



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Saša Krstović, Vojislava Bursić



Kvalitet i zdravstvena bezbednost poljoprivrednih proizvoda

PRAKTIKUM



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Saša Krstović
Vojislava Bursić

**Kvalitet i zdravstvena bezbednost poljoprivrednih proizvoda -
Praktikum**

Novi Sad, 2024.

EDICIJA POMOĆNI UDŽBENIK

Osnivač i izdavač edicije
Univerzitet u Novom Sadu

Poljoprivredni fakultet Novi Sad
Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad

Godina osnivanja 1954.

Glavni i odgovorni urednik edicije

Dr Nedeljko Tica, redovni profesor
Dekan Poljoprivrednog fakulteta

Članovi Komisije za izdavačku delatnost

Prof. dr Branislav Vlahović, predsednik

Prof. dr Ivana Davidov, član

Doc. dr Dejan Beuković, član

Doc. dr Ksenija Mačkić, član

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Biblioteka Matice srpske, Novi Sad

KRSTOVIĆ, Saša 1987-

Kvalitet i zdravstvena bezbednost poljoprivrednih proizvoda - Praktikum /Saša Krstović,
Vojislava Bursić - Novi Sad : Poljoprivredni fakultet, 2024 (Novi Sad). - 122 str.: ilustr. ;
30 cm. - (Edicija Pomoćni udžbenik / Poljoprivredni fakultet, Novi Sad)

Tiraž 20. – Bibliografija

ISBN 978-86-7520-603-3

a) Kvalitet i zdravstvena bezbednost poljoprivrednih proizvoda – Praktikum
1. Vojislava Bursić [autor]
COBISS.SR-ID

Autori

Dr Saša Krstović, docent
Dr Vojislava Bursić, redovni profesor

Glavni i odgovorni urednik

Dr Nedeljko Tica, redovni profesor
Dekan Poljoprivrednog fakulteta

Urednik

Doc. dr Dejan Beuković
Direktor Departmana za stočarstvo
Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu

Tehnički urednik

Dr Saša Krstović, docent

Recenzenti:

Dr Igor Jajić, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Dr Snežana Kravić, redovni profesor
Tehnološki fakultet Novi Sad

Izdavač

Univerzitet u Novom Sadu,
Poljoprivredni fakultet Novi Sad

Zabranjeno preštampanje i fotokopiranje. Sva prava zadržava izdavač.

Štampa:

Štampanje odobrila:

Komisija za izdavačku delatnost, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Tiraž: 20

Mesto i god. štampanja: Novi Sad, 2024.

PREDGOVOR

Praktikum je napisan prema nastavnom planu i programu iz predmeta “Kvalitet i zdravstvena bezbednost poljoprivrednih proizvoda” i prvenstveno je namenjen studentima smeru Organska poljoprivreda, na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu. Takođe ga kao pomoćnu nastavnu literaturu, mogu koristiti studenti smerova Stočarstvo, Fitomedicina, Hortikultura i Ratarstvo i povrtarstvo.

Autori su se trudili da izloženi materijal ne sadrži previše detalja, imajući u vidu predznanje i potrebe studenata u vezi sa tematikom praktikuma. U okviru praktikuma su obuhvaćeni najsavremeniji trendovi i saznanja iz oblasti kvaliteta hrane kao i metode određivanja sadržaja hranljivih materija (nutrijenata) ali i mogućih kontaminanata poljoprivrednih proizvoda.

Na izuzetnoj pomoći prilikom izrade praktikuma, autori se zahvaljuju dr Gorici Vuković, kao i recenzentima dr Igoru Jajiću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i dr Snežani Kravić, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu.

Autori se unapred zahvaljuju svima koji bi svojim savetima, primedbama i sugestijama doprineli poboljšanju kvaliteta budućih izdanja.

Autori

Novi Sad, jul 2024. godine.

SADRŽAJ

Vitamini	11
Vitamin C.....	11
Vežba 1. Određivanje vitamina C.....	15
Fotosintetički pigmenti	17
Vežba 2. Određivanje hlorofila a, b i karotenoida.....	20
Boja namirnica.....	22
Pigmenti u mesu i boja mesa	25
Vežba 3. Određivanje boje mesa	27
Vežba 4. Određivanje ukupnih pigmenata u mesu	28
Sposobnost vezivanja vode.....	29
Vežba 5. Sposobnost vezivanja vode	31
Upotreba nitrata u poljoprivrednoj proizvodnji.....	32
Vežba 6. Određivanje nitrata u povrću	35
Sadržaj vode i suve materije u poljoprivrednim proizvodima.....	37
Vežba 7. Određivanje sadržaja vode i suve materije poljoprivrednih proizvoda.....	40
Kiselost voća i povrća.....	42
Vežba 8. Određivanje kiselosti voća i povrća	45
Kvalitet meda.....	46
Vežba 9. Ispitivanje kvaliteta meda.....	48
Kvalitet jaja.....	50
Vežba 10. Ispitivanje kvaliteta jaja.....	60
Hromatografija.....	63
Adsorpciona hromatografija	64
Hromatografija na tankom sloju - TLC	65
Vežba 11. Određivanje histamina u ribama metodom tankoslojne hromatografije	69
Gasna hromatografija	72
Tečna hromatografija visokih performansi.....	76
Sekundarni biomolekuli.....	80
Fenoli	80
Antioksidativna svojstva biljaka.....	82
Sekundarni metaboliti u poljoprivrednim proizvodima iz organske proizvodnje	82
Tečna hromatografija u određivanju fenolnih jedinjenja.....	82

Vežba 12. Određivanje fenolnih kiselina u liski suncokreta	83
Ostaci pesticida u poljoprivrednim proizvodima	87
Ostaci pesticida u organski proizvedenim biljnim proizvodima	87
Određivanje ostataka pesticida u voću i povrću	88
Parametri validacije metode.....	88
Validacija analitičke metode za određivanje ostataka pesticida u hrani.....	89
Vežba 13. Određivanje ostataka pesticida u povrću.....	92
Mikotoksini.....	98
Vežba 14. Određivanje mikotoksina u hrani za životinje.....	104
Senzorna analiza hrane	106
Vežba 15. Testovi senzitivnih pragova čula ukusa.....	109
Biokristalizacija.....	111
Literatura	114

VITAMINI

Naziv vitamin je nastao od složenice „amin života“ (*vit-* od Latin *vita* - život + *amin* od amina), imajući u vidu da su prva otkrivena jedinjenja vitamina bila sa amino grupom (vitamin B₁). Kada se govori o vitaminima, radi se o grupi visokomolekularnih organskih jedinjenja različite hemijske prirode, koji su u malim količinama potrebni za normalno funkcionisanje organizma. Sve navedeno, ukazuje na njihovu katalitičku i koezimsku ulogu (Pribiš, 1999). Najvažniji izvor vitamina su biljke. Čovek i životinje dobijaju vitamine iz biljne hrane ili preko životinjskih namirnica, dok se delimično potrebe za vitaminima zadovoljavaju preko sinteze mikroorganizama u probavnom traktu.

Vitamini se, u načelu, ne sintetišu u organizmu, nego se svakodnevno moraju unositi hranom, pa se označavaju i kao hranljive materije. Takođe se nazivaju i zaštitne materije, štiteći zdravstvenu kondiciju organizma uz regulaciju metabolizma hranljivih materija (Pribiš, 1999). Vitamini su esencijalni sastojci hrane, kao i esencijalne amino- i masne kiseline.

Nedostatak vitamina (avitaminoza) izaziva brojne poremećaje i bolesti, koje mogu biti genetske ali i sa smrtnim ishodom. Od davnina, avitaminoze su bile poznate. Naime, kokošije slepilo (nedostatak vitamina A) se 2000 godina u kineskoj medicini leči životinjskom jetrom i izmetom slepog miša u kojem se nalazi velik broj nesvarenih očiju komaraca, materijama bogatim vitaminom A (Pribiš, 1999). Dugogodišnju smrtonosnu bolest ne samo moreplovaca, već svih ljudi koji su se hranili hranom siromašnom vitaminom C, izlečio je sok od limuna i pomorandže, bogat ovim vitaminom (Tansey, 2016). Za bolest beri-beri izazvanu nedostatkom vitamina B₁ ili rahitis (nedostatak vitamina D) i njegovo lečenje ribljim uljem, znalo se mnogo ranije nego što se znao uzrok nastajanja. Mnogo ređi su podaci u vezi sa prekomernom količinom vitamina (hipervitaminoza). Jedan od takvih je, na primer, slučaj da su polarni istraživači podlegali trovanju usled ishrane jetrom belog medveda, odnosno, unošenja visokih količina vitamina A.

Osim vode i izvora energije, za očuvanje zdravlja i normalne funkcije organizma, potrebna su 24 esencijalna jedinjenja, od kojih su više od polovine – vitamini. Neophodno je pravilno doziranje vitamina jer svako preveliko, kao i nedovoljno unošenje, dovodi do disfunkcije organizma.

Vitamin C

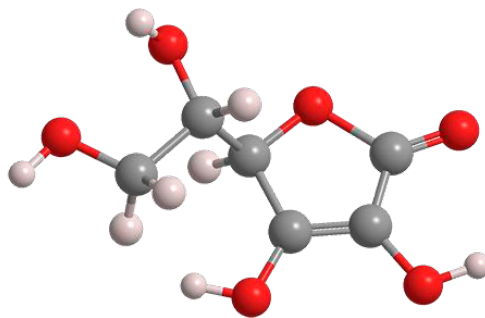
Najstarija podela vitamina je na hidrosolubilne i liposolubilne vitamine. Vitamin C je hidrosolubilni vitamin koji se:

- dobro rastvara u vodi i alkoholu,
- ne rastvara u lipidima i mnogim organskim rastvaračima,
- termolabilan je,
- nestabilan na promene pH sredine,
- ne može se deponovati u organizmu.

Mnogi od hidrosolubilnih vitamina su sastavni deo enzima i neposredni učesnici većine reakcija razmene materija u živim organizmima. Ovi vitamini se lako transportuju kroz organizam i izlučuju mokraćom, čime se isključuje hipervitaminoza.

Otkrivanje vitamina C u vezi je sa dvojicom nobelovaca Albert Sent-Derđi koji je iz prirodne sirovine izolovao askorbinsku kiselinu 1928. godine, i Linus Pauling koji ga je 1934. godine, sintetisao. Tako je dobijen antiskorbutni vitamin koji je izlečio skorbut.

Askorbinska kiselina je beo kristalan prah, bez mirisa, kiselog ukusa i osetljiva na svetlost. Vitamin C (Slika 1) je po građi u osnovi heksoza sa četiri optička izomera od kojih biološku aktivnost imaju L-konfiguracije.



Slika 1. Struktura C vitamina (American Chemical Society, 2023)

L-askorbinska kiselina (vitamin C) je čvrsta supstanca u vidu belih kristala sa tačkom topljenja do 192°C. Kiselošć vitamina C potiče od dve hidroksilne (OH) grupe enolnog karaktera, koje mogu da disosuju uz izdvajanje vodonikovih jona. Postojanje dve dvostruke veze u ovom nezasićenom jedinjenju, dovodi do njegove oksidacije i do nastanka dehidroaskorbinske kiseline. Oba oblika (redukovani i oksidovani) imaju vitaminski karakter (Pribiš, 1999). Daljom oksidacijom, vitamin prelazi u jedinjenje diketoglukonsku kiselinu, koja nije aktivna. Ovaj proces se ubrzava delovanjem svetlosti i toplote.

Čovek, primati i zamorci, za razliku od biljaka i životinja, ne mogu da sintetišu askorbinsku kiselinu preko intermedijera D-glukonske kiseline, L-glukonske kiseline i L-glukonolaktone, zato što nemaju enzim L-glukonolakton oksidazu, pa zbog toga, vitamin C moraju unostiti hranom u organizam (Tansey, 2016). U organizmu se askorbinska kiselina brzo usvaja iz tankog creva, preko krvi dospeva u jetru, a zatim u druge organe i tkiva. Veće količine askorbinske kiseline se javljaju u nadbubrežju. U mnoge ćelije C vitamin dospeva u obliku dehidroaskorbinske kiseline. Najveći deo askorbinske kiseline vezan je sa proteinima u Goldžijevom kompleksu i mitohondrijama. U toku oksidacije, konačan produkt razgradnje je oksalna kiselina. Izvesna količina askorbinske kiseline se mokraćom izlučuje iz organizma. Poluživot C vitamina u organizmu iznosi šesnaest dana.

Značaj C vitamina

Vitamin C učestvuje u oksido-redukcionim procesima kao prenosilac elektrona. U eritrocitima, ima zaštitnu funkciju (štiti hemoglobin), dok u vezivnom tkivu ima glavnu ulogu kod formiranja oksiprolina u sintezi kolagena. Takođe, „čuva” adrenalin od oksidacije. Utiče na povećanje količine „dobrog” holesterola, odnosno, lipoproteina veće gustine, smanjujući rizik bolesti krvnih sudova (Matt i sar., 2011). Vitamin C štiti vitamine A, E i B od oksidacije i povećava iskorišćenje folne kiseline. Askorbinska kiselina povećava otpornost organizma prema virusnim i bakterijskim infekcijama, alergijama, a efikasna je u lečenju disajnih puteva i drugih bolesti (Sasazuki i sar., 2006).

Askorbinska kiselina je dobro poznata po svom antioksidativnom delovanju – u „borbi“ protiv slobodnih radikala. Postavlja se pitanje: „Šta su slobodni radikali?“ Radijacijom, UV zračenjem ili oksidacijom, kovalentna veza organskog molekula (zajednički elektronski par) se homolitički cepa usled čega nastaju čestice bogate energijom sa po jednim nesparenim elektronom, koje nazivamo slobodni radikali. Kako elektron slobodnog radikala ne može da ostane nesparen, kreće „u napad“ na susedne molekule, kako bi od njih „oteo“ jedan elektron i postigao stabilnu strukturu. Tako kreće lančana reakcija u kojoj su glavne mete molekuli lipida i proteina. Stvaranje slobodnih radikala u našem organizmu je konstantan proces. U tome se ističe jedna vrsta krvnih zrnaca – fagociti, sa ciljem uništavanja bakterija i virusa u organizmu. Sa tog stanovništva, slobodni radikali su korisni, pod uslovom da ih nema previše i da su pod kontrolom. Kontrola se reguliše materijama koje sprečavaju oduzimanje elektrona – antioksidantima. Ove materije proizvodi naše telo ili ih unosimo hranom (razni enzimi, vitamin C, E, A i oligoelementi). U uslovima povećanog izlaganja suncu ili drugim štetnim agensima, poput pušenja, antioksidantni postaju nemoćni. Ako kožu oko podneva, izlažemo UV zracima, proizvodnja slobodnih radikala se povećava za 130%. U tim slučajevima slobodni radikali napadaju ćelijske membrane i dovode do raspadanja ćelija (Pribiš, 1999). Kada u ljudskom organizmu nastaje više slobodnih radikala od antioksidanata, nastaje oksidativan stres, koji dovodi do kardio-vaskularnih bolesti, hipertenzije, hroničnih bolesti i dijabetesa.

Vitamin C u hrani i dnevne potrebe

Glavni izvor askorbinske kiseline su namirnice biljnog porekla (Skroza i sar., 2010). Jedna paprika zadovoljava dnevne potrebe, pri čemu crven, zreliji i mesnati plod ima viši sadržaj C vitamina. Citrusi su odličan izvor vitamina C, kao i lisnato povrće i plodovi paradajza. Krompir sadrži male količine vitamina C, ali predstavlja značajan izvor vitamina C za ljudsku populaciju jer se konzumira u velikim količinama (Katalinić, 2006). U tabeli 1, su date količine askorbinske kiseline u pojedinim namirnicama.

Tabela 1. Sadržaj vitamina C u namirnicama (mg/100 g namirnice)

Namirnica	Sadržaj vitamina C	Namirnica	Sadržaj vitamina C
Šipak	1025	Spanać, luk vlašac	47
Peršunov list	166	Kupus - beli	46
Paprika - sveža	139	Kelj - običan	59
Ribizla - crna	136	Grejpfrut	45
Ren	114	Peršun - koren	41
Kelj - zeleni	105	Blitva	39
Kelj - pupčar	104	Ribizla	35
Mirodija	93	Praziluk	30
Karfiol	70	Rotkva, rotkvica	29
Jagoda	59	Grašak, malina	25
Limun, keleraba	53	Paradajz	24
Pomorandža	51	Ananas	21
Kupus - crveni	50	Boraniya - zelena	20

Smatra se da je potrebna dnevna doza C vitamina 90 mg za muškarce, a 75 mg za žene. Tokom trudnoće, potrebe za ovim vitaminom se povećavaju na 85 mg/dan, a u periodu dojenja na 120 mg/dan (Juraschek, 2022). Osobe koje puše, kao i one izložene stresu, bolestima ili hirurškim intervencijama imaju povećane potrebe za askorbinskom kiselinom.

Deficit vitamina C bi doveo do smanjene biosinteze kortikosteroida, kolagena, poremećaja imunog sistema, smanjenja apetita, zaustavljanje rasta, usporenog zarastanja rana, povišenja nivoa masnoće u krvi, anemije uz najčešću bolest – skorbut, koja se manifestuje krvarenjem desni, ispadanjem zuba, neugodnim zadahom iz usta, krvarenjem iz nosa i stvaranjem krvavih podliva po nogama. Suficit vitamina C se javlja kod osoba koje uzimaju velike količine vitamina C u tabletama ili kroz različite farmaceutske i komercijalne proizvode. Povišene količine ovog vitamina u organizmu mogu dovesti do nesanice, stvaranje kamena u bubregu, dijareje, smanjene količine kiseonika u tkivima, nepravilnog rada srca i drugo.

Uticaj prerade, pripreme i skladištenja proizvoda na sadržaj C vitamina

Razgradnja askorbinske kiseline u povrću, započinje odmah nakon berbe. Čuvanjem na +4°C značajno se usporava ovaj proces, dok se čuvanjem na sobnoj temperaturi, gubi velika količina ovog vitamina. Zbog toga je nakon berbe, potrebno što pre zamrznuti povrće. Pre zamrzavanja, povrće se blanšira (delimična obrada namirnica vrelom vodom, temperature od 82 do 95°C, u trajanju od pola do pet minuta; na taj način se deaktiviraju enzimi koji mogu prouzrokovati kvarenje namirnica ili se izbacuje vazduh iz njih), pri čemu dolazi i do određenog gubitka vitamina C (više kod povrća velikih površina, npr. brokoli, a manje kod graška), dok se proces raspadanja vitamina nastavlja i tokom zamrzavanja. U zamrznutom stanju, askorbinska kiselina prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu, koja je veoma stabilna na temperaturama zamrzavanja povrća. Martins i Silva (2003) navode da je nakon 250 dana skladištenja zamrznutog pasulja, gubitak dehidroaskorbinske kiseline bio 8%, što ukazuje da bi se na ovaj način sačuvalo vitamin C u pasulju. Hajšlova i sar. (2005) navode da nema velikih odstupanja u sadržaju askorbinske kiseline tokom petomesečnog skladištenja krompira pod kontrolisanim uslovima.

Gubici vitamina C u soku od narandže su proporcionalni količini kiseonika koji je inicijalno prisutan u vazduhu ili je rastvoren u soku, istovremeno zavise od temperature i vremena skladištenja napitaka (Grujić i sar., 2014). Gubitak vitamina C u sokovima je ubrzan u prvom periodu skladištenja i u korelaciji je sa potrošnjom rastvorenog kiseonika, a nakon određenog perioda se postepeno smanjuje.

Deo vitamina C se može izgubiti tokom pranja voća i povrća. Količina ispranog vitamina C u konzervisanim proizvodima od voća je beznačajna, ali može predstavljati problem kod prerade povrća.

C vitamin i biljni proizvodi iz organske proizvodnje

Poredeći kvalitet različitih sorti krompira iz organske i konvencionalne proizvodnje, u periodu od četiri godine Hajšlova i sar. (2005) ističu da je sadržaj vitamina C bio viši u krompiru proizvedenom organskom proizvodnjom, ali da je odnos povećanja sadržaja vitamina zavisio od sorte krompira.

Matt i sar. (2011) ukazuju na prisustvo moćnog antioksidansa – vitamina C u povrću, ističući da je u proseku najveća razlika između konvencionalne i organske proizvodnje, izražena kod luka.

VEŽBA 1. ODREĐIVANJE VITAMINA C

Cilj vežbe

Određivanje sadržaja vitamina C u poljoprivrednim proizvodima volumetrijskom titracijom.

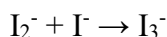
Volumetrija je metoda kvantitativne hemijske analize u kojoj je analitički signal zapremina. Zasniva se na merenju zapremine standardnog rastvora koja se utroši u potpunoj hemijskoj reakciji sa analitom. Kolevkom volumetrijske tehnike može se smatrati Francuska jer je titracionu tehniku uz konstruisanje prve birete, razvio Deskorzils krajem XVIII veka. Gaj-Lusa je razvio poboljšanu verziju birete koja je imala bočnu granu, i uveo je termine „pipeta“ i „bireta“, dok je velik napredak u metodologiji i popularizaciji volumetrijske analize ostvario Karl Fridrih Mor, koji je redizajnirao biretu, dodao slavinu na dnu, i 1855. godine, napisao prvi udžbenik o titraciji.

Suština volumetrijske tehnike bazira se na nekoliko koraka:

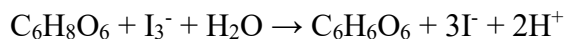
- Poznatoj zapremini ispitivane supstance, čija je količina nepoznata (titrand ili titrovani rastvor), dodaje se rastvor supstance poznate koncentracije (titrant ili titracioni rastvor).
- Rastvor se dodaje iz birete, kap po kap, nakon dodavanja indikatora, do postizanja završne tačke titracije.

Određivanje količine vitamina C u voću i povrću, izvodi se titracijom pomoću standardnog rastvora joda u prisustvu skroba kao indikatora. Jod reaguje sa vitaminom C i boja rastvora se ne menja. Kada izreaguje sav vitamin C, jod počinje da reaguje sa skrobom i u tom trenutku boja rastvora se menja iz bezbojne u tamno plavu. Očitavanjem zapremine utrošenog joda, pomoću hemijske jednačine izračunava se količina prisutnog vitamina C u uzorku.

Jod je relativno nerastvorljiv, ali se to svojstvo poboljšava stvaranjem kompleksa sa jodidnim jonima u trijodidni oblik:



Trijodidni joni dovode do oksidacije vitamina i prelaze u jone jodida. Kada se završi oksidacija vitamina C, joni trijodida ostaju u smeši i počinju da reaguju sa skrobom uz stvaranje kompleksa plavo-crne boje koji je znak završetka titracije vitamina C:



Potrebna aparatura i pribor

Odmerne tikvice od 100 i 250 mL; klipne pipete od 10 mL; 2 levka, 3 laboratorijske čaše od 250 mL; 3 Erlenmejer tikvice od 250 mL; bireta od 50 mL, normalni sud od 50 mL, tehnička vaga, analitička vaga, rešo sa azbestnom mrežicom za grejanje destilovane vode, rende i filter papir.

Potrebne hemikalije

Skrob, vitamin C, KJ, KJO_3 , cc H_2SO_4 i destilovana voda.

Priprema rastvora

Rastvor indikatora skroba priprema se tako što se 0,2500 g skroba, odmeri na analitičkoj vagi u čaši, zatim sa rastvori u 50 mL vruće destilovane vode.

Rastvor vitamina C se priprema merenjem 0,2500 g vitamina C na analitičkoj vagi uz rastvaranje u čaši sa 250 mL destilovane vode. Krajnja koncentracija rastvora je oko 1 mg/mL. Rastvor čuvati u tamnoj boci usled osetljivosti C vitamina na svetlost!

Rastvor H_2SO_4 (3 mol/L) se priprema razblaživanjem cc H_2SO_4 (98% ili 18,4 mol/L). U odmerni sud od 100 mL sipati destilovanu vodu skoro do pola, a zatim polako dodati u kapima 16,3 mL cc H_2SO_4 . Odmerni sud dopuniti destilovanom vodom do crte.

Rastvor jodida se priprema merenjem 5 g KJ (kalijum jodida) na tehničkoj vagi i 0,268 g KJO_3 (kalijum jodata) na analitičkoj vagi. Odmerene supstance rastvoriti u čaši destilovanom vodom (200 mL) i preko levka kvantitativno prebaciti u odmerni sud od 500 mL. Zatim dodati 30 mL sumporne kiseline ($c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 3 \text{ mol/L}$) i do crte dopuniti destilovanom vodom.

Priprema i analiza uzorka

Voće ili povrće izrendisati, sokove procediti preko filter papira u erlenmajer. Izmeriti 20 g soka, dodati 10 kapi indikatora i titrisati jodom. Titracija je završena kada nastane stabilna plavo-ljubičasta boja (postojana 20 sekundi).

Zabeležiti utrošak joda (mL) uz ponavljanje postupka tri puta!

Titracija standardnog rastvora vitamina C

Izmeriti 20 g rastvora vitamina C, sipati u erlenmajer uz dodavanje 10 kapi indikatora i titrovati rastvorom joda. Titracija je završena kada nastane stabilna (traje 20 sekundi) plavo-ljubičasta boja.

Zabeležiti utrošak joda (mL) uz ponavljanje postupka tri puta!

Izračunavanje

Sadržaj vitamina C u standardnom rastvoru

0,25 g vitamina C + 250 g destilovane vode = 250,25 g rastvora

$250,25 \text{ g} : 0,25 \text{ g} = 20 \text{ g} : x$

$x = 0,0199 \text{ g} \rightarrow 19,9 \text{ mg}$

x-količina vitamina C u 20 g standardnog rastvora vitamina C

Sadržaj vitamina C u uzorku

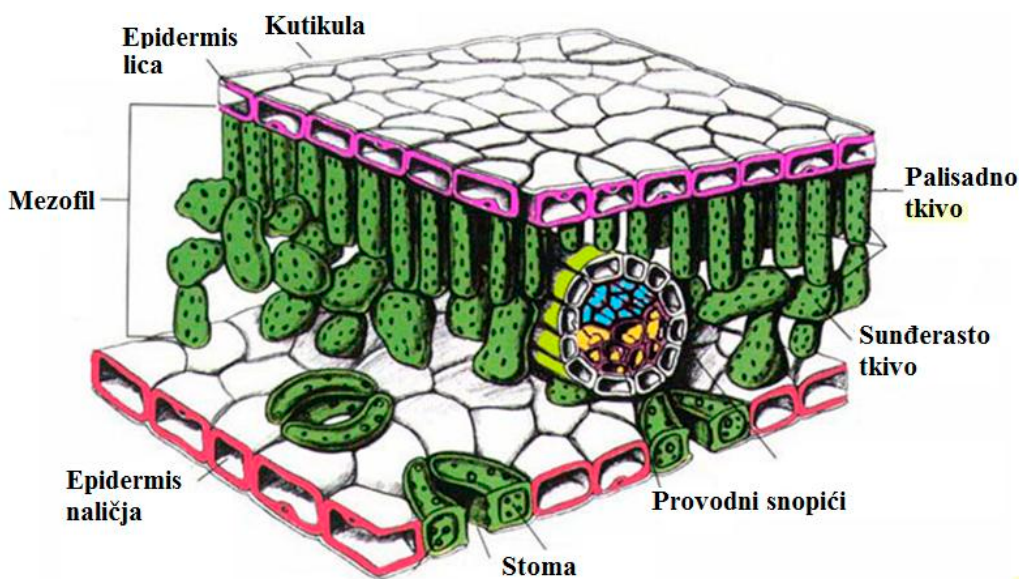
$19,9 \text{ mg} : \text{zapremina utrošenog rastvora joda za titraciju standardnog rastvora vitamina C (mL)} = y : \text{zapremina utrošenog rastvora joda za titraciju uzorka (mL)}$

y - količina vitamina C (mg) u 20 g uzorka.

FOTOSINTETIČKI PIGMENTI

Proces u kojem biljke, alge i prokarioti direktno koriste sunčevu energiju za sintezu organskih jedinjenja naziva se fotosinteza. Pre pojave fotosinteze, gotovo svi organizmi su koristili organska jedinjenja praokeana u kojem su živeli. Bili su to heterotrofni organizmi, koji su jednostavnim reakcijama heterotrofne ishrane iz ugljenikovih jedinjenja u atmosferu oslobađali ugljen dioksid (CO_2). Kako organske materije nisu bile obnovljive, smanjila se količina organski vezanog ugljenika, čime su organizmi koji nisu imali sposobnost vezivanja CO_2 bili osuđeni na izumiranje. Pojava fotosinteze (pre tri milijarde godina) nekim organizmima je omogućila preživljavanje korišćenjem novih izvora energije (Olson i Blankenship, 2004). Sunčeva svetlost, kao nov izvor energije, omogućila je prvim fotoautotrofnim organizmima sintezu organskih jedinjenja iz vode i CO_2 .

Fotosintetički organ je list (Slika 2). List je sa lica i naličja prekriven kutikulom koja ima zaštitnu funkciju. U epidermisu (pokožica) naličja lista smeštene su stome koje su zadužene za razmenu gasova sa spoljašnjom sredinom. Ispod epidermisa, na licu lista, nalaze se zbijene izdužene ćelije palisadnog tkiva, postavljene normalno na površinu lista. Ispunjene su hloroplastima i čine glavno fotosintetičko tkivo. Ispod palisadnog tkiva (idući ka naličju lista, odnosno, epidermisu naličja) nalaze se ćelije nepravilnog oblika sunderastog tkiva.

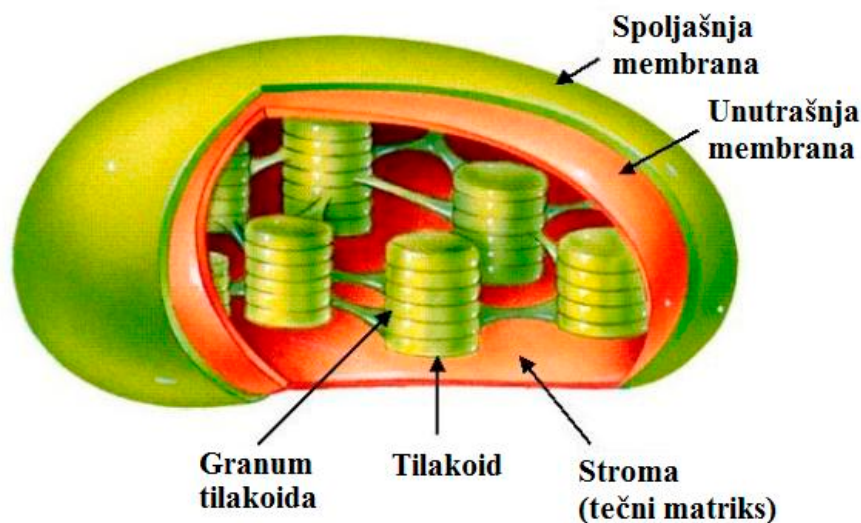


Slika 2. List kao fotosintetički organ (<https://quizlet.com/96726510/y9-science-plants-and-photosynthesis-flash-cards/>)

Mnoštvo intercelularnih prostora u sunderastom tkivu ukazuje na njihovu glavnu funkciju – razmenu gasova sa spoljašnjom sredinom. U listu se nalaze završeci sprovodnih snopića kroz koje, tokom procesa fotosinteze, otiču materije stvorene u ćelijama palisadnog tkiva.

Tokom 50-ih i 60-ih godina prošlog veka, naučnik Aron sa saradnicima objavljuje da izolovan hloroplast na svetlosti može pretvoriti CO_2 u ugljene hidrate (Popović i Malenčić, 2006). Hloroplasti (Slika 3) su organele biljnih ćelija u kojima se vrši proces fotosinteze. To su zeleni fotosintetički plastidi odgovorni za vezivanje energije svetlosti. Zahvaljujući sopstvenoj DNK (deoksiribonukleinska kiselina) i ribozomima (ćelije supramolekulske strukture čija je uloga sinteza proteina), hloroplasti mogu da rastu i da se dele nezavisno od

deobe ćelije. Spoljašnji membranski sistem sačinjen je od dvojne membrane i okružuje stromu (tečni matriks – unutrašnja sredina) (Šerban, 2001).



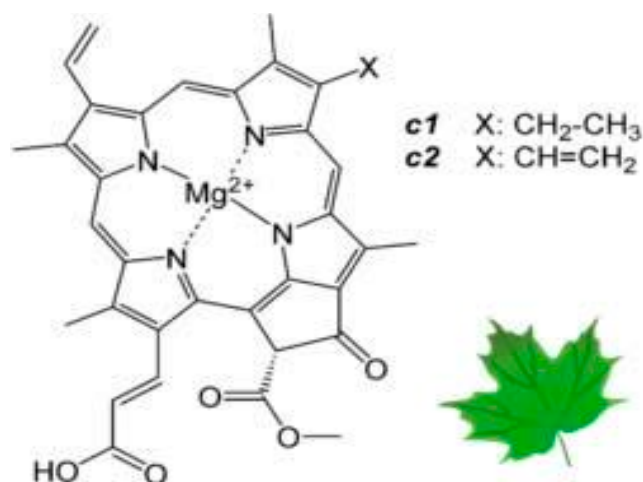
Slika 3. Građa hloroplasta (<https://lilywaynaorganellesproject.weebly.com/c.html>)

Stroma sadrži enzime koji učestvuju u fotosintezi. U stromi se nalazi unutrašnji membranski sistem sastavljen od spoljašnjih membranskih kesastih struktura, koje se nazivaju tilakoidi. Na pojedinim mestima, tilakoidi su naslagani i tako obrazuju grupacije granum tilakoida („granum“ – množina). Tilakoidi koji povezuju granume su tilakoidi strome. Obe grupe tilakoida (granuma i stroma) čine tilakoidni sistem. U membranama tilakoida ugrađeni su kompleksi fotosintetičkih pigmenata, te su membrane tilakoida ključna mesta fotosinteze.

Fotosintetički procesi se odvijaju u dve faze: reakcije svetlosti u kojima nastaje O_2 (kiseonik), ATP (adenozin trifosfat) i NADPH (redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat); i reakcije ugljenika u kojima se CO_2 redukuje do ugljenih hidrata uz utrošak ATP i NADPH nastalih u reakcijama svetlosti.

Izrazita i atraktivna boja voća i povrća potiče od prirodnih supstanci koje se u njima nalaze, a nazivaju se pigmenti. Biljni pigmenti se nalaze u ćelijama tkiva i organelama, tj. plastidima. Plastidi su lipidima bogati reakcijski prostori, odvojeni od osnovne citoplazme dvostrukom membranom. Pomenuti prostori često su upadljivo obojeni bojama rastvorljivim u mastima i služe kao organele u anabolizmu fotosintetske asimilacije ugljenika ili kondenzaciji skroba. Osnovni tipovi pigmenata prisutnih u biljkama su hlorofil, koji lišću daje zelenu boju, potom karotenoidi, koji su obojeni u žuto i narandžasto-crveno, i antocijanini koji uslovljavaju crvenu, crveno-ljubičastu i plavu obojenost biljnih organa (Popović i Malenčić, 2006).

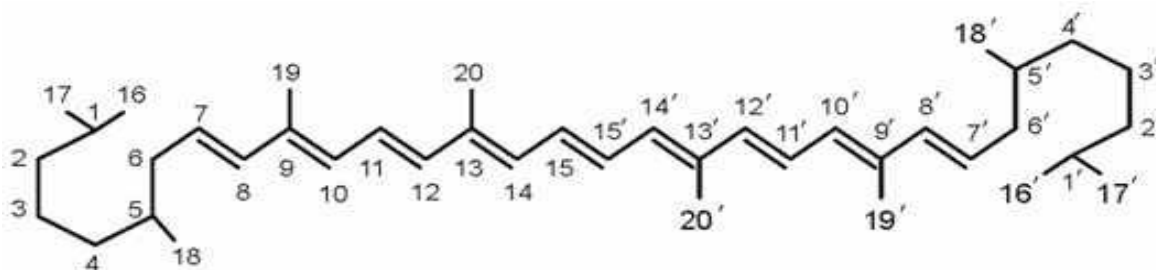
U fotosintezi viših biljaka učestvuju dve grupe pigmenata: hlorofili i karotenoidi. Molekuli hlorofila imaju strukturu porfirinskog prstena sa centralnim atomom magnezijuma (Mg) vezanog sa dve kovalentne i dve koordinativne veze za četiri modifikovana pirolova prstena (Slika 4). Porfirinska jezgra su hidrofilna, a fitolni rep bogat $-CH_3$ grupama je hidrofoban (lipofilan).



Slika 4. Struktura hlorofila (<https://www.svethemije.com/boje-godisnjih-doba>)

U većini biljaka prisutna su dva oblika hlorofila: oblici a (modrozelen hlorofil) i b (žutozelen hlorofil). Njihov kvantitativan odnos je otprilike 3:1.

Karotenoidi predstavljaju grupu pigmenata koji se sintetišu u biljnim i bakterijskim organizmima. Identifikovano je oko 600 karotenoida. Po rastvorljivosti su lipofilna jedinjenja koja se mogu podeliti u dve grupe: karotene (polinezasićene ugljovodonike) i ksantofile (kiseonične derivate). U biljkama igraju važnu ulogu u zaštiti hloroplasta od štetnog delovanja kiseonika (Popović i Štajner, 2008). Središnji deo molekula karotenoida građen je od dugog, konjugovanog ugljovodoničnog niza. Krajevi lanca su ili otvoreni ili su na njih vezana dva prstena ili je jedan kraj lanca otvoren, a na drugom kraju je prsten (Slika 5). Posledica ovakve strukture je velika reaktivnost, podložnost autooksidaciji, intenzivna boja i karakteristični apsorpcijski spektri.



Slika 5. Struktura karotenoida

Prirodni pigmenti su podložni hemijskim promenama, takođe su osetljivi na hemijske i fizičke uticaje tokom proizvodnje hrane. Usled mehaničkog ili termičkog tretiranja ćelija dolazi do njihovog razaranja i oslobađanja pigmenata, koji se pod uticajem vazduha i svetlosti degradiraju (razgrađuju).

Karotenoidi i biljni proizvodi organske proizvodnje

Karotenoide karakterišu jaka antioksidativna svojstva. Istraživanja koja se bave upoređivanjem sadržaja karotenoida u proizvodima iz organske i konvencionalne proizvodnje daju različite rezultate. Naime, Dias (2021) ukazuju na povišen nivo ovih supstanci u organski proizvedenoj šargarepi, paprici i paradajzu, dok drugi istraživači navode potpuno suprotne rezultate. No, potrebno je imati na umu da sadržaj karotenoida zavisi od mnogih faktora poput genotipa, osobina zemljišta, vremenskih uslova, primene pesticida i đubrenja (Matt i sar., 2011).

VEŽBA 2. ODREĐIVANJE HLOROFILA A, B I KAROTENOIDA

Cilj vežbe

Spektrofotometrijsko određivanje hlorofila a, b i karotenoida u uzorcima voća i povrća.

Potrebna aparatura i pribor

UV/VIS spektrofotometar sa kivetama, analitička vaga, keramički avan sa tučkom, stakleni levak, laboratorijski mlin, filter papir, sahatno staklo, klipna pipeta od 10 mL, pipeta od 1 mL, Bühnerov levak, vakuum pumpa, vorteks mikser, odmerni sudovi od 10 i 25 mL.

Potrebne hemikalije

Aceton

Priprema uzorka i spektrofotometrijsko merenje

Izvršiti homogenizaciju uzorka mlevenjem u mlinu, a zatim, tarirajući sahatno staklo na analitičkoj vagi, izmeriti 2 g homogenizovanog biljnog materijala. Prebaciti uzorak u avan i macerirati ga uz dodatak 5-10 mL acetona (Slika 6a). Isprati avan i tučak nekoliko puta sa 2-3 mL acetona uz kvantitativno prenošenje sadržaja na filter papir Bühnerov-og levka (Slika 6b). Po potrebi isprati avan i filter papir acetonom, tako da ostatak na filter papiru bude potpuno beo. Dobijen filtrat predstavlja ekstrakt pigmenata, koji se staklenim levkom prenese iz Bühnerov-og levka u odmerni sud od 25 mL (Slika 6c desno). Sud dopuniti acetonom do crte i dobro promućkati. Dobijen rastvor iz odmernog suda razblažiti u odnosu 1:10 (ekstrakt:aceton, v/v), tako što se u odmerni sud od 10 mL otpipetira 1 mL ekstrakta i doda 9 mL acetona (Slika 6c levo). Promućkati ekstrakt na vorteks mikseru i analizirati spektrofotometrijski.



6a



6b



6c

Slika 6. Postupak pripreme uzorka

Spektrofotometar je optički uređaj kojim se meri apsorpcija propuštene monohromatske svetlosti kroz uzorak biljnog materijala. Svetlost odabrane talasne dužine se dobija propuštanjem bele svetlosti halogene ili deuterijumske (za UV deo spektra) lampe kroz difrakcionu rešetku, a zatim se preko sistema ogledala usmerava na uzorak. Uzorak se nalazi u specijalnim kivetama (debljina sloja rastvora 1 cm), čiji se brušeni delovi koriste za unošenje kivete u aparat, dok su glatke strane kivete postavljene da kroz njih prolazi svetlost. Kada svetlost „padne na uzorak“ jedan njen deo biva apsorbovan od strane molekula uzorka, a drugi transmitovan kroz uzorak i dospeva na fotočeliju indukujući fotosignal. Bitno je da se spektrofotometrijsko određivanje pigmenata vrši na talasnoj dužini koja odgovara maksimumu apsorpcije molekula pigmenta.

Očitati apsorbanciju na spektrofotometru na talasnim dužinama 662, 644 i 440 nm. Baždarenje instrumenta uraditi sa kivetom napunjenom acetonom (slepa proba).

Za izračunavanje količine hlorofila a i b i ukupnih karotenoida u apsolutnom acetonskom rastvoru, koriste se Weltstein (1957) jednačine (mg/L).

Izračunavanje sadržaja hlorofila a

$$\text{Hlorofil a} = 9,784 \times A_{662} - 0,990 \times A_{644}$$

A_{662} – očitana apsorbancija na talasnoj dužini 662 nm

A_{644} - očitana apsorbancija na talasnoj dužini 644 nm

Izračunavanje sadržaja hlorofila b

$$\text{Hlorofil b} = 21,426 \times A_{644} - 4,650 \times A_{662}$$

A_{662} – očitana apsorbancija na talasnoj dužini 662 nm

A_{644} - očitana apsorbancija na talasnoj dužini 644 nm

Izračunavanje sadržaja karotenoida

$$\text{Karotenoidi} = 4,695 \times A_{440} - 0,268 \times (a + b)$$

A_{440} - očitana apsorbancija na talasnoj dužini 440 nm

a – sadržaj hlorofila a

b – sadržaj hlorofila b

U navedenim izrazima, vrednosti 9,784; 0,990; 21,426; 4,650; 4,695 i 0,268 predstavljaju molarne apsorpcione koeficijente po Holtu i Jacobs (1954) i Weltsteinu (1957) za apsolutni aceton i debljinu sloja u kivetu od 1 cm (Holm je odredio apsorpcione koeficijente za hlorofile a i b, dok je Weltstein za ukupne karotenoide).

Nakon proračuna koncentracije (mg/L), utvrđuje se količina (mg/g) pigmenata u biljnom materijalu, prema obrascu:

$$C = \frac{C_1 \times V \times R}{G \times 1000}$$

Gde su:

C_1 – koncentracija pigmenata (mg/L)

V – zapremina ekstrakta (mL)

R – razblaženje (ukoliko je rađeno)

G – masa biljnog materijala (g)

BOJA NAMIRNICA

Boja je jedna od najvažnijih osobina namirnica po kojoj se one razlikuju jedne od drugih. Svetlost koja od nekog izvora svetlosti dospe do oka bilo direktno, bilo odbijajući se sa predmeta ili prolazeći kroz njih, stvara putem vidnog živca osećaj koji u čoveku istovremeno izaziva nerazdvojiv pojam svetlosti i boje. Jedna od definicija bi glasila da je boja način na koji se u čovekovoj svesti doživljava svetlost.

Da bi se održao kvalitet namirnica, potrebno ga je definisati i kontrolisati. Kada je boja mesa u pitanju, o njoj se u našim pravilnicima o kvalitetu (Pravilnik o kvalitetu zaklanih svinja i kategorizaciji svinjskog mesa, Sl. list SFRJ, 24/86; Pravilnik o kvalitetu mesa pernate živine, Sl. list SFRJ, 51/88) govori opisno, bez navođenja instrumentalne provere njenog slaganja ili neslaganja sa propisanim kvalitetom. Za naučna istraživanja boje mesa koriste se senzorne, instrumentalne i hemijske metode. Boja se instrumentalno može meriti pomoću nekoliko instrumenata: kolorimetri, komparatori, spektrofotometri i tristimulusni fotoelektrični kolorimetri. Među najpoznatijim uređajima ovog tipa je MOM Color.

U svetu se koristi više sistema za definisanje boje od kojih su najpoznatiji Hunter-ov i CIE sistem. Hunter-ov sistem je razvijen kao jedinstven sistem kojim se boja određuje preko sledećih vrednosti: difuzione reflektancije (r_d), svetloće boje (L), udela crvene i zelene (a), i udela plave i žute boje (b).

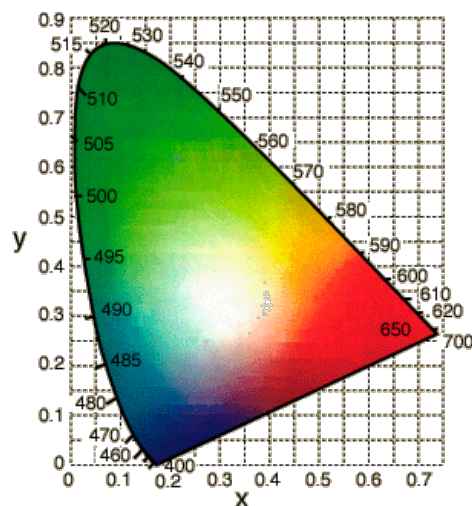
Standardni sistem za definisanje boja koji je preporučila CIE (Internacionalna komisija za osvetljavanje) je jedan od najznačajnijih i u kompatibilnosti je sa Hunter-ov sistemom. CIE je prvi put odredila Standardna kolorimetrijska posmatranja (posmatranja pod uglom od 2°) gde se pokazuje slaganje boje po funkcijama $x(\lambda)$, $y(\lambda)$, $z(\lambda)$. Po ovom sistemu, boja se definiše preko tri vrednosti: dominantne talasne dužine i čistoće koje zajedno čine pokazatelje hromatičnosti i sjajnosti (srednja reflektancija). CIE se saglasila da se sve boje dobijaju preko smeša tri boje: crvene, zelene i plave. Razlika između Hunter-ovog sistema i CIE sistema je u tome što su CIE koordinate zasnovane na osnovu transformacije podataka boje preko trećeg korena, a u Hunter-ovom sistemu su koordinate zasnovane na transformaciji podataka pomoću kvadratnog korena. Vrednosti x , y , z za bilo koju talasnu dužinu zovu se tristimulusne vrednosti spektralne boje date talasne dužine. Kriva $x(\lambda)$ odgovara crvenom filtru, kriva $y(\lambda)$ zelenom, a $z(\lambda)$ plavom. Na osnovu toga zaključuje se, da bi za specifikaciju bilo koje boje bilo potrebno tri broja, što se izbegava uvođenjem novih veličina X , Y , Z .

$$X = x(\lambda) / x(\lambda) + y(\lambda) + z(\lambda)$$

$$Y = y(\lambda) / x(\lambda) + y(\lambda) + z(\lambda)$$

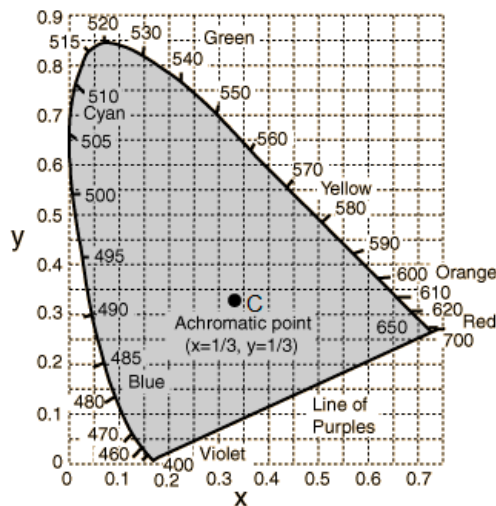
$$Z = z(\lambda) / x(\lambda) + y(\lambda) + z(\lambda)$$

Te nove veličine zovu se trihromatski koeficijenti. Pošto se iz navedenih jednačina vidi da je $X+Y+Z=1$ bilo koja dva koeficijenta su dovoljna da se definiše boja u CIE sistemu. Obično se koriste vrednosti X i Y . Spektralne boje se mogu predstaviti grafički, u vidu dijagrama hromatičnosti (Slika 7) na osnovu vrednosti X i Y , koji su ujedno i koeficijenti hromatičnosti. Na tom dijagramu, kriva dobijena na osnovu vrednosti X i Y zove se spektralna kriva.



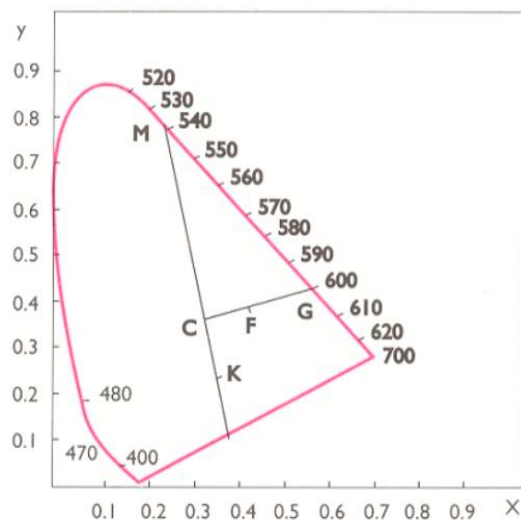
Slika 7. Dijagram hromatičnosti po CIE sistemu

Koeficijenti X i Y primarnih komponenti (crveno, zeleno, plavo) su: crveno $X=1$ i $Y=0$; plavo $X=0$ i $Y=0$; zeleno $X=0$ i $Y=1$. Ove tačke su, kao što se vidi na slici 7, van oblasti realnih boja, ali pošto trougao koji čine te tačke uključuje i spektralnu krivu, onda se sve boje mogu odrediti kao smeša tih primarnih boja. Ako se postupak sprovede za spektar jednakih energija (kada je ukupni fluks toplotnog zračenja jednak za sve talasne dužine) dobija se da je $X=0,333$, a $Y=0,333$. To bi u stvari bila bela boja, odnosno ta tačka je veoma blizu standardnom izvoru svetlosti, te se može reći da na zadovoljavajući način zamenjuje dnevnu svetlost. Ova tačka se još zove i „bela tačka”, prikazana kao tačka C na dijagramu hromatičnosti (Slika 8).



Slika 8. „Bela tačka” na dijagramu hromatičnosti

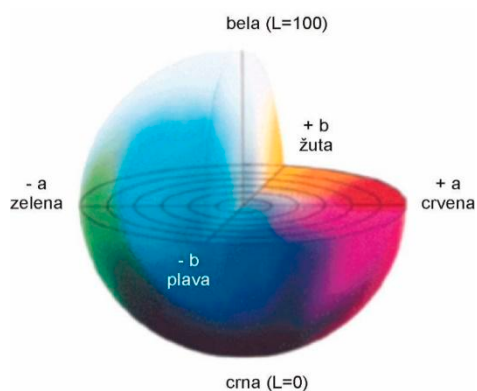
Navedeno je da su nosioci hromatičnosti po CIE sistemu, talasna dužina i čistoća boje, a kao treće svojstvo je sjajnost. Dominantna talasna dužina se određuje na sledeći način: na osnovu koeficijenata X i Y se ucrtta odgovarajuća tačka u dijagram hromatičnosti (Slika 9). Ova tačka (F) se preko tačke C produži do spektralne krive i ta tačka, koju označimo sa G, predstavlja dominantnu talasnu dužinu. U slučaju da se novoformirana tačka (K) nalazi ispod tačke C, pravac se produžava u suprotnom smeru i na mestu preseka sa spektralnom krivom se očita dominantna talasna dužina (tačka M).



Slika 9. Dominantna talasna dužina i čistoća boje prema CIE sistemu.

Sjajnost se može definisati kao svojstvo boje koje omogućava da se neka boja klasifikuje u smislu ekvivalentnosti sa osećajem koji izaziva neki član niza neutralnog sivog. Po CIE sistemu sjajnost se određuje na osnovu veličine Y .

CIE je razvila XYZ bojeni prostor od tristimulusnih vrednosti, dokazan u $L^*a^*b^*$ sistemu. $L^*a^*b^*$ bojeni prostor (CIELAB) je zasnovan na trodimenzionalnom prostoru sa tri koordinate ($L^*a^*b^*$). U CIELAB sistemu, boja se predstavlja sferično (Slika 10). L^* koordinata je merilo svetloće boje i smeštena je na centralnoj (vertikalnoj) osi u CIELAB bojenom prostoru. Ova osa je ahromatična i ima opseg od crne (0) na dnu, do bele (100) na vrhu. a^* i b^* su koordinate hromatičnosti i pokazuju pravac i udaljenost od centra obojene sfere. Koordinata a^* označava crvenu boju kada je pozitivna, a zelenu kada je negativna. Koordinata b^* označava žutu boju kada je pozitivna i plavu kada je negativna. Hue angle (h°) se može odrediti iz koordinata a^* i b^* . Hue angle utvrđuje vrstu boje (crvena, žuta, plava, zelena itd.) i izračunava se kao: $\text{hue angle } (h^\circ) = \arctg b^*/a^*$.



Slika 10. CIELAB bojeni prostor (www.tehnologijahrane.com/hemijahrane/boja-prehrambenih-proizvoda)

Pigmenti u mesu i boja mesa

Boja mesa je primarni faktor koji određuje kvalitet svežeg mesa koji potrošači prepoznaju prilikom kupovine, dok komponente ukusa (kao što su mekoća, sočnost i aroma) termički obrađenog mesa određuju ukupan doživljaj ukusa, utičući na ponovnu odluku potrošača o kupovini.

Optimalna boja površine svežeg mesa (tj. trešnja-crvena za govedinu; tamna višnja-crvena za jagnjetinu; crvenkasto-ružičasta za svinjetinu i bledo ružičasta za teletinu) veoma je nestabilna i kratkotrajna. Kada je meso sveže i zaštićeno od kontakta sa vazduhom (kao što je slučaj sa vakuum pakovanjima), ono ima ljubičasto-crvenu boju koja potiče od mioglobina, jednog od dva ključna pigmenta odgovorna za boju mesa. Kada je izložen vazduhu, mioglobin formira pigment oksimioglobin, koji daje mesu prijatnu trešnja-crvenu boju. Upotreba plastične folije, koja omogućava kiseoniku da prođe kroz nju, pomaže da se osigura da rezano meso zadrži ovu jarko crvenu boju.

Količina mioglobina u mišićima životinja određuje boju mesa. Jagnjetina i svinjetina su klasifikovani kao „crveno“ meso zajedno sa govedinom i teletinom, jer sadrže više mioglobina od piletine ili ribe, koja se smatra „belim“ mesom. Kada se sveže svinjsko meso skuva, postaje svetlije, ali je i dalje crveno meso.

Boja sirovog živinskog mesa može varirati od plavičasto-bele do žute. Sve ove boje su normalne i direktan su rezultat uticaja rase, fizičke aktivnosti, starosti i ishrane. Meso mlađe živine ima manje potkožnog masnog tkiva, što može rezultirati plavičastom nijansom kože, a izrazito žuta boja kože može biti posledica prisustva različitih pigmenta u hrani.

Izlaganje svetlosti, kao i kontinuirani kontakt mioglobina i oksimioglobina sa kiseonikom dovodi do stvaranja metmioglobina, pigmenta koji mesu daje braonkastocrvenu boju. Ova promena boje sama po sebi ne znači da je proizvod pokvaren. Promene boje su normalne za svež proizvod. Promena boje usled kvarenja uglavnom dovodi do pojave bleđih ili tamnijih nijansi. Ukoliko je pokvareno, pored promene boje, meso će imati neprijatan miris, biće lepljivo na dodir ili će biti ljigavo. Ako je meso razvilo ove karakteristike, svakako ga ne treba koristiti.

Faktori koji utiču na boju mesa

Upotreba mišića. Meso živine je najbolji primer da se uoče razlike u boji mesa. Mesari i kuvari dobro znaju da jedni delovi piletine imaju belo meso, a drugi tamno meso, kao i da neke vrste ptica, kao što su patke ili divljač, imaju uglavnom tamno meso.

Boja mesa je određena načinom na koji se mišić koristi. Ptice planinske divljači, kao što su jarebica i tetreb, koje lete samo na kratke udaljenosti imaju belo meso. Nasuprot tome, patke i guske i većina drugih divljih ptica koje lete na velike udaljenosti imaju isključivo tamno meso. Kod domaće živine (kokoške i ćurke) postoji razlika između mišića grudi (belo meso) i karabataka i bataka (tamno meso).

Napomena: Pileći butovi, čak i kada su potpuno kuvani, mogu imati crvenkastu nijansu i curenje krvi iz butne kosti. To je potpuno normalno. Međutim, neiskusni potrošači to mogu protumačiti kao znak da meso nije dovoljno termički obrađeno.

Proteini. Boja mesa je povezana sa dva proteina: mioglobin (u mišićima) i hemoglobin (u krvi). Osnovni nosilac boje mesa je mioglobin, a u manjoj meri i hemoglobin. Ovaj osnovni pigment se nalazi u mišićima u nativnom stanju u tri oblika: kao mioglobin (Mb), oksimioglobin (MbO) i metmioglobin (MMB). Mioglobin je redukovani pigment izrazito

crvene boje, oksihemoglobin je oksidovani pigment svetlo crvene boje, a metmioglobin crveno-smeđe boje. Na odnos sadržaja ovih pigmenata u mesu utiču sadržaj kiseonika, temperatura i pH mesa. Kada životinje više nisu žive i vazduh dođe u kontakt sa mesom, mioglobin reaguje sa kiseonikom u pokušaju da dostigne stanje ravnoteže. Kako se ovaj proces odvija, boja mesa prolazi kroz tri faze i tri boje koje se lako vide, posebno na sveže isečenom goveđem mesu:

1. Ljubičasto crvena (mioglobin) - javlja se u momentu kada se meso iseče;
2. Višnja crvena (oksimioglobin) - javlja se nekoliko minuta nakon sečenja i nakon izlaganja kiseoniku;
3. Braon (metmioglobin) - nastaje kada se gvožđe u mioglobinu oksidira, što obično traje oko tri dana nakon sečenja. Ovakvo meso se često može videti u delu supermarketa sa proizvodima na sniženju. Međutim, braon boja ne znači da nešto nije u redu sa proizvodom, već je kupovina mesa u ovoj fazi odličan način da se kupi jeftinije meso.

Kiseonik. Kiseonik igra dve važne uloge, koje utiču na boju na suprotne načine. Čim se meso iseče, kiseonik reaguje sa mioglobinom i stvara svetlo crvenu boju povezanu sa oksimioglobinom. Ovo će nastaviti da se razvija sve dok gvožđe u mioglobinu ne oksidira do metmioglobina.

Oksidacija se takođe može desiti kada se gvožđe u mesu veže sa kiseonikom koji je već prisutan u mišićima. Ovo se često može desiti tokom obrade goveđeg buta i može se prepoznati po karakterističnim duginim bojama koje se pojavljuju usled refleksije svetlosti sa površine mesa. Stanje će ostati i nakon što se proizvod termički obradi i često se može videti na isečenoj govedini. Ovo stanje ne menja kvalitet mesa; međutim, generalno je manje privlačno za potrošače.

Starost. Bledi mišići telećih trupova ukazuju na veoma mladu životinju, koja ima manji sadržaj mioglobina, u odnosu na meso starijih kategorija. Telad se hrane prvenstveno mlečnim proizvodima kako bi njihovo meso bilo svetle boje. Međutim, kada se tele odbije od mlečne ishrane i počne da konzumira kabastu hranu, meso počinje da tamni. Mužjaci kao što su bikovi za priplod imaju mišiće koji sadrže više mioglobina nego ženke (junice) ili junad (kastirani mužjaci) u istom uzrastu.

Govedina i jagnjetina imaju više mioglobina u mišićima nego svinjetina, teletina, riba i živina. Divljač ima mišiće koji su tamniji od mišića domaćih životinja, delom zbog veće fizičke aktivnosti, pa samim tim imaju i veći sadržaj mioglobina.

VEŽBA 3. ODREĐIVANJE BOJE MESA

Cilj vežbe

Cilj vežbe je da se odredi boja uzoraka svinjskog i goveđeg mesa koristeći CIE sistem tristimulusnih vrednosti, kao i svetloću boje (L), udeo crvene i zelene (a), i udeo plave i žute boje (b) mesa upotrebom CIELAB sistema.

Potrebna aparatura

Tristimulusni fotoelektrični kolorimetar MOMCOLOR 100 (MOM, Budimpešta, Mađarska) za određivanje boje prema CIE sistemu tristimulusnih vrednosti. Kolorimetar za određivanje svetloće boje (L), udela crvene i zelene (a), i udela plave i žute boje (b) prema CIELAB sistemu Precision Colorimeter NR110 (3NH Technology, Šendžen, Kina).

Kalibrisanje instrumenta

Tristimulusni fotoelektrični kolorimetar se kalibriše odgovarajućim standardima boja sa definisanim tristimulusnim vrednostima. Kao standard za kalibraciju treba koristiti standard boje koja najpribližnije odgovara boji uzorka čija se boja meri. Kolorimetar za određivanje boje prema CIELAB sistemu je fabrički kalibrisan.

Postupak određivanja boje mesa

Za određivanje boje mesa tristimulusnim fotoelektričnim kolorimetrom, nakon kalibrisanja instrumenta, uzorak mesa postaviti na mernu glavu instrumenta i očitati vrednosti tristimulusne vrednosti $x_1(\lambda)$, $x_2(\lambda)$, $y(\lambda)$ i $z(\lambda)$. Nakon toga je potrebno izračunati trihromatske koeficijente (X, Y i Z) na sledeći način:

$$X = x(\lambda) / x(\lambda) + y(\lambda) + z(\lambda) \quad \text{gde je } x(\lambda) = x_1(\lambda) + x_2(\lambda)$$

$$Y = y(\lambda) / x(\lambda) + y(\lambda) + z(\lambda)$$

$$Z = z(\lambda) / x(\lambda) + y(\lambda) + z(\lambda)$$

Vrednost talasne dužine boje se dobija ukrštanjem vrednosti koeficijenta hromatičnosti (X i Y) na dijagramu hromatičnosti (Slika 7 i 8).

Postupak određivanja svetloće boje (L), udela crvene i zelene (a), i udela plave i žute boje (b) prema CIELAB sistemu je veoma jednostavan. Kolorimetar (Slika 11) se prisloni na uzorak mesa, a zatim se pritiskom na taster za merenje očitaju vrednosti svetloće boje (L), udela crvene i zelene (a), i udela plave i žute boje (b). Radi preciznijih rezultata merenja, za svaki uzorak mesa je potrebno ponoviti postupak tri puta i izračunati srednje vrednosti.



Slika 11. Kolorimetar za određivanje svetloće boje

<https://sensing.konicaminolta.us/us/products/cm-700d-spectrophotometer/>

VEŽBA 4. ODREĐIVANJE UKUPNIH PIGMENATA U MESU

Princip

Metoda za određivanje ukupnih pigmenata se zasniva na činjenici da se vodenim rastvorom acetona, kojem je dodata koncentrovana hlorovodonična kiselina (HCl), ekstrahuju svi pigmenti u obliku kiselog hlorhematina. Određivanje pigmenata vrši se spektrofotometrijski.

Potrebna aparatura i pribor

Odmerni sud od 250 mL, menzura od 10 i 100 mL, klipna pipeta od 5 mL, analitička vaga, laboratorijski mlin, tarionik, tamna boca sa šlifovanim čepom, stakleni levak, filter papir, erlenmajer, sahatno staklo, laboratorijska metalna kašičica.

Potrebne hemikalije

Aceton, cc HCl i destilovana voda.

Priprema rastvora

Rastvor acetona se pravi tako što se na 100 mL acetona doda 2,5 mL koncentrovane HCl i 5 mL vode.

Postupak određivanja

Homogenizovati uzorak mesa (500 g) korišćenjem laboratorijskog mlina. Na analitičkoj vagi, tariranjem sahatnog stakla, odmeriti 10 g usitnjenog, dobro homogenizovanog uzorka mesa bez većih nakupina vezivnog i masnog tkiva. Uzorak homogenizovati u tarioniku sa 43 mL rastvora acetona. Preneti homogenizovani uzorak u tamnu bocu sa šlifovanim čepom i ostaviti da stoji u mraku 1 sat. Profiltrirati uzorak kroz naboranu kvalitativnu filter hartiju i izmeriti apsorbanciju na talasnoj dužini od 640 nm, koristeći spektrofotometar.

Izračunavanje rezultata

$$UP \text{ (mg/kg)} = A \times 680$$

gde je:

UP – ukupni pigmenti u mesu

A – izmerena apsorbancija rastvora na 640 nm

SPOSODBNOST VEZIVANJA VODE

Sposobnost vezivanja vode (SVV) je značajno kvalitativno svojstvo mesa, od kojeg zavisi sočnost kulinarski priređenog mesa i termički obrađenih mesnih proizvoda. Sposobnost vezivanja vode prvenstveno zavisi od pH vrednosti. Niska vrednost pH ukazuje na lošu sposobnost zadržavanja mesnog soka, posebno neposredno *post mortem*, kada nastaje bleđo-meko-vodnjikavo (BMV) meso. S druge strane, kada pH vrednost u prvih 24 časa *post mortem* ne padne ispod pH 6, tada nastaje tamno-čvrsto-suvo (TČS) meso.

Postoji više metoda utvrđivanja sposobnosti vezivanja vode od kojih se u literaturi najčešće opisuju metoda kompresije po Grau i Hammu (1952), te metoda „drip loss“ (Kauffman i sar., 1992). Blendl i sar. (1991) predložili su graničnu vrednost za BMV meso $>9 \text{ cm}^2$, za „normalno meso“ $4\text{--}8 \text{ cm}^2$ i za TČS meso $<3 \text{ cm}^2$. Kauffman i sar. (1992) navode za BMV meso vrednosti drip loss $>5\%$, dok Joo i sar. (1999) predlažu blaži kriterijum za BMV meso (drip loss $>6\%$).

Warner i sar. (1997) navode da svinjetina koja se opisuje kao BMV ima visok gubitak usled otkapavanja i bleđu nestabilnu boju te denaturaciju mišićnih proteina, što je uzrokovano niskom rastvorljivošću sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina. Na sposobnost vezivanja vode mišićnog tkiva svinje utiče mnogo faktora kao što su: krajnji pH (pH_u), denaturacija proteina, intra- i interfascijalni razmak, te dužina sarkomera. Pretpostavlja se da je denaturacija miozina uzrok visoke stope gubitka mesnog soka (drip loss) u svinjetini sa BMV pojavom. Denaturacija miozina rezultira u skupljanju glave miozina približavajući međusobno zadebljani deo i vlakno. To skupljanje, uz skupljanje miovlakana usled niskog krajnjeg pH u BMV svinjetini, rezultira izlučenjem više tečnosti između vlakana i snopova vlakana.

U cilju istraživanja mehanizma gubitka usled otkapavanja u svinjskom mesu, Warner i sar. (1997) određivali su denaturaciju mišićnog proteina, degradaciju i mogućnost ekstrakcije u uzorcima svinjetine u odnosu na obeležja kvaliteta svinjskog mesa - pH_u , boju (L^* vrednost) i drip loss (%), na temelju kojih su predložili četiri razreda kvaliteta svinjskog mesa (PSE, RSE, RFN i DFD), dok su Kauffman i sar. (1992) predložili, osim navedena četiri razreda, i 5. razred tj. PFN meso (Tabela 2).

Tabela 2. Razredi kvaliteta svinjskog mesa (Kauffman i sar., 1992)

Razred mesa	Vrednosti parametara kvaliteta
PSE (pale, soft, exudative – bleđo, mekano, vodnjikavo)	$L^* > 50$, drip loss $> 5\%$, $\text{pH}_u < 6,0$
RSE (reddish-pink, soft, exudative - crveno-ružičasto, mekano, vodnjikavo)	$L^* = 42\text{--}50$, drip loss $> 5\%$, $\text{pH}_u < 6,0$
RFN ili normalno (reddish-pink – crveno-ružičasto, čvrsto, nevodnjikavo)	$L^* = 42\text{--}50$, drip loss $< 5\%$, $\text{pH}_u < 6,0$
PFN (pale, firm, non-exudative – svetlo, čvrsto, nevodnjikavo)	$L^* > 50$, drip loss $< 5\%$, $\text{pH}_u < 6,0$
DFD (dark, firm, dry - tamno, čvrsto, suvo)	$L^* < 42$, drip loss $< 5\%$, $\text{pH}_u > 6,0$

Vrednost pH jedan je od najvažnijih pokazatelja kvaliteta sirovog mesa. Brzina i jačina pada pH vrednosti nakon klanja ima specifičan uticaj na senzorna svojstva kvaliteta i tehnološka svojstva mesa. Ako pH vrednost pada vrlo brzo, meso će po pravilu biti BMV, te će slabo vezivati dodatu vodu tokom prerade. Vrlo spor i nepotpun pad pH vrednosti upućuje na tamno-čvrsto-suvo meso (TČS) koje nije dobro održivo.

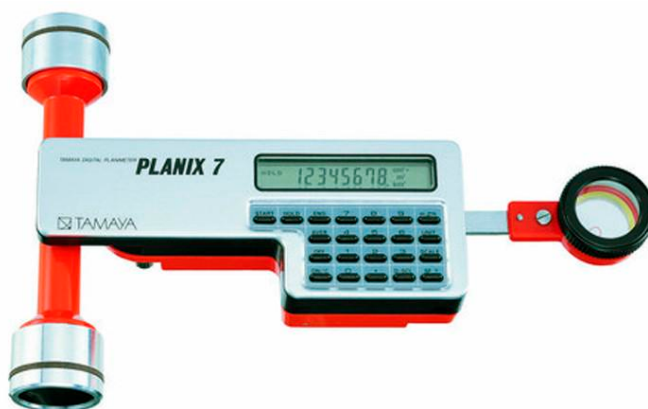
Granične pH vrednosti za BMV meso razlikuju se prema pojedinim autorima. Tako Blendl i sar. (1991) navode granične vrednosti za „normalno” meso nakon 45 minuta $pH_{45} > 5,80$ i nakon 24 časa $pH_{24} < 5,80$. Hofmann (1994) daje sledeće granične pH_{45} vrednosti: $pH_{45} < 5,8$ za BMV meso; $5,8 - 6,0$ za meso sumnjivo na BMV i $pH_{45} > 6,0$ za „normalno“ meso. Autor navodi da se TČS meso ne može odrediti s početnom pH vrednošću, nego tek nakon 24 sata post mortem (pH_{24}). Tako Forrest (1998) navodi graničnu pH_{24} vrednost za BMV meso $\leq 5,5$, a za TČS meso graničnu pH_{24} vrednost $\geq 6,2$. Van Laack (2000) navodi pH_{24} manju od 5,7 kao indikator pojave BMV mesa.

VEŽBA 5. SPOSOBNOST VEZIVANJA VODE

Sposobnost vezivanja vode (SVV) je sposobnost mesa da zadrži sopstvenu ili dodatu vodu pri delovanju neke sile. Jedna od najstarijih metoda za određivanje sposobnosti vezivanja vode je metoda kompresije prema Grau i Hammu (1952).

Postupak određivanja

Pomoću skalpela se iz svežeg preseka mišića *musculus longissimus dorsi* MLD-a, izreže $0,3 \pm 0,01$ g tkiva i komprimuje na filter papiru pomoću kompresijskih stakala 5 min. Nakon skidanja gornjeg kompresijskog stakla, mastiljavom olovkom se obeleži ivica filma mesa. Zatim se pomoću digitalnog planimetra (Slika 12) utvrdi površina (izražena u cm^2) samog mesa (P_1) i površina ovlažena istisnutim mesnim sokom (P_2). Vrednost za SVV (izražena u cm^2) se prikazuje kao razlika dobijenih površina ($P_2 - P_1$) ili kao odnos ovih površina (P_1 / P_2).



Slika 12. Digitalni planimetar (<https://www.tamaya-technics.com/>)

Vrednosti gubitka mesnog soka se može odrediti i metodom „drip loss“ („bag“ metoda) u uzorcima mesa, mase oko 100 g, očišćenih od spoljašnje masti i vezivnog tkiva. Uzorci se obese o najlonski konac i stave u plastičnu vrećicu, osiguravši da meso nema kontakt sa sokom u vrećici (Honikel, 1998). „Drip loss“ je prikazan kao procenat gubitka mase nakon 24 sata i 7 dana kondicioniranja od momenta otkošćavanja mišića na temperaturi od 4°C .

UPOTREBA NITRATA U POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

Konvencionalna poljoprivreda i nitrati

U konvencionalnoj poljoprivrednoj proizvodnji se koriste mineralna, lako rastvorljiva đubriva u obliku mineralnih soli azota, fosfora i kalijuma. Nitrati i joni amonijuma u obliku vodenog rastvora dolaze u zemljište u kojem ih korenje biljaka lako apsorbiraju. Tokom miliona godina evolucije biljke nisu razvile nijedan mehanizam koji može regulisati usvajanje ovih jona i tako apsorbiraju isuviše velike zapremine lako dostupnih jona, npr. jona nitrata. Nakon usvajanja, nitrati se delom koriste u izgradnji tkiva, dok se ostatak akumulira u listovima, stabljici i korenu. Korišćenjem đubriva u dve doze (pre setve i prihranjivanje) ili korišćenjem folijarnih đubriva, može se uticati na usvajanje i akumulaciju nitrata (Matt i sar., 2011).

Prosečan sadržaj azota u pedosferi iznosi 0,1%. Najveći sadržaj azota oraničnog zemljišta se nalazi u obliku organskih jedinjenja, dok se manji deo nalazi u neorganskom obliku. Skoro 50% organskog azota u zemljištu je vezano u kondenzovana ili polimerizovana jedinjenja humusnih materija, 24-37% zemljišnog organskog azota čine proteini, do 4% nukleinske kiseline i do 10% amino šećeri (Ubavić i Bogdanović, 2008).

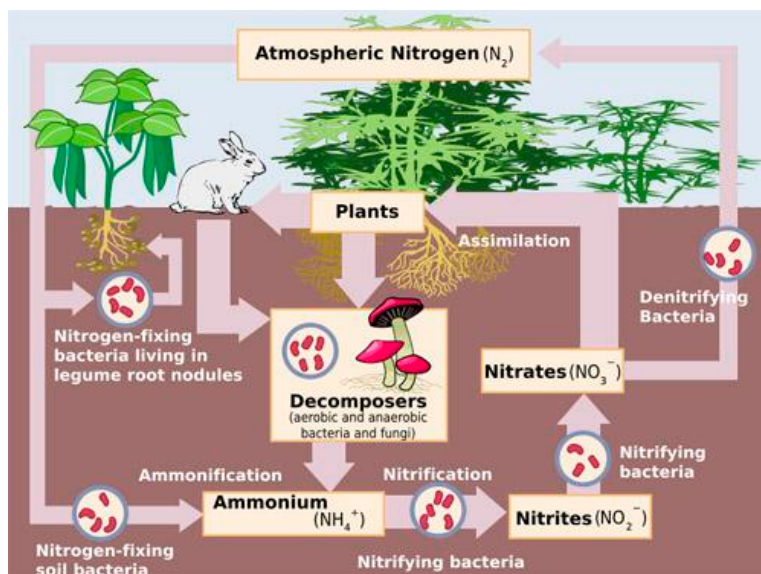
Organska poljoprivreda i nitrati

Za ishranu biljaka i oplemenjivanje zemljišta u organskoj proizvodnji koriste se organska, pojedina mineralna i mikrobiološka đubriva. Đubriva koja se koriste uglavnom vode poreklo iz organske proizvodnje, tj. poreklom su sa organske farme ili se nalaze na listi dozvoljenih sredstava koja odobrava Ministarstvo poljoprivrede. Ukupna količina stajskog đubriva, suvog stajskog đubriva, dehidriranog živinskog đubriva, kompostiranih životinjskih ekskremenata, uključujući živinsko đubrivo, kompostirano stajsko đubrivo i tečne životinjske ekskreme, koja se koriste u organskoj proizvodnji, godišnje ne mogu da pređu 170 kg azota po hektaru površine, zbog mogućeg zagađenja zemljišta i voda nitratima (Sl. glasnik RS 40/2012).

Organska đubriva su potpuno različita za biljku sa fiziološkog gledišta. Prirodna organska đubriva poput stajnjaka, komposta, humus-glistenjaka, zelenišno đubrenje, treseta ili drvenog pepela se dodaju zemljištu. Organska materija podleže delovanju živih organizama, bakteriološkoj i gljivičnoj razgradnji, ali i zemljišnoj fauni sa glistama kao najdominantnijim organizmima (Matt i sar., 2011). Od nastalih organskih i mineralnih materija, biljka će usvajati potrebne elemente kada ih najviše treba (tokom intenzivnog rasta). Mnoga istraživanja ukazuju na drugačiji fiziološki mehanizam oslobađanja azota pri korišćenju komposta u odnosu na mineralna đubriva i na prednosti u kvalitetu korišćenja komposta u odnosu na mineralno đubrivo tokom proizvodnje povrća. Eksperimentalna istraživanja ističu različitosti kod sorti. Naime, pod istim uslovima rasta, različite sorte imaju različite nivoe nitrata. To ukazuje na selekciju sorti koje akumuliraju niži sadržaj nitrata i drugih nečistoća, što je veoma bitno kod organske proizvodnje.

Kao izvor azota (N) u organskoj poljoprivredi uglavnom se koriste organska đubriva sa ukupnim sadržajem azota $>1,5\%$, odnosno C/N odnosom <20 . Njihovom mineralizacijom u zemljištu mogu se osloboditi značajne količine azota u mineralnom, lako pristupačnom obliku i na taj način zadovoljiti potrebe useva u azotu.

U slučaju prekomerne upotrebe đubriva, uključujući i organsko, može doći do povišene akumulacije nitrata u biljci kao posledice prekomernog usvajanja nitrata iz zemljišta, ali i neadekvatne redukcije u biljci (redukcija do amonijaka i sinteza aminokiselina) (Slika 13).



Slika 13. Kruženje azota u prirodi (Rudolf i Kroneck, 2005)

Sadržaj nitrata u usevima zavisi od mnogih faktora. Faktori koji utiču na sadržaj nitrata u krompiru su vrsta, đubrenje, klimatski i zemljišni uslovi kao i vreme vađenja. Od klimatskih faktora najznačajnija je temperatura, a od agrotehničkih navodnjavanje krompira u vegetacionom periodu. Prema literaturnim navodima, suviše zalivanja tokom vegetacionog perioda će uticati na nižu akumulaciju nitrata u krtolama krompira, dok suša povećava njihov sadržaj (Matt i sar., 2011).

Naročito je česta intenzivna akumulacija nitrata u lisnatom povrću. Naime, kratka vegetacija i intenzivan rast (npr. salate), zahtevaju veliku količinu hraniva u relativno kratkom vremenskom periodu. Prekomerna upotreba organskih đubriva usled intenzivne mineralizacije neusklađene sa potrebama useva, može dovesti do povećanja koncentracije nitrata u listu salate. S obzirom da se salata koristi za ljudsku ishranu u svežem stanju, visoka koncentracija nitrata može izazvati zdravstvene problem kod ljudi i životinja iako su nitrati manje štetni od nitrita.

Čovek ishranom unosi više nitrata nego nitrita, ali se delovanjem bakterija u digestivnom traktu nitrati redukuju do nitrita. Naime, pod uticajem intestinalne mikroflore oko 3/4 nitrata absorbovanih hranom, mogu da se redukuju do nitrita koji su 6-10 puta toksičniji od nitrita (Szponar i Kierzkowska, 1990). Ova transformacija se može odigrati tokom procesa proizvodnje kao rezultat neadekvatnih uslova skladištenja i transporta hrane.

Visoka koncentracija nitrita u organizmu može izazvati methemoglobinemiju novorođenčadi, male dece i starijih osoba (Matt i sar., 2011). Radi se o bolesti u kojoj hemoglobin prelazi u methemoglobin koji ne može vezati kiseonik i na taj način ga prenositi u tkiva. Tokom šezdesetih godina prošlog veka, je nutricionista methemoglobinemija, uglavnom kod dece, prozrokovana unosom velike količine nitrata spanaćem i šargarepom (Duchan i Handy, 1992; Stolarczyk i Socha, 1992; Matt i sar., 2011).

Drugi problem kod visoke koncentracije nitrita u organizmu je što u reakciji sa sekundarnim i tercijarnim aminima u kiseloj sredini želuca nastaju kancerogeni i mutageni nitrozamini, koji mogu dovesti do razvića tumora i leukemije. Dozvoljen dnevni unos nitrata iznosi 3,7 mg/kg telesne mase što odgovara količini od 222 mg nitrata dnevno za osobu težine 60 kg. Ovu vrednost je ustanovio bivši Scientific Committee on Food (SCF),

što je 2002. godine potvrdio Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

Iz tog razloga, sadržaj nitrata u svezem povrću u nekim zemljama zakonski je regulisan i sistematski se sprovodi kontrola sadržaja nitrata u poljoprivrednim proizvodima. U Evropskoj Uniji maksimalno dozvoljen sadržaj nitrata u salati iznosi 2500 mg NO₃/kg (EC/466/2001).

Mnoge studije su ukazale na značajno viši sadržaj nitrata u konvencionalnoj proizvodnji krompira, šargarepe, kupusa, cvekle, celera, praziluka i peršuna u odnosu na organski način proizvodnje povrća. Najviši nivoi nitrata su zabeleženi u kupusu, zatim u šargarepi i krompiru, što potvrđuje pravilo da lisnato povrće akumulira više nitrata.

Nedavna istraživanja zastupaju stav da nitrati i nitriti mogu imati pozitivnu ulogu u ljudskom organizmu, štiteći ga od hipertenzije i stimulišući kardiovaskularni sistem (Hord i sar., 2009). Međutim, neki autori, poput Katan-a (2009) dovode u pitanje povezanost nitrata i nitrita sa methemoglobinemijom kod beba i tumora kod odraslih, ističući da su niske koncentracije ovih jedinjenja u telu neophodne, dok njihove povišene doze mogu biti veoma opasne za ljudsko zdravlje.

Nitriti mogu redukovati nutritivnu vrednost hrane smanjujući usvajanje proteina, masti i beta karotena, izazivajući raspadanje B vitamina i smanjujući sadržaj vitamina A (Matt i sar., 2011).

VEŽBA 6. ODREĐIVANJE NITRATA U POVRĆU

Cilj vežbe

Odrediti koncentraciju nitrata u lisnatom povrću i uporediti sa maksimalno dozvoljenim sadržajem nitrata prema nacionalnoj i EU regulativi.

Potrebna aparatura i pribor

Analitička vaga, tehnička vaga, staklene čaše od 250 mL, tamne boce od 100 mL, odmerni sudovi od 100, 500 i 1000 mL, menzura od 100 mL, stakleni štapići, erlenmajeri od 50 mL, klipna pipeta od 10 i 20 mL, pH metar, špric boca sa nastavkom za ispiranje elektroda pH metra, puferski rastvori (pH=4 i pH=8) za baždarenje pH metra, spektrofotometar sa kivetama.

Potrebne hemikalije

Salicilna kiselina (Merck, Nemačka), cc H_2SO_4 (Merck, Nemačka), NaOH (Merck, Nemačka), KNO_3 (Merck, Nemačka) i destilovana voda.

Priprema rastvora

Rastvor salicilne kiseline: 5 g salicilne kiseline rastvoriti u 100 mL koncentrovane H_2SO_4 . Rastvor se čuva u tamnoj boci, u frižideru. Rok trajanja ovako napravljenog i čuvanog rastvora je 7 dana.

Rastvor NaOH koncentracije 2 mol/L: odmeriti 40 g NaOH i preneti u čašu od 250 mL. Rastvoriti u 100 mL destilovane vode. Preneti u odmerni sud od 500 mL i dopuniti destilovanom vodom do crte.

Osnovni standardni rastvor nitrata koncentracije 25 mg/L: Odmeriti 0,407 g KNO_3 , preneti u odmerni sud od 1000 mL i dopuniti destilovanom vodom. Preneti 10 mL ovog rastvora u odmerni sud od 100 mL i dopuniti do crte destilovanom vodom.

Kalibraciona kriva

U erlenmajere od 50 mL odmeriti odgovarajuću zapreminu osnovnog standardnog rastvora nitrata i dejonizovane (ili destilovane) vode po šemi iz tabele 3:

Tabela 3. Priprema rastvora za definisanje kalibracione krive

Zapremina osnovnog standardnog rastvora nitrata (c=25 mg/L) (mL)	Zapremina H_2O (mL)	Količina NO_3 u odmerenom sudu (μg)	Odgovara količini NO_3 u sušenom uzorku (mg/kg)
0,25	0,00	6,25	2500
0,20	0,05	5,0	2000
0,15	0,10	3,75	1500
0,10	0,15	2,5	1000
0,05	0,20	1,25	500
0,00	0,25	0,00	0,00

Nakon toga, u erlenmajer dodati 0,8 mL rastvora salicilne kiseline u cc H_2SO_4 i ostaviti 20 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim, vrlo pažljivo dodati 19 mL rastvora NaOH (2 mol/L) kako bi se pH vrednost rastvora podigla iznad 12. Ohladiti uzorke do sobne temperature.

Preneti deo uzorka u kivetu spektrofotometra i meriti apsorbanciju na 410 nm.

Slepa proba

Za uzorke sa dosta pigmenta slepa proba se pravi mešanjem 0,25 mL ekstrakta, 0,8 mL cc H_2SO_4 (bez salicilne kiseline) i 19,0 mL rastvora NaOH (2,0 mol/L).

Priprema uzorka

Svež materijal se suši na sobnoj temperaturi ili u sušnici na 40°C. Potrebno je odrediti sadržaj vlage u uzorku povrća na sledeći način: odmeriti tačno 5,00 g svežeg uzorka na analitičkoj vagi u posudu za merenje, a zatim otklopljenu posudu sa uzorkom staviti u sušnicu na 40°C i uzorak sušiti do konstantne mase. Zabeležiti masu suvog uzorka. Sadržaj vlage se računa po formuli:

$$\text{Sadržaj vlage, \%} = \frac{m_{\text{svežeg uzorka}} - m_{\text{suvog uzorka}}}{m_{\text{svežeg uzorka}}} \times 100$$

Odmeriti 100 mg osušenog i samlevenog uzorka u erlenmajer od 50 mL i dodati 10 mL destilovane ili dejonizovane vode. Inkubirati na 45°C tokom 1 sata. Nakon toga, centrifugirati na 5000xg 15 minuta i zatim odvojiti supernatant.

Pipetom odmeriti 0,25 mL ekstrakta i preneti u erlenmajer od 50 mL. Dodati 0,8 mL rastvora salicilne kiseline u cc H_2SO_4 i ostaviti 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, vrlo obazrivo dodati 19,0 mL rastvora NaOH (2,0 mol/L) kako bi se pH vrednost rastvora podigla iznad vrednosti 12. Ohladiti uzorke do sobne temperature.

Preneti deo uzorka u kivetu spektrofotometra i meriti apsorbanciju na 410 nm.

Rezultati rada

Zabeležiti apsorpciju slepe probe, serije standardnih rastvora i uzorka.

Formulisati kalibracionu krivu nanoseći na x-osu vrednost količine NO_3 koja odgovara sadržaju u sušenom uzorku u mg/kg (četvrta kolona u tabeli 3), a na y-osu vrednosti apsorbancije na 410 nm.

Napomena

Od apsorbancije uzorka treba oduzeti vrednost apsorbancije slepe probe.

Zatim sa kalibracione krive očitati količinu NO_3 koja odgovara korigovanoj apsorbanciji uzorka.

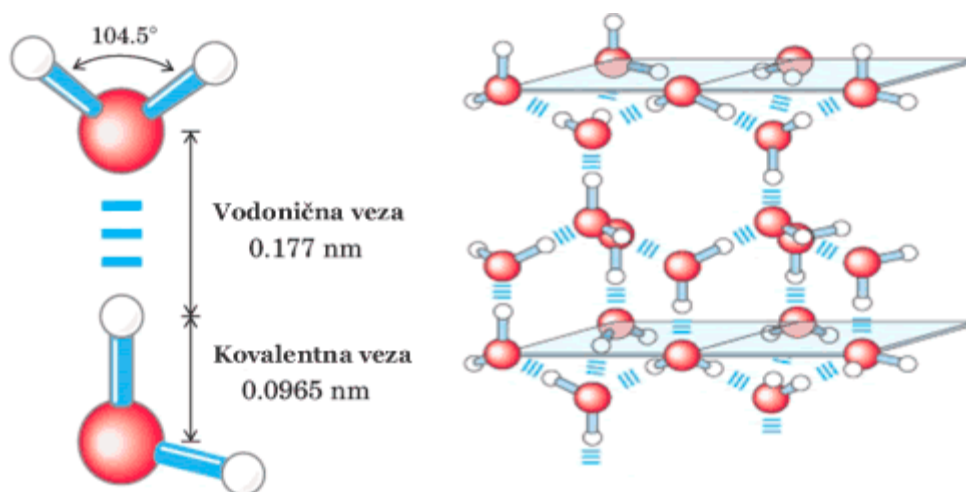
Očitana vrednost odgovara sadržaju nitrata u sušenom uzorku i potrebno ju je preračunati na svež uzorak pomoću podatka o sadržaju vlage.

SADRŽAJ VODE I SUVE MATERIJE U POLJOPRIVREDNIM PROIZVODIMA

Sadržaj vode (vlage) u namirnicama je veoma različit i kreće se u širokim granicama, u zavisnosti od vrste namirnice. U odnosu na većinu namirnica, voće ima najviši sadržaj vode (Skroza i sar., 2010). Sveže voće i povrće sadrži u proseku 65-95% vode, meso i ribe 50-70% a žitarice od 10-15%.

Određivanje sadržaja vode u namirnicama predstavlja jednu od osnovnih analiza i ima višestruki značaj (Niketić-Aleksić, 1996). S obzirom na mesto gde se voda nalazi u tkivu, može se podeliti na intercelularnu (u ćelijama) i ekstracelularnu (u međucelijskom prostoru). Između ćelije i njene okoline konstantno se odvija proces razmene vode, čime se obavlja snabdevanje ćelija hranljivim materijama. Postoje različiti oblici vode prisutne (vezane) u biljnim ćelijama. U vodi koja se nalazi u ćeliji, rastvorene su organske i mineralne materije. Koloidno vezana voda se nalazi u membrani, citoplazmi i jezgri ćelija, teže se uklanja tokom sušenja ili dehidratacionih procesa. Konstitucionalna voda koja je direktno vezana u hemijske komponente molekula se veoma teško uklanja.

Molekul vode je polaran, što znači da negativan kraj privlači pozitivan kraj molekula. Zahvaljujući dipolnom momentu, javlja se interakcija usled privlačenja atoma kiseonika jednog i atoma vodonika drugog molekula. Na taj način nastaje vodonična veza (Slika 14).



Slika 14. Vodonična veza (<https://biologijazts.wordpress.com/2014/09/12/хеміјски-састав-ћелије/>)

Usled dipolnog karaktera, oko molekula vode se stvara hidrantni omotač, koji se manifestuje vezivanjem vode sa polarnim grupama, odnosno, hidrofilnim radikalima (hidroksil, amino, karboksil i drugi radikali). Većina najvažnijih makromolekularnih sastojaka voća i povrća ima hidrofilna svojstva, te vodu vezuje putem adsorpcije, gradeći hidrokoloide. Voda adsorbovana na ovaj način je hidrantna voda i u vezi je sa energijom vezivanja molekula vode za makromolekularne sastojke (želatin, škrob, i dr).

Voda je važna komponenta poljoprivrednih proizvoda, univerzalan je rastvarač soli, šećera, vitamina, pigmenata i drugih sastojaka voća i povrća. Na osnovu sadržaja vode procenjuje se, u prvom redu, kvalitet namirnica, mogućnost konzervisanja, čuvanja i ispravnost u smislu zakonskih propisa (npr. brašno ne sme da sadrži više od 14% vode, a sušeno voće ne više od 20%).

Ukoliko sadržaj vode pređe određenu granicu povećava se aktivnost fermenta koji ubrzavaju razvoj mikroorganizama i gljiva i dolazi do kvarenja namirnica.

Kod nekih namirnica neophodno je poznavati sadržaj vode, a preko njega sadržaj suve materije, jer se na osnovu njihovog sadržaja vrši klasifikacija ovih namirnica (npr. med, sirevi). Osim makromolekularnih tvorevina, u suvu materiju ulaze kristaloidi, male molekulske težine (manje od koloida), odnosno supstance koje preko polupropustljive membrane prelaze u rastvor i snižavaju tačku mržnjenja, te dovode do kristalizacije (Jašić, 2007). To su šećeri, kiseline i mineralne materije (Tabela 4).

Tabela 4. Orijentacioni sastav suve materije u voću i povrću

Naziv materije	Sadržaj (%)
Ugljeni hidrati	3 - 18
Sirova vlakna	0,3 - 6
Azotne materije	0,8 - 1,3
Mineralne materije	0,3 - 0,8
Masti	0,1 - 0,3

Osim pomenutog značaja, određivanje i poznavanje sadržaja vode u namirnicama je neophodno u slučajevima kada je sadržaj pojedinih hranjivih sastojaka potrebno izraziti na suvu materiju.

Voda se nalazi u svim namirnicama sa različitom procentualnom zastupljenošću (Pribiš, 1999). Količina ukupne vode u različitim namirnicama prema navodima Pribiš (1999), data je u tabeli 5.

Tabela 5. Količina ukupne vode (%) u namirnicama

Namirnice	%	Povrće	%	Voće	%
Brašno	10 - 13	Kelj	86	Banana	71
Hlebovi	34 - 38	Blitva	94	Kruška	60
Kuvana testa	do 60	Krastavac	96	Jabuka	87
Morska riba	60 - 83	Paradajz	98	Trešnja	84
Slatkovodna riba	50 - 80	Mahunarke	7 - 12	Višnja	84
Mleko i proizvodi	30 - 93	Gljive	80 - 93	Limun	88
Meso i iznutrice	50 - 80	Lubenica	94	Pomorandža	88

Postoji velik broj metoda za određivanje vode u namirnicama. Međutim, iako je način određivanja vode po ovim metodama veoma jednostavan, tačno određivanje sadržaja vode u namirnicama je jedno od najtežih određivanja u analitici hrane. Teškoće su prouzrokovane činjenicom da postoje različiti oblici vezivanja vode, kao i da se u toku određivanja izvesni sastojci u namirnici menjaju, razlažu, isparavaju i sl.

Voda se u namirnicama pojavljuje u dva osnovna oblika:

- **Slobodna voda ili apsorbovana voda**, koja predstavlja najčešći oblik prisutne vode, lako se oslobađa i može se odrediti najvećim brojem metoda koje se koriste za određivanje vode.
- **Vezana voda ili adsorbovana voda**, može biti prisutna kao kristalna voda u hidratima, ili čvrsto vezana za proteine ili šećere ili adsorbovana na površini koloidnih čestica. Pojedini od ovih oblika vode se veoma teško uklanjaju, te je stoga potrebno primeniti posebne metode određivanja.

Sadržaj vode i suve materije u poljoprivrednim proizvodima iz organske proizvodnje

Veoma je malo dostupnih literaturnih podataka koji se bave određivanjem sadržaja suve materije u proizvodima iz organske poljoprivrede. Matt i saradnici (2011) navode da je sadržaj suve materije viši u proizvodima iz organske proizvodnje, ukazujući na neznatno viši sadržaj suve materije u krompiru iz organske proizvodnje (20,92%) u odnosu na konvencionalno proizveden krompir (20,09%).

VEŽBA 7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VODE I SUVE MATERIJE POLJOPRIVREDNIH PROIZVODA

Princip vežbe

Metode za određivanje sadržaja vode sušenjem zasnivaju se na sušenju uzorka do konstantne mase u sušnici. Izvodi se merenjem mase uzorka pre i posle sušenja do konstantne mase, na temperaturi od 105 °C u sušnici pod atmosferskim pritiskom. Dobijena razlika masa ekvivalentna je sadržaju vode u uzorku. Nakon određivanja sadržaja vode, izračunaće se suva materija ispitivanog poljoprivrednog proizvoda.

Potrebna aparatura i pribor

Vegeglas (staklena posuda za sušenje sa poklopcem), analitička vaga, eksikator, sušnica, laboratorijski mlin, stakleni štapić, pipeta od 5 mL i laboratorijska metalna kašičica.

Potrebne hemikalije

Destilovana voda

Postupak

A) Određivanje sadržaja vode u brašnu

U prethodno osušenu, u eksikatoru ohlađenu i izmerenu posudu (vegeglas) odmeriti oko 3 g uzorka na analitičkoj vagi sa tačnošću od ± 1 mg. Zatim se posuda sa uzorkom, sa koso postavljenim poklopcem, stavlja u sušnicu, koja je prethodno zagrejana na 105 °C. Posle sušenja u trajanju od 90 min, posuda se još u sušnici zatvori poklopcem i stavi u eksikator. Nakon 30-60 min hlađenja u eksikatoru, posuda se meri na analitičkoj vagi. Postupak se ponavlja do postizanja konstantne mase.

B) Određivanje sadržaja vode u voću ili povrću

Homogenizovati uzorak voća ili povrća u laboratorijskom mlinu i u prethodno osušenu, u eksikatoru ohlađenu i izmerenu vegeglas, odmeriti 5 g uzorka na analitičkoj vagi sa tačnošću od ± 1 mg. U uzorak dodati malo destilovane vode i promešati uzorak staklenim štapićem. Zatim se posuda sa uzorkom i koso postavljenim poklopcem, stavlja u sušnicu, koja je prethodno zagrejana na 105 °C. Posle sušenja u trajanju od 90 min, posuda se još u sušnici zatvori poklopcem i stavi u eksikator. Nakon 30-60 min hlađenja u eksikatoru, posuda se meri na analitičkoj vagi. Postupak se ponavlja do postizanja konstantne mase.

Izračunavanje

Rezultat određivanja sadržaja vode u ispitivanom uzorku se izražava u procentima (%).

$$Voda, \% = \frac{a \times 100}{p}$$

Gde su:

a – razlika u masi posude sa uzorkom pre i posle sušenja (g)

p – odmerena količina uzorka (g)

Određivanje suve materije

Suva materija predstavlja celokupnu količinu materije iz sastava proizvoda, koja ne isparava pod definisanim uslovima.

Sadržaj suve materije se može odrediti računski na osnovu sadržaja vode, koristeći formulu:

$$\textit{Suva materija, \%} = 100 - \textit{voda, \%}$$

KISELOST VOĆA I POVRĆA

Kiselost se izražava preko vrednosti pH, koja predstavlja vrednost negativnog logaritma koncentracije vodonikovih jona (H^+) u rastvoru. pH vrednost rastvora određuje da li je rastvor kiselog ili baznog karaktera. Vrednost pH je neimenovan broj, a za poređenje koristi se pH skala koja obuhvata vrednosti od 0 do 14 (Slika 15). Za kisele rastvore vrednost pH je manja od 7 ($pH < 7,0$), dok je za bazne veća od 7 ($pH > 7,0$). Za neutralan rastvor vrednost pH je 7.

Iako vrednost pH nema mernu jedinicu, skala njenog opsega nije proizvoljna. Vrednost pH se meri na osnovu koncentracije vodonikovih jona u rastvoru.

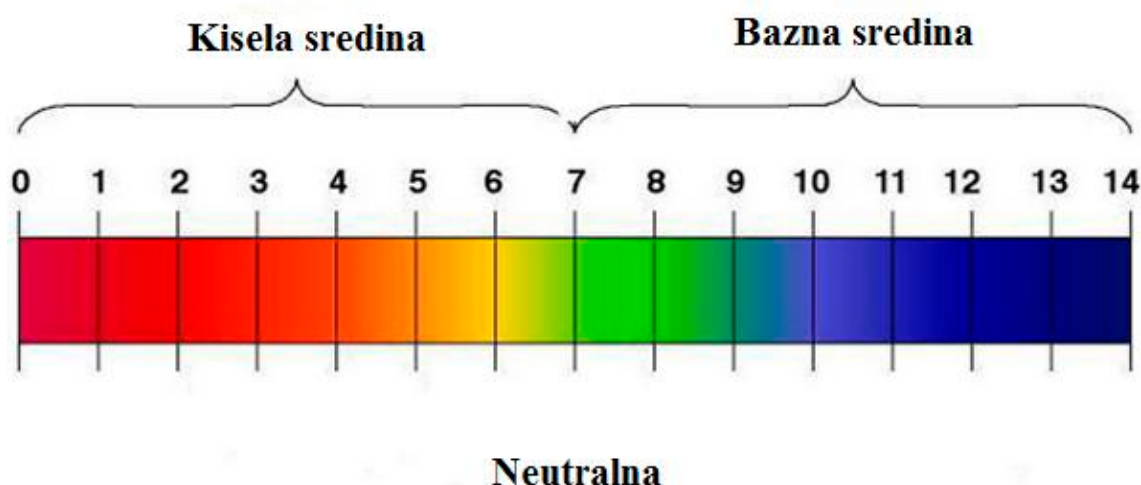
Formula za računanje vrednosti pH je:

$$pH = -\log_{10} [H^+]$$

u kojoj su:

$[H^+]$ - aktivnost H^+ jona (koncentracija vodonikovih jona u litru datog rastvora)

$\log_{10}$ - označava logaritam sa osnovom od 10, tako da se pH vrednost definiše na logaritamskoj skali kiselosti. Na primer, rastvor sa $pH = 7,4$ će imati koncentracija $[H^+]$ jona $10^{-7,4}$ mol/L.



Slika 15. Skala vrednosti pH (Rial i sar., 2019)

Na slici 15, se jasno uočava da se baznost i kiselost supstanci utvrđuju pomoću vrednosti pH. Pritom se meri koncentracija vodonikovih jona (H^+), koji daju vrednost pH veću od 7 do 14 (bazna reakcija) odnosno, pH manju od 7 i kiselu reakciju.

Kiselost voća i povrća potiče od organskih kiselina (limunska, jabučna, vinska i dr.), koje se normalno nalaze u voću i povrću, kao i od taninskih i pektinskih materija (Skroza i sar., 2010). U svežem voću i povrću, prirodne organske kiseline se uglavnom nalaze u malim količinama (Trajković i sar., 1983) kao slobodne kiseline ili vezane u obliku soli. U voću ima prosečno od 0,1 – 2,0% organskih kiselina, u sokovima ih može biti do 6,0%, dok je u povrću njihov sadržaj manji od 0,1%.

U poslednje vreme se intenzivno govori o kvalitetu namirnica, odnosno, postavlja se pitanje da li u ljudskom organizmu izazivaju baznu ili kiselu reakciju?

Sve namirnice se dele na kisele, bazne i neutralne prema njihovoj vrednosti pH. U Tabeli 6 su date namirnice koje u organizmu stvaraju baznu sredinu. Već je ranije navedeno da pH skala definiše koliko su supstance bazne ili kisele po svom karakteru. Ako je pH neke namirnice 7, to znači da je neutralna. Sa druge strane, ekstremno bazne namirnice imaju vrednosti blizu 14, a ekstremno kisele blizu nule. Kako se radi o logaritamskoj skali, treba imati na umu da jedan broj razlike predstavlja 10 puta više kiselosti date namirnice. Na primer, hrana koja ima pH vrednost 4 je 10 puta kiseliya od hrane sa pH 5, a sto puta kiseliya od one koja ima pH 6. Slično važi i za alkalne, odnosno, bazne namirnice.

Tabela 6. Namirnice koje u organizmu stvaraju baznu sredinu

Bazno povrće	Bazno voće	Bazni proteini	Ostala bazna hrana	Zaslađivači i začini
Beli luk	Jabuke	Jaja	Jabukovo sirće	Stevija
Cvekla	Kajsije	Mlad sir	Zeleni sokovi	Cimet
Brokoli	Banane	Pileće grudi	Granule od	Kari
Kupus	Grejpfrut	Jogurt	lecitina	Senf
Šargarepa	Nektarine	Badem	Polen	Miso
Karfiol	Dinje	Kesten	Probiotske	Đumbir
Celer	Narandže	Tofu	kulture	Čili papričica
Blitva	Avokado	(fermentisan)	Ceđeno povrće	Svi biljni začini
Špargla	Trešnje	Laneno seme	Ceđeno voće	Morska so
Pečurke	Limun	Seme od	Organsko	Tamari
		bundeve	mleko	
Zelena salata	Ananas		Mineralna voda	
Grašak	Kruške	Tempeh	Biljni čaj	
Pastrnak	Mandarine	(fermentisan)	Zeleni čaj	
Crni luk	Lubenica	Klice	Čaj od	
			maslačka	
Keleraba	Ribizle	Proso	Ginseng	
Kelj	Breskve	Suncokret	Kombuha	
Paradajz	Tropsko voće			
Krastavac	Urme			
Plavi patlidžan	Sve bobičasto			
Bundeva	voće			

Kada hrana dospe u sistem za varenje, teško je govoriti o početnoj vrednosti pH. Kiselost organizma je naziv za različita stanja u kojima je poremećen odnos kiselina i baza u organizmu, pa je vrednost pH krvi i mokraće pomećena ka kiseljoj reakciji, odnosno, pH < 7,35. Suprotno stanju kiselosti organizma je baznost organizma, kada je pH vrednost krvi i mokraće > 7,35. Stanje kiselosti organizma je pogodno za razvijanje mnogih bolesti (nizak nivo energije, hronični umor, prekomerno stvaranje sluzi, učestale prehlade i infekcije, nervoza, iritabilnost, lomljivi nokti, suva kosa i koža, stvaranje cisti, glavobolje, bolni zglobovi i artritis, neuritis, mišićni bolovi i grčevi, gastritis, rak, autoimuna oboljenja).

Sa stanovišta zdravstvenog stanja organizma, izuzetno je važno da se uravnoteži ishrana i zadrži neutralna reakcija organizma. Ovo se postiže pravim odabirom namirnica, jer kiselina neutrališe bazu i obrnuto.

Zastupljeno je mišljenje da namirnice koje u organizmu snižavaju vrednost pH, treba manje unositi (Tabela 7). Neki stručnjaci iz oblasti alternativne ishrane smatraju da unos „kisele hrane” treba kontrolisati.

Tabela 7. Namirnice koje u organizmu stvaraju kiselu sredinu

Kiselo zrnavlje	Zaslađivači i pića	Kiseli proteini	Kisela ulja	Kiseli lekovi
Pirinčani kolači	Šećer	Kravlji sir	Laneno ulje	Aspirin
Heljda	Kukuruzni sirup	Koziji sir	Kukuruzno ulje	Psihodelične
Pirinač	Pivo	Tvrđi sirevi	Ulje avokada	supstance
Kukuruz	Rakija	Ovčiji sir	Suncokretovo	Droga
Pšenica	Vino	Mleko	Svinjska mast	Duvan
Kolači od žita	Kakao	Puter	Kudeljino ulje	
Raž	Kafa	Rakovi	Ulje od susama	
Ječam	Sirće	Riba	Maslinovo ulje	
Ovas	Senf	Jagnjetina	Laneno ulje	
Kikiriki	Biber	Govedina	Bademovo ulje	
Raž	Koka-kola	Svinjetina		

Treba naglasiti da termičkom obradom „bazne“ namirnice, postaju „kisele“. Naravno da se ovaj efekat pojačava dugotrajnijem izlaganju toplote (kuvanje i prženje). Na taj način se opterećuje organizam i stvara podloga za nastajanje bolesti.

Smatra se da u organizam treba dnevno unositi 80% „baznih“ namirnica, a samo 20% „kiselih“. U ovih 20% „kiselih“ namirnica najbolje je koristiti one koje će dovesti do najnižeg snižavanja vrednosti pH u organizmu (žitarice, mahunarke, semenje i orašaste plodove).

Kalcijum je jedan od najvažnijih minerala za stvaranje baznosti. Ljudsko telo sadrži 2,0% kalcijuma ili prosečno 1,2 kg. Ovaj mineral pozitivno utiče na brojne telesne funkcije upravo zbog toga što reguliše kiselo-baznu ravnotežu u svim telesnim tečnostima. Krv je u uspostavljanju te ravnoteže najvažnija i zato se telo brine da krv ima pH vrednost 7,4, čak i na štetu drugih telesnih tečnosti. Ako bi krv imala pH 6,0, bila bi kisela, ne bismo imali dovoljno kiseonika i nastupila bi smrt. Zato se telo brani na taj način što crpi kalcijum iz kostiju i tako reguliše pH vrednost, a upravo je to uzrok mnogih bolesti.

VEŽBA 8. ODREĐIVANJE KISELOSTI VOĆA I POVRĆA

Cilj vežbe

Određivanje kiselosti voća i povrća volumetrijskom metodom, titracijom rastvorom natrijum hidroksida (NaOH) uz fenoftalein kao indikator.

Potrebna aparatura i pribor

Analitička vaga, tehnička vaga, stalak za biretu, bireta od 50 mL, stakleni levak, menzura od 100 i 1000 mL, staklene češe od 200 mL, odmerni sudovi od 100 mL i 1 L, mlin, sahatno staklo (prečnika 10 cm), metalne kašičice, stakleni štapić, filter papir, makaze, erlenmajer od 300 mL, tikvica od 250 mL, vodeno kupatilo, ultrazvučna kada i staklena/plastična kapaljka.

Potrebne hemikalije

Natrijum hidroksid, fenoftalein (Sigma Aldrich, SAD), 96,0% etanol (Merck, Millipore) i destilovana voda.

Priprema reagenasa

Rastvor NaOH (0,1 mol/L): izmeriti 4,0 grama NaOH u staklenu čašu na analitičkoj vagi. Destilovanu vodu sipati do markera u menzuru od 1000 mL. Kvantitativno preneti NaOH preko levka u odmerni sud od 1000 mL uz dodavanje vode iz menzure. Ukoliko se nije sav NaOH rastvorio, potrebno je staviti odmerni sud u ultrazvučnu kadu tokom 5 minuta.

Rastvor fenoftaleina (indikator): u odmerni sud od 100 mL izmeriti 1,0 g fenoftalenina na analitičkoj vagi. U menzuru od 100 mL odmeriti 60 mL etanola, preneti u odmerni sud i dobro promućkati. Dopuniti odmerni sud vodom do crte.

Priprema uzorka

Homogenizovati uzorak voća ili povrća mlevenjem na mlinu. Na tehničkoj vagi u staklenu tikvicu od 250 mL, odmeriti 20 g homogenizovanog uzorka. Dodati destilovanu vodu do $\frac{3}{4}$ zapremine tikvice. Sadržaj dobro promešati i zagrejati na vodenom kupatilu (podešeno na 80°C). Ostaviti uzorak pola sata na vodenom kupatilu uz povremeno mešanje sadržaja tikvice. Pre početka titracije, uzorak se preko staklenog levka i filter papira profiltrira u erlenmajer.

Izmeriti u menzuri 50 mL filtrata i preneti u erlenmajer, dodati 3-4 kapi fenoftaleina kao indikatora i titrisati NaOH do pojave bledo-ružičaste boje.

Sadržaj kiselina, odnosno kiselost se izražava u g/100 g ili u g/100 mL uzorka.

Formula za izračunavanje kiselosti:

$$\text{Kiselost} = A \times k \times 100 / \text{odvaga}$$

gde su:

A - utrošak NaOH (mL)

odvaga - količina ispitivanog uzorka (g ili mL)

k - konstanta

Vrednosti k za pojedine organske kiseline:

Jabučna kiselina: 0,0067; Limunska kiselina: 0,0064; Vinska kiselina: 0,0075.

KVALITET MEDA

Med predstavlja prirodnu, slatku supstancu koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) preradom nektara biljaka, sokova sa živih delova biljaka ili ekskreta insekata koji se hrane sakupljanjem sokove sa živih delova biljaka. Pčele sakupljaju ove sirovine, prerađuju i dodaju sopstvene specifične supstance, dehidriraju i odlažu u ćelije saća do sazrevanja. Med se sastoji od različitih šećera, pretežno fruktoze i glukoze, kao i drugih supstanci, kao što su organske kiseline, enzimi i čvrste čestice. Med može biti tečne ili viskozne konzistencije, delimično ili potpuno kristalizovan, sa bojom koja varira od svetložute do tamnobraon. Miris i ukus meda variraju u zavisnosti od vrste biljaka od kojih potiče.

Pored meda, domaća zakonska regulativa (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, Sl. glasnik RS 101/2015) prepoznaje med sa dodacima, druge proizvode pčela, kao i preparate na bazi meda i drugih proizvoda pčela. Med sa dodacima predstavlja mešavinu meda sa drugim proizvodima, pri čemu gotov proizvod sadrži najmanje 60% meda. Kategorija drugih proizvoda pčela obuhvata one supstance koje nastaju sakupljanjem od strane pčela ili sekrecijom žlezda pčela. Preparati na bazi meda i drugih proizvoda pčela predstavljaju mešavine meda sa drugim pčelinjim proizvodima kao što su polen, propolis i mleč.

Klasifikacija meda

Prema poreklu, med se klasifikuje kao:

1. cvetni ili nektarni, tj. jednocvetni (monoflorni) i višecvetni (poliflorni) med;
2. medljikovac;
3. pekarski med.

Jednocvetni/monoflorni med je proizvod koji medonosne pčele proizvode od nektara cvetova medonosnih biljaka određene vrste. Monoflorni med može se označiti prema određenoj biljnoj vrsti ako u nerastvorljivom delu sadrži najmanje 45% polenovih zrna te biljne vrste, sa izuzetkom pojedinih biljnih vrsta kao što su uljana repica (najmanje 60%), suncokret (najmanje 40%), lipa (najmanje 25%), bagrem (najmanje 20%). Višecvetni/poliflorni med (livadski, cvetni) je proizvod koji medonosne pčele proizvode od nektara cvetova različitih vrsta medonosnih biljaka. Medljikovac je proizvod koji pčele proizvode sakupljanjem ekskreta insekata (Hemiptera), koji se hrane sokovima sa živih delova biljaka ili sekreta sa živih delova biljaka. Pekarski med je med izmenjenog kvaliteta koji se koristi u industriji ili kao sastojak druge hrane koja se dalje prerađuje i može da ima nesvojstven ukus ili miris, u stanju vrenja, prevreo ili pregrejan.

Prema načinu proizvodnje i stavljanja u promet, med se kategorizuje kao:

1. med u saću;
2. med sa saćem ili med sa delovima saća;
3. ceđeni med;
4. vrcani (ekstrahovani) med;
5. presovani med;
6. filtrirani med.

Drugi proizvodi pčela - klasifikuju se kao polen, propolis i matični mleč. Polen je proizvod koji pčele sakupljaju sa cvetova biljaka, oblikuju u grudvice i dodaju mu sopstvene specifične supstance. Prema načinu dobijanja polen se klasifikuje kao hvatani polen sakupljen pomoću hvatača i kao vađeni polen („perga” odnosno „pčelinji hleb”) koji je dobijen vađenjem iz ćelija saća. Prema sadržaju suve materije polen se klasifikuje kao

neosušeni polen, koji sadrži najmanje 60% suve materije, odnosno kao osušeni polen, koji sadrži najmanje 92% suve materije. Propolis je proizvod mešavine prirodnog pčelinjeg voska i smolastih materija koje pčele sakupljaju sa drvenastih biljaka. Propolis koji se stavlja u promet ne sme da ima više od 5% mehaničkih nečistoća i ostataka pčela, ne sme da sadrži manje od 35% materija koje se ekstrahuju alkoholom, kao ni više od 30% voska. Matični mleč je proizvod alotrofnih (podždrelnih) žlezda mladih pčela, mlečne boje, guste konzistencije, karakterističnog ukusa i mirisa koji je izvađen 68 do 72 sata nakon presađivanja larvi, uz obavezno uklanjanje larvi iz oduzetog mleča. Matični mleč se ne uzima iz zatvorenih matičnjaka ili legla trutova. Liofilizovan matični mleč je proizvod dobijen postupkom liofilizacije. Matični mleč koji se stavlja u promet ne sme da ima manje od 30% suve materije, ne manje od 11% proteina i ne više od 70% vode.

Preparati na bazi meda i drugih proizvoda pčela - mogu biti mešavine meda sa drugim proizvodima pčela (matičnim mlečom, polenom ili propolisom) ili mešavine drugih proizvoda pčela. Preparati osim u sirovom obliku mogu da budu i u obliku kapi, tableta, kapsula, čvrstih smeša, masti ili sirupa. Preparati na bazi meda i drugih proizvoda pčela moraju da ispunjavaju uslove za bezbednost hrane životinjskog porekla u skladu sa zakonom kojim se uređuje bezbednost hrane.

Med sa dodacima - je mešavina meda sa drugim proizvodima (lekovito bilje, ekstrakti, sveži pupoljci bora, oraha, sušeno voće, proizvodi od sušenog voća i povrća, kakao, sok od voća ili povrća i dr.). Med sa dodacima mora da sadrži najmanje 60% meda u gotovom proizvodu. Proizvodi koji se dodaju u med moraju da ispunjavaju uslove za bezbednost hrane, u skladu sa posebnim propisima koji se odnose na te proizvode.

VEŽBA 9. ISPITIVANJE KVALITETA MEDA

U cilju falsifikovanja, u med se često dodaje kukuruzni sirup, melasa, glukoza, skrob, dekstroza i slični proizvodi. Čist med ne sme sadržavati ove dodatke. Vizuelnim pregledom meda nemoguće je utvrditi da li med ima ili nema dodate supstance. Najjednostavniji način falsifikovanja meda je da se obični šećer (saharoza) otopi pomoću vode u gusti sirup i pomeša sa prirodnim medom. Umesto šećera može se koristiti i glukoza (groždani šećer) koji dolazi u trgovinu u obliku gustog sirupa. Oba falsifikata se mogu lako otkriti pomoću polarimetra.

Određivanje falsifikata meda pomoću polarimetra. Prirodni cvetni med zakreće ravan polarizovane svetlosti u levo, a rastvoreni šećer i glukoza su optički desno aktivni. Ako se cvetnom medu doda izvesna količina šećernog sirupa ili glukoza, uz dekstrozu koja već postoji u medu, a koja je takođe optički desno aktivna, polarizacija skreće udesno i falsifikovani med postaje optički desno aktivan čime se razlikuje od cvetnog meda.

Mnogo je teže ako se za falsifikovanje upotrebi invertni šećer. On se otkriva pomoću jedinjenja koja se zove anilin hlorid. Anilin hlorid se pravi mešanjem hlorovodonične kiseline i anilina u razmeri 3:1. Kada se ovaj rastvor doda uzorku meda, tamno crvena ili narandžasta boja govori da je med falsifikovan, dok boja čistog meda ostaje nepromenjena.

Dokazivanje prisutnog skroba u medu. Skrob prisutan u medu se može dokazati pomoću tzv. jodo-testa. Za ovaj test, uzorak meda se razblaži sa jednakom količinom vode. Koristi se 10% rastvor joda. Dodatkom nekoliko kapi rastvora joda u rastvor meda koji sadrži skrob, obojiće se ispitivani rastvor ljubičasto-plavom bojom, a rastvor prirodnog meda će ostati nepromenjen.

Određivanje falsifikata meda pomoću gustine meda. Gustina falsifikovanog meda je manja od gustine pravog meda sa mineralnim sastojcima. Gustina pravog meda se kreće oko 1,4, a falsifikovanog oko 1,3. Gustina meda direktno zavisi od sadržaja vode u medu. Što je veća količina vode, to je gustina meda manja.

Određivanje falsifikata u kućnim uslovima. Pošto je poznato da je gustina falsifikovanog meda niža od gustine pravog meda jednostavnim merenjem na vagi se može otkriti autentičnost meda. Masa tegle u koju stane kilogram meda je oko 280 g, tako da je njena težina sa medom 1280 g, pa masa iste količine falsifikovanog meda, s obzirom na manju gustinu, iznosi između 1210 i 1220 g.

Određivanje pH vrednosti meda. Med je relativno kiseo proizvod, njegova prosečna pH vrednost se kreće od 3,2 - 4,5. Kiselost meda potiče od prisutnih organskih kiselina i u mnogome doprinosi antibakterijskim osobinama meda. pH vrednost meda se određuje tako što se 5 g meda rastvori u 50 ml vode i pomoću pH metra se odredi njegova pH vrednost.

Određivanje aktivnosti diastaze. Dijastaza je enzim koji se u medu sastoji od α -amilaze, koja razlaže skrob na dekstrine i od β -amilaze koja ga razlaže na maltozu. Svojstva tog enzima su detaljno proučena, ali još uvek nije razjašnjena njegova uloga u zrenju meda. Aktivnost diastaze predstavlja jedan od glavnih parametra u određivanju intenziteta zagrevanja meda tokom prerade i skladištenja. Prilikom zagrevanja, aktivnost diastaze se smanjuje. Ova metoda zasniva se na hidrolizi 1% rastvora skroba enzimom iz 1 g meda u toku jednog sata na temperaturi od 40°C.

Određivanje hidroksimetilfurfurala (HMF) u medu. Da bi se odredio sadržaj hidroksimetilfurfurala, nepoželjne supstance koja medu daje specifičan ukus, neophodno je odmeriti tačno 5 g meda i kvantitativno preneti sa 25 ml vode u sud od 50 ml. Zatim se doda 0,5 ml napravljenog rastvora Karez I (15 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ se rastvori do 100 ml sa

destilovanom vodom) i dobro promućka. Zatim se doda 0,5 ml napravljenog rastvora Karez II (30 g $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se rastvori do 100 ml destilovanom vodom), i takođe dobro promućka. Dodati malo alkohola, kako bi se sprečilo penušanje rastvora. Filtrira se kroz filter papir, pri čemu se prvih 10 ml filtrata odbacuje.

Ispipetirati po 5 ml filtrata u svaku od dve kivete za spektrofotometar. U prvu dodati 5 ml H_2O (test rastvor), a u drugu kivetu (referentni rastvor) dodati 5 ml NaHSO_4 (0,20 g NaHSO_4 rastvoriti u 100 ml vode) i dobro promešati. Određivanje se vrši na talasnoj dužini od 284 nm i 336 nm. Ako je apsorbancija u prvoj kiveti (test rastvor) veća od 0,6, tada se taj rastvor razblažuje, a za referentni rastvor (kiveta broj 2) se koristi 0,1% umesto 0,2% NaHSO_4 .

Izračunavanje:

$$\frac{\text{mg hidroksimetilfurfurala (HMF)}}{100 \text{ g meda}} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \cdot 14,97 \cdot 5}{\text{odvaga (g)}}$$

$$Faktor (14,97) = \frac{126}{16830} \times \frac{1000}{10} \times \frac{100}{5}$$

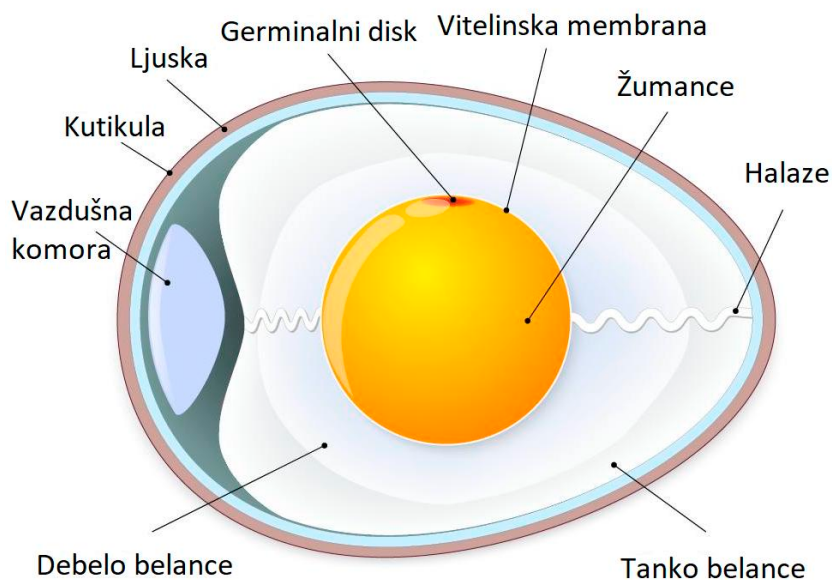
gde je:

126 - molekulska masa HMF; 16830 - molarni apsorpcioni koeficijent HMF na 284 nm; 1000 mg/g; 10 centilitara/l; 100 - preračunava se na 100 g meda, 5 - masa uzorka meda.

Napomena: pre određivanja HMF, med se ne sme zagrevati.

KVALITET JAJA

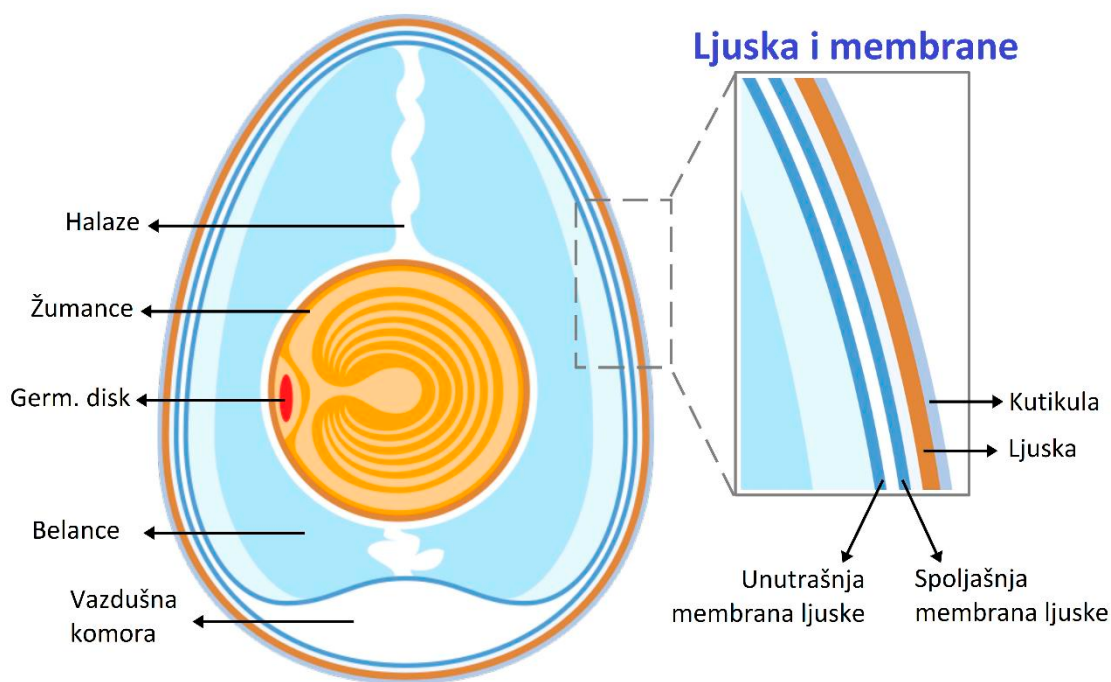
Jaje se sastoji od žumanca u sredini, okruženog belancem, a oba su zatvorena unutar ljuske. Međutim, detaljna struktura jajeta je složenija nego što se na prvi pogled čini (Slika 16). Žumance se sastoji od masti, vitamina i minerala, kao i oko polovine ukupnog sadržaja proteina u jajetu. Providna barijera zvana vitelinska membrana okružuje žumance i sprečava prelazak sadržaja žumanca u belance. Unutar žumanca nalazi se germinativni disk. Ovo je mesto razvoja embriona. Boja žumanca varira i na nju utiče, pre svega, ishrana koka nosilja. Boja žumanca nije u vezi sa nutritivnom vrednošću jajeta.



Slika 16. Građa jajeta (www.chickens.allotment-garden.org)

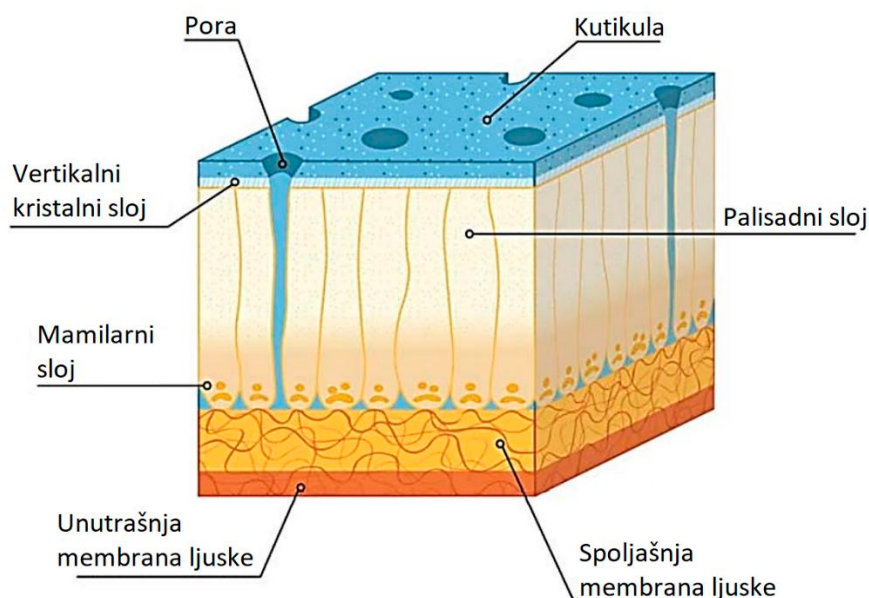
Belance je bogato proteinima i vitaminima i sadrži supstance koje štite jaje od mikroorganizama koji mogu proći kroz ljusku. U sveže položenom, kvalitetnom jajetu, jasno su vidljivi naizmenični slojevi debelog i tankog belanca. Najdublji sloj debelog belanca (halaziferni sloj) je proširen na dve tačke, formirajući bele, vlaknaste halaze koje su usidrene u spoljašnjem debelom belancu. Struktura belanca je takva da pruža potporu i zaštitu žumancetu, držeći ga centralno unutar jajeta.

Ljuska jajeta se sastoji od unutrašnje i spoljašnje membrane - prave ljuske i kutikule. Ukupna debljina je oko jedne trećine milimetra (Slika 17). Najveći deo ljuske je izgrađen od kalcijum karbonata (preko 90%), a sadrži i male količine proteina i drugih minerala. Nekoliko hiljada sićušnih pora prožima ljusku, od kojih je većina obično na širem kraju jajeta. Pore omogućavaju da se gasovi kreću između sadržaja jajeta i okoline. Sa unutrašnje strane ljuske se nalaze dve membrane (spoljašnja i unutrašnja) i imaju gustu strukturu koja sprečava ulazak mikroorganizama u jaje. Jajne opne izgrađene su od mreže organskih vlakana slabo impregnirane mineralnim materijama. Spoljašnja opna, koja je tesno vezana sa ljuskom, oko 3 puta je deblja od unutrašnje opne koja omotava belance. Kod Leghorn kokoši debljina spoljašnje opne iznosi približno 0,05 mm, a unutrašnje 0,015 mm. Ove membrane takođe obezbeđuju čvrstu osnovu na kojoj se gradi prava ljuska.



Slika 17. Ljuska i membrane ljuske jajeta (en.wikipedia.org/wiki/Eggshell)

Prava ljuska je izgrađena od kalcijum karbonata i sastoji se od sunderastog (palisadnog) sloja i unutrašnjeg mamilarnog sloja (Slika 18). Kada je u potpunosti formirana, školjka je kruta, ali krhka. Čvrstoća ljuske nije određena samo debljinom ljuske već i oblikom i strukturom. Najudaljeniji deo ljuske je kutikula koja jajetu daje karakterističan sjaj. Kutikula predstavlja vrlo tanak sloj organske materije, a kada je jaje položeno, kutikula je još uvek vlažna, iako će se osušiti za minut ili dva. Kutikula normalno prekriva pore i to pruža dodatnu mikrobiološku zaštitu, posebno kada je jaje sveže.



Slika 18. Građa ljuske jajeta (Hincke i sar., 2012)

Spoljašnji i unutrašnji kvalitet jaja je pod uticajem velikog broja faktora. Razlog ovome je što kvalitet jaja podrazumeva veoma različite i važne aspekte kao što bezbednost,

nutritivna i organoleptička svojstva, tehnološke osobine kuvanja, od kojih svi moraju biti kontrolisani od njive do trpeze.

Za uzgajivače živine, farmere, prehrambenu industriju i marketinške kompanije, glavni prioriteti su da se obezbedi bezbedan proizvod koji je prihvaćen od strane potrošača. Stoga, uzgajivači žele da njihove nosilje obezbede konzistentan proizvod sa dobro utvrđenim karakteristikama koje se odnose na izgled proizvoda, integritet ljuske (kako bi se izbegla kontaminacija jajeta), odgovarajuća masa, specifična boja ljuske i žumanceta, kao i dobra svojstva prerade koja omogućavaju „svežinu jajeta“. Duž celog lanca, cilj je da se izbegne bilo kakav defekt u spoljašnjem ili unutrašnjem kvalitetu proizvoda i bilo kakvo odstupanje od očekivanog ukusa proizvoda.

Za neka veoma mala tržišta, hranljiva vrednost jajeta će biti važna kada se obezbedi dodatna vrednosti njihovim obogaćivanjem određenim hranljivim sastojcima kao što su masne kiseline, vitamini ili mikroelementi („dizajnirana jaja“).

Prvi preduslov za potrošače će biti da: ništa loše ne sme da im se desi kada konzumiraju jaja (zdravstvena bezbednost). Epidemije bolesti ili kontaminacije mogu da izazovu velike padove u potrošnji sa ozbiljnim ekonomskim posledicama. Shodno tome, brojna pravila i propisi su doneti u većini zemalja kako bi se osigurala mikrobiološka ispravnost jaja i odsustvo hemijskih ostataka u jajima.

Pored toga, proizvođači se suočavaju sa ograničenjima u vezi sa dobrobiti životinja. Ovo je dovelo do promena u sistemu proizvodnje jaja, zabranom konvencionalnih kaveznih sistema u Evropi i posledičnim prelaskom na alternativne sisteme.

Širom sveta, potrošnja jaja se prebacuje na proizvodnju tečnih jaja. Ova tendencija ka važnosti tehnološkog kvaliteta jaja, takođe nudi nove mogućnosti i izazove za kontrolu higijenskog kvaliteta jaja.

Kao što je već pomenuto, kriterijumi za spoljnu i unutrašnju procenu kvaliteta jaja uključuju veoma različite i važne aspekte kao što su zdravstvena bezbednost, hranljiva vrednost, organoleptičke i tehnološke karakteristike jaja. Ove osobine su pod uticajem velikog broja faktora kao što su fiziologija, genetika, ishrana i menadžment.

Genetika je efikasan instrument za poboljšanje kvaliteta, ali istorijski gledano, proizvodnja jaja je bila prioritet broj jedan kada su u pitanju poboljšanja. Selekcija na kvalitet jaja se uglavnom koristila kako bi se izbegla bilo kakva negativna promena u pogledu kvaliteta ljuske ili unutrašnjih defekata. Međutim, potreba za unutrašnjim kvalitetom je porasla poslednjih 20 godina što je podstaklo i razvoj molekularne genetike koja je omogućila selekciju nosilja koja daju jaja vrhunskog kvaliteta.

Ishrana je važna za kontrolu kvaliteta ljuske i putem nje se jaja mogu uspešno obogatiti nekim manjim komponentama od interesa za ljudsku ishranu. Sistem proizvodnje utiče na higijenski kvalitet jaja, što se posebno odnosi na alternativne sisteme uzgoja. Zdravstvena bezbednost jaja može imati veoma veliki uticaj na potrošnju jaja i veoma zavisi od zakonske regulative. Prostor za poboljšanje predstavlja i razvoj neinvazivnih i brzih fizičkih tehnika za merenje kvaliteta ljuske i unutrašnjeg kvaliteta jaja u postrojenjima za pakovanje. Kvalitet jaja se stalno poboljšava kao rezultat stalnih zahteva potrošača.

Spoljašnji kvalitet jaja

Spoljašnji kvalitet jaja se pre svega odnosi na kvalitet ljuske jaja. Boja ljuske potiče od pigmenta koji se nalaze u spoljašnjem sloju ljuske. Bolja ljuske je pre svega genetski determinisana, mada često postoje i varijacije među jedinkama istog jata. Ljuske jaja za

konzum su najčešće bele ili braon boje. Rase koje imaju bele ušne školjke uglavnom nose bela, dok rase sa crvenim ušnim školjkama, nose jaja braon boje.

Pošto su nosilje jaja braon boje malo krupnije i zahtevaju više hrane, braon jaja su obično skuplja od belih. Iako jaja braon boje koja su tamnija često imaju deblje ljuske, boja ljuske nema nikakve veze sa kvalitetom jaja, ukusom, hranljivom vrednosti, ili karakteristikama kuvanja.

Izgled jajeta je veoma važan za potrošača. Ljuska jaja se ocenjuju na osnovu čistoće, oblika, texture, i stabilnosti.

Čistoća. Većina jaja je čista nakon izleganja, ali ona se mogu kontaminirati izmetom ili ostalim stranim materijama. U Sjedinjenim Američkim Državama, jaje koje na sebi sadrži izmet ili druge materije, ne može biti u prometu. Klasifikuje se kao prljavo i ne može se koristiti za ishranu ljudi.

Oblik. „Normalno" kokošije jaje je eliptičnog oblika. U SAD, jaja koja su neobičnog oblika, kao što su duga i uska ili okrugla ne mogu biti kategorisana u klasu konzumnih jaja. Okrugla jaja i neobično dugačka jaja imaju loš izgled i ne uklapaju se dobro u kartonske kutije, tako da postoji velika verovatnoća da će biti slomljena tokom transporta.

Tekstura. Ljuska jajeta koja je glatka je prihvatljivija u odnosu na jaja sa grubom ljuskom jer su manje lomljiva i imaju bolji izgled. U SAD, jaja sa izrazito grubim i neujednačenim ljuskama se ne stavljaju u promet kao konzumna. Neka jaja imaju izbočine na ljusci. Izbočine (naslage kalcijuma) su distorzije ljuske. Infekcija nije nužno odgovorna za pojavu izbočina jer se izbočine javljaju i u zdravim jatima. Defekt može biti delimično i nasledan.

Unutrašnji kvalitet jaja

Unutrašnji kvalitet jaja zavisi od veličine vazdušne ćelije, kvaliteta belanceta, kvaliteta žumanceta, kao i prisustva krvavih ili mesnatih mrlja.

Kvalitet belanceta. Belance ima veliki uticaj na ukupni unutrašnji kvalitet jaja. Smanjenje belanceta je znak gubitka kvaliteta. Kada se sveže jaje pažljivo razbije na glatku ravnu površinu, okruglo žumance je u centru okruženo debelim slojem belanceta. Kada se razbije bajato jaje, žumance je uglavnom pomereno u jednu stranu i okruženo tanjim slojem belanceta.

Belance povremeno sadrži krvave i/ili mesnate mrlje. Gledano sa hemijskog i nutritivnog aspekta, ova jaja su jestiva. Mrlje se mogu ukloniti, ako potrošač želi, ali jaje se može koristiti za ishranu. Manje od 1% od svih proizvedenih jaja ima krvave mrlje. Krvave mrlje su rezultat krvarenja malog krvnog suda u jajniku ili jajovodu. Mesnate mrlje su degenerisane krvave mrlje, slobodni delovi u jajniku ili jajovodu, ili ostaci kutikule. Pojava mrlja se češće može zapaziti kod braon jaja u odnosu na bela jaja. Temperatura okoline takođe ima uticaj na učestalost pojave krvavih mrlja.

Faktori koji utiču na kvalitet belanceta su brojni. Izuzimajući bolesti, jedan od najvažnijih faktora koji utiče na kvalitet belanceta jeste starost nosilje. Kako nosilje stare, kvalitet belanceta se smanjuje. Pokazalo se da namerni prekid u proizvodnji jaja (indukovano mitarenje) poboljšava kvalitet belanceta. Kvalitet belanceta nije pod velikim uticajem ishrane nosilja. Životna sredina i uslovi držanja, čak i toplotni stres, nemaju skoro nikakav direktan uticaj na kvalitet belanceta sveže snesenih jaja.

Vodenasta belanca se mogu javiti usled visokog nivoa vanadijuma u ishrani. Visok nivo vanadijuma može biti poreklom iz nekih izvora neorganskog fosfora.

U veoma retkim slučajevima, tvrdo kuvana bela jaja mogu da potamne do boje karamele usled visoke količine gvožđa u vodi za kuvanje ili usled hemijske reakcije koja uključuje komponente belanceta. Upotreba svežih jaja i njihovo brzo hlađenje nakon kuvanja može pomoći da se spreči ovakvo potamnjivanje.

Kvalitet žumanceta. Kvalitet žumanceta se odnosi na izgled, teksturu, čvrstinu i miris. Žumance sveže snesenog jajeta je okruglo i čvrsto. Kako žumance stari, upija vodu iz okolnih belančevina i povećava se u veličini. Ovo slabi vitelinsku membranu i daje žumancetu donekle zgnječeni izgled. Povremeno se može javiti i puknuće žumanceta. Jako hlađenje ili zamrzavanje jaja može dovesti do pojave gumenastih žumanaca. Slično stanje se može desiti kada se nosilje hrane sirovim pamučnim uljem. Pamuk i druge srodne biljke sadrže ciklopropanoidna jedinjenja, koja povećavaju procenat zasićenih masti u jajima.

Jaja sa dva žumanceta se javljaju kada se dva žumanca kreću zajedno kroz jajovod, zbog istovremenih ovulacija ili usled kašnjenja u prolazu žumanceta kroz jajovod. Takvi jaja su obično veća zbog prisustva dva žumanceta. Jaja sa tri ili više žumanaca su izuzetno retka.

Boja. Boja žumanceta zavisi od ishrane nosilje. Ako nosilja dobija dovoljno žuto-narandžastih biljnih pigmenata poznatih kao ksantofili, oni će biti deponovani u žumance. U svakom istraživanju potrošača po pitanju kvaliteta jaja, boja žumanceta zauzima visoko mesto, ali ovaj rang varira od zemlje do zemlje. Neki potrošači preferiraju belu boju žumanceta, dok drugi više vole svetlo žute boje žumanceta. Ostali potrošači preferiraju tamno narandžastu boju žumanceta. U većini slučajeva menja se ishrana kako bi se proizvela jaja za određeno tržište.

Pigmenti žumanceta su relativno stabilni i ne gube se pri kuvanju. Međutim, ponekad postoji zelenkasti prsten oko tvrdo kuvanih žumanaca. To je rezultat površinske reakcije na žumancetu između sumpornih jedinjenja i jedinjenja gvožđa u jajetu. Ovo može nastati kada su jaja prekuvana ili kada postoji velika količina gvožđa u vodi za kuvanje.

Uticaj genetike na kvalitet jaja

Tokom poslednjih 40 godina su učinjeni ogromni napor da se poboljša proizvodnja jaja i kvalitet jaja, ali su prioriteti farmi za uzgoj evoluirali tokom ovog perioda. U početku, bolja iskoristivost hrane i veći broj jaja je bio glavni cilj i tek od nedavno je osobina kvaliteta jaja dobila nešto više pažnje.

Promene u prioritetima u selekciji se mogu ilustrovati jednim primerom koji opisuje promenu osobina performansi i kvaliteta evropske braon komercijalne linije. U periodu 1981-1991, poboljšanje se uglavnom svodilo na proizvodnju jaja i konverziju hrane. Tokom narednih 10 godina (1991-2001), efektivnost hranjenja je unapređena blagim spuštanjem mase nosilja, ali uglavnom sa povećanjem mase jaja. Broj jaja je povećan zbog ranije seksualne zrelosti i povećanjem pika proizvodnje jaja. Nosilje su zbog ovoga proizvodile 26 jaja više uz poboljšani vek trajanja. Poboljšanje mase jaja (180 g po nosilji godišnje) i smanjenje unosa hrane (24 g/kg jaja) je dobijeno bez promene srednje mase jaja. Selekcija je fokusirana na ograničavanje povećanja mase jaja sa godinama, pokušavajući da se ranije dobije teže jaje. Kvalitet ljuske je ostao presudan, a pored toga se kod braon nosilja, intenzitet i homogenost boje ljuske takođe kontrolisala.

Od 1995. godine, zbog povećanja tražnje za tečnim jajima, ali i kao posledica zahteva za sertifikovanim proizvodnim sistemima, uključujući i visoki kvalitet proizvoda, selekcija je vršena na tehnološka svojstva belanceta (uglavnom Haugh-ova jedinica). Od 2000. godine, zahtevi potrošača u Evropi za ekološkim standardima i standardima dobrobiti su pojačani novim propisima. Ovo je favorizovalo segmentaciju tržišta jaja sa povećanjem broja jaja koja potiču iz ne-kaveznih sistema, (Francuska 26%, Velika Britanija 37%, Nemačka 57%,

Švedska 63% i Holandija 84%). U ovim sistemima je izvršena selekcija održivosti što je rezultiralo smanjenjem smrtnosti (4-5% u 2007. godini u poređenju sa 8% u 1990. godini, u Francuskoj).

Dobro je poznato da se kvalitet jaja (ljuska jajeta, Haugh-ova jedinica) smanjuje sa starošću nosilja. Zatim, kako bi se dodatno poboljšala masa jajeta, bilo je neophodno smanjiti broj lošijih jaja i stoga izvršiti selekciju nosilja koje imaju bolji kvalitet jaja na kraju perioda nosivosti. Kvalitet ljuske jajeta, boja ljuske jajeta kod braon jaja i izgled ljuske kao što su hrpavost ljuske i prisustvo tamno-braon tačaka (koje u nekim zemljama, mogu dovesti potrošače u zabunu da su fecesi muva) su sve više uzimani u obzir.

Među unutrašnjim parametrima kvaliteta jaja, tehnološka svojstva belanca (Haugh jedinica) su smatrana prioritetnim, posebno za sertifikovane alternativne proizvodne sisteme. Heritabilnost visine belanceta se procenjuje na 0,23 pri čemu su u nasumičnim ispitivanjima kvaliteta jaja izvedenim u Nemačkoj (1997-1999), dobijene povećane vrednosti Haugh-ove jedinice kod belih i braon jaja. Selekcija je od 2001. godine dovela do poboljšanja od 0,8 Haugh-ovih jedinica.

Osim toga, važan unutrašnji parametar kvaliteta je i procenat žumanca. Selekcija ka povećanju broja jaja i efektivnosti hranjenja možda ima negativan uticaj na odnos žumance/belance i potencijalno modifikuje sadržaj suve materije jajeta, jer je povećanje sadržaja vode verovatno metabolički „jeftinije“. Međutim, ovo se izgleda nije desilo. Korišćenjem tradicionalne kvantitativne genetike, napredak se može jasno videti u performansama nosilja i u nekim osobinama kvaliteta jaja. U takvim tehnikama uzgoja, svojstvo je smatrano crnom kutijom, ali u stvarnosti je pod kontrolom brojnih gena. Poznavanje genoma kokoši se razvilo veoma brzo. Potpuna sekvenca genoma kokoši je postala dostupna od 2004. godine (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004). Ogromni naponi su učinjeni na razvoju genetičkih markera za lokalizaciju izvora statistički značajne genetičke varijabilnosti u specifičnim regionima hromozoma (Abasht i sar., 2006).

Za kvalitet jaja, skeniranja genoma koja imaju za cilj da otkriju lokuse su zasnovana na srednjoj gustini mikrosatelitskih mapa. Baza podataka QTL-ova (quantitative trait locus) (Abasht i sar., 2006) daje 113 QTL-ova za kvalitet ljuske. Oni su uočeni na hromozomima 1, 2, 4, 5, 7 i Z, gde su hromozomi 1 i 2 za svojstva belanceta, a hromozom 8 za mrlje na ljusci. Većina ovih lokusa kvantitativnih osobina su za masu jaja i kvalitet ljuske, dok su oni koji se odnose na unutrašnji kvalitet (Haugh-ove jedinice ili visina belanceta) sporni. Pojedini istraživači su dokazali da je miris na ribu u braon jajima povezan sa QTL u hromozomu, a još preciznije na mutacije jednog jedinog gena - kokošijeg FMO3 gena, koji se nalazi u QTL regionu i povezan je sa ovom osobinom. Ovo zapažanje su iskoristili uzgajivači kako bi eliminisali miris na ribu kod svojih linija koje nose braon jaja, koji se može javiti kada su nosilje hranjene uljanom repicom.

Pojava SNP-ova (single nucleotide polymorphisms) nedavno je istražena za potencijalne gene koji su uključeni u izgradnju fizičke barijere, ljuske jajeta i onih koji kodiraju antimikrobnu aktivnost belanceta. Značajne veze su pronađene između SNP-ova u ovalbuminu, ovokleidinu 116 i ovokaliksenu 32, kao i osobine ljuske kao što su statička kompresija i debljina mamilarnog sloja. Među potencijalnim genima koji su uključeni u prirodne odbrambene mehanizme jajeta protiv penetracije ili rasta mikroba, uočen je iznenađujuće veliki broj SNP-ova koji menjaju aminokiselinsku sekvencu. Ostaje da se vidi da li su geni koji kodiraju antimikrobne proteine u belancetu (proteaza, antiproteaza, defenzini) povezani sa rastom salmonele.

Uticaj ishrane i sistema držanja nosilja

Sistemi držanja koka nosilja su evoluirali poslednjih 10 godina u Evropi zbog zabrane konvencionalnih kavezni sistema i primene alternativnih sistema (EC/74/1999), ali i zbog povećane potražnje za jajima iz alternativnih sistema proizvodnje. Uvođenje novog sistema držanja može potencijalno uvesti rizik u odnosu na već dobro uspostavljeni konvencionalni kavezni sistem, posebno kada je u pitanju higijenska ispravnost jaja. Međutim, efekat sistema držanja nosilja na senzorne, nutritivne, ili higijenske osobine jaja je i dalje kontroverzan (De Reu i sar., 2008). Menadžment ishrane je sa druge strane bio relativno stabilan u poslednjih 15 godina, a glavne izmene su bile zabrana životinjskih proteina i aditiva.

Sastav jajeta, hranljiva vrednost i unutrašnje osobine. Što se tiče sadržaja najvažnijih materija, jaja pokazuju veoma konzistentan sastav kada su u pitanju sadržaji ukupnih proteina, esencijalnih aminokiselina, ukupnih lipida, fosfolipida, fosfora, gvožđa, itd. Samo starost nosilja i genetsko poreklo mogu, ali veoma malo, izmeniti nivo ovih komponenti (Nys, 2001). Kako nosilje stare, ukupna masa jaja se povećava, a sa tim povećanjem istovremeno dolazi i do povećanja mase žumanceta. Na taj način i genetsko poreklo nosilja može da, na dugoročnoj osnovi, malo izmeni odnos žumance/belance, mada kada se uporede sadašnje komercijalne linije, varijacije su male.

Nasuprot tome, pre 40 godina je ustanovljeno da sastav obroka nosilja može imati veliki uticaj na profil masnih kiselina i koncentraciju nekih vitamina i mikroelemenata. Moguće je desetostruko povećati sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) koje pripadaju $\omega 3$ masnim kiselinama koristeći laneno ulje ili žitarice i morske proizvode, dok se sadržaj $\omega 6$ masnih kiselina povećava upotrebom sojinog ili suncokretovog ulja. Sa takvom manipulacijom, odnos $\omega 3/\omega 6$ može da varira od >30 do <2 . Takođe, moguće je ugraditi konjugovanu linolnu kiselinu (CLA) u žumance, ali bi to imalo štetan uticaj, kako na stopu nosivosti, tako i na teksturu žumanceta. Povećanje nivoa joda, selen, vitamina E, D i A u ishrani je dovelo do desetostrukog povećanja sadržaja žumanceta. Snažan antioksidantni efekat vitamina E je posebno koristan kada žumance sadrži visoku koncentraciju PUFA. Ishranom nosilja se u jajima može povećati i sadržaj vitamina rastvorljivih u vodi, kao što su B2, B12, B1, biotin, folna kiselina i pantotenska kiselina. Tako da inovacija nije u metodama modifikovanja sastava jaja ishranom, već u demonstraciji potencijala takvih modifikacija za ljudsku ishranu i dodatne vrednosti obogaćenih jaja.

Zaključeno je da nivo holesterola u žumancetu (210 mg/jajetu) nije snažno genetski određena (Elkin, 2006), i pored toga, moderne linije hibrida imaju tendenciju da proizvode jaja sa manjim sadržajem holesterola nego što je slučaj kod tradicionalnih rasa. U pogledu manipulacije ishranom, smanjenje sadržaja holesterola je vršeno pomoću ulja bogatih sa PUFA, vlaknima bogatih celulozom, kukuruzom u zrnu, sačmom od juke ili belog luka, itd., sa nekonzistentnim efektima ograničenim na minus 5-10% (Nys, 2001). Najveća promena je bila činjenica da novije epidemiološke studije daju dokaze za reviziju efekta holesterola po ljudsko zdravlje koje bi trebalo da rezultira u boljem prihvatanju jaja u ishrani. Pored toga, humani nutricionisti su možda postali svesni činjenice da u Evropi prosečan dnevni unos lipida mleka, mesa i jaja iznosi 28 g, 21 g i 2-3 g, redom, te je stoga doprinos iz jaja veoma mali.

Sistem držanja nosilja ne modifikuje sastav jaja direktno, mada je zabeležen indirektan odgovor kada je dostupna trava bogata sa PUFA i tokoferolima. Glavni efekti uzgoja koka nosilja u podnom sistemu u poređenju sa kavezni sistemima su smanjenje mase jaja (-0.5-1 g), smanjenje proporcija žumanceta (-0 do 5%) i nekonzistentne varijacije (manje od $\pm 3\%$) u sadržaju ukupnih lipida, proteina i suve materije (Nys, 2001). Kada se uporede

različiti sistemi proizvodnje nosilja u eksperimentalno kontrolisanim uslovima sa životinjama istog uzrasta, Rossi (2007) je takođe pokazala da ne postoje relevantne razlike u sastavu jaja. Sistem proizvodnje nosilja nije imao efekta na pojave krvavih i mesnih pega. Haugh-ova jedinica i pH ne utiču ni na senzornu ocenu tvrdo kuvanih jaja pri čemu je dokazano da nemaju nikakav uticaj na ukus jaja. Međutim, unutrašnja svojstva jaja (pre svega belance) kod nosilja koje su uzgajane u kaveznim sistemima, su bila lošijeg ukusa. Autori ipak navode da je farmski menadžment imao veći uticaj na kvalitet jaja nego sam sistem držanja.

Uticaj ishrane mineralima na kvalitet ljuske. Lomljivost ljuske je veliki problem i ima značajne ekonomske posledice u proizvodnji konzumnih jaja. Novi sistemi za sortiranje jaja koji snimaju vibracije ljuske jajeta pomoću elektronskih senzora se trenutno koriste u postrojenjima za pakovanje jaja. Ovaj veoma osetljiv sistem dovodi do povećanja učestalosti pronalazjenja loših jaja, čiji je broj minimalan u ranom periodu nosivosti, ali se povećava od 12% do više od 20% na kraju perioda nosivosti u zavisnosti od menadžmenta, ishrane i uslova životne sredine tokom uzgoja i samog perioda nosivosti.

Lomljivost ljuske zavisi od čvrstine ljuske, sistema držanja nosilja i načina transporta jaja. Mehanička snaga ljuske ne zavisi samo od količine materija koje je izgrađuju već i od drugih materija. Brojni primeri u literaturi pokazuju da nedostaci pojedinih hranljivih materija u ishrani nosilja mogu da utiču na taloženje kalcijum karbonata u materici, ali dokazi za bilo kakav uticaj na strukturu ljuske ili kristalografske osobine skoro da ni ne postoje. Ovo je do sada samo dokazano u slučaju nedostatka ključnih hranljivih materija u enzimskim sistemima poput Cu ili Mn (Mabe i sar., 2003). Nutritivne faktore bi trebalo optimizovati za prevenciju bilo kakvih dodatnih smanjenja kvaliteta ljuske nastalih usled starenja nosilja ili usled nepovoljnih uslova životne sredine.

Ishrana bogata kalcijumom je ključni element za kvalitet ljuske. Jedan od ključnih perioda je momenat prelaza nezrelog pileta do koke nosilje. Nivo kalcijuma treba povećati 2 nedelje pre početka proizvodnje jaja kako bi se olakšao razvoj medularne kosti i da bi se izbegla proizvodnja prvih jaja bez dodavanja kalcijuma u ishrani. Ovo bi rezultiralo negativnim bilansom kalcijuma i nižim kvalitetom ljuske, od kojeg se nosilje nikada ne bi oporavile. Nosilje danas sazrevaju ranije i iz tog razloga mogu da proizvedu prva jaja pre prebacivanja u objekte za nošenje jaja, što se obično poklapa sa prelaskom na ishranu obrocima za nosilje. Stoga se preporučuje da se počne sa ishranom višim nivoima kalcijuma (2,5% ili 3,5%) pre početka proizvodnje jaja (14-16 nedelja starosti).

Bilo kakav rizik od smanjenja potrošnje hrane zbog viška kalcijuma može se ublažiti poboljšanjem oblika hrane (veličina čestica, upotreba drobljene hrane). Nosilje dnevno izlučuju 2,2 g kalcijuma iz organizma, tako da ishrana zahteva najmanje 4 g kalcijuma. Nizak nivo kalcijuma u ishrani (<3%) povećava smrtnost nosilja i snižava proizvodnju jaja.

Selekcija na broj jaja je danas povezana sa proizvodnjom jaja koja se legu veoma rano ujutro, ili čak pre nego što se uključi svetlo. Prema tome, jutarnji unos hrane ne može da doprinese snabdevanju ljuske jajeta kalcijumom čije formiranje se završava 1,5 h pre leganja jaja. Uvođenje ponoćne ishrane može da poboljša sinhronizaciju unosa kalcijuma i formiranje ljuske jajeta, a time i bolji kvalitet ljuske jajeta.

Dnevna kinetika intestinalne apsorpcije kalcijuma je od velike važnosti zbog nedostatka povezanosti između taloženja kalcijuma za formiranje ljuske u materici tokom noći i uzimanja kalcijuma tokom dana. Specifični apetit za kalcijumom kod nosilja favorizuje skladištenje kalcijuma i hrane u voljki i na taj način delimično nadoknađuje ovaj nedostatak. Prisustvo grubih kalcijumovih čestica omogućava ekspresiju ovog fiziološkog kapaciteta i, pored toga pojačava sekreciju kiseline koja stimuliše dilataciju voljke. Grube

čestice kalcijuma naročito poboljšavaju kvalitet ljuske kada se daju nosiljama pri kraju perioda nosivosti.

Brojne studije su pokazale da se kvalitet ljuske smanjuje kada u ishrani nosilja postoje visoki nivoi raspoloživog fosfora, pri čemu će negativan efekat biti značajan ako je sadržaj nefitinskog fosfora veći od 0,35-0,4% (Nys, 2001).

Higijenski kvalitet. Tip proizvodnog sistema u načelu nema konzistentnog uticaja na sastav jaja. S druge strane, smatra se da je higijenski status kod podnih i otvorenih sistema niži, jer su jaja u kontaktu sa izmetom. De Reu i sar. (2008) su zaključili da je kontaminacija ljuske jajeta aerobnim bakterijama veća kod podnih sistema u odnosu na kavezne sisteme. Pored toga, kod podnih sistema, higijenski kvalitet jaja je niži kao posledica visokog procenta jaja koja se nalaze na podu. De Reu i sar. (2008) takođe zaključuju da su razlike u kontaminaciji ljuske između podnih i konvencionalnih kaveznih sistema veoma sporne, ali i da se distribucija kontaminacije povećava ako se jaja legu u drugim delovima kaveza. Ovi autori, su istakli i da u komercijalnim uslovima, razlike u higijenskom statusu umeju da budu manje u poređenju sa eksperimentalnim uslovima.

Važno je napomenuti da su konvencionalni kavezni sistemi optimizovaniji zbog njihove duže upotrebe, u poređenju sa novim sistemima držanja koji su još uvek u fazi razvoja. To objašnjava heterogenost literaturnih podataka o kontaminaciji jaja u alternativnim sistemima držanja. Obzirom da se proizvođači polako navikavaju na novi sistem, očekuje se da će se ovakve varijacije smanjiti.

Razlike između rezultata kod podnih i kaveznih sistema proizilaze iz ogromnog povećanja sadržaja prašine i bakterija u vazduhu kod podnog sistema u odnosu na kavezni (do 100 puta), obzirom da su aerobne bakterije u vazduhu i na ljusci u korelaciji (De Reu i sar., 2008). Pored toga, kontaminacija na ljusci jajeta potiče pretežno od gram-pozitivnih bakterija i razlikuje se od unutrašnje mikroflore jaja, koju uglavnom čine gram-negativne bakterije i manje su pod uticajem životne sredine (prašina, zemlja ili izmet). Odnos između kontaminacije površine jaja i glavnog bakterijskog ljudskog patogena (*Salmonella enteritidis*) nije jasno utvrđen.

Rukovanje jajima i prerada jaja

Uniformnost i visok kvalitet jaja je veoma važan za firme koje se bave pakovanjem i reklamiranjem jaja. Prosvetljavanje i vizuelna inspekcija u kombinaciji sa nekim kvantitativnim merama kvaliteta jaja (Haugh-ova jedinica, suva materija, prisustvo krvavih mrlja) se prilikom tradicionalnog sortiranja može sprovesti na veoma ograničenom broju jaja, sa rizikom od lažne procene zbog umora operatera.

Međutim, povećanjem ukupnog broja jaja kojima je potrebno rukovati, sortiranje više nije bilo moguće vršiti vizuelnim pregledom od strane ljudi. Zbog toga, primena automatskih neinvazivnih tehnika pomoću tehnologije senzora (akustičnih ili optičkih u bliskom infracrvenom i fluorescentnom spektru) ima veliki potencijal za veoma brzu detekciju pojedinih parametara kvaliteta jaja. Razvoj ovih tehnologija će omogućiti da se jaja sortiraju pri velikoj brzini ne samo na osnovu integriteta ljuske i težine jaja, što je i sad moguće, već i na osnovu nekih unutrašnjih parametara, kao što su pH i svežina (Haugh jedinica). To će omogućiti sortiranje jaja za posebne svrhe ili eliminisanje jaja nebezbednih za ljudsku ishranu.

Trenutno, u komercijalnim uslovima, detekcija naprslina ljuske jajeta se vrši koristeći vibracionu analizu ljuske jajeta (merenje razlike u oscilacionom odgovoru ljuske jajeta nakon udara u četiri tačke), što omogućava detekciju 90% naprslih jaja sa samo 1% lažno pozitivnih rezultata (De Ketelaere i sar., 2000). Ova tehnika je veoma osetljiva i može da

otkrije neke veoma male mikro-pukotine. Optičke tehnike su obećavajuće pri oceni kvaliteta albumina (pH, Haugh-ove jedinice i viskoznost) ili za detekciju krvavih mrlja, ali nisu još uvek prilagođene komercijalnim uslovima. Pored toga, kompjutersko video snimanje može efikasno detektovati i diferencirati različite mrlje, ali je ova tehnika i dalje suviše spora da bi bila integrisana u komercijalne sisteme. Trenutno se radi na optimizaciji tehnika za akustična, spektralna i vizuelna merenja od strane Evropskog konzorcijuma kako bi se izvršila njihova integracija u platformu za detekciju jaja rizičnih za ishranu ljudi, što može biti veoma efikasan način da se poboljša kvalitet jaja za potrošače.

Alternativni pristup za poboljšanje bezbednosti jaja jeste dekontaminacija celog jajeta. Pranje konzumnih jaja se vrši u mnogim zemljama, ali je još uvek zabranjeno u Evropi. Alternativne metode za dekontaminaciju površine jaja (mikrotalasi, gas-plazma sterilizacija, tehnologije pakovanja) su trenutno u postupku evaluacije u Evropskoj uniji.

VEŽBA 10. ISPITIVANJE KVALITETA JAJA

Metode za određivanje kvaliteta konzumnih jaja

Prosvetljavanje jaja

Mnogi nedostaci koji umanjuju kvalitet jaja mogu se uočiti pažljivim posmatranjem jajeta pri normalnom svetlu. Izlaganjem jaja snopu jakog svetla (prosvetljavanjem), mogu se otkriti i mnogi drugi nedostaci koji na prirodnom osvetljenju nisu bili vidljivi. Ova tehnika podrazumeva da jak snop svetla prolazi kroz ljusku jajeta i čini njegov sadržaj vidljivim. Iako ima svojih ograničenja, ona predstavlja najbolji način za uočavanje sitnih naprslina na ljusci, pokretljivosti žumanca i veličine vazdušne komore. Starenjem jajeta dolazi do odavanja vode i ugljen dioksida u spoljašnju sredinu kroz pore. Usled toga povećava se veličina vazdušne komore, a stepen tog povećanja direktno zavisi od temperature i relativne vlažnosti vazduha okruženja. Visina vazdušne komore koristi se kao pokazatelj kvaliteta i svežine jaja.

Određivanja kvaliteta jaja direktnim metodama

Pored prosvetljavanja, koriste se i druge metode kojima se preciznije može odrediti kvalitet jaja. One se izводе na reprezentativnom uzorku jaja i podrazumevaju postupke koji su opisani u daljem tekstu.

Mere spoljašnjeg kvaliteta jaja

Masa jaja. Masu jaja možemo utvrditi njegovim merenjem na vagi. Prema izmerenoj masi, jaja se klasiraju u određene klase koje su u svakoj zemlji definisane odgovarajućim pravilnikom. Postoje određene razlike u klasiranju jaja po masi između SAD, EU i Srbije.

Boja ljuske. Boja ljuske može se izmeriti pomoću refraktometra ili oceniti subjektivnom procenom. Boja ljuske jaja ocenjuje se poenima od 1 (svetla) do 5 (tamna). Važno je naglasiti da boja ljuske nije indikator njenog kvaliteta i čvrstoće, ali uprkos tome često igra veoma važnu ulogu u proceni kvaliteta jaja od strane potrošača.

Oblik jaja. Oblik jaja je osobina koja se izražava preko indeksa oblika. On se izračunava tako što se širina jajeta podeli njegovom dužinom i pomnoži sa 100. Jaje normalnog oblika ima indeks oblika oko 73, a vrednosti se kreću u rasponu od 61 do 86.

Čvrstoća ljuske. Čvrstoća ljuske se može odrediti na dva načina: određivanjem njene deformacije ili utvrđivanjem sile loma.

Merenje deformacije – prednosti ove metode su u tome što se jaje ne razbija, a dobijene vrednosti su relativno pouzdane. Za ovu svrhu koristi se aparat koji u sebi sadrži teg od 500 g kojim se opteretiti tačka na ekvatoru jajeta. Aparat registruje koliku deformaciju na ljusci je izazvalo to opterećenje, a dobijena vrednost se izražava u μm .

Sila loma – ovaj metod podrazumeva razbijanje jaja, jer ima za cilj da utvrdi kolika je sila potrebna da bi ljuska pukla. Uobičajene vrednosti se kreću između 4 i 5 kg. Ova metoda je pouzdanija od merenja deformacije ljuske ali se primenjuje samo onda kada nam ispitivana jaja nisu više potrebna. Veličina sile loma zavisi od debljine ljuske, veličine jajeta, oblika jajeta, veličine pora, debljine membrane, kao i sadržaja proteina, kalcijuma, mangana i magnezijuma u ljusci i njenim membranama.

Debljina ljuske. Za merenje ove osobine koriste se dve metode.

Gustina – za ovu metodu nije potrebno razbiti jaja. Za njenu primenu potrebno je više slanih rastvora različite gustine -1,07; 1,08; 1,09; 1,10 g/cm^3 . Jaja se potapaju u svaki rastvor i smatra se da jaja imaju specifičnu težinu istu kao i rastvor u kome su počela da

plutaju. Ovaj test se koristi na svežim jajima jer većina snesenih jaja ima specifičnu težinu od 1,08-1,09 g/cm³.

Drugi način je direktno merenje debljine ljuske – podrazumeva da se jaje razbije i da se odvoji jedan deo sa ekvatora jajeta bez membrane. Debljina ljuske se meri mikrometrom. Normalne vrednosti kreću se u rasponu od 0,32-0,35 mm.

Masa ljuske. Masa ljuske se meri tako što se jaje razbije, odvoji njegov sadržaj od ljuske, a zatim se ljuska osuši i izmeri njena masa. Vrednosti mogu biti izražene u gramima (apsolutna vrednost) ili u procentima od ukupne mase jaja. Normalne vrednosti variraju u rasponu od 8-12% od ukupne mase jaja.

Mane spoljašnjeg kvaliteta jaja

Jaja nepravilnog oblika. Ukoliko je kvalitet belanca veoma loš, ne postoji dovoljno čvrsta podloga na kojoj bi se u toku formiranja jajeta izgradila ljuska. Rezultat toga mogu biti različite nepravilnosti u obliku, koje u nekim slučajevima mogu ukazivati na pojedina virusna oboljenja. Svi faktori koji izazivaju uznemiravanje kokoši 10-14 sati pre ovipozicije, takođe mogu prouzrokovati pojavu jaja nepravilnog oblika.

Naslage kalcijuma na ljusci. Dodatne količine kalcijuma mogu biti deponovane na ljusci i one na njoj prouzrokuju tačkaste tvorevine i neravnine, a u nekim slučajevima i ružičasto obojenje na ljusci. Do ove pojave dolazi usled dužeg zadržavanja jajeta u uterusu. Na ovu pojavu posebno su osetljiva mlada jata koja su u pronosjenju, tako da svaki stres ili uznemiravanje jata može prouzrokovati duže zadržavanje jajeta u uterusu.

Mekana ljuska. Meka ljuska i slaba kalcifikacija ljuske pojavljuju se češće kod starijih jata koja su na završetku proizvodnog ciklusa. Neadekvatna ishrana (posebno nedovoljna količina Ca u hrani) može takođe dovesti do povećanog loma ljuske. Još jedan faktor koji izaziva lošiji kvalitet ljuske jaja je visoka temperatura spoljašnje sredine, jer u tom slučaju se smanjuje konzumacija hrane.

Napukla ili polomljena ljuska. Ljuska može da pukne relativno lako nakon ovipozicije i povećan procenat loma ljuske zapravo i predstavlja jedan od najvećih gubitaka pri proizvodnji konzumnih jaja. Do pucanja može doći usled lošeg kvaliteta ljuske ili usled lošeg postupanja sa jajima prilikom sakupljanja, klasiranja ili transporta.

Prljava ljuska. Nakon ovipozicije, jaje može doći u kontakt sa mnogim kontaminantima, kao što je izmet, prostirka (kod podnog sistema), prašina i druge nečistoće. Takođe, jaja mogu biti zaprljana krvlju ili sadržinom drugog razbijenog jajeta. Sve ovo dovodi do toga da jaja ne mogu biti klasirana kao jaja prve klase, što se odražava i na finansijski uspeh proizvodnje.

Mere unutrašnjeg kvaliteta jaja

pH vrednost. Kod svežih jaja, dobrog kvaliteta, pH vrednost je oko 7,5. Kako jaje stari, pH se povećava usled gubitka vode i CO₂, jer to utiče na smanjenu sposobnost puferuskog sistema jajeta da se odupre promeni pH. Pri višim temperaturama stepen gubitka vode i CO₂ je veći, tako da je i povećanje pH vrednosti brže.

Indeks žumanca. Ovaj parametar predstavlja odnos visine žumanca i širine žumanca. Izračunava se tako što se visina žumanca koja se meri tripodnim mikrometrom podeli sa njegovom širinom koja se meri šestarom ili kljunastim merilom (šublerom) i ta vrednost se pomnoži sa 100. Normalne vrednosti kreću se od 32-58%. Starenjem jajeta indeks žumanca se smanjuje.

Visina belanca. Kvalitet belanca može se odrediti merenjem njegove visine pomoću tripodnog mikrometra i izražava se u milimetrima. Što je jaje svežije, visina belanca je veća. Ovaj parametar koristi se za izračunavanje Haugh-ova jedinica, prema sledećoj formuli:

$$HU = 100 \times \log H + 7,57 - 1,7 \times M^{0,37}$$

HU – Haugh-ova jedinica

H – visina gustog belanca (μm)

M – masa jaja (g)

Smatra se da je kvalitet jaja dobar ukoliko je vrednost Hogovih jedinica iznad 70.

Boja žumanca. Boja žumanca može se odrediti pomoću tzv. Rošove lepeze (Roche Yolk Colour Fan) tako što se vizuelno uporedi boja ispitivanog žumanca sa paletom boja koje se nalaze na lepezi. Kad se odredi najsličnija boja, očita se njena vrednost u poenima (raspon na lepezi je od 1-15).

Mane unutrašnjeg kvaliteta jaja

Jaja sa dva žumanca. Ova pojava nastaje kada dođe do dve uzastopne ovulacije u razmaku od maksimalno tri sata. Pojava ovakvih jaja češća je u početku proizvodnog ciklusa, kada ritam nošenja nije u potpunost stabilizovan. Neke provenijencije lakih nosilja pokazuju veću sklonost ka nošenju jaja sa dva žumanca u odnosu na ostale, što znači da na ovu pojavu u izvesnoj meri utiče i genetski faktor.

Krvave mrlje. Krvave mrlje u jajetu nastaju tako što prilikom ovulacije deo krvnog suda zajedno sa žumancetom dospeva u jajovod. Uzroci mogu biti različiti: genetski faktori, hrana, starost nosilja, uznemiravanje nosilja – posebno u vreme ovulacije. Učestalost pojave krvavih mrlja u jajima bele boje ljuske je oko 1,5-5,5%, dok je kod jaja braon boje ljuske nešto veća.

Mesne mrlje. Mesne mrlje u jajetu obično predstavljaju delove tkiva, kao što su delovi unutrašnjeg zida jajovoda, ali mogu poticati i od krvavih mrlja koje su izgubile boju. Njihova pojava zavisi od rase, hibrida, starosti nosilja i zdravstvenog stanja. Mesne mrlje u jajima učestalije se pojavljuju kod jaja braon boje ljuske, nego kod belih jaja.

Vodeno belance. Unutrašnji kvalitet jaja, posebno kvalitet belanca, opada sa starošću nosilja. Kod nekih nosilja koje su na samom kraju proizvodnog ciklusa, belance je vodnjikavo čak i kod tek snesenih jaja. Takođe, neke infektivne bolesti, kao što je infektivni bronhitis, zatim visoka ambijentalna temperatura, pojedina hraniva (pšenica), lekovi na bazi amonijuma i sulfata, mogu uticati na pojavu vodnjikavog belanca.

Pegavo žumance. Nekada se na površini žumanca pojavljuju male svetlije pege koje nastaju usled prodiranja vode u žumance kroz vitelinsku membranu. Ova pojava je češća u letnjim mesecima, a uzrok mogu biti neki lekovi (nicarbazin), pare amonijuma, piperazin ili gosipol (alkaloid poreklom iz pamukove sačme).

HROMATOGRAFIJA

Pod pojmom hromatografija se podrazumeva veliki broj fizičko-hemijskih metoda koje služe za razdvajanje i izolovanje komponenata neke smeše. Razdvajanje komponenata smeše se odvija između dve faze, od kojih je jedna nepokretna (stacionarna faza), a druga pokretna (mobilna faza). Bitne osobine ovih faza su da se ne mešaju i da su različite pokretljivosti.

Nepokretna (stacionarna) faza po svom agregatnom stanju može biti:

- čvrsta supstanca (porozno, ili granulirano);
- tečna supstanca (ili sloj tečnosti adsorbovan na čvrstom nosaču);
- jonoizmenjivač.

Pokretna faza po svom agregatnom stanju može biti:

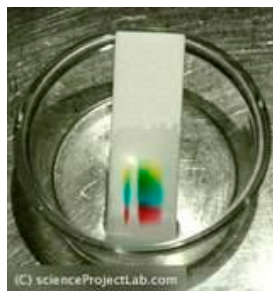
- tečna supstanca;
- gasovita supstanca.

Na osnovu mehanizma razdvajanja, hromatografske metode se dele na:

- adsorpcija - adsorpciona hromatografija;
- različita rastvorljivost - podeona (particiona) hromatografija;
- jonska izmena - hromatografija na izmenjivačima jona;
- na osnovu razlike u veličini molekula - gel hromatografija;
- reakcija antitelo antigen - afinitetna (biospecifična) hromatografija.

Klasifikacija hromatografskih metoda na osnovu tehnike izvođenja obuhvata:

- planarnu hromatografiju (Slika 19 a) i
- hromatografiju u koloni (Slika 19 b).



Slika 19. Planarna hromatografija (a) i hromatografija u koloni (b)

Raspodela komponenata između pokretne (**mobile phase, M**) i nepokretne faze (**stationary phase, S**) se zasniva na Nernstovom zakonu raspodele koji kaže da se supstance raspodeljuju između stacionarne (S) i mobilne faze (M) tako da je odnos koncentracija tih supstanci pri nekoj temperaturi stalan. Koeficijent raspodele (K) predstavlja odnos koncentracija supstanci u mobilnoj i stacionarnoj fazi na određenoj temperaturi. Koeficijent raspodele zavisi od prirode komponente, prirode jedne i druge faze (afiniteta hromatografija) i temperature (Slika 20).

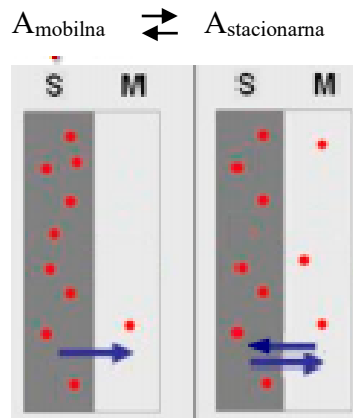
$$K = C_s / C_m$$

Gde su:

K – koeficijent raspodele, particioni koeficijent

C_s – ravnotežna koncentracija komponente u stacionarnoj fazi

C_m – ravnotežna koncentracija komponente u mobilnoj fazi



Slika 20. Raspodela komponenata između mobilne i stacionarne faze

Adsorpciona hromatografija

Stacionarna (nepokretna) faza se sastoji od čestica hemijski inertne čvrste faze. Kao čvrsta faza obično se koriste celuloza, magnezijum oksid, diatomеjska zemlja (celit), silika gel, aktivni ugalj. Adsorpcione osobine ovih supstanci se međusobno razlikuju i zavise od njihove hemijske prirode i od hemijske prirode jedinjenja u smeši koja se razdvaja (Tabela 8). Za uspešno hromatografsko razdvajanje potrebno je da čestice adsorbenta budu ujednačeno upakovane, a samim tim i da veličina međuprostora (pora) bude što ujednačenija.

Tabela 8. Adsorbenti koji se koriste u hromatografiji

Adsorbent	Karakteristika
celuloza	raste moć vezivanja za adsorbent ↓
skrob	
šećeri	
Mg-silikat	
Ca-karbonat	
Ca-fosfat	
Ca-sulfat	
Ca-oksidi	
silika gel	
florisil	
aktivni ugalj	
Al-oksidi	

Pri izboru adsorbenta za hromatografiju treba voditi računa da:

- adsorbent ne sme ireverzibilno da reaguje sa jedinjenjima koja se razdvajaju, niti sa rastvaračima;
- adsorbent treba da ima veliku selektivnost u odnosu na jedinjenja koja se razdvajaju, tako da razlike u brzini migracije budu velike;
- adsorbent mora imati ujednačenu veličinu čestica. Čestice treba da budu dovoljno male da bi omogućile dobro razdvajanje, ali i dovoljno krupne da omoguće proticanje mobilne faze (rastvarača);

- adsorbent ne sme da se rastvara u rastvaračima koji se koriste za hromatografsko razdvajanje;
- adsorbent treba da je netoksičan;
- da ima relativno nisku cenu.

Kao mobilna faza se koriste organski rastvarači koji se međusobno razlikuju po svojoj polarnosti. Niz rastvarača poredan po porastu svoje polarnosti naziva se **eluotropni niz** (Tabela 9).

Tabela 9. Eluotropni niz rastvarača

Rastvarač	Karakteristika
alkani (n-heksan)	najmanje polarni
aciklični ugljovodonici (cikloheksan)	
ugljen tetrahlorid	
aromatični ugljovodonici (benzen)	
metilen hlorid	
hloroform	
etil Etar	
etil Acetat	
aceton	
propanol	
etanol	
metanol	
acetonitril	
voda	
sirćetna kiselina	jako polarni

Hromatografija na tankom sloju - TLC

Kod ovog tipa hromatografije nepokretna faza je u obliku tankog sloja (debljine 0,01 - 0,1 cm) uniformno nanet na ploču od stakla, aluminijuma ili plastike. Standardne dimenzije ploča su 20 x 20 cm. Smeša koju treba razdvojiti se prethodno rastvara u odgovarajućem, lako isparljivom rastvaraču i nanosi na ploču pomoću kapilare ili mikrošpica na rastojanju od 1,5 - 2,0 cm od donje ivice ploče. Uzorak se nanosi u obliku mrlje (koncentričnog kruga prečnika manjeg od 0,5 cm) ili uzane trake. Uzana traka se koristi kod **preparativne hromatografije**, kada se žele samo razdvojiti komponente smeše, a identifikacija se radi nekom drugom tehnikom, npr. instrumentalnom metodom.

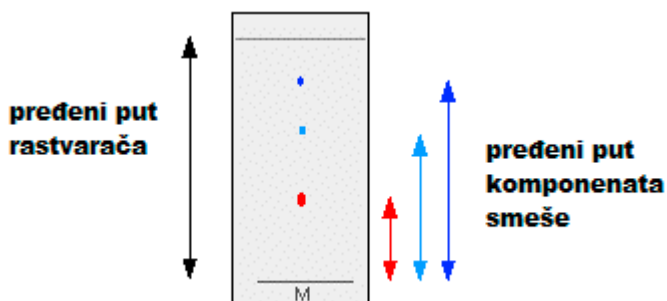
Kada ispari organski rastvarač, što se može osetiti po mirisu, hromatografska ploča se stavlja u hermetički zatvorenu posudu u kojoj se nalazi rastvarač za razvijanje hromatograma (mobilna faza). Rastvarač obično predstavlja smese dva ili više rastvarača. Posuda u kojoj se vrši hromatografsko razdvajanje se naziva **hromatografska kada**. Kako bi hromatografsko razdvajanje bilo uspešno, neophodno je ostaviti rastvarač da odstoji jedno vreme u hermetički zatvorenoj kadi, kako bi se prostor iznad tečnosti zasitio parama rastvarača. Da bi se ovo ostvarilo, često se zid kade oblaže filter papirom natopljenim rastvaračem. Zasićena atmosfera parama rastvarača zaustavlja uparavanje rastvarača sa ploče i omogućava kontinuirano razvijanje. Nivo tečnosti rastvarača u hromatografskoj

kadi treba da bude toliki da nakvasi ploču na koju je nanet adsorbent, ali mesto na kome je naneta smesa za razdvajanje mora da bude iznad nivoa tečnosti (Slika 21). Ploča se ostavi da se razvija sve dok rastvarač, putem kapilarnih sila, ne stigne skoro do vrha ploče. To će omogućiti najbolje razdvajanje komponenata smeše za datu kombinaciju adsorbenta i odabrane smeše rastvarača. Dužina puta koju je prešao rastvarač naziva se **front rastvarača**.



Slika 21. Kada za razvijanje (<http://www.generalglassblowing.com/HTML/chromato.html>)

Kada je front rastvarača blizu vrha hromatografske ploče, ploča se izvadi i obeleži se položaj fronta rastvarača da bi ostao zapis pređenog puta nakon isparavanja rastvarača. Nakon toga se izvrše merenja, kao što je prikazano na slici 22.



Slika 22. Šematski prikaz hromatograma kod tankoslojne hromatografije

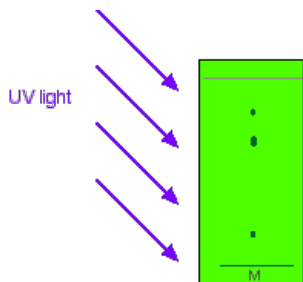
Rastojanje koje pređe komponenta smeše od mesta nanošenja (polazna mrlja ili startna linija) do centra mrlje date supstance X je značajno za identifikaciju te supstance i služi za izračunavanje tzv. **Rf vrednosti**. **Rf vrednost** je količnik rastojanja centra mrlje supstance X i fronta rastvarača.

$$Rf = \frac{\text{pređeni put komponente } x}{\text{pređeni put rastvarača}}$$

Rf vrednost je karakteristična za određeno jedinjenje u datom sistemu adsorbent/rastvarač, a zavisi od prirode adsorbenta, debljine sloja adsorbenta, polarnosti rastvarača i drugih eksperimentalnih uslova. Poređenjem Rf vrednosti nepoznate komponente sa Rf vrednošću standarda (poznate komponente) moguće je izvršiti identifikaciju supstance (kvalitativnu analizu), a poređenjem površine, odnosno intenziteta mrlje, izvodi se kvantitativna analiza.

U nekim slučajevima supstance nisu vidljive golim okom pa se moraju učiniti vidljivim, odnosno potrebno je da se „izazove” hromatogram. Ovo je moguće izvesti na dva načina: posmatranjem ploče pod UV zracima i izazivanjem bojene reakcije.

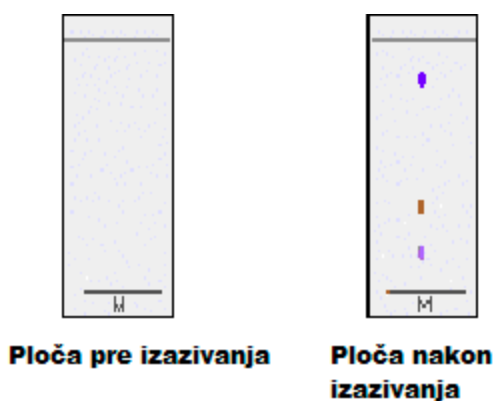
Ukoliko se koristi prvi naveden način moraju se koristiti stacionarne faze kojima su dodata jedinjenja koja fluoresciraju kada se izlože UV svetlosti. To znači da kada stavimo ploču pod UV svetlost ona će sijati. Nakon razvijanja ploče, mesto na kome se nalazi razdvojena komponenta će biti maskirano i kada se ploča obasja UV svetlošću ploča će da zasija, a ta mesta će biti tamno obojena (Slika 23).



Dok UV svetlost obasjava ploču, položaj mrlje se označi olovkom, zato što kada se isključi izvor UV svetlosti, mrlje će ponovo postati nevidljive.

Slika 23. Detekcija mrlja na ploči

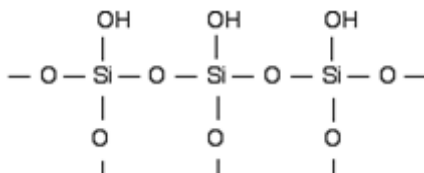
Drugi način izazivanja hromatograma je prskanje ploče pogodnim rastvaračem, sa kojim dato jedinjenje od interesa stupa u reakciju i gradi obojeni proizvod. Reagensi kojima se ploče prskaju, da bi se reakcije izazvale, nazivaju se **hromogeni reagensi** (Slika 24).



Slika 24. Ploče pre i nakon izazivanja pojave mrlja

Ploča se osuši i isprska npr. rastvorom ninhidrina. Ninhidrin reaguje sa amino kiselinama dajući obojeno jedinjenje braon ili ljubičaste boje. Ukoliko za jedinjenje od interesa nemamo odgovarajući hromogeni reagens, ploču isprskamo koncentrovanom sumpornom kiselinom ($\text{cc H}_2\text{SO}_4$) i nakon sušenja na sobnoj temperaturi, prenesemo je u sušnicu i sušimo do pojave crnih mrlja.

Najčešće korišćena stacionarna faza u tankoslojnoj hromatografiji je silika gel, koji se dobija iz silicijum dioksida (SiO_2). Atomi silicijuma su povezani preko atoma kiseonika u velike strukture (Slika 25).



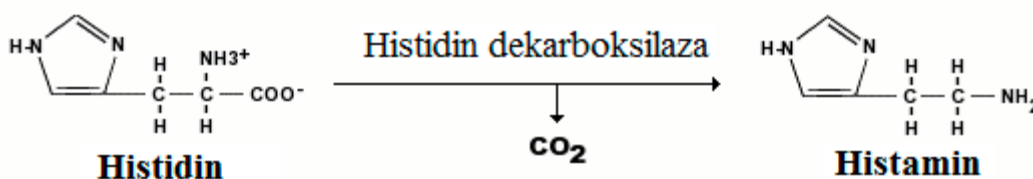
Slika 25. Struktura silika gela

Međutim, za atome silicijuma su vezane –OH grupe, tako da na površini silika gela imamo Si-O-H pored Si-O-Si veza. Slika 25 prikazuje mali deo površine silika gela. Površina silika gela je veoma polarna, usled prisustva -OH grupa, koje mogu sa komponentama smeše da grade vodonične veze, dok se privlače dipol-dipol i Van der Waals disperzionim silama.

VEŽBA 11. ODREĐIVANJE HISTAMINA U RIBAMA METODOM TANKOSLOJNE HROMATOGRAFIJE

Riblje meso i proizvodi su izvor kvalitetnih i biološki vrednih proteina. Usled nedostatka vezivnog tkiva i fascija (mišićna vlakna) riblje meso je lako svarljivo, bogato je esencijalnim aminokiselinama i masnim kiselinama, liposolubilnim vitaminima, mineralnim materijama (Ca, Mg, P) i oligoelementima.

Pored svih prednosti, riblje meso ima velik nedostatak – lako je kvarljivo. Naime, na površini kože ribe nalaze se mnogobrojne bakterije uključujući i proteolitičke. Proteolitičke bakterije (naročito kod uginulih riba) lako prodiru u potkožno mišićno tkivo i dovode do proteolitičke razgradnje histidina (aminokiselina). Pod uticajem bakterijskog enzima histidin-dekarboksilaze iz histidina se oslobađa histamin. Oslobađanje histamina se odvija po reakciji prikazanoj na slici 26.



Slika 26. Reakcija oslobađanja histamina

Potrebno je naglasiti da usled čuvanja mesa u frižideru, bakterije vrste *Proteus* mogu da oslobode znatne količine histamina bez organoleptičkih promena ribljeg mesa. Tako može doći do masovnih trovanja izazvanih povišenim (toksičnim) koncentracijama histamina u ribljem mesu. Simptomi trovanja su poremećaji digestivnog trakta praćeni dijarejom, glavoboljom, crvenilom i svrabom kože, šokom i abdominalnim bolovima.

Cilj vežbe

S obzirom na značaj histamina, primenom jednostavne analitičke metode – tankoslojne hromatografije, odrediće se sadržaj ovog biogenog amina u uzorcima ribljeg mesa.

Potrebna aparatura i pribor

Laboratorijski mikser, centrifuga, UV lampa, odmerni sudovi od 10, 100, 200 i 1000 mL, klipna pipeta od 5, 10 i 20 mL, automatska pipeta od 1-20 i 100-1000 μL , pH metar, laboratorijska staklena čaša od 100 mL, stakleni štapić, rešo sa azbestnom mrežicom, stakleni levak, filter papir, sušnica i vorteks mikser.

Potrebne hemikalije

Dietil etar (p.a. čistoće), alkohol (p.a. čistoće), *iso* propanol (p.a. čistoće), amonijum hidroksid (p.a. čistoće, 25%), silika gel G, aluminijum oksid (p.a. čistoće), perhlorna kiselina (HClO_4 , p.a. čistoće, 73%), kalijum hidroksid (KOH, p.a. čistoće), hlorovodonična kiselina (HCl, p.a. čistoće), bakar sulfat hidratisan ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, p.a. čistoće), ninhidrin, kalijum dihidrogen fosfat (KH_2PO_4 , p.a. čistoće), natrijum hidroksid (NaOH, p.a. čistoće), kalajhlorid (SnCl_2 , p.a. čistoće), analitički standard histama ($\geq 97,0\%$ (TLC), Sigma Aldrich) i destilovana voda.

Priprema rastvora

0,4 M HClO_4 : pipetom odmeriti 3,24 mL 73% HClO_4 i preneti u odmerni sud od 100 mL u kojem se nalazi 80 mL destilovane vode. Dopuniti do crte destilovanom vodom.

1 M KOH: Izmeriti na analitičkoj vagi 5,6 g KOH i prenети u odmerni sud od 100 mL. Dopuniti do crte destilovanom vodom.

0,1 M HCl: Pipetom odmeriti 1,85 mL 37-38% HCl i prenети u odmerni sud od 500 mL u kojem se nalazi 480 mL destilovane vode. Dopuniti do crte destilovanom vodom.

0,2 M KH_2PO_4 : Izmeriti na analitičkoj vagi 2,72 g KH_2PO_4 i prenети u odmerni sud od 100 mL. Dopuniti do crte destilovanom vodom.

0,2 M NaOH: Izmeriti na analitičkoj vagi 0,8 g NaOH i prenети u odmerni sud od 100 mL. Dopuniti do crte destilovanom vodom.

1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: Izmeriti na analitičkoj vagi 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i prenети u odmerni sud od 100 mL. Dopuniti do crte destilovanom vodom.

3% rastvor ninhidrina pH 7: U odmerni sud od 200 mL dodati 50 mL 0,2 M KH_2PO_4 i 29,54 mL 0,2 M NaOH. Odmerni sud dopuniti destilovanom vodom do crte.

Rastvor za izazivanje boje: sastoji se od dva rastvora. Prvi rastvor se priprema tako što se na analitičkoj vagi u staklenu čašu od 100 mL odmeri 2 g ninhidrina. Dosuti 40 mL destilovane vode i uz blago mešanje i zagrevanje rastvoriti ninhidrin. Drugi rastvor se priprema tako što se na analitičkoj vagi u staklenu čašu od 100 mL odmeri 0,08 g SnCl_2 i rastvoriti u 50 mL destilovane vode. Rastvori se pomešaju i ostave da stoje do potpunog sleganja belog taloga. Rastvor se potom profiltrira.

Standardni rastvor histamina: Odmeriti na analitičkoj vagi 0,02 g standarda histamina. Rastvoriti ga u 1 mL 0,4 M HClO_4 . Zatim dodati 0,8 mL 1 M KOH i 0,2 mL destilovane vode. Dobro promućkati na vtreks mikseru, a nastali talog odvojiti centrifugiranjem na 3000 o/min tokom 10 minuta. Supernatant je osnovni rastvor histamina koncentracije 10 mg/mL. Radni rasvori masenih koncentracija 1,0 i 0,1 mg/mL se dobijaju razblaživanjem osnovnog rastvora (1 mL osnovnog rastvora razblažiti do 10 mL, odnosno, 100 mL destilovanom vodom).

Priprema hromatografske ploče

Odmeriti 5 g silika gela G i 5 g aluminijum oksida na analitičkoj vagi. Suspendovati ih u 20 mL destilovane vode i naneti sloj debljine 0,25 mm, na alkoholom prebrisane ploče. Ploče se suše 30 minuta na vazduhu i aktiviraju tokom 30 minuta u sušnici na 105°C.

Priprema uzorka

Očišćeno riblje meso homogenizovati mlevenjem u laboratorijskom mlinu.

Na analitičkoj vagi odmeriti 10 g homogenizovanog uzorka i prenети u centrifugalnu kivetu. Dodati 15 mL 0,4 M HClO_4 i mešati 10 minuta. Nakon mešanja staviti u centrifugu na 3000 o/min tokom 10 minuta. Ponoviti ekstrakciju uzimanjem 10 mL supernatanta uz dodavanje 5 mL 0,4 M HClO_4 . Nakon centrifugiranja, spojiti supernatante i dobro promešati. Jedan mL supernatanta odgovara 0,33 g ribljeg mesa.

Nanošenje uzorka (supernatanta) na ploču

Pipetom odmeriti 1 mL supernatanta i pomešati sa 0,8 mL 1 M KOH u centrifugalnoj kiveti, dodati 0,2 mL destilovane vode i nakon centrifugiranja (10 minuta na 3000 o/min), odliti supernatant i naneti ga na ploču.

Na donju liniju ploče naneti 24 μL supernatanta (što odgovara količini od 4 g mesa) zatim se dodaju po 2, 4, 6, 8 i 10 μL rastvora histamina (koncentracije 0,1 mg/mL), što odgovara količinama 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i 1,0 μg histamina.

Nakon sušenja ploča se stavlja u kadu za razvijanje. Po završetku razvijanja, ploča se vadi iz kade i obeležava se front rastvarača. Po sušenju, ploča se isprska rastvorom za izazivanje boje i stavi u sušnicu na 80°C tokom 5-10 minuta, sve dok se mrlje standarda ne oboje ružičastom bojom.

Očitavanje rezultata

Kvalitativno određivanje

Odrediti R_f vrednost mrlje u uzorku i R_f vrednost mrlje standarda. Što je količnik ovih vrednosti bliže jedinici, potvrđuje se prisustvo histamina u uzorku.

Kvantitativno određivanje

Upoređivanjem intenziteta svetljenja mrlje pod UV svetlom u uzorku sa intenzitetom svetljenja mrlje standarda različitih koncentracija (nanetih na ploču), može se kvantifikovati prisutna količina histamina u uzorku.

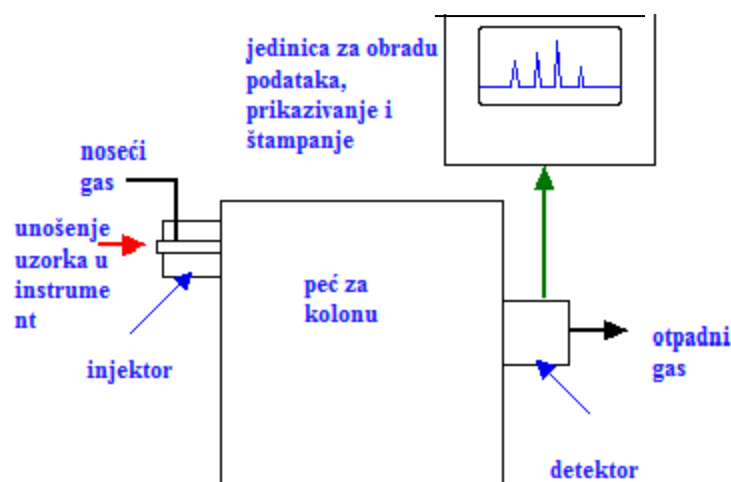
Napomena

Kod TLC hromatografije, prilikom kvantifikacije, može se napraviti greška i do 20%.

GASNA HROMATOGRAFIJA

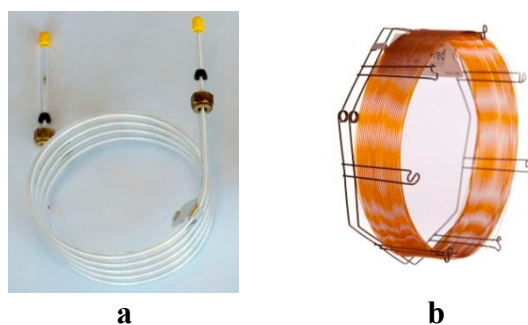
Gasna hromatografija (Gas Chromatography - GC) je hromatografska tehnika u kojoj je mobilna faza gas i koja se izvodi u koloni. Do preraspodele komponenata smeše dolazi u hromatografskoj koloni između stacionarne faze koja je najčešće viskozna tečnost i gasne mobilne faze (inertni gas). Do razdvajanja dolazi usled nejednake rastvorljivosti para ispitivanih jedinjenja u datoj tečnoj fazi, odnosno različitog podeonog koeficijenta (K). Analiza se sastoji u neprekidnom proticanju inertnog gasa (gas nosač) kroz hromatografsku kolonu (tehnika eluiranja) (Milosavljević, 2004).

Gasna hromatografija se može koristiti za ispitivanje komponenata koje se mogu prevesti u gasovito stanje, a koje se pri tome ne raspadaju. Shema uređaja za gasnu hromatografiju je prikazana na slici 27.



Slika 27. Shema uređaja za gasnu hromatografiju

U zavisnosti od vrste hromatografskih kolona koje koristimo za razdvajanje komponenata smeše, razlikujemo GC na punjenim kolonama (Slika 28a) i kapilarnu GC (Slika 28b).



Slika 28. Punjena (a) i kapilarna kolona za GC (b)

Kod **punjenih kolona**, tečna faza je u obliku tankog filma ravnomerno raspoređena po sitnim česticama nosača (dimenzija 120-60 mesh-a), kojim se ravnomerno ispuni staklena ili metalna kolona. Nosač mora da bude inertan sa česticama sfernog oblika i ujednačene veličine. Kao inertni nosač se najčešće koristi dijatomejska zemlja ili silicijum-dioksid.

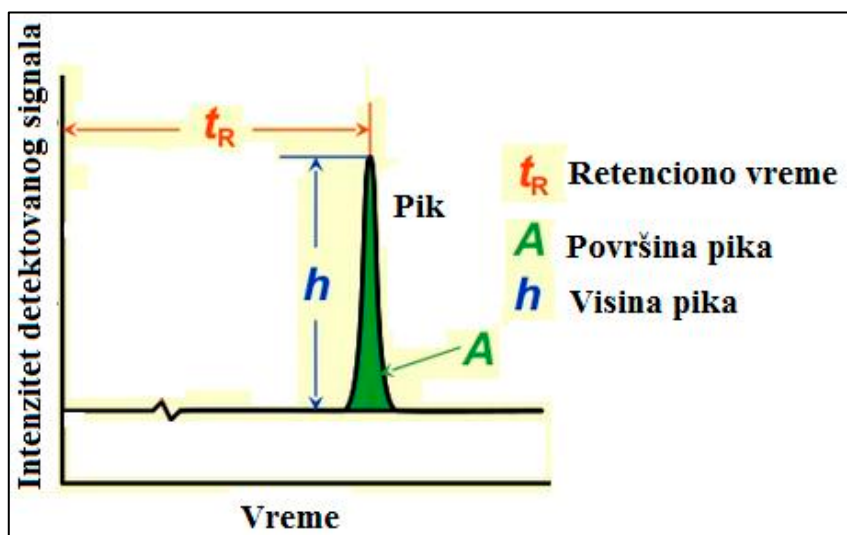
Kod **kapilarnih kolona**, tečna faza je u obliku tankog filma naneta na zidove uske kapilarne cevi duge od 5-60 m i prečnika koji se kreće do 1 mm (najčešće od 0,25-0,53 mm).

Princip rada gasnog hromatografa

Uzorak se u gasni hromatograf unosi pomoću mikrošprica (zapremine 10 μL) manuelno ili pomoću autosemplera. Igla šprica prolazi kroz tanki disk od gume (poznat kao septa) koja se samostalno zatvara kada se igla izvadi napolje. Injektor (zagrejan isparivač) se termostatira na određenu temperaturu koja je dovoljno visoka da sve komponente ispare i nošene gasom nosačem ulaze u kolonu.

U koloni se pare ovih jedinjenja delimično rastvaraju u nepokretnoj tečnoj fazi. U sistemu postoji težnja za uspostavljanjem ravnoteže koja se remeti zbog kretanja gasa nosača. Usled različite raspodele između pokretne i nepokretne faze, komponente smeše putuju različitom brzinom kroz kolonu, a stepen razdvajanja zavisi od dužine kolone, prirode tečne faze, debljine sloja, protoka gasa nosača, prirode komponenata koje se razdvajaju i drugih faktora. Nakon razdvajanja u koloni, komponente smeše dolaze u detektor zajedno sa gasom nosačem gde se beleže kao električni signal, pri čemu je intenzitet struje direktno proporcionalan koncentraciji ispitivane supstance.

Kriva zavisnosti jačine signala od vremena se naziva **hromatogram**. Kada je postignuto dobro hromatografsko razdvajanje, tada svaki signal (pik) odgovara jednom jedinjenju. Svaki pik na hromatogramu okarakterisan je vremenom zadržavanja (t_R -retenciono vreme) i površinom (Slika 29). **Retenciono vreme** predstavlja vreme koje protekne od unošenja uzorka do pojave maksimuma pika. Ono je za date uslove rada (temperaturu kolone, protok gasa nosača, dužinu kolone, vrstu i debljinu sloja tečne faze) karakteristično za to jedinjenje. Poređenjem retencionog vremena ispitivanog jedinjenja sa retencionim vremenom standarda, omogućena je identifikacija tog jedinjenja (kvalitativna analiza), dok se na poređenju površine pika nepoznatog jedinjenja sa površinom pika standarda poznate koncentracije, bazira kvantitativna analiza (Slika 29).



Slika 29. Osnovne karakteristike pika

Različita jedinjenja imaju različito vreme zadržavanja, koje zavisi od:

- Tačke ključanja komponenata. Komponente koje isparavaju na temperaturi višoj od temperature kolone će ostati kondenzovane kao tečnost na početku kolone. Na taj način, visoka tačka ključanja znači i dugo vreme zadržavanja na koloni.
- Rastvorljivosti u tečnoj fazi. Jedinjenja koja su bolje rastvorna u tečnoj fazi, kraće vreme će biti nošena nosećim gasom. Dobra rastvorljivost u tečnoj fazi znači duže vreme zadržavanja.

- **Temperature kolone.** Visoka temperatura pobuđuje molekule da prelaze iz tečne u gasovitu fazu i budu zahvaćeni gasom nosačem koji ih nosi ka detektoru. Viša temperatura kolone znači kraće vreme zadržavanja na koloni.

Niža temperatura kolone omogućava bolje razdvajanje, ali povećava vreme trajanja analize. Sa druge strane, ukoliko koristimo visoku temperaturu, komponente će proći kroz kolonu veoma brzo, ali se neće dobro razdvojiti.

Rešenje je poći od niže temperature kolone, a zatim gradijentno podizati temperaturu kolone. U početku, jedinjenja koja provode više vremena u gasovitoj fazi će brzo proći kroz kolonu i biće detektovana. Povećanjem temperature kolone i jedinjenja koja su bila „zalepljena“ za tečnu fazu će biti istisnuta.

Ostali parametri koji su važni za gasnu hromatografiju su visina i širina pika, kapacitet kolone, broj teorijskih podova potrebnih za uspešno razdvajanje komponenata, brzina analize i drugo. Gasna hromatografija je našla svoju široku primenu zahvaljujući brzini analize, velikoj osetljivosti detektora, jednostavnom rukovanjem instrumentom, lakom tumačenju rezultata i pristupačnoj cena instrumenta.

Detektor

Detektori su povezani sa izlazom kolone, tako da je na taj način omogućeno da sve što se sa nje eluira („skida“) prođe kroz isti. Postoji više vrsta detektora, ali su najčešće u upotrebi dva tipa: termoprovodljivi i jonizacioni detektori. Izbor detektora zavisi od strukture jedinjenja koja se ispituju i svrhe analize. Jedna od glavnih karakteristika detektora su selektivnost i osetljivost tj. sposobnost detektora da u prisustvu velikog broja komponenata smeše identifikuje i kvantifikuje jedinjenje od interesa.

Kod **termoprovodljivih detektora** detekcija se zasniva na činjenici da brzina prelaska toplote sa zagrejanog tela na okolini gas zavisi od sastava gasa. Proces odvođenja toplote se zasniva na termičkoj provodljivosti i zavisi od broja sudara zagrejanog gasa sa zagrejanim telom.

Princip rada svih **jonizacionih detektora** se zasniva na električnoj provodljivosti gasa koja je direktno proporcionalna broju prisutnih naelektrisanih čestica (jona, elektrona). Izvor jona može biti plamen ili neki radioaktivni materijal.

Plameno – jonizacioni detektori (flame ionization detector, FID) su najčešće korišćeni jonizacioni detektori. Pomoću ovog detektora ne mogu da se detektuju voda, neorganski gasovi, kao i neka druga organska jedinjenja kao što je npr. mravlja kiselina. Osetljivost detektora raste sa povećanjem udela ugljenika u molekulu i zavisi od brzine protoka vodonika i vazduha.

Detektor sa zahvatom elektrona (electron capture detector, ECD) zasniva se na principu jonizacije molekula sudarom sa β -česticama koje emituje β -emiter (^3H ili ^{63}Ni). Ima verovatno najveću osetljivost u odnosu na sve ostale detektore. Selektivan je za jedinjenja koja u sebi sadrže halogene (i to prvenstveno hlor), kao i za sva druga jedinjenja koja imaju slobodan elektronski par.

Masena spektrometrija je u poslednje vreme postala najmoćnija metoda identifikacije složenih smeša organskih jedinjenja. Velika osetljivost i brzina snimanja masenih spektara eluiranih komponenata sa kolone, dovela je do povezivanja masenih spektrometara sa gasnim ili tečnim hromatografima, čija je uloga hromatografsko razdvajanje komponenata smeše, a uloga masenih spektrometara identifikacija i kvantifikacija. Masena spektrometrija se zasniva na tome da se analizirani uzorak prevodi u stanje jonizovanog gasa, čije komponente imaju različit odnos mase i naelektrisanja (m/z). Prvi korak pri

analizi molekula je **jonizacija molekula u jonskom izvoru**. Nastali joni se provode kroz **analizator**, koji razdvaja jone u prostoru i/ili vremenu na osnovu njihovog odnosa m/z . Iz analizatora, joni idu na **detektor** gde proizvode električni signal koji se može registrovati na osciloskopu, pisaču, računaru ili na nekom drugom uređaju.

Neprekidnim merenjem ukupne jonske struje svih jona koji nastaju u jonskom izvoru za vreme hromatografisanja dobija se hromatogram. Maseni spektar se dobija merenjem struje koja potiče od jona razdvojenih prema m/z (masa/naelektrisanje) vrednostima. Maseni spektar se predstavlja kao zavisnost jonske struje od m/z vrednosti. Uobičajen način predstavljanja je da se obilnost jona u masenom spektru izražava u % u odnosu na najintenzivniji jon (osnovni jon) za koji se uzima da je 100%.

Kad su komponente od interesa prisutne u mikro količinama, obično ne mogu da se odvoje od drugih pratećih supstanci, pa je neophodno da se postigne selektivna detekcija pojedinih jona tj. da se meri promena jonske struje koja potiče samo od jedne vrste jona, karakteristična za jedinjenje koje se određuje.

Postoje tri načina merenja intenziteta izabranih jonskih struja:

- detekcija svih jona u zadatom opsegu masa (Scan mod);
- detekcija određenih jona (Single Ion Monitoring - SIM mod);
- detekcija više jona ili masena fragmentacija (Multiple Ion Detection, Mass Fragmentography).

Masena spektrometrija se koristi za:

- određivanje sastava nepoznatog uzorka (kvalitativna analiza);
- određivanje količine određene supstance u uzorku (kvantitativna analiza);
- određivanje izotopskog sastava uzorka;
- određivanje strukture molekula prateći fragmentaciju molekula;
- određivanje molarne mase molekula;
- određivanje fizičkih i hemijskih osobina supstanci.

TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKIH PERFORMANSI

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) je u osnovi unapređena tečna kolonska hromatografija. Za razliku od kolonske hromatografije u kojoj tečnost prolazi pod uticajem sile gravitacije, ovde se tečnost kreće pod dejstvom pritiska do 600 bara (uobičajeno 400 bara), što za posledicu ima znatno brže razdvajanje. Takođe HPLC je visoko automatizovana i izuzetno osetljiva tehnika.

U zavisnosti od polarnosti stacionarne i mobilne faze razlikujemo:

- normalno-faznu HPLC (NP-LC) i
- reverzno-faznu HPLC (RP-LC) hromatografiju.

Normalno-fazna tečna hromatografija

Kod normalno-fazne tečne hromatografije stacionarna faza je polarna, a mobilna faza je nepolarna. Tipična stacionarna faza u normalno-faznoj tečnoj hromatografiji je silika, sa modifikovanim cijano i amino funkcionalnim grupama. Kod normalno-fazne hromatografije, nepolarna jedinjenja se eluiraju prva, a polarna jedinjenja ostaju duže na koloni. Mobilna faza se sastoji od nepolarnog rastvarača kao što su heksan i heptan u smeši sa slabo polarnim rastvaračem poput *izo*-propanola, etil-acetata ili hloroforma. Povećanjem udela nepolarnog rastvarača u mobilnoj fazi povećava se i vreme zadržavanja.

Koristi se za analizu materija koji se lako rastvaraju u organskim rastvaračima. Razdvajanje ovih materija se zasniva na njihovoj razlici u polarnosti, a to mogu biti amini, kiseline, metalni kompleksi, itd. Koristi se za jedinjenja koja su suviše hidrofobna ili suviše hidrofilna za razdvajanje pomoću RP-LC, nisu rastvorna u vodi ili se mogu raspadati u vodi i sl.

Reverzno-fazna tečna hromatografija

Reverzno-fazna tečna hromatografija je tehnika koja je najviše u upotrebi. Kod reverzno-fazne tečne hromatografije stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza je polarna. Kod silika stacionarne faze nepolarna površina je dobijena vezivanjem silana sa alkil ugljovodonicima. Kod materijala na bazi polimera, nepolarna stacionarna faza se dobija vezivanjem sa polistirenima i bromovanim polistirenima. Postoji mala razlika u osobinama između čestica silike i materijala na bazi polimera.

Oktadecil (C18) je najčešće korišćena stacionarna faza, zatim slede oktil (C8) i butil (C4). Reverzno-fazni (RP) materijali se prave vezivanjem alkilnih lanaca za silika materijale u širokom opsegu od kratkih C1 do veoma dugih C30 alkil lanaca.

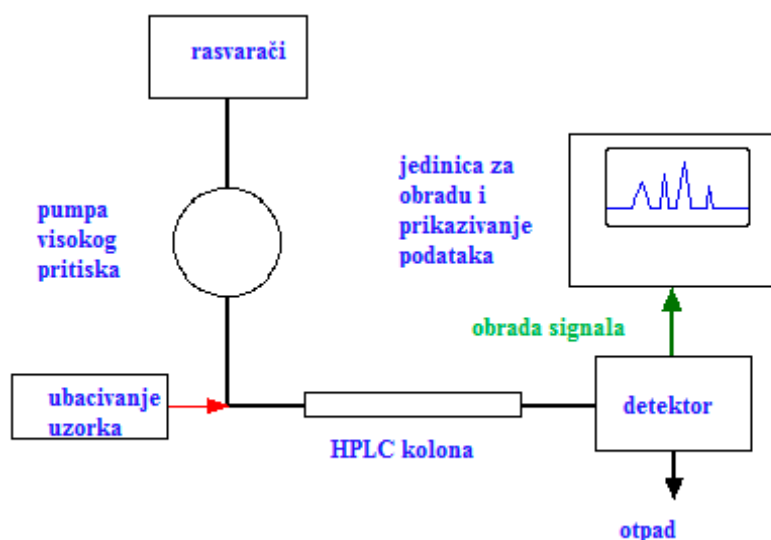
Kod RP-LC prvo se eluiraju polarna jedinjenja, a zatim nepolarna. Uobičajene mobilne faze su smeše vode i polarnih organskih rastvarača kao što su metanol (MeOH), acetonitril (ACN) ili tetrahidrofuran (THF). Vreme zadržavanja se povećava ako se povećava udeo polarnog rastvarača (vode) u mobilnoj fazi. To znači da polarni molekuli putuju kroz kolonu znatno brže od ostalih. Nepolarna jedinjenja bivaju zadržana Van der Waals-ovim privlačnim silama. Ova jedinjenja su inače manje rastvorna u rastvaraču, zato što je neophodno raskinuti vodonične veze (npr. između vode i metanola). Pored toga, nepolarna jedinjenja provode manje vremena u rastvoru mobilne faze, što ima za posledicu slabije spiranje sa kolone.

Karakteristike reverzno-faznih materijala zavise od mnogo parametara. Dva ključna svojstva, hidrofobnost i hidrofilnost su praktično najznačajniji za njihov dominantni izbor.

Princip rada tečnog hromatografa

Uzorak koji je prethodno rastvoren u odgovarajućem rastvaraču se unosi u hromatografski sistem najčešće automatski. Shema toka procesa kod tečne hromatografije visoke performansi je prikazana na slici 30. Nakon razdvajanja komponenata smeše na hromatografskoj koloni, komponente smeše zajedno sa mobilnom fazom dolaze na detektor i beleže se kao električni signal. Intenzitet struje direktno je proporcionalan koncentraciji ispitivane supstance. Kriva zavisnosti jačine signala od vremena naziva se **hromatogram**. Vreme koje protekne od unošenja uzorka do pojave maksimuma pika predstavlja vreme zadržavanja ili **retenciono vreme** (R_t). Različita jedinjenja imaju različita retenciona vremena koja zavise od:

- primenjenog pritiska (protoka mobilne faze);
- prirode stacionarne faze (ne samo od vrste stacionarne faze, već i od veličine čestica);
- sastava mobilne faze;
- temperature kolone i dr.



Slika 30. Shema toka procesa kod tečne hromatografije visoke performansi

Retenciono vreme je za date uslove (datu kolonu, dužinu i temperaturu kolone, protok mobilne faze) karakteristično za to jedinjenje i ako želimo da nam služi za identifikaciju nepoznatih supstanci, radni uslovi moraju biti strogo kontrolisani i konstantni. Poređenjem retencionog vremena ispitivanog jedinjenja sa retencionim vremenom standarda omogućena je identifikacija tog jedinjenja - kvalitativna analiza. Kvantitativna analiza se zasniva na poređenju površine pika nepoznatog jedinjenja sa površinom pika standarda poznate koncentracije.

Detektori

Postoji nekoliko načina za detekciju supstanci kada prođu kroz hromatografsku kolonu. Najčešće korišćen detektor u tečnoj hromatografiji je detektor koji se zasniva na UV apsorpciji (**UV detektor**). Velik broj organskih jedinjenja apsorbuje UV svetlost na različitim talasnim dužinama. Količina apsorbovane svetlosti je direktno proporcionalna količini komponente koja u datom trenutku prolazi kroz ćeliju detektora. Ne treba zaboraviti da mobilna faza takođe apsorbuje UV svetlost, ali da različita jedinjenja imaju različite maksimume apsorpcije na različitim talasnim dužinama. Tako metanol apsorbuje

na talasnim dužinama nižim od 205 nm, a voda niže od 190 nm. Ukoliko koristimo smešu metanol/voda kao mobilnu fazu, onda moramo raditi na talasnim dužinama višim od 205 nm da bi izbegli pogrešno očitavanje apsorbance koje potiče od rastvarača.

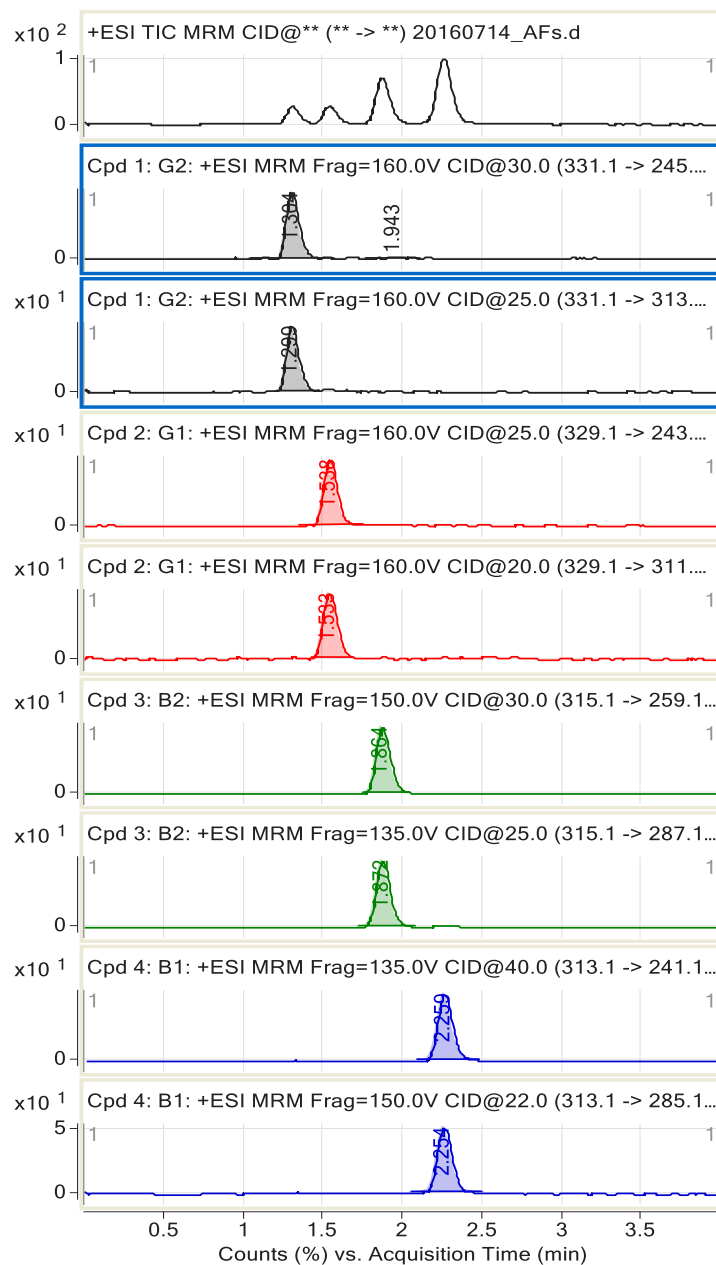
Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom je analitička tehnika koja kombinuje fizičko razdvajanje komponenata smeše pomoću tečne hromatografije (LC ili HPLC) sa detekcijom koja se vrši pomoću masenog spektrometra (MS). Postoji nekoliko tipova masenih spektrometara koji se mogu koristiti kod LC/MS: jednostruki kvadrupol (single quadrupole), trostruki kvadrupol (triple quadrupole), jonska zamka (ion trap), analizator na bazi vremena preleta (time of flight, TOF) i kvadrupol analizator na bazi vremena preleta (quadrupole-time of flight, Q-TOF) (Vuković, 2012).

LC-MS je moćna tehnika velike osetljivosti, pogodna za velik broj analitičkih određivanja. Veoma je pogodna za razdvajanje neisparljivih i termo-labilnih jedinjenja (Pico i sar, 2004). Do 90-tih godina se koristila za jedinjenja za koja nisu mogli da se nađu odgovarajući uslovi za GC analizu, međutim danas ima široku primenu zbog svoje mogućnosti da pokrije veliki broj jedinjenja sa različitim fizičko-hemijskim osobinama. U novije vreme, tečna hromatografija spregnuta sa trostrukim kvadrupolom (LC-MS/MS ili LC-QQQ), postala je moćna tehnika u analizi ostataka i kontaminanata zahvaljujući njenim prednostima kao što su dobra selektivnost i osetljivost, pouzdana kvantifikacija na niskim koncentracionim nivoima i sa brojem koraka u pripremi uzoraka svedenim na minimum.

Kod LC-MS ili kvadrupolne tehnike, različiti su načini dobijanja podataka:

- potpuno skeniranje koje dovodi do tipičnog ukupnog jonskog hromatograma (Total Ion Chromatography, TIC);
- praćenja odabranog jona (Selected Ion Monitoring, SIM);
- praćenje odabrane reakcije jona (Multiple Reaction Monitoring, MRM ili Selected Reaction Monitoring, SRM) (samo kod LC-MS/MS).

Najčešći načini dobijanja podataka u LC-MS/MS je praćenje višestruke reakcije, u kojoj se obično prati nastajanje dva fragment jona, od kojih se jedan koristi za kvantifikaciju (jon jačeg intenziteta), a drugi za potvrdu tj. za kvalitativnu potvrdu komponente (Slika 31).



Slika 31. Ukupan jonski hromatogram smeše standarda aflatoksina G2, G1, B2 i B1, kao i MRM hromatogrami AFG2, AFG1, AFB2 i AFB1

SEKUNDARNI BIOMOLEKULI

Pojava oksidativnog stresa kod biljaka, kao posledica negativnog uticaja različitih abiotičkih i biotičkih faktora spoljašnje sredine, kao što su UV-zračenje, pesticidi, teški metali, mraz, suša itd., dovodi do nakupljanja fenolnih jedinjenja u njima.

Sekundarni biomolekuli ili prirodni proizvodi biljaka, predstavljaju organska jedinjenja ograničene biomolekulske mase (>300 daltona) i velike strukturne raznolikosti. Za razliku od prirodnih organskih jedinjenja poput šećera, aminokiselina i nukleotida, kao i njihovih polimera, koji su esencijalni i uvek prisutni u živim organizmima, ova jedinjenja nemaju direktnu ulogu u primarnom metabolizmu biljaka i nisu neophodna za održavanje života, ali su esencijalna za opstanak vrste u njenom prirodnom okruženju. Biljke sintetizuju i akumuliraju sekundarne biomolekule zavisno od nutricionih resursa, genetičkog potencijala i ekoloških uslova.

Postoji više hipoteza koje objašnjavaju prisustvo sekundarnih molekula u biljkama. Danas preovladava mišljenje da su sekundarni biomolekuli korisni i funkcionalni metaboliti biljnog organizma koji predstavljaju prilagođenost biljnog organizma za preživljavanje u uslovima spoljašnje sredine. Sekundarni biomolekuli nisu slučajni, otpadni ili nefunkcionalni metaboliti u biljnim organizmima, već imaju određenu funkciju u metabolizmu. Utvrđeno je da mnoge klase sekundarnih biomolekula pokazuju značajne biološke aktivnosti i to kako u samom metabolizmu biljke (fiziološka aktivnost), tako i u komunikaciji biljke sa okolinom koja je okružuje (ekološka aktivnost).

Najpoznatije klase sekundarnih biomolekula su alkaloidi, terpeni i fenoli, ali se u ovu grupu jedinjenja ubrajaju i fotosintetički pigmenti sa azotom, cijanogeni glikozidi, indoli, citokinini, organske kiseline, poliacetileni, jedinjenja sa sumporom itd. (Malenčić, 2001).

Mnoga od ovih jedinjenja poseduju izrazita farmakološka, mirisna i antioksidativna svojstva što ih čini interesantnim za eksploataciju u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Pored ekoloških funkcija, ova jedinjenja pokazuju važna biološka svojstva za čoveka kao što su antimikrobna i antioksidativna, a učestvuju i u uklanjanju toksičnih slobodnih radikala i snižavaju nivo šećera, lipida i holesterola.

Fenoli

Fenoli su hemijska jedinjenja koje karakteriše prisustvo barem jednog aromatičnog prstena (C_6) za koji su vezane jedna ili više hidroksilnih grupa. Najveći broj fenolnih jedinjenja predstavljaju derivati nastali u reakcijama kondenzacije ili adicije. Više hiljada danas poznatih fenola su biljnog porekla. Rastvorljivi su u vodi i veoma su reaktivna jedinjenja, dok sa šećerima grade glikozide. Široko su rasprostranjeni u prirodi, a u biljkama je do danas identifikovano više hiljada fenolnih jedinjenja. Nalaze se u vakuolama, lako se oksiduju (enzimima ili bez njih) u hinone ili jedinjenja hinoidne strukture. Dominatne strukture u listovima viših biljaka su flavonoid-glikozoid, konjugati hidrooksidanata i kondenzovani tanini, kao i antocijanidi u cvetnim laticama i voću (Popović i Malenčić, 2006).

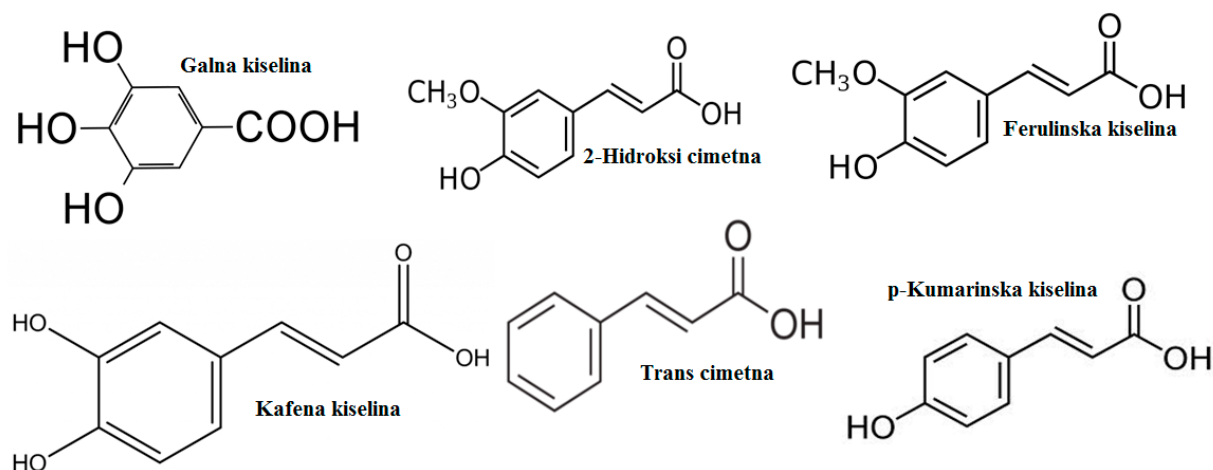
Jedinjenja iz grupe fenola su od velikog značaja za strukturu ćelije. Predstavljaju integralan deo strukture ćelijskih zidova, uglavnom kao polimeri tipa lingana i suberina, čineći mehaničku podršku i barijeru za mikroorganizme. Lingini su, nakon celuloza najviše zastupljena jedinjenja u zemlji. Njihovim nastankom biljke su se adaptirale na kopneni način života gradeći čvrste organe poput drvenih stabala i sprovodnih elemenata za transport vode. Istovremeno su aktivni metaboliti biljnih ćelija. Učestvuju u raznim

biohemijskim procesima u vezi sa fotosintezom, stimulišu oprašivanje (daju boju cvetovima), štite biljke od bakterija, virusa i gljiva kao i od mehaničkih oštećenja. Imaju značajnu funkciju u uklanjanju kiseoničnih radikala.

Fenolna jedinjenja su našla primenu u farmaceutskoj industriji zbog određenih fizioloških efekata na ljude i životinje, a od interesa su i za prehrambenu industriju kao antioksidanti i pigmenti. Mnogobrojna istraživanja i izveštaji podvlače značaj i biološke efekte antioksidanata fenolne prirode prisutnih u hrani. Ukazuju da svakodnevni unos malih količina biljnih fenola smanjuje rizik oboljenja krvnih sudova i srca u velikim populacionim grupama (Bursić i sar., 2013). Pretpostavlja se da oksidativna oštećenja imaju glavnu ulogu u razvoju različitih oboljenja poput kardio-vaskularnih i karcinoma. Zbog navedenog, u poslednje vreme se posebna pažnja posvećuje činjenici da prirodni antioksidanti iz biljaka mogu pružati određenu zaštitu protiv oksidativnih oštećenja i oksidacije lipoproteina male gustine (LDL holesterol).

Fenolne kiseline su poznati antioksidanti zbog sposobnosti da predaju vodonik ili elektron, kao i zato što njihovi stabilni interemedijeri radikali sprečavaju oksidaciju različitih komponenti, naročito masnih kiselina i ulja.

Hidroksi derivati benzoeeve i cimetne kiseline su prisutni u hrani biljnog porekla (voće, povrće, žitarice). Nalaze se u svim delovima biljaka (koren, stabljika, lišće, seme). U različitim delovima biljaka nalaze se različite koncentracije fenolnih kiselina, čiji sastav utiče na kvalitet proizvoda (Andrejev i Bursić, 2013). Osim toga, u različitim stadijumima razvoja biljaka prisutne su različite fenolne kiseline (Slika 32). Manji deo fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku dok je većina vezana estarskim, etarskim ili acetalnim vezama sa strukturnim komponentama biljaka (celulozom, proteinima i ligninom) ili sa manjim organskim molekulima (glukoza, kvinska, maleinska i vinska kiselina) i drugim prirodnim proizvodima (terpeni).



Slika 32. Strukturne formule fenolnih kiselina

Hidroksibenzoeva kiselina u slobodnoj i esterifikovanoj formi dokazana je samo u nekim višim biljkama. Cimetne kiseline (*p*-kumarna, kafena, ferulna i sinapinska kiselina) su više zastupljene u odnosu na hidroksibenzoevu kiselinu. Kafena i kininska kiselina formiraju hlorogensku kiselinu, koja se nalazi u mnogim vrstama voća, a u većoj koncentraciji u kafi (jedna šoljica sadrži 70-350 mg hlorogenske kiseline). Cimetna kiselina je pronađena u svim delovima voća, a najveći sadržaj je utvrđen u spoljašnjem omotaču zrelog ploda. Kafena kiselina je izolovana iz kafe. U slobodnom i esterifikovanom obliku je najviše zastupljena fenolna kiselina i čini od 75% do 100% ukupnog sadržaja derivata cimetne

kiseline u voću. Najvažniji izvor ferulne kiseline su zrna žitarica u kojima je dominantna fenolna kiselina.

Antioksidativna svojstva biljaka

Proučavanje antioksidativnih svojstava gajenog bilja i istraživanje novih prirodnih antioksidanata zaokuplja sve veću pažnju naučne, ali i šire javnosti, što je ilustrovano velikim brojem naučnih radova i patenata vezanih za ovu oblast. Ono obuhvata istraživanje biohemijskih procesa vezanih za nastanak i dejstva slobodnih kiseoničnih radikala i aktiviranih oblika kiseonika u metabolizmu aeroba, kao i mehanizama njihovog uklanjanja odnosno umanjavanja toksičnih efekata na nivou ćelije.

Razloge za navedeno treba tražiti u sve izraženijem svetskom trendu koji podrazumeva okretanje proizvodima prirodnog porekla nasuprot sintetičkim, sa ciljem da se dođe do lako pristupačnih prirodnih izvora antioksidanata, koji se mogu koristiti u ishrani, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Na tržištu je prisutan velik broj efikasnih i relativno jeftinih sintetičkih antioksidanata. Njihova upotreba u praksi je ipak sve više limitirana zdravstvenim razlozima i zakonskim ograničenjima zbog čega se komercijalni interes za korišćenje prirodnih antioksidanata sve više povećava. Da bi bili primenjeni u praksi, prirodni antioksidanti od značaja u industriji hrane moraju ispunjavati određene kriterijume. Kako navode Löliger i sar. (1996), ekstrakti moraju pokazivati dobru antioksidantnu efikasnost, moraju biti dostupni na tržištu u velikoj količini i moraju imati konkurentnu cenu. Samo mali broj preparata danas ispunjava ove uslove: lecitini, askorbinska kiselina, tokoferoli, ekstrakti začina i smeše ovih sastojaka.

Sekundarni metaboliti u poljoprivrednim proizvodima iz organske proizvodnje

Većina studija koje za cilj imaju upoređivanje kvaliteta poljoprivrednih proizvoda iz organske i konvencionalne proizvodnje, izražavaju sadržaj sekundarnih metabolita u odnosu na sadržaj suve materije. Većina analiza se baziraju na određivanju ukupnih polifenola, no, u poslednje vreme se pojavljuju radovi koji se bave određivanjem udela pojedinačnih komponenti fenolnih jedinjenja. Najčešće se određuje sadržaj kvercetina, taninskih kiselina, kamferola ili antocijana u poljoprivrednim proizvodima. Skoro 90% dostupnih literaturnih navoda ukazuje na povišen sadržaj flavonoida, kvercetina, kamferola ili antocijana u jabukama, spanaću, luku, paradajzu, borovnicama ili jagodama (Wang i sar., 2014). Neki autori ukazuju na niži sadržaj kvercetina u žutim šljivama i paradajzu, dok neki ukazuju na niži sadržaj kamferola u jagodama (Elshafie, 2023).

Tečna hromatografija u određivanju fenolnih jedinjenja

HPLC je veoma pogodna za razdvajanje neisparljivih i termalno labilnih jedinjenja (Vuković, 2012). Fenolne kiseline su pogodne za HPLC razdvajanja zbog njihove srednje do izuzetno polarne prirode, termolabilnosti i slabe isparljivosti. Za ovu vrstu analiza poželjno je korišćenje kolona sa C18 stacionarnom fazom. Mobilna faza je važna za dobro hromatografsko razdvajanje, ali isto tako utiče i na jonizaciju analita i osetljivost masenog spektrometra. Kombinacije metanol-voda i acetonitril-voda sa dodatkom hlorovodonične, mravlje ili sirćetne kiseline, su uglavnom korišćene kao mobilne faze u gradijentnom eluiranju, prilikom određivanja fenolnih jedinjenja (Generalić i sar., 2012).

VEŽBA 12. ODREĐIVANJE FENOLNIH KISELINA U LISKI SUNCOKRETA

Cilj vežbe

Određivanje ferulinske, trans-cimetne, 2-hidroksi cimetne, galne, kafene i p-kumarinske kiseline u liski suncokreta metodom tečne hromatografije uz detektor sa nizom dioda (HPLC-DAD).

Potrebna aparatura i pribor

Tečni hromatograf Agilent 1100 (Agilent Technology, SAD) sa binarnom pumpom sa detektorom sa nizom dioda – DAD, kolona za HPLC: ZORBAX SB-Aq (5 µm veličina čestice: 4,6 x 250 mm, Agilent), centrifuga, vodeno kupatilo, najlonski membranski filteri 25/45, vijale (wm 12 x 32 mm) od 2 mL, 0,45-µm filteri za špriceve, špricevi sa iglama od 2 mL, analitička vaga, tank i boca za tečni azot, polipropilenske tube od 50 mL sa zatvaračem.

Potrebne hemikalije

Analitički standardi ferulinske kiseline, čistoće 99,0%, trans-cimetne kiseline, čistoće 99,0%; 2-hidroksi cimetne kiseline, čistoće 97,0%; galne kiseline, čistoće 99,9%; kafene kiseline, čistoće 98,0% i p-kumarinske kiseline, čistoće 98,0% (Sigma-Aldrich). Methanol, acetonitril HPLC čistoće (J.T.Baker), etanol 95-96% (Zorka, Pharma), sirćetna kiselina 100% (Carl Roth), azot (Messer) i Milli-Q dejonizovana voda.

Priprema osnovnih i radnih rastvora

Osnovni (stock) rastvori pojedinačnih fenolnih kiselina se pripremaju rastvaranjem njihovih analitičkih standarda u metanolu. Radni rastvori masenih koncentracija 100 µg/mL se pripremaju razblaživanjem osnovnih rastvora mobilnom fazom, kao što je prikazano u tabeli 10. Smeša rastvora u kojima su prisutne sve fenolne kiseline, masene koncentracije 10 µg/mL, priprema se uzimanjem određene zapremine radnih rastvora pojedinačnih fenola i razblaživanjem do crte mobilnom fazom.

Tabela 10. Priprema osnovnih, radnih rastvora i mešavina standarda fenolnih kiselina

Fenolne kiseline	Odvaga standarda (mg)	Zapremina suda (mL)	Koncentracija O.S. (mg/mL)	Zapremina O.S. (mL)	Zapremina suda (mL)
Ferulinska	19,4	50	0,3841	6,51	25
Trans-cimetna	18,2	50	0,3604	6,94	25
2-Hidroksi cimetna	21,3	50	0,4132	6,05	25
Galna	20,4	50	0,4076	6,13	25
Kafena	20,4	50	0,3998	6,25	25
p-Kumarinska	15,4	50	0,3018	8,28	25

Smeša rastvora se koristi u određivanju validacionih parametara. Stok rastvori se čuvaju u zamrzivaču, dok se radni i rastvor mešavine fenolnih kiselina čuvaju u frižideru na 5 °C.

Validacioni parametri

Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ)

LOD i LOQ se određuju injektovanjem najniže masene koncentracije rastvora smeše fenolnih kiselina, masene koncentracije 0,1 µg/mL (dobijen razblaživanjem radnog rastvora koncentracije 10 µg/mL).

Linearnost odziva detektora se proverava za mešavinu fenolnih kiselina masenih koncentracija od 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 50,0 i 100,0 µg/mL, injektovanjem u dva ponavljanja. Rastvori datih koncentracija dobijaju se razblaživanjem osnovnih i radnih rastvora.

Hromatografski uslovi razdvajanja fenolnih kiselina

HPLC-DAD razdvajanje fenolnih kiselina izvodi se pod sledećim uslovima:

1. Kolona ZORBAX SB-Aq (250 x 4,6; 5 µm) Agilent
2. Mobilna faza: 2% sirćetna kiselina u acetonitrilu (rastvor A) i 2% sirćetna kiselina u dejonizovanoj vodi (rastvor B). Analiza se izvodi u gradijentnom modu sa protokom od 1,0 ml/min. Gradijent počinje sa 92% A, zatim se u intervalu od 18 minuta smanjuje do 80% A, do 25 minuta 60% A, 25 minuta na 55% A, 30 minuta na 35% A, 40 minuta 20% A i održava tokom 4 minuta. Na kraju analize automatski se povećava udeo rastvora A na 90% A i na 57 minutu se ostavi da stoji 3 minuta. Vreme između dva injektovanja je 2 minuta.

Mobilna faza se pre puštanja na HPLC-DAD profiltrira preko najlonskog membranskog filtera 25/45.

3. Injekciona zapremina: 20 µL
4. Temperatura kolone: 25°C
5. Talasna dužina DAD detektora: 280 nm

Priprema uzorka i ekstrakcija

Liske suncokreta se odmah po uzorkovanju stavljaju u tečni azot do trenutka ekstrakcije. Usitniti liske suncokreta (homogenizovati), odmah po vađenju iz tečnog azota.

Ekstrakcija fenolnih kiselina se izvodi po metodi Generalić i sar. (2012). Na analitičkoj vagi odmeriti 0,5 g homogenizovanog uzorka liski suncokreta. Prebaciti uzorak u polipropilensku tubu od 50 mL i dodati 10 mL etanola. Postaviti uzorak u vodeno kupatilo u kojem se održava konstantna temperatura od 60°C. Nakon sat vremena, izvaditi uzorak iz vodenog kupatila i staviti ga u centrifugu na 4000 o/min u trajanju od 8 minuta. Izvaditi uzorak iz centrifuge, a supernatant profiltrirati preko 0,45-µm filtera i analizirati na HPLC-DAD.

Obrada i prikaz rezultata validacije

Validacija metode određivanja sadržaja fenolnih kiselina u listovima suncokreta obuhvata provere koje se izvode kako bi se obezbedilo da karakteristike metode budu u skladu sa propisanim karakteristikama metode i da se dokaže da je metoda naučno opravdana u uslovima svoje primene.

LOD i LOQ

LOD i LOQ se određuju obogaćivanjem uzorka liski suncokreta najnižom masenom koncentracijom mešavine fenolnih kiselina, tako da krajnja masena koncentracija iznosi 0,1 µg/mL, u šest merenja (df) u dva ponavljanja (n).

LOD i LOQ se računaju po formulama (SHI, 2009):

$$LOD = 2 \times t_{0,95} (df) \times S_{w, blank} \times (1+1/n)^{1/2}$$

df – broj replikata, u našem slučaju je 1

$t_{0,95}$ – se preuzima iz tabele (broj merenja je 6 i daje df 5) i iznosi 2,015

$S_{w, blank}$ – standardna devijacija uzoraka masene koncentracije 0,01 µg/mL

$$LOQ = \bar{x}_{average, blank} + 10 S_{w, blank}$$

$\bar{x}_{average, blank}$ – srednja vrednost uzorka obogaćenog masenom koncentracijom 0,001 ng/mL

Primer izračunatih LOD i LOQ vrednosti, prema navedenim formulama, prikazan je u tabeli 11.

Tabela 11. LOD i LOQ vrednosti fenolnih kiselina

Fenolne kiseline	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Ferulinska	0,13	0,3
Trans-cimetna	0,12	0,3
2-Hidroksi cimetna	0,13	0,3
Galna	0,13	0,3
Kafena	0,12	0,3
p-kumarinska	0,12	0,3

Linearnost odziva detektora i ponovljivost retencionog vremena i površine pika

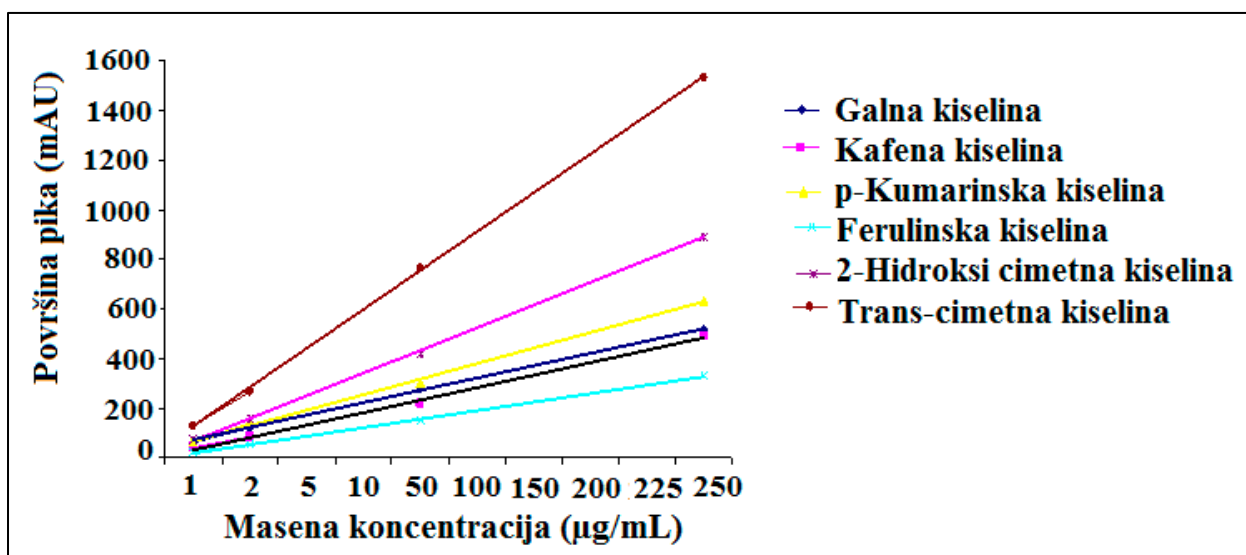
Linearnost odziva detektora proverena za mešavinu fenolnih kiselina masenih koncentracija od 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 200,0 i 250,0 µg/mL (Slika 33, Tabela 12).

Ponovljivost retencionog vremena (R_t) i površine pika (A) kao vid preciznosti je proverena analizom rastvora smeše fenolnih kiselina masene koncentracije 1,0 µg/mL u dvanaest ponavljanja. Analiza je izvršena pod istim uslovima (ista metoda, isti operater, isti materijal itd.), a dobijene vrednosti relativne standardne devijacije (RSD, %) su bile < 20% što je u skladu sa SANTE/11945/2015 dokumentom.

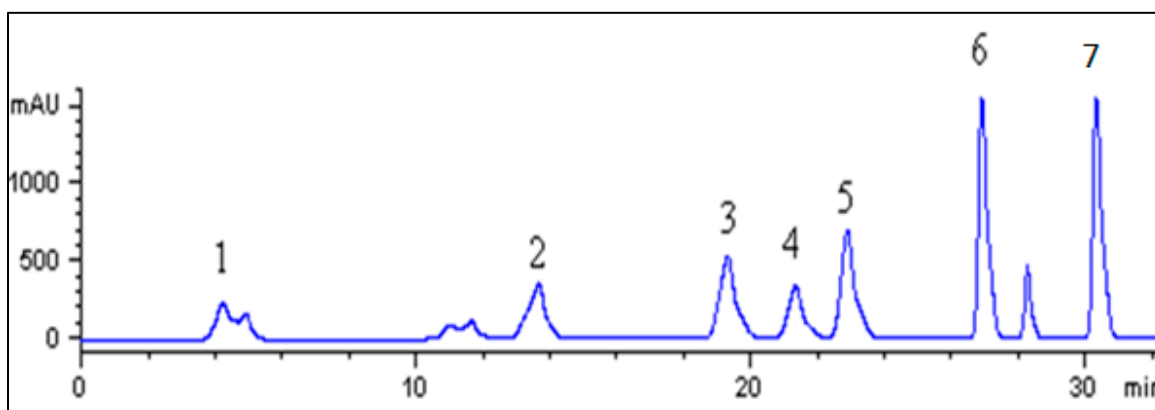
Nakon postavljanja i provere validacionih parametara, uraditi analizu uzoraka suncokreta u kojima su kvantifikovane detektovane fenolne kiseline na osnovu retencionih vremena (t_R) (Slika 34).

Tabela 12. Linearnost odziva detektora za ispitivane fenolne kiseline

Fenolne kiseline	R ²	Jednačina regresije
Ferulinska	0,9982	$y = 34,287x - 14,864$
Trans-cimetna	0,9997	$y = 157,21x - 32,566$
2-Hidroksi cimetna	0,9995	$y = 91,199x - 23,768$
Galna	0,9979	$y = 50,335x + 19,947$
Kafena	0,9970	$y = 50,329x - 17,461$
p-Kumarinska	0,9970	$y = 62,177x + 6,535$



Slika 33. Linearnost odziva detektora ispitivanih fenolnih kiselina



Slika 34. HPLC-DAD hromatogram fenolnih kiselina (1 – galna kiselina, 3 - kafena kiselina, 4 - p-kumarinska kiselina, 5 - ferulinska kiselina, 6 - 2 hidroksi cimetna kiselina, 7 - trans cimetna kiselina)

OSTACI PESTICIDA U POLJOPRIVREDNIM PROIZVODIMA

Cilj savremene poljoprivredne proizvodnje je postizanje visokih i kvalitetnih prinosa poljoprivrednih proizvoda. Time poljoprivredni proizvođači ostvaruju rentabilnu proizvodnju uz povećanje ukupnog fonda hrane koja sve više postaje strateška sirovina današnjeg sveta. U ostvarivanju ovih rezultata i postizanju kvalitativnog i kvantitativnog opravdanog prinosa, nužna je upotreba sredstava za zaštitu bilja. Rastuća zabrinutost javnosti za zdravlje ljudi, a u vezi sa ostacima pesticida u hrani, uveliko je promenila strategiju zaštite useva sa posebnim naglaskom na kvalitet i bezbednost hrane. Ova opasnost se povećava ako se pesticidi ne primenjuju u skladu sa dobrom poljoprivrednom praksom, pri čemu se vrlo često ne poštuje karenca. Postoji bojazan da se primenjuju veće količine pesticida uz veći broj tretmana od preporučenih, ili se tretiranje izvodi preparatima koji nemaju dozvolu za tu namenu. Zdravstvena bezbednost hrane je od izuzetnog značaja za konzumenta, industriju hrane i ekonomiju.

Programi praćenja ostataka pesticida u hrani koji se kontinuirano sprovode, mogu da ukažu na probleme u vezi sa njihovim povećanim sadržajem i da spreče izlaganje potrošača riziku njihovih ostataka. Količina pesticida u hrani treba da bude što niža i u skladu sa različitim Evropskim direktivama, kao što je regulativa EC/396/2005. Najnoviji „Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje“ donet je u Srbiji, 2022. godine (Sl. glasnik RS 91/2022).

Ostaci pesticida u organski proizvedenim biljnim proizvodima

Fokus moderne poljoprivrede danas se prebacuje sa proizvodnje odgovarajuće količine hrane na proizvodnju hrane određenog kvaliteta i zdravstvene bezbednosti. Ovaj cilj ispunjava organska poljoprivredna proizvodnja u kojoj se ne upotrebljavaju insekticidi, herbicidi, fungicidi i đubriva, regulatori rasta (fitohormoni), hormoni, antibiotici i genetski modifikovani organizmi, te predstavlja ultimativnu strategiju svakog naroda koji se brine o svom zdravlju. Suzbijanje bolesti, štetočina i korova je najveći problem sa kojim se sreću proizvođači u organskoj proizvodnji, usled zabrane upotrebe sintetičkih hemijskih preparata koji se koriste u konvencionalnoj poljoprivredi. Iako se u organskoj proizvodnji ne koriste proizvodi za zaštitu bilja, izvesne kontaminacije pesticidima mogu se javiti dospevanjem agrohemijskih preko zemljišta, vode ili zanošenjem pesticida prilikom tretiranja susednih površina.

Evropska Regulativa EC/178/2002 propisuje da je ciljana maksimalno dozvoljena količina (MDK) ostataka pesticida u proizvodu iz organske proizvodnje 0,01 mg/kg. Ovu MDK propisuje i USDA (United States Department of Agriculture) u nacionalnom programu iz 2011. godine, koji podržava USEPA (United States Environmental Protection Agency). Izuzetno je važno imati na umu da se u organskim proizvodima ne tolerišu višestruke detekcije, odnosno, da jedan proizvod ne može sadržavati više detektovanih ostataka pesticida. Naime, nemačko savezno udruženje Bundesverband Naturkost Naturwaren (BNN) koje zastupa interesne grupe u industriji organske hrane, navodi da se u organskim proizvodima mogu detektovati najviše dva ostataka pesticida na nivou 0,01 mg/kg kako bi se i dalje smatrali organskim proizvodima. Prihvaćena orijentaciona vrednost od 0,01 mg/kg je praktično validna za sve proizvode za zaštitu bilja sa izuzetkom supstanci propisanih Apendiksom II EC Regulative broj 889/2008 (implementacija pravila regulative EC/834/2007) i sinergist piperonil butoksid.

Sve ovo ukazuje da je za određivanje ovako niskih MDK potrebna sofisticirana analitička tehnika koja podrazumeva prvenstveno gasnu i/ili tečnu hromatografiju sa masenom ili

tandem masenom spektrometrijom (GC-MS, GC-MS/MS; LC-MS; LC-MS/MS). Pored ovih tehnika, mogu se koristiti i tzv. „high resolution” tehnike, poput LC-TOF, LC-qTOF, GC/GC-TOF, koje će sa dovoljnom osetljivošću i preciznošću moći da detektuju izuzetno niske vrednosti ostataka pesticida u proizvodima iz organske proizvodnje.

Određivanje ostataka pesticida u voću i povrću

Pesticidi čine veoma heterogenu grupu hemijskih jedinjenja, sa različitim biološkim, hemijskim i fizičkim osobinama i zbog toga ne postoji jedinstvena metoda ili tehnika njihovog određivanja. Najefikasniji pristup analizi ostataka pesticida u hrani je upotreba multirezidualnih metoda (MRM) u kojima se u jednom koraku istovremeno može odrediti na stotine pesticida (Vuković, 2012). Povećana briga za zaštitu životne sredine dovela je do smanjenja upotrebe toksičnih rastvarača u samim analizama rezidua pesticida kao i skraćanja vremena pripreme uzoraka. Anastassiades i sar. (2003) su razvili brzu, jednostavnu, jeftinu, efikasnu, robusnu i bezbednu metodu – QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) kako bi se prevazišla ograničenja postojećih metoda pripreme i prečišćavanja ekstrakata. Ova metoda je postala zvanična AOAC metoda broj 2007.01 i BSEN 15662:2008 za određivanje ostataka pesticida u hrani kako gasnom (GC), tako i tečnom (LC) hromatografijom (Bursić i sar., 2012).

Veoma je važno naglasiti da svakom određivanju ostataka pesticida u poljoprivrednim proizvodima prethodi validacija metode kojom se proveravaju određeni parametri i daju karakteristike same metode, odnosno utvrđuju da li je metoda pouzdana i dovoljno tačna za određivanje pesticida u određenom matriksu (poljoprivrednom proizvodu). Postoje različite Direktive EU koje propisuju način validovanja metoda. Do sada najčešće korišćen EU dokument za validaciju je bio SANCO/12571/2013, ali se u laboratorijama širom sveta, sve češće koristi SANTE/11312/2021 dokument. Ključni ciljevi ovog dokumenta su obezbeđivanje usklađenosti procesa ispitivanja sa ekonomičnom internom kontrolom kvaliteta, obezbeđivanje uporedivih analitičkih rezultata, postizanje rezultata prihvatljive tačnosti, izbegavanje dobijanja lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Naime, ovi dokumenti proveravaju performanse analitičke metode, poput granice detekcije (LOD), granice kvantifikacije (LOQ), linearnost, selektivnost, specifičnost, analitički opseg metode, preciznost (ponovljivost, unutarlaboratorijska reproduktivnost, reproduktivnost), tačnost - prinos ekstrakcije (recovery), istinitost (trueness), kao i robusnost (Vuković, 2012).

Parametri validacije metode

Uzorkovanje, transport, obeležavanje i čuvanje laboratorijskih uzoraka

Uzorci hrane za laboratorijsku analizu bi trebali da se uzimaju u skladu sa direktivom EC/63/2002 i SANTE/11945/2015 dokumentom. Ako nije izvodljivo, uzimanje primarnih uzoraka se vrši nasumično unutar lota. Uzorci se u jasno obeleženim polietilenskim ili polipropilenskim vrećama transportuju u laboratoriju. Za većinu svežih proizvoda najvažniji je brz transport do laboratorije. Analize rezidua pesticida koji su isparljivi potrebno je započeti na dan prijema uzorka. Uzorke koji se neće analizirati odmah trebalo bi čuvati pod uslovima koji usporavaju degradaciju pesticida (u zamrzivaču). Osušeni proizvodi se mogu čuvati na sobnoj temperaturi, ali ako vreme čuvanja prelazi dve nedelje, treba ih odložiti u frižider.

Homogenizovanje uzorka

Kako bi se usporilo raspadanje i gubitak pesticida, kompletna procedura pripreme i obrade uzorka treba da bude obavljena u najkraćem mogućem vremenu po dospevanju u laboratoriju. U uzorcima u kojima je uočeno da se sitnjenjem (homogenizacijom) na sobnoj temperaturi ubrzava razgradnja određenih pesticida, preporučljivo je da se homogenizacija izvodi na niskoj temperaturi.

Analitički standardi i osnovni rastvori

„Čist” – analitički standard pesticida poznate čistoće mora se čuvati u zamrzivaču u odsustvu svetlosti i vlage, odnosno, u uslovima koji će što manje doprinositi degradaciji pesticida. Prilikom pripreme osnovnih rastvora mora se zapisati masa izmerenog pesticida i zapremina u kojoj je pesticid rastvoren. Nakon dodavanja organskog rastvarača, rastvor se obavezno mora promućkati.

Osnovni rastvori pojedinačnih pesticida se moraju čuvati na niskim temperaturama u laboratorijskim posudama koje neće dozvoliti isparavanje rastvarača, kao ni prodiranje vode.

Prema postojećim podacima, smatra se da je osnovni rastvor pesticida stabilan najmanje pet godina ukoliko je kao rastvarač korišćen toluen ili aceton, odnosno tri godine ukoliko se koristi acetonitril, metanol ili etilacetat. Rastvori ditiokarbamata i visoko isparljivih fumiganata uvek se moraju pripremati pre analize.

Validacija analitičke metode za određivanje ostataka pesticida u hrani

Specifičnost i selektivnost

Cilj svake analitičke metode je sposobnost da se pomoću nje odredi samo željeni analit u uzorku. Uzorci koji sadrže samo ispitivani analit su retki i najčešće su to sintetički uzorci. Pojmovi specifičnost i selektivnost analitičkih metoda su uvedeni kako bi se iskazali njihovi kvaliteti i primena. Specifičnost se može definisati kao mogućnost određivanja samo jednog analita (pesticida) u prisustvu drugih komponenata u uzorku bez ometanja, dok se selektivnost odnosi na mogućnost određivanja grupe sličnih sastojaka u uzorku. Da bi se u hromatografskim metodama dokazala selektivnost metode potrebno je dobiti hromatogram sa jasno označenim standardima na najnižem kalibracionom nivou, zatim hromatograme blank/matriks uzorka, kao i uzorka obogaćenog na nivou kvantifikacije i to za svaki analit i svaki matriks (Vuković, 2012).

Linearnost / kalibraciona funkcija

Obogaćivanje uzorka je kritična tačka u procesu validacije. Ukoliko je uzorak kriogeno samleven i ekstrahovan u zamrznutom stanju, obogaćivanje uzoraka mora biti izvedeno dok je uzorak zamrznut i odmah se počinje sa ekstrakcijom. Ukoliko je uzorak na sobnoj temperaturi ekstrahovao se 20 minuta nakon obogaćivanja.

Linearnost kalibracione funkcije je jedan od osnovnih i veoma bitnih parametara validacije metode. Kalibraciona funkcija predstavlja zavisnost nekog analitičkog signala od sadržaja analita u uzorku. Na osnovu definisane kalibracione funkcije, a na osnovu vrednosti analitičkog signala u uzorku, moguće je vrlo jednostavno određivanje sadržaja analita u ispitivanom uzorku. Zavisnost između analitičkog signala i sadržaja analita u uzorku po pravilu treba da bude linearna u određenom opsegu sadržaja analita. Često se dešava da se ne dobija linearna zavisnost između ove dve veličine. U tim slučajevima se traži neka

odgovarajuća matematička zavisnost ili se pristupa matematičkim operacijama i transformacijama kako bi se postigla linearnost.

Preporučuje se kalibracija na više nivoa (tri ili više). Broj reprezentativnih analita za kalibraciju u svakoj seriji mora biti najmanje 15, plus 25% od ukupnog broja analita u okviru svake instrumentalne metode (SANTE/11312/2021). Na primer, ako analitički opseg instrumentalne metode pokriva 40 analita, sistem mora biti kalibrisan sa najmanje 25 reprezentativnih analita. Ukoliko je obim analize 20 analita, ili manje, onda svi analiti moraju biti kalibrisani.

Većina pesticida se analizira multirezidualnim metodama koje obuhvataju stotine različitih komponenata radi identifikacije i kvantifikacije. Uticaj matriksa predstavlja velik izazov za pouzdano kvantifikovanje analita. Uticaj matriksa se određuje u LC i GC analizi sa masenom spektrometrijom i mora se oceniti u okviru validacije metode. Kalibracija u matriksu se najčešće koristi da bi se superponirao uticaj matriksa. Za kalibraciju bi trebalo koristiti uzorke blank matriksa (SANTE/11312/2021). Prema najnovijim dostupnim literaturnim podacima razblaživanje uzorka je najsavremeniji način smanjenja uticaja matriksa, ali to zahteva korišćenje visoko osetljivih instrumenata. Osim toga, velika razblaženja ekstrakta uzorka zahtevaju visoku osetljivost, jer bi čak i mala odstupanja mogla da rezultiraju značajnim greškama. Novorazvijeni QQQ MS instrument sa poboljšanom osetljivošću omogućava veću fleksibilnost u razblaživanju uzorka (Glauner i sar., 2013). Gotovo nijedna tehnika prečišćavanja ne može da ukloni sve komponente matriksa iz sirovog ekstrakta. Komponente matriksa injektovane u hromatografski sistem mogu dovesti do pojave lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata. Matriks efekat može imati različite uticaje kao što su promena signala i mnoštvo specifičnih fragmenata jona (Fernandez-Alba, 2014). U praksi se može sresti još jedan način poništavanja uticaja matriksa – upotreba izotopski obeleženih internih standarda. Njihova upotreba je skupa, naročito u multirezidualnim analizama, gde je za svako jedinjenje ili grupu potreban odgovarajući standard (Vuković, 2012).

Trenutno ne postoji regulativa koja propisuje dozvoljeno odstupanje za uticaj matriksa (ME), ali dobra laboratorijska praksa smatra da je $\pm 15\%$ prihvatljivo odstupanje (Vuković, 2012).

Tačnost metode

Tačnost metode se definiše kao mera u kojoj rezultati analize odgovaraju pravoj vrednosti. Tačnost se može izraziti i kao bliskost slaganja između prihvaćene i nađene vrednosti (Vuković, 2012). Može biti određena na nekoliko načina ali se najčešće izvodi kao recovery test. Recovery test se koristi kada nemamo sertifikovani referentni materijal. Kontrolni uzorak može biti obogaćen poznatom masenom koncentracijom ispitivanog analita. Posle ekstrakcije analita iz matriksa i hromatografske analize, njegov prinos (recovery) može se odrediti poređenjem dobijenih vrednosti ekstrakta sa vrednostima analita rastvorenog u čistom rastvaraču. Vrednosti recovery testa iz validacione studije se mogu koristiti za korigovanje konačnih rezultata. Prilikom izvođenja recovery testa, masene koncentracije koje se koriste za obogaćivanje kontrolnih uzoraka treba da su: na nivou granice kvantifikacije, jedna na sredini linearnog opsega, a treća na samom kraju kalibracione krive (Bursić, 2011).

Preciznost metode

Preciznost metode izražava bliskost slaganja između serije merenja dobijenih višestrukim uzimanjem uzoraka iz istog homogenog uzorka pod propisanim uslovima. Preciznost

analitičkog postupka se obično izražava preko standardne devijacije ili koeficijenta varijacije serije merenja. Preciznost se može posmatrati kroz tri nivoa: ponovljivost, intermedijarna reproduktivnost i reproduktivnost (Bursić, 2011).

Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije metode (LOD – limit of detection) predstavlja najmanju koncentraciju ili količinu nekog analita u uzorku koja može biti detektovana, ali ne mora biti određena i sa prihvatljivom tačnošću kvantifikovana. Često se ovaj pojam u procesu validacije naziva granica detekcije. LOD se određuje na osnovu odnosa signala i šuma, koji predstavlja koncentraciju analita koja na datom instrumentu daje signal od 2,5 do 5 puta veći od signala šuma instrumenta (Vuković, 2012).

Granica kvantifikacije metode (LOQ – limit of quantification) se definiše kao najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može pouzdano odrediti datom analitičkom metodom sa određenim stepenom sigurnosti (najčešće 95%). LOQ se razlikuje od LOD obično pet do deset pa i više puta. Prilikom praktičnog određivanja LOD i LOQ vrednosti, mora se uraditi analiza slepe probe i uzorka sa vrlo malim sadržajem analita, i to po dva paralelna određivanja u šest ponavljanja, tj. ukupno dvanaest proba (npr. svakog dana se rade dve probe, tokom šest dana).

VEŽBA 13. ODREĐIVANJE OSTATAKA PESTICIDA U POVRĆU

Cilj vežbe

Određivanje ostataka pesticida u poljoprivrednim proizvodima uz QuEChERS ekstrakciju (Slika 35) i hromatografsku analizu upotrebom LC-MS/MS u cilju provere zdravstvene bezbednosti.

Reagensi

Acetonitril, HPLC čistoće; QuEChERS kitovi za ekstrakciju pesticida iz uzorka i to: ekstrakcioni kitovi koji sadrže MgSO_4 , NaCl , $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \times 1,5\text{H}_2\text{O}$ i $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 5,5\text{H}_2\text{O}$ (kivete od 50 mL), disperzivni kitovi za prečišćavanje pesticida iz uzorka koji sadrže MgSO_4 i PSA (kivete od 15 mL).

Standardi pesticida

U radu će se koristiti radni rastvori mešavine 20 različitih pesticida masene koncentracije 1,0 i 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Kao interni standard (IS) će se koristiti karbofuran D-3, masene koncentracija 10,0 $\mu\text{g/mL}$.

Potrebna aparatura i pribor

Staklene čaše od 200 mL, mikser za homogenizovanje uzorka, tehnička vaga, laboratorijska kašika, centrifuga, štoperica, ultraturaks za mućkanje uzoraka, pipete od 10 mL i mikropipete (100-1000 μL i 1000-10000 μL), stalak za odlaganje kiveta, mikrofilteri 45 μm (Agilent) za filtriranje ekstrakta i staklene vijale sa zatvaračima za autosempler. LC-MS/MS hromatogram Agilent 6410B QQQ.

Postavljanje validacionih parametara

Pre nego što se uradi analiza realnih uzoraka, usled osetljivosti MS/MS i uticaja matriksa, neophodno je postaviti validacione parametre metode za sve ispitivane matrikse, odnosno, za svaki poljoprivredni proizvod (lubenica, krastavac, bundeva, tikva, paradajz, paprika, krompir, celer, rukola, dinja, kukuruz, pšenica, soja, ovas, jabuka, kruška, jagode i dr). Prema uslovu QuEChERS metode, prilikom analize povrća i voća uzima se 10 g homogenizovanog uzorka, dok se za uzorke žitarica uzima 5 g.

Prinos ekstrakcije se proverava za nivoe obogaćenja od 0,01 i 0,10 mg/kg.

- Za nivo 0,01 mg/kg: u 10 g uzorka dodati 100 μL IS (10 $\mu\text{g/mL}$) i 100 μL radnog rastvora standarda masene koncentracije 1,0 $\mu\text{g/mL}$.
- Za nivo 0,10 mg/kg: u 10 g uzorka dodati 100 μL IS (10 $\mu\text{g/mL}$) i 100 μL radnog rastvora standarda masene koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$.

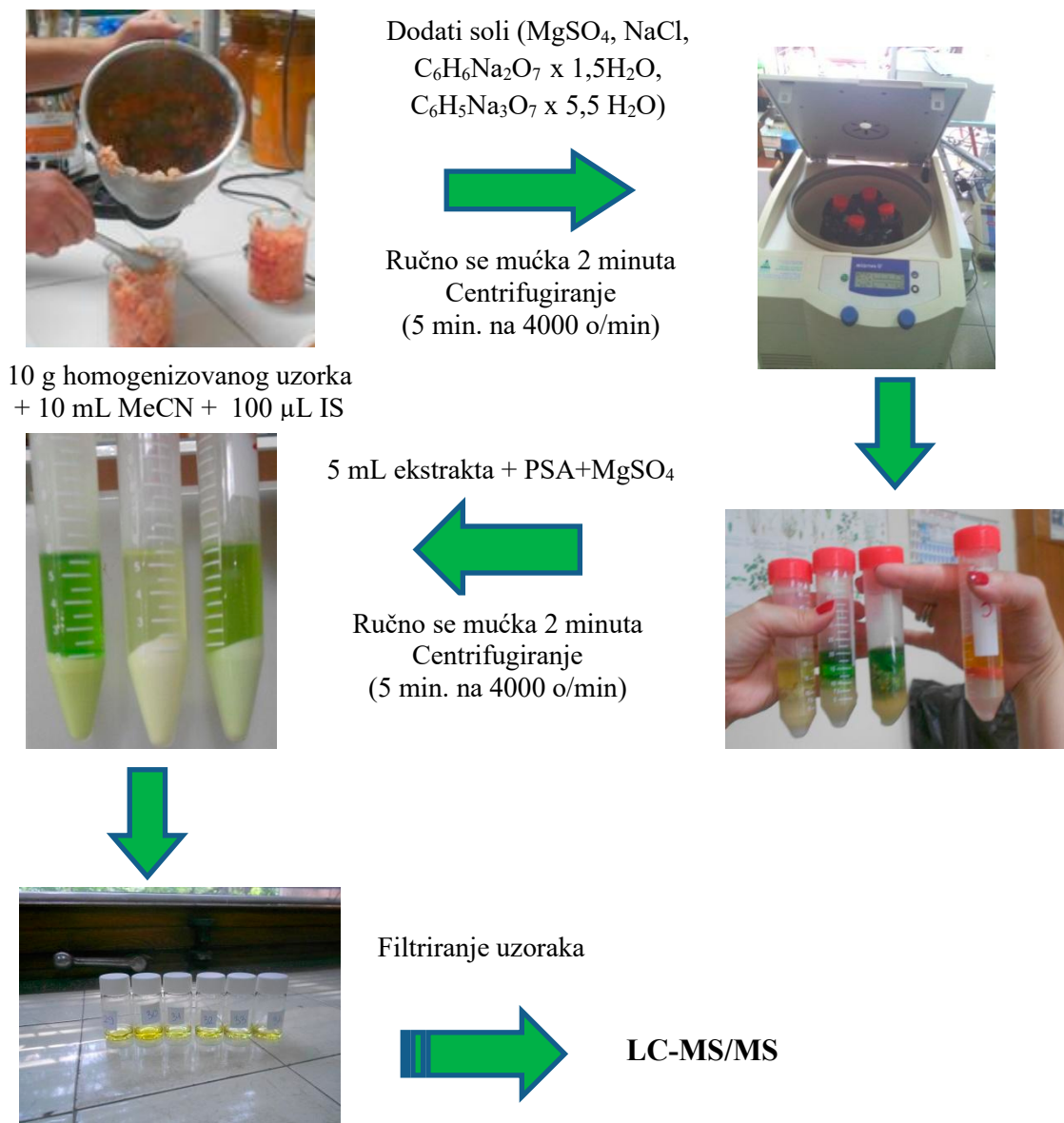
Linearnost se ispituje za koncentracije od 0,010; 0,025; 0,050; 0,100 i 0,200 $\mu\text{g/mL}$, tako što se u upareni ekstrakt prečišćenog uzorka (1 mL) doda kalibracioni rastvor smeše standarda sa IS. Zbog značajnog uticaja matriksa na ispitivane pesticide koji se može javiti kod LC-MS/MS, neophodno je pre kvantitativnog određivanja ispitati u kojoj meri je izražen uticaj matriksa i da li se kalibracija u rastvaraču može koristiti za kvantifikaciju. Da bi se ispitao uticaj matriksa, pored kalibracije pesticida u rastvaraču (koje su pripremljene), priprema se i serija koncentracija u matriksu (matrix-matched calibration, MMC).

Da bi se ispitala linearnost metode ispitivan je odgovor MS (response) za kalibracione standarde smeše pesticida u koncentracionom opsegu od 0,010 do 0,20 $\mu\text{g/mL}$, što odgovara koncentraciji pesticida u uzorku od 0,010 do 0,20 mg/kg.

Granica detekcije i kvantifikacije

LOQ su zadane na osnovu regulative i potvrđene eksperimentalnim putem, obogaćivanjem kontrolnog uzorka matriksa smešom standarda tako da krajnja masena koncentracija bude 0,010 mg/kg. Vrednosti za LOD su izračunate softverskim putem tako da odnos signal/šum u hromatogramima za LOQ bude jedan prema pet.

Ekstrakcija obogaćenih uzoraka i uzoraka za analizu



Slika 35. Shema koraka QuEChERS ekstrakcije

Uslovi LC-MS/MS razdvajanja

Potrebno je podesiti uslove hromatografskog razdvajanja LC-MS/MS (Tabela 13).

Tabela 13. LC-MS/MS uslovi

Instrument	Agilent 6410B QQQ
Kolona	Zorbax XDB C18, 50 x 4,6 mm, 1,8 μ m, Agilent
Jonski izvor	Multimod, MMI
Tip jonizacije	+ESI
Drying gas flow / Drying gas temp.	5 ml/min /325 °C
Vaporizer temp. / Nebulizer gas	220 °C/40 psi
Opseg merenja masa	m/z 70-2000
Napon kapilare	2000 V
Autosempler	h-ALS-SL+, model G1367D
Zapremina injektovnja uzoraka	Vinj=10 μ L
Tip injektovanja/ Binarna pumpa	sa ispiranjem/ BinPump-SL, model G1312B
Mobilna faza	A: 0,1% HCOOH u MeOH; B: 0,1% HCOOH u vodi
Odnos mobilne faze, protok	A:B=90:10; 0,4 ml/min 0 min-90% B; 2 min-90% B; 15 min-10% B; 20 min 2% B; 23 min -2% B
Termostat i temperatura kolone	Column-SL, Model G1316B, sobna temperatura

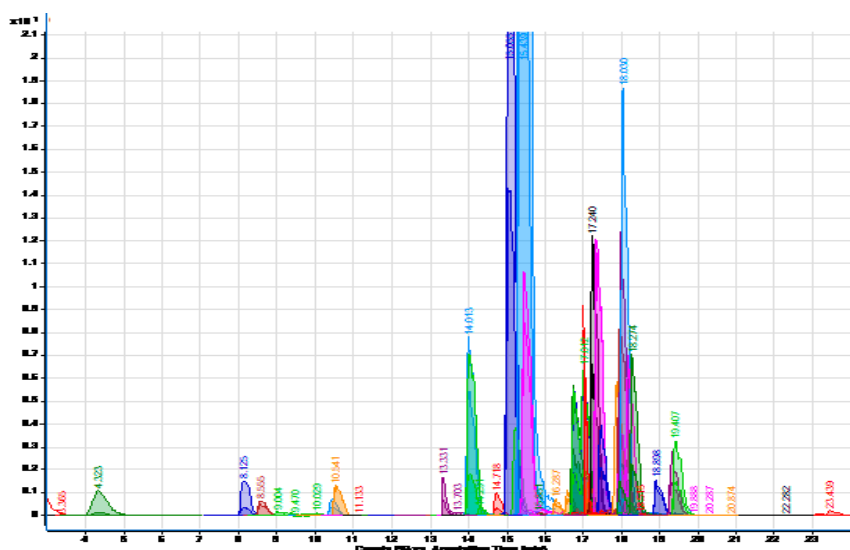
Očekivani rezultati

Pre nego što se pristupi kalibraciji ili kvantifikaciji pesticida, neophodno je postaviti akvizicione parametre masenog spektrometra - odrediti reakcije za praćenje jona (MRM) i naći energiju fragmentacije i kolizione ćelije (CE) pri kojoj će odgovor ispitivanog pesticida biti najveći za date uslove (Tabela 14).

Tabela 14. MRM prelazi sa retencionim vremenima pojedinih ispitivanih pesticida

Pesticid	Formula	M (g/mol)	Prekursor jon, m/z		Produkt jon, m/z	Frag (V)	CE (V)	Rt (min)
Acetamiprid	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	223	223	→	125,8	120	10	11,45
			223	→	55,7	120	10	
Azoksistrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403	404,1	→	372	100	9	13,17
			404,1	→	344,1	100	25	
Klotianidin	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	249,7	224,2	→	109,1	100	10	15,54
			224,2	→	167,1	100	5	
Karbendazim	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191	192,1	→	132	104	34	11,76
			192,1	→	160,1	104	18	
Karbofuran	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221	222,1	→	123	100	20	16,93
			222,1	→	165,1	100	20	
Ciprokonazol	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	291	292,1	→	125	120	29	14,24
			162	→	70	120	20	
Dihlorvos	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	220	221,1	→	109	80	5	4,76
			221,1	→	127	80	15	
Difenokonazol	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	405	406,1	→	251	130	25	18,15
			406,1	→	337	130	20	
Dimetomorf	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	387,9	388,1	→	301,1	100	9	16,56
			388,1	→	165	100	10	
Imidakloprid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255,7	256	→	208,7	130	21	10,30
			256	→	174,6	130	50	
Indoksakarb	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	527,8	528,1	→	203	80	9	18,12
			528,1	→	150	80	25	
Krezoksime-til	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313	336,2	→	246,2	120	15	16,6
			336,2	→	229,2	120	15	
Karbofuran	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,2	222,1	→	165,1	90	25	14,0
Malation	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330	331	→	127	90	5	14,22
			331,1	→	99	90	21	
Metalaksil	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279	280,1	→	220,1	90	9	10,03
			280,1	→	192,1	90	13	
Piraklostrobin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	387	388,1	→	194	100	10	17,74
			388,1	→	163	110	10	
Piriprosifen	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	322	322	→	227,1	100	10	19,47
				→	185,1	110	10	
Tebukonazol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307	308	→	70	100	25	16,92
			308	→	125	100	25	
Thiamethoxam	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	291,7	292	→	211	150	10	9,13
			292	→	118	150	10	
Tebufenpirat	C ₁₈ H ₂₄ ClN ₃ O	335	334,2	→	145,1	60	10	19,19
			334,2	→	121,7	60	5	

Tipičan LC-MS/MS hromatogram ispitivanih pesticida, prikazan je na slici 36.

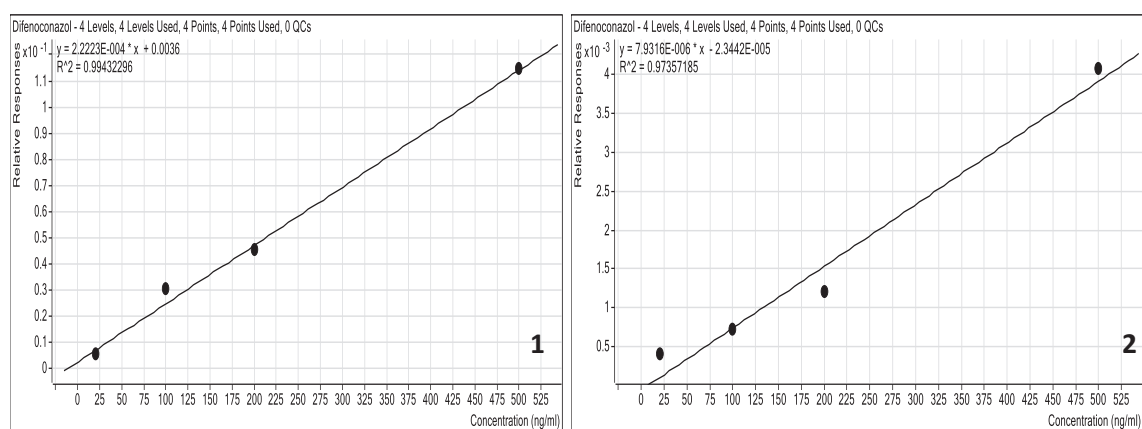


Slika 36. LC-MS/MS hromatogram standarda koncentracije 0,1 µg/mL

Linearnost odziva detektora

Za sve ispitivane pesticide, u svim matriksima, potrebno je da se dobije koeficijent korelacije $R^2 > 0,99$. Za pojedine pesticide će se iz nagiba kriva u matriksu i rastvaraču izračunati uticaj matriksa.

Primer kalibracione krive u matriksu i u rastvaraču, dat je na slici 37.



Slika 37. Kalibraciona kriva difenokonazola u jabuci kao matriksu (1), kalibraciona kriva difenokonazola u organskom rastvaraču (2)

LOD i LOQ

Vrednosti za granice detekcije će se izračunati pomoću kalkulatora „Calculate Signal-to-Noise“ u okviru Qualitative MussHunter B.03.01 programa (Agilent Technologies, 2010) na osnovu odnosa standardne devijacije visine pika i visine šuma na hromatogramima za najniže vrednosti kalibracionog standarda smeše pesticida (5 ng/mL) u matriksima. Za sve ispitivane pesticide postavlja se LOQ od 0,01 mg/kg, dok se LOD vrednosti izračunavaju preko softvera aparata.

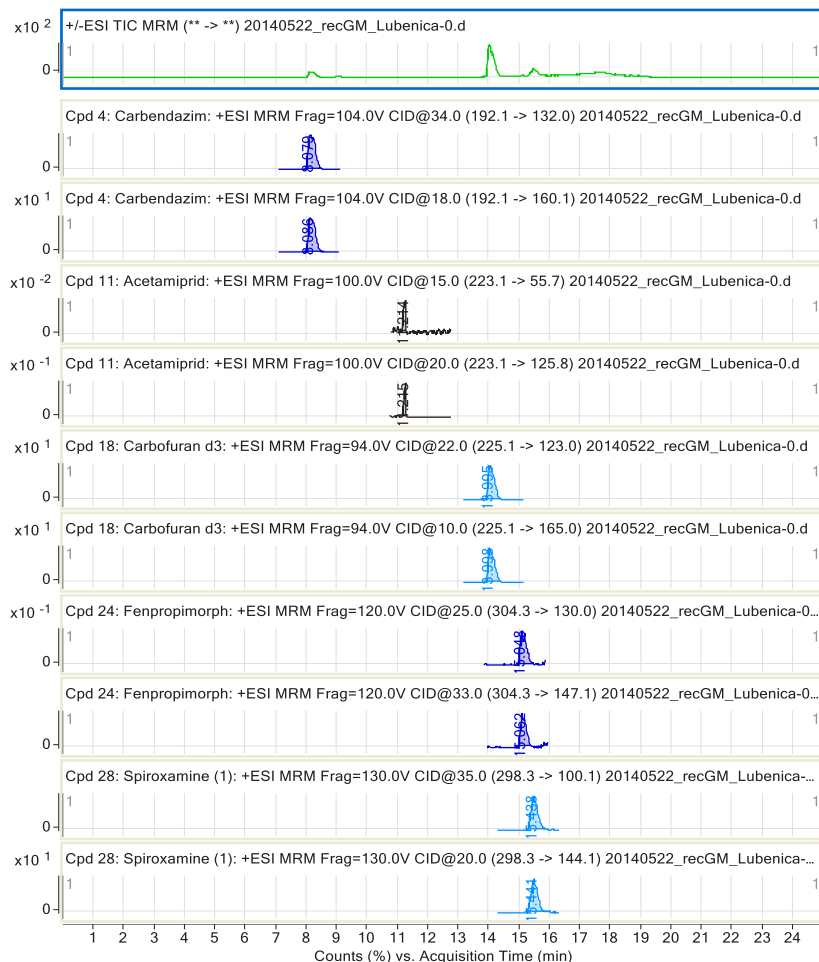
Tačnost i preciznost

Tačnost metode je ispitana preko prinosa ekstrakcije (Rec, %) obogaćivanjem kontrolnog uzorka (blank uzorak) na dva nivoa obogaćenja (0,01 i 0,1 mg/kg) u tri ponavljanja.

Prosečni prinosi ekstrakcije bi trebalo da se kreću u intervalu od 70,0% do 120,0% sa relativnom standardnom devijacijom (RSD) do 20,0%, čime bi bili zadovoljeni uslovi SANTE/11312/2021 dokumenta.

Izračunavanje sadržaja detektovanih pesticida

Analizom uzoraka, dobijaju se hromatogrami (Slika 38), dok se preko pojedinačnih kalibracionih kriva, LC-MS/MS, direktno preračunava sadržaj ostataka detektovanih pesticida, odnosno vrši kvantifikacija rezultata detektovanih pesticida.



Slika 38. Ukupan jonski hromatogram (TIC) sa MRM hromatogramima detektovanih pesticida u uzorku lubenice

MIKOTOKSINI

Mikotoksini predstavljaju veliki izazov današnjice u pogledu bezbednosti hrane. Radi se o sekundarnim jedinjenjima koje produkuju razne vrste gljiva pri rastu u odgovarajućim uslovima. To su toksična jedinjenja koja nemaju dovoljno velike molekule, te životinjski i ljudski organizmi ne stvaraju antitela i tako ostaju trajno nezaštićeni na njihovo delovanje. Bolesti koje nastaju usled ingestije mikotoksina se nazivaju mikotoksikoze.

Mikotoksini se mogu proizvesti na polju, kao i tokom skladištenja. Oni mogu da kontaminiraju hranu i hranu za životinje i to najčešće žitarice. Jedan od značajnih problema je i visoka termička stabilnost velike većine mikotoksina koja ih čini otpornim na temperaturama kuvanja, te se na taj način dodatno povećava rizik od izloženosti stanovništva mikotoksinima.

Većinu mikotoksina u hrani i hrani za životinje proizvode tri roda gljivica: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Neke gljive su u stanju da produkuju više vrsta mikotoksina, a takođe se i pojedini mikotoksini javljaju kao produkti nekoliko vrsta gljiva. Najčešće zastupljeni mikotoksini su iz grupe aflatoksina, ohratoksina, trihotecena i zearalenona.

Mikotoksini mogu dovesti do akutne ili hronične toksičnosti u zavisnosti od vrste toksina i unete količine. Akutne intoksikacije kod životinja mogu dovesti do oštećenja bubrega i jetre, promena na centralnom nervnom sistemu, dermatotoksičnog efekta i hormonalnih poremećaja. Uzimajući u obzir zdravstvene, ali i ekonomske posledice nastale usled kontaminacije gljivama, mikotoksini su danas dostigli vrhunac negativne popularnosti u oblasti ishrane ljudi i životinja.

Vremenske prilike, koje su u svetu sve više promenljive, izazivaju stres biljaka što uslovljava povećanu infekciju gljivama, parazitskim i saprofitskim gljivama, koje normalno ne predstavljaju problem, ako su dobri uslovi gajenja i žetve biljaka. Razmnožavanje gljivica na stresiranim biljkama smanjuje kvalitet i kvantitet roda, te uslovljava sintezu mikotoksina. Posledica svega je činjenica da se smatra da je oko 25% biljne hrane u svetu, kontaminirano mikotoksinima.

Uništavanjem gljiva zaustavlja se produkcija mikotoksina, ali se ne mogu uništiti oni koji su već stvoreni. Većina mikotoksina su hemijski stabilna jedinjenja, prisutna u hrani dugo posle njihovog stvaranja, iako su u međuvremenu gljive koje su ih produkovale izumrle ili uništene na neki drugi način.

Pored prisustva toksigenih gljiva, za produkciju mikotoksina potrebni su odgovarajući supstrat, adekvatna količina vlage, odgovarajuća temperatura i prisustvo kiseonika. Najviše im odgovara povećana vlažnost (između 13% i 22%), velika vlažnost vazduha (iznad 80%) i srazmerno visoka temperatura (20-35 °C). Razvijaju se u velikom rasponu pH (1,5-8,8), s tim da im više odgovara viši pH.

Podneblja sa umereno kontinentalnom klimom za koju je karakteristična visoka vlažnost, kao što su Evropa, SAD i Kanada, su povoljna za razvoj *Fusarium* i *Penicillium* vrsta (deoksinivalenola, zearalenona, ohratoksina i T-2 toksina). Topla i vlažna klimatska područja, kao što su Latinska Amerika, azijske države i neki delovi Australije, s druge strane, su idealni za razvoj *Aspergillus* vrsta i proizvodnju kancerogenih aflatoksina. Zimski meseci posebno pogoduju sintezi zearalenona, deoksinivalenola, T-2 toksina i ohratoksina u umerenim klimatskim uslovima. Pored toga, zbog trgovine žitaricama koje se koriste za životinjsku hranu, mikotoksini se transportuju širom sveta, tako da nije neuobičajeno da se pojave u hranivu i zemlji u kojoj se inače prirodno ne javljaju.

Od svih mikotoksina, *Fusarium* mikotoksini (deoksinivalenol, zearalenon, fumonizin, moniliforminska i fuzarična kiselina) se smatraju najrasprostranjenijim u hrani za životinje, kako u zrnastim žitaricama, tako i kabastoj hrani. Naša zemlja se nalazi u umereno kontinentalnom klimatskom pojasu gde su na gajenim kulturama najčešće izolovane gljive iz roda *Fusarium*, i posledično, najčešće utvrđeni mikotoksini iz grupe tzv. fuzarijumskih mikotoksina.

Akutne mikotoksikoze se retko javljaju u uslovima savremene stočarske proizvodnje, međutim male doze mikotoksina (često ispod nivoa detekcije) mogu da dovedu do smanjene proizvodnje i povećane podložnosti infektivnim oboljenjima kod životinja. Biohemijske promene koje se javljaju tokom mikotoksikoza se razlikuju, ali se najvažnijim posledicama mikotoksikoza smatraju peroksidacija lipida i kidanje membrane ćelija, apoptoza i ugrožena sinteza DNA, odnosno proteina.

Stepen osetljivosti prema mikotoksinima varira u zavisnosti od mnogobrojnih faktora: koncentracije i dužine izloženosti mikotoksinu, od vrste i farmakodinamičkih osobina mikotoksina (apsorpcija, hidrofilnost/lipofilnost, distribucija u tkivima i organima, metabolizma i vremena poluraspada i eliminacije), od vrste, pola, starosti i zdravstvenog statusa životinje.

Naše razumevanje značenja mikotoksina kao faktora koji utiče na zdravstvenu ispravnost namirnica i na zdravlje ljudi stalno se razvija i raste. Dostupni rezultati istraživanja na terenu i u skladištima pokazuju da kontaminacija namirnica i hrane za životinje kancerogenim mikotoksinima nije više pojava na koju se sumnja, nego je to dokazan fenomen.

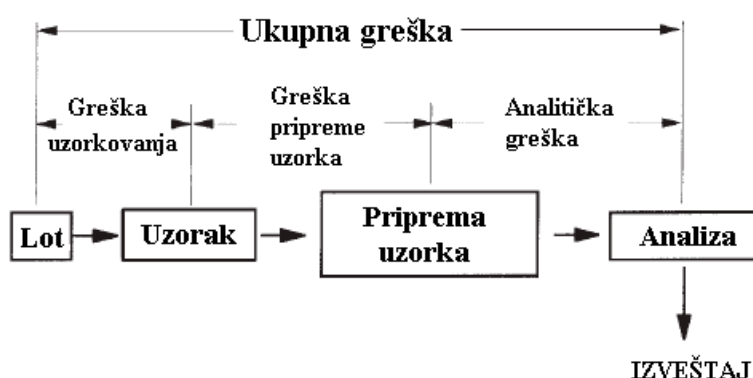
Na osnovu dokaza o osetljivosti mnogobrojnih vrsta životinja na različite efekte mikotoksina, teško je poverovati da i kod ljudi ne dolazi do sličnih efekata. Regionalne studije akutnih i hroničnih bolesti ljudi, zajedno sa kontaminacijom hrane aflatoksinom i ostalim mikotoksinima u istim regionima, potvrđuju sumnje u verovatno uključanje mikotoksina u bolesti ljudi izazvane takvom hranom. Stoga je najvažnije da se prevencijom onemogućiti kontaminacija namirnica i hrane za životinje mikotoksinogenim vrstama gljiva na njivi, u skladištu, na farmi, u trgovini i u domaćinstvu. Zaštita namirnica i hrane za životinje od kontaminacije mikotoksinima mora se sprovoditi u čitavom lancu hrane, od početka proizvodnje pa sve do stola potrošača.

Razvoj i validacija metode za određivanje mikotoksina nije jednostavan posao. Odrediti koncentraciju mikotoksina u $\mu\text{g/kg}$ ili ppb nivou je veoma težak i zahtevan analitički poduhvat. Iz navoda mnogih autora može se zaključiti da mikotoksini predstavljaju jedinstven analitički izazov. Sa jedne strane, potrebno je uzorkovati reprezentativan uzorak, dok sa druge treba postići niske granice detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ) u skladu sa Pravilnikom o maksimalnim koncentracijama određenih kontaminanata u hrani (Sl. glasnik RS 110/2023).

Analiza prirodno prisutnih organskih komponenata u hrani uključuje nekoliko ključnih koraka: uzorkovanje, ekstrakcija, prečišćavanje, koncentrovanje, razdvajanje, detekcija, kvantifikacija, konfirmacija i izveštaj. Prilikom svakog koraka, moguće je napraviti greške (Slika 39), zbog toga je potrebno posebnu pažnju posvetiti svakom koraku kako bi se greške svele na minimum.

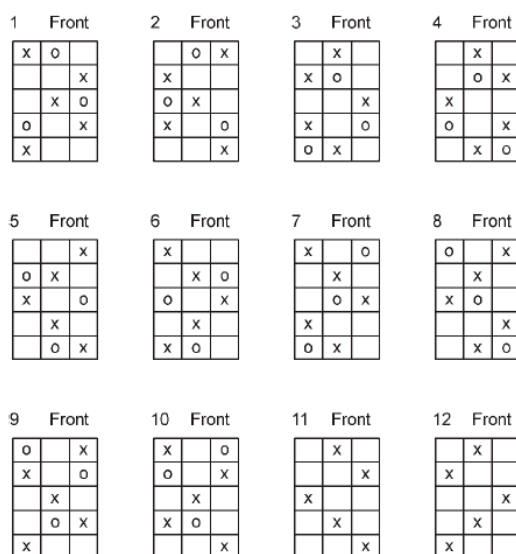
Uzorkovanje. Krajnji uspeh svake analitičke procedure zavisi od pripreme test laboratorijskog uzorka za analizu, koji treba istinski da reprezentuje ceo uzorak. Uzimanje uzorka za analizu odvija se u tri faze: uzimanje reprezentativnog uzorka, mlevenje (homogenizacija) uzorka i uzimanje uzorka za laboratorijsku analizu. Cilj uzorkovanja je

dobijanje uzorka za laboratorijsku analizu, koji predstavlja i karakteriše osobine odgovarajućeg kontigenta hrane u celini. Koliko je važno pravilno formiranje laboratorijskog uzorka navodi i Freese i sar. (2000) koji su sakupili 225 kg osnovnog uzorka ječma i podelili u 16 poduzoraka po 0,1 kg; 16 poduzoraka po 0,8 kg i 16 poduzoraka po 7 kg. Poduzorci su samleveni i za analizu je uzeto 50 g. Rezultati proistekli iz ovog istraživanja su pokazali da povećanje količine poduzorka ima manji uticaj na određivanje koncentracije deoksinivalenola (DON) u odnosu na razlike u rezultatima određivanja sa manjim količinama poduzoraka. Sve ovo upućuje na činjenicu da je pravilno uzorkovanje najvažniji deo u analizi i da u greškama koje mogu nastati tokom mikotoksikološke analize, uzorkovanje učestvuje i do 82% (Whitaker, 2006).



Slika 39. Greške prilikom analize mikotoksina

Postavlja se pitanje kako izvesti pravilno uzorkovanje? Prema EC No 401/2006, uzorkovanje se zasniva na uzimanju od 3-100 inicijalna uzoraka, u zavisnosti od ukupne količine lota, do količine od 10 kg, od koje se nakon homogenizacije uzima uzorak za laboratorijsku analizu. USDA (US Department of Agriculture), na primer, predlaže da se pravilno uzorkovanje materijala koji se nalazi u kontejnerima izvodi kao što je prikazano na Slici 40. Sami uređaji za uzorkovanje moraju biti dovoljno dugački kako bi doprli do dna kontejnera i kako bi se uzorkovanje izvršilo sa pet, odnosno osam mesta u kontejneru (Whitaker, 2006).



Slika 40. Pravilno uzorkovanje uzorka za mikotoksikološku analizu (Whitaker, 2006)

Ekstrakcija. Nakon pripreme reprezentativnog uzorka za analizu, sledi ekstrakcija ovih analita iz ispitivanog matriksa (uzorka). Svrha ekstrakcije je da iz matriksa u rastvarač pređe što veća količina mikotoksina. Efikasnost ekstrakcije se ogleda u prinosu ekstrakcije metode i u idealnom slučaju bi iznosila 100%. Naravno, nije važna samo veličina prinosa ekstrakcije, već i njegova ponovljivost. Kako bi se osigurala maksimalna ekstrakcija, najvažniji je dobar izbor organskog rastvarača ili smeše rastvarača za ekstrakciju mikotoksina iz određenog matriksa. Rastvarač mora biti niske toksičnosti, isparljiv i stabilan, zato što će rastvor biti kasnije koncentrovan upotrebom toplote pod redukovanim pritiskom.

Literaturni podaci navode da su metanol i acetonitril najviše korišćeni organski rastvarači za ekstrakciju mikotoksina. Mešavina rastvarača sa vodom je često efikasnija od čistog organskog rastvarača. Smatra se da prisustvo vode dovodi do bubrenja matriksa, čime se omogućava pucanje ćelija proizvoda i potpomaže oslobađanje mikotoksina. Različiti organski rastvarači, kao i njihove smeše u različitim zapreminskim odnosima, se koriste za ekstrakciju mikotoksina iz biljnog materijala. Najčešće su korišćeni vodeni rastvori acetonitrila, metanola i etil-acetata u različitim zapreminskim odnosima.

Ekstrakcija mikotoksina može biti izvedena tečno-tečnom ekstrakcijom (LLE), koja koristi velike količine organskih rastvarača u kojoj se toksini rastvaraju u jednom rastvaraču, dok ostale komponente matriksa ostaju u drugom. Rastvarači poput heksana i cikloheksana se koriste da uklone nepolarne komponente poput lipida i holesterola. Međutim, sam postupak ekstrakcija dugo traje i zavisi od matriksa, kao i od ispitivanog mikotoksina. Nedostatak LLE leži u mogućnosti gubitka mikotoksina usled njihove adsorpcije na zidove staklenih posuda.

Povećana potreba da se smanji potrošnja rastvarača i vreme izvođenja postupka ekstrakcije dovelo je do komercijalnog uvođenja nekoliko alternativnih postupaka ekstrakcije kao što je ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju (SFE). Najveća prednost SFE u analizi hrane je mogućnost visoke ekstrakcione selektivnosti, dobijanja relativno čistog, najčešće koncentrovanog ekstrakta. SFE se zasniva na upotrebi ugljen dioksida kao ekstrakcionog reagensa, koji pod određenim pritiskom i temperaturom prelazi u superkritično stanje. Prednost ove ekstrakcione tehnike je nekorišćenje organskih rastvarača, što pozitivno utiče na zaštitu životne sredine. SFE se sporadično koristi za ekstrakciju mikotoksina u laboratorijama, uglavnom zbog visoke cene i neophodnosti optimizacije velikog broja parametara za svaki matriks.

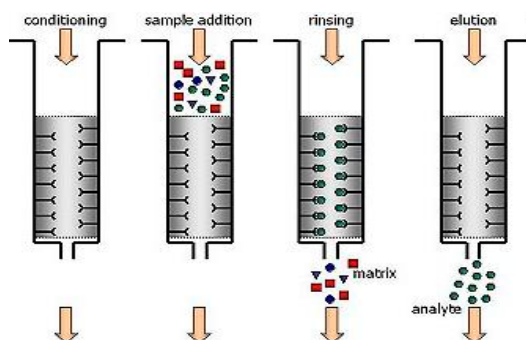
Mnogi analitičari koriste ekstrakciju na čvrstoj fazi (solid phase extraction - SPE), koja se pokazala kao odlična za ekstrakciju mikotoksina iz različitih matriksa. Uzorak se sipa na aktiviranu čvrstu fazu kolone pod redukovanim pritiskom. U postupku ispiranja, većina supstanci koje mogu ometati detekciju se uklanjaju, a zatim se mikotoksini eluiraju drugim rastvaračem.

Ekstrakcione tehnike poput ekstrakcije pod pritiskom (PLE), disperzija matriksa na čvrstoj-fazi (MSPD), ultrazvučna i homogenizaciona ekstrakcija sa različitim mešavinama organskih rastvarača su samo tehnike u nizu koje se mogu primenjivati u izdvajanju mikotoksina iz različitih matriksa.

Prečišćavanje. Nakon ekstrakcije, neophodno je iz sirovog ekstrakta ukloniti supstance koje svojim prisustvom mogu ometati detekciju i određivanje mikotoksina, kao što su lipidi, ugljeni hidrati ili proteini. Za prečišćavanje sirovog ekstrakta koriste se kolone punjene aktivnim ugljem i aluminijum-oksidom, sa i bez izmenjivača jona, kolone punjene silika-gelom ili florisilom. U novije vreme se koriste imunoafinitetne kolone (Slika 41) ili

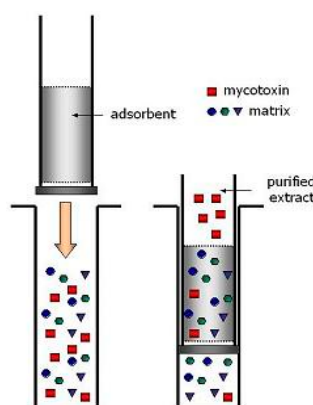
MycoSep kolone (Slika 42), a kao najsavremeniji postupak ekstrakcije i prečišćavanja ekstrakta se navodi QuEChERS.

Imunoafinitetne kolone su punjene antitelima specifičnim za ispitivani mikotoksin i pripremaju se vezivanjem antitela za čvrstu podlogu. Nakon aktiviranja i kovalentnog vezivanja za antitelo, podloga se suspenduje u fosfatnom puferu i pakuje u polietilenske kolone. Osnovni koraci prečišćavanja ekstrakta upotrebom imunoafinitetnih kolona su: kondicioniranje (aktiviranje kolone), dodavanje ekstrakta, ispiranje kolone, čime se uklanjaju nečistoće prisutne u ekstraktu, i eluiranje mikotoksina.



Slika 41. Koraci pri prečišćavanju ekstrakata upotrebom imunoafinitetnih kolona (<https://slideplayer.com/slide/5808156/>)

MycoSep kolone, namenjene za trihotecene grupe A i B, su multifunkcionalne kolone punjene različitim adsorbentima poput aktivnog uglja, celita ili jonoizmenjivačkih smola (Slika 42). Materijal je smešten u polietilensku cev (PE cev) između filter diskova sa gumenim ivicama. Na donjem delu su krilca koja propuštaju uzorak samo u jednom smeru. Kada se kolona uroni u epruvetu sa ekstraktom, gumeni krajevi diska se pribijaju uz zid epruvete, povlačeći ekstrakt uzorka kroz punjenje kolone, tako da se u gornjem delu kolone, iznad filter diska, pojavljuje prečišćeni ekstrakt. Ove kolone omogućavaju brzo prečišćavanje sa prinosom ekstrakcije višim od 85% za deoksinivalenol i 70% za nivalenol.



Slika 42. Način rada MycoSep kolone (<https://slideplayer.com/slide/5808156/>)

Trendovi poslednjih godina su usmereni na smanjenje količine uzorka za analizu uz pristup koji je bezbedan i manje štetan po životnu sredinu, poput QuEChERS-a, a ujedno podrazumeva brži, jednostavniji način pripreme uzorka uz istovremeno obezbeđenje visokih prinosa i dobre preciznosti. QuEChERS metoda je razvijena da bi se prevazišla

ograničenja postojećih metoda pripreme i uspešno se koristi u analizi pesticida iz različitih matriksa. Sa izvesnim modifikacijama, QuEChERS je postao veoma interesantan kao metod ekstrakcije i prečišćavanja uzoraka pri određivanju mikotoksina. Za analizu se uzima samo 5 g uzorka, pri čemu se ekstrakcija u PTT tubama izvodi vodom i zakiseljenim acetonitrilom. Po dodatku bezvodnog magnezijum sulfata i natrijum acetata (ili natrijum hlorida), uzorak se centrifugira. Supernatant se može odmah injektovati u tečni hromatograf ili se prečišćava dodavanjem primarnog-sekundarnog amina (PSA) i bezvodnog magnezijum sulfata i, po ponovnom centrifugiranju, supernatant se analizira tečnom hromatografijom.

Koncentrovanje. Uparavanje u struji azota pod redukovanim pritiskom se često koristi za uparavanje rastvarača i koncentrovanje uzorka. Nekada je neophodno kolone za prečišćavanje zaštititi od direktnog svetla kako bi se smanjio rizik od degradacije prisutnog mikotoksina. Imunoafinitetne kolone se mogu koristiti za koncentrovanje mikotoksina prilikom uklanjanja čestica koje mogu ometati detekciju. Rezidue koje su vezane za kolonu se kasnije spiraju sa kolone malom količinom rastvarača, najčešće metanolom ili acetonitrilom.

Detekcija. Nekoliko analitičkih tehnika je razvijeno za određivanje mikotoksina u različitim matriksima. Ove tehnike uključuju tankoslojnu hromatografiju (TLC), enzimsku analizu, kapilarnu gasnu hromatografiju sa masenom spektrometrijom (GC-MS), kapilarnu elektroforetsku masenu spektrometriju (CE-MS) i tečnu hromatografiju (LC) sa UV ili fluorescentnom detekcijom u kombinaciji sa derivatizacijom (ukoliko je neophodna) i sa MS ili MS/MS detekcijom.

TLC je jednostavna i jeftina tehnika za kvalitativno dokazivanje mikotoksina, dok se rede primenjuje za kvantitativno određivanje usled velike greške (može da ide do 20%).

Tečna hromatografija visokih performansi sa fluorescentnim detektorom (HPLC-FLD) ili detektorom sa nizom dioda (HPLC-DAD), kao i GC su favorizovani izbori za analizu mikotoksina zahvaljujući osetljivosti, pouzdanosti i doslednosti rezultata. Ukoliko se poseduje HPLC-FLD mogu se odrediti aflatoksini B2 i G2, a sa UVE fotohemijskim reaktorom mogu se određivati i aflatoksini B1 i G1. Kod GC je potrebno uraditi derivatizaciju hidroksilnih grupa, kako bi se postigla bolja isparljivost, a time i veća osetljivost GC analize supstance u tragovima. Ove tehnike moraju obuhvati ekstrakciju, prečišćavanje i validaciju. Ukoliko su povezane sa masenom spektrometrijom obezbeđuju bolju konformaciju i osetljivost.

Za dokazivanje prisutnosti mikotoksina, može se koristiti i ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Ova tehnika je brza tehnika za dokazivanje mikotoksina sa minimalnom pripremom uzorka i jeftinom opremom. Zasniva se na reverzibilnom vezivanju antigena (mikotoksina) i odgovarajućih antitela, stvarajući antigen-antitelo kompleks. Priprema odgovarajućeg mikotoksin imunogena je limitirajući faktor ove tehnike. Nedostatak ELISA tehnike je loša selektivnost – često se događa da imunoenzimske metode daju lažno pozitivan rezultat ili da se njima utvrde daleko veće količine mikotoksina u odnosu na neku hromatografsku metodu. Sve ovo navodi na nepouzdanost ove metode i do 20%, zbog čega se koristi kao skrining (screening) metoda.

VEŽBA 14. ODREĐIVANJE MIKOTOKSINA U HRANI ZA ŽIVOTINJE

Za određivanje sadržaja mikotoksina se primenjuje veći broj različitih analitičkih tehnika. Kao jedna od prvih, proteklih nekoliko decenija najčešće korišćena tehnika je tankoslojna hromatografija. Zatim su razvijene različite tehnike za preciznije određivanje mikotoksina – imunohemijska tehnika i tačna hromatografija visokih performansi. Danas se u rutinskoj analizi najčešće primenjuje imunohemijska, ELISA tehnika.

ELISA tehnika se zasniva na principu dve vrste reakcija. Prva je imunološka, gde dolazi do reakcije između antigena i antitela, dok je druga hemijska i podrazumeva reakciju između enzima i supstrata.

Cilj vežbe

Određivanje ukupnih aflatoksina u hrani za životinje upotrebom ELISA metode.

Potrebne hemikalije

Metanol (p.a. čistoće), destilovana voda, konjugat, komercijalni standardi aflatoksina masenih koncentracija 0; 5; 15 i 50 µg/mL, antitela, stop reagens.

Priprema reagenasa

Rastvor metanola (70%): U menzuru od 100 mL odmeriti 70 mL metanola i preneti u odmerni sud od 100 mL. Dopuniti odmerni sud do crte destilovanom vodom.

Potrebna aparatura i pribor

Laboratorijski mlin, laboratorijska staklena čaša od 150 mL, automatska mešalica (Ultra-Turrax), filter papir, stakleni levak, erlenmajer, automatska mikropipeta, štoperica, menzura od 100 mL i odmerni sud od 100 mL.

Priprema uzorka

Homogenizovati uzorak mlevenjem na laboratorijskom mlinu.

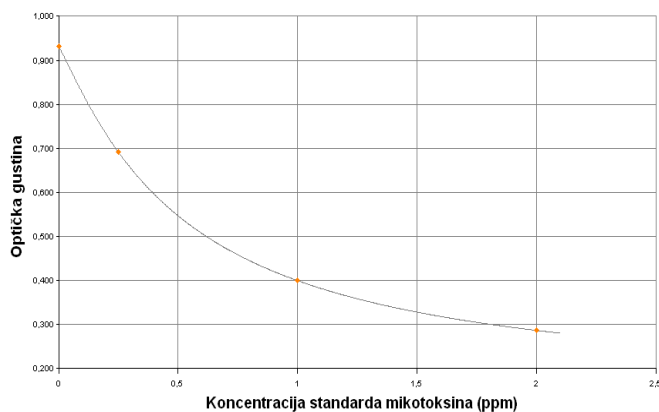
Određivanje sadržaja ukupnih aflatoksina ELISA metodom

Odmeriti 20 g uzorka u čašu od 150 mL. Dodati 100 mL 70% rastvora metanola i mešati na automatskom mešaču tokom 3 min na 12000 o/min. Rastvor profiltrirati kroz kvantitativnu filter hartiju u erlenmajer. Na mikrotitar ploču, u bunarčiće za mešanje (wells), dodati 100 µL konjugata, a zatim još 100 µL standarda odnosno, ispitivanog uzorka. Sadržaj svakog bunarčića za mešanje promešati 3 puta koristeći automatsku pipetu, a zatim prebaciti 100 µL sadržaja u bunarčiće sa antitelima. Inkubirati 2 min na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje, pomeranjem mikrotitar ploče napred-nazad. Odbaciti sadržaj bunarčića i isprati ih 5 puta dejonizovanom vodom. U bunarčiće dodati 100 µL supstrata i inkubirati 3 min na sobnoj temperaturi. Dodati 100 µL stop reagensa. Očitati vrednost apsorbancije na 650 nm koristeći ELISA čitač (Slika 43).



Slika 43. ELISA čitač (<https://www.omnia-health.com/product/readers-and-washers-plate-reader>)

Za rastvore poznate koncentracije mikotoksina očitati vrednosti optičke gustine, napraviti kalibracionu krivu (Slika 44). Instrument, preko softvera, samostalno iskazuje koncentraciju mikotoksina u uzorku.



Slika 44. Kalibraciona kriva standardnih rastvora mikotoksina

SENZORNA ANALIZA HRANE

Nauka o senzornim svojstvima prehrambenih proizvoda proučava nosioce, intenzitet i prirodu senzornih svojstava, dok različita svojstva namirnica, meri i vrednuje senzorna analiza uz korišćenje čovekovih čula (Radovanović i Popov-Raljić, 2001).

Nekadašnji termin - naziv ovih ispitivanja je bio „organoleptika”. Pojam „organoleptika” potiče od grčke reči „organon”, što znači organ. Starolatinski naziv *sensus* u značenju obuhvata čula, a prema Tignerovoj definiciji iz 1974. godine, „senzorna analiza je nauka o merenju i vrednovanju svojstava namirnica sa jednim ili više čula čoveka”. Tako da se termin „organoleptika”, kao nejasan i nepotpun pojam, zamenjuje mnogo boljim i preciznijim – „senzorika”.

Prijem, obrada, evaluacija i interpretacija utisaka stečenih u postupku senzorne analize namirnica, zasniva se na zapažanjima i obradi podataka dobijenih korišćenjem čula. Tehnike senzornih ispitivanja i vrednovanja prehrambenih proizvoda se sprovode upotrebom:



Čula vida (koriste se oči) – vizuelna tehnika



Čula mirisa (mirisni epitel u bazi nosa) – olfaktorna tehnika



Čula ukusa (papile u ustima) – gustativna tehnika



Čula dodira (mehanički receptori u ustima, koži, sluzokoži, zglobovima i mišićima) – palpatorna tehnika



Čula sluha (koriste se uši) – audijska tehnika

Senzorna analiza prehrambenih proizvoda je veoma zahtevna disciplina, koja uključuje poznavanje anatomije i fiziologije ljudskih čula, potom, teorijska znanja i praktična iskustva u primeni različitih tehnika senzorne analize. Veoma je bitna veština u pogledu optimalnog prilagođavanja tehnike senzornog ispitivanja specifičnim potrebama, odnosno, konkretnim uslovima rada (Radovanović i Popov-Raljić, 2001).

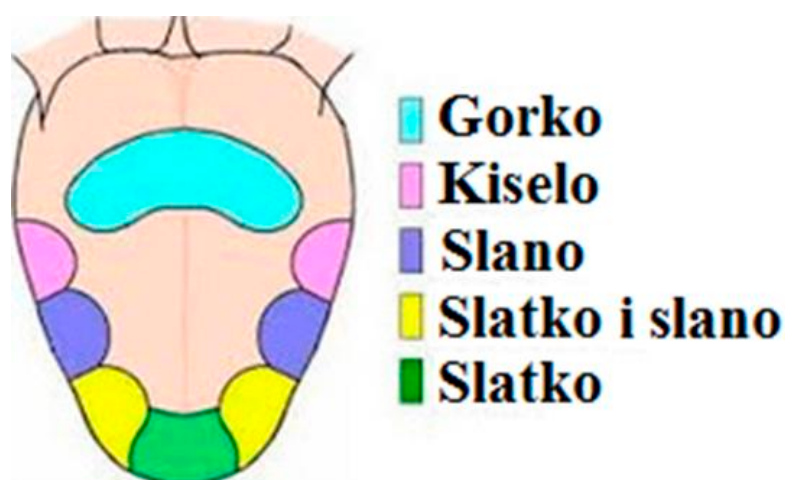
Kada sagledamo sve što je navedeno, možemo smatrati da senzorna analiza namirnica podrazumeva naučnu pripremu, izvođenje i ocenjivanje senzornih svojstava, nakon čega sledi statistička obrada rezultata svakog ocenjivača u cilju dobijanja objektivne ocene o kvalitetu ispitivanog proizvoda. U ocenjivanju se može koristiti jedna ili više tehnika, baziranih na različitim ljudskim čulima.

Čulo ukusa je jedno od najstarije poznatih čula i jedno od osnovnih bioloških saznanja. Ovo čulo je primarno ljudsko čulo u jednom, a možda i najznačajnijem periodu njegovog razvoja. Nije karakteristično samo za čoveka, nego ga intenzivno upotrebljava i veći broj životinjskih vrsta. Čulo ukusa je najvažnija senzorna karakteristika prehrambenih

proizvoda, što oralnu (gustativnu) tehniku čini veoma značajnom u postupku senzorne analize.

Čulo mirisa i ukusa su hemijska čula, zato što se senzorni utisak zasniva na funkciji ukusnih receptora smeštenih u ustima. Čulo ukusa omogućava čoveku izbor namirnica prema sopstvenim željama i potrebama. Receptori za ukus su pored površine jezika, smešteni i u drugim delovima usne šupljine, odnosno, na sluzokoži ždreta, po površini nepca, na epiglotisu (nepčana resica), a kod dece i po unutrašnjoj strani obraza.

Jezik je primarni organ čula ukusa. Na njegovoj površini se nalaze četiri vrste papila (senzorne grupe), pri čemu svaka grupa registruje jedan od četiri osnovna modaliteta ukusa (slatko, kiselo, slano ili gorko). U korenu jezika, nalaze se papile koje će registrovati gorak ukus, dok se sa spoljašnjih strana nalaze ostale senzorne grupe. Na vrhu jezika se oseće slatko i slano, a sa strane – kiselo (Slika 45).



Slika 45. Čulo ukusa sa senzornim grupama
(<https://naukica.wordpress.com/2012/04/16/jezik-javlja-sta-je-ukusno/>)

Prema standardu ISO 5492:2008, smatra se da postoje četiri osnovna tipa (modaliteta) ukusa: slano (potiče od vodenih rastvora različitih supstanci, najčešće natrijum hlorida); slatko (osnovni ukus koji proizvode voden rastvori supstanci, najčešće saharoze); gorko (osnovni ukus koji proizvode voden rastvori različitih supstanci, najčešće kinina ili kofeina); i kiselo (osnovni ukus koji proizvode voden rastvori najčešće limunske kiseline ili vinske kiseline). Naravno da čovekovo čulo ukusa može da registruje ostale ukuse, ali se ova četiri izdvajaju kao osnovna.

Prema navodima Radovanović i Popov-Raljić (2001), kiseo ukus je posledica prisustva kiseline, dok jačina gustativne senzacije odgovara logaritmu koncentracije vodonikovih jona, odnosno vrednosti pH. Što je niža vrednost pH, to je intenzivniji kiseli ukus. Prema istim autorima, gorak ukus ne izaziva jedno, već više grupa jedinjenja. Dominiraju dve grupe organskih jedinjenja, koje se razlikuju po dužini lanaca. Naime, jedna grupa su jedinjenja dugih lanaca, dok u drugu grupu ulaze alkaloidi poput kinina, kofeina ili tanina. Sladak ukus, kao kod gorkog, izazivaju više grupa jedinjenja. Smatra se da su nosioci slatkog ukusa uglavnom organska jedinjenja poput šećera, alkohola, aldehida, ketona, estara, amino-kiselina i dr. Jedino soli olova ili berilijuma, kao neorganska jedinjenja, daju sladak ukus.

Dešava se da se analizom nekih jedinjenja stiče utisak da se radi o supstanci koja daje sladak ukus u prvim trenucima nadražaja, dok se kasnije, kao naknadni, javlja osećaj

gorkog nadražaja. Supstanca koja može dovesti do ovakve zabune, koja ukazuje na određenu komplementarnost između gorkog i slatkog ukusa je npr. saharin.

Radovanović i Popov-Raljić (2001) navode da slan ukus potiče od jonizovanih soli. Smatra se da dominantan uticaj na slan ukus imaju nastali katjoni, mada se uticaj anjona ne treba zanemariti. Uzimajući u obzir da su soli nosioci ovog ukusa, kvalitet i stepen nadražaja može da bude veoma različit.

VEŽBA 15. TESTOVI SENZITIVNIH PRAGOVA ČULA UKUSA

Cilj vežbe

Upotrebom vodenih rastvora odgovarajućih materija, izvediće se testovi kojima se definišu osnovni senzitivni pragovi. Prag nadražaja (donji prag), prag razlike (diferencijalni prag), prag prepoznavanja i maksimalni prag (gornji prag). U okviru testova postaviće se pragovi razlikovanja različitih ukusa i provera sposobnosti pamćenja određenih koncentracija rastvora. Identifikovaće se četiri osnovna modaliteta ukusa: slatko, slano, gorko i kiselo.

Potrebna aparatura

Analitička vaga, metalne kašičice, stakleni levci, odmerni sudovi od 1000 i 2000 mL sa čepovima, staklene čaše od 50 mL, stakleni štapići, odmerni sudovi od 100 mL, menzure od 50 i 100 mL, flomaster za pisanje po staklu, plastične čašice od 20 mL, čaše od 200 mL i štoperica.

Potrebne hemikalije

Saharoza, limunska kiselina, natrijum hlorid, tanin i destilovana voda.

Priprema rastvora

Priprema osnovnih rastvora se izvodi u skladu sa metodom ISO 8586:2023. Na analitičkoj vagi u staklenu čašu odmeriti količinu supstance kao što je prikazano u tabeli 15, rastvoriti u vodi uz mešanje staklenim štapićem i kvantitativno (preko staklenog levka, pri tom paziti da ne dođe do prosipanja ili podlivanja) preneti u odmerni sud. Sud dopuniti do crte destilovanom vodom.

Tabela 15. Masa supstanci potrebna za pripremu 1 L rastvora osnovnih modaliteta ukusa

Modalitet	Supstanca	Odvaga na analitičkoj vagi (g)	V (mL)
Gorko	Tanin	0,002	1000
Slatko	Saharoza	8,0	1000
Kiselo	Limunska kiselina	0,18	1000
Slano	Natrijum hlorid	2,5	1000

Po 90 mL osnovnih rastvora svih modaliteta sipati u po dve šifrirane boce. Zadatak studenta je da jedan po jedan rastvor sipa u plastičnu čašicu (10 mL) i da ih u ustima razlije po površini celog jezika, pri čemu vreme nadražaja ne sme biti duže od 2 do 3 sekunde. Posle prvog gutljaja, student ispljune rastvor, usta ispere destilovanom vodom i ponavlja postupak degustiranja sa narednim uzorkom. Nakon svih devet ispitanih uzoraka, mišljenje o ispitanim rastvorima se zapisuju, upisivanjem rezultata pored šifriranih podataka.

Svaki student koji je od devet ponuđenih uzoraka tačno identifikovao osam, može da pređe na naredni nivo testiranja.

Suptilniji pokazatelj sposobnosti čula ukusa studenta je određivanje pragova njegove senzorne osetljivosti:

- Donji prag – najmanji intenzitet draži, koja izaziva jedva primetan osjet. Što je manja vrednost donjeg praga, veća je osetljivost čulno-nervnog aparata.
- Prag prepoznavanja – podrazumeva momenat reakcije čula kada se tačno prepozna modalitet ukusa.

- Prag razlike – reakcija čula na najmanju promenu u stimulaciji, pod čijim uticajem se zapaža prva, jedva primetna razlika u osetu.
- Gornji prag – najveći intenzitet nadražaja (stimulacije) čula, čije dalje uvećavanje ne izaziva osećaj promene u nivou i kvalitetu draži materije nosioca određene draži. Naime, od gornjeg praga, odnosno, maksimalnog praga, čula ne mogu više da registruju prag razlike.

Prema ISO 3972:2011 treba pripremiti osnovne rastvore kao što je prikazano u tabeli 16, po već opisanom postupku.

Tabela 16. Priprema osnovnih rastvora određenih modaliteta

Modalitet	Supstanca	Odvaga na analitičkoj vagi (g)	V (mL)
Gorko	Tanin	1,08	2000
Slatko	Saharoza	48,0	2000
Kiselo	Limunska kiselina	2,4	2000
Slano	Natrijum hlorid	8,0	2000

Od pripremljenih osnovnih rastvora, pravi se serija radnih rastvora (Tabela 17). U odmerni sud od 1000 mL, sipati odgovarajuću zapreminu osnovnog rastvora i do crte dopuniti destilovanom vodom.

Tabela 17. Serije radnih rastvora

Šifra	Kiseo modalitet		Gorak modalitet		Slan modalitet		Sladak modalitet	
	OR (mL)	KK	OR (mL)	KK	OR (mL)	KK	OR (mL)	KK
V1	500	0,60	500	0,27	500	2,00	500	12,00
V2	400	0,48	400	0,22	350	1,40	300	2,20
V3	320	0,38	320	0,17	245	0,98	180	4,32
V4	256	0,31	256	0,14	172	0,69	108	2,59
V5	205	0,25	205	0,11	120	0,48	65	1,56
V6	164	0,20	164	0,09	84	0,34	39	0,94
V7	131	0,16	131	0,07	59	0,24	23	0,55
V8	105	0,13	105	0,06	41	0,16	14	0,34

OR – osnovni rastvor, KK – krajnja koncentracija (g/mL)

Za svaki modalitet ukusa, sipa se određena količina radnih rastvora u šifrirane boce od V1 do V8.

Student proba svaki uzorak jedne serije (kao što je već objašnjeno) i svoja zapažanja zapisuje u ocenjivački list. Ocene u ocenjivačkom listu treba da budu tumačenja:

0 – bez ukusa; X, XX – oseti se ukus; XXX – potvrda ukusa (sa naznakom o prepoznavanju modaliteta); XXXX - razlika u nadražaju.

BIOKRISTALIZACIJA

Holističke metode kao što su biokristalizacija, metoda kreiranja slike i merenje emisije biofotona, su uvedene s ciljem naglašavanja prednosti konzumiranja organske hrane. Kako poređenje hemijskog sastava hrane ponekad nije dovoljno da potvrdi da li hrana potiče iz organskog lanca, odnosno da li pokazuje potencijal za pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje, korišćenje holističkih metoda dopunjuje druge metode praćenja kvaliteta.

Metoda biokristalizacije je zasnovana na fenomenu da kada vodeni rastvor bakar-hlorida dihidrata ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) kristališe sa supstratom na staklenoj ploči, pojavljuju se obrasci kristalizacije specifični za taj supstrat. Obrasci nastaju kroz proces samoorganizacije na koji utiče sam supstrat, a pokazalo se da i odražava fiziološke procese kao što su sazrevanje i razlaganje, efekat obrade, režima ishrane i sistem proizvodnje na širokom spektru poljoprivrednih proizvoda. Iz tog razloga, ova metoda se decenijama koristi u proceni kvaliteta organske hrane, zasnovanoj na holističkim principima. Ova premisa podrazumeva procenu uzorka kao celine, koja dopunjuje redukcionistička razmatranja i ispunjava zahteve sistemskog pristupa organske poljoprivrede. Ovu metodologiju su tek 2010. godine Busscher i sar. (2010a) dokumentovali i okarakterisali, uključujući kristalizacione komore i laboratorijske procedure.

Pored toga, razvijena je metodologija za procenu uzoraka biokristalizacije kako iz vizuelne orijentacije korišćenjem definisanih morfoloških kriterijuma, koje su dali Huber i sar. (2010), tako i pomoću kompjuterizovane analize tekture i strukture. Kompjuterizovana evaluacija je omogućila standardizaciju metode, koja je potvrdila da je glavni izvor varijacije proces kristalizacije (Busscher i sar., 2010b). Shodno tome, studije koje razjašnjavaju fizičke uslove koji leže u osnovi procesa kristalizacije su još uvek u fazi istraživanja.

Pri vizuelnoj evaluaciji uzoraka biokristalizacije mogu se razlikovati četiri kriterijuma evaluacije koji odražavaju hijerarhijsku složenost. Ovi nivoi su: (1) kvantitativni kriterijumi evaluacije zasnovani na morfološkim karakteristikama, npr. dužina bočnih igala; (2) kvantitativni deskriptivni kriterijumi evaluacije povezani sa pojedinačnim morfološkim karakteristikama, npr. pravilnost grananja; (3) kvantitativni deskriptivni kriterijumi evaluacije višeg reda, koji opisuju gestove ili implicitne pokrete u celom obrascu, npr. koordinacija, integracija karakteristika; (4) kvalitativni deskriptivni kriterijumi evaluacije zasnovani na percepciji „smislenih celina“ ili geštalta u obrascima (Huber i sar., 2010).

Geštalt je termin koji dolazi iz nemačkog jezika i uopšteno se prevodi kao način na koji se stvari postavljaju ili sastavljaju u celinu. Proces prepoznavanja i primene šablona (geštalt) se obično objašnjava sa tri perceptivna modela vođena stimulacijom, po *bottom-up* (odozdo prema gore) principu: (1) podudaranje šablona, (2) analiza karakteristika i (3) podudaranje prototipa, pri čemu je prepoznavanje obrazaca proces podudaranja između vizuala, stimulansa i informacije iz memorije. Međutim, uticaj konteksta, očekivanja i iskustva se, sa druge strane, najbolje opisuju procesima pažnje orijentisanim ka zadacima po *top-down* (odozgo nadole) principu.

Trenutno je uspostavljena standardizovana i prenosiva metodološka osnova za evaluaciju obrazaca biokristalizacije do trećeg nivoa (Huber i sar., 2010). Za ovaj proces standardizacije primenjuje se ISO 11035 standard za senzornu analizu prilagođen za upotrebu u vizuelnoj evaluaciji uzoraka biokristalizacije.

Kristalizaciona sposobnost bakar-hlorida posebno je podložna vrsti uzorka. Kahl i sar. (2009) detaljno su opisali tehniku kristalizacije bakar-hlorida. Biokristalizacioni obrasci korišćenjem bakar-hlorida imaju slabo zelenu prozirnu boju. Tečnost treba držati u posudi s plastičnim prstenom prečnika oko 9 cm i visinom od 1 cm. Prema tipu konstrukcije, 12 do 54 posude mogu istovremeno stati u kristalizacionu kabinu. Odlučujući kriterijumi su odnos uzorka i bakar-hlorida i uslovi (temperatura i relativna vlažnost vazduha) koji omogućavaju određeno vreme isparavanja (period između formiranja prvih kristala i kristalizacije poslednje posude).

Primena metoda biokristalizacije za ispitivanje kvaliteta mleka

Prilikom ispitivanja kvaliteta mleka primenom metoda biokristalizacije, Huber i sar. (2010) su identifikovali pojedine morfološke karakteristike, značajne za procenu neadekvatnog ili nedovoljnog kvaliteta.

Efekat supstance opisuje da li uzorci zahtevaju mnogo ili malo supstance da bi stvorili slične biokristalizacione obrasce. Efekat supstance može se posmatrati kao aspekt snage kvaliteta.

Diferencijacija određuje koliko su tačne i diferencirane postojeće karakteristike. Na stadijumu optimalnog sazrevanja, diferencijacija je veoma visoka.

Integracija pokazuje kako se različiti delovi biokristalizacionih obrazaca pojavljuju kao međusobno harmonični ili odvojeni. Visoko integrisan biokristalizacioni obrazac može ukazivati na harmoničan odnos.

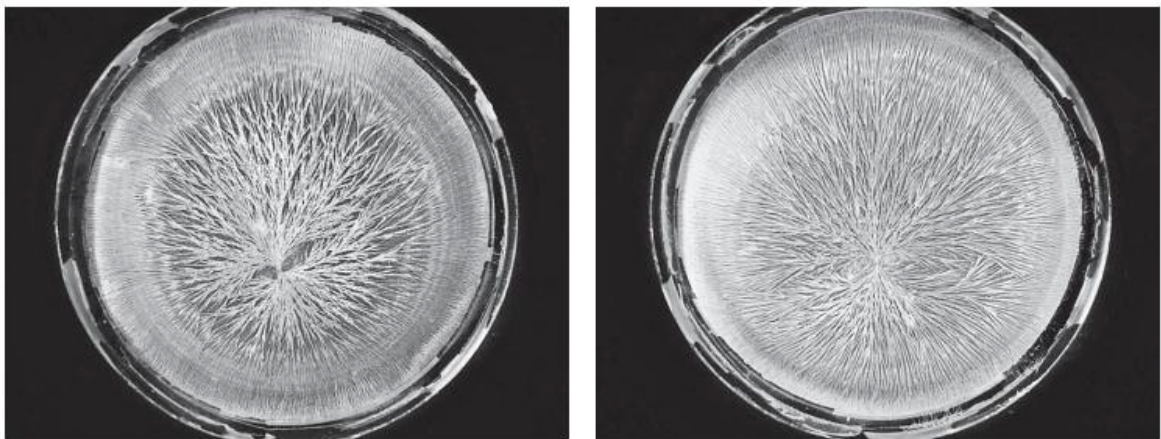
Koordinacija centra podrazumeva pozicioniranje koje zavisi od procesa isparavanja, rezultirajući radijalno super zasićenim područjem oko geometrijskog centra posude.

Biokristalizacioni obrazac pokazuje više ili manje jasno vidljive izražene drške - relativno jedna prema drugoj, nastale iz centra i šireći se u srednjoj zoni. Jasne drške mogu ukazivati na sazrevanje, a manje na degradaciju ili starenje.

Proređivanje se odnosi na gubitak strukture u spoljnoj i srednjoj zoni biokristalizacionog obrasca. Tekstura je više ili manje prazna s crnim područjima bez iglica, što može biti indikator starenja.

Karakteristike koje se odnose na degradaciju/starenje su gubitak strukture i diferencijacije, biokristalizacioni obrasci su više centralizovani i haotični, veća asimetrija u obrascu, gubitak reda, nema jasnih drški, krhke drške i iglice, gubitak punoće iglica, proređivanje, uvijene iglice, savijene iglice, dijagonalne i prekrížene iglice i mrežaste strukture. Doesburg i sar. (2015) su razradili koncept za procenu uzoraka kristalizacije prema karakteristikama degradacije.

Primer: obrasci biokristalizacije niske koncentracije mleka (0,05 mL) otkrivaju velike razlike između uzoraka organski i konvencionalno proizvedenog mleka (Slika 46). Na slici se vidi da su obrasci biokristalizacije organskog mleka znatno više koncentrisani (efekat supstance) sa dobro zračenim iglicama (dobra koordinacija centra). Nasuprot tome, obrasci biokristalizacije konvencionalnog mleka ukazuju na veoma nisku koncentraciju sa stanjivanjem u srednjoj zoni i zonom nepravilne teksture u centru. Koordinacija centra je niska.



Slika 46. Obrasci biokristalizacije pasterizovanog konvencionalnog (levo) i organskog (desno) mleka pri niskim koncentracijama (Popović-Vranješ i sar., 2016)

Metod kapilarne dinamolize, koji se obično izvodi paralelno s biokristalizacijom, može detektovati razlike između organskog i konvencionalnog mleka, kao i mleka tretiranog na različite načine tokom prerade (Popović-Vranješ i sar., 2010a). Metoda biokristalizacije takođe omogućava otkrivanje visokih termičkih tretmana. U Norveškoj je praćen zdravstveni status životinja u organskoj i konvencionalnoj proizvodnji tokom tri godine (Hardeng i Edge, 2001). Zaključeno je da sistem upravljanja životinjama značajno utiče na pojavu mastitisa, ketoze i mlečne groznice kod krava. Sve ove bolesti životinja odražavaju se u holističkom kvalitetu mleka. Ishrana životinja ima značajan uticaj na kvalitet mleka i stoga utiče na proces prerade mleka u mlečne proizvode (Popović-Vranješ i sar., 2010b).

Upoznavanje sa tokom metode biokristalizacije na primeru mleka

Priprema uzoraka za biokristalizaciju

Mleko pažljivo pomešati sa demineralizovanom vodom u zapreminskom odnosu 25:75. Smešu potom snažno promućkati. U staklene graduisane epruvete zapremine veće od 6 ml dodati mleko u tri nivoa - nizak (0,05 mL), srednji (0,1 mL) i visok (0,125 mL). Zatim dodati 3 mL 5%-tnog rastvora bakar-hlorida čime se u svakoj epruveti nalazi 150 mg bakar-hlorida. Epruvete dopuniti demineralizovanom vodom do zapremine od 6 ml. Nakon blagog mućkanja pojedinačnih epruveta, rastvore pažljivo prebaciti u pripremljene posude u komori za biokristalizaciju.

Kristalizacija bakar hlorida

Za ocenu biokristalizacionih obrazaca mleka se koristi kriterijum starenja (karakteristike propadanja). Vizuelna evaluacija i poređenje se sprovode korišćenjem referentnih biokristalizacionih obrazaca koji odražavaju poznata fiziološka stanja.

LITERATURA

Abasht B., Dekkers J. C., Lamont S. J. (2006). Review of quantitative trait loci identified in the chicken. *Poultry Science*, 85(12), 2079-2096.

Agarski M., Stojanović T., Bursić V., Meseldžija M., Vuković G., Špirović Trifunović B., Zeremski T. (2015). Glifosat u životnoj sredini. Treći naučni stručni skup Politehna, 04.12., Beograd, Zbornik radova, 106-110.

Akesson M., Sparrenbom C. J., Dahlgvist P., Fraser S. J. (2015). On the scope and management of pesticide pollution of Swedish groundwater resources: The Scanian example. *Ambio*, 44, 226-234.

Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC*, 86(2), 412-31.

Andrejev N., Bursić V. (2013). Validation of HPLC-DAD method for the analysis of phenolic acids in plant material. Conference of agronomy students with international participation, 28-30 August 2013, Čačak, Proceedings, 95-100.

Attallah E. R., Barakat D. A., Maatook G. R., Ashour Badawy H. A. (2012). Validation of a quick and easy (QuEChERS) method for the determination of pesticides residue in dried herbs. *Journal of Food Agriculture Environ.* 10(1), 755–762.

Baličević R., Rozman V., Raspudić E., Brmež M., Lončarić Z., Bursić V., Ravlić M., Sarajlić A., Lucić P. (2015). Upotreba sredstava za zaštitu bilja na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima na području istočne Hrvatske. 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture, Opatija, Croatia, Proceedings, 49-53.

Blendl, H., Kallweit, E., Scheper, J. (1991). *Qualitätsanbieten Schweinefleisch*. AID 1103, Bonn.

Borggaard O. K., Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64, 441-449.

Bursić V. (2011). Optimizacija hromatografskih metoda i određivanje ostataka fungicida u plodovima krastavca. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet Novi Sad.

Bursić V., Vuković G., Dedić B., Prvulović D., Malenčić Đ., Popović M., Stojanović Z., Zeremski T. (2013). Environmental impact on antioxidant capacity in sour cherries: HPLC-DAD determination of phenolic acids and flavonoids. The 19th Symposium on analytical and environmental problems, 23 September, Szeged, Hungary, Proceedings, 40-43.

Bursić V., Vuković G., Špirović B., Lazić S., Đurović R., Zeremski-Škorić T. (2012). Analiza pesticida u trešnjama QuEChERS ekstrakcijom: Poređenje uticaja sorbenta na prinos ekstrakcije. XIV Simpozijum o zaštiti bilja i IX Kongres o korovima, Zlatibor 26-30.11.2012., Zbornik rezimea radova, 79-80.

Busscher N., Kahl J., Andersen J. O., Huber M., Mergardt G., Doesburg P., Paulsen M., Ploeger, A. (2010b). Standardization of the biocrystallization method for carrot samples. *Biological Agriculture Horticulture*, 27(1), 1-23.

Busscher N., Kahl J., Doesburg P., Mergardt G., Ploeger A. (2010a). Evaporation influences on the crystallization of an aqueous dihydrate cupric chloride solution with additives. *Journal of colloid and interface science*, 344(2), 556-562.

De Ketelaere B., Coucke P., De Baerdemaeker J. (2000). Eggshell crack detection based on acoustic resonance frequency analysis. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 76(2), 157-163.

De Reu K., Messens W., Heyndrickx M., Rodenburg T. B., Uyttendaele M., Herman L. (2008). Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems. *World's Poultry Science Journal*, 64(1), 5-19.

Dias M.G., Borge G.I.A., Kljak K., Mandić A.I., Mapelli-Brahm P., Olmedilla-Alonso B., Pinteá A.M., Ravasco F., Tumbas Šaponjac V., Sereikaitė J., Vargas-Murga L., Vulić J.J., Meléndez-Martínez A.J. (2021). European Database of Carotenoid Levels in Foods. Factors Affecting Carotenoid Content. *Foods*, 10(5), 912-922.

Doesburg P., Huber M., Andersen J.O., Athmann M., Van der Bie G., Fritz J., Geier U., Hoekman J., Kahl J., Mergardt G., Busscher, N. (2015). Standardization and performance of a visual Gestalt evaluation of biocrystallization patterns derived from ripening and decomposition processes. *Biological Agriculture Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems*, 31(2), 128-145.

Duchan B., Hady S. (1992). Trzy przypadki methemoglobinemii w przebiegu zatrucia azotanami. *Roczniki PHZ*, 42, 267-270.

Elkin R. G. (2006). Reducing shell egg cholesterol content. *World's Poultry Science Journal*, 62, 665-687.

Elshafie H.S., Camele I., Mohamed A.A. (2023). A comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3266.

European Commission (EC) Directive 63/2002 of 11 July 2002 establishing community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin and repealing Directive 79/700/EEC. *Official Journal of the European Communities*, L187, 30-43.

European Commission (EC) Directive No 74/1999. Council Directive 1999/74/EC of 19 July 1999 laying down minimum standards for the protection of laying hens. *Official Journal of the European Communities*, L203, 53-57.

European Commission (EC) Regulation No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Communities*, L31, 1-24.

European Commission (EC) Regulation No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of European Union*, L70, 1-16.

European Commission (EC) Regulation No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, L77, 1-33.

European Commission (EC) Regulation No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. Official Journal of European Union, L189, 1–23.

Fernandez-Alba A. (2014). Evaluation of analytical procedures in pesticide multi-residue methods to overcome matrix effects in fruits and vegetables. 10th European Pesticide Residue Workshop, Dublin, Ireland, Programme book of abstracts, 54.

Forrest J. C. (1998). Line speed implementation of various pork quality measures.

Freese L., Friedrich R., Kendall D., Tanner S. (2000). Variability of deoxynivalenol, measurements in barley. Journal of AOAC International, 83, 1259-1263.

Generalić I., Skroza D., Šurjak J., Možina S., Ljubenković I., Katalinić A., Šimat V., Katalinić V. (2012). Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). Chemistry and Biodiversity, 9, 441-457.

Glauner T., Yang D., Wuest B., Fandino A. (2013). Eliminating matrix effects during multi-residue pesticide analysis by extensive dilution using the Agilent 6495 Triple Quadrupole MS with enhanced sensitivity. Dostupno na:

Grau R., Hamm R. (1952). Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbildung im Fleisch. Die Fleischwirtschaft, 4, 295-297.

Hajšlova J., Schulzova V., Slanina P., Janne K., Hellena K. E., Andersson C.H (2005). Quality of organically and conventionally grown potatoes: four-year study of micronutrients, metals, secondary metabolites, enzymic browning and organoleptic properties. Food additives and contaminants, 22, 514-543.

Hardeng F., Edge V. L. (2001). Mastitis, Ketosis, and Milk Fever in 31 Organic and 93 Conventional Norwegian Dairy Herds. Journal of Dairy Science 84(12), 2673-2679.

Hincke M. T., Nys Y., Gautron J., Mann K., Rodriguez-Navarro A. B. and McKee M. D. (2012). The eggshell: structure, composition and mineralization. Frontiers in Bioscience-Landmark 17(4), 1266-1280.

Hofmann K. (1994). What is quality? Definition, measurement and evaluation of meat quality. Meat Focus International, 3(2), 73-82.

Holt A.S., Jacobs E.E. (1954). Spectroscopy of plant pigments. American Journal of Botany, 41, 710-722.

Honikel K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. Meat Science, 49(4), 447-457.

Hord N. G., Tang Y., Bryan N. S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. American Journal of Clinical Nutrition, 90(1), 1-10.

Huber M, Andersen J-O, Kahl J, Busscher N, Doesburg P, Mergardt G, Kretschmer S, Zalecka A, Meelursarn A, Ploeger A, Nierop D, van de Vijver L, Baars E. (2010). Standardization and validation of the visual evaluation of biocrystallizations. Development of a reliable and valid instrument for visual evaluation according to ISO-Norms for sensory analyses. *Biological Agriculture Horticulture* 27, 25–40.

ISO 3972:2011. Sensory analysis – Methodology – Method of investigating sensitivity of taste

ISO 5492:2008. Sensory analysis – Vocabulary.

ISO 8586:2023. Sensory analysis – Selection and training of sensory assessors

Jašić M. (2007). Tehnologija voća i povrća – I dio, Univerzitet u Tuzli, Tuzla.

Joo S. T., Kauffman R. G., Kim B. C., Park G. B. (1999). The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Science*, 52(3), 291-297.

Juraschek S.P., Gaziano J.M., Glynn R.J., Gomelskaya N., Bubes V.Y., Buring J.E., Shmerling R.H., Sesso H.D. (2022). Effects of vitamin C supplementation on gout risk: results from the Physicians' Health Study II trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 116(3), 812-9.

Kahl J., Busscher N., Doesburg P., Mergardt G., Huber M., Ploeger A. (2009). First tests of standardized biocrystallization on milk and milk products, *European Food Research and Technology*, 229, 175-178.

Katalinić V., Miloš M., Kulišić K., Jukić M. (2006). Screening of 70 medical plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557.

Katan M. B. (2009). Nitrate in foods: harmful or healthy? *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1), 11-12.

Kauffman R. G., Cassens R. G., Sherer A., Meeker D. L. (1992). Variations in pork quality. NPPC Publication, Des Moines, U.S.A., 1-8.

Löliger J., Lambelet P., Aeschbach Prior E. M. (1996). Natural antioxidants: from radical mechanisms to food stabilization. In: *Food Lipids and Health* (eds. R. E. McDonald, D. B. Min), Marcel Dekker Inc., New York, USA, 315-344.

Mabe I., Rapp C., Bain M. M., Nys Y. (2003). Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. *Poultry Science*, 82(12), 1903-1913.

Malenčić Đ. (2001). Biohemijska istraživanja odabranih samoniklih vrsta roda *Salvia* iz Vojvodine. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

Matt D, Rembiałkowska E, Luik A, Peetsmann E, Pehme S. (2011). Quality of organic vs. conventional food and effects on health. Tallinn: Estonian University of Life Sciences. Dostupno na: http://orgprints.org/19504/1/Report_2011_%281%29.pdf

Milosavljević S. (2004). Strukturne instrumentalne metode, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd.

Niketić-Aleksić G. (1996). Tehnologija voća i povrća, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Nys, Y. (2001) Recent developments in layer nutrition for optimising shell quality. Proceedings of 13th European Symposium on Poultry Nutrition, Blankenberge, Belgium, 45-52.

Olson J., Blankenship R. (2004). Thinking about the evolution of photosynthesis. Photosynthesis Research, 80, 373-385.

Popović B., Štajner D. (2008). Oksidativni stress kod biljaka, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, Novi Sad

Popović M., Malenčić Đ. (2006). Aktivni principi ukrasnog bilja, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Popović-Vranješ A., Krajinović M., Grubačić M.D, Kralj A. (2010a). Biodinamička poljoprivreda kao poseban oblik organske poljoprivrede. Zbornik kratkih sadržaja, Simpozijum "Stočarstvo, veterinarska medicina i ekonomika u ruralnom razvoju i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane", sa međunarodnim učešćem, 20-27. June, Divčibare, Serbia.

Popović-Vranješ A., Lopičić-Vasić T., Grubješić G., Krstović S., Lukač D., Kralj A., Geier U. (2016). Biocrystallization as a method for distinguishing between organically and conventionally produced milk. Mljekarstvo 66(4), 262-271.

Popović-Vranješ A., Pejanović R., Jovanović S., Savić M., Ostojić M., Grubačić M., Cvetanović D. (2010b). Upravljanje kvalitetom u organskoj proizvodnji i preradi mleka. Prehrambena industrija - mleko i mlečni proizvodi, 21 (1-2), 56-62.

Pribiš V. (1999). Nutritivne osobine hrane, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

Pucarević M. (2008). Ostaci pesticide u voću i povrću. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 45(1), 195-203.

Radovanović R., Popov-Raljić J. (2001). Senzorna analiza prehrambenih proizvoda, Tehnološki fakultet, Beograd – Novi Sad.

Rial M. A. L., Lires M. M. Á., Correa A. A., Rodríguez U. P. (2019). Aprender a interpretar la acidificación oceánica con recursos on-line y experimentación contextualizada. Enseñanza de las ciencias: revista de investigación y experiencias didácticas, 37(2), 189-209.

Rossi M. (2007) Influence of the laying hen housing systems on table egg characteristics. Proceeding of the XII European Symposium on the quality of egg and egg products, Prague, September 2-5, Prague, 49-51.

Rudolf M., Kroneck P.M. (2005). The nitrogen cycle: its biology. Metal Ions in Biological Systems, 43, 75-103.

SANCO/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

SANCO/12571/2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European Commission Health Consumer Protection Directorate-General Safety of the food chain. Chemicals, contaminants, pesticides. 19 November 2013 rev. 0.

SANTE/11312/2021. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.

SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.

Sasazuki S., Sasaki S., Tsubono Y., Okubo S., Hayashi M., Tsugane S. (2006). Effect of vitamin C on common cold: randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(1), 9-17.

Savez hemijskih inženjera – SHI (2009). Validacija metoda u laboratorijskoj praksi, Priručnik za kurs validacija mernih metoda.

Skroza D., Generalić I., Katalinić V. (2010). Tehnologija mediteranskog voća i povrća, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju.

Službeni glasnik Republike Srbije. (2012). Pravilnik o kontroli i sertifikaciji u organskoj proizvodnji i metodama organske proizvodnje broj 40/2012.

Službeni glasnik Republike Srbije. (2015). Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela broj 101/2015.

Službeni glasnik Republike Srbije. (2022). Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje broj 91/2022.

Službeni glasnik Republike Srbije. (2023). Pravilnik o maksimalnim koncentracijama određenih kontaminanata u hrani broj 110/2023.

Stolarczyk A., Socha I. (1992). Azotany, azotyny and nitrozoaminy w pożywieniu niemowląt and małych dzieci w Polsce. *Medycyna*, 2000, 41-43.

Szponar L., Kierzkowska E. (1990). Nitrates and nitrites in the environment and their effect on human health, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 44(4-6), 327-350.

Šerban N. (2001). Ćelija - strukture i oblici, Zavod za udžbenike, Beograd.

Tansey T. (2016). Medical research: Mariners' malady. *Nature*, 540, 338-347. <https://doi.org/10.1038/540338a>.

Trajković J., Mirić M., Baras J., Šiler S. (1983). Analize životnih namirnica, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

Ubavić M., Bogdanović R. (2008). Praktikum iz agrohemijske, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Van Laack, R. L. J. M. (2000). Determinants of ultimate pH and quality of pork.

Vuković G. (2012). Određivanje ostataka pesticida u dečijoj hrani upotrebom gasne i tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

Vuković G., Stereva D., Bursić V., Mladenova R., Lazić S. (2012). Application of GC-MSD and LC-MS/MS for the determination of priority pesticides in baby foods in Serbian market, LWT – Food Science and Technology, 49, 312-319.

Wang S., Moustaid-Moussa N., Chen L., Mo H., Shastri A., Su R. (2014). Novel insights on dietary polyphenols and obesity. The Journal of Nutritional Biochemistry, 25, 1–18.

Warner R. D., Kauffman R. G., Greaser M. L. (1997). Muscle protein changes *post mortem* in relation to pork quality traits. Meat Science, 45, 339-352.

Weltstein D. (1957). Chlorophyll-letale und der submicroscopische formwechsel der plastiden. Experimental Cell Research, 12, 437-440.

Whitaker T. B. (2006). Sampling foods for mycotoxins. Food additives and contaminants, 23(1), 50-61.

Worthington V. (2001). Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 7(2), 161-173.

O autorima

Dr Saša Krstović je docent za užu naučnu oblast Ishranu životinja na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. Završio je integrisane akademske studije veterinarske medicine i doktorirao biotehničke nauke na istom fakultetu. Ima više od deset godina istraživačkog iskustva u oblasti monitoringa, kontrole i dekontaminacije mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Pored rada u nastavi i nauci, angažovan je i u Laboratoriji za kontrolu kvaliteta hrane za životinje i animalnih proizvoda na matičnom fakultetu, gde se bavi kontrolom kvaliteta i zdravstvene bezbednosti hrane za životinje, kao i poslovima održavanja akreditacije. Boravio je na stručnim usavršavanjima u Sloveniji, Italiji, Belgiji, Holandiji, Portugaliji i Izraelu. Aktivan je u brojnim naučnim projektima, uključujući i dva projekta iz Horizon Europe programa. Prema SCOPUS-u, do 2024. godine, njegove publikacije imaju preko 400 citata i Hiršov indeks 11.

Prof. dr Vojislava Bursić angažovana je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu od 2000. godine. Nakon završenog Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, magistrira i doktorira na Poljoprivrednom fakultetu. Tokom rada, objavila je preko 480 publikacija, naučnih radova međunarodnog i nacionalnog značaja (49 radova na SCI listi), monografije, praktikum i udžbenik. Učestvovala je u većem broju međunarodnih i domaćih projekata, pri čemu je nacionalni koordinator međunarodnog projekata finansiranih od strane Evropske Komisije (CEEPUS - Training and research in environmental chemistry and toxicology). Pored ekspertize u oblasti fitofarmacije, naučno istraživanje bazira na kontaminantima hrane, vode i zemljišta.

Izvodi iz recenzija

„...Sadržaj, forma, struktura i obim rukopisa odgovaraju nastavnom planu praktične nastave koja se u skladu sa specifikacijom predmeta realizuje u formi vežbi. Metodički, rukopis je dobro koncipiran i logički uređen, a sadržaji su prilagođeni potrebama studenata. Napisan je na savremen način, jasno, razumljivim stilom i stručnom terminologijom koja je prilagođena budućim korisnicima. Dobru preglednost i laku čitljivost pripremljenog materijala obezbeđuje veliki broj slikovitih prikaza, koji olakšavaju usvajanje novih znanja i realizaciju vežbi...“

Novi Sad, 9. 7. 2024.

Recenzent

Dr Igor Jajić, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Novom Sadu

„...Rukopis je zasnovan na savremenim naučnim i stručnim dostignućima iz oblasti zdravstvene bezbednosti i kvaliteta poljoprivrednih proizvoda. Napisan je na savremen način, jasno, razumljivim stilom i naučno-stručnom terminologijom koja je prilagođena budućim korisnicima. Svi teorijski navodi dokumentovani su stručnim i naučnim izvorima koji su konsultovani i navedeni u spisku literature. Materijal je koncipiran tako da sadrži 18 tematskih celina u okviru kojih su obrađene teorijskih osnove neophodne za razumevanje značaja određivanja parametara kvaliteta različitih poljoprivrednih proizvoda, kao i razumevanje i pravilno izvođenje analitičkih metoda koje se koriste u te svrhe...“

Novi Sad, 8. 7. 2024.

Recenzent

Dr Snežana Kravić, redovni profesor
Tehnološki fakultet, Univerziteta u Novom Sadu

