnim silama dovodi do antitijela. Detektorsko antitijelo koje je specifično za eksprimirani protein se obilježi enzimom. Obilježena antitijela se tada mogu detektirati. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama intenziteta obojenja. LFD test trakice prikazuju rezultat unutar 5 minuta i prikladne su za inicijalni monitoring na samom početku prehrambenog lanca. Trakice su se prvobitno koristile za detekciju insekticidnog endotoksina bakterije *Bacillus thuringiensis* koji imaju zaštitni učinak na insekte poput Cry1 (Ab) u kukuruzu, te CP4 EPSPS proteina u soji, repi, pamuku i šećernoj repi.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.3. ZADATAK

U diplomskom radu je određena prisutnost genetski modificirane soje, kukuruza i pšenice na tržištu Republike Hrvatske. Uzorkovano je po 40 uzoraka soje, 40 uzoraka kukuruza te 20 uzoraka pšenice namijenjene ljudskoj uporabi te je ispitana prisutnost CP4 EPSPS proteina, kao markera za genetsku inserciju *cp4 epsps* gena u transgenim biljkama. Hrvatska ne dozvoljava uzgoj GM biljaka, ali se one smiju naći na tržištu i u neoznačenim proizvodima u količini do 0,9%. Proizvodi s većim udjelom moraju nositi etiketu GMO proizvoda. U odabranim uzorcima u kojima se dokaže prisutnost CP4 EPSPS proteina, dodatno će se ispitati prisutnost sljedećih GMO proteina: Bt-Cry1Ab, Bt-Cry3Bb1, Bt-Cry1F, Bt-Cry34Ab1, PAT i VIP3A.

3.4. MATERIJALI I METODE

Uzorci su prikupljeni iz svih županija Republike Hrvatske. Zastupljenost uzoraka tri testirane kulture je varirala o lokaciji budući da se navedene kulture ne uzgajaju u svim dijelovima županija jednako dobro. Plan uzorkovanja je uključivao 100 uzoraka.

Uzorci su samljeveni u mlinu za usitnjavanje zrna (M20, IKA, Njemačka). Svi uzorci su zapakirani u prozirne vrećice (100 grama), kodirani i spremni za daljnju analizu. U Eppendorf epruvetu od 1,5 mL je prebačeno 500 mg uzorka (**Slika 5**, **Slika 6** i **Slika 7**) uz dodatak 0,75 mL vode. Uzorci su promiješani na tresilici 30 sekundi kako bi se sadržaj u tubi homogenizirao. Za detekciju CP4 EPSPS proteina u testiranim kulturama upotrijebljen je AgraStrip® RUR Seed & Leaf test (RomerLabs, Austrija) koji funkcionira na principu testa LFD-a.



Slika 5 Uzorci samljevenog kukuruza



Slika 6 Uzorci samljevene pšenice



Slika 7 Uzorci samljevene soje

U svaki pojedinačni uzorak je okomito stavljena LFD trakica za detekciju transgena. Kontrolna linija na trakici za testiranje treba biti približno 1 cm iznad uzorka. Crvena boja navedene linije označava da trakica funkcionira ispravno. Crvena linija koja se nalazi ispod kontrolne linije je RUR Test line (eng. *Roundup Ready*) koja ukazuje na pozitivan rezultat za CP4 EPSPS protein. Ukoliko trakica za testiranje pokaže dvije crvene linije, analiza je završena i uzorak je GMO pozitivan. Međutim, ako se na trakici pojavi samo jedna crvena linija a to je kontrolna linija, uzorak je negativan za RUR transgensko svojstvo. Postupak se treba ponoviti ukoliko se na trakici ne pojavi čak ni kontrolna linija sa svježim LFD testom. Nakon 5 minuta, rezultati testiranja trakicama su interpretirani.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U **Tablici 4** je prikazana podjela prema vrsti i podrijetlu pojedinog uzorka. Analizirano je 100 uzoraka na području cijele Hrvatske. Zastupljenost pojedinih biljaka nije svugdje u Hrvatskoj jednaka što je utjecalo na gustoću uzorkovanja prikazanu na **Slikama 8-10**.

Tablica 4 Rezultati detekcije transegena u uzorcima

Broj uzoraka	Vrsta uzorka	Županija	GM (+/-)
12	soja	Brodsko-posavska	-
11		Osječko-baranjska	-
6		Vukovarsko-srijemska	-
2		Međimurska	-
2		Požeško-slavonska	-
1		Virovitičko-podravska	-
1		Krapinsko-zagorska	-
1		Karlovačka	-
1		Bjelovarsko-bilogorska	-
1		Varaždinska	-
1		Zagrebačka županija	-
1		Zadarska	-
11		kukuruz	Brodsko-posavska
9	Osječko-baranjska		-
3	Splitsko-dalmatinska		-
2	Vukovarsko-srijemska		-
2	Virovitičko-podravska		-
1	Ličko-senjska		-
1	Sisačko-moslavačka		-
1	Koprivničko-križevačka		-
1	Zadarska		-
1	Krapinsko-zagorska		-
1	Međimurska		-
1	Primorsko-goranska		-
1	Bjelovarsko-bilogorska		-
1	Varaždinska		-
1	Karlovačka		-
1	Istarska		-
1	Dubrovačko-neretvanska		-
1	Šibensko-kninska		-
4	pšenica	Osječko-baranjska	-
3		Bjelovarsko-bilogorska	-
3		Vukovarsko-srijemska	-
2		Brodsko-posavska	-
2		Požeško-slavonska	-
2		Virovitičko-podravska	-
1		Ličko-senjska	-
1		Varaždinska	-
1		Koprivničko-križevačka	-
1		Međimurska	-

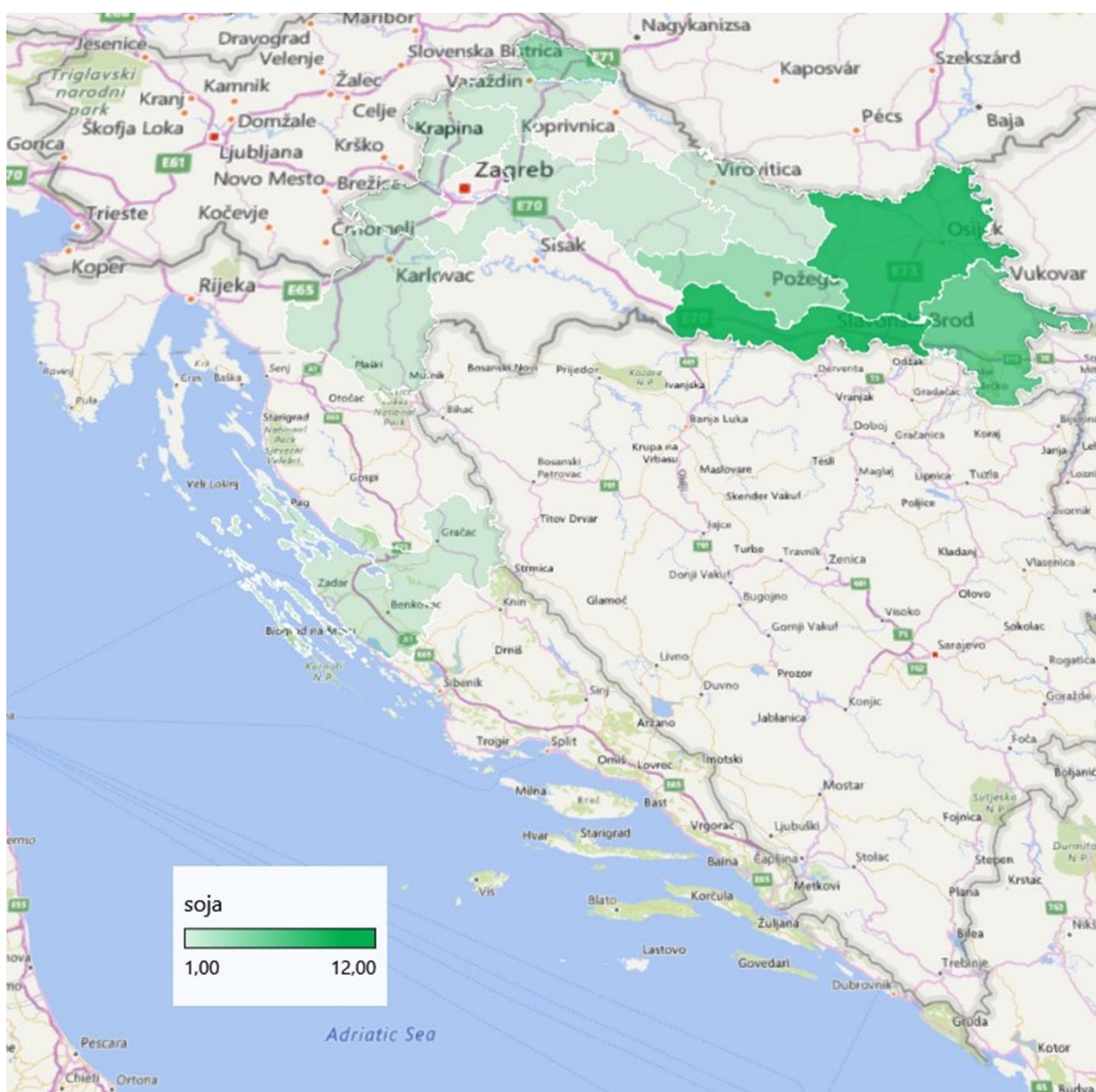
Iz priložene **Tablice 4** vidljivo je da su rezultati testiranja svih uzoraka negativni što znači da uzorci ne sadrže CP4 EPSPS protein koji u ovim kulturama može biti prisutan jedino ako su dobivene genetskim inženjeringom. Kontrolna linija na tracicama za testiranje je bila označena crvenom bojom što upućuje na pravilno provedenu ekstrakciju i pripremu uzoraka. Takvi rezultati su u skladu sa zakonom NN 28/2013 (HS, 2013a), te se s tog pogleda rezultati mogu smatrati ispravnima. Navedenim Zakonom se utvrđuje okvir za provedbu pojedinih odredaba sljedećih uredbi Europske unije kao što su Uredba (EZ) br. 1829/2003 Europskoga parlamenta i Vijeća (EC, 2003b) glede prijave za odobrenje nove genetski modificirane hrane i hrane za životinje, notifikacije o postojećim proizvodima i slučajne, ali tehnološki neizbježne prisutnosti genetski modificiranog materijala koji je pri procjeni rizika povoljno ocijenjen (Uredba br. 641/2004 o detaljnim pravilima za provedbu Uredbe br. 1829/2003) (EC, 2003b). Uporaba GMO-a obavlja se na način kojim se sprječava ili na najmanju mjeru smanjuje opasnost za bioraznolikost, vodeći računa o opasnostima za zdravlje ljudi, životinja i okoliš. U tu svrhu se osiguravaju i provode odgovarajuće mjere zaštite radi sigurne uporabe GMO-a NN 28/2013 (HS, 2013a).

U Hrvatskoj je provedeno istraživanje o percepciji rizika potrošača vezano za genetski modificiranu hranu metodom telefonskog intervjuiranja tijekom rujna i listopada 2016 godine. Hrvatska agencija za hranu (HAH) je u suradnji s nezavisnom agencijom za istraživanje tržišta provela istraživanje (HAH, 2017). Ispitivanje je uključivalo 800 građana RH oba spola starosti od 15 do 65 godina, u 6 regija i 4 veličine naselja. Tri četvrtine ispitanika navodi negativno mišljenje o GM hrani što ukazuje na neinformiranost društva i nepovjerenje u znanost. Vrlo je važno na stručan i kvalitetan način identificirati percepciju rizika porijeklom od GM hrane budući da se perceptivni i stvarni rizici po navedenom pitanju značajno razlikuju. Ispitanici smatraju da je potencijalna dobrobit GM hrane niska i da nadležna tijela trebaju konzultirati javnost o mjerama kontrole GM hrane (HAH, 2017). Nadležna tijela koja su zadužena za provedbu Zakona o provedbi uredbe (EU) br. 1829/2003 (EC, 2003b) i 1830/2003 (EC, 2003a) su Ministarstvo zdravlja (Odjel za GMO) u suradnji s Ministarstvom zaštite okoliša i energetike, Ministarstvom znanosti i Ministarstvom poljoprivrede. Neki od ciljeva upravljanja rizikom GMO u hrani uključuju zaštitu javnog zdravlja i interesa potrošača, pružanje dovoljno informacija za odabir hrane, osiguravanje ravnopravnosti u kretanju robe na tržištu RH/EU i pravilno označavanje GM hrane. Označavanje GM hrane nije obvezno ukoliko proizvod ili sastojci dobiveni ili koji sadržavaju GMO u količini manjoj od 0,9% jer može biti rezultat slučajne tehnološke kontaminacije koju subjekt u poslovanju s hranom mora dokazati nadležnom tijelu prema Uredbi br. 1829/2003 (EC, 2003b). Ukoliko se na tržištu pojavi proizvod koji sadrži više od 0,9% GMO, naređuje se povlačenje s tržišta, ispravak deklaracije i specifikacije proizvoda te se na osnovi članaka Zakon o izmjenama i

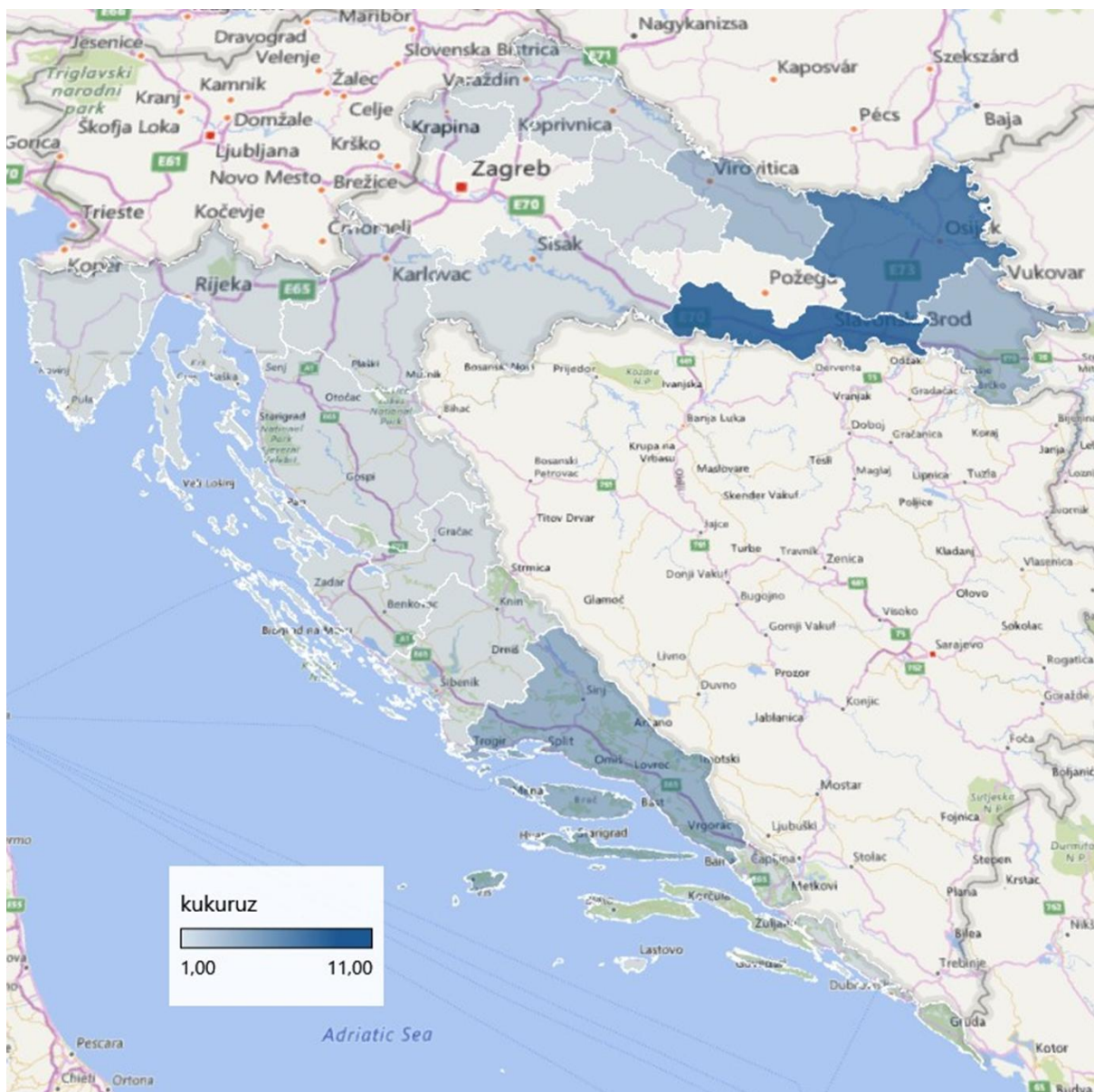
dopunama Zakona o službenim kontrolama koje se provode sukladno propisima a hrani, hrani za životinje, o zdravlju i dobrobiti životinja NN 56/15, (HS, 2015) Zakona o izmjeni zakona o hrani NN 14/14 (HS, 2014) i Zakona o sanitarnoj inspekciji NN 113/08 (HS, 2008) donosi se Usmeno rješenje kojim se fizičkoj ili pravnoj osobi privremeno zabranjuje uporaba radnih i pomoćnih prostorija kao i rad osoba. Lokalnim odlukama, čak 20 županija je proglašeno GMO free. Republika Hrvatska se u studenom 2013 godine pridružila programu „DONAU SOYA INITIATIVE” koja promovira uzgoj i preradu soje koja ne sadrži GMO (Zoretić-Rubes, 2017).

Sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (RASFF, eng. *the Rapid Alert System for Food and Feed*) je informatički alat za brzu razmjenu informacija među nadležnim nacionalnim tijelima o zdravstvenim rizicima povezanim s hranom i hranom za životinje. RASFF portal je online baza podataka koja sumira informacije o najnovijim RASFF obavijestima i pruža mogućnost pretrage informacija o zabilježenim nepravilnostima o hrani i hrani za životinje. Trenutno na RASFF portalu nema prijavljenih nepravilnosti o GM hrani u RH. Zabilježeno je 575 prijavljenih nepravilnosti o genetski modificiranoj hrani i hrani za životinje u Europi a samo jedna nepravilnost je procijenjena ozbiljnom za ljudsko zdravlje. Riječ je o neovlaštenom fermentiranom proizvodu iz Francuske koji je nastao proizvodnjom aminokiselina iz kulture genetski modificiranog organizma (*E. coli* K12) za stočnu hranu (RASFF, 2017). Pravilnikom o uvjetima monitoringa utjecaja genetski modificiranih organizama ili proizvoda koji sadrže i/ili se sastoje ili potječu od genetskih modificiranih organizama i njegove uporabe u procjeni rizika za okoliš točne i identificirati nastanak štetnih učinaka GMO-a ili njegove uporabe na zdravlje ljudi i okoliš koji nisu predviđeni u procjeni rizika za okoliš. Nacrt plana monitoringa sastoji se od tri osnovna dijela a to su strategija, metodologija monitoringa i analiza, izvješćivanje i preispitivanje. Strategija monitoringa uključuje uočavanje mogućih učinaka koji mogu nastati stavljanjem GMO-a na tržište. Metodologija praćenja sadrži smjernice o vrsti parametara i elemenata koje će možda biti potrebno uočiti i pratiti kao dio programa monitoringa, kao i o sredstvima za provođenje takvog praćenja, uključujući područja koja se prate i učestalost praćenja. Procjena podataka mora uključivati statističke analize s odgovarajućim vrijednostima standardnih pogrešaka kako bi se omogućilo donošenje odluka. Monitoring genetski modificiranih organizama u hrani biljnog i životinjskog podrijetla proveden 2015. godine u RH obuhvatio je praćenje hrane koja potencijalno sadrži GMO ili se sastoji od GMO-a (Domitrović, 2016). To su proizvodi na bazi soje, kukuruza, pšenice, papaje i riže. Monitoring hrane se provodio u 6 gradova u 5 faza pri čemu je ukupno uzorkovano 180 uzoraka hrane. U 7 uzoraka od navedenih 180 uzoraka je detektiran GMO, a dokazana količina je ispod dozvoljene razine (0,9%). U svih 7 uzoraka je utvrđena prisutnost GM soje u količini ispod granice kvantifikacije

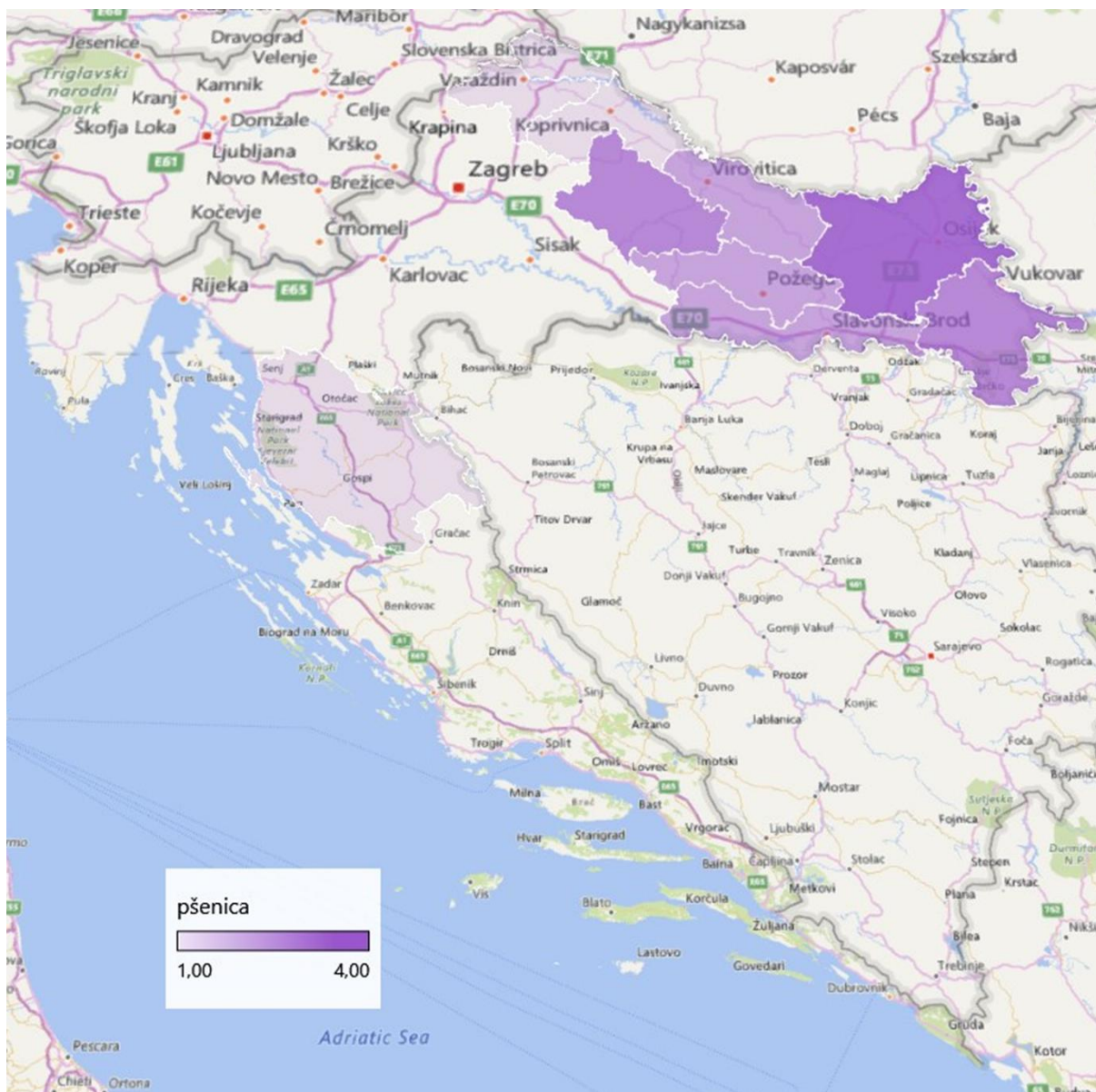
te predstavlja slučajan i tehnički neizbježan trag prisutnosti GMO-a. Uzorci u kojima je detektiran GMO su porijeklom bili iz Amerike i Njemačke (Domitrović, 2016). Nakon stavljanja GMO-a na tržište, podnositelj izvješća ima pravnu obvezu osigurati da se praćenje i izvješćivanje provode u skladu s uvjetima iznesenima u dopuštenju a izvješća o tom praćenju moraju se predati Europskoj komisiji i nadležnom tijelu. U skladu sa Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o genetski modificiranim organizmima NN 15/18 (HS, 2018), podaci moraju biti dostupni i javnosti a ukoliko korisnici ili drugi izvori iznesu nove podatke o riziku, podnositelj izvješća je obavezan odmah poduzeti potrebne mjere za zaštitu zdravlja ljudi i okoliša te o tome obavijestiti nadležno tijelo (HS, 2018).



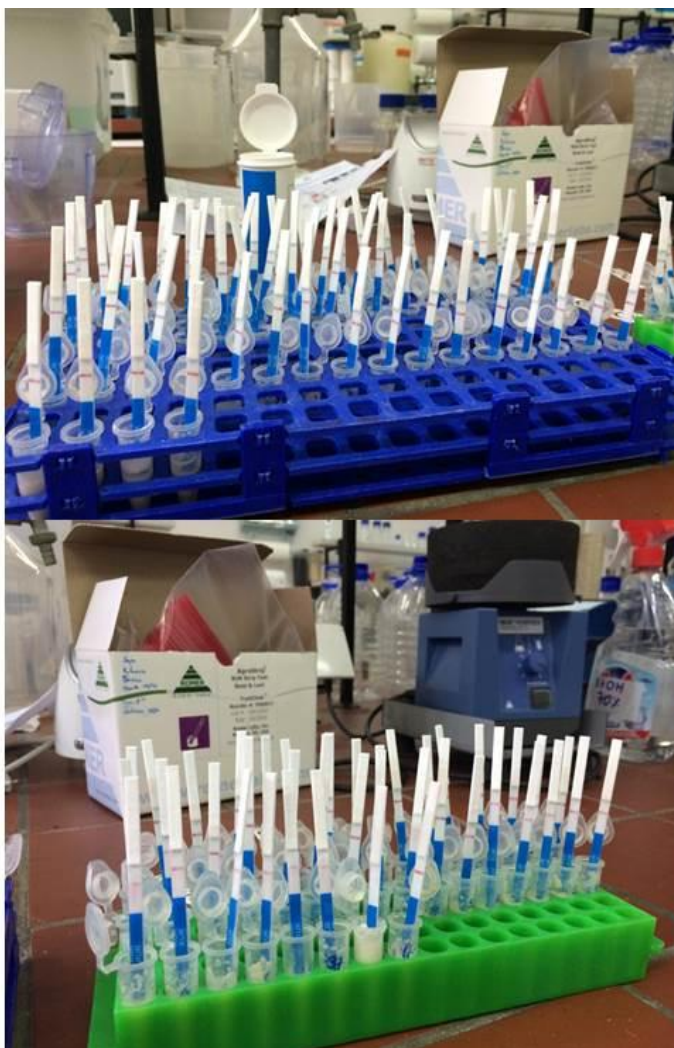
Slika 8 Raspodjela nasumično izuzetih uzoraka soje s područja Republike Hrvatske. Gradijentom boje je označen broj uzoraka izuzetih iz svake županije



Slika 9 Raspodjela nasumično izuzetih uzoraka kukuruza s područja Republike Hrvatske. Gradijentom boje je označen broj uzoraka izuzetih iz svake županije



Slika 10 Raspodjela nasumično izuzetih uzoraka kukuruza s područja Republike Hrvatske. Gradijentom boje je označen broj uzoraka izuzetih iz svake županije



Slika 11 Rezultati testiranja prikupljenih uzoraka soje, pšenice i kukuruza

Na **Slici 11** su prikazani uzorci u Eppendorf epruveti s uronjenim LFD trakicama koje služe za brzu i jednostavnu detekciju GMO-a. Rezultati testiranja su negativni što se očituje pozitivnom kontrolnom linijom na prikazanim trakicama.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja provedenih u ovom radu mogu se izvesti zaključci:

- Nijedan uzorak ne sadrži CP4 EPSPS protein. Riječ je o markeru za genetsku inserciju *cp4 epsps* gena u transgenim biljkama. Prisutnost navedenog proteina ukazuje na genetsku modifikaciju organizma;

- Rezultati su u skladu sa zakonom (NN 28/2013) kojim se utvrđuje okvir za provedbu uredbe Europske unije (EZ) br. 1829/2003 te se ispitivani uzorci, s obzirom na navedeni zakon mogu smatrati ispravnima.

6. LITERATURA

- Ahmed FE: Application of molecular biology to biomedicine and toxicology. *Journal of Environmental Science and Health* 11:1-51, 1995.
- Ahmed FE: Safety standards for food contaminants. *Environmental Contaminants in Food* 13:500-570, 1999.
- Ahmed FE: Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology* 20:215-223, 2002.
- Alibhai MF, Stallings WC: Closing down on glyphosate inhibition with a new structure for drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2944-2946, 2001.
- Baker HG: The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5:1-24, 1974.
- Butorac A, Marić M, Badanjak Sabolović M, Hruškar M, Rimac Brnčić S, Bačun Družina V: Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 8:90-101, 2013.
- CFIA, Canadian Food Inspection Agency: *Determination of environmental safety of Monsanto Canada Inc.'s roundup herbicide-tolerant Brassica napus canola line GT73*. CFIA, 1995.
- CAC, Codex Alimentarius Commission: *Principles for the risk analysis of food derived through modern biotechnology*. CAC, 2003.
- Cohen SN, Cgang AC, Boyer HW, Helling RB: Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America* 70:3240-3244, 1973.
- Cohet O, Teillaud JL, Sautes C: *Immunological Techniques Made Easy*. Wiley, Paris, 1998.
- Domitrović I: *Otkriveno koliko GMO-ova ima na policama u hrvatskim trgovinama*. Dnevnik.hr, 2016. <https://dnevnik.hr/vijesti/hrvatska/koliko-gmo-a-ima-na-policama-trgovina-u-hrvatskoj---424230.html> [15.04.2018.]
- EFSA, European Food Safety Agency: *Opinion of the Scientific Panel on genetically modified organisms on a request from the Commission related to the Notification for the placing on the market of herbicide-tolerant genetically modified maize NK603, for import and processing under part C of Directive 2001/18/EC from Monsanto*. EFSA, 2003.
- EFSA, European Food Safety Agency: *Consolidated presentation of the joint Scientific Opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the „Use of the Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants“ and the Scientific Opinion of the GMO Panel on „Consequences of the Opinion on the Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants on Previous EFSA Assessments of Individual GM Plants“*. EFSA, 2009.
- EFSA, European Food Safety Agency: *Scientific opinion an application for the placing on the market of insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize MON 89034 x 1507 x MON 88107 x 59122 and all subcombinations of the individual events as present in its segregating progeny, for food and feed uses, import and processing under regulation (EC) no 1829/2003 from Dow AgroSciences and Monsanto*. EFSA, 2010.

- EC, European Commission: Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća od 28. siječnja 2002. o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane, 2002.
- EC, European Commission: *Uredba (EZ) br. 1830/2003 Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2003. o sljedivosti i označivanju genetski modificiranih organizama te sljedivosti hrane i hrane za životinje proizvedene od genetski modificiranih organizama i izmjeni Direktive 2001/18/EZ*. Službeni list Europske unije, 2003a.
- EC, European Commission: *Uredba (EZ) br. 1829/2003 Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2003. o genetski modificiranoj hrani i hrani za životinje*. Službeni list Europske unije, 2003b.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations: *The state of food insecurity in the world*. FAO, 2015.
- Fischhoff DA: Insect tolerant transgenic tomato plant. *Biotechnology* 5:807-813, 1987.
- Franz JE, Mao MK, Sikorski JA: *Glyphosate: A unique global herbicide*. American Chemical Society Monograph, Washington, 1997.
- Gupta A: Governing trade in genetically modified organisms. The Cartagena protocol on biosafety. *Environment* 42:22-23, 2000.
- HAH, Hrvatska agencija za hranu: *Percepcija i stavovi potrošača na području Republike Hrvatske vezano za problematiku GM hrane*. HAH, 2017.
- ISAAA, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications: *Gene: cp4 epsps (aroA:CP4)*. ISAAA, 2018.
- James C: *Global Status of Commercialized Biotech/Gm Crops: 2011*. ISAAA Brief No. 43, ISAAA, 2011.
- James C: *Global Status of Commercialized Biotech/Gm Crops: 2012*. ISAAA Brief No. 44, ISAAA, 2012.
- James C: *Global status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013*. ISAAA Brief No. 46, ISAAA, 2013.
- Kamle S, Ali S: Genetically modified crops: Detection strategies and biosafety issues. *Gene*, 522:123-132, 2013.
- Kishore G, Shah D, Padgett S, dells-Cippa G, Gasser C, Re D, Hironak C, Taylor M, Wibbenmeyer J, Eichholtz D, Hayford M, Hoffmann N, Delannay X, Horsch R, Klee H, Rogers S, Rochester D, Brundage L, Sanders P, Fraley RT: 5-enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase. From Biochemistry to Genetic Engineering of Glyphosate Tolerance. U *Biotechnology for Crop Protection*, str. 37-48. American Chemical Society, Washington, 1988.
- Liang CL, Zhang XP, Song Y, Jia XD: Immunotoxicological evaluation of wheat genetically modified with TaDREB4 gene on BALB/c mice. *Biomedical and Environmental Sciences* 26:663-670, 2013.

- Liu P, He X, Chen D, Luo Y, Cao S, Song H, Liu T, Huang K, Xu W: A 90-day subchronic feeding study of genetically modified maize expressing Cry1Ac-M protein in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 50:3215-3221, 2012.
- Lipp M: Validation of an immunoassay for the detection and quantification of Roundup-Ready soybeans in food and food fractions by the use of reference material. *Journal of AOAC International* 83:99-127, 2000.
- Mallory-Smith C, Zapiola M: Gene flow from glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science* 68:428-440, 2008.
- Marinho CD, Martins FJO, Amaral Junior AT, Goncalves LSA, dos Santos OJAP, Alves DP, Brasileiro BP, Peternelli LA: Genetically modified crops: Brazilian law and overview. *Genetics and Molecular Research* 3:5221-5240, 2014.
- MZSS, Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH: *Pravilnik o uvjetima monitoringa utjecaja genetski modificiranih organizama ili proizvoda koji sadrže i/ili se sastoje ili potječu od genetski modificiranih organizama i njihove uporabe*. Narodne novine 110/08, 2008.
- Nickson TE, Hammond BG: Case study: Canola Tolerant to Roundup Herbicide, an Assessment of its Substantial Equivalence Compared to Nonmodified Canola. U *Genetically Modified Crops*, str. 138-163. CRC Press, London 2002.
- Nida DL, Patzer S, Harvey P, Stipanovic R, Wood R, Fuchs RL: Glyphosate-tolerant cotton: the composition of the cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44:1967-1974, 1996.
- Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK: Identification of a brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *The new england journal of medicine*, 334:688-692, 1996.
- HS, Hrvatski sabor: *Zakon o genetski modificiranim organizmima*. Narodne novine 70/05, 2005.
- HS, Hrvatski sabor: *Zakon o sanitarnoj inspekciji*. Narodne novine 113/08, 2008.
- HS, Hrvatski sabor: *Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o genetski modificiranim organizmima*. Narodne novine 28/13, 2013a.
- HS, Hrvatski sabor: *Zakon o provedbi Uredbe (EZ) br. 1946/2003 o prekograničnom prijenosu genetski modificiranih organizama*. Narodne novine 81/13, 2013b.
- HS, Hrvatski sabor: *Zakon o izmjeni zakona o hrani*. Narodne novine 14/14, 2014.
- HS, Hrvatski sabor: *Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o službenim kontrolama koje se provode sukladno propisima a hrani, hrani za životinje, o zdravlju i dobrobiti životinja*. Narodne novine 56/15, 2015.
- HS, Hrvatski sabor: *Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o genetski modificiranim organizmima*. Narodne novine 15/18, 2018.
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development: *Consensus document on the biology of Brassica napus L. (oilseed rape)*. OECD, Paris, 1997.

- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development: *Consensus document on the biology of Glycine max L.* OECD, Paris, 2000.
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development: *Consensus document on the biology of Beta vulgaris L.* OECD, Paris, 2001.
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development: *Consensus document on the biology of Zea mays.* OECD, Paris, 2003.
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development: *Points to consider for consensus documents on the biology of cultivated plants.* OECD, Paris, 2006.
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development: *Consensus document on the biology of cotton (Gossypium spp.).* OECD, Paris, 2008.
- OGTR, Office of the gene technology regulatory. *The biology of Gossypium hirsutum L. and Gossypium barbadense L.* OGTR, Canberra, 2008.
- Okunuki H, Teshima R, Shigeta T, Sakushima J, Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Sawada J: Increased Digestibility of Two Products in Genetically Modified Food (CP4-EPSPS and Cry 1Ab) after Preheating. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 43:68-73, 2001.
- Oliver MJ: Why we need GMO crops in agriculture. *Missouri Medicine* 6:492-507, 2014.
- Qi X, He X, Luo Y, Li S, Zou S, Cao S, Tang M, Delaney B, Xu W, Huang K: Subchronic feeding study of stacked trait genetically-modified soybean (3Ø5423 × 40- 3-2) in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 50:3256-3263, 2012.
- Pellegrino E, Bedini S, Nuti M, Ercoli L: Impact of genetically engineered maize on agronomic, environmental and toxicological traits: a meta-analysis of 21 years of field data. *Scientific Reports*, 8:3113, 2018.
- RASFF: *RASFF Portal*. Rapid Alert System for Food and Feed, 2017. https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2017.1544 [27.03.2018.]
- Rhode BE: Female specimen of Helicoverpa punctigera. Landcare Research New Zealand Ltd, 2011. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Helicoverpa_punctigera_female.jpg [13.05.2018.]
- Ridley WP, Sidhu RS, Pyla D, Nemeth MA, Breeze ML, Astwood D: Comparison of the nutritional profile of glyphosate-tolerant event NK603 with that of conventional corn (*Zea mays L.*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50:7235-7243, 2002.
- Sammons RD, Gaines TA: Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science* 70:1367-1377, 2014.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:775-806, 1998.

- Schreiber GA: Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. *Food Control* 10:351-352, 1999.
- Steinrucken HC, Amrhein N: The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 94:1207-1212, 1980.
- Tabashnik BE: Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 39:47-79, 1994.
- Taylor NB, Fuchs RL, MacDonald J, Shariff AR, Padgett SR: Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47:4469-4473, 1999.
- Warwick SI, Legere A, Simard MJ, James T: Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology* 17:1387-1395, 2008.
- WHO: *Frequently asked questions on genetically modified foods*. World Health Organization, 2014. http://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/en/ [01.02.2018.]
- WHO: *Frequently asked questions on genetically modified foods*. World Health Organization, 2016. http://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/en/. [03.01.2018]
- Zdziarski IM, Edwards JW, Carman JA, Haynes JI: GM crops and the rat digestive tract. *Environment International* 73:423-433, 2014.
- Zhang C, Wohlhueter R, Zhang H: Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems. *Food Science and Human Wellness* 5:116-123, 2016.
- Zoretić-Rubes V: *Strategija i izazovi upravljanja rizicima GMO-a u hrani*. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, 2017. https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2017/10/1.2.2.-Zoreti%C4%87-Rubes_Strategije-i-izazovi-u-upravljanju-rizikim-u-podru%C4%8Dju-GM-hrane.pdf [23.03.2018.]
- Želježić Davor: Genetički preinačeni organizmi u hrani. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55:301-312, 2004.