

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Dora Benšek

7081/PT

**ODREĐIVANJE UDJELA PROTEINA U
VISOKOPROTEINSKIM PRAHOVIMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitika prehrambenih proizvoda

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Krpan

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE UDJELA PROTEINA U VISOKOPROTEINSKIM PRAHOVIMA

Dora Benšek, 0058206791

Sažetak:

Sportaši, fitness entuzijasti i općenito tjelesno aktivne osobe kao jedne od najčešće korištenih dodataka prehrani koriste dodatke proteina. Posežu za njima iz više razloga, kao što su poboljšanje izvedbe, promicanje snage mišića i veličine, često ne informirajući se dovoljno o njima. Potrošnja proteinskih dodataka koja je u konstantnom rastu može predstavljati problem zbog zabrinutosti za njihovu kvalitetu. Stoga je cilj ovoga rada bio odrediti udjel proteina u uzorcima visokoproteinskih prahova, usporediti ih s deklaracijama proizvoda i utvrditi jesu li dobivene vrijednosti u skladu sa Uredbom (EZ) br. 1924/2006 o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama koje se navode na hrani. Proteini su određeni metodom po Kjeldahlu direktno iz udjela dušika upotrebom Kjeltex uređaja, u 10 uzoraka visokoproteinskih proizvoda životinjskog i biljnog podrijetla, stranih i domaćih proizvođača, dostupnih na hrvatskom tržištu. Udjel proteina određen u svim analiziranim uzorcima je u granicama određenim Uredbom, a utvrđena odstupanja od podataka na deklaracijama su u dozvoljenim granicama prihvatljivosti propisanih Hrvatskom agencijom za hranu.

Ključne riječi: Kjeldahl, proteini, sigurnost hrane, visokoproteinski prahovi

Rad sadrži: 28 stranica, 6 tablica, 54 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Marina Krpan

Pomoć pri izradi: Saša Drakula, mag. ing.

Datum obrane: 18. lipnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology**

DETERMINATION OF PROTEIN CONTENT IN HIGH PROTEIN POWDERS

Dora Benšek, 0058206791

Abstract:

Athletes, fitness enthusiasts and active people use protein supplements as one of the most commonly used dietary supplements. They reach for them for a number of reasons, such as enhancing performance, promoting muscle strength and size, often not informed enough. The consumption of protein supplements that is constantly growing may be a problem due to concerns about their quality, so the aim of this work was to determine protein content in high protein powders, compare them with product declarations and determine whether values were in accordance with national regulations (EZ) no.1924/2006. The proteins were determined by Kjeldahl method directly from the nitrogen content using the Kjeltex device, in 10 high protein samples of animal and plant origin, foreign and domestic producers, available on the Croatian market. The protein content determined in all samples is within the limits established by regulations and the deviations are within limits prescribed by the Croatian Food Agency.

Keywords: food safety, high protein powders, Kjeldahl, proteins

Thesis contains: 28 pages, 6 tables, 54 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Marina Krpan, PhD, assistant professor

Technical support and assistance: Saša Drakula, MSc

Thesis delivered: June 18th 2018

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	
2.1. Građa proteina.....	2
2.2. Funkcije proteina.....	3
2.3. Potreba tijela za proteinima.....	4
2.3.1. Potreba za proteinima kod tjelesno aktivnih osoba.....	6
2.4. Dodaci prehrani.....	7
2.4.1. Proteinski dodaci.....	8
2.5. Proteinski prahovi	9
2.5.1. Životinjskog podrijetla	9
2.5.1.1. Proteini sirutke.....	10
2.5.1.2. Kazeini.....	10
2.5.2. Biljnog podrijetla.....	11
2.5.2.1. Proteini graška.....	11
2.5.2.2. Proteini lana i bundeve.....	12
2.5.2.3. Proteini riže.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	
3.1. Uzorci.....	14
3.2. Određivanje udjela vode u proteinskim prahovima.....	15
3.2.1. Materijali.....	15
3.2.2. Metoda.....	15
3.3. Određivanje udjela proteina u proteinskim prahovima.....	16
3.3.1. Materijali.....	16
3.3.2. Metoda.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	
4.1. Određivanje udjela vode u proteinskim prahovima.....	20
4.2. Određivanje udjela proteina u proteinskim prahovima.....	21
5. ZAKLJUČAK.....	24
6. LITERATURA.....	25

1. UVOD

Hrana se sastoji od nutrijenata koji imaju specifične metaboličke učinke na ljudsko tijelo. Makronutrijenti, koji čine veći dio prehrane pojedinca, služe za osiguravanje energije i esencijalnih nutrijenata nužnih za rast, održavanje funkcija i aktivnost (1). Proteini kao makronutrijenti imaju gradivnu, specifičnu fiziološku i energetska ulogu. Potrebni su za sintezu hormona, gena, za rast i održavanje tkiva i brojne druge funkcije u organizmu (2).

Dnevni zahtjevi za proteinima određeni su količinom aminokiselina koje su nepovratno potrošene u jednom danu. Različite agencije postavile su razine zahtjeva za dnevni unos proteina za opću populaciju (3), no tijekom posljednjih desetak godina, stara rasprava o proteinskim i aminokiselinskim zahtjevima za tjelesno aktivne pojedince privukla je veliku pažnju i u znanstvenoj i stručnoj literaturi (4).

Dodatak proteina jedan je od najčešće korištenih dodataka prehrani sportaša i tjelesno aktivnih osoba (5). Takve osobe konzumiraju proteinske dodatke prvenstveno za promicanje snage mišića, funkcije i moguće veličine (4). Znanstveni dokazi o fiziološkim učincima proteinskih dodataka nisu u potpunosti razjašnjeni. Različite studije upućuju na to da ovisno o čimbenicima kao što su dob, stupanj vježbanja, vrsta tjelesne aktivnosti, sastav tijela, vrijeme i količina potrošnje energije, koristi od proteinskih dodataka ima samo mala grupa korisnika (6,7). Rastuća potrošnja dodataka prehrani može predstavljati problem, s obzirom na zabrinutost za njihovu kvalitetu. Potrošnja dodataka od strane sportaša i fitness entuzijasta za poboljšanje rezultata vježbanja je u stalnom rastu. U nekim slučajevima, korisnici očekuju da dodaci ispunje prehrane potrebe nastale nepotpunom prehranom, dok u drugim slučajevima očekuju da dodaci poboljšaju njihove sportske izvedbe. Međutim, nema konsenzusa između liječnika i trenera o prednostima dodataka prehrani zbog brojnih kontaminiranih, patvorenih ili neučinkovitih dodataka koji mogu ozbiljno ugroziti zdravlje sportaša ili dovesti do dokazivanja dopingiranja u sportskim analizama (8).

Cilj ovoga rada bio je odrediti udjel proteina u uzorcima proteinskih dodataka prehrani u praškastom obliku, domaćih i stranih proizvođača, dostupnim na hrvatskom tržištu. Dobiveni rezultati udjela proteina uspoređeni su s podacima na deklaracijama te je tako utvrđena njihova sukladnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Građa proteina

Proteini kao makronutrijenti, potrebni su ljudskom organizmu za brojne funkcije pa čovjek dušik, koji mu je potreban prvenstveno za izgradnju proteina, dobiva iz hrane u obliku proteina, za razliku od biljaka koje dušik dobivaju iz tla zahvaljujući bakterijama koje imaju sposobnost iskorištavanja atmosferskog dušika (9).

Osnovne gradivne jedinice proteina su aminokiseline (AK), koje su prema osnovnoj građi jednake u strukturnom pogledu. Svaka sadrži karboksilnu (-COOH) i amino (-NH₂) skupinu te jedan od 20 mogućih različitih funkcionalnih nastavaka (-R) (10). U proteinima su povezane peptidnim vezama koje povezuju α-karboksilnu skupinu jedne i α-amino skupinu druge aminokiseline te tako stvaraju takozvanu primarnu strukturu proteina, odnosno nerazgranati polipeptidni lanac izgrađen od pravilno ponavljane okosnice i ogranaka koji su međusobno različiti. Sekundarna struktura sačinjena je od α-uzvojnice i β-nabrane ploče, dviju periodičnih struktura koje su stabilizirane vodikovim vezama između amino i karboksilnih skupina u okosnici lanca. Treći sastavni element sekundarne strukture proteina je β-okret, koji omogućuje promjene smjera proteinskog lanca, a nastaje povezivanjem karboksilne skupine ostataka n i amino skupine ostataka n+3 vodikovom vezom. Na taj je način omogućeno smatanje proteinskog lanca u kuglasti, globularni oblik. Ono što čini tercijarnu strukturu proteina je prostorni odnos aminokiselinskih ostataka međusobno udaljenih u linearnom slijedu. Ona je stabilizirana povezivanjem odgovarajućih grupa pobočnih lanaca aminokiselinskih ostataka velikim brojem nekovalentnih veza (vodikovim, ionskim, Van der Waalsovima i hidrofobnim interakcijama). Kvaternu strukturu, kao dodatnu strukturnu razinu, imaju oligomerni proteini koji sadrže više od jednog proteinskog lanca. Svaki polipeptidni lanac u ovakvom proteinu naziva se podjedinica, a one su međusobno povezane nekovalentnim vezama između pobočnih lanaca njihovih aminokiselinskih ostataka. Oligomerni proteini mogu biti građeni od istih ili od različitih podjedinica (11).

Slijed aminokiselina je taj koji određuje funkciju proteina, a on ovisi o informaciji pohranjenoj u DNK u jezgri stanice. Od svega stotinjak aminokiselina, koliko ih se u prirodi pojavljuje, samo 20 se pojavljuje u proteinima hrane i ljudskog tijela. Uz razne druge podjele, kao što su prema ulozi u organizmu, na glukogene i ketogene ili prema njihovom podrijetlu, glavna podjela 20 aminokiselina prisutnih kod ljudi je u tri skupine: (1.) esencijalne, koje je potrebno unijeti hranom jer ih organizam ne može sam sintetizirati ili ne može sintetizirati dovoljno, zatim (2.) uvjetno esencijalne, koje postaju esencijalne prilikom manjka njihova

prekursora ili kad sinteza ne zadovoljava potrebe te (3.) neesencijalne (Tablica 1). Aminokiseline prisutne u krvi čovjeka podrijetlom su iz hrane ili razgradnje tjelesnih proteina ili su sintetizirane u tijelu (neesencijalne aminokiseline), a koriste se kao izvor energije, uključuju se u različite metaboličke puteve ili pak služe za sintezu proteina (9). Svih 20 aminokiselina može tvoriti neki protein, a svaka od njih ima svoje mjesto i ulogu u peptidnom lancu te svaka ima svoja svojstva kojima doprinosi konačnoj strukturi i funkciji istog proteina (10). U tablici 1. navedene su esencijalne, uvjetno esencijalne i neesencijalne aminokiseline.

Tablica 1. Esencijalne, uvjetno esencijalne i neesencijalne aminokiseline (9)

ESENCIJALNE	UVJETNO ESENCIJALNE	NEESENCIJALNE
Valin	Tirozin	Alanin
Leucin	Cistein	Asparagin
Izoleucin	Glutamin	Aspartat
Metionin	Arginin	Glutamat
Lizin	Glicin	Hidroksiprolin
Treonin	Prolin	Serin
Triptofan		
Fenilalanin		
Histidin		

2.2. Funkcije proteina

Proteini u tijelu mogu biti strukturni (npr. kolagen), kontraktilni (aktin i miozin u mišićima), transportne molekule (hemoglobin kao prenositelj kisika), hormoni (inzulin i glukagon), enzimi (npr. probavni), imunoproteini te oni koji održavaju kiselinsko-baznu ravnotežu (9). Proteini kao gradivne tvari, upravo zbog svoje strukturne raznolikosti, obavljaju mnoštvo funkcija u organizmu pa tako primarno utječu na rast i razvoj, sudjeluju u nadoknadi istrošenog tkiva mišića, kože, kose, noktiju, kosti, vezivnih tkiva i tjelesnih organa (12).

Proteini u obliku enzima, koji su ključni za kataliziranje brojnih bioloških biokemijskih reakcija kod biljaka, životinja i drugih živih vrsta, i u obliku hormona, reguliraju tjelesne procese, ubrzavaju ih i zaustavljaju (10). Sastavni su dio svake stanice te antitijela koji sudjeluju u obrani organizma od bolesti (12). Pojavljuju se u velikom broju oblika kao vrlo kompleksni spojevi pa tako proteini mogu i stvarati komplekse s metalima (metaloproteini) ili lipidima (poput HDL ili LDL kolesterola) (10) koji kao transportne molekule, imaju ulogu da prenose nutrijente i druge molekule, npr. već spomenuti hemoglobin koji omogućuje odvijanje procesa disanja u svim stanicama u kojima se taj ciklus odvija i lipoprotein koji omogućuje prijenos masti. Važnu ulogu imaju i u održavanju normalne ravnoteže tjelesnih tekućina i kiselinско-bazne ravnoteže (12). Isto tako, osnovne gradivne jedinice proteina, aminokiseline (od kojih posebice glutamin) pa time i sami proteini, imaju vrlo važnu ulogu u održavanju funkcije imunskog sustava (13). Još jedna vrsta proteina su oni membranski, koji se nalaze u membranama stanica i tamo tvore membranske kanaliće, tzv. pumpe (npr. kalcijevi kanali). Kao takvi imaju regulatornu ulogu kojom kontroliraju protok malih molekula i iona prilikom njihova ulaska ili izlaska iz stanice (10).

Teorija evolucije postavlja da se sintezom proteina i njihove funkcije stvarala prirodna selekcija. Evolucija je tako usko povezana s mutacijama i promjenama DNA, koja je zapravo izvor informacija za sintezu proteina. Svaka stanica organizma sintetizira specifične proteine koji svojom građom određuju ulogu same stanice, a tako i formiraju tkiva, čime je osigurana učinkovitost funkcija svakog organizma (10).

2.3. Potreba tijela za proteinima

Sinteza proteina zahtjeva prisutnost svih aminokiselina (esencijalnih i neesencijalnih) zastupljenih u tom proteinu te je regulirana kao i razgradnja tjelesnih proteina. Kod zdravih osoba, količina proteina unesena hranom u ravnoteži je s količinom koju tijelo upotrebljava za održavanje svojih tkiva i gubicima dušika fecesom, urinom te kroz kožu (9). Govoreći o proteinima u prehrani čovjeka, postoji nekoliko izvora proteina u hrani. Primarni su biljni i životinjski, ali mogu biti i proteini kvasaca, gljiva i algi. Prema sadržaju aminokiselina od kojih su građeni proteini, određuje se njihova biološka vrijednost koja govori o sadržaju esencijalnih aminokiselina u proteinu, čime on može i ne mora biti biološki punovrijedan protein (10). Tako proteini iz hrane životinjskog podrijetla (meso, perad, jaja, riba, mliječni proizvodi – osim kolagena) osiguravaju sve esencijalne aminokiseline u količinama koje su potrebne organizmu, odnosno potpuni su, dok su oni proteini iz hrane biljnog podrijetla

nepotpuni s obzirom na sadržaj pojedinih aminokiselina. Kombiniranje raznih nepotpunih namirnica osigurava potrebne količine svih esencijalnih aminokiselina, a taj koncept nije potrebno zadovoljavati u svakom obroku, već u cijelom danu (9).

Kod odraslih osoba, preporučeni unos proteina je 0,8 g/kg tjelesne mase (TM), što se osigurava unosom proteina u rasponu 10 – 35 % cjelodnevnog unosa energije, uz prijedlog povećanja preporuke na 1,2 g/kg TM za sportaše. Takva preporuka odnosi se samo na uravnoteženo energetske stanje, što kod aktivnih pojedinaca često nije moguće, s obzirom da je ponekad teško nadoknaditi svu potrošenu energiju. Isto tako, ponekad se unos energije i namjerno ograničava zbog postizanja željene tjelesne mase, stoga je preporučeni unos proteina za različite grupe ljudi drugačiji, odnosno veći kod sportaša koji imaju veći utrošak energije. Uobičajenom prehranom, kada je postignuta energetska ravnoteža, odnosno unos energije jednak je energetske potrošnji, unos proteina viši je od 0,8 g/kg TM, stoga se kod iznimno visokog ili iznimno niskog unosa energije, potrebna količina proteina računa prema jedinici TM, a ne s obzirom na energetske udio jer takav izračun daje pretjeranu, odnosno nedovoljnu količinu proteina. Sintaza i razgradnja proteina tijekom tjelesne aktivnosti i oporavka organizma ovisi o brojnim čimbenicima kao što su intenzitet i trajanje aktivnosti, unos energije, dob, spol i dostupnost ugljikohidrata (9).

Novorođenčad i djeca, kao i trudnice i sportaši, imaju povećane potrebe za proteinima. Osim toga, niz bolesti i komplikacija (povišena tjelesna temperatura, prijelomi, opekline, kirurška trauma) uzrokuju pojačane gubitke proteina tijekom akutne faze bolesti pa su opravdani i zahtjevi za povećani unos – 1 do 1,5 g/kg TM (14). Najveći preporučeni unos je za sportaše koji se bave vježbama snage i to ne bi trebalo biti iznenađujuće jer je poznato da je ova vrsta vježbanja izuzetno snažnog anaboličkog poticaja (9).

Ako unos proteina, odnosno esencijalnih aminokiselina nije adekvatan, može doći do gubitka tjelesnih proteina te neadekvatne ravnoteže dušika. Dva najčešća stanja do kojih može doći uslijed dugotrajnog razdoblja nedovoljnog unosa proteina su kwashiorkor i marazam. Kwashiorkor je stanje u kojem postoji deficit proteina, a ukupni energetske unos može biti osiguran povećanim unosom ugljikohidrata, dok se marazam javlja zbog smanjenog energetske unosa uzrokovanog djelomičnim ili potpunim gladovanjem. S druge strane, previše proteina u prehrani je štetno budući da se urinom izlučuje kalcij, što može uzrokovati razne bolesti kao što su karcinom, osobito kolona i dojke, aterosklerozu i osteoporozu (1).

2.3.1. Potreba za proteinima kod tjelesno aktivnih osoba

Kod osoba koje su tjelesno aktivne, unos proteina od 0,8 g/kg TM kolika je preporuka za opću populaciju, nije dovoljan za održanje mišićne mase, stvaranje novog mišićnog tkiva i oporavak mišića nakon napornog treninga (15). U ovakvim slučajevima, kod aktivnog vježbanja, povećana je potreba za unosom proteina iz više razloga: zbog povećanja oksidativnog kapaciteta povećanjem mitohondrijskih proteina, povećanja kapaciteta oksidacije aminokiselina u vježbama izdržljivosti i rasta mišića u vježbama snage (9).

Što se tiče izdržljivosti, energiju za takve vježbe osiguravaju primarno masti i ugljikohidrati. Skeletni mišići koriste i neke aminokiseline, a to su razgranati leucin, izoleucin i valin, te nerazgranati lizin. S obzirom da su sve navedene aminokiseline esencijalne, a njihovi izvori su tjelesni proteini i hrana, vježbe izdržljivosti povećavaju potreban unos proteina na vrijednost od 1,2 – 1,4 g/kg TM. Kod velikog broja tjelesno aktivnih osoba ta vrijednost se čak i prekoračuje već samom uobičajenom prehranom, dok se nedovoljan unos proteina zamjećuje tek kod osoba koje se bave gimnastikom, plesom, trčanjem i hrvanjem. Kod vježbi izdržljivosti dolazi do povećanja kapaciteta oksidacije aminokiselina iz razloga što se redovitim treniranjem sama oksidacija aminokiselina smanjuje, što je dobro u slučajevima kada je mala raspoloživost ugljikohidrata. Zbog sprječavanja degradacije mišićnih tkiva, korisno je vježbe ovakvog tipa započinjati s popunjenim rezervama glikogena. Ukoliko je adekvatna opskrba ugljikohidratima prije i nakon vježbi izdržljivosti, dodatak proteina ne pomaže u poštediti mišićnog glikogena ili njegove obnove, ali ima dobar anabolički učinak i pomaže oporavku mišića (9).

Kod vježbi jakosti i snage, kao što je bodybuilding, također je potreban veći unos proteina u usporedbi s tjelesno neaktivnim osobama, naročito u prvih 3 – 6 mjeseci vježbanja, zbog mišićnog rasta. Preporučeni unos proteina kod početnika u ovom tipu vježbanja iznosi 1,2 – 1,7 g/kg TM, dok je kod iskusnijih i naprednijih vježbača, zbog djelotvornijeg korištenja proteina unos manji, ali i dalje veći od unosa kod tjelesno neaktivnih pojedinaca. Nakon vježbi snage potrebno je osigurati hranjive tvari jer je sinteza proteina pojačana 24 – 48 sati nakon vježbanja, a ovdje važnu ulogu ima kombinacija ugljikohidrata i proteina koji osiguravaju potrebne aminokiseline za sintezu proteina dok sami ugljikohidrati sprječavaju njihovu razgradnju. Još jedan važan čimbenik kod sinteze proteina je inzulin koji ju u mirovanju potiče, a nakon vježbanja sprječava razgradnju koja je također pojačana u istom razdoblju od 24 – 48 sati nakon vježbi, ali u tom odnosu sinteze i razgradnje proteina, mišići su u pozitivnoj ravnoteži. Unos proteina poželjan je i prije vježbanja, ali u manjoj mjeri.

Većim unosom od 20 g potpunih proteina, koliko je dovoljno za maksimalnu sintezu proteina nakon vježbi snage (9), ne postižu se bolji rezultati, već se dodatni proteini uneseni prehranom deaminiraju (otklanjanje dušika) te koriste kao energija ili se recikliraju u masti i pohranjuju kao masno tkivo (6).

Međutim, još se uvijek vode rasprave o tome trebaju li sportaši i tjelesno aktivne osobe više proteina od ostale populacije. Američka Nacionalna akademija znanosti (NAS) zaključuje da zbog manjka dokaza u suprotno, nije potreban dodatni unos proteina za zdrave osobe koje se bave vježbama snage ili izdržljivosti. Znanstvenici koji se bave sportom dodaju da ukoliko sportaši trebaju više energije, preporučena količina se lako (10 – 35 % od energetske unosa) može osigurati adekvatnom prehranom, tako da suplementi postaju nepotrebni (6). Na pitanje da li sportaši trebaju više proteina od normalne populacije – većina stručnjaka odgovoriti će negativno. Bez obzira na uvjerenja trenera i sportaša, vjerojatno nema pogodnosti od uzimanja pretjeranih količina proteina: studije pokazuju da povećanje unosa proteina od 3 puta u odnosu na preporučenu količinu ne povećava radni kapacitet tokom intenzivnog treninga (17).

Za postizanje maksimalne sinteze proteina, optimalna doza je 20 – 40 g visokovrijednih proteina, što je otprilike 10 – 20 g esencijalnih aminokiselina, svakih 4 – 5 sati, uključujući unos prije spavanja. Što se tiče vremena unosa proteina u odnosu na vrijeme vježbanja, manje je bitno je li unos proteina prije ili nakon vježbanja, već je najvažnije da je vremenski odnos tih dviju komponenata blizu (15).

2.4. Dodaci prehrani

Tjelesno aktivne osobe, ponajviše profesionalni sportaši posežu za dodacima prehrani iz više razloga kao što su brži oporavak, poboljšanje zdravlja, zadovoljavanje povećanih nutritivnih potreba, jednostavnija opskrba hranjivim tvarima, prevencija ili nadomještanje manjka neke hranjive tvari, radi postizanja bolje izvedbe i rezultata, kompenzacije nepravilne prehrane, regulacije tjelesne mase ili zbog uvjerenja da je korištenje dodataka praksa svakog sportaša (16).

Iako razne sportske napitke, energetske pločice, gelove i druge proizvode koji osiguravaju energiju i hranjive tvari ne ubrajamo u dodatke prehrani u užem smislu, oni se kao takvi upotrebljavaju i mogu imati učinak na poboljšanje rezultata i izvedbe. Prije odluke o uzimanju bilo kakvih dodataka prehrani, bilo u užem ili širem smislu, treba temeljno

razmotriti što kvalitetnije znanstvene dokaze, podatke o dugoročnoj sigurnosti njihove upotrebe, podatke o djelotvornoj dozi i najvažnije, mogućnost prisustva štetnih i nedozvoljenih tvari u njima. Nažalost, za brojne dodatke koji imaju razne utjecaje na rezultate i izvedbe, dokazi o djelotvornosti nisu dovoljno ili nisu uopće utemeljeni, već postoji samo nekoliko iznimaka koji se mogu opravdano koristiti kao što su kofein, kreatin i bikarbonati, čija je djelotvornost znanstveno dokazana (16).

Poznati svjetski stručnjak s područja sportske prehrane, profesor Ron Maughan, duhovito je postavio tri zakona o dodacima prehrani: (1.) Ako suplement djeluje, vjerojatno je zabranjen; (2.) ako je dozvoljen, vjerojatno ne djeluje; (3.) postoje iznimke (16).

2.4.1. Proteinski dodaci

Proteine kao najpopularnije dodatke prehrani najviše koriste sportaši i tjelesno aktivne osobe. Postoji više razloga zbog kojih se takvi dodaci koriste, a neki od njih su poboljšano zadržavanje dušika i povećanje mišićne mase što je izrazito važno kod aktivnih pojedinaca. Isto tako, dodatak proteina povećava jakost, pomaže kod održavanja TM, kontrolira apetit tijekom planiranog ili neizbježnog gubitka TM i ublažava gubitak mišićne mase pri negativnoj ravnoteži energije. Pospješuje sposobnost, izvedbu, poboljšava oporavak i unapređuje zdravlje (15).

Ono što svaki visokokvalitetan protein mora zadovoljavati je da osigurava sve esencijalne aminokiseline u potrebnim količinama, osigurava dovoljno drugih aminokiselina kao izvor dušika za sintezu neesencijalnih aminokiselina i da je lako probavljiv (9).

Usprkos tome što izgleda kao da su esencijalne aminokiseline najbitnije kod sinteze proteina, one same nisu dovoljne, a povećanje koje one uzrokuju kod sinteze proteina jednako je onom kojeg uzrokuju potpuni proteini poput onih iz mlijeka. Razne kombinacije proteina soje, sirutke i kazeina pomažu kod oporavka i sinteze proteina nakon tjelesne aktivnosti. Jedno istraživanje dokazalo je da se proteini uneseni 30 min prije spavanja (nakon vježbanja) tijekom noći probavljaju, apsorbiraju i potiču sintezu mišićnih proteina.

Što se tiče loših strana, osim što visoke doze pročišćenih aminokiselina mogu biti kancerogene, postoje i drugi zdravstveni rizici kojima se izlažu korisnici takvih dodataka prehrani. Djelotvornost raznih dodataka nije dovoljno istražena, moguće su slučajne kontaminacije proizvoda, a moguća je i neravnoteža u metabolizmu. Isto tako, sinteza proteina u ljudskom tijelu nema beskonačnu mogućnost povećanja prilikom povećanog unosa energije i proteina, štoviše, i previsoki unos proteina ima potencijalne negativne

posljedice. Jedna od njih je povećani gubitak iona kalcija urinom što povećava rizik od osteoporoze, ali se može izbjeći prehranom koja sadrži omjer kalcija (mg) : proteina (g) \geq 20:1. Drugi negativni učinak je na funkciju bubrega (9), zbog velike količine dušika, odnosno ureje koja opterećuje jetru i bubrege. Dobro istrenirani sportaši koji su konzumirali visokoproteinsku prehranu (2,8 g/kg TM ili manje) nisu imali poremećenu funkciju, ali postoje osobe koje posebno moraju paziti na unos proteina, a to su osobe koje su sklone dijabetesu i bolestima bubrega, kao i bubrežnim kamencima (17). Neadekvatnim unosom tekućine, moguća je dehidracija prilikom pretjeranog unosa proteina (9).

Većina proteinskih dodataka koje sportaši koriste dolazi u raznim oblicima kao što su napitci, prahovi, tablete i pročišćeni proteini. Takvi dodaci sadrže proteine koji su "probavljeni" kemijskim reakcijama u laboratorijima u svoje gradivne jedinice, jednostavne aminokiseline. Vjeruje se da se jednostavne aminokiseline brzo apsorbiraju i da ih tijelo koristiti za izgradnju mišićne mase, te da povećavaju izdržljivost i snagu. Pobornici njihova korištenje tvrde da aminokiseline povećavaju prirodnu proizvodnju hormona testosterona, faktora rasta i inzulina, te da se tako povećava masa mišića, izdržljivost i olakšan je gubitak tjelesne masti. Međutim, nakon provedenih znanstvenih istraživanja na zdravim osobama, rezultati su ukazali da korištenje dodataka aminokiselina nema učinka na hormone ili na izvedbu vježbanja. U stvarnosti se aminokiseline sasvim dobro apsorbiraju iz složenih oblika – proteina, a koncentrirane otopine aminokiselina izvlače vodu iz probavnog sustava što dovodi do iritacije, grčeva i probavnih smetnji (17).

Uz ispravan unos proteina od 15 % ukupnih kalorija i ispravan unos energije, dodaci prehrani s proteinima i aminokiselinama nisu potrebni jer uobičajena prehrana osigurava dovoljno proteina (9).

2.5. Proteinski prahovi

2.5.1. Životinjskog podrijetla

Mlijeko, kao bitan izvor proteina životinjskog podrijetla i vrlo popularan u današnje vrijeme, sadrži dvije vrste proteina: kazein, koji čini 80 % proteina mlijeka, te protein sirutke (engl. *whey*), koji čini preostalih 20 %. Ono po čemu se ove dvije vrste mliječnih proteina najviše razlikuju je vrijeme njihovog probavljanja, koje je kod proteina sirutke mnogo kraće u odnosu na ono kod kazeina (18).

2.5.1.1. Proteini sirutke

U mnoštvu sportskih dodataka prehrani, proizvodi koji sadrže protein sirutke predstavljaju važan izvor aminokiselina. Međutim, kao rezultat nedostatka ujednačenosti proizvoda, prehrambena kvaliteta ovih vrsta proizvoda je neizvjesna (19). Među sastojcima koji se koriste za proizvodnju proteinskih dodataka (npr. kazeinati, sirutka, jaja, soja i proteini pšenice), protein sirutke je najviše komercijaliziran na tržištu sportske prehrane zbog visoke prehrambene vrijednosti u usporedbi s drugim izvorima proteina (20,21). Protein sirutke predstavlja 20 – 30 % proteina prisutnih u kravljem mlijeku; to je složena mješavina globularnih proteinskih molekula koje se uglavnom sastoje od α -laktalbumina (α -La), β -laktoglobulina (β -Lg) (22). Razlike u fizikalno-kemijskom sastavu proizvoda od proteina sirutke mogu potencijalno utjecati na njegov nutritivni učinak na ljudsko tijelo (23).

Hranjiva vrijednost dodataka proteina sirutke ovisi o sastavu aminokiselina, bioraspoloživosti bitnih aminokiselina, probavljivosti proteina i fiziološkoj upotrebi specifične aminokiseline nakon probave i apsorpcije (24). Protein sirutke smatra se važnim izvorom esencijalnih aminokiselina (engl. *esencial amino acid*, EAA), od kojih su razgranate aminokiseline (engl. *branched-chain amino acid*, BCAA) leucin, izoleucin i valin povezane s povećanim poticanjem sinteze skeletnih mišićnih proteina (19). Protein sirutke zbog velike koncentracije aminokiseline cisteina, koji je od vitalnog značaja za proizvodnju intercelularnog glutationa (engl. *glutathione*, GSH), najvažnijeg čistača slobodnih radikala, potencijalno ima antioksidativna svojstva (25). Dodatak proteina sirutke može imati efekt koji štedi mišiće (26), te učinke sniženja hipotriacilglicerola i kolesterola (27) u zdravih pojedinaca ili životinja.

2.5.1.2. Kazein

Kazein, kao i drugi proteini životinjskog podrijetla, sadrži sve esencijalne aminokiseline potrebne ljudskom tijelu, zbog čega možemo reći da je on kompletan izvor proteina. Pojavljuje se u dva oblika, kao (1.) micelarni kazein, koji je najpopularniji polako probavljivi protein, te (2.) kazein hidrolizat, koji je brže probavljivi oblik kazeina. Kazein, u obliku micelnog kazeina, je dobro poznat kao protein sporo otpuštajućeg učinka, zbog spore apsorpcije u crijevima što znači da konstantno, ali sporije, otpušta aminokiseline tijekom dužeg vremenskog perioda, čime omogućava mišićima sintezu proteina čak i u trenucima kada nema unosa proteina u organizam (18).

Nakon unosa kazeina u organizam, koncentracija aminokiselina u krvi je povišena čak i do 7 sati, zbog čega se najčešće koristi noću kada nema nikakvog unosa proteina. Učinak koji se

time postiže je antikatabolički, što pomaže u očuvanju mišića i smanjuje njihovu razgradnju zbog konstantne opskrbe mišića aminokiselinama i male brzine probave. Kazein doprinosi povećanju mišićnog rasta, gubitku tjelesne masti, a također sadrži i neke makronutrijente kao što su kalcij i fosfor (18).

2.5.2. Proteini biljnog podrijetla

U posljednjih nekoliko godina javlja se snažan interes za potrošnju proteina biljnog podrijetla kao zamjene za one životinjskog podrijetla (npr. sirutke i kazeina), prvenstveno zbog pristupačnijih cijena i više održivosti s nižim udjelom ugljika (28). Štoviše, dijeta na biljnoj bazi je pokazala i pozitivne zdravstvene učinke, kao što je smanjenje razine kolesterola i krvnog tlaka, uravnoteženje šećera u krvi, pa čak i smanjenje rizika od razvoja nekih vrsta raka (29).

Drugi razlozi povećane potrebe za korištenjem biljnih proteina su sigurnost hrane i održivost okoliša, zbog čega su oni u velikoj potražnji među zdravstveno osviještenim potrošačima. Proteini soje su najčešće korišteni biljni proteini u ljudskoj prehrani, iako su proteini iz drugih biljnih izvora, uključujući pšenicu, rižu, kukuruz, grašak, krumpir i druge, također komercijalno dostupni (30,31).

2.5.2.1. Protein graška

Suhi grašak (*Pisum sativum L.*) je sekundarna najznačajnija mahunarka koja čini najveći postotak (36 %) od ukupne proizvodnje mahunarki (32). Trenutno, velika većina komercijalno dostupnih proteinskih izolata je protein graška ekstrahiran iz žute vrste graška. Sadržaj proteina u žutom grašku, ovisno o sorti, kreće se od 18 – 30 % i sadrži višu razinu dviju aminokiselina, lizina i triptofana (28). Albumini i globulini su glavni proteini koji se nalaze u toj vrsti graška (33). Oni doprinose površinskim svojstvima proteina graška kao što je hidrofobnost, emulgiranje i kapacitet vezanja ulja (34,35). Međutim, loša funkcionalna svojstva proteina žutog graška, kao što su kiselinska topljivost i toplinska stabilnost, ograničavaju njihovu primjenu i predstavljaju izazov pri korištenju hrane u tekućem obliku kao što su napitci (36).

Što se tiče njegova sastava, protein graška u prahu ne sadrži sve bitne aminokiseline potrebne za izgradnju mišića. Uz njegovu primjenu, potrebno je upariti i neki drugi izvor proteina, kao što je grah, quinoa ili tofu, da bi ga upotpunili. Preporuča se korištenje u

umjerenim količinama jer može izazvati gubitak kalcija iz kostiju zbog svog utjecaja na razinu mokraćne kiseline u tijelu (21).

Pozitivna strana ovog alkalizirajućeg, slatkastog proteinskog praha je njegovo hipoalergensko svojstvo i izuzetno laka probavljivost. Ne sadrži gluten, laktozu ni masti pa je odličan nadomjesni protein za vegetarijance i vegane, osobe intolerantne na laktozu, kao i one alergične na soju i gluten te osobe s osjetljivom probavom (37).

2.5.2.2. Protein lana i protein bundeve

Laneno sjeme (*Linum usitatissimum L.*, članica *Linaceae*) i sjemenke bundeve (*Cucurbita pepo L.*, članica *Cucurbitaceae* obitelji) dugo se i opsežno koriste kao tradicionalna zdrava hrana u Tunisu i drugim zemljama Sjeverne Afrike.

Sjemenke lana sadrže visoke razine omega-3 masne kiseline (38), brojna vlakana i fitokemikalije (39). 32 – 45 % sastava sjemenki uključuje ulja, gdje je 51 – 55 % α -linolenska kiselina, prekursor eikosapentanoične kiseline (engl. *eicosapentaenoic acid*, EPA) i dokozaheksanske kiseline (engl. *docosahexaenoic acid*, DHA) (40). Glavne fiziološke prednosti lanenog sjemena prvenstveno se pripisuju visokom sadržaju linolenske kiseline koji doprinosi njihovim antioksidativnim svojstvima (41), borbi protiv različitih bolesti, uključujući aterosklerozu, dijabetes, hipertenziju te brojnim protuupalnim i antikancerogenim učincima (38).

Sjemenke bundeve ljudi koriste i kao grickalice nakon procesa soljenja i prženja, svuda u svijetu, a najviše u arapskim zemljama (42). Te sjemenke su izvrsni izvori proteina (25,2 – 37 %), vitamina i ulja (37,8 - 45,4 %) (38,43), a osobito omega-6 masnih kiselina koje imaju brojne biološke i druge učinke (44).

2.5.2.3. Protein riže

Riža je osnovna namirnica za oko 3,5 milijardi ljudi širom svijeta, uključujući azijske zemlje koje čine najveći dio proizvodnje i potrošnje riže. U Aziji, riža osigurava do 50 % opskrbe hrane i znatan udio proteinskog unosa za milijune ljudi (45). Usprkos tome što je sadržaj proteina riže relativno nizak, njegova ukupna proizvodnja kao proteina hrane po hektaru drži drugo mjesto među žitaricama, odmah nakon pšenice (31). Dva glavna izvora rižinih proteina jesu rižino brašno nastalo mljevenjem riže ili razbijanjem rižinih zrna i meso riže, a dobivaju se raznim postupcima njihove ekstrakcije koji uključuju alkalne, enzimske i fizičke metode (46,47).

Proteini riže općenito se smatraju hipoalergenskim (31), a procjenjuje se da riža ima veću probavljivost proteina i biološku vrijednost u odnosu na druge žitarice (pšenicu, kukuruz, ječam, proso i sirak). Smatra se da je uzrok veći sadržaj lizina u riži (31), tj. prva ograničavajuća aminokiselina među proteinima žitarica (48). U istraživanju u kojem su bile uspoređene prehrambene kvalitete riže, soje, kazeina i proteina sirutke, proteini zrna riže i rižinog endosperma pokazali su izvrsne vrijednosti probavljivosti (90,8 – 94,8 %), usporedive s onima drugih analiziranih proteinskih sastojaka (91,7 – 94,8 %), a biološke vrijednosti (66,7 – 72,6 %) na drugom mjestu, odmah iza vrijednosti proteina sirutke (78,8 %) (49). Proteinski sastojci riže se obično proizvode industrijski u praškastom obliku. Glavne prednosti praškastog oblika nad tekućim su povećan rok trajanja zbog smanjenog udjela vode, čime se pospješuje očuvanje nutritivnih, organoleptičkih i fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka (50).

Rižin protein sadrži u prosjeku 80 % proteina, od kojih su gotovo sve esencijalne aminokiseline. Nedostaje jedino triptofan, koji se lako može nadoknaditi kombiniranjem s drugim kompletnim proteinom, najčešće s proteinom graška, s kojim čini idealnu kombinaciju. Protein riže ujedno je bogat vitaminima B skupine: tiaminom, riboflavinom, niacinom te mineralnim tvarima: fosforom, željezom i kalijem. Izvrstan je odabir za sportaše koji su izloženi intenzivnim tjelesnim aktivnostima, a veganima i osobama intolerantnim na laktozu i gluten odličan je izvor proteina (51).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uzorci

Određen je udjel vode i proteina u 10 uzoraka proteinskih dodataka, u praškastom obliku, domaćih i stranih proizvođača, dostupnih na hrvatskom tržištu. Od toga, 6 uzoraka stranih proizvođača od kojih je 1 uzorak micelarnog kazeina te 5 uzoraka proteina sirutke (engl. *whey*) kao najpopularnijeg proteinskog dodatka i 4 uzorka proteina domaćih proizvođača: bio protein lana, graška, bundeve i riže.

Tablica 2. Analizirani uzorci proteinskih prahova

UZORAK	PROIZVOD	OPIS PROIZVODA NA DEKLARACIJI
1	VPP – proteini kazeina Naziv na proizvodu: Optimum Nutrition (ON) – 100 % Gold standard micellar casein	Kazein – prah, sa sladilima. Sadrži: micelarni kazein (sadrži emulgator: sojin lecitin), kakao prah smanjene količine masti, arome, sol, zgušnjivači (celulozna guma, karagenan, guar guma), sladila, kompleks enzima (amilaza, proteaza, celulaza, β -D-galaktozidaza, lipaza). Može sadržavati gluten, jaja, orašaste plodove i kikiriki u tragovima.
2	VPP – proteini sirutke Naziv na proizvodu: Quality Nutrition Technology (QNT) – Metapure zero carb whey	Izvor proteina koji pospješuje rast mišićne mase. Sadrži: izolat proteina sirutke, mlijeko, emulgator (sojin lecitin), arome, boje, sladila, koncentrat soka mrkve. Sadrži prirodne šećere.
3	VPP – proteini sirutke Naziv na proizvodu: Optimum Nutrition (ON) – Protein whey	Protein whey – prah, sa sladilima, Chocolate Milkshake. Sadrži: Mješavina proteina sirutke (96%) (koncentrat proteina sirutke, izolat proteina sirutke, emulgator: sojin lecitin), kakao prah smanjene masnoće (2,2%), zgušnjivači (celulozna guma, ksantan guma, karagenan), sol, aroma, sladilo. Može sadržavati gluten, jaja, orašaste plodove i kikiriki u tragovima.
4	VPP – proteini sirutke Naziv na proizvodu: Optimum Nutrition (ON) – 100 % Whey gold standard	100% GOLD STANDARD WHEY – prah, sa sladilima. Sadrži: proteinska mješavina (izolat proteina sirutke, koncentrat proteina sirutke, hidrolizirani izolat proteina sirutke, emulgator: sojin lecitin), hladno sušeni komadići maline (1,0%), aroma, sladila. Može sadržavati gluten, jaja, orašaste plodove i kikiriki u tragovima.
5	VPP – proteini sirutke Naziv na proizvodu: Nutrition Technology (QNT) – Light digest whey protein	Light digest whey protein – prah, sa sladilom. Sadrži: mliječni proteini (koncentrat proteina sirutke (iz mlijeka), izolat proteina sirutke (iz mlijeka)), inulin, aroma, zgušnjivači (guar guma, ksantan guma), kalijev klorid, sladilo.
6	VPP – proteini sirutke Naziv na proizvodu: Scitec Nutrition (SN) – 100 % Whey protein professional	100% whey protein, prah, dodatak prehrani za sportaše sa sladilima. Sadrži: ultrafiltrirani koncentrat proteina sirutke, taurin, L-glutamin, dekstroza, zgušnjivač (ksantan guma), sladila, arome.
7	VPP – proteini lana Naziv na proizvodu: Nutrimea – Bio proteinski prah lana	Bio protein lana proizveden je finim mljevenjem odmašćenih sjemenki lana iz organskog uzgoja. Nutritivna i energetska vrijednost u 100 g proizvoda: energija 1697,25 kJ/402,05 kcal, masti 9,17 g, od kojih zasićene masne kiseline 0,76 g, ugljikohidrati 39,29 g, od kojih šećeri 2,41 g, bjelančevine 40,59 g, sol 0,41 g.

Tablica 2. Analizirani uzorci proteinskih prahova - nastavak

8	VPP – proteini graška Naziv na proizvodu: Nutrislim – Bio protein graška	Veganski izvor proteina. 100% ekološka proizvodnja, lako probavljivo, 100% izvor proteina, bez alergena, visok sadržaj esencijalnih aminokiselina, vegansko, sirovo.
9	VPP – proteini bundeve Naziv na proizvodu: Nutrimedica – Bio protein bundeve raw	100% organske odmašćene sjemenke bundeve. Nutritivna i energetska vrijednost u 100 g proizvoda: energija 1567 kJ / 374 kcal, masti 12 g od kojih zasićene masne kiseline 2,3 g, ugljikohidrati 7 g od kojih šećeri 4,2 g, vlakna 13,2 g, bjelančevine 62 g, sol 2,04 g.
10	VPP – proteini riže Naziv na proizvodu: Nutrimedica – Bio protein riže raw	Prosječna hranjiva vrijednost na 100g: bjelančevine 83,00 g, ugljikohidrati 0,5 g, dijetalna vlakna 3,9 g, masti 3,95 g.

* VPP – visokoproteinski prah

3.2. Određivanje udjela vode u proteinskim prahovima

3.2.1. Materijali

Laboratorijsko posuđe i uređaji:

- aluminijska posudica
- eksikator
- analitička vaga tip JK 180, YMC CHYO, Mikrotehna, Zagreb
- zračna sušnica tip ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb

3.2.2. Metoda

Princip:

Udjel vode određen je metodom sušenja do konstantne mase. Određuje se indirektno, pri čemu se mjeri ostatak koji zaostaje nakon sušenja. Iz razlike u masi prije i nakon sušenja do konstantne mase, izračunava se udjel vode u uzorku, a gubitak u masi izražava se kao masa vode u uzorku.

Postupak:

Aluminijska posudica koja je prethodno osušena i u eksikatoru ohlađena, izvaže se zajedno s poklopcem i staklenim štapićem s točnošću $\pm 0,0001$. U posudicu se odvaže približno 3 g uzorka proteinskog praha s točnošću $\pm 0,0001$ i promiješa staklenim štapićem kako bi se uzorak ravnomjerno rasporedio.

Nepokrivena posudica sa staklenim štapićem stavlja se u sušnicu zajedno s koso postavljenim poklopcem na 101 °C približno 2 sata. Nakon isteka vremena sušenja, aluminijska posudica sa staklenim štapićem i uzorkom se poklopi dok je još u sušnici, prebaci u eksikator gdje se hladi, a kada postigne sobnu temperaturu važe se s točnošću $\pm 0,0001$.

Nepokrivena posudica sa staklenim štapićem stavlja se ponovno u sušnicu zajedno s poklopcem na približno jedan sat, nakon čega se ponovno ohladi i izvaže. Postupak se ponavlja sve dok razlika u masi između dva uzastopna vaganja ne bude manja od 0,0005 g. Uzorci su sušeni ukupno 4 sata do konstantne mase. Ostatak uzorka predstavlja suhu tvar, a gubitak na masi udjel vode u uzorku.

Račun:

Gubitak mase sušenjem, odnosno udjel vode, izražen kao postotak mase, izračunava se pomoću sljedeće jednadžbe:

$$\text{Udjel vode (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100 ,$$

gdje je: m_1 - masa prazne aluminijske posude sa staklenim štapićem [g],

m_2 - masa aluminijske posude sa staklenim štapićem i uzorkom prije sušenja [g],

m_3 – masa aluminijske posude sa staklenim štapićem i uzorkom nakon sušenja [g](52)

3.3. Određivanje udjela proteina u proteinskim prahovima

3.3.1. Materijali

Laboratorijsko posuđe i uređaji:

- analitička vaga tip JK 180, YMC CHYO, Mikrotehna, Zagreb
- menzura
- uređaj za spaljivanje, digestion system 6, 1007 digester, Tecator
- Erlenmeyerova tikvica (250 mL)
- kiveta za Kjeltex sustav (500 mL)
- KjeltexTM8100, TecatorTM Line, Foss
- bireta za titraciju

Kemikalije:

- 96 % sumporna kiselina (H_2SO_4)
- smjesa soli K_2SO_4 i CuSO_4 – katalizator kod spaljivanja
- 4 % borna kiselina (H_3BO_3) s indikatorima
- natrijev hidroksid (NaOH , $c = 0,1 \text{ mol/L}$)
- klorovodična kiselina (HCl , $c = 0,1 \text{ mol/L}$)

3.3.2. Metoda

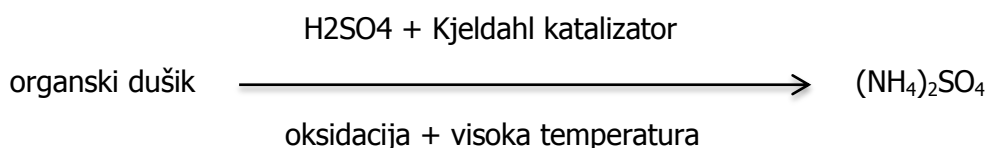
Princip:

Jedan od najčešće primjenjivanih postupaka za određivanje udjela dušika i proteina je onaj po Kjeldahlu sa ili bez korištenja Kjeltceva sustava. Kjeldahlovim postupkom, koji se koristio uz pomoć Kjeltceva sustava, određen je ukupni dušik prisutan u amino skupinama u hrani (npr. proteinski dušik, amino dušik i amido dušik). Udjel dušika se zatim preračunava u udjel proteina množenjem postotka dušika s odgovarajućim faktorom pretvorbe F (100/X) pri čemu je X postotak dušika u proteinima određene namirnice ili skupine namirnica.

Određivanje proteina odvija se u tri koraka, a to su spaljivanje (mineralizacija), destilacija (i alkalizacija) i titracija.

1. Mineralizacija

Prilikom zagrijavanja uzorka uz dodatak sumporne kiseline i katalizatora, koji joj povisuje vrelište i na taj način ubrzava reakciju, dolazi do razaranja organskih tvari u uzorku. Razaranje uzrokuje oslobađanje proteinskog i neproteinskog dušika (osim dušika vezanog uz nitrate i nitrite) koji zaostaje u obliku amonijevog sulfata.



2. Alkalizacija s NaOH u suvišku

Dodatkom natrijeva hidroksida, iz amonijeva sulfata oslobađa se amonijak.



3. Destilacija u bornu kiselinu u suvišku

Oslobodeni amonijak predestilira se u bornu kiselinu pri čemu nastaje amonijev borat.



4. Titracija amonijevog borata klorovodičnom kiselinom

Nastali amonijev borat titrira se klorovodičnom kiselinom iz čega nastaje amonijev klorid i borna kiselina.



Postupak:

Odvaž se približno 0,5 g s točnošću $\pm 0,0001$ g homogeniziranog uzorka u kivetu od 500 mL, pomoću aluminijske folije i pincete tako da uzorak ne zaostane ne stjenkama kivete. U kivetu se stave dvije Kjeldah-ove tablete za spaljivanje (oko 10 g smjese soli K_2SO_4 i CuSO_4) i 15 mL 96 % sumporne kiseline. Uzorak se spali u bloku za spaljivanje u digestoru. Uzorak je u potpunosti spaljen kada zaostane samo bistra plavo-zelena tekućina bez crnih ostataka. Sadržaj u kiveti se ohladi na sobnu temperaturu. Kiveta se umetne u Kjeltex uređaj u jedinicu za destilaciju, a na izlaz se postavi Erlenmeyerova tikvica s 25 mL 4 % borne kiseline unaprijed pripremljene dodatkom metilnog crvenila i brom krezol zelenila, na način da je izlazna cijev uronjena u otopinu borne kiseline.

Prije destilacije podese se sljedeći uvjeti: vrijeme destilacije - 5 minuta; razrjeđenje - 80 mL destilirane vode; lužina - 60 mL NaOH i pokrene se destilacija. Nakon završetka reakcije, vidljiva je promjena boje otopine iz ružičaste u zelenu, što ukazuje na prisustvo amonijaka. Otopina se titrira klorovodičnom kiselinom uz indikator fenolftalein do promjene boje iz zelene u ružičastu (52).

Račun:

Udjel dušika u uzorcima računa se pomoću sljedeće jednadžbe:

$$\text{Udjel ukupnog N (\%)} = \frac{(T - B) \cdot N \cdot 14,007 \cdot 100}{m}$$

gdje je: T - volumen HCl utrošen za titraciju uzorka [mL],

B – volumen HCl utrošen za titraciju slijepa probe [mL],

N – molaritet kiseline,

m – masa uzorka [mg].

Udjel proteina u uzorcima izračuna se pomoću jednadžbe:

$$Udjel\ proteina\ (\%) = Udjel\ ukupnog\ N \cdot F$$

gdje je: F – faktor za preračunavanje udjela dušika u proteine (Tablica 3) (52).

Tablica 3. Faktori za preračunavanje postotka dušika u proteine za analizirane uzorke

NAMIRNICA	UDIO DUŠIKA U PROTEINIMA (X,%)	FAKTOR PRETVORBE (F = 100/X)
mlijeko i mliječni proizvodi	15,66	6,38
riža	16,81	5,95
ostale namirnice	16,00	6,25

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom završnom radu određivan je udjel vode te udjel proteina u uzorcima proteinskih prahova. Rezultati su uspoređeni s pripadajućim deklaracijama proizvoda.

Rezultati udjela vode u uzorcima proteinskih prahova prikazani su u Tablici 4., a rezultati udjela proteina u Tablici 5. i Tablici 6.

4.1. Određivanje udjela vode u proteinskim prahovima

Tablica 4. Udjel vode u proteinskim prahovima

UZORAK	UDJEL VODE [%]
1	6,28
2	6,03
3	6,56
4	5,80
5	4,16
6	5,16
7	8,46
8	6,79
9	8,11
10	3,98

Eksperimentalno dobivene vrijednosti udjela vode za proteinske prahove životinjskog podrijetla kreću se u rasponu od 4,16 % do 6,58 %, od čega vrijednost udjela vode od 6,28 % pripada proteinskom prahu kazeina, a ostale vrijednosti u tom rasponu pripadaju uzorcima (njih 5) proteinskog praha sirutke.

Kod proteinskih prahova biljnog podrijetla, vrijednosti udjela vode kreću se u rasponu od 3,98 %, koliko iznosi vrijednost za proteinski prah riže, do 8,46 % za proteinski prah lana.

4.2. Određivanje udjela proteina u proteinskim prahovima

Tablica 5. Udjel dušika (N) i proteina (P) u proteinskim prahovima

UZORAK	UDIO DUŠIKA [%]	UDIO PROTEINA [%]
1	11,49	73,31
2	12,84	81,92
3	12,04	76,82
4	13,36	85,24
5	12,45	79,43
6	11,67	74,45
7	7,56	47,26
8	13,61	85,06
9	9,31	58,19
10	14,24	84,73

Udjel proteina u analiziranim uzorcima dobiven je računskim putem, korištenjem formule navedene na stranici 19 ovog rada, gdje je Kjeldahlovim postupkom eksperimentalno određen udjel dušika (Tablica 5), množen s pripadajućim faktorom pretvorbe određene vrste namirnice (Tablica 3). Dobiveni udjeli proteina u uzorcima vidljivi su u Tablici 5.

Udjel proteina u proteinskim prahovima životinjskog podrijetla kreće se u rasponu vrijednosti od 76,82 % do 85,24 % za 5 uzoraka proteinskih prahova sirutke te vrijednost od 73,31 % za proteinski prah kazeina.

Za razliku od proteinskih prahova životinjskog podrijetla, za one biljnog podrijetla mnogo je širi raspon vrijednosti udjela proteina koji se kreće od 47,26 %, za proteinski prah lana, do 85,06 %, za vodeći udjel proteina u uzorcima biljnog podrijetla – proteinski prah graška.

Tablica 6. Usporedba određenih udjela proteina s vrijednostima na deklaraciji

UZORAK	IZMJERENO g proteina / 100 g praha	DEKLARIRANO g proteina / 100 g praha	Odstupanje od deklaracije [%]
1	73,31	72,12	1,62
2	81,92	91	-9,98
3	76,82	71	8,20
4	85,24	77,4	10,13
5	79,43	77	3,16
6	74,45	73,33	1,53
7	47,26	40,59	16,43
8	85,06	78	9,05
9	58,19	62	-6,15
10	84,73	83	2,08

Prema Uredbi (EZ) br. 1924/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o prehranbenim i zdravstvenim tvrdnjama koje se navode na hrani (53) visokoproteinska hrana je ona kod koje najmanje 20 % ukupne energetske vrijednosti potječe od proteina. S obzirom da se udjel proteina 10 analiziranih uzoraka kretao između 47,26 % i 85,24 %, možemo zaključiti kako svi analizirani uzorci pripadaju navedenoj skupini hrane.

Iz dobivenih vrijednosti, navedenih u Tablici 6, vidljivo je kako gotovo svi analizirani uzorci, osim 2 uzorka (broj 2 i 9), sadrže veći udjel proteina od onog navedenog na deklaraciji samih proizvoda. Dobivena odstupanja od deklaracije kreću se u rasponu od 1,53 % do 16,43 %, za uzorke sa pozitivnim odstupanjem, te od 6,15 % do 9,98 % za one s negativnim odstupanjem.

U oba slučaja, vrijednosti odstupanja ne prelaze dopuštena odstupanja za ovu vrstu proizvoda (>10 g proteina / 100 g proizvoda), određena od strane Hrvatske agencije za hranu prema mišljenju Ministarstva poljoprivrede (± 20 %) i industrije (± 25 %) (54).

Prekomjerni unos visokoproteinskih prahova može uzrokovati laksativni učinak ukoliko se ne poštuju preporučene dnevne doze navedene na nekim proizvodima. Isto tako, prevelika količina proteina može uzrokovati povećani gubitak iona kalcija urinom, što se može izbjeći prehranom koja sadrži omjer kalcija (mg) : proteina (g) \geq 20:1. Posebnu pažnju na unos proteina moraju usmjeriti osobe koje su sklone dijabetesu i bolestima bubrega, kao i bubrežnim kamencima, a moguća je i dehidracija prilikom pretjeranog unosa proteina tijekom neadekvatne opskrbe organizma tekućinom. Iz ovih je razloga učestala kontrola sastava i praćenje kvalitete visokoproteinskih proizvoda od strane proizvođača od iznimne važnosti za sigurnost i zaštitu potrošača.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. S obzirom da kod svih analiziranih uzoraka više od 20 % ukupne energetske vrijednosti potječe od proteina, možemo potvrditi kako svi uzorci pripadaju skupini visokoproteinskih proizvoda.
2. Vrijednosti udjela proteina u analiziranim uzorcima kretale su se za proteinske prahove životinjskog podrijetla od 73,31 % do 85,24 % te za proteinske prahove biljnog podrijetla od 47,26 % do 85,06 %.
3. Utvrđena su odstupanja analiziranog od deklariranog sastava, te su se kretala od -9,98 % do +16,43 %.
4. Usporedbom određenog udjela proteina i udjela proteina navedenog na deklaracijama analiziranih uzoraka, od njih 10, svi su unutar dopuštenog odstupanja koje ne prelazi ± 20 % prema mišljenju Ministarstva poljoprivrede, odnosno ± 25 % za industriju.
5. Kontrola sastava visokoproteinskih proizvoda od iznimne je važnosti za sigurnost proizvoda te zaštitu potrošača od prekomjernog unosa proteina.

6. LITERATURA

1. Vranešić Bender D., Krstev S. (2008) Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka. *Medicus* **17**: 19-25.
2. Mandić M. L. (2007) Znanost o prehrani: hrana i prehrana u čuvanju zdravlja, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno tehnološki fakultet, str. 28.
3. Phillips S.M. (2004) Protein Requirements and Supplementation in Strength Sports. *Nutrition* **20**: 689-695.
4. Wolfe R. R. (2000) Protein supplements and exercise. *Nutrition* **72**: 551S-75S.
5. Phillips S. M. (2012) Dietary protein requirements and adaptive advantages in athletes. *British Journal of Nutrition* **12**: S158-S167.
6. Churchward-Venne T. A., Holwerda A. M., Phillips S. M., van Loon L. J. (2016) What is the Optimal Amount of Protein to Support Post-Exercise Skeletal Muscle Reconditioning in the Older Adult? *Sports Medicine*, **46(9)**: 1205-12.
7. Pasiakos S. M., McLellan T. M., Lieberman H. R. (2015) The effects of protein supplements on muscle mass, strength, and aerobic and anaerobic power in healthy adults: a systematic review. *Sports Medicine* **45(1)**: 111-131.
8. Garrido B. C., Souza G. H. M. F., Lourenco D. C., Fasciotti M. (2016) Proteomics in quality control: whey protein-based supplements. *Journal of Proteomic*, **147**: 48-55.
9. Šatalić Z., Sorić M., Mišigoj-Duraković M. (2016) Sportska prehrana, Znanje, str. 128-143.
10. Dolibašić B. (2005) Što su bjelančevine i njihova uloga, <<https://nutricionizam.com/>> Pristupljeno 23. veljače 2018.
11. Stryer L. (1991) Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, str. 11-39.
12. Anonymous (2013) Funkcije proteina u tijelu, <<https://www.zdravlje-prehrana.com/>> Pristupljeno 23. veljače 2018.
13. Bassit R. A., Sewada L. A., Bacurau R. F. (2002) Branched-chain amino acid supplementation and the immune response of long-distance athletes. *Nutrition* **18**: 376-379.
14. Goldberg A. L., Etlinger J. D., Goldspink D. F., Jablecki C. (1975) Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **7**: 248-261.
15. Šatalić Z., Sorić M., Mišigoj-Duraković M. (2016) Sportska prehrana, Znanje, str. 339-343
16. Šatalić Z., Sorić M., Mišigoj-Duraković M. (2016) Sportska prehrana, Znanje, str. 222-223
17. Šajina M. (2012) Suplementi proteina i aminokiselina za sportaše, <<https://nutricionizam.com/>> Pristupljeno 24. veljače 2018.
18. Jakovljević P. (2017) Koje su prednosti uzimanja kazeina kao izvora proteina?, <<http://sportska-prehrana.com/>> Pristupljeno 9. ožujka 2018.

-
19. Almeida C. C., Guerra Monteiro M. L., Carneiro da Costa-Lima B. R., Alvares T. S., Conte-Junior C. A. (2015). In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. *LWT - Food Science and Technology* **61**: 7-11.
20. Ha E., Zemel M. B. (2003) Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *Journal of Nutritional Biochemistry* **14**: 251-258.
21. Khanam A., Kumkum R. C. G., Swamylingappa B. (2013) Functional and nutritional evaluation of supplementary food formulations. *Journal of Food Science and Technology* **50**: 309-316.
22. Urista C. M., Fernandez R. A., Rodriguez F. R. A., Cuenca A. A., Tellez A. J. (2011) Review: production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International* **17**: 293-317.
23. Manninen A. H. (2009) Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutrition & Metabolism* **6**: 1-5.
24. Lemon P. W., Berardi J. M., Noreen E. E. (2002) The role of protein and amino acid supplements in the athlete's diet: does type or timing of ingestion matter? *Current Sports Medicine Reports* **4**: 214-221.
25. Vatani D. S., Golzar F. A. K. (2012) Changes in antioxidant status and cardiovascular risk factors of overweight young men after six weeks supplementation of whey protein isolate and resistance training. *Appetite* **59**: 673-678.
26. Burke D. G., Chilibeck P. D., Davidson K. S., Candow D. G., Farthing J., SmithPalmer T. (2001) The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* **11(3)**: 349-364.
27. Cribb P. J., Williams A. D., Carey M. F., Hayes A. (2006) The effect of whey isolate and resistance training on strength, body composition and plasma glutamine. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* **16(5)**: 494-509
28. Lan Y., Chen B., Rao J. (2018) Pea protein isolate-high methoxyl pectin soluble complexes for improving pea protein functionality: Effect of pH, biopolymer ratio and concentrations. *Food Hydrocolloids* **80**: 245-253.
29. McCarty M. F. (1999) Vegan proteins may reduce risk of cancer, obesity, and cardiovascular disease by promoting increased glucagon activity. *Medical Hypotheses* **53(6)**: 459-485.

-
30. Day L. (2013) Proteins from land plants - potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science and Technology* **32**: 25-42.
31. Amagliani L., O'Regan J., Kelly A. L., O'Mahony J. A. (2016) Physical and flow properties of rice protein powders. *Journal of Food Engineering* **190**: 1-9.
32. Dahl W. J., Foster L. M., Tyler R. T. (2012) Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition* **108(S1)**: S3-S10.
33. Taherian A. R., Mondor M., Labranche J., Drolet H., Ippersiel D., Lamarche F. (2011) Comparative study of functional properties of commercial and membrane processed yellow pea protein isolates. *Food Research International* **44(8)**: 2505-2514.
34. Boye J. I., Aksay S., Roufik S., Ribereau S., Mondor M., Farnworth E., Rajamohamed S. H. (2010) Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International* **43(2)**: 537-546.
35. Freitas R. L., Ferreira R. B., Teixeira A. R. (2000) Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comparisons within the major classes of globulins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **51(5)**: 341-352.
36. Nosworthy M. G., Tulbek M. C., House J. D. (2017) Does the Concentration, Isolation, or Deflavoring of Pea, Lentil, and Faba Bean Protein Alter Protein Quality? *Cereal Foods World* **62(4)**: 139-142.
37. Deždek M. (2016) Protein graška - lako probavljiv i bogat biljni protein, <<https://www.sensa.hr/>> Pristupljeno 14. travnja 2018.
38. Suresh Y., Das U. N. (2003) Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: Effect of ω -6 fatty acids. *Nutrition* **19**: 93-114.
39. Vijaimohan K., Jainu M., Sabitha K. E., Subramaniyam S., Anandhan C., Shyamala Devi C. S. (2006) Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Sciences* **79**: 448-454.
40. Makni M., Fetoui H., Gargouri N. K., Garoui El M., Jaber H., Makni J., Boudawara T., Zeghal N. (2008) Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in x-3 and x-6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 3714-3720.
41. Simopoulos A. P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition* **54**: 438-463.

-
42. Al-Khalifa A. S. (1996) Physicochemical characteristics, fatty acid composition, and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 964-966.
43. Murkovic M., Piironen V., Lampi A., Kraushofer T., Gerhard S. (2004) Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: non-volatile compounds). *Food Chemistry* **84**: 359-365.
44. Makni M., Fetoui H., Gargouri N. K., Garoui El M., Zeghal N. (2011) Antidiabetic effect of flax and pumpkin seed mixture powder: effect on hyperlipidemia and antioxidant status in alloxan diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications* **25**: 339-345.
45. Muthayya S., Sugimoto J. D., Montgomery S., Maberly G. F. (2014) An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1324**: 7-14.
46. Fabian C., Ju Y. H. (2011) A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51**: 816-827.
47. Shih F.F. (2003) An update on the processing of high-protein rice products. *Nahrung/Food* **47**: 420-424.
48. Young V. R., Pellett P. L. (1994) Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* **59**: 1203S-1212S.
49. Han S. W., Chee K. M., Cho S. J. (2015) Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry* **172**: 766-769.
50. Fitzpatrick J. J., Iqbal T., Delaney C., Twomey T., Keogh M. K. (2004) Effect of powder properties and storage conditions on the flowability of milk powders with different fat contents. *Journal of Food Engineering*. **64**: 435-444.
51. Deždek M. (2016) Protein riže - odličan biljni izvor proteina, <<https://www.sensa.hr/>> Pristupljeno 14. travnja 2018.
52. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., Vol. 2. Arlington (1995) Secs. 33.2.11.
53. Uredba (EZ) br. 1924/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o prehranbenim i zdravstvenim tvrdnjama koje se navode na hrani (SL L 404, 30.12.2006., str. 9)
54. HAH, Hrvatska agencija za hranu (2012) Prihvatljiva odstupanja kod navođenja hranjivih vrijednosti hrane, <https://www.hah.hr/pregled-upisnika/?preuzmi_misljenje=24> Pristupljeno 9. lipnja 2017.