

Sveučilište u Splitu
Kemijско – tehnološki fakultet

Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju

OSNOVE ZNANOSTI O HRANI

Stručni studij

Smjer: Prehrambena tehnologija

ak. god. 2015./2016.

KVALITATIVNI TEST ZA PROTEINE

Proteini ili bjelančevine u većim ili manjim količinama zastupljeni su u gotovo svoj hrani osim u rafiniranim šećerima i mastima. Hrana životinjskog podrijetla poput mesa, riba, jaja (bjelanjak), mlijeka, jogurta i sira najbogatiji su izvor proteina u kvalitativnom i kvantitativnom smislu. U hrani biljnog porijekla najveću količinu bjelančevina ima soja, a nalaze se i u mahunarkama i žitaricama, grahu, leći, pšenici, riži, kukuruzu, ječmu, zobi i raži. Osim što sadrže mnogo bjelančevina, te su namirnice izvor svih esencijalnih aminokiselina.

U ovoj vježbi koristiti ćemo specifične testove koji se zasnivaju na bojanju određenih vrsta proteina prisutnih u hrani, na osnovu razlike u njihovoj strukturnoj građi. Obojene reakcije se mogu koristiti i kao kvalitativni, a u nekim slučajevima i kao kvantitativna analiza proteina. Samo jedan pozitivan ovakav test nije dokaz prisutnosti proteina u hrani. Potrebno je provesti nekoliko različitih testova karakterističnih za pojedine grupe proteina.

Materijal:

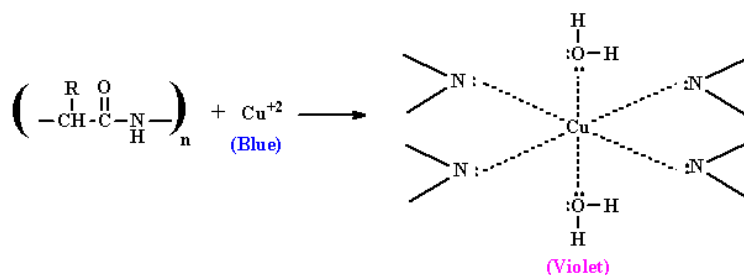
Epruvete, Različita hrana (npr. jaja, želatina, mlijeko, kruh, brašno, šećer, mast), jaka lužina (10%-tna otopina NaOH), razrijeđena otopina CuSO₄, nitratna kiselina, koncentrirana HCl, otopina saharoze, kalijev hidroksid, otopina olovo acetata, otopina ninhidrina.

Postupak:

Napraviti suspenziju male količine hrane u 5 mL vode u svakoj od 5 epruveta. Ispitati hranu s sljedećim testovima:

1. Biuret test

Ovaj test je specifičan za spojeve s dvije ili više peptidnih veza. Dipeptidi ne daju pozitivan test ali svi drugi polipeptidi da. U testu nastaje obojeni kompleks koji se sastoji od bakra između dvije peptidne veze (*Slika1.*). Ukoliko smjesa poprimi ***ljubičastu*** boju ***test je pozitivan.***



Slika 1. Nastajanje obojenog kompleksa

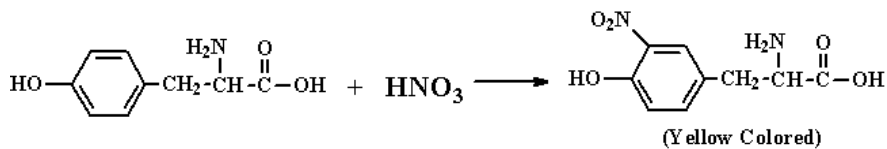
Suspenciji hrane u epruveti dodati nekoliko kapi (5 kapi) jake lužine (10% NaOH), potom nekoliko kapi (2 kapi) razrijeđene CuSO₄ otopine i promiješati.



Slika 2. Karakteristična boja pozitivnog Biuret testa

2. Xanthoprotetic test

Ovaj test je specifičan za proteine koji sadrže amino kiseline s benzenskim prstenom kao što je tirozi, fenilalanin i triptofan. **Pozitivan test** će očituje promjenom **žute boje** u izgorjeno **narančastu**. Do promjene obojenja dolazi zbog vezanja NO₂ skupina na orto i para položaj benzenskog prstena pod utjecajem HNO₃ (65%).

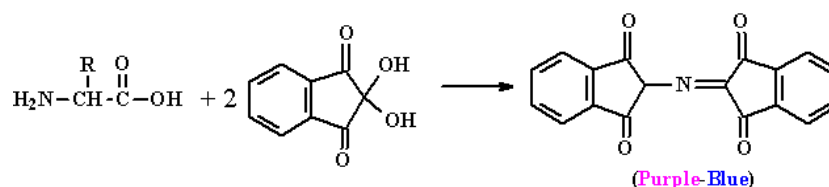


Slika 3. Kemijska reakcija kiseline s proteinima

Suspenciji hrane u epruveti dodati oko 3 mL (10 kapi) koncentrirane nitratne kiseline. Epruvete nekoliko minuta (3-5 min) zagrijati i vodenoj kupelji, izvaditi na stol, te potom pratiti promjenu boje. Sadržaj potom neutralizirati lužinom i ponovno zabilježiti promjene.

3. Ninhydrin Test

Ovaj test je specifičan za proteine s slobodnim amino i karboksilnim skupinama. Pojava **ljubičaste boje** predstavlja **pozitivan test** i ukazuje na prisustvo barem jedne slobodne amino skupine i jedne slobodne karboksil skupine, uz iznimku prolin i hidroksiprolin, koji daju žuti produkt.



Slika 4. Kemijska reakcija kiseline s proteinima

U svaku epruvetu otopini proteina dodati nekoliko mL (5 kapi) ninhidrin reagensa (triketohidrindene hidrata) i sadržaj zagrijati u vodenoj kupelji (5 min). Zabilježiti promjene.

4. Test s sumporom

Crna precipitacija (olovo sulfid) je formiran ako aminokiselina sadrži sumpor kao što su cistein i metionin. U vodenoj kupelj zagrijati otopinu proteina (pr. 2 mL mlijeka) s nekoliko mililitara KOH i nakon toga dodati nekoliko mL olovo acetata. Zabilježiti promijene.

KOAGULACIJA PROTEINA

Jedna od namirnica koja se smatra izvanrednim izvorom nutrijenata je jaje. Jedno jaje (ovisno o veličini) osigurava između 4,5–6 g proteina, a polovica te količine nalazi se u bjelanjku. Bjelanjak se smatra idealnim izvorom proteina jer sadrži sve esencijalne aminokiseline u pravim omjerima. Od ukupnih masti u jajetu, više od polovice otpada na nezasićene masne kiseline. Jaja su nadalje dobar izvor kolina, luteina, željeza, riboflavina (vitamina B2), folne kiseline, biotina, vitamina B12, vitamina D te vitamina E. Najzastupljeniji protein u sirovom bjelanjku jajeta je albumin. Dodatno, albumin je bogat argininom, aminokiselinom koja potiče proizvodnju dušičnog oksida (NO – koji proširuje krvne žile, što rezultira povećanim prilivom krvi u mišiće i osigurava im veći dotok kisika, nutrijenata i anaboličkih hormona). Protein bjelanjka sadrži oko 40 različitih bjelancevina među kojima je i ovalbumin-tip glikoproteina (protein na koji su vezani ugljikohidrati) koji čini čak 55% bjelanjka. Jedan od proteina koji su u vrlo malom postotku (0,5%) je avidin, koji ima tu manu što se veže za biotin, inače vrlo važan B-vitamin i uzrokuje njegov nedostatak! Utjehu predstavlja podatak da je avidin aktivan samo u sirovom obliku, te je opasnost samo za one koji konzumiraju sirova i nedovoljno termički obrađena jaja što je slučaj i kod salmonele.

U ovoj vježbi pratit će se utjecaj temperature, kao i pH na promjene u smjesi albumina i testiranih otopina različitih koncentracija. Budući da je albumin, protein koji se nalazi u bjelanjku jajeta, negativno nabijen, pratit će se i utjecaj prisutnih iona testiranih otopina kao i njihova koncentracija na koagulaciju albumina. Koagulaciju proteina uzrokovati, odnosno potaknuti će pozitivno nabijeni ioni. Negativni ioni ne mogu koagulirati albumin, kao ni dodatak kiseline. Dodatak kiseline promijeniti će pH medija, a time i naboja albumina koji će postati kation i neće koagulirati s prisutnim pozitivno nabijenim ionima. Ukoliko je u kiselom mediju albumin postao kation, a u smjesi je prisutan negativno nabijeni ion doći će do koagulacije.

Materijal:

Epruvete, pipete, jaja, vodena kupelj, destilirana voda, otopine različitih koncentracija navedene u *Tablici 3*.

Postupak:

Razrijediti bjelanjak jajeta (prethodno malo tučen) s 3 dijela destilirane vode. Miješati smjesu i nakon miješanja filtrirati. U epruvete pipetirati po 10 mL gore opisane albumin otopine i po 5 mL pripremljenih otopina u *Tablica 3*. U jednu epruvetu umjesto 5 mL otopine, dodati 5 mL destilirane vode. Zabilježiti pH otopina koje sadrže destiliranu vodu, 0,01 M i 0,1 M HCl. Zagrijati epruvete u vodenoj kupelji te odrediti temperaturu na kojoj pojedine otopine postaju zamućene.

U dvije epruvete testirati utjecaj smjese dviju otopina na koagulaciju proteina. U prvu epruvetu otopini albumina dodati 10 mL octene kiseline i 5 mL otopine bakrova(II) sulfata. U drugu epruvetu dodano je 10 mL otopine octene kiseline i 5 mL otopine kalijeva heksacijanoferata(II). Epruvete također zagrijati u vodenoj kupelji i zabilježiti promjene.

Tablica 3. Popis pojedinih testiranih otopina i njihove koncentracije

Otopina	Koncentracija
NaCl	0,1 M
CaCl ₂	0,1 M
FeCl ₃	0,1 M
saharoza	0,1 M
saharoza	1 M
HCl	0,01 M
HCl	0,1 M
CuSO ₄	0,1 M
K ₄ [Fe(CN) ₅]	2%
CH ₃ COOH	0,1 M

Zadatak:

Zabilježite sve promjene i napišite svoja zapažanja i komentare.

MAILLARDOVA REAKCIJA

Ne-enzimatsko posmeđivanje ili Millard-reakcija pojavljuje se u hrani kao rezultat reakcija između karbonil spojeva (aldehida i ketona) uglavnom reducirajućih šećera (glukoza, fruktoza) i spojeva sa slobodnim amino-skupinama (aminokiseline, peptidi, proteini).

Reakcija je vrlo važna za nastajanje okusa (arome) i smeđih pigmenata tijekom tretmana hrane toplinom ili pak tijekom skladištenja hrane. Spojevi niske molekulske mase koji se mogu stvarati tijekom Millard reakcija odgovorni su i važni za okus (aromu) kuhane, pečene i pržene hrane, kao i za crveno-smeđu boju pečene ili pržene hrane. Tijekom reakcija ne-enzimatskog posmeđivanja također se umanjuje nutritivna vrijednost proteina zbog gubitka aminokiselina iz hrane. Najosjetljivija esencijalna aminokiselina je lizin. Ovom vježbom objektivno ćemo odrediti boju i aromu smjese otopina glukoze i aminokiselina.

Materijal:

Epruvete, analitička vaga, vodena kupelj, aluminijska folija, glukoza, aminokiseline.

Postupak:

U svaku epruvetu redom staviti po 50 mg glukoze i 50 mg amino kiseline (asparaginska kiselina, lizin, valin, leucin, prolin, arginin, metionin, fenilalanin) i dodati 0,5 mL destilirane vode. Sadržaj u epruveti dobro promućkati i pomirisati svaki uzorak, te zapisati dojam. Svaku epruvetu prekriti aluminijskom folijom i zagrijati u vodenoj kupelji na 100°C tijekom 45 minuta. Potom sadržaj ohladiti na oko 25°C u vodenoj kupelji. Ponovno opisati miris i boju svakog uzorka (npr. kao čokolada, kao rajčica, itd.).

Boju uzoraka ocijeniti bodovima: 0=ništa, 1=svijetlo žuto, 2=jako žuta, 3=smeđe.

ODREĐIVANJE OKSIDATIVNE UŽEGLOSTI

Užeglost je proces degradacije masti, ulja i drugih lipida uzrokovana hidrolitičkim i/ili oksidativnim procesima ili pod utjecajem mikroorganizma, a karakterizirana je organoleptičkim promjenama, tj. pojavi neugodnog prodornog mirisa. Pojava užeglosti u prehrambenim proizvodima, čine proizvod pokvarenim i štetnim za zdravlje. Pažljivim organoleptičkim praćenjem oksidativna užeglost može se otkriti vrlo rano. Osnovni parametri koji uzrokuju ili ubrzavaju oksidaciju masti su prisustvo kisika (najmanje 0,5 mg/L), svjetlosti ili teških metala (Cu, Fe, itd.). Pojava užeglosti se može spriječiti **dodavanjem antioksidansa** (vitamini topivi u mastima (A, D, E) i njihovi provitamini), **kontroliranom atmosferom** i **drugim sredstvima** ovisno o prirodi namirnice (tretiranje s kelatima, dodatak limunske kiseline, tehnološkim operacijama (pr. homogenizacija)). U ovoj vježbi objektivno ćemo pratiti utjecaj pojedinih faktora na užeglost masti.

Materijal:

Svinjska mast, karoten, kloroform, filter papir, Petrijeve zdjelice s diskovima od filter papira, 0,01%-tna otopina CuSO_4 , 0,001%-tna otopina BHA, 0,5%-tna otopina hemoglobina, zasićena otopina soli, repa, vrhovi zelenog luka, bijeli krumpir.

Postupak:

U 50 g čiste svinjske masti (bez dodataka) dodati 10 mg karotena otopljenog u malo kloroforma. Pincetom uroniti trake filter papira (promjera 7 cm) u otopljenu mast i pustiti da se osuše 20 sekundi. Potom filter papire staviti u petrijevu zdjelicu i tretirati na slijedeći način:

1. Utjecaj temperature i svjetla:

Jednu petrijevku pokriti i skladištiti u mraku na sobnoj temperaturi, drugu petrijevku pokriti i skladištiti na svjetlu (direktan utjecaj svjetla), treću petrijevku pokriti i skladištiti u hladnjaku, a četvrtu petrijevku pokriti i skladištiti u inkubator na 60°C. Opisati promjene.

2. Antioksidansi i prooksidansi

Male diskove filter papira namočiti testiranim otopinama (*Tablica 2.*) i položiti na filter papir namočen smjesom mast–karoten. Ovako pripravljene filter papire položiti u petrijeve zdjelice, preokrenuti ih preko petrijevki s vodom i skladištiti u inkubatoru na 40°C. Za svaku testiranu otopinu koristiti drugu petrijevku. Opisati promjene.

Tablica 2. Popis pojedinih testiranih otopina

	Otopina	Koncentracija (%)
1.	Voda (kontrola)	/
2.	CuSO ₄	0,01
3.	Hemoglobina	0,5
4.	Komercijalni antioksidans (BHA)	0,001
5.	Zasićena otopina soli	/
6.	Vodena otopina sjeckanog povrća ***	/

***Otopina pripravljena grijanjem 20 g sjeckanog povrća (repa, luk, krumpir) s 8 mL vode do točke vrenja; dekantirana i ohlađena prije upotrebe.

Karoten, visoko nezasićen ugljikovodik, po strukturi je sličan masnim kiselinama i u slučaju oksidacije prelazi iz svijetlo narančaste u bezbojnu otopinu. Budući da u ovoj vježbi objektivno pratimo utjecaj pojedinih faktora na užeglost masti, upravo promjena boje ili obezbojenje (izrazit ćemo ga kao stupanj obezbojenja) karotena, predstavljat će stupnja oksidativne užeglosti masti. Usporediti mirise filter papira (izbjeljenog ili neizbjeljenog) pod utjecajem različitih faktora, te zapisati sve promjene i zapažanja.

ODREĐIVANJE KOLIČINE GLUTENA U BRAŠNU

Gluten (lat. glutena= ljepilo) je protein koji se nalazi u pšenici, raži i ječmu. Sastoji se od dvije vrste proteina: glijadina i glutenina (spojen s škrobom) prisutnih u endospermu zrna raznih vrsta žitarica. Glijadin i glutenin (prolamin i glutelin u pšenici) čine oko 80% bjelancevina prisutnih u pšenici. Prisustvo ovih dvaju proteina zaslužno je za odgovarajuću teksturu, elastičnost i strukturu kruha. Gluten se pretvara u tijesto u trenu kada glijadin i glutenin apsorbiraju vodu. Kruh bez glutena bio bi vrlo gust i neelastičan, budući da prisustvo glutena daje elastičnost tijestu i pomaže mu da se digne i da zadrži svoj oblik, tj. daje proizvodu konačnu strukturu. Gluten je prisutan u gotovo svim vrstama kruha, a ovisi o vrsti brašna. Obično su količina glutena u brašnu kreće 20-40%, a kod nas od 22-25%, dok je u brašnu za lisnato tijesto ona iznad 30%. Glutena nema u riži, krumpiru i zobu zbog nedostatka proteina glijadina. Iako je gluten sastavni dio nekih namirnica, brojni su proizvodi na tržištu koji ne sadrže gluten zbog pojava osjetljivosti nekih stanovnika na prisutnost glutena. Gluten izaziva teško oštećenje sluznice tankoga crijeva, što dovodi do umanjene apsorpcije hrane, pa oboljeli trebaju biti na strogoj bezglutenskoj dijeti cijeli život.

Materijal:

Tarionik s tučkom, Petrijeve zdjelice, brašno, ulje, sol, šećer, 2%-tna otopina NaCl.

Priprava glutena

Postupak:

U posudicama pomiješati sastojke kako je navedeno u *Tablici 1*. Brašnu i ostalim sastojcima dodati vodu i umiješati kuglu tijesta. Pripravljene smjese rukama oblikovati u kugle i gnječiti 10-15 minuta kako bi se razvio gluten. Opisati teksturu, boju i elastičnost svake smjese. Stvorenu smjesu (kuglu) stiskanjem među prstima ispirati pod laganim mlazom hladne vode 10-15 minuta. Voda koja otječe iz smjese bijele je boje zbog škroba koji se vodom ispire iz smjese. U smjesi koja ostaje nakon ispiranja vodom ostaje gluten. Opisati teksturu, boju i elastičnost smjesa nakon ispiranja u mlazu vode.

Tablica 1. Udio pojedinih sastojaka u analiziranim smjesama

Smjesa	Brašno (g)	Šećer (g)	Ulje (mL)	Sol (g)	Voda (mL)
1	50	0	0	0	30
2	50	25	0	0	30
3	50	0	10	0	20
4	50	0	0	0,5	30

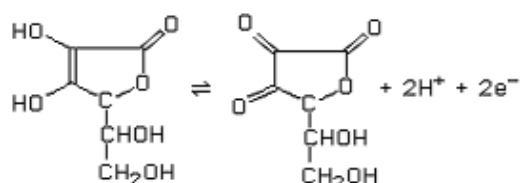
Određivanja količine glutena

Postupak:

Odvagati 10 g brašna u tarionik i dodati 5 mL 2%-tne otopine NaCl. Tučkom dobivenu smjesu dobro zamijesi u kuglicu tijesta. Kuglicu potom uz konstantno stiskanje ispirati pod laganim mlazom vodovodne vode. Prilikom ispiranja ispire se bijela tekućina koja sadrži sav škrob i vodotopive šećere iz brašna. Ispiranje vršiti oko 15 minuta no negativne reakcije. Negativna reakcija je test koji pokazuje da li je sav škrob ispran i vrši se tako da se iz tijesta iscijedi kap u čašu napunjenu vodom. Ukoliko je postupak u redu i svi šećeri su isprani, kap koja padne u čašu ne bi smjela biti primjetna. Nakon negativne reakcije dobiveni gluten vagati i dobivena masa predstavlja količinu mokrog glutena u 10 g brašna. Iz dobivenih masa računati udio mokrog glutena. Od dobivene količine glutena odvagati 1g i osušiti ga u sušioniku na 130°C do konstantne mase. Nakon hlađenja osušeni uzorak vagati i izračuna udio suhog glutena u brašnu.

ODREĐIVANJE VITAMINA C U LISNATOM POVRĆU I CITRUSIMA

Vitamin C je važan nutritivni sastojak kojeg unosimo prehranom koja uključuje voće i povrće, a kuhanjem (topljiv je u vodi) ili duljim izlaganjem na zraku zbog nestabilnosti se uništava. U literaturi su opisane različite metode određivanja udjela L-askorbinske kiseline, dehidroksiaskorbinske kiseline i njihovog ukupnog sadržaja (vitamina C), a zasnivaju se na reverzibilnoj sposobnosti sustava:



L – askorbinska kiselina $\leftrightarrow$ Dehidroksiaskorbinska kiselina

Jedna skupina metoda, tzv. oksidimetrijske titracije se zasnivaju na jakim redukcijskim osobinama endiolne skupine, odnosno na redukciji primijenjenog reagensa i oksidaciji askorbinske kiseline u dehidroksiaskorbinsku kiselinu.

A) Određivanje askorbinske kiseline sa 2,6–diklorfenol-indofenolom

Za određivanje vitamina C koristi se titracija s modro obojenom otopinom 2,6–diklorfenol-indofenolom koja se reducira do bezbojne otopine.⁵

Materijal:

Odmjerna tikvica od 100 mL; pipeta od 2,5 i 10 mL; 3 Erlenmeyer tikvice od 100 mL; bireta; posudica za vaganje; analitička vaga.

Reagensi:

- **Otopina 2,6-diklorfenol-indofenola:** U odmjernoj tikvici od 200 mL otopiti 50 mg natrijeve soli 2,6-diklorfenol-indofenola u 150 mL vruće vode koja sadrži 42 mg natrijeva dikarbonata (NaHCO_3). Smjesu ohladiti i dopuniti vodom do 200 mL, zatim filtrirati i čuvati u tamnoj posudi na temperaturi od 3°C.

- **Smjesa metafosforne i octene kiseline:** U odmjernu tikvicu od 250 mL pipetirati 100 mL destilirane vode i 20 mL glacijalne octene kiseline ($C_2H_4O_2$). Potom izvagati 7,5 g metafosforne kiseline (HPO_3), dodati i pomiješati sa smjesom vode i octene kiseline, zatim nadopuniti do 250 mL destiliranom vodom. Smjesu je potrebno filtrirati i čuvati u hladnjaku. Smjesa metafosforne i octene kiseline je postojana 7-10 dana.
- **Standardna otopina askorbinske kiseline:** U odmjernu tikvicu od 50 mL izvagati 50 mg askorbinske kiseline, otopiti i nadopuniti do oznake sa smjesom metafosforne i octene kiseline.
- **Priprema uzorka:** Kod bistrih sokova nije potrebna prethodna priprema, dok je kod prekoncentriranih sokova, voća i povrća potrebna. 100 mL soka ili 100 g prethodno usitnjenog uzorka voća ili povrća razrijedi s istom količinom (100 mL) smjese metafosforne i octene kiseline. Prije početka titracije smjesu potrebo filtrirati.

Postupak:

Prije upotrebe otopina 2,6-diklorfenol-indofenola se mora standardizirati pomoću standardne otopine askorbinske kiseline.

Standardizacija otopine 2,6-diklorfenol-indofenola:

U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL pipetirati 5 mL smjese metafosforne i octene kiseline, dodati 2 mL standardne otopine askorbinske kiseline, te titrirati otopinom 2,6-diklorfenol-indofenol do ružičaste boje koja mora biti postojana 15 sekundi (potrebno oko 15-17 mL). Isti postupak ponoviti sa 7 mL smjese metafosforne i octene kiseline za slijepu probu (ne dodaje se standard askorbinske kiseline), te izračunati F tj. titar 2,6-diklorfenol-indofenola ($mg\ mL^{-1}$), koji predstavlja utrošak askorbinske kiseline po 1 mL 2,6-diklorfenol-indofenola.

Titracija uzorka:

5 mL smjese metafosforne i octene kiseline i 2 mL pripravljene otopine uzorka pipetirati u tikvicu, te titrirati s otopinom 2,6-diklorfenol-indofenola do ružičaste boje koja mora biti postojana 15 sekundi. Postupak ponoviti 3 puta.

Račun:

Titar 2,6-diklorfenol-indofenola ($mg\ mL^{-1}$), koji predstavlja utrošak askorbinske kiseline po 1 mL 2,6-diklorfenol-indofenola računati prema jednadžbi :

$$F = A / (Z - B)$$

$$A = (mg\ Vit\ C / 50\ mL) \times 2\ mL$$

F – titar (mg mL^{-1})

A – količina askorbinske kiseline u volumenu titrirane standardne otopine (mg) – jednačba (5)

Z – količina 2,6-diklorfenol-indofenola utrošena za titraciju standardne otopine askorbinske kiseline (mL)

B – količina 2,6-diklorfenol-indofenola utrošena za titraciju slijepe probe (mL)

Sadržaj askorbinske kiseline u voću i povrću računati prema jednačbi:

$$C = (X - B) \times (F / E)$$

C – masa askorbinske kiseline (mg mL^{-1})

X – volumen 2,6-diklorfenol-indofenola utrošenog za titraciju otopine uzorka (mL)

B – količina 2,6-diklorfenol-indofenola utrošena za titraciju slijepe probe (mL)

F – titar 2,6-diklorfenol-indofenola (mg askorbinske kiseline za standardizaciju 1 mL indofenola)

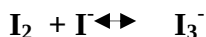
E – volumen uzorka (2mL)

Zadatak:

Odrediti sadržaj askorbinske kiseline u analiziranom voću i povrću.

B) Određivanje vitamina C titracijom s otopinom jodida

Još jedan od načina utvrđivanja količine vitamina C u voću, voćnim sokovima i povrću je titracija uz korištenje otopine jodida. Jod je relativno netopiv, međutim njegovim kompleksiranjem s jodidnim ionima u trijodidni oblik to svojstvo se poboljšava.⁶



Trijodidni ioni oksidiraju vitamina C i prelaze u jodidne ione. Kada se sav vitamin C oksidira, jod i trijodidni ioni ostaju prisutni u smjesi i reagiraju sa škrobom u obliku kompleksa plavo-crne boje koji ujedno predstavlja krajnju točku titracije.



Materijal:

- Odmjerna tikvica od 100 mL; odmjerna tikvica od 250 mL; pipeta od 10 i 25 mL; čaša; 3 Erlenmeyer tikvice od 250 mL; bireta; posudica za vaganje; analitička vaga.

Reagensi:

- **Otopina škroba:** 0,50 g škroba otopiti u 50 mL zagrijane vode.
- **Otopina jodida:** 5 g kalijevog jodida (KI) i 0,268 g kalijevog jodata (KIO_3) otopiti u 200 mL destilirane vode. Dodati 30 mL sumporne kiseline ($c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 3 \text{ mol L}^{-1}$). Otopinu prelići u odmjernu tikvicu od 500 mL i dopuniti do konačnog volumena od 500 mL.

- **Standardna otopina vitamina C:** 0,25 g vitamina C otopiti u 250 mL destilirane vode da koncentracija otopine bude 1 mg mL^{-1} . Otopinu čuvati u zatamnjenoj boci jer je vitamina C osjetljiv na svjetlo.
- **Priprema uzorka:** 100 g uzorka (voća ili povrća) homogenizirati i pomiješati sa 50 mL destilirane vode. Dobivenu smjesu filtrirati, uz ispiranje filtera papira s nekoliko mL destilirane vode, u tikvici od 100 mL.

Standardiziranje otopine za titraciju:

U Erlenmeyer tikvicu od 250 mL pipetirati 25 mL standardne otopine vitamina C, dodati 10 kapi otopine škroba, te titrirati smjesu otopinom jodida. Titracija je završena kada pojava plavo – ljubičaste boje traje duže od 20 sekundi pri stalnom miješanju otopine. Postupak ponoviti tri puta i zapisati utrošak otopine jodida pri titraciji. Postupak ponoviti 3 puta.

Titracija uzorka:

25 mL otopine uzorka prebaciti u tikvicu i titrirati s otopinom jodida do plavo-ljubičaste boje koja mora biti postojana 20 sekundi. Postupak ponoviti 3 puta.

Racun:

Sadržaj vitamina C u voću i povrću računati prema jednadžbi:

$$C \text{ (g/25 mL)} = (V \times 0,25) / S$$

C - g vitamina C u 25 mL uzorka

V - volumen otopine jodida utrošen za titraciju uzorka (mL)

S - volumen otopine jodida utrošen za titraciju standardne otopine vitamina C (mL)

NAPOMENA!

Računom se dobije količina vitamina C u 25 mL uzorka! Za sokove je potrebno preračunati koliko je to vitamina C po 1 L, a za uzorke voća i povrća rezultat pomnožiti sa 4, da se dobije količina vitamina C u 100 mL otopine, tj. u 100 g uzorka.

Zadatak:

Odrediti sadržaj askorbinske kiseline u analiziranom voću i povrću.

EKSTRAKCIJA FENOLA IZ BILJNOG MATERIJALA

Priprema ekstrakata:

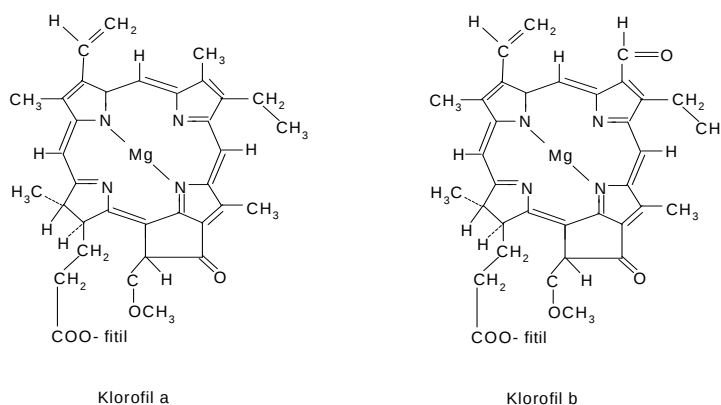
Za određivanje utjecaja različitog otapala na udio ukupnih fenola, udio antocijana i antioksidacijski potencijal ekstrakata potrebno je pripremiti alkoholni i vodeni ekstrakti biljnog materijala.

Postupak:

Biljni materijal homogenizirati u tarioniku, odvagati 20 g i prenijeti u Erlenmeyer-ovu tikvicu. Homogeniziranom biljnom materijalu dodati 100 mL otapala (80 %-tni etanol ili destilirana voda). Tikvicu staviti u vodenu kupelj na temperaturu od 60 °C u trajanju od 2 sata. Nakon 2 sata izvršiti filtraciju kroz naborani filter papir. Dobiveni filtrat koristiti u daljnjoj analizi fenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta.

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA BILJNIH PIGMENATA U ZELENOM LISNATOM POVRĆU

Klorofil je najvažniji biljni pigment koji je aktivan za vrijeme fotosinteze. U vodi netopljivi, djelomično lipofilni klorofil pojavljuje se u većine biljaka u dva kemijski srodna oblika: kao modrozeleni *klorofil a* i kao žutozeleni *klorofil b*. Njihov je kvantitativni odnos otprilike 3:1. Klorofili sadrže porfirinsku jezgru od četiri pirolska prstena u čijem se središtu nalazi atom magnezija na koji je vezan fitolni rep. Porfirinska jezgra je hidrofilna, a fitolni rep bogat -CH₃ skupinama je hidrofoban i lipofilan..



Slika 5. Struktura klorofila a i b

Materijal:

Biljni materijal (listovi blitve ili špinata), epruvete, ljevak za odjeljivanje, pipete, odmjerna tikvica, posuda za razvijanje kromatografije, papir za kromatografiju, vodena kupelj, petrol-eter, etanol, n-butanol.

Ekstrakcija pigmenata

Postupak:

Listove zelenog lisnatog povrća (špinat, blitva) izrezati na male komade promjera 5 cm i uroniti u malo kipuće vode i ostaviti da ključa oko 2 min. Nakon 2 min listove izvaditi iz ključale vode i pažljivo ih posušiti kuhinjskim papirom.

U epruvetu ili neku manju posudu pomiješati 3 mL petrol-etera i 10 mL etanola. Posušene listove povrća uroniti u posudu s otapalima pazeći da svi dijelovi budu prekriveni tekućinom. Ostaviti nekoliko minuta da se pigmenti otope u otapalima, te da list izgubi veći dio svoje boje. Povremeno miješati staklenim štapićem. Nakon što su listovi izgubili veći dio svoje boje preliterati otopinu u drugu posudu i dodati 10 mL vode. Posudu (epruvetu, mali lijevak za odjeljivanje) zatvoriti čepom i okrenuti nekoliko puta i potom ostaviti da se odvoje dvije faze. Pipetom odvojiti površinski sloj (tamno zelene boje) u novu epruvetu. Ostatku u posudici dodati novih 10 mL vode, zatvoriti posudu, okrenuti nekoliko puta i ponovno ostaviti da se odvoje slojevi. Gornji sloj prenijeti u novu epruvetu i postupak ponoviti još jednom. Sve skupa ga uraditi 3-4 puta. Biljni pigmenti će se nalaziti u fazi s petrol-eterom, a voda je uklonila većinu etanola. Ako se pigmenti ne odvajaju dobro na kromatografskoj pločici, potrebno je ponoviti postupak ispiranja.

Separacija pigmenta tankoslojnom kromatografijom

Kromatografska analiza služi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka prisutnih u složenim smjesama. Odijeljeni sastojci se vide na koloni kao obojene vrpce prema kojima je tehnika dobila i naziv (grč. *chroma*- boja; *graphein*- pisati), a njihovo odvajanje ovisi o brzinama kojima plinovita ili tekuća mobilna faza nosi sastojke kroz stacionarnu fazu, a temelji se na različitoj raspodjeli tvari smjese između faza. Metoda tankoslojne kromatografije spada u metode plošne kromatografije kod kojih se kao stacionarna faza koristi ravan, relativno tanak sloj tvari tj. adsorbensa koji je samonosiv ili nanesen na staklenu, plastičnu ili metalnu površinu. Mobilna faza prolazi kroz stacionarnu pod utjecajem kapilarnih sila, gravitacije ili pak električnog potencijala. Kapljica otopine uzorka nanese se na jedan kraj ploče kapilarom. Mjesto na koje se nanosi uzorak se označi grafitnom olovkom i naziva se *start*, dok je *fronta* zona najveće udaljenosti mobilne faze (eluensa) od starta.

Brzina prolaska tvari po pločici je proporcionalna udaljenosti do fronte pa na brzinu ukazuje R_f vrijednost (eng. *related to front*) koja je omjer prijeđenog puta tvari od starta (x) i udaljenosti fronte od starta (y) tj. x/y .

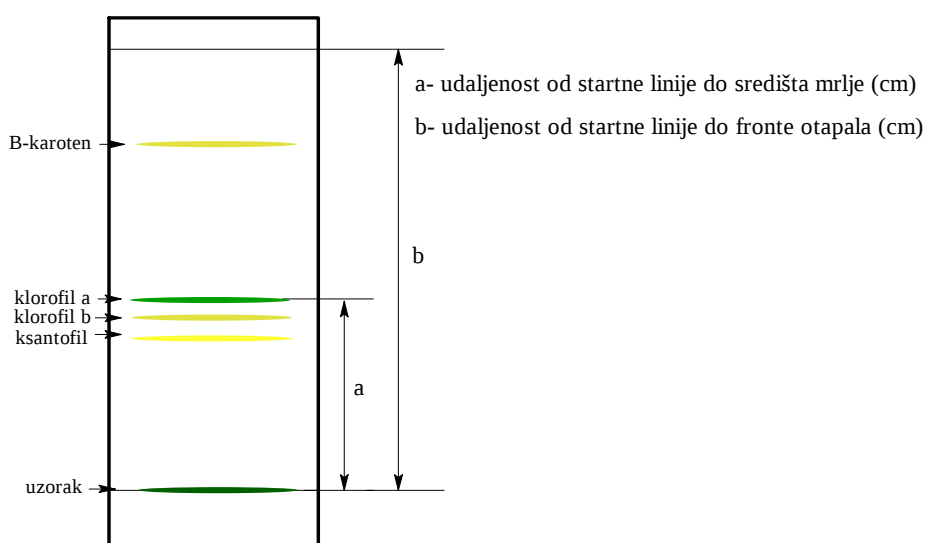
$$R_f = x / y$$

Ukoliko komponente nisu obojene, da bi se izmjerile R_f vrijednosti potrebno ih je učiniti vidljivima. To se postiže pomoću UV-lampe, kristalića joda ili prskanjem razvijačem (sumpnom kiselinom). Pločica s definiranim mjestima adsorbirane tvari se zove kromatogram.

Postupak:

Pripremiti smjesu za razvijanje kromatograma pipetiranjem 1 mL n-butanola u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti je do oznake petrol eterom uz oprez! (Držati dalje od vatre!) Od pripravljene smjese razvijača uzeti alikvot i staviti ga na dno (da se malo prekrije dno) posude u kojoj će se razvijati kromatografija. Prethodno papir za kromatografiju izrezati na dimenzije 55×200 mm i grafitnom olovkom u dnu papira (2,5 cm od ruba) nacrtati startnu liniju duž koje se kapilarom nanese uzorak ekstrakta povrća. Mrlju osušiti na zraku ili u struji toplog zraka (fenom ili u sušioniku). Nakon nanošenja i sušenja uzorka, pločicu uroniti u posudu za razvijanje kromatograma u kojoj se nalazi smjesa otapala za razvijanje. Kromatograme razvijati sve dok otapalo ne dođe pred vrh pločice, kada je potrebno pločice izvaditi i grafitnom olovkom obilježiti frontu otapala. Pločice ostavit sušiti na zraku, nakon čega su mrlje na njima vidljive i bez detekcije UV lampom ili prskanjem razvijačem. R_f vrijednost računati prema jednadžbi:

$$R_f = \text{udaljenost sredine mrlje od starta} / \text{udaljenost fronte otapala od starta}$$



Slika 6. Izgled kromatograma

UTJECAJ pH NA BILJNE PIGMENTE

Antocijani su biljni pigmenti prisutni u svakodnevnom životu, u voću, povrću, cvijeću. Nalaze se u grožđu, višnjama, jagodama, malinama, rotkvicama, crvenom zelju. Danas se antocijani najčešće ekstrahiraju iz grožđa i crvenog zelja, zatim iz bobica bazge, crnog ribizla i crne mrkve. U prirodi se pojavljuje 6 osnovnih tipova antocijana (cijanidin, malvidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin). Antocijanini uvijek postoje u prirodi kao glikozidi. Aglikoni koji mogu nastati kiselinskom ili enzimskom hidrolizom su izuzetno nestabilni. Najčešći glikozidni šećeri su: glukoza, galaktoza, ksiloza, arabinoza i raminoza, supstitucija sa disahaidima se također pojavljuje, sa rutinozom, gentibiozom. Molekule antocijana se mogu međusobno povezivati i acilirati sa aromatskim i alifatskim kiselinama. Te pojave se još nazivaju ko-pigmentacija, što pridodaje njihovoj stabilnosti.

Boja antocijana i antocijanidina ovisi o brojnim faktorima kao što su promjena pH, stvaranje metalnih kompleksa i kopigmentacija (*Tablica 4*). Faktori koji utječu na stabilnost antocijana su: prisustvo šećera, pH, temperatura, svjetlost, prisustvo metala, kisika itd.

Tabela 4. Ovisnost boje antocijana od pH vrijednosti medija

pH vrijednost medija	Boja antocijana
$\text{pH} < 2$	Crveno obojen kation (najstabilnija forma)
$2 < \text{pH} < 4,5$	Crveno obojen kation u ravnoteži sa bezbojnom pseudo ili leuko bazom
$4,5 < \text{pH} < 7$	Ljubičasto obojena leukobaza (najnestabilnija forma)
$7 < \text{pH} < 10$	Plavo obojena so anhidro baze
$\text{pH} > 10$	Obojeni halkon

Materijal:

Sok od bobičastog voća (grožđa, brusnice, itd.), 1 M otopina NaOH, destilirana voda, epruvete, pehametar, pipete.

Postupak:

Pomiješati 20 mL soka od grožđa s 90 mL destilirane vode i odrediti pH pripravljene otopine. Otpipetirati 5-10 mL ove otopine u epruvetu i razrijediti do pH=5,0 s 1 M NaOH. Uzeti 5 do 10 mL ove otopine u drugu epruvetu i razrijediti do pH=7,0. potom od ove otopine uzeti 5 do 10 mL otopine u drugu epruvetu i razrijediti do pH=10,0. usporediti sve uzorke i posebno zabilježiti boju. Isti postupa ponoviti i s sokom od brusnice. Pomiješati 50 mL soka od brusnica s 50 mL destilirane vode i ponoviti postupak. Zabilježiti sve promjene koje se javljaju promjenom pH u otopinama i promjena boja otopine sokova u kojima su prisutni antocijani.

ODREĐIVANJE AKTIVITETA PEROKSIDAZE (PEROKSIDAZA TEST)

Peroksidaza test je test za kontrolu blanširanja povrća. Pri procesu konzerviranja i zamrzavanja povrća vrlo je važno provesti postupak blanširanja (toplinski postupak kratkotrajnog izlaganja ploda toplini) na odgovarajući način u cilju izbjegavanja pojave neugodnih mirisa i aroma u proizvodu tijekom perioda čuvanja. Postoji nekoliko enzima, npr. katalaza, peroksidaza, polifenoloksidaza i lipoksigenaza, koji su prisutni u povrću i koji moraju biti inaktivirani postupkom blanširanja da bi se dobio stabilan proizvod.

Peroksidaza je jedan od enzima koji je veoma otporan na djelovanje topline, stoga se aktivitet peroksidaze koristi kao kriterij adekvatnog toplinskog procesa kod prerade voća i povrća. Peroksidaza djeluje s vodikovim peroksidom (ili neke druge peroksidge), koji nastaje tijekom oksidacijskih procesa iz aktivnog i molekuskog kisika, pri čemu se vodikov peroksid razlaže na vodu i aktivni kisik.

Vizualni test za kontrolu blanširanja povrća

Peroksidaza katalizira oksidaciju gvajakola (bezbojan) u prisustvu vodikovog peroksidge pri čemu nastaje tetragvajakol (žuto-smeđe boje s apsorpcijskim maksimumom pri valnoj duljini od 450 nm) i voda. Na osnovu promjene boje, spektrofotometrijskom metodom, praćenjem apsorbancije, određuje se aktivnost peroksidaze u reakcionoj smjesi. Cilj ove vježbe je izmjeriti aktivnost enzima peroksidaze u povrću (zelena šparoga, kupus).

Materijal:

Tarionik; lijekvak; lončić za kuhanje; kuhalo; filter papir; čaše; epruvete; graduirane pipete; 0,5 %-tna otopina gvajakola; 1 %-tna otopina vodikovog peroksidge.

Postupak:

Povrće izrezati na kocke, odvagati 10g, staviti u metalnu mrežicu i uroniti u vruću vodu (95-100 °C). Štopericom mjeriti vrijeme proteklo od uranjanja povrća u vruću vodu. Test počinje s kraćim vremenom blanširanja (npr. 10 ili 15 s). Nakon blanširanja metalnu mrežicu s uzorkom uroniti u hladnu vodu. Ohlađeni uzorak prenijeti u tarionik i usitniti što je moguće bolje. Prilikom usitnjavanja postupno dodati vodu tako da konačni omjer bude 1:3.

Filtrirati uzorak koristeći filter papir i sakupiti 5-10 mL uzorka. Po 2 mL filtrat otpipetirati u dvije epruvete. U prvu epruvetu dodati 22 mL vode, a u drugu 20 mL vode, 1 mL gvajakola i 1 mL vodikovog peroksida. Odmah nakon dodatka peroksida uključiti štopericu i mjeriti vrijeme proteklo do obojenja otopine u prvoj epruveti u istoj nijansi kao i u drugoj epruveti.

Ukoliko je obojenje nastalo prije 3,5 min, to se označava kao pozitivna reakcija, tj. to znači da je peroksidaza još aktivna (pr. nakon blanširanja od 15 s), pa se stoga vrijeme blanširanja mora produljiti (test s 30 s). Cijeli postupak treba ponoviti s produženim vremenom blanširanja. Postupak se ponavlja sve dok se testom na peroksidazu ne utvrdi negativna reakcija, tj. da u uzorku više nema peroksidaze.

Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti peroksidaze

Materijal:

Filtrat iz prethodnog postupka; pipete; 0,5 1%-tni gvajakol; 1%-tni vodikov peroksid; 0,1 M otopina kalij hidrogenfosfata.

Postupak:

Za testiranje svakog od uzoraka filtrata potrebno je pripremiti: 2,5 mL fosfatnog pufera pH=7, 0,25 mL otopine gvajakola i 0,25 mL filtrata. Čista otopina filtrata služi za određivanje nule na spektrofotometru. Za početak enzimske reakcije, potrebno je dodati 0,05 mL otopine vodikovog peroksida u prethodno opisanu smjesu, promiješati, i zabilježiti apsorbanciju na 450 nm svakih 30 sekunda tijekom perioda od 5 min. Ovaj postupak se ponavlja za sve uzorke. Sve otopine koje se koriste za izvođenje vježbe moraju biti svježije pripremljene.

Zadatak:

1. Grafički prikazati ovisnosti apsorbancije i vremena, te odrediti početnu brzinu reakcije (promjena apsorbancije po minuti) za svaki uzorak.
2. Grafički prikazati ovisnost vremena blanširanja i enzimske aktivnosti. Koje je vrijeme blanširanja potrebno za potpunu inhibiciju enzima peroksidaze?

ODREĐIVANJE ŠKROBA

Ugljikohidrati ili saharidi su glavni izvori energije za sve tjelesne funkcije i mišićni rad. Oni osiguravaju odmah dostupnu energiju (toplino) u tijelu i to u trenutku kada se ugljik spoji s kisikom u krvi, te pomažu u reguliranju metabolizma bjelančevina i masti. Ugljikohidrati se najčešće dijele u: **monosaharide**, **disaharide** i **polisaharide**. Monosaharidi su najjednostavniji šećeri, dok su polisaharidi spojevi poznati i pod nazivom glikani, a sastoje se od mnogo monosaharida povezanih glikozidnom vezom.

Škrob je glukan kojeg biljka sintetizira kao osnovnu rezervu hrane. Smješten je u citoplazmi u obliku netopivih granula. Pohranom glukoze u obliku škroba smanjuje se osmotski tlak u stanici. Razgradnja škroba (glavni ugljikohidrat hrane) počinje u ustima jer slina sadrži **α -amilazu** enzim koji razgrađuje škrob. Kada hrana dospije u želudac gdje je pH prekiseo te inaktivira α -amilazu škrob je već razgrađen s od oko nekoliko tisuća na manje od 8 glukoznih jedinica. Daljnja razgradnja se nastavlja u crijevu gdje je opet aktivna amilaza. U obliku glukoze resorbira se u crijevnim resicama i odlazi u krv. Nepotpunom hidrolizom škroba nastaje dekstrin. U pravilu je lako probavljiv, no postoji i škrob koji odolijeva probavnim enzimima i to je tzv. **otporni škrob** koji se nalazi u sjemenkama i cjelovitim žitaricama.

Škrob se nalazi u hrani biljnog podrijetla, biljka tako skladišti ugljikohidrate koji su i čovjekovoj prehrani važan izvor energije. Ima ga u grahu, kruhu, žitaricama (50-85%), tijestu, tjestenini, grašku i krumpiru (20%).

Za dokazivanje škroba uglavnom se koristi karakteristična reakcija škroba s otopinom joda pri kojoj dolazi do plavog obojenja. Među metodama određivanja škroba uz metode zasnovane na hidrolizi škroba i optičkoj aktivnosti, često se koristi metoda bazirana na taloženju škroba i potom njegovom određivanju gravimetrijski ili titrimetrijski. Među njima najpoznatije su metode po Fellenberg-u i Mayrhofer-u.

Određivanje škroba metodom po Mayrhofer-u

Ova metoda se zasniva na osobini škroba da tretiranjem s alkalnim otopinama (KOH) u koncentriranoj alkoholnoj otopini, ostaje neotopljen, za razliku od bjelančevina, masti i ostalih sastojaka, koji se otapaju. Ova metoda je pogodna za namirnice sa visokim sadržajem bjelančevina i masti (pr. sir, kobasice i dr. mesni proizvodi), dok kod namirnica biljnog porijekla ne daje zadovoljavajuće rezultate uslijed prisustva i drugih polisaharida, koji se talože zajedno sa škrobom.

Materijal:

Buchner-ov lijevak; čaša od 400 mL; odmjerna tikvica od 200 mL; lijevak; stakleni štapić; filter papir; pipeta od 50 mL; 8 %-tna otopina KOH u 96 %-tnom etanolu; 8 %-tna otopina KOH u vodi; 96%-tni etanol, 60%-tni etanol; 10%-tna otopina HCl-a; 80%-tna otopina octene kiseline, eter.

Postupak:

Oko 10 g uzorka zagrije se u čaši od 400 mL sa 50 mL 8%-tnog kalijevog hidroksida u etanolu u vodenoj kupelji (proključala voda). Tijekom grijanja otopinu češće promiješati staklenim štapićem dok sve tvari, osim škroba, ne prijeđu u otopinu. Otopinu potom ostaviti da se talog slegne te profiltrira kroz Buchner-ov lijevak. Zaostali talog najprije 2-3 puta isprati 8%-tnim vrućim KOH u etanolu, a zatim sa vrućim 96%-tnim etanolom tako dugo dok filtrat uz dodatak HCl-a ne ostaje potpuno bistar. Talog se potom kvantitativno prenese u čašu pomoću 60 mL 8%-tne vodene otopine KOH grije 30 min u vodenoj kupelji da se škrob otopi. Otopina se kvantitativno prenese (uz ispiranje čaše vodom) u odmjernu tikvicu od 200 mL, a kad se ohladi, dopuni se do oznake, dobro promiješa i ostavi da se eventualno talog slegne. Od bistre otopine u čašu se otpipetira 50 mL, slabo zakiseli octenom kiselinom, a zatim doda 96%-tni etanol onoliko koliko iznosi cjelokupni volumen otopine, promiješa i ostavi preko noći da se škrob potpuno istaloži. Talog se uz vakum filtrira, ispere etanolom i eterom. (filtrira se preko kvantitativnog filter papira, najprije bez vakuma, ispire se etanolom i tek tada uz vakum, potom eter.) Potom se suši jedan sat na 105 C i mjeri. Uzorak se potom spali, hladi u eksikatoru i ponovno važe pepeo.

Sadržaj škroba je ekvivalentan razlici mase taloga prije i poslije spaljivanja (m). Ako je analiza obavljena po navedenoj metodi, sadržaj škroba, izražen u postocima, izračunava se prema sljedećoj formuli:

$$X = 40 \cdot m$$

gdje je:

X - sadržaj čistog škroba (m);

m - razlika mase taloga prije i poslije spaljivanja (g)

Literatura: J. Trajković; M. Mirić; J. Baras; S. Šiler: *Analize životnih namirnica*. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 1983.

ANALIZA SUHOG VOĆA I POVRĆA

A) Određivanje indeksa rehidracije

Indeks rehidracije ispituje se u osušenim proizvodima da bi se provjerila kvaliteta postupka osušenog proizvoda. Uzorci koji imaju veću snagu bubrenja kvalitetniji su, i to je jedan od najvažnijih indikatora kakvoće suhog proizvoda (voća i povrća).

Postupak:

Usitnite dio osušenog uzorka i odvagajte 2 g u čašu od 100 mL na analitičkoj vagi. Uzorak u čaši prelijte s 50 mL destilirane vode i ostavite stajati preklopljeno preko noći (24 sata).

Odvagnite praznu čašu (100 mL) i prazan Buchnerov lijevak.

Zatim se Buchnerov lijevak stavi u vakum bocu i na dno lijevka uloži filter papir veličine dna tog lijevka. Nabubreni uzorak iz čaše kvantitativno se prenese na filter-papir u lijevku i ostavi se filtrirati točno 3 min. Zatim se uključi vodena vakum sisaljka i pod vakuumom ostavi filtrirati točno 2 min. Tada se isključi vakum i Buchnerov se lijevak stavi u čašu poznate mase. Na tehničkoj vagi odvagane se lijevak zajedno s čašom i uzorkom. U toku vaganja lijevak neka bude neprekidno u čaši sa de dio tekućine iz lijevka koji kapi ne gubi. Nakon vaganja iz lijevka se izvadi vlažni filter-papir, očisti se od dijelova uzorka i odmah vagne (prije nego se počne jače sušiti), masu filter-papira treba oduzeti od cjelokupne mase kako bi se dobila masa nabubrenog voća i povrća.⁴

Račun:

Indeks rehidracije izračunati prema formuli:

$$IR = [m(\text{nabubrenog uzorka}) / m(\text{suhog uzorka})] \cdot 100$$

B) Određivanje moći bubrenja

Osnovna karakteristika sušenih proizvoda je manji sadržaj vode, što onemogućava djelovanje mikroorganizama i enzima. Sposobnost naknadnog primanja vode, tj. rehidracija je također jedan od važnih karakteristika za ove proizvode. Kvalitetno osušeni proizvodi primaju određenu količinu vode, a veća odstupanja od te vrijednosti ukazuju na slabu kvalitetu sušenja. Npr., poželjno je da se vrijednost za normalno bubrenje raznih vrsta osušenog kupusa i kelja kreće oko 70, za mrkvu i luk oko 50, a za grašak oko 20. Princip metode se zasniva na određivanju preostale, neupijene vode.

Postupak:

U čašu od 100 mL odvagati 2 g usitnjenog uzorka i preliterati ga s 50 mL hladne destilirane vode (mjeriti pipetom). Ovako pripremljenu smjesu ostaviti da stoji 24 sata i nakon toga nabubreni uzorak se filtrira uz vakum (Buchnerov lijevak), a dobiveni filtrat se prenese u menzuru od 100 mL i očita preostali volumen vode koju uzorak nije upio tijekom 24 sata.

Račun:

Moć bubrenja (X) se proračunava na 10 g uzorka preko formule:

$$X = 5 \cdot [50 - (V + 1)]$$

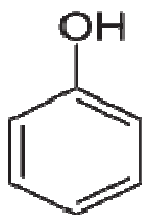
gdje je:

V - volumen neupijene vode (mL)

V + 1 - korekcija zbog gubitka tijekom filtracije (lijevak i/ili filter papir)

ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Fenole možemo definirani kao tvari koje u svojoj strukturi posjeduju barem jedan aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa, uključujući i njihove funkcionalne derivate.¹⁸ Poznato je preko 8000 biljnih fenolnih spojeva koji se razlikuju po svojoj kemijskoj strukturi i po svojim kemijskim svojstvima.



Slika 10. Kemijska formula fenola

Ovisno o strukturi fenolni spojevi se dijele na:¹⁹

- **Monofenole** (spojevi koji sadrže jedan benzenski prsten na koji je vezana jedna OH - fenolne kiseline),
- **Polifenole** (spojevi koji sadrže veći broj fenolnih skupina unutar jedne molekule - flavonoidi, neflavonoidi).

Fenolni spojevi čine jednu od najbrojnijih i najraširenijih grupa spojeva u biljnom svijetu. Prisutni su u svi biljnim organima (sjemenkama, koži ili kori voća, lišću i cvijeću) i imaju jako važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkcija biljaka. Koncentracija fenola u voću i povrću varira ovisno o sorti, klimatskim uvjetima i stupanj zrelosti.

Ukupni fenoli određuju se metodom po Folin-Ciocalteu.^{20,21} Metoda je spektrofotometrijska i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenog produkta. Fenolne grupe oksidiraju se do kinona dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se reduciraju i daju plavo obojenje.

Nereducirani Folin-Ciocalteu reagens je žute boje dok reducirani ima stabilnu plavu boju. Intenzitet obojenja mjeri se određivanjem apsorbancije kod 765 nm u odnosu na slijepu probu.

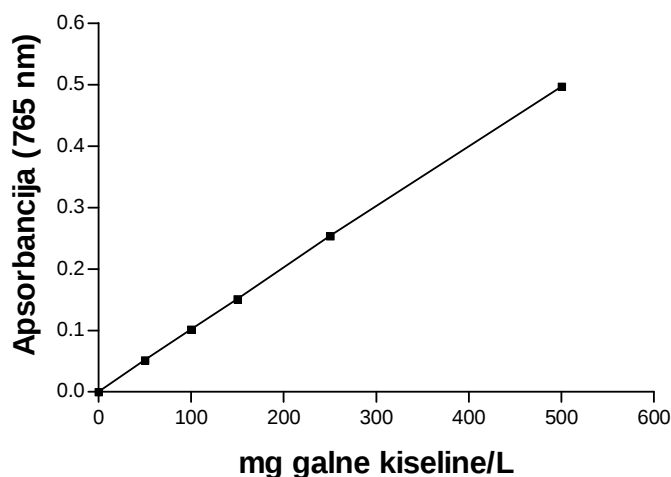
Materijal:

Odmjernih tikvica od 100 mL; 3 odmjerne tikvice od 50 mL; pipete od 1-10 mL; 2 staklene kivete za spektrofotometar; spektrofotometar; analitička vaga.; Folin-Ciocalteu reagens; 20%-tna otopina natrijeva karbonata (Otopiti 200 g bezvodnog natrijeva karbonata u 1 L vode kuhanjem, ohladiti na sobnoj temperaturi uz dodatak nekoliko kristala natrijeva karbonata i filtrirati nakon 24 sata); otopine standarda za određivanje fenola (otopiti 0,50 g prethodno osušene galne kiseline u tikvici od 100 mL s vodom)

Postupak:

Izrada standardne krivulje:

Za izradu standardne krivulje potrebno je pripremiti otopine galne kiseline različitih koncentracija. Pipetirati 0-, 1-, 2-, 3-, 5- i 10-mL matične otopine fenola u tikvice od 100 mL i dopuniti do oznaka s vodom. Fenolne koncentracije ovako pripremljenih radnih otopina standarda su 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice pipetirati po 1 mL otopine u zasebnu odmjernu tikvicu od 100 mL. U svaku tikvicu dodati po 60 mL destilirane vode i dobro promućkati; potom dodati po 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i ponovo dobro promućkati, a zatim nakon 1 minute dodati po 15 mL zasićene otopine natrijeva karbonata, dobro promućkati i nadopuniti do oznake s vodom. Tikvice ostaviti stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega izmjeriti apsorbanciju svake otopine kod 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm. Standardnu krivulju napraviti s podacima: koncentracija prema apsorbanciji.



Slika 11. Standardna krivulja za određivanje ukupnih fenola. Kao standard korištene su otopine s različitim koncentracijama galne kiseline.

Analiza uzorka:

U odmjerenu tikvicu od 50 mL pipetirati 0,5 mL uzorka (sok razrijediti u omjeru 1:10 s vodom), dodati 30 mL destilirane vode i 2,5 mL reagensa Folin–Ciocalteu. Otopinu dobro promućkati i nakon 1 minute dodati 7,5 mL zasićene otopine natrijeva karbonata te nadopuniti do oznake. Ostaviti stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, a nakon toga u kiveti od 10 mm očitati apsorbanciju na spektrofotometru na valnoj dužini od 765 nm. Rezultate izraziti kroz ekvivalente galne kiseline (GAE) budući je ona korištena kao standard.

ODREĐIVANJE ANTOCIJANA

Antocijani su grupa flavonoidnih spojeva koja daju cvijeću, lišću i plodovima crvenu, ljubičastu i plavu boju u bezbroj nijansi i kombinacija. U kemijskom pogledu antocijani su glikozidi (heterozidi), koji kiselom hidrolizom oslobađaju aglikon, nazvan antocijanidin i jedan ili više šećera, obično glukozu, ramnozu ili galaktozu, a od disaharida gentobiozu i rutinozu. Na stvaranje određene boje (crvene, ljubičaste, plave) kao i na stvaranje raznih nijansi tih osnovnih boja, utječu mnogi faktori kao što su vrsta i mješavina antocijana, pH, prisustvo anorganskih iona (aluminij daje plavo), prisustvo raznih ko-pigmenata (tanini, flavonglukozidi, alkaloidi) i raznih koloidnih sastojaka staničnog zida (polisaharidi, pektini). Najčešće korištena metoda pri određivanju antocijana je metoda izbjeljivanja s disulfitom.

Materijal:

Erlernmayer tikvica, epruvete, pipete, staklene kivete za spektrofotometar, spektrofotometar, 0,1%-tne otopine HCl u 95%-tnom etanolu, 2%-tna otopina otopina HCl-a, 15%-tna otopina natrijeva disulfita.

Postupak:

U tikvicu se od 50 mL pipetirati 1 mL uzorka, dodati 1 mL 0,1%-tne otopine HCl u 95%-tnom etanolu i 20 mL 2%-tne otopine HCl. Po 10 mL ovako pripravljene smjese prebaciti u dvije epruvete. U prvu epruvetu dodati 4 mL destilirane vode, a u drugu epruvetu 4 mL 15%-tne otopine natrijeva disulfita. Nakon 20 minuta izmjeriti apsorbanciju uzorka s destiliranom vodom (A_1) i apsorbanciju uzorka s otopinom disulfita (A_2) na valnoj duljini od 520 nm u odnosu na vodu. Izračunati razliku apsorbancija između dva mjerenja prema jednadžbi (36):

$$A = A_1 - A_2$$

$$\text{Udio antocijana (mg cijanidina/L)} = \Delta \text{ Abs} \times 875$$

Zadatak:

Izračunati sadržaj antocijana u ispitivanom uzorku.

ENZIMSKO POSMEĐIVANJE

(POLIFENOLOKSIDAZA (KATEHOL OKSIDAZA) TEST)

Enzimatsko posmeđivanje voća i povrća je često neželjena reakcija čije sprečavanje je uvijek bio izazov prehrambenim znanstvenicima. Oksidativno posmeđivanje voća i povrća je uglavnom pojava izazvana prisustvom polifenol oksidaze, enzima koji sadrži bakar i koja u prisustvu kisika katalizira oksidaciju fenolnih spojeva u kinone koji se potom polimeriziraju u smeđe, crvene ili crne pigmente. Inhibicija polifenol oksidaze provodi se s različitim inhibitorima (askorbinskom, eritirbinskom, limunskom i benzojevom kiselinom), sniženim pH i povišenom temperaturom. Intenzitet inhibicije prati se promjenom boje koja se mjeri pomoću spektrofotometra.

Materijal:

Banana, čaše, pipete, lijevak, filter papir, kivete za spektrofotometar, spektrofotometar, destilirana voda, 1%-tna otopina tiouree, askorbinska kiselina, natrijev sulfat, dikalijev fosfat.

Postupak:

Podijeliti bananu na (male dijelove) 4 dijela od 30 g svaki. Jedan dio uroniti u posudu s 60 mL 1% tiouree. U tom bi se uzorku zbog djelovanja tiouree trebalo zaustaviti enzimsko posmeđivanje (ovo služi kao kontrola). Drugi komadić banane staviti u posudu s 60 mL destilirane vode, a treći komadić banane uroniti u posudu s 60 mL destilirane vode i 0,01 g askorbinske kiseline. Četvrti komadić banane uroniti u posudu s 60 mL destilirane vode i 0,01 g natrij sulfita, a nakon 45 sekundi baciti otopinu i zamijeniti ju otopinom vode (60 mL) i 0,12 g dikalijevoj fosfata. Kod ove je vježbe važno brzo prenijeti komadiće izrezane banane u pripremljene otopine. Nakon što su komadići banane stajali 30 min u otopinama, potrebno je homogenizirati svaki uzorak u mikseru i filtrirati ga. Staviti 1 mL svakog filtrata u epruvetu koja sadrži 5 mL vode i pomiješati. Svaki uzorak tih smjesa staviti u kivetu i očitati apsorbanciju na 475 nm. Za određivanje nule na spektrofotometru koristiti destiliranu vodu. Zabilježiti promjene boje i komentirati rezultate. Pratiti i kinetiku djelovanja polifenoloksidaze u uzorku voća kroz 30 min u funkciji vremena, te rezultate prikazati grafički.

Postupak 1:

Odvagati 10 g narezane banane. Kontrolna masa ploda uroni se u 20 mL 1%-tne otopine tiouree koja zaustavlja enzimatsku reakciju posmeđivanja. Drugi se plod uroni u 20 mL destilirane vode. Uzorci se homogeniziraju u mikseru i filtriraju kroz Buchnerov lijevak i filter papir. Stupanj reakcije posmeđivanja prati se na spektrofotometru, na valnoj duljini od 475 nm na način da se 1 mL filtrata doda u 5 mL vode, stavi u kivetu i očitava absorbancija. Očitavanje se vrši periodično tijekom 30 min i rezultati se prikazuju u obliku krivulje s očitanim absorbancijom u funkciji vremena, a krivulja predstavlja mjeru aktivnosti enzima polifenoloksidaze u odabranom voću.

Postupak 2:

Izrezati voće na tri jednaka dijela. Prvi dio ostaviti izložen na zraku (kontrola), drugi dio prelitati sokom od limuna ili naranče, a treći dio staviti u plastičnu vrećicu. Svaki 10 min tijekom perioda od pola sata pratiti i opisati zapažanja na uzorcima voća. Na temelju konačnih zapažanja moguće je izvesti zaključke o udjelu askorbinske kiseline u odabranom voću, o utjecaju soka od naranče i/ili limuna na sprječavanje procesa posmeđivanja te o utjecaju plastične ambalaže u sprječavanju pojave posmeđivanja.

Zadatak:

Na zabilješkama je potrebno navesti vrstu voća, ime uzorka, opisati boju uzorka nakon rezanja, boju nakon 10, 20, 30 min te nakon 24 sata. Također je potrebno navesti na koji bi način i zašto sačuvali dio ploda od procesa posmeđivanja te koje sve tehnike čuvanja voća poznajete u cilju osiguranja njihove optimalne kakvoće.

ODREĐIVANJE ENERGETSKE VRIJEDNOSTI HRANE

Energetska vrijednost hrane se određuje u kalorimetru gdje se osušeni uzorak spaljuje uz prisustvo kisika do pepela, a mjeri se toplina koja se pri tome oslobađa. Količina oslobođene topline, tj. energije izražava se u **kcal = kilokalorijama** ili **kJ= kilojoulima**.

- **1 kcal** je količina topline potrebna da se 1 kg vode zagrije za 1 °C i to od 15-16°C.
- **1 kJ** je količina energije koja se utroši da se masa od 1 kg pomjeri 1 m primjenom sile od 1 N koja daje ubrzanje 1m/s.

$$1 \text{ kcal} = 4,187 \text{ kJ (cca 4,2)}$$

$$1 \text{ kJ} = 0,239 \text{ kcal (cca 0,24)}$$

Potpunim izgaranjem različitih hranjivih tvari oslobađa se različita količina energije:

1 g bjelančevina daje 4 kcal ili 16,8 kJ

1 g masti daje 9 kcal ili 37,8 kJ

1 g ugljikohidrata daje 4 kcal ili 16,8 kJ

1 g alkohola daje 7 kcal ili 29,3 kJ

1 g organskih kiselina daje 3 kcal ili 12,6 kJ

Energetska vrijednost namirnica izračunata je iz količine bjelančevina, masnoća, ugljikohidrata i alkohola u namirnici, odnosno u piću, uz upotrebu faktora za izračunavanje energije. U tablicama su energetske vrijednosti za namirnice prikazane u kilojoulima (kJ) i kilokalorijama (kcal). Faktori za izračunavanje energije su:

Bjelančevine	4 kcal/g ili 17 kJ/g
Masti	9 kcal/g ili 37 kJ/g
Ugljikohidrati	4 kcal/g ili 17 kJ/g
Alkohol	7 kcal/g ili 29 kJ/g

Ako se energetska vrijednost iskazana u kilokalorijama želi preračunat u kilojoule koristi se izraz:

$$1 \text{ kcal} = 4,184 \text{ kJ}$$

BJELANČEVINE

Čine 16-19% ukupne tjelesne mase i predstavljaju najvažniji biološki sastojak svake žive stanice. Bjelančevine su građevni materijal za rast i obnavljanje tkiva i uključene su u gotovo sve biološke procese. Građene su od aminokiselina kojih u prirodi ima oko 200., a u ljudskom organizmu je prisutno 20 aminokiselina. Namirnice bogate bjelančevinama su namirnice životinjskog porijekla (meso, riba, jaja, mlijeko...) i namirnice biljnog porijekla (grah, leća i soja). Potreba organizma za proteinima ovisi o ravnoteži dušika, tj. omjeru spojeva koje organizam prima hranom i spojeva koje organizam izlučuje kao ureu i amonijak (urinom ili znojem). Smatra se da je optimalna količina proteina koju treba unijeti u organizam prehranom 1 g/ kg tjelesne mase, tj. prosječno 70-100 g dnevno.

UGLJIKOHIDRATI

Osiguravaju glavninu ukupne energije u prehrani, a preporuča se unos 60% U_h odnosno 4 kg/ kg tjelesne mase. Prema strukturi UH se dijele na probavljive (škrob i šećeri) i neprobavljive (polimeri, vlaknaste tvari, celuloza, itd.)

MASTI

Ukupne masti čine trigliceridi, fosfolipidi, steroli i dr., izvor su namirnice biljnog i životinjskog porijekla (tekuće masti – biljnog; krute masti – životinjskog). Preporuka je da u energetske vrijednosti cjelokupnog obroka masti budu zastupljene sa 25-30%, a minimalno bi 1/3 te vrijednosti trebale činiti masnoće biljnog porijekla koje sadrže nezasićene masne kiseline. Optimalna dnevna potreba odraslog organizma po kilogramu tjelesne težine iznosi 1-3 g.

VITAMINI

Najvažniji i organizmu najpotrebniji su vitamin C, vitamini B kompleksa, vitamin A, vitamin E i D.

ESENCIJALNI OLIGOELEMENTI

Fe, Zn, Cu, Cr, Se, Mo, I, i dr.

VODA

U umjerenim klimatskim uvjetima uz lagani fizički rad odrasla osoba treba 2,5 L vode dnevno (1,2-1,5 L se unosi pićem, hranom 0,8-1 L, a sam organizam oksidacijom hranjivih tvari stvara endogenu (metaboličku) vodu 0,3 L).

Zadatak:

1. Kolika je energetska vrijednost 1 kg mlijeka izražena u kJ ako je kemijski sastav mlijeka slijedeći:

100 g mlijeka sadrži:

- 3,6 g bjelančevina (3 g Ca-kazeinata, 0,5 g laktalbumina, 0,1 g laktoglobulina)
- 2,5 g triglicerida (11 g kolesterola)
- 4,7 g ugljikohidrata (laktoze)
- 0,7 g mineralnih tvari
- 87,5 g vode

3,6 g bjelančevina	u	100 g mlijeka
X g bjelančevina	u	1000 g mlijeka

X = 36 g bjelančevina

36 g bjelančevina $\times$ 4 kcal = 144 kcal

35 g triglicerida $\times$ 9 kcal = 315 kcal

47 g ugljikohidrata $\times$ 4 kcal = 188 kcal

Ukupno = **647 kcal**

647 kcal $\times$ 4,2 = **2717 kJ**

2. Kolika je energetska vrijednost 100 g mliječne čokolade izražena u kJ ako 50 g čokolade ima 1 g vode, 4 g proteina, 17 g masnoća, 27 g saharoze i 0,6 g mineralnih tvari?

4 g bjelančevina	u	50 g čokolade
X g bjelančevina	u	100 g čokolade

X = 8 g bjelančevina

8 g bjelančevina $\times$ 4 kcal = 32 kcal

34 g triglicerida $\times$ 9 kcal = 306 kcal

54 g ugljikohidrata $\times$ 4 kcal = 216 kcal

32 + 306 + 216 = 544 kcal $\times$ 4,2 = **2327 kJ**

3. Odrasli čovjek za doručak pojede dvije kriške pšeničnog bijelog kruha (30 grama), 20 g sirnog namaza koji sadrži 30% masnoća, jednu breskvu (cca 20 g) i popije jednu čašu kravljeg mlijeka (cca 200 g) koje sadrži 3,3% masti. Izračunajte koje je količine pojedinih sastojaka čovjek unio u svoj organizam nakon što je pojeo doručak i kolika je njihova energetska vrijednost.

4. Ručak četveročlane obitelji (roditelji i 2 dvoje djece) sastoji se od krem juhe od povrća (dehidrirane- 100 g), 400 g srednje masnog telećeg mesa pečenog na 30 g nesoljene svinjske masti zajedno s 300 g mladog krumpira, 150 g zelene salate začinjene s 15 g jabučnog octa i 10 g repičinog ulja. Za desert je posluženo svakome po 50 g kompota od bresaka. Koliko su hranjivih, a koliko zaštitnih tvari unijeli u organizam svi članovi obitelji, a koliko svatko od njih posebno ako je otac pojeo 50% svih jela, majka 25%, a djeca sav ostatak u jednakoj količini. Kolika je energetska vrijednost cijelog jela, a kolika obroka pojedinih članova?

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH METODOM

Antioksidansi su, po definiciji, sve one tvari koje u maloj količini u kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidanata. Slobodni radikal je svaki atom ili molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnim i veoma reaktivnim. Antioksidacijsku aktivnost uzoraka odrediti ćemo mjerenjem sposobnosti inhibicije slobodnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Antioksidacijska sposobnost se mjeri u vidu otpuštanja vodika od strane antioksidansa odnosno sposobnosti vezivanja radikala pri čemu se koristi stabilan DPPH radikal.

Materijal:

Posudica za vaganje, odmjerne tikvice, staklene kivete, spektrofotometar, analitička vaga, etanol, otopina DPPH radikala (4 mg/100 mL etanola),

Postupak:

U kivetu širine 1 cm pipetirati 2 mL DPPH otopine i izmjeriti početnu apsorbanciju otopine radikala (A_0). U kivetu dodati etanolnu otopinu (50 μ L) uzorka tj. antioksidansa, smjesu dobro promiješati i pratiti promjenu apsorbancije otopine tijekom 1 sat pri valnoj duljini od 517 nm. Za baždarenje spektrofotometra i određivanje nule u referentnoj kiveti koristiti čisti etanol. Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računati prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

A_0 - apsorbancija otopine DPPH radikala kod $t = 0$ min

A_t - apsorbancija reakcione smjese kod $t = 1$ sat.

Zadatak:

Za svaku vrijednost izmjerene apsorbancije ispitivanog uzorka izračunati postotak inhibicije. Pratiti kinetiku „gašenja“ slobodnog radikala tijekom 20 minuta mjereći apsorbanciju uzorka svakih 30 sekundi. Nacrtati krivulju ovisnosti vrijeme - %inhibicije.

ENERGETSKE POTREBE ORGANIZMA

Čovjekovom organizmu je potrebna energija za:

- bazalni metabolizam (60-70% E),
- termogenezu (5-15% E) i
- fizičku aktivnost (15-35% E)

Preporuča se da udio prehrambenih tvari u ukupnoj energiji planiranog obroka bude:

- Bjelančevine 12-15% (1-1,5 g/kg)
- Masti oko 30% (1,5 g/kg)
- Ugljikohidrati 50-60% (4-6 g/kg)

- **Indeks tjelesne mase (ITM)**

$$\text{ITM} = \text{TM} / \text{TV}^2$$

- **Stupanj uhranjenosti**

$$\text{STUPANJ UHRANJENOSTI (\%)} = (\text{TM} / \text{ITM}) * 100$$

$$\text{ITM (muškarci)} = (\text{TV} - 100) - (\text{TV} - 150) / 4 + (\text{D} - 20) / 4$$

$$\text{ITM (žene)} = (\text{TV} - 100) - (\text{TV} - 150) / 2,5 + (\text{D} - 20) / 4$$

TM – tjelesna masa (kg)

TV – tjelesna visina (m)

D - dob (god)

< 18,5	pothranjenost
18,5 – 24,9	poželjna težina
25,0 – 29,9	povećana težina
30,0 – 34,9	stupanj pretilosti I
35,0 – 39,9	stupanj pretilosti II
> 40,0	stupanj pretilosti III

BAZALNI METABOLIZAM (MB)

- je količina energije potrebna za rad unutrašnjih organa i za održavanje tjelesne topline pri potpunom mirovanju organizma u uvjetima povoljne vanjske temperature i kada organizam nije uzimao hranu najmanje 12 sati.

$$\text{BM} = \text{stm} \times 20 \text{ kcal}$$

$$\text{BM} = \text{itm} \times 28 \text{ kcal}$$

stm – standardna tjelesna masa (visina – 100)

itm – idealna tjelesna masa (masa mišićnog tkiva)

Faktori koji utječu na BM:

1. **površina tijela** – tijelo veće površine treba više energije za održavanje stalne tjelesne temperature.
2. **sastav tijela** – tijelo s većim udjelom masnog tkiva treba manje energije za BM.
3. **spol** – žene trebaju 5-10 % manje energije za BM nego muškarci, jer žene genetski imaju predodređeno više masnog tkiva.
4. **životna dob** – energija za BM je veća u doba rasta i puberteta, a smanjuje se nakon 40 –te godine života 5 % po dekadi.
5. **endokrine žlijezde** – najveći utjecaj ima žlijezda štitnjača – kod hipotireoze (smanjena funkcija štitnjače) se količina energije za BM smanjuje za 50 %, a kod hipertireoze se povećava za 100 %.
6. **posebna fiziološka stanja** – pr. trudnoća, dojenje – trudnice trebaju prosječno 350 kcal više tijekom dana, a dojilje 550 ckal.
7. **posebna patološka stanja** – pr. kod povećane tjelesne temperature treba nam 7 % više energije za BM.
8. **spavanje** – za vrijeme spavanja BM se smanjuje za 10%.

TERMOGENEZA

- je utrošak energije za:

1. **prehranu** – energetska potreba za probavu hrane (i apsorpcija, i metabolizam i eliminacija) iznose prosječno 10 % od energije potrebne za BM.
2. **djelovanje termogenetskih agenasa** – za neutralizaciju i razgradnju pojedinih spojeva koji nisu hranjive tvari naš organizam troši dodatnu energiju (pr. kod pušenja 1 kutije cigareta dnevno povećana je potrošnja energije za približno 200 kcal)
3. **održavanje stalne tjelesne temperature kod promjenjivih vanjskih uvjeta** – kad se vanjska temperatura snižava povećava se i energetska potreba organizma, pa tako za svaki 10 °C nižih od 15 °C povećava se BM za 5 %.

TJELESNA AKTIVNOST

Bilo kakva fizička aktivnost zahtjeva dodatnu energiju, a količina energije koja se troši ovisi o težini i duljini trajanja tog fizičkog rada. Fizičke aktivnosti podijeljene su u 3 kategorije:

1. **laka fizička aktivnost** – svi poslovi koji se obavljaju sjedeći (učenik, student, ...)
2. **umjerena fizička aktivnost** – svi poslovi koji se obavljaju stojeći, a dase pritom ne diže teret veći od 50 kg (farmaceuti, stomatolozi, ...)
3. **teška fizička aktivnost** – svi poslovi kod kojih se diže teret viši od 50 kg (rudari, građevinari, ...)

Da bi izračunali dnevnu energetska potrebu organizma (za taj dan) **Epo** koristi se izraz:

$$Epo = eBM + dah \pm fBM + fa$$

eBM – energija potrebna za bazalni metabolizam

dah – dinamička aktivnost hrane (probava) (10% od BM)

fBM – faktori koji utječu na BM (pr. spavanje)

fa – fizička aktivnost

Da bi izračunali fizičku aktivnost koristimo sljedeće izraze:

Laka fizička aktivnost (8 sati)	→	$\text{stm} \times 6 \text{ kcal}$
Umjerena fizička aktivnost	→	$\text{stm} \times 10 \text{ kcal}$
Teška fizička aktivnost	→	$\text{stm} \times 20 \text{ kcal}$

VITAMINI

U tablici su navedeni podaci o količinama ukupnog vitamina A iskazanog u retinol ekvivalentima (RE), te odvojeno sadržaj retinola i sadržaj karotena (beta karoteni i ostali karotenoidi preračunati na aktivnost beta karotena), iskazani u mikrogramima.

Za izračunavanje retinol ekvivalenata (RE), tj. ukupne aktivnosti vitamina A iz sadržaja retinola i karotena u pojedinim namirnicama koristi se sljedeća formula:

$$\text{RE } (\mu\text{g}) = \text{retinol } (\mu\text{g}) + (\text{betakaroten } (\mu\text{g}) / 6)$$

A za mlijeko i mliječne proizvode formula:

$$\text{RE } (\mu\text{g}) = \text{retinol } (\mu\text{g}) + (\text{betakaroten } (\mu\text{g}) / 2)$$

Zadaci:

1. Muškarac standardne tjelesne mase 79 kg, zaposlen kao poštar, nakon posla igra nogomet 3 h (potroši 31,5 kJ/min), popravljao automobil 2 h (17,2 kJ/min), spavao 7 h. Kolike su njegove Epo izražene u kcal?

$$BM = stm \times 20 \text{ kcal} = 79 \times 20 = \mathbf{1580 \text{ kcal}}$$

$$Umjerena \text{ fizička aktivnost} = stm \times 10 \text{ kcal} = \mathbf{790 \text{ kcal}} \quad (8h)$$

$$3 \text{ h nogometa} = 31,5 : 4,2 = 7,5 \text{ kcal/min}$$

$$7,5 \times 180 \text{ min} = \mathbf{1350 \text{ kcal}}$$

$$2 \text{ h popravljavanja auta} = 17,2 : 4,2 = 4,1 \text{ kcal/min}$$

$$4,1 \times 120 \text{ min} = \mathbf{491 \text{ kcal}}$$

$$7 \text{ h spavanja} = 1580 \text{ kcal} : 24 = 65,8 \text{ kcal/min} \quad (\text{cca } 66)$$

$$10\% \text{ od } 66 = 6,6 \text{ kcal} \times 7 \text{ h} = \mathbf{-46 \text{ kcal}}$$

$$dah = 10\% \text{ od } BM = \mathbf{158 \text{ kcal}}$$

$$Epo = 1580 + 790 + 1350 + 491 + 158 - 46 = \mathbf{4323 \text{ kcal}}$$

2. Žena visoka 164 cm, redovni student, učila 4 h i slušala predavanja 4 h, poslijepodne 2 h plivala u bazenu i trošila 5 kcal/min, spavala 10 h. Epo=?

$$stm = \text{visina} - 100 = 164 - 100 = \mathbf{64}$$

$$BM = stm \times 20 \text{ kcal} = 64 \times 20 = \mathbf{1280 \text{ kcal}}$$

$$Laka \text{ fizička aktivnost} (4 \text{ h učenja} + 4 \text{ h slušanja}) = stm \times 6 \text{ kcal} = \mathbf{384 \text{ kcal}} \quad (8h)$$

$$plivanje = 5 \text{ kcal} \times 120 \text{ min} = \mathbf{600 \text{ kcal}}$$

$$spavanje = 1280 \text{ kcal} : 24 = 53 \text{ kcal/1 h}$$

$$10\% \text{ od } 53 = 5,3 \text{ kcal} \times 10 \text{ h} = \mathbf{-53 \text{ kcal}}$$

$$dah = 10\% \text{ od } BM = \mathbf{128 \text{ kcal}}$$

$$Epo = 1280 + 384 + 600 + 128 - 53 = \mathbf{2339 \text{ kcal}}$$

3. Žena visoka 173 cm, zaposlena kao kuharica, dojilja, nakon posla je peglala 2 h (14,6 kJ/min), odmarala se i spavala 7 h. $E_{po}=?$

$$stm = \text{visina} - 100 = 173 - 100 = 73$$

$$BM = stm \times 20 \text{ kcal} = 73 \times 20 = 1460 \text{ kcal}$$

$$Dojenje = 500 \text{ kcal/dan}$$

$$Umjerena \text{ fizička aktivnost} = stm \times 10 \text{ kcal} = 730 \text{ kcal} \quad (8h)$$

$$peglanje = 14,6 \text{ kJ} : 4,2 = 3,5 \text{ kcal/min}$$

$$3,5 \times 120 \text{ min} = 420 \text{ kcal}$$

$$spavanje = BM : 24 = 1460 : 24 = 61 \text{ kcal/h}$$

$$10\% \text{ od } 61 = 6,1 \text{ kcal} \times 7 \text{ h} = - 43 \text{ kcal}$$

$$dah = 10\% \text{ od } BM = 146 \text{ kcal}$$

$$E_{po} = 1460 + 500 + 730 + 420 + 146 - 43 = 3213 \text{ kcal}$$