

Promjene na proteinima i parametrima teksture tijekom prve četiri faze proizvodnje dimljenog pršuta

Badenić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:186127>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Petra Badenić

1113/PI

**PROMJENE NA PROTEINIMA I
PARAMETRIMA TEKSTURE
TIJEKOM PRVE ČETIRI FAZE
PROIZVODNJE DIMLJENOG
PRŠUTA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Nives Marušić Radovčić, docentice Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Ivne Poljanec, mag.ing.

Zahvaljujemo se Hrvatskoj zakladi za znanost koja je omogućila sredstva za ovo istraživanje u sklopu projekta "Primjena inovativnih metoda u praćenju proteolitičkih, lipolitičkih i oksidativnih procesa tijekom proizvodnje pršuta, IM – HQHAM" (IP-2016-06-6793).

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Nives Marušić Radovčić na stručnom vodstvu, savjetima i pomoći oko izrade diplomskog rada.

Također, zahvaljujem asistentici Ivni Poljanec na strpljenju i uloženom trudu i vremenu u pomoć oko izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su uvijek bili tu za mene.

Najveće hvala mojim roditeljima, Brankici i Zlatku, koji su mi omogućili školovanje i uvijek vjerovali u mene. Bez njihove ljubavi i podrške, ne bih uspjela. Ovaj rad posvećujem njima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PROMJENE NA PROTEINIMA I PARAMETRIMA TEKSTURE TIJEKOM PRVE ČETIRI FAZE PROIZVODNJE DIMLJENOG PRŠUTA

Petra Badenić, 1113/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti promjene na proteinima i parametrima teksture koje se odvijaju tijekom prve četiri faze proizvodnje dimljenog pršuta (sirovi but, nakon soljenja, dimljenja i sušenja) na uzorcima *biceps femoris* i *semimembranosus* dimljenog pršuta. Određen je indeks proteolize, koncentracija proteina, stupanj oksidacije proteina te parametri teksture. Rezultati istraživanja pokazali su da je došlo do povećanja indeksa proteolize tijekom proizvodnje pršuta u oba mišića ($P < 0,05$), bez statistički značajne razlike između mišića u pojedinim fazama proizvodnje ($P > 0,05$). Koncentracija karbonila, koja je indikator stupnja oksidacije proteina, nije se statistički značajno mijenjala tijekom faza proizvodnje kao ni u ispitivanim mišićima ($P > 0,05$). Najveće promjene parametara teksture nastupile su nakon faze sušenja, ali bez statistički značajnih razlika ($P > 0,05$) između mišića u većini ispitivanih parametara teksture. Nakon sušenja, tvrdoća i adhezivnost su se statistički značajno smanjile u oba mišića, dok su se kohezivnost i odgođena elastičnost povećale ($P < 0,05$), što se povezuje s intenzivnom proteolizom osobito u fazi sušenja.

Ključne riječi: dimljeni pršut, oksidacija proteina, indeks proteolize, tekstura

Rad sadrži: 42 stranice, 13 slika, 4 tablice, 34 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Nives Marušić Radovčić

Pomoć pri izradi: Ivna Poljanec, mag.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Helga Medić
2. Doc.dr.sc. Nives Marušić Radovčić
3. Doc.dr.sc. Mia Kurek
4. Doc.dr.sc. Sven Karlović (zamjena)

Datum obrane: 5. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Meat and Fish Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

CHANGES IN PROTEIN AND TEXTURE PARAMETERS DURING FIRST FOUR STAGES OF SMOKED DRY-CURED HAM PRODUCTION

Petra Badenić, 1113/PI

Abstract: The aim of this paper was to determine the changes in protein and texture parameters that take place during the first four stages of smoked ham production (raw ham, after salting, smoking and drying) on the samples of *biceps femoris* and *semimembranosus* of smoked dry-cured ham. The proteolysis index, protein concentration, degree of protein oxidation and texture parameters were determined. The proteolysis index increased statistically significantly during the production in both muscles ($P < 0.05$) without statistically significant difference between the muscles in the individual stages of production ($P > 0.05$). The concentration of carbonyls, which is the indicator of the degree of protein oxidation did not change significantly during the production process as well as in the examined muscles ($P > 0.05$). Changes in texture parameters occurred after the drying phase, but without statistically significant differences ($P > 0.05$) between the muscles in most examined texture parameters. After drying, hardness and adhesion decreased significantly in both muscles, while cohesiveness and springiness increased ($P < 0.05$), which was associated with intensive proteolysis especially after drying stage.

Keywords: smoked dry-cured ham, protein oxidation, proteolysis index, texture

Thesis contains: 42 pages, 13 figures, 4 tables, 34 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Nives Marušić Radovčić, Assistant professor*

Technical support and assistance: *BSc Ivna Poljanec*

Reviewers:

1. PhD. *Helga Medić*, Full professor
2. PhD. *Nives Marušić Radovčić*, Assistant professor
3. PhD. *Mia Kurek*, Assistant professor
4. PhD. *Sven Karlović*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 5 July 2019

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. DALMATINSKI PRŠUT | 2 |
| 2.2. PROTEOLIZA..... | 6 |
| 2.2.1. Čimbenici koji utječu na proteolizu | 8 |
| 2.2.2. Utjecaj proteolize na teksturu | 9 |
| 2.3. OKSIDACIJA PROTEINA | 10 |
| 2.3.1. DNPH metoda u procjeni ukupne količine karbonila..... | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 16 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 16 |
| 3.1.1. Priprema uzorka za analizu..... | 18 |
| 3.2. METODE RADA | 19 |
| 3.2.1. Određivanje indeksa proteolize..... | 19 |
| 3.2.2. Određivanje ukupnih karbonila..... | 21 |
| 3.2.3. Određivanje teksture | 22 |
| 3.2.4. Statistička obrada podataka | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 24 |
| 4.1. PROTEOLIZA..... | 24 |
| 4.2. KARBONILI | 28 |
| 4.3. TEKSTURA | 32 |
| 5. ZAKLJUČCI | 38 |
| 6. LITERATURA | 39 |

1. UVOD

Pršut je jedan od najcjenjenijih i najkvalitetnijih proizvoda od mesa. Pršut predstavlja izvor proteina visoke biološke vrijednosti jer sadrži esencijalne aminokiseline u odgovarajućim omjerima (Jiménez-Colmenero i sur., 2010), a odlikuju ga iznimna senzorska svojstva privlačna potrošačima. Proizvodnja pršuta tradicionalno se veže uz mediteranske zemlje, osobito Španjolsku, Italiju, Francusku, Portugal i Hrvatsku, u kojima prevladavaju specifični klimatski uvjeti pogodni za prirodno sušenje i zrenje pršuta.

Pršut je proizvod visoke nutritivne vrijednosti s obzirom na veliki udio proteina (prosječno 30%) koji su lako probavljivi s obzirom na stupanj razgrađenosti zbog višemjesečne proteolize tijekom procesa zrenja (Kovačević, 2017).

Proizvodnja pršuta dugotrajan je i složen proces koji rezultira specifičnim poželjnim senzorskim svojstvima takvih proizvoda.

Pretvorba svinjskog mesa u pršut posljedica je apsorpcije i raspodjele soli i progresivne dehidracije mesa, što dovodi do različitih mišićnih modifikacija u pogledu fizikalno-kemijskih svojstava kao što su pH, koncentracija NaCl, udjela vode i aktiviteta vode. Štoviše, tijekom proizvodnje pršuta odvijaju se različite biokemijske reakcije, kao što su proteoliza i lipoliza, koje uzrokuju promjene u boji, okusu i teksturi i utječu na formiranje tipičnih karakteristika konačnog proizvoda (Gallego i sur., 2018).

Kao glavna komponenta mišićnog tkiva, proteini imaju glavnu ulogu u tehnološkim, nutritivnim i senzorskim osobinama proizvoda. Modifikacije native strukture mišićnih proteina kao rezultat denaturacije i proteolize, uvelike utječu na kvalitetu mesa, odnosno na teksturu, boju, aromu, okus, sposobnost zadržavanja vode i biološku funkcionalnost. Osim proteolizi, proteini mesa u značajnoj mjeri podložni su i oksidaciji. Oksidacija proteina uzrokuje brojne fizikalno-kemijske promjene na proteinima, uključujući razaranje aminokiselina, smanjenje topljivosti proteina, polimerizaciju proteina, gubitak enzimske aktivnosti i smanjenu probavljivost proteina (Estévez, 2011).

Cilj ovog rada bio je pratiti stupanj proteolize i oksidacije proteina te promjene teksture koje se događaju tijekom prve 4 faze proizvodnje dimljenog pršuta: svježi but, soljenje, dimljenje i sušenje na 2 mišića buta-*biceps femoris* (BF) i *semimembranosus* (SM).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DALMATINSKI PRŠUT

Prema Pravilniku (2018), pršut je proizvod koji pripada u skupinu trajnih suhomesnatih proizvoda. Trajni suhomesnati proizvodi su toplinski neobrađeni proizvodi od svinjskog mesa sa ili bez pripadajućih kosti, potkožnog masnog tkiva i kože, s dodanim drugim sastojcima. Pršut je trajni suhomesnati proizvod od svinjskog buta s kostima, sa ili bez kože i potkožnog masnog tkiva, sa ili bez nogice, bez repa, sa ili bez zdjeličnih kostiju. Osim pršuta, trajni suhomesnati proizvodi od svinjskog mesa su suha šunka, suha lopatica, suha vratina ili buđola, suha pečenica, suha slanina i panceta (Pravilnik, 2018).

U Hrvatskoj su zaštićene 4 vrste pršuta-oznakom izvornosti zaštićen je istarski pršut, a oznakom zemljopisnog podrijetla dalmatinski, drniški i krčki pršut (Kovačević, 2017).

Dalmatinski pršut je trajni suhomesnati proizvod od svinjskog buta s kosti, kožom i potkožnim masnim tkivom, bez zdjeličnih kosti, suho soljen morskom soli, dimljen blagim izgaranjem tvrdog drva bukve (*Fagus sp.*), hrasta (*Quercus sp.*) ili graba (*Carpinus sp.*) te podvrgnut procesu sušenja i zrenja u trajanju od najmanje godinu dana (Kos i sur., 2015).

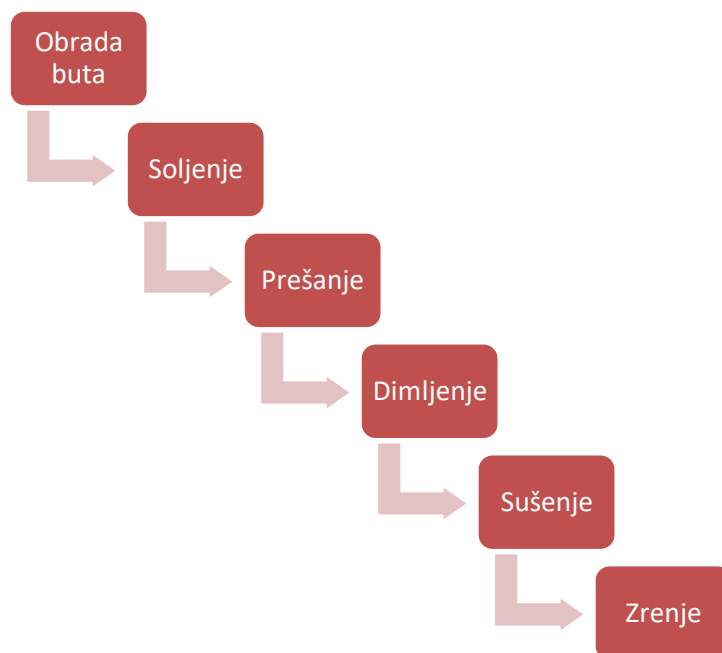
Dalmatinski pršut proizvodi se isključivo unutar administrativnih granica Ličko-senjske (grad Novalja), Zadarske, Šibensko-kninske, Splitsko-dalmatinske i Dubrovačko-neretvanske županije (Kos i sur., 2015). Za taj prostor karakteristični su relativna vlažnost zraka između 56 i 76% i vjetrovi koji pušu veći dio godine (više od 130 dana), a posebno je za sušenje pršuta značajna hladna i suha bura koja puše s planina prema moru (Kovačević, 2017).

Gotovi proizvod odlikuju blagi slani okus, osebujna aroma, blagi miris po dimu, jednolična crvena boja mesa i poželjna konzistencija (Kos i sur., 2015). Tehnološki postupak proizvodnje dalmatinskog pršuta započinje izborom svježih butova odgovarajućih fizikalno-kemijskih i senzorskih karakteristika. Ako postoje određene manje nepravilnosti u obliku butova, oni se dorađuju, dok se butovi s vidljivim oštećenjima i većim nepravilnostima uklanjaju i ne ulaze u postupak proizvodnje pršuta (Kos i sur., 2015).

Na slici 1. prikazan je dalmatinski pršut, a na slici 2. prikazane su glavne faze tehnološkog procesa proizvodnje dalmatinskog pršuta.



Slika 1. Dalmatinski pršut (Anonymous)



Slika 2. Tehnološki postupak proizvodnje dalmatinskog pršuta

Prvi korak u proizvodnji dalmatinskog pršuta je obrada buta. But mora biti odvojen od svinjske polovice između zadnjeg slabinskog kralješka (*v. lumbales*) i prvog križnog kralješka (*v. sacrales*). U butu se ne smiju nalaziti zdjelične kosti, odnosno bočna kost (*os ilium*), sjedna kost (*os ishii*), preponska kost (*os pubis*) i križna kost (*os sacrum*), a moraju biti odstranjeni i repni kralješci (*v. caudales*). But mora biti odvojen od zdjelice u bočnom zglobu (*articulus coxae*) koji povezuje glavu bedrene kost (*caput femoris*) i zdjeličnu čašicu (*acetabulum*) na kukovlju. U muskulaturi buta mora ostati samo dio sjedne kosti s hrskavicom (*tuber ishii*). Masa obrađenog buta mora iznositi najmanje 11 kg.

Nakon odabira i obrade buta slijedi soljenje. Butovi se sole isključivo morskom soli, bez dodataka bilo kojih drugih začina ili konzervansa. Prije samog postupka soljenja, istiskuje se zaostala krv u butovima. Soljenje je najkritičnija faza proizvodnje pršuta te se tijekom ove faze mora održavati niska temperatura, kako ne bi došlo do kvarenja. Soljenje se vrši na temperaturi između 2 i 6°C i relativnoj vlazi zraka višoj od 80%. Brzo i ravnomjerno prodiranje soli u mišiće butova ima izniman utjecaj na kvalitetu konačnog proizvoda, te je vrlo važno da butovi budu iste temperature (1-4°C). Jako hladni butovi slabije apsorbiraju sol, dok nedovoljno ohlađeni butovi imaju tendenciju kvarenja. Butovi se sole tako da se u njih utrlja suha morska sol po cijeloj površini te se ostave stajati s medijalnom stranom okrenutom prema gore. Nakon 7 do 10 dana butovi se sole i okreću te ostave stajati narednih 7 do 10 dana (Kos i sur., 2015). Najvažniji učinci soli su bakteriostatski učinak, inhibiranje rasta nepoželjnih mikroorganizama, formiranje okusa (slanost), te snažan utjecaj na sve mišićne enzime (Krvavica, 2006). Osim konzervirajućeg djelovanja, soljenje ima ulogu poboljšanja organoleptičkih svojstava mesnih proizvoda-okusa, boje i teksture. Sa stajališta sigurnosti hrane, udio NaCl-a u pršutu, treba iznositi minimalno 4.5%, dok maksimalni udio ne bi trebao prelaziti 6% (Kovačević, 2017).

Prešanje butova je dodatan korak u proizvodnji pršuta, koji nije obavezan, a provodi se u svrhu pravilnog oblikovanja pršuta. Prešanje se provodi pri završetku faze soljenja tako da se butovi poslože između ploča i opterete. Prešanje traje 7 do 10 dana, nakon čega se butovi ispiru čistom vodom i cijede, nakon čega slijedi dimljenje i sušenje. Ako se butovi ne prešaju, nakon što prođe faza soljenja ostave se stajati još 7 do 10 dana bez preslagivanja, a zatim se ispiru vodom i cijede. Prešanje se provodi pri istim temperaturnim uvjetima i relativnoj vlažnosti zraka kao i soljenje (Kos i sur., 2015). Postupak prešanja važno je provesti pravilno, jer preveliko opterećenje butova tijekom prešanja može umanjiti mekoću i sočnost pršuta.

Također, može doći do trganja strukture tkiva, u kojem kasnije za vrijeme sušenja i zrenja nastaju rascjepi i pukotine (Karolyi, 2009).

Sljedeći korak u proizvodnji dalmatinskog pršuta je faza dimljenja te sušenja. Nakon što su butovi isprani i ocijeđeni, vežu se špagom ili se vješaju na kuku od nehrđajućeg čelika iznad petne kvrge te se prenose u komoru kako bi se ujednačila temperatura prije dimljenja. Nakon izjednačavanja temperature butova i komore, slijedi dimljenje. Dimljenje se vrši uporabom hladnog dima koji se dobiva izgaranjem bukve (*Fagus sp.*), hrasta (*Quercus sp.*) ili graba (*Carpinus sp.*). Temperatura u komori ne smije biti viša od 22°C. Više temperature prelaze granicu hladnog dimljenja te mogu uzrokovati denaturaciju proteina na površinskom sloju buta, čime se sprječava izlazak vode i povećava mogućnost pojave kvarenja. Komora mora imati otvore za zrak koji su zaštićeni mrežicama koje sprječavaju ulazak kukaca. Dimljenje i sušenje traje do 45 dana (Kos i sur., 2015). Uz soljenje, sušenje je ključna metoda konzerviranja pršuta kojom se smanjuje maseni udio vode, ali i aktivitet vode što rezultira inhibicijom razvoja mikroorganizama, posebice patogene i mikroflore kvarenja. Dimljenje ima konzervirajući učinak zbog antioksidativnog djelovanja dima koje je posljedica aktivnosti fenola i njihova vezanja za slobodne radikale, pri čemu poništavaju njihovu oksidativnu aktivnost te manjim dijelom kiselina, baktericidnog i fungicidnog djelovanja dima, za što su odgovorni formaldehidi, smole, masne kiseline, ugljikovodici, amonijak, octena i mravlja kiselina i alkoholi u sastavu dima te sušenju koje je funkcija temperature i brzine strujanja zraka i dima. Osim konzerviranja, dimljenje se provodi za dobivanje specifičnog, ugodnog mirisa i okusa mesa po dimu te zlatnosmeđe do smeđe boje pršuta (Kovačević, 2017). U suhomesnatim proizvodima dimljenje u kombinaciji sa soljenjem i djelomičnom dehidracijom povećava rok trajanja, zbog površinskog sušenja i taloženja antioksidansa i antimikrobnih spojeva na površinu (Marušić Radovčić i sur., 2016).

Nakon dimljenja i sušenja, pršuti se prenose u komoru za zrenje. Komore moraju imati stabilnu mikroklimu te otvore za zrak zaštićene mrežicama. Komore su zamračene, a izmjena zraka je blaga. Temperatura zrenja ne smije biti viša od 20°C, a relativna vlažnost zraka viša od 90%. U takvim povoljnim uvjetima odvija se pravilno zrenje pršuta, ravnomjeran gubitak vlage, uspostavlja se harmonija okusa i mirisa. Zrenje se odvija minimalno godinu dana, nakon čega je pršut spreman za stavljanje na tržište i konzumaciju (Kos i sur., 2015). Zrenje je završna faza proizvodnje pršuta, odnosno proteolitička i lipolitička razgradnja mišićnog i masnog tkiva koju kataliziraju endogeni enzimi. Osim što proteoliza i lipoliza imaju ključnu ulogu u formiranju specifičnih senzorskih svojstava pršuta-arome, boje i teksture,

proteolizom i lipolizom nastaju spojevi s konzervirajućim djelovanjem (alkoholi, terpeni, karboksilne kiseline i dr.) (Kovačević, 2017).

2.2. PROTEOLIZA

Proteini su glavna komponenta mišića i čine oko 80% mase suhog mišića ili 15-22% mase svježeg mišića. Mišićni proteini se obično klasificiraju na temelju topljivosti ili biološke funkcije. Kategorija topljivosti temelji se na topljivosti mišićnih proteina pri različitim koncentracijama soli te se prema tome mišićni proteini dijele u 3 skupine: miofibrilarni, sarkoplazmatski i stromalni proteini.

Miofibrilarni proteini glavni su sastojci mišićnih vlakana i čine 50–60% ukupnog sadržaja proteina u mišićnom tkivu. Topljivi su pri visokoj ionskoj snazi, odnosno topljivi su u otopinama soli. Miofibrilarni proteini uvelike doprinose formiranju teksture mesa. Na mikrostrukturnoj razini, pokazalo se da su miofibrilarni proteini najviše pogođeni proteolitičkom aktivnošću. Sarkoplazmatski proteini čine između 25 i 35% ukupnih proteina u mišićima i uključuju većinu mišićnih enzima. Proteaze i lipaze čine značajan dio ove frakcije proteina. Stromalni proteini su osnovni elementi mišićnog vezivnog tkiva te čine 10-20% ukupnog sadržaja mišićnih proteina. Najzastupljeniji stromalni protein u mesu je kolagen, dok se elastin nalazi u manjim količinama. Stromalni proteini također su važni za teksturu mesa (Petrova i sur., 2015).

Proteoliza je jedna od glavnih biokemijskih reakcija koje se odvijaju tijekom procesa proizvodnje pršuta. Proteoliza se općenito odnosi na aktivnost endogenih enzima, kao što su katepsini B, L, H i D, kalpaini, peptidaze i citosolni enzimi (Harkouss i sur., 2015). Proteolitički enzimi-katepsini i kalpaini oslobađaju se postmortalno razgradnjom membrana stanice npr. lisosoma ili sarkomere čemu doprinosi niža pH vrijednost, odnosno koncentriranje mliječne kiseline glikolitičkom razgradnjom šećera (glikogena) (Kovačević, 2017). Miofibrilarni proteini se uglavnom razgrađuju s katepsinima B, D, H i L, koji zadržavaju svoju aktivnost nekoliko mjeseci tijekom proizvodnje pršuta (Petrova i sur., 2015).

Aktivnost endogenih mišićnih peptidaza odgovorna je za oslobađanje slobodnih aminokiselina i malih peptida, koji izravno utječu na konačnu kvalitetu proizvoda (Mora i sur., 2016).

Proteoliza započinje djelovanjem katepsina B, L, H i D, kalpaina, peptidaza i citosolnih enzima koji razgrađuju mišićne proteine u polipeptide. Proteoliza će se ubrzano odvijati pri povišenim temperaturama, višim pH vrijednostima mesa i nižim koncentracijama NaCl-a. Aktivnost katepsina B, H, L i D s vremenom se postupno smanjuje. Enzimi ostaju aktivni duže u mišiću *biceps femoris* nego u *semimembranosus*, jer je SM vanjski mišić direktno izložen djelovanju soli te se inhibira enzimska razgradnja. Preostala aktivnost enzima smanjuje se s prodiranjem soli u tkivo mišića BF. Iako se njihova aktivnost smanjuje, prisutna je tijekom cijelog postupka proizvodnje. U početnim fazama proizvodnje pršuta, katepsin L je najaktivnija proteaza, katepsin B ima manju ulogu u razgradnji proteina, dok je doprinos katepsina H proteolizi vrlo nizak. Dakle, aktivnost proteaza najveća je u početnim fazama proizvodnje pršuta zbog veće aktivnosti enzima i većeg aktiviteta vode. Tijekom proizvodnje pršuta, djelovanje proteaza praćeno je aktivnošću peptidaza, koje uzrokuju formiranje malih peptida i konačno slobodnih aminokiselina. Aminopeptidaze ostaju aktivne tijekom cijelog procesa proizvodnje pršuta pa se može zaključiti kako se količina slobodnih aminokiselina povećava s dužim zrenjem pršuta (Petrova i sur., 2015). Proteoliza je svojstvena proizvodnji svih vrsta pršuta, a količina oslobođenih aminokiselina ovisi o trajanju proizvodnje. Enzimi odgovorni za proteolizu su aminopeptidaze koje djeluju na N-terminalnim krajevima peptida i proteina (Jiménez-Colmenero i sur., 2010).

Nakupljanje slobodnih aminokiselina u pršutu posljedica je djelovanja mišićnih aminopeptidaza, među kojima je alanil aminopeptidaza dominantna tijekom zrenja, dok arginil i leucil aminopeptidaze pokazuju nešto nižu aktivnost. Čimbenici kao što su udio NaCl, aktivitet vode i pH reguliraju aktivnost mišićnih aminopeptidaza. Također, nakupljanje slobodnih aminokiselina iznad određene razine uzrokuje povratnu inhibiciju aminopeptidaza. Slobodne aminokiseline podliježu Streckerovoj razgradnji, Maillardovim reakcijama ili reagiraju s ugljikohidratima ako sadrže sumpor, što snižava njihovu koncentraciju (del Olmo i sur., 2015).

Peptidi koji nastaju tijekom procesa proizvodnje pršuta, osim što doprinose jedinstvenim organoleptičkim svojstvima proizvoda, imaju posebne funkcije u ljudskome tijelu. Prirodni bioaktivni peptidi nisu aktivni unutar sekvence proteina od kojeg potječu, ali pokazuju fiziološke učinke nakon oslobađanja (Mora i sur., 2016). Također, pršut predstavlja važan izvor esencijalnih aminokiselina za ljude, a one upravo nastaju procesom proteolize (Harkouss i sur., 2015). Pojedine aminokiseline, kao što su glutamin, triptofan, leucin, izoleucin i valin, imaju pozitivnu zdravstvenu i preventivnu ulogu jer pomažu kod

psihofizičke iscrpljenosti. Dipeptidi karnozin i anserin koji se nalaze u površinskim mišićima buta (*semimembranosus*) imaju antioksidacijsko djelovanje te pri određenim koncentracijama smanjuju užeglost i stabiliziraju boju (Kovačević, 2017). Određene aminokiseline prisutne u pršutu imaju određene pozitivne učinke na živčani sustav, primjerice taurin i glutamin, kojima se pripisuju preventivni učinci na neke bolesti, dok se djelovanje triptofana povezuje s oporavkom od mentalnog umora (Jiménez-Colmenero i sur., 2010).

2.2.1. Čimbenici koji utječu na proteolizu

Brzina odvijanja proteolize i njezin opseg, razlikuju se od faze do faze u proizvodnji pršuta, ovisno o prodiranju soli i migraciji vode (Théron i sur., 2011). Tijekom proizvodnje pršuta od svježeg mesa do konačnog proizvoda dolazi do gubitka enzimске aktivnosti zbog denaturacije i degradacije enzima. Aktivnost enzima također se smanjuje zbog smanjenja aktiviteta vode tijekom tehnološkog procesa proizvodnje pršuta (Petrova i sur., 2015).

Proteolitička aktivnost ovisi o mnogo faktora, kao što su temperatura, relativna vlažnost zraka te sadržaj soli. Primjerice, dokazano je da sol ima inhibitorni učinak na proteolitičke enzime. Također, pokazalo se da povišene temperature (30°C) prilikom zrenja pršuta povećavaju intenzitet proteolize. Povišene temperature tijekom faze zrenja pršuta potiču stvaranje neproteinskih dušičnih spojeva i tako utječu na tijek proteolize. Visok udio vode potiče proteolitičku aktivnost zbog visokog aktiviteta vode (a_w) (Harkouss i sur., 2015). Na pojavu i intenzitet proteolize uvelike utječu pH sirovog mesa, udio soli, vode i sadržaj proteina te temperatura tijekom proizvodnje (Andronikov i sur., 2013).

Također, anatomski položaj mišića buta, bilo vanjski-*semimembranosus*, ili unutarnji-*biceps femoris*, ima važnu ulogu u vremenskom tijeku proteolize tijekom procesa proizvodnje pršuta, zbog različitih kinetika prijenosa soli i vode u svakom mišiću (Harkouss i sur., 2015). Mišić *semimembranosus* je vanjski mišić koji je u izravnom kontaktu sa soli te u prvim fazama proizvodnje velika količina soli difundira u mišić i udio vode se značajno smanjuje. S druge strane, mišić *biceps femoris* je unutarnji mišić te će u njemu sadržaj soli biti niži, a udio vode viši. Upravo ta razlika podrazumijeva veću proteolitičku aktivnost *biceps femorisa*, što uvelike utječe na njegovu teksturu (Théron i sur., 2011). Prodiranje soli duboko u mišić *biceps femoris* nastupa tek kasnije, oko 3 mjeseca nakon soljenja, dok je *semimembranosus* izložen brzom dehidraciji i prodiranju soli u prvim fazama proizvodnje (Pugliese i sur., 2015). Mišić buta *semimembranosus* izložen je većoj količini soli tijekom postupka soljenja i većoj dehidraciji tijekom sušenja i zrenja te ima veći sadržaj soli nakon zrenja od *bicepsa*

koji je kao unutarnji mišić buta prekriven kožom i masnim tkivom. Međutim treba napomenuti da tijekom cijelog proizvodnog procesa, postoji tendencija izjednačavanja koncentracije soli u cijelom butu. Naime, difuzija soli u mišićno tkivo iz površinskih mišića buta s većim sadržajem soli nastavlja se odvijati zbog postojanja gradijenta koncentracije što uzrokuje da unutarnji mišići s većim sadržajem vode imaju i veći sadržaj otopljene soli (Kovačević, 2017).

Na proteolizu, osim parametara procesa proizvodnje, kao što su dodatak soli, temperatura, vlažnost i vrijeme zrenja, utječe i genetika svinja od kojih se pršut proizvodi (Mora i sur., 2016). Intenzitet proteolize se povećava produženjem vremena zrenja, pri čemu na proteolitičku aktivnost enzima pozitivno djeluju povišena temperatura, niža pH vrijednost, veći aktivitet vode te manje koncentracije NaCl-a (Kovačević, 2017).

2.2.2. Utjecaj proteolize na teksturu

Enzimska razgradnja mišićnih proteina važna je za razvoj okusa i teksture tijekom proizvodnje pršuta (Petrova i sur., 2015). Proteoliza jedan je od najvažnijih čimbenika za kvalitetu konačnog proizvoda. Osim što utječe na teksturu i okus, proteolizom nastaju i brojni hlapivi spojevi arome koji utječu na finalnu aromu pršuta. Tekstura je senzorna i funkcionalna manifestacija strukturnih, mehaničkih i površinskih svojstava hrane koja se otkriva kroz osjetila vida, sluha i dodira (Andronikov i sur., 2013).

Poznato je da proteoliza utječe na teksturu, odnosno tvrdoću i kohezivnost konačnog proizvoda te se smatra da je upravo proteoliza ključna reakcija koja uvjetuje dobivanje konačnog proizvoda s odgovarajućim senzorskim svojstvima. Visoki stupanj proteolize uzrokuje izrazitu mekoću konačnih proizvoda i slabu kohezivnost. Većina teksturalnih problema pršuta povezuje se s kratkim vremenom procesiranja i niskim sadržajem soli. Zato je važno pratiti međudjelovanje parametara procesiranja (temperatura, udio soli, vrijeme), biokemijskih promjena i teksturalnih svojstava (Harkouss i sur., 2015).

Proteoliza osim na teksturu utječe i na okus i miris pršuta stvaranjem malih peptida i slobodnih aminokiselina te daljnjom razgradnjom slobodnih aminokiselina i njihovih razgradnih produkata (Maillardove reakcije i reakcije Streckerove razgradnje). Također dolazi do povišenja pH vrijednosti što je posljedica povećanja koncentracije slobodnih aminokiselina (Kovačević, 2017).

Prekomjerna proteoliza je nepoželjna i rezultira kvarenjem pršuta, a manifestira se mekšom konzistencijom, gorkim okusom, stvaranjem kristala tirozina i bijelog filma na površini presjeka pršuta uslijed povećanja koncentracije peptida (Kovačević, 2017).

2.3. OKSIDACIJA PROTEINA

Mišićni proteini podložni su oksidativnim reakcijama uzrokovanim različitim oksidacijskim inicijatorima kao što su oksidirajući lipidi, metalni ioni i drugi prooksidansi nastali tijekom procesiranja mesa (Armenteros i sur., 2009).

Oksidacija proteina u mesu može biti izravna posljedica djelovanja reaktivnih vrsta kisika (ROS) (slobodnih ili neslobodnih radikala) ili reaktivnih dušikovih vrsta ili biti neizravna posljedica nastajanja sekundarnih produkata oksidativnog stresa. Mogući prekursori oksidacije proteina su slobodni radikali kao što su hidroksili (OH^\cdot), superoksidi (O_2^\cdot), peroksili (PO^\cdot) i dušikov oksid (NO^\cdot). Ostale reaktivne vrste, koje nisu slobodni radikali, su vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik (1O_2), hipoklorična kiselina (HOCl) i ozon (O_3). Ove reaktivne vrste potječu ili iz okoline mišića (X-zračenje, gama zračenje, zagađeni zrak, industrijske kemikalije itd.) ili od internih faktora (metabolički procesi, enzimski sustavi, metal katalizirani sustavi). Ove reaktivne vrste iniciraju oksidaciju proteina na način da dolazi do modifikacije bočnih lanaca aminokiselina ili reaktivne vrste napadaju polipeptidni kostur proteina (Soladoye i sur., 2015).

Kemijske modifikacije pobočnih lanaca aminokiselina i/ili samog kostura peptida mogu uzrokovati promjene fizikalnih svojstava proteina, kao što su fragmentacija, agregacija, gubitak topljivosti i funkcionalnosti i smanjena podložnost na proteolizu (Estévez, 2011). Ovi učinci rezultiraju biokemijskim i strukturnim poremećajima koji uzrokuju određene senzorske, tehnološke i nutritivne promjene mišića (Soladoye i sur., 2015).

Neki intracelularni i membranski proteini u mišićima mogu se modificirati ili razgrađivati na fragmente zbog djelovanja reaktivnih vrsta kisika koje nastaju tijekom oksidacije lipida. Tijekom procesiranja i obrade mesa, oksidacijska modifikacija aminokiselinskih ostataka i polipeptidnog kostura može uzrokovati veću podložnost mišića enzimskoj hidrolizi i proteolizu unutar i izvan stanica (Wang i sur., 2011).

Oksidacija miofibrilarnih proteina dovodi do gubitka nutritivne kvalitete i funkcionalnosti proteina (Estévez i sur., 2008). Također, oksidacija proteina u mesnim proizvodima dovodi do smanjene sposobnosti zadržavanja vode i sposobnosti formiranja teksture. To se smatra glavnim uzrokom izmijenjene probavljivosti, a time i manje hranjive vrijednosti oksidiranih proteina. Međutim, nikakva promjena okusa nije povezana s oksidacijom proteina i stoga njezina organoleptička svojstva ostaju uglavnom nepromijenjena (Hu i Jacobsen, 2016). Oksidacija proteina povezuje se i s povećanjem žilavosti mesa tijekom proizvodnje i skladištenja (Soglia i sur., 2016).

Oksidativne reakcije imaju utjecaj na aktivnost mišićnih proteaza i funkcionalnost miofibrilarnih proteina. Prirodne komponente mišićnog tkiva kao što su nezasićeni lipidi, hem pigmenti, prijelazni metali i oksidativni enzimi su potencijalni prekursori ili katalizatori za formiranje ROS-a i zbog toga imaju važnu ulogu u inicijaciji oksidacije proteina u mišićima (Estévez, 2011).

Ovisno o meti i oksidirajućem agensu, oksidacija proteina odvija se višestrukim mehanizmima, a posljedice uključuju gubitak sulfhidrilnih skupina, stvaranje karbonila proteina, formiranje križnih veza i modifikaciju aromatskih aminokiselina (Soladoye i sur., 2015).

Formiranje karbonilnih spojeva jedna je od najizraženijih modifikacija na oksidiranim proteinima, a posljedica je oksidacije ostataka treonina, prolina, arginina i lizina (Estévez, 2011). Mišićni strukturni proteini posebno su skloni oksidacijskim reakcijama što rezultira stvaranjem karbonila. Stoga karbonilirani strukturni proteini predstavljaju značajan udio ukupnih oksidiranih proteina u mesu (Soglia i sur., 2016).

Karbonilacija je ireverzibilna i neenzimska modifikacija proteina koja uključuje stvaranje karbonilnih spojeva inducirana oksidativnih stresom ili drugim mehanizmima. Karbonili (aldehidi i ketoni) nastaju u proteinima na 4 načina:

1. Izravna oksidacija bočnih lanaca lizina, treonina, arginina i prolina
2. Neenzimatska glikozilacija u prisutnosti reducirajućih šećera
3. Oksidacijsko cijepanje peptidne osnove putem α -amidacije ili putem oksidacije glutamil bočnih lanaca
4. Kovalentno vezanje na neproteinske karbonilne spojeve kao što su 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ili malondialdehid (MDA).

Od ova četiri puta, izravna oksidacija osjetljivih aminokiselinskih bočnih lanaca glavni je put karbonilacije proteina i jedini put za koji je dokazano da uzrokuje formiranje karbonila iz proteina mesa. Ostala 3 mehanizma moguće je primijeniti na složene prehrambene sustave, ali doprinos tih puteva karbonilaciji proteina mesa ostaje nepoznat (Estévez, 2011).

Nastajanje karbonilnih derivata iz bočnih lanaca lizina, treonina, arginina i prolina obično se prepisuje metal kataliziranim oksidacijskim sustavima. Prema tom mehanizmu, reducirani oblici prijelaznih metala reduciraju vodikov peroksid pri čemu nastaje reaktivni međuprodukt hidroksil radikal ($\bullet\text{OH}$) kroz Fentonovu reakciju u neposrednoj blizini osjetljivog bočnog aminokiselinskog lanca. Prisutnost metalnih veznih mjesta u proteinima objašnjava da su aminokiselinski ostatci koji se nalaze na takvi mjestima jedinstveno osjetljivi na metal katalizirane oksidacije putem mehanizma specifičnog mjesta vezanja. Smatra se da je metal katalizirana oksidacija ograničena na metal-vezujuća mjesta proteina u blagim uvjetima oksidacije dok su praktički svi aminokiselinski ostatci pogođeni pri visokim koncentracijama vodikovog peroksida i metalnih iona kao što je Fe^{2+} . Oksidirani oblici takvih iona kao što je Fe^{3+} mogu generirati $\text{HO}_2\bullet$ radikale iz H_2O_2 kroz reakciju nalik Fenton reakciji. Dakle, i reducirani i oksidirani oblici željeza potiču formiranje protein karbonila kroz reakcije u posredstvu reaktivnih vrsta kisika (Estévez, 2011).

Kao posljedica metal kataliziranih oksidacija, treonin se pretvara u α -amino-3-keto maslačnu kiselinu, lizin u α -amino-adipinski semialdehid (AAS), i arginin i prolin u γ -glutaminski semialdehid (GGS). AAS i GGS čine 70% ukupnih karbonila koji nastaju oksidacijom mesnih proizvoda (Estévez, 2011), te predstavljaju indikatore oksidacije proteina u mesu i mesnim proizvodima (Estévez i sur., 2009).

Također, pokazalo se da se AAS i GGS formiraju u proteinima mesa kao rezultat mehanizma tipa Maillardovih reakcija u prisutnosti reducirajućih šećera. Ovaj potonji put također može uključivati mehanizam oksidativne deaminacije induciran α -dikarbonil spojevima kao što su glioksal i metilglioksal (Soladoye i sur., 2015).

Osim preko sustava metal kataliziranih oksidacija, karbonilacija proteina mesa odvija se i oksidacijom posredovanom mioglobinom te preko sustava oksidacije lipida pri čemu se generiraju reaktivne vrste kisika. Mioglobin aktiviran vodikovim peroksidom potiče stvaranje AAS i GGS u većoj mjeri nego $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ i $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Mioglobin je dobar marker formiranja karbonila u mesu, što ističe njegovu ulogu u karbonilaciji proteina. Reaktivne

vrste kisika koje potječu od lipida, kao što su peroksilni radikali (ROO•), također su potencijalni inicijatori karbonilacije proteina (Estévez, 2011).

Osim prisustva prijelaznih metala, mioglobina i oksidacije lipida, na oksidaciju proteina i aminokiselina utječu i brojni okolišni faktori, kao što su pH, temperatura, aktivitet vode i prisutnost ostalih promotora ili inhibitora kao što su fenolni spojevi. Tercijarna struktura proteina, njihova veličina, sastav i slijed aminokiselina, te raspodjela aminokiselina u strukturi proteina također mogu utjecati na podložnost proteina na karbonilaciju. Pojava karbonilacije proteina povezana je s raznim biokemijskim promjenama, kao što su povećana hidrofobnost i sekundarne strukturne promjene proteina (Estévez, 2011).

Jednom oblikovani u hrani, proteinski karbonili su opisani kao aktivne komponente u dodatnim reakcijama (Soladoye i sur., 2015).

Aldehidna skupina iz specifičnih karbonila može biti uključena u nekoliko reakcija:

1. Daljnju oksidativnu degradaciju, gdje se aldehidna skupina dalje oksidira u karboksilnu kiselinu
2. Reakciju s aldehidnom skupinom iz drugog karbonila pri čemu nastaje produkt aldolne kondenzacije
3. Reakciju s amino skupinom iz susjedne aminokiseline vezane na protein (uglavnom lizin) što uzrokuje formiranje kovalentne veze preko Schiffove baze
4. Reakciju s α -amino skupinom slobodne aminokiseline gdje nastaje Strecker aldehid preko Strecker tipične degradacijske oksidativne deaminacije i dekarboksilacije aminokiseline u prisutnosti karbonilnog spoja.

Aldehidi nastali Streckerovom razgradnjom su uobičajene hlapive komponente suhomesnatih proizvoda i uvelike pridonose njihovoj aromi. Istovremena pojava intenzivne proteolize, oksidativne reakcije na proteinima i stvaranje aldehida tijekom zrenja mesnih proizvoda upućuju na to da su semialdehidi uključeni u formiranje aldehida reakcijom sa susjednom slobodnom aminokiselinom. AAS i GGS promoviraju in vitro razgradnju leucina i izoleucina da bi se dobili odgovarajući aldehidi, 3-metilbutanal i 2-metilbutanal, čime pridonose formiranju okusa pršuta (Estévez, 2011).

Tehnološki postupak soljenja u proizvodnji mesnih proizvoda povećava pojavu oksidacije proteina kao i oksidaciju lipida.

Prooksidativni učinak soli na lipide mesa ovisi o metaboličkom profilu mišića, s većim učinkom na crveno u odnosu na bijelo meso, što je povezano s većom količinom hem pigmenta, ukupne količine masti i razine polinezasićenih masnih kiselina. Pretpostavlja se da mehanizam prooksidacijskih učinaka NaCl uključuje poremećaj strukturnog integriteta membrana, omogućujući blisku interakciju katalizatora s lipidima ili proteinskim reaktantima, smanjenu katalitičku aktivnost antioksidacijskih enzima ili sudjelovanje NaCl u stvaranju hipervalentnog ferilmioglobina, koji može propagirati oksidaciju. Osim toga, nečistoće u soli također su implicirane kao prooksidanti. Učinci NaCl-a na lipide mogu se ekstrapolirati na proteine i opisivati oksidaciju proteina, zbog povezanosti oksidacije lipida i proteina (Soladoye i sur., 2015).

Mišićni proteini osobito su osjetljivi na oksidaciju u okolini s visokom ionskom snagom, kao što je 0,6 M otopina NaCl-a. Sol ima izravan utjecaj na konformaciju proteina, topljivost i funkcionalnost. Budući da miofibrili imaju labavu ili poremećenu strukturu u 0,6 M NaCl zbog elektrostatskih odbojnosti, pojedinačni proteini, uključujući miozin, bili bi podložniji difuznim hidroksilnim radikalima. Dakle, promjene konformacije mogu imati neizravan utjecaj na osjetljivost miofibrilarnih proteina na oksidaciju time što je pristupačniji radikalima i drugim prooksidacijskim faktorima. Nadalje, NaCl u mesnim proizvodima može promijeniti stanje željeza od željeza (Fe^{2+}) oksimioglobina do feri (Fe^{3+}) metmioglobina kroz Fentonovu reakciju, čime se povećava njegov prooksidacijski potencijal (Soladoye i sur., 2015).

Dodatak soli uvelike utječe na ionsku snagu okoline mesa koja utječe na stupanj agregacije proteina mesa, njihovu izloženost prooksidansima i stoga njihovu osjetljivost na karbonilaciju. Osim toga, dodatak NaCl-a može povećati aktivnost Fe^{3+} iona ili Cl^- ioni koji potječu iz NaCl-a povećavaju topljivost tih iona i potiču njihov prooksidacijski učinak (Estévez, 2011).

S druge strane, niske temperature pri kojima se provodi soljenje butova (0-5°C) ograničavaju djelovanje soli kao prooksidansa i sprječavaju oksidaciju proteina u mišićima (Wang i sur., 2011).

Dimljenje pršuta ima pozitivne učinke na sprječavanje oksidacije proteina, jer fenolni spojevi prisutni u dimu, osim što doprinose okusu dimljenih mesnih proizvoda, imaju antimikrobno i antioksidativno djelovanje (Hu i Jacobsen, 2016).

Oksidacija proteina mesa uzrokuje gubitak određene količine aminokiselina i značajnu promjenu profila aminokiselina (Estévez, 2011), gubitak esencijalnih aminokiselina,

smanjenu probavljivost i bioraspoloživost te zdravstvene poremećaje (Soladoye i sur., 2015). Osim toga, oksidacija proteina negativno utječe na boju i teksturu mesa i mesnih proizvoda (Armenteros i sur., 2009).

2.3.1. DNPH metoda u procjeni ukupne količine karbonila

Količina nastalih karbonila često se mjeri kako bi se procijenila oksidacija proteina jer se njihovo nastajanje odvija različitim mehanizmima. Njihova detekcija DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin) metodom jednostavna je i predstavlja jedan od najrelevantnijih načina za izražavanje oksidativnog oštećenja proteina u biološkim i prehrambenim sustavima (Soladoye i sur., 2015).

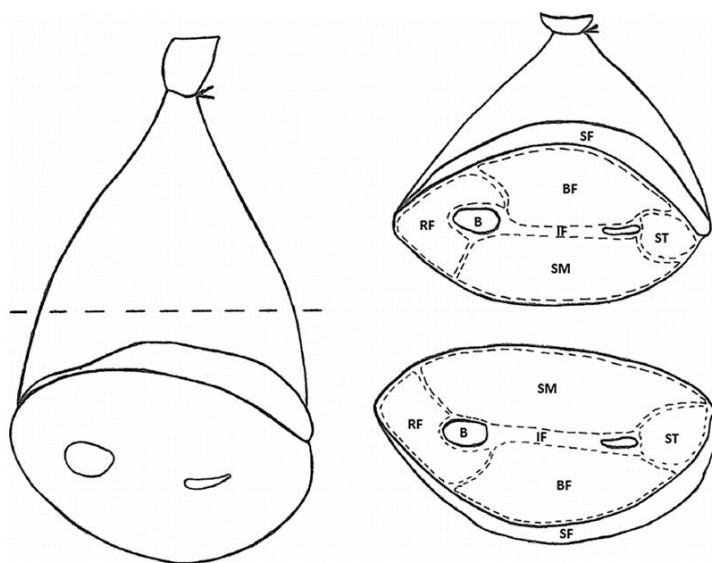
DNPH metoda je rutinska metoda koja omogućava kvantifikaciju ukupne količine karbonila iz uzorka proteina i rezultati predstavljaju opći indeks oksidacije proteina u mesu i mesnim proizvodima. Metoda se temelji na reakciji DNPH s karbonilima pri čemu nastaje 2,4-dinitrofenil (DNP) hidrazonski produkt koji pokazuje maksimum apsorpcije na 370 nm. Ova metoda uključuje istovremeno određivanje karbonilnih derivata i sadržaja proteina u uzorku. Koncentracija DNP hidrazona izračunava se uvođenjem koeficijenta apsorpcije proteina hidrazona koji iznosi $22\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$. Koncentracija proteina određuje se iz kontrolnog uzorka, bez dodanog DNPH, na 280 nm koristeći BSA kao standard. Rezultati se obično izražavaju kao nmol DNP hidrazona po mg proteina (Estévez, 2011).

Iako se DNPH metoda uobičajeno koristi za procjenu oksidacije proteina u mesu i biološkim uzorcima, postoje određeni nedostaci ovog postupka. Primjerice, karbonilne skupine mogu se pojaviti u proteinima iako nisu posljedica oksidacije aminokiselinskih ostataka. Određeni produkti lipidne peroksidacije (alkenali) mogu reagirati sa sulfhidrilnim skupinama proteina pri čemu nastaju stabilni kovalentni tioesterski adukti koji sadrže karbonilne skupine. Također, DNPH se može vezati na karbonile dobivene iz lipida pri čemu se ukupna koncentracija karbonila povećava iako nije došlo do oksidacije proteina. Zbog navedenih nedostataka, razvijaju se i druge metode za određivanje oksidacije proteina, kao što su fluorescentna spektroskopija i LC-ESI-MS (tekućinska kromatografija-elektrosprej ionizacija-masena spektrometrija) (Armenteros i sur., 2009).

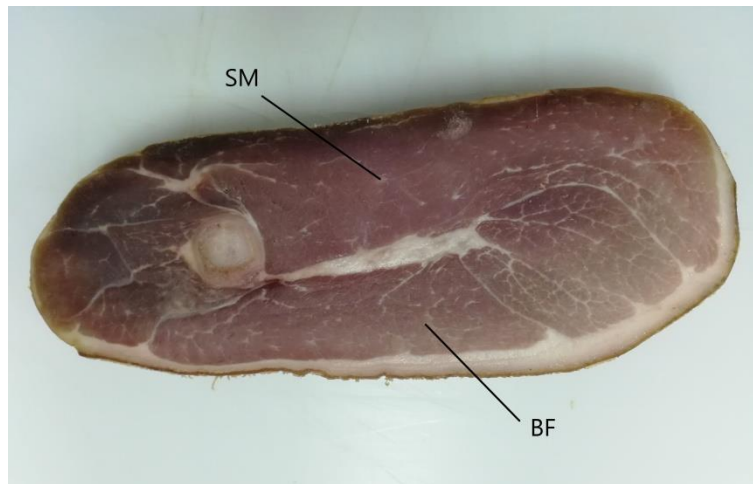
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom radu analizirani su uzorci dalmatinskog pršuta tijekom 4 faze proizvodnje: sirovi, soljeni, dimljeni i sušeni butovi. Pasma svinja korištena u proizvodnji pršuta bio je tropasminski križanac DANBRED ((danski landras x veliki jorkšir) x durok). Po svakoj fazi proizvodnje izuzeto je 10 presjeka butova iz kojih su izdvojena po 2 mišića-*biceps femoris* i *semimembranosus*, što čini ukupno 20 uzoraka po pojedinoj fazi proizvodnje, odnosno ukupno 80 analiziranih uzoraka tijekom 4 faze proizvodnje. Na slici 3 prikazan je presjek mišića buta s označenim mišićima, kostima, unutarnjim masnim dijelom i potkožnim masnim područjem. Na slici 4 prikazan je realni uzorak presjeka mišića buta korišten za analizu u sklopu izrade ovog rada. Na slici 5 prikazani su odvojeni mišići *biceps femoris* i *semimembranosus* iz presjeka buta.



Slika 3. Presjek buta: mišići: SM-*Semimembranosus*; ST-*Semitendinosus*; BF-*Biceps femoris*; RF-*Rectus femoris* i B-kost; IF-unutarnji masni dio; SF-potkožno masno područje (Petrova i sur., 2015)



Slika 4. Presjek mišića buta s označenim mišićima (BF-*biceps femoris* i SM-*semimembranosus*) (vlastita fotografija)



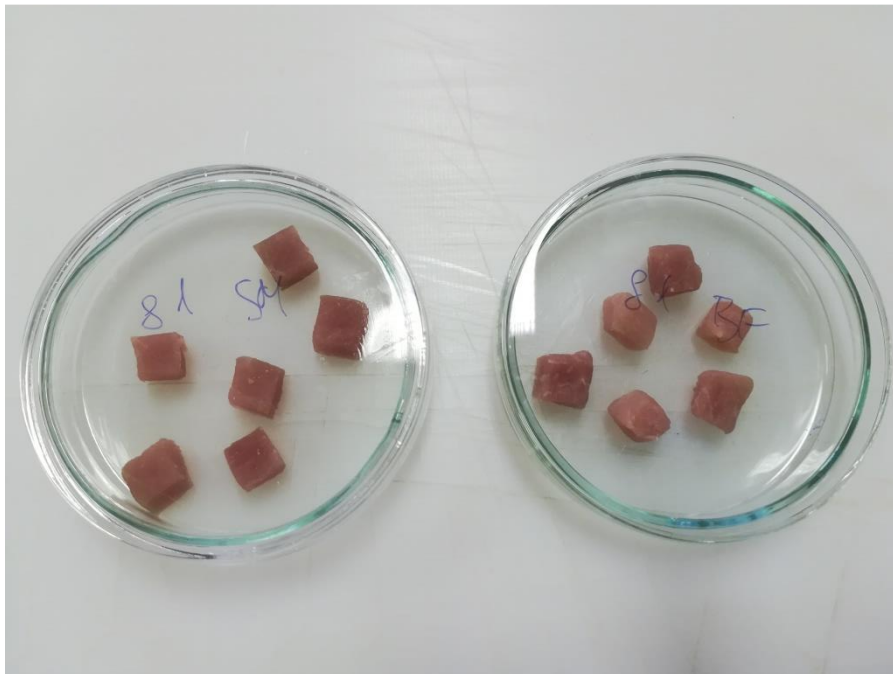
Slika 5. Mišići *biceps femoris* (BF) i *semimembranosus* (SM) izdvojeni iz presjeka buta (vlastita fotografija)

3.1.1. Priprema uzorka za analizu

Aparatura i pribor:

- uređaj za vakuumiranje
- tehnička vaga.

Analiza teksture provedena je odmah po primitku uzoraka. Uzorci mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* izrezani su na kockice veličine 10 x 10 x 10 mm. Za analizu pojedinog uzorka izrezano je 6 kockica navedenih dimenzija. Na slici 6. prikazan je uzorak mišića pripremljen za analizu teksture.



Slika 6. Uzorci mišića pripremljeni za analizu teksture (vlastita fotografija)

Za određivanje indeksa proteolize i oksidacije proteina (DNPH metoda) po 15-20 g uzorka mišića vakuumirano je pomoću uređaja za vakuumiranje u vrećice s određenim brojevnim oznakama i oznakama mišića. Uzorci su čuvani u zamrzivaču na -18°C do provedbe analiza.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje indeksa proteolize

Indeks proteolize određen je prema metodi koju su opisali Doi i sur. (1981) i Baer i sur. (1996). Određivanjem indeksa proteolize kvantificira se ukupan broj aminokiselina izraženih na bazi leucina prisutnih u uzorcima pršuta (primjenjivo za sve faze proizvodnje). Reakcija se temelji na derivatizaciji s kadmij ninhidrinom, a apsorbancija uzoraka očitava se na 490 nm.

2 g uzorka izvagano je na tehničkoj vagi u tube za centrifugu te je dodano 20 mL hladnog 0,01 M HCl-a. Uzorci su zatim homogenizirani na Ultra-Turrax-u 3 puta po 20 sekundi pri čemu su u međuvremenu stavljani u led. Tube za centrifugu su ekvilibrirane i centrifugiranje je provedenom 20 minuta na 10 000 rpm na 4°C. Dobiveni supernatant filtriran je preko staklene vune i dobiveni ekstrakt otopljen sa 0,01 M HCl-om u različitim omjerima ovisno o vremenu zrenja. U tablici 1 prikazani su navedeni omjeri.

Tablica 1. Omjeri ekstrakta i HCl-a ovisno o vremenu zrenja

| | |
|--------------------|-------|
| Sirovi but | 1/3 |
| 2 mjeseca | 1/5 |
| 3,5 mjeseca | 1/10 |
| 5 mjeseci | 1/50 |
| 6,5 mjeseca | 1/50 |
| 9 mjeseci | 1/100 |
| 10 mjeseci | 1/100 |

* Prvi volumen u zbroju odnosi se na ekstrakt, a drugi na količinu HCl-a.

U 400 µL dobivene otopine (ekstrakt+HCl) dodano je 800 µL etanola te su uzorci promiješani na Vortex-u i ostavljeni na sobnoj temperatura da precipitiraju proteini i nakon toga centrifugirani na 12 000 rpm 5 min. 400 µL supernatanta promiješano je s 800 µL reagensa kadmij ninhidrin, uzorci su dobro promiješani na Vortex-u i stavljani u termoblok na 84°C

tijekom 5 minuta. Nakon toga uzorci su odmah stavljeni u led tijekom 15 minuta, zatim centrifugirani na 12 000 rpm 5 minuta te je naposljetku očitana apsorbancija na 490 nm.

Za svako mjerenje izrađena je kalibracijska krivulja. Za kalibracijsku krivulju pripremljena je 1 mM otopina leucina tako da se odvagalo 0,0133 g leucina u 100 mL destilirane vode. Pripremljena otopina leucina pomiješana je s etanol/voda (2:1) u koncentracijama kako je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Priprema kalibracijske krivulje za određivanje indeksa proteolize

| | Leu 1 mMol 13,3 mg/100 mL | EtOH:Voda 2:1 | | |
|--------------------------|------------------------------|------------------|------|---------------------|
| | mL | mL | mM | mg mL ⁻¹ |
| Leu 06 | 0,6 | 0,4 | 0,60 | 79,80 |
| Leu 04 | 0,4 | 0,6 | 0,40 | 53,20 |
| Leu 02 | 0,2 | 0,8 | 0,20 | 26,60 |
| Leu 01 | 0,1 | 0,9 | 0,10 | 13,30 |
| Slijepa proba | 0 | 1 | 0,00 | 0,00 |

400 µL otopine za kalibracijsku krivulju promiješano je s 800 µL reagensa kadmij ninhidrin, otopine za kalibracijsku krivulju su dobro promiješane na Vortex-u i stavljene u termoblok na 84°C tijekom 5 minuta. Nakon toga otopine za kalibracijsku krivulju su odmah stavljene u led tijekom 15 minuta, zatim centrifugirane na 12 000 rpm 5 minuta te je naposljetku očitana apsorbancija na 490 nm.

Izračun:

Pomoću kalibracijske krivulje i apsorbancije uzoraka izračunata je koncentracija aminokiselina u svakoj otopini uzorka (µg mL⁻¹). Također je napravljena korekcija sukladno napravljenim otopinama uzorka: dobivena koncentracija x10 (ekstrakcija) x3 (deproteinizacija) x specifična otopina svakog uzorka (3, 5, 10, 20, 50, 100) i podijeljena s 1 000 te je na taj način dobivena količina aminokiselina u mg po 1 g uzorka.

3.2.2. Određivanje ukupnih karbonila

Određivanje ukupnih karbonila provedeno je prema izmijenjenom postupku koji su opisali Armenteros i sur. (2009). 1 g uzorka izvagan je u falconicu u duplikatu. Uzorak je homogeniziran s 10 mL pirofosfatnog pufera (pH 7.4; 2 mM Na₄P₂O₇; 10 mM trizma maleat; 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) na Ultra Turrax-u 30 sekundi. Uzorak je podijeljen na 2 alikvota od 0,1 mL (u eppendorficu od 2 mL), u svaki je dodano 1 mL 10% TCA da precipitiraju proteini, izmiješano na Vortex-u i centrifugirano na 10 000 rpm tijekom 5 min (2°C). Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen te se za kvantifikaciju proteina u eppendorfice dodao 1 mL HCl 2N (Pelet 1), a za kvantifikaciju karbonila 1 mL 0,2% DNPH u HCl 2N (Pelet 2). Dobiveni uzorci inkubirani su 1 h na sobnoj temperaturi u tami, uz miješanje svakih 15 min na Vortex-u. Zatim su uzorci precipitirani s 1 mL 10% TCA, promiješani na Vortex-u 30 sekundi i centrifugirani na 10 000 rpm 5 minuta (2°C). Supernatant je odbačen, a pelet ispran sa 1 mL etanol/etil acetata (1:1), uzorci promiješani na Vortex-u i centrifugirani na 10 000 rpm 5 min. ispiranje s etanol/etil acetatom ponovljeno je 2 puta. Dobiveni pelet zatim je otopljen u natrijevom fosfatnom puferu 20 mM (pH 6.5) sa 6M gvanidin hidrokloridom, uzorci su promiješani na Vortex-u i centrifugirani na 10 000 rpm 5 min da se uklone netopljivi fragmenti. Na dobivenom supernatantu mjerena je apsorbancija. Apsorbancija uzoraka za kvantifikaciju proteina (Pelet 1) mjerena je na 280 nm, kao standard korišten je BSA (0,5-2 mg mL⁻¹) u natrijevom fosfatnom puferu 20 mM (pH 6,5) sa 6M gvanidin hidrokloridom. Apsorbancija uzoraka za kvantifikaciju karbonila mjerena je na 370 nm, a koncentracija karbonila izračunata je korištenjem jednadžbe

$$A = \epsilon * M * l.$$

A označava apsorbanciju pri 370 nm, l je debljina kivete korištene prilikom mjerenja apsorbancije, M koncentracija karbonila, a ϵ koeficijent adsorpcije proteina hidrazona koji iznosi 21.0 mM⁻¹cm⁻¹. Rezultat je izražen kao nmol karbonila po mg proteina.

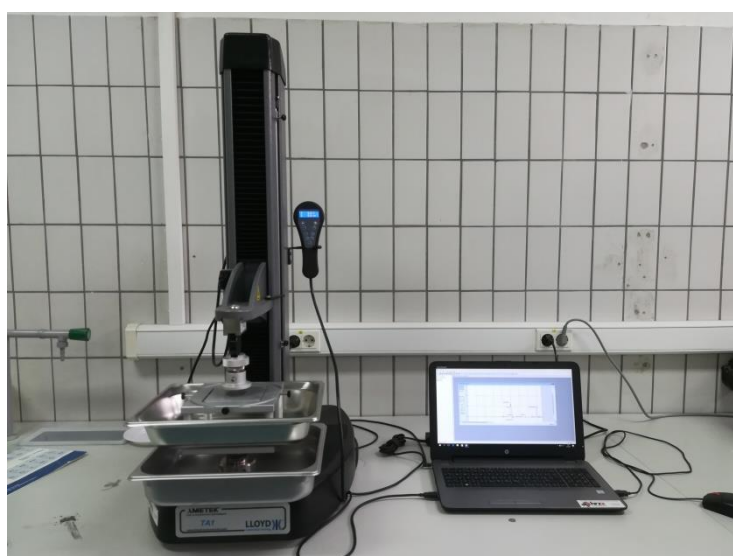
Za izradu baždarne krivulje, 0,02 g BSA (albumin goveđeg seruma) otopi se u 10 mL natrij fosfatnog pufera 20 mM (pH 6,5) sa 6M gvanidin hidrokloridom. Baždarna krivulja izrađena je prema tablici 3.

Tablica 3. Podaci za izradu baždarne krivulje (SP=slijepa proba)

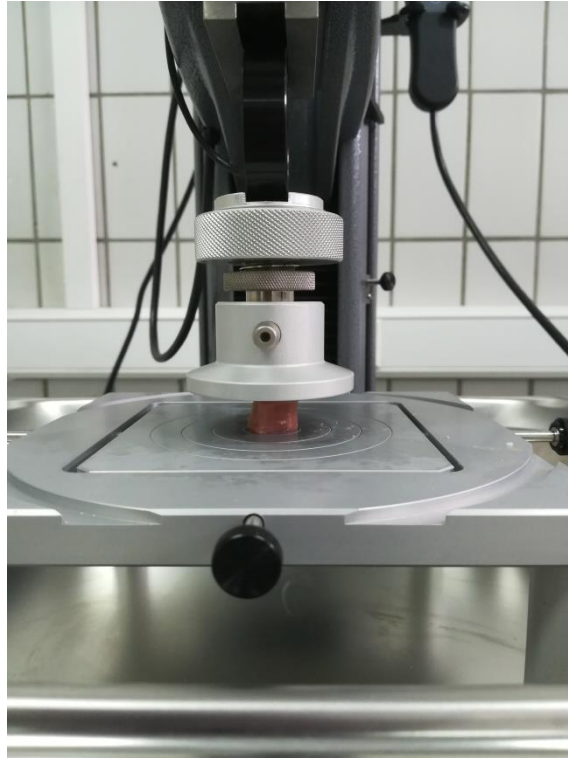
| BSA (mL) | natrij fosfatni pufer + gvanidin hidroklorid (mL) | koncentracija BSA (mg mL ⁻¹) |
|----------|---|--|
| 0 | 2 | 0 (SP) |
| 0.5 | 1.5 | 0.5 |
| 1 | 1 | 1 |
| 1.5 | 0.5 | 1.5 |
| 2 | 0 | 2 |

3.2.3. Određivanje teksture

Tekstura na uzorcima BF i SM pršuta u pojedinoj fazi proizvodnje određena je pomoću teksturometra (Ametek Lloyd Instruments Ltd., UK) s ćelijom od 50 kg. Uzorci mišića pršuta pripremljeni su kako je navedeno u poglavlju 3.1.1. Uzorci su komprimirani dva puta do 50% deformacije brzinom od 1 mm/s (vrijeme razmaka između 2 ciklusa 5 s). Rezultati su obrađeni softverom NexygenPlus, a određeni su sljedeći parametri: tvrdoća (N), adhezivna sila (N), kohezivnost, adhezivnost (N mm), gumenost (N), odgođena elastičnost (mm), žvakljivost (N mm), otpornost (N), lom (N) i vlaknastost (mm). Na slikama 7. i 8. prikazan je uređaj za određivanje teksture.



Slika 7. Teksturometar (Ametek Lloyd Instruments Ltd., UK) (vlastita fotografija)



Slika 8. Analiza uzorka teksturometrom (Ametek Lloyd Instruments Ltd., UK) (vlastita fotografija)

3.2.4. Statistička obrada podataka

Statistički izračun rezultata određen je jednosmjernom analizom varijance (one-way ANOVA test) uz razinu značajnosti 5 % ($P < 0,05$). Za statističku obradu podataka korišten je računalni program SPSS 12.0 (IBM, USA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

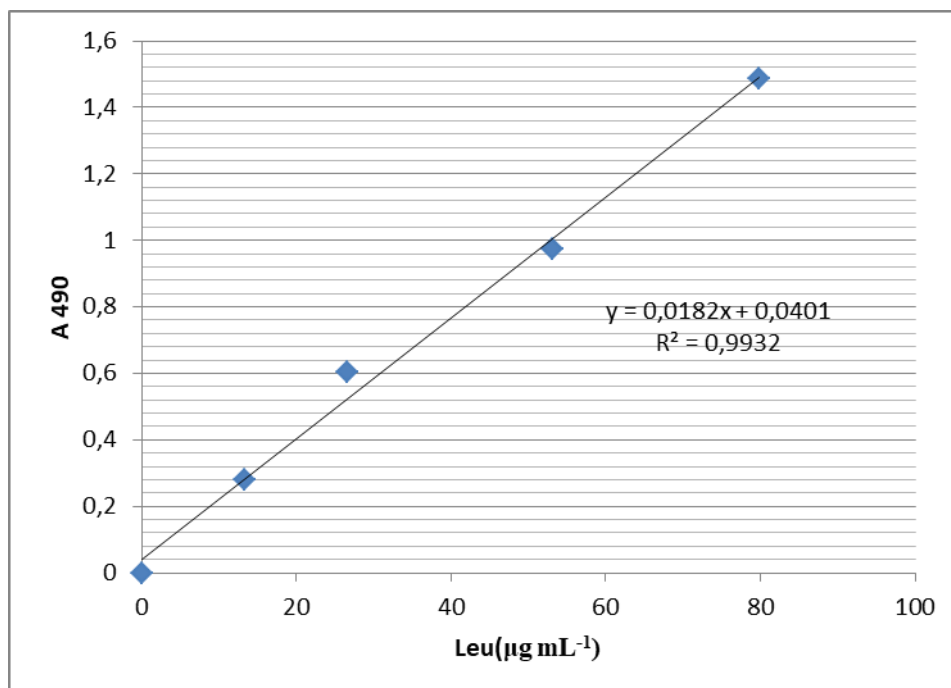
Promjene na proteinima dalmatinskog pršuta određivane su tijekom 4 faze proizvodnje-na sirovim butovima, te nakon soljenja, dimljenja i sušenja. Sve analize provedene su na 2 mišića-*biceps femoris* i *semimembranosus*. Analize koje su provedene su određivanje teksture pršuta, određivanje količine proteina i karbonila DNPH metodom i određivanje indeksa proteolize mjerenjem koncentracije aminokiselina. Prilikom određivanja teksture napravljeno je 6 paralelnih mjerenja za svaki pojedini mišić-*biceps femoris* i *semimembranosus* tijekom svake faze proizvodnje. Za određivanje koncentracije proteina i karbonila te za određivanje indeksa proteolize napravljena su 2 paralelna mjerenja za svaki uzorak mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* tijekom svake od 4 faze proizvodnje.

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

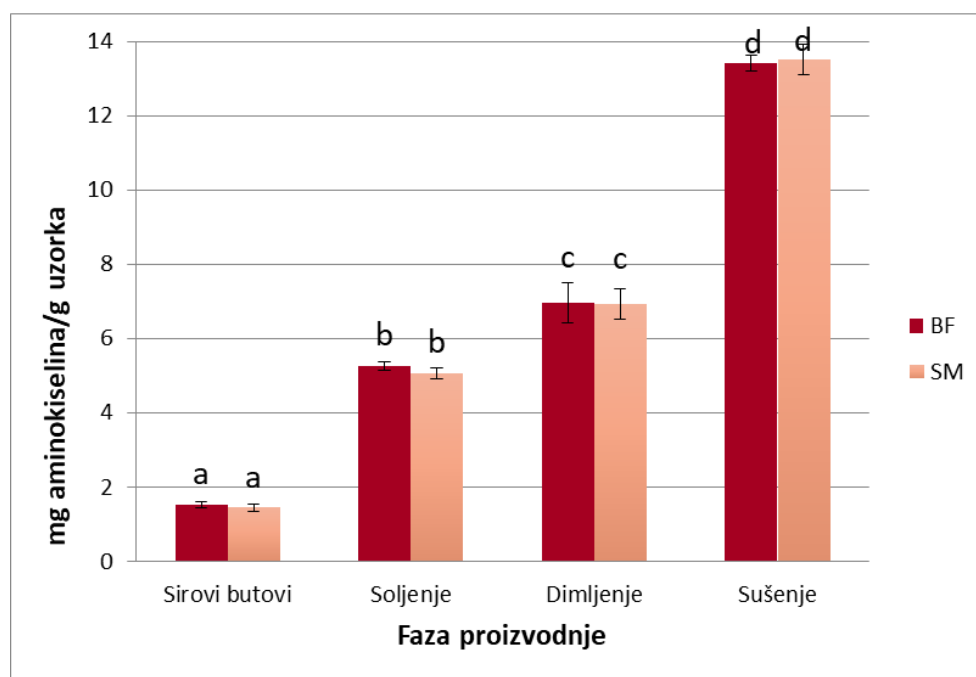
4.1. PROTEOLIZA

Proteoliza je jedan od najvažnijih biokemijskih procesa koji se odvijaju tijekom procesa proizvodnje pršuta. Osim o gubitku vode i difuziji soli, kvaliteta pršuta uvelike ovisi i o enzimskoj aktivnosti. Poznato je da su endopeptidaze uključene u početnu razgradnju sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina, dok egzopeptidaze (di- i tri-peptidil peptidaze i aminopeptidaze) nastavljaju razgradnju proteina pri čemu nastaju mali peptidi i slobodne aminokiseline (Bermúdez i sur., 2014).

Indeks proteolize određen je reakcijom derivatizacije s kadmij-ninhidrinom. Ovim postupkom kvantificiran je ukupan broj aminokiselina izraženih na bazi leucina. Prilikom svakog određivanja koncentracije aminokiselina napravljena je baždarna krivulja ovisnosti apsorbancije pri 490 nm o koncentraciji leucina. Primjer baždarne krivulje prikazan je na slici 9. Iz jednadžbe pravca očitane su odgovarajuće vrijednosti koncentracije aminokiselina, napravljena je odgovarajuća korekcija i rezultati su izraženi kao koncentracija aminokiselina u mg po g uzorka. Na slici 10. prikazani su rezultati određivanja indeksa proteolize.



Slika 9. Prikaz baždarne krivulje leucina korištene za određivanje koncentracije aminokiselina (izraženih na bazi leucina)



*Utjecaj tipa mišića (BF- *biceps femoris*; SM- *semimembranosus*) (srednja vrijednost 10 uzoraka). Različita slova (a-d) označavaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$) (razlika u fazama).

Slika 9. Grafički prikaz rezultata određivanja indeksa proteolize u uzorcima dimljenog pršuta kroz faze proizvodnje

Indeks proteolize u uzorcima dimljenog pršuta određen je tijekom prve 4 faze proizvodnje-u sirovim, soljenim, dimljenim i sušenim uzorcima *biceps femorisa* i *semimembranosusa*. Indeks proteolize izražen je kao mg aminokiselina po g uzorka. Indeks proteolize povećavao se tijekom svake od 4 faze proizvodnje u oba mišića te postoji statistički značajna razlika između faza proizvodnje u oba mišića ($P < 0,05$). Statistički značajna razlika nije postojala između mišića u niti jednoj od faza proizvodnje ($P > 0,05$). Dakle, tijekom prve 4 faze proizvodnje dalmatinskog pršuta, razgradnja proteina odvijala se jednakim intenzitetom u oba mišića.

Koncentracija aminokiselina u sirovim butovima iznosi $1,44 \text{ mg g}^{-1}$ u *semimembranosusu* i $1,53 \text{ mg g}^{-1}$ u *biceps femorisu*. Nakon soljenja koncentracija aminokiselina povećala se na $5,07 \text{ mg g}^{-1}$ u *semimembranosusu* i $5,27 \text{ mg g}^{-1}$ u *biceps femorisu*. Nakon faze dimljenja zabilježeno je daljnje povećanje koncentracija aminokiselina na $6,94 \text{ mg g}^{-1}$ u *semimembranosusu* i $6,97 \text{ mg g}^{-1}$ u *biceps femorisu*, te daljnje povećanje nakon faze sušenja na $13,50 \text{ mg g}^{-1}$ u mišiću *semimembranosus* i $13,41 \text{ mg g}^{-1}$ u *biceps femorisu*.

Andronikov i sur. (2013) navode kako se indeks proteolize povećavao tijekom proizvodnje Kraškog pršuta, te da je postojala statistički značajna razlika između pojedinih faza proizvodnje u oba mišića-*biceps femoris* i *semimembranosus*, što je potvrđeno i u ovome radu.

U istraživanju koje su proveli Bermúdez i sur. (2014), na uzorcima mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* tijekom proizvodnje Celta pršuta analizirana je koncentracija slobodnih aminokiselina. Koncentracija slobodnih aminokiselina povećavala se tijekom pojedinih faza proizvodnje Celta pršuta u oba mišića, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovome radu. Također, Bermúdez i sur. (2014) navode kako se razgradnja proteina povećava tijekom faze sušenja i zrenja, jer se te faze provode pri temperaturi od 30°C . Pri takvoj temperaturi stimulira se djelovanje katepsina D i egzopeptidaza i oslobađa se veća količina slobodnih aminokiselina. Soljenje dalmatinskog pršuta provodi se na temperaturi između 2 i 6°C , nakon čega se dimljenje i sušenje provode na 22°C , pa se povećanje indeksa proteolize, odnosno povećanje koncentracije slobodnih aminokiselina i u ovome radu može povezati s povišenjem temperatura koje pogoduje djelovanju katepsina D i egzopeptidaza.

Harkouss i sur. (2012) proveli su istraživanje u kojem se pratio indeks proteolize tijekom proizvodnje Bayonne pršuta kroz faze odmaranja, sušenja i zrenja. Indeks proteolize povećavao se tijekom proizvodnje pršuta te nije postojala statistički značajna razlika u stupnju

proteolize između mišića *biceps femoris* i *semimembranosus*, što je u korelaciji s rezultatima dobivenim ovim istraživanjem.

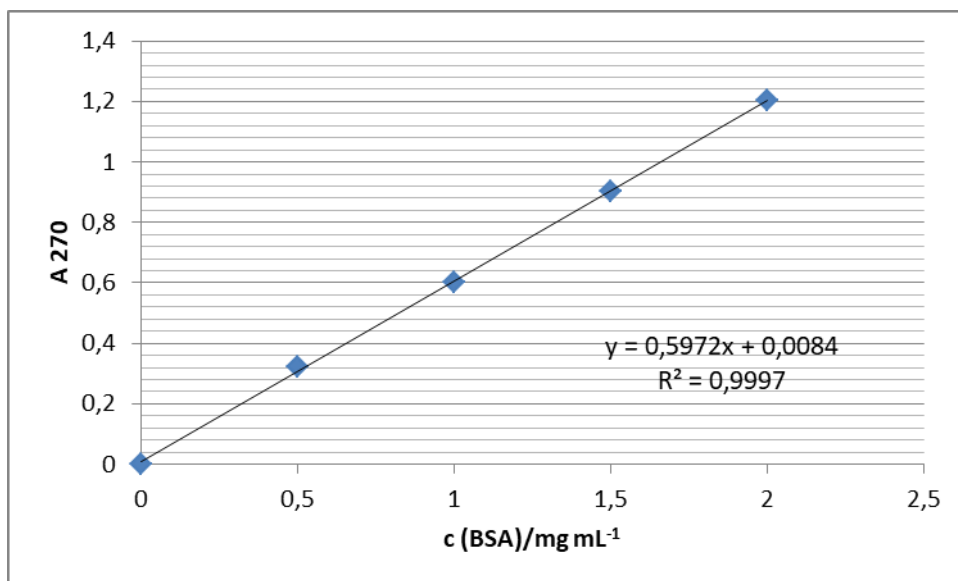
Wang i sur. (2011) pratili su indeks proteolize u sirovom mesu i tijekom faza soljenja Xuanwei pršuta. Indeks proteolize izražen je kao omjer neproteinskog dušika i ukupnog dušika. Indeks proteolize povećao se s 10,81% (za svježi pršut) na 12,50% na kraju soljenja u *bicepsu* i sa 10,37% na 11,33% u *semimembranosusu*, što pokazuje da je došlo do izraženije proteolitičke aktivnosti u fazi soljenja Xuanwei pršuta, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovome radu gdje je došlo do povećanja indeksa proteolize nakon faze soljenja.

U radovima Harkoussa i sur. (2012, 2015) i Pugliese i sur. (2015) navedeno je kako se statistički značajna razlika u indeksu proteolize između mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* postiže tek u kasnijim fazama proizvodnje pršuta, osobito nakon faze zrenja, pri čemu je indeks proteolize veći u *biceps femorisu*, te se može pretpostaviti kako će ta razlika nastupiti u kasnijoj fazi proizvodnje dalmatinskog pršuta, odnosno fazi zrenja. Također, slični rezultati dobiveni su i u istraživanju Thérona i sur. (2011), gdje je provedena proteomska analiza mišića u zrelih Bayonne pršutima. Proteomska mapa *biceps femorisa* pokazivala je više proteinskih fragmenata, što znači da je stupanj razgradnje proteina veći nego u *semimembranosusu*, zbog većeg udjela vode. Andronikov i sur., (2013) također navode kako je na kraju proizvodnje Kraškog pršuta indeks proteolize veći u *biceps femorisu*, nego u *semimembranosusu*. Visoki udio soli u početnim fazama i niski sadržaj vode u kasnijim fazama proizvodnje u mišiću *semimembranosus* glavni su uzroci nižeg indeksa proteolize. Također, del Olmo i sur. (2015) pratili su proteolizu tijekom zrenja pršuta Serrano pri različitim temperaturnim uvjetima te se udio slobodnih aminokiselina povećavao kako je tehnološki proces proizvodnje napredovao.

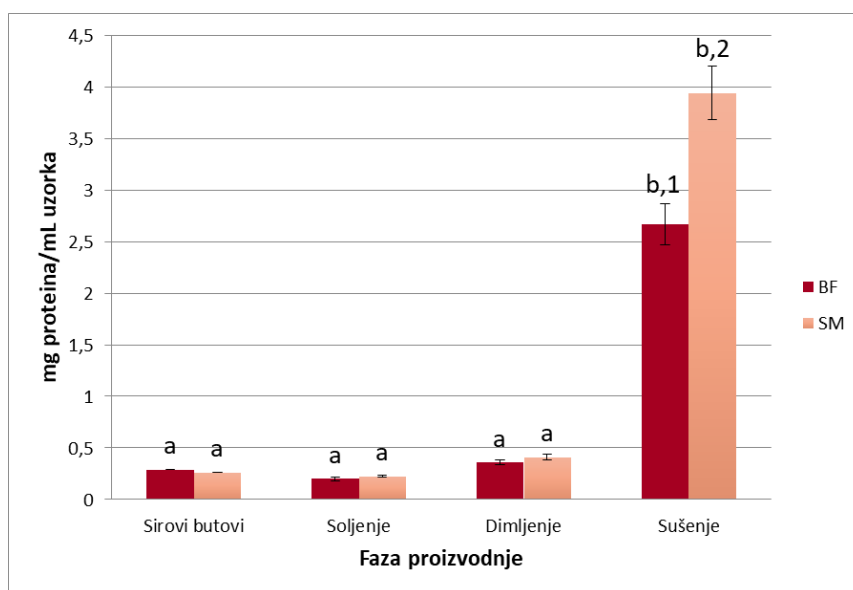
4.2. KARBONILI

Oksidacija proteina može uzrokovati promjene u hidrofobnosti proteina, konformaciji i topljivosti, što se smatra glavnim uzrokom niske probavljivosti, a time i manje nutritivne vrijednosti oksidiranih proteina. Oksidacija proteina u mesnim proizvodima uzrokuje smanjenu sposobnost zadržavanja vode i sposobnost oblikovanja teksture te samu nježnost i sočnost konačnih proizvoda. Karbonilni spojevi koji nastaju oksidacijom proteina mogu utjecati i na miris i okus pršuta (Lund i sur., 2011).

Koncentracija karbonila u uzorcima mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* iz 4 faze proizvodnje dalmatinskog pršuta određena je DNPH metodom. Ovom metodom određena je i koncentracija proteina u uzorcima, ali se umjesto DNPH za kvantifikaciju proteina dodaje otopina HCl-a. Prilikom svakog određivanja koncentracije proteina napravljena je baždarna krivulja u ovisnosti apsorbancije pri 280 nm o koncentraciji BSA. Primjer baždarne krivulje prikazan je na slici 11. Iz dobivene jednadžbe pravca izračunata je koncentracija proteina. Koncentracija proteina izražena je u mg po mL uzorka. Koncentracija karbonila izračunata je iz formule te izražena u nmol po mg proteina. Na slici 12. prikazane su izmjerene koncentracije proteina, a na slici 13. rezultati određivanja koncentracije karbonila u uzorcima mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* tijekom prve 4 faze proizvodnje dimljenog pršuta.



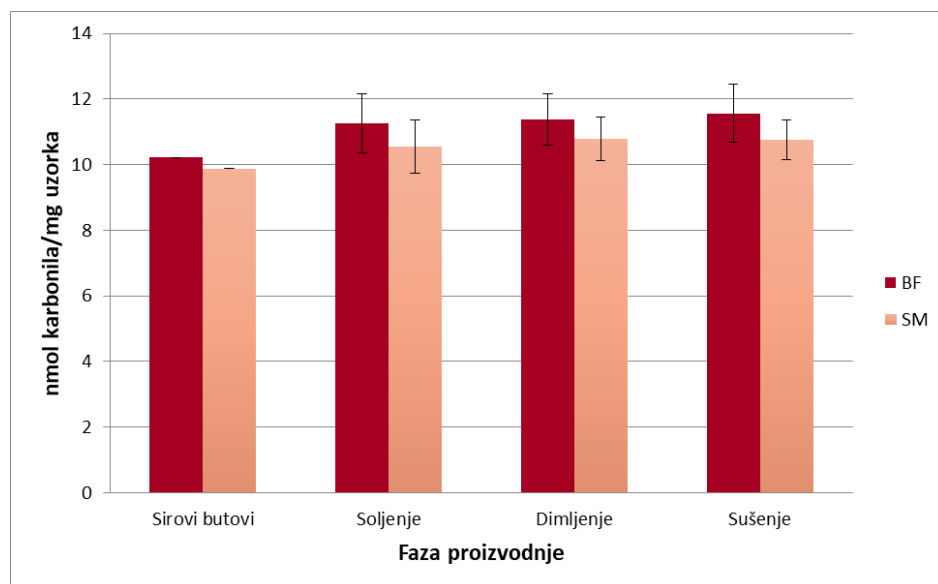
Slika 11. Prikaz baždarne krivulje BSA korištene za određivanje koncentracije proteina



*Utjecaj tipa mišića (BF- *biceps femoris*; SM- *semimembranosus*) (srednja vrijednost 10 uzoraka). Različita slova (a-b) označavaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$) (razlika u fazama) dok različiti brojevi (1,2) označavaju statistički značajnu razliku ($P < 0,05$) (razlika između mišića).

Slika 12. Grafički prikaz rezultata određivanja koncentracije proteina u uzorcima dimljenog pršuta kroz faze proizvodnje

Koncentracija proteina u prve 3 faze proizvodnje dimljenog pršuta iznosila je između 0,20 i 0,36 mg mL⁻¹ u *biceps femorisu* i između 0,23 i 0,41 mg mL⁻¹ u *semimembranosusu* te se nije statistički značajno mijenjala (P>0,05) tijekom navedenih faza i u ovisnosti o anatomskej lokaciji mišića. Nakon faze sušenja, došlo je do porasta koncentracije proteina na 3,94±0,26 mg mL⁻¹ za *semimembranosus* i 2,67±0,20 mg mL⁻¹ za *biceps femoris*. Ovaj nagli porast u koncentraciji proteina posljedica je gubitka vode prilikom sušenja i povećanja udjela suhe tvari, te se koncentracija proteina nakon sušenja statistički razlikuje od prve 3 faze proizvodnje (P<0,05). Nakon faze sušenja postojala je statistički značajna razlika u koncentraciji proteina između mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* (P<0,05). Koncentracija proteina u mišiću *semimembranosus* iznosila je 3,94 mg mL⁻¹, dok je u *biceps femorisu* bila niža i iznosila 2,67 mg mL⁻¹. *Semimebranosus* je vanjski mišić koji je u većoj mjeri izložen isušivanju, dok je *biceps femoris* unutarnji mišić, obložen kožom i masnim tkivom, te je *semimembranosus* nakon sušenja izgubio veću količinu vode, udio suhe tvari se povećao pa je samim time i određena veća koncentracija proteina.



*Utjecaj tipa mišića (BF-*biceps femoris*; SM-*semimembranosus*) (srednja vrijednost 10 uzoraka).

Slika 13. Grafički prikaz rezultata određivanja koncentracije karbonila u uzorcima dimljenog pršuta kroz faze proizvodnje

Iz grafičkog prikaza rezultata određivanja koncentracije karbonila (slika 13.) vidljivo je kako je koncentracija karbonila u prve 4 faze proizvodnje dalmatinskog pršuta kretala u istim vrijednostima te nije postojala statistički značajna razlika između pojedinih faza ($P > 0,05$). Također, nije postojala statistički značajna razlika između mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* u niti jednoj 4 faze proizvodnje ($P > 0,05$). Dakle, oksidacija proteina odvija se jednakim intenzitetom kroz faze soljenja, dimljenja i sušenja u oba mišića.

Koncentracija karbonila u *biceps femorisu* iznosila je između 10,22 i 11,56 nmol mg⁻¹ uzorka, te između 9,88 i 10,78 nmol mg⁻¹ uzorka u *semimembranosusu*.

U istraživanju koje je provela Koutina i sur. (2012) pratila se koncentracija karbonila tijekom proizvodnje Parma pršuta, od sirovog buta do konačnog proizvoda, u mišićima *biceps femoris* i *semimembranosus*. Koncentracija karbonila određena je DNPH metodom kao i u ovome radu, iako postoje manje razlike u pojedinim koracima provođenja metode. Rezultati su pokazali da se koncentracija proteinskih karbonila povećavala, iako ne značajno, za oba mišića. Koncentracija karbonila povećala se s otprilike 1 na 3 nmol mg⁻¹ tijekom proizvodnje. U ovome radu, koncentracija karbonila je bila viša kroz sve 4 faze proizvodnje, što znači da je oksidacija proteina u dalmatinskom pršutu bila izraženija.

Također, u istraživanju Wanga i sur. (2011) navedeno je kako su koncentracije karbonila u sirovom pršutu iznosile 0,33 nmol mg⁻¹ u *semimembranosusu* i 0,34 nmol mg⁻¹ u *biceps femorisu*. Wang i sur. također navode kako se nakon soljenja koncentracija karbonila u *semimembranosusu* povećala na 1,57 nmol mg⁻¹, te na 0,94 nmol mg⁻¹ u *biceps femorisu*. Ove vrijednosti također su niže od vrijednosti dobivenih ovim istraživanjem.

Ventanas i sur. (2007) određivali su koncentraciju karbonila u Iberijskom pršutu u mišiću *biceps femoris*. Istraživanje je provedeno na konačnom proizvodu, odnosno na Iberijskom pršutu nakon faze zrenja od 30 mjeseci, a vrijednosti koncentracije karbonila kretale su se između 6,84 i 8,87 nmol mg⁻¹, ovisno o tipu prehrane svinja od kojih je pršut proizveden.

Prooksidativni učinak soli koje navode Soladoye i sur. (2015) i Estévez (2011) u svojim radovima prilikom ove 4 faze proizvodnje pršuta nije evidentiran, s obzirom na to da je koncentracija karbonila stalna tijekom faza. Postoji mogućnost da niske temperature prilikom soljenja dalmatinskog pršuta (2-6°C) pridonose sprječavanju prooksidativnog učinka soli na oksidaciju proteina, kako navodi Wang i sur. (2011).

4.3. TEKSTURA

Na kvalitetu proizvoda od mesa snažno utječu njihova teksturna svojstva, određena tehnološkim i sirovinskim značajkama. U pršutu, tekstura je karakteristika koja se izravno odnosi na strukturu mišića, posebno je vezana uz razgradnju miofibrilarnih proteina i kolagena, kao i na sadržaj intramuskularne masti i brzinu sušenja. Karakteristike svježeg šunke (konformacija, debljina potkožnog masnog tkiva i sadržaj masti) iz različitih genetičkih izvora također su odgovorne za razlike pronađene u teksturi pršuta. Drugi aspekti, kao što je enzimski aktivnost ili pH mesa također doprinose svojstvima teksture (Rezende Costa i sur., 2008).

Na teksturu pršuta najviše utječu postupci soljenja, sušenja i zrenja. Sadržaj NaCl-a i vode te pH vrijednost mesa su fizikalno-kemijska svojstva koja utječu na samu teksturu pršuta. Manji sadržaj NaCl-a pospješuje proteolizu i doprinosi mekšoj teksturi zrelog proizvoda. Veća pH-vrijednost i veći maseni udio vode potiču enzimsku aktivnost i intenziviraju proteolizu čime se povećava najprije mekoća, a zatim pastoznost i ljepljivost pršuta (Kovačević, 2017).

Proteoliza, jedna od glavnih biokemijskih reakcija koja se odvija tijekom proizvodnje pršuta, ima najveći utjecaj na promjene teksture. Prekomjerna proteoliza uzrokuje nedostatke i greške teksture. Na intenzitet proteolize tijekom proizvodnje pršuta utječu brojni čimbenici kao što su sadržaj vode, temperatura, sadržaj soli, anatomske položaj i pH svježeg pršuta (Pérez-Santaescolástica i sur., 2018).

Tekstura uzoraka dalmatinskog pršuta određena je pomoću teksturometra na mišićima *biceps femoris* i *semimembranosus* iz 4 faze proizvodnje. Parametri teksture koji su određeni su tvrdoća, adhezivna sila, kohezivnost, adhezivnost, gumenost, odgođena elastičnost, žvkljivost, otpornost, lom i vlaknastost. Rezultati određivanja parametara teksture su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati određivanja parametra teksture pršuta u uzorcima pršuta kroz 4 faze proizvodnje u dva različita mišića

| | Sirovi butovi | Nakon soljenja | Nakon dimljenja | Nakon sušenja |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Tvrdoća (N) | | | | |
| BF | 116,81±2,12 ^{b,2} | 129,96±7,43 ^b | 133,24±6,76 ^{b,2} | 32,83±2,39 ^a |
| SM | 101,55±3,05 ^{b,1} | 119,68±6,96 ^b | 102,92±8,27 ^{b,1} | 28,37±2,30 ^a |
| Adhezivna sila (N) | | | | |
| BF | -0,27±0,03 ^b | -0,70±0,08 ^b | -2,61±0,32 ^{a,1} | -0,43±0,02 ^b |
| SM | -0,33±0,02 ^b | -0,60±0,06 ^a | -0,66±0,07 ^{a,2} | -0,42±0,03 ^b |
| Kohezivnost | | | | |
| BF | 0,44±0,01 ^a | 0,46±0,02 ^{ab,1} | 0,41±0,02 ^{a,1} | 0,50±0,01 ^{b,1} |
| SM | 0,46±0,01 ^a | 0,53±0,02 ^{ab,2} | 0,50±0,02 ^{ab,2} | 0,53±0,01 ^{b,2} |
| Adhezivnost (Nmm) | | | | |
| BF | 0,36±0,04 ^{a,1} | 1,41±0,18 ^{b,2} | 2,54±0,28 ^{c,2} | 0,63±0,03 ^{a,2} |
| SM | 0,48±0,04 ^{ab,2} | 0,79±0,10 ^{b,1} | 0,75±0,14 ^{b,1} | 0,42±0,03 ^{a,1} |
| Gumenost (N) | | | | |
| BF | 54,50±1,72 ^b | 69,38±3,23 ^{c,2} | 68,60±2,76 ^c | 19,28±1,33 ^a |
| SM | 50,99±1,83 ^b | 48,39±3,43 ^{b,1} | 59,02±4,71 ^b | 17,00±1,34 ^a |
| Odgodena elastičnost (mm) | | | | |
| BF | -2,30±0,06 ^{c,1} | -2,87±0,06 ^b | -3,32±0,06 ^{a,1} | 2,56±0,03 ^{d,1} |
| SM | -2,05±0,06 ^{b,2} | -2,60±0,12 ^a | -2,86±0,11 ^{a,2} | 2,88±0,06 ^{c,2} |
| Žvkljivost (N mm) | | | | |
| BF | 87,77±1,92 ^{b,2} | 106,75±5,93 ^c | 104,13±3,11 ^{c,2} | 57,00±4,23 ^a |
| SM | 76,76±2,97 ^{b,1} | 92,80±6,07 ^c | 88,63±4,92 ^{bc,1} | 48,70±1,98 ^a |
| Otpornost | | | | |
| BF | 0,40±0,02 ^{a,1} | 0,42±0,02 ^a | 0,36±0,03 ^{a,1} | 0,55±0,02 ^{b,2} |
| SM | 0,47±0,02 ² | 0,47±0,02 | 0,50±0,03 ² | 0,47±0,02 ¹ |
| Lom (N) | | | | |
| BF | 113,27±2,70 ^{b,2} | 127,42±7,11 ^{b,2} | 124,66±8,21 ^{b,2} | 39,13±2,66 ^a |
| SM | 100,21±3,50 ^{b,1} | 102,89±8,33 ^{b,1} | 84,25±6,43 ^{b,1} | 31,72±3,09 ^a |
| Vlknastost (mm) | | | | |
| BF | 2,08±0,13 ^a | 5,13±0,20 ^c | 5,13±0,42 ^{c,2} | 3,27±0,19 ^b |
| SM | 2,63±0,34 ^a | 4,31±0,48 ^b | 3,11±0,18 ^{ab,1} | 2,82±0,36 ^a |

* Utjecaj tipa mišića (BF- *biceps femoris*; SM- *semimembranosus*) (srednja vrijednost 10 uzoraka). Različita slova (a-d) označavaju statistički značajnu razliku (P<0,05) (razlika u fazama) dok različiti brojevi (1,2) označavaju statistički značajnu razliku (P<0,05) (razlika između mišića).

Tvrdoća sirovog, soljenog i dimljenog mišića *biceps femoris* kretala se između $116,81 \pm 2,12$ i $133,24 \pm 6,76$ N te nije postojala statistički značajna razlika između ovih faza ($P > 0,05$). Nakon faze sušenja došlo je smanjenja tvrdoće na $32,83 \pm 2,39$ N te je postojala statistički značajna razlika ($P < 0,05$) od prethodnih faza. Sličan tijek imala je i tvrdoća u mišiću *semimembranosus* te je nakon faze sušenja postojala statistički značajna razlika u tvrdoći ($P < 0,05$). Statistički značajna razlika u tvrdoći između 2 mišića uočena je u sirovim i dimljenim uzorcima pršuta ($P < 0,05$). Harkouss i sur. (2015) pratili su promjene u parametrima teksture tijekom faza proizvodnje Bayonne pršuta u mišićima *semimembranosus* i *biceps femoris*. Tvrdoća sirovog bicepsa iznosila je 185 N, a nakon faze sušenja smanjila se na 89 N. Također, tvrdoća *semimembranosusa* smanjena je sa 122 na 97 N do kraja sušenja. Ovi rezultati su u korelaciji s onima dobivenim u ovome radu jer je došlo do smanjenja tvrdoće u oba mišića, iako su vrijednosti tvrdoće dalmatinskog pršuta nakon sušenja niže, ali to može biti posljedica nešto drugačije tehnologije proizvodnje i trajanja faze sušenja. Tvrdoća zrelog Bayonne pršuta iznosila je 198 ± 14 N za *semimembranosus* i 183 ± 3 N za *biceps femoris*. Također, Andronikov i sur. (2013) navode kako tvrdoća Kraškog pršuta iznosi od 62 do 82 N za *biceps femoris* i od 163 do 205 N za *semimembranosus*. Pugliese i sur. (2015) uspoređivali su razliku u tvrdoći Kraškog pršuta između mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* tijekom različitog vremena zrenja (12 i 16 mjeseci). Dobivene su vrijednosti 41,93 i 52,51 N za *biceps femoris* i 70,23 i 107,22 N za *semimembranosus* nakon 12, odnosno 16 mjeseci proizvodnje. Na temelju rezultata dobivenih u navedenim radovima, moguće je da će se značajna razlika između mišića u tvrdoći pojaviti tek u kasnijim fazama proizvodnje dalmatinskog pršuta, odnosno tijekom zrenja.

Laureati i sur. (2014) navode kako gubitak vode uzrokuje povećanje tvrdoće pršuta, dok s druge strane, proteoliza uzrokuje smanjenje tvrdoće i omekšavanje proizvoda. S obzirom na to da je indeks proteolize u fazi sušenja vrlo visok, za pretpostaviti je kako je upravo zbog proteolize došlo do snižavanja tvrdoće u uzorcima dalmatinskog pršuta. Ruiz-Ramírez i sur. (2006) pronašli su korelaciju između tvrdoće i indeksa proteolize tijekom proizvodnje pršuta. Tvrdoća pršuta smanjuje se s povećanjem indeksa proteolize, a ova korelacija vidljiva je i nakon sušenja dalmatinskog pršuta, gdje se tvrdoća smanjila, a indeks proteolize se znatno povećao.

Adhezivna sila se u sirovim, soljenim i sušenim uzorcima mišićima *biceps femorisa* kretala se između -0,70 i -0,27 N, dok je nakon faze dimljenja bila statistički značajno niža ($P < 0,05$) i iznosila -2,61 N. U mišiću *semimembranosus* nakon soljenja i dimljenja adhezivna sila bila je

niža, nego u sirovim i sušenim uzorcima. U fazi dimljenja postojala je statistički značajna razlika u adhezivnoj sili između 2 mišića ($P < 0,05$), dok u ostalim fazama ta razlika nije uočena ($P > 0,05$).

Kohezivnost *biceps femorisa* u prve 3 faze iznosila je između 0,41 i 0,46, dok je u posljednjoj fazi nešto viša i iznosila 0,50. U mišiću *semimembranosus* kohezivnost je također narasla s 0,46 u prvoj fazi do 0,53 u posljednjoj fazi. Statistički značajna razlika ($P < 0,05$) u kohezivnosti između dvaju mišića postojala je u soljenim i dimljenim uzorcima. Slične vrijednosti za kohezivnost dobivene su u istraživanju Harkoussa i sur. (2015) provedenom na Bayonne pršutu. Kohezivnost sirovog *biceps femorisa* iznosila je 0,41; nakon soljenja 0,47; dok je u zrelom pršutu iznosila 0,49. Za kohezivnost *semimembranosusa* dobivene su nešto više vrijednosti za sirove (0,48) i soljene (0,48) uzorke, dok je kohezivnost nakon zrenja bila ista kao i u *biceps femorisu*. Nešto više vrijednosti kohezivnosti *semimembranosusa* (0,63), za razliku od *biceps femorisa* (0,57) dobivene su nakon 12 mjeseci proizvodnje Kraškog pršuta (Pugliese i sur., 2015), kako je dobiveno i u ovome radu u prve 4 faze proizvodnje dalmatinskog pršuta.

Adhezivnost *biceps femorisa* u prve 3 faze porasla je s 0,36 na 2,54 N mm, dok je nakon sušenja došlo do smanjenja na 0,63 N mm. U mišiću *semimembranosus* u sirovim uzorcima adhezivnost je iznosila 0,48 N mm, tijekom soljenja i dimljenja porasla je na između 0,75 i 0,79 N mm, a nakon sušenja ponovno se smanjila na 0,42 N mm. U sve 4 faze proizvodnje postojala je statistički značajna razlika ($P < 0,05$) između mišića u adhezivnosti-u prvoj fazi vrijednosti su bile više za *semimembranosus*, a u ostale 3 faze za *biceps femoris*.

Pérez-Santaescolástica i sur. (2018) promatrali su kako indeks proteolize utječe na adhezivnost Serrano pršuta te su došli do zaključka kako se s povećanjem indeksa proteolize povećava i adhezivnost. Tijekom prve 3 faze proizvodnje dalmatinskog pršuta došlo je do povećanja adhezivnosti, ali je nakon faze sušenja došlo do smanjenja adhezivnosti iako se stupanj proteolize i dalje povećavao. Harkouss i sur. (2015) navode kako se adhezivnost oba mišića povećavala tijekom proizvodnje Bayonne pršuta te da su više vrijednosti izmjerene za *semimembranosus*, što je osobito došlo do izražaja tijekom posljednjih faza proizvodnje. Tijekom prve 4 faze proizvodnje dalmatinskog pršuta više vrijednosti adhezivnosti *semimembranosusa* izmjerene su samo u sirovim uzorcima, dok su u sljedećim fazama vrijednosti bile više za *biceps femoris*. Također, adhezivnost se povećavala samo u prve 3 faze nakon čega je došlo do smanjenja.

Gumenost oba mišića smanjila se nakon faze sušenja, te je iznosila 19,28 N za *biceps femoris* i 17,00 N za *semimembranosus*. Tijekom prve 3 faze proizvodnje vrijednosti za *biceps femoris* kretale su se između 54,50 i 69,38 N te između 48,39 i 59,02 N za *semimembranosus*. Statistički značajna razlika u gumenosti između mišića postojala je jedino u soljenim uzorcima ($P < 0,05$).

Odgođena elastičnost u oba mišića bila je najveća nakon sušenja pršuta i iznosila 2,56 mm na *biceps femorisu* i 2,88 mm na mišiću *semimembranosus*. U prve 3 faze proizvodnje vrijednosti su iznosile između -3,32 i -2,05 mm. Odgođena elastičnost značajno se statistički značajno razlikovala između mišića u sirovim, dimljenim i sušenim uzorcima ($P < 0,05$). Ruiz-Ramírez i sur. (2006) određivali su parametre teksture u pršutima s različitim vrijednostima indeksa proteolize. Oni navode kako se kohezivnost i odgođena elastičnost smanjuju kako se smanjuje indeks proteolize. Navedeni rezultati su u korelaciji s vrijednostima kohezivnosti i odgođene elastičnosti u ovome radu, jer su vrijednosti nakon faze sušenja značajno porasle, a u toj fazi izmjeren je i najveći indeks proteolize. S druge strane, Harkouss i sur. (2015) navode da se odgođena elastičnost smanjivala kako se indeks proteolize povećavao tijekom proizvodnje Bayonne pršuta.

Najveće vrijednosti za žvakljivost izmjerene su u fazama soljenja i dimljenja u oba mišića. Nešto niže vrijednosti izmjerene su u sirovim uzorcima, dok su najniže vrijednosti (48,70 do 57 N mm) izmjerene nakon sušenja pršuta. Statistički značajna razlika između mišića postojala je u sirovim i dimljenim uzorcima ($P < 0,05$).

Otpornost *biceps femorisa* povećala se nakon faze sušenja na 0,55, dok je u prve 3 faze proizvodnje iznosila između 0,36 i 0,42. Otpornost mišića *semimembranosus* nije se mijenjala statistički značajno tijekom prve 4 faze proizvodnje pršuta ($P > 0,05$). Statistički značajna razlika ($P < 0,05$) između otpornosti mišića postojala je u sirovim, dimljenim i sušenim uzorcima.

Parametar teksture-lom za *biceps femoris* kretao se između 113,27 i 127,42 N u prve 3 faze, dok je u posljednjoj fazi bio značajno niži i iznosio 39,13 N. Vrijednosti loma za *semimembranosus* kretale su se slično kao i u *biceps femorisu*-tijekom prve 3 faze lom je iznosio između 84,25 i 102,89 N te je u fazi sušenja smanjen na 31,72 N. Lom *semimembranosusa* bio je niži u prve 3 faze proizvodnje, dok nakon faze sušenja nije bilo statistički značajne razlike između mišića ($P > 0,05$).

Vlaknastost mišića bila je viša u soljenim i dimljenim uzorcima nego u sirovim i sušenim. Statistički značajna razlika ($P < 0,05$) u vlaknastosti između mišića postojala je nakon dimljenja i bila je viša za *biceps femoris*.

Najveće promjene u parametrima teksture uočene su nakon posljednje faze proizvodnje dalmatinskog pršuta koje su analizirane, točnije nakon sušenja pršuta. Tvrdoća uzoraka u ovoj fazi značajno se smanjila u oba mišića. Također, adhezivna sila je porasla nakon sušenja, nakon što se u fazama soljenja i dimljenja znatno snizila. Kohezivnost oba mišića nakon sušenja se povećala, dok se adhezivnost smanjila nakon što je znatno porasla u fazama soljenja i dimljenja. Gumenost oba mišića nakon sušenja značajno se smanjila, dok je odgođena elastičnost porasla. Također, nakon sušenja došlo je do snižavanja vrijednosti žvkljivosti, loma i vlaknastosti. Ove značajne promjene nakon sušenja posljedica su gubitka vode iz mesa.

Razlike između mišića u u fazi sušenja uočene su samo u nekoliko parametara teksture, te se može zaključiti kako nakon faze sušenja još uvijek ne postoji velika razlika u mišićima što se tiče ispitivanih parametara teksture, iako je došlo do većeg isušivanja mišića *semimembranosus*. Veće razlike u ispitivanim parametrima teksture između mišića eventualno će nastupiti nakon faze zrenja od 12 mjeseci i duže.

Također, uočena je povezanost između indeksa proteolize i određenih parametara teksture: tvrdoće, kohezivnosti, odgođene elastičnosti i adhezivnosti. Nakon faze sušenja, tvrdoća i adhezivnost se značajno smanjuju, dok se kohezivnost i odgođena elastičnost povećavaju, u odnosu na prethodne faze ($P < 0,05$). Ova povezanost osobito je vidljiva nakon faze sušenja, jer su u toj fazi izmjerene znatno više vrijednosti indeksa proteolize nego u prve 3 faze proizvodnje.

5. ZAKLJUČCI

1. Tijekom faza soljenja, dimljenja i sušenja došlo je do povećanja indeksa proteolize ($P < 0,05$). U sirovim butovima indeks proteolize iznosio je 1,53 i 1,44 mg g^{-1} , nakon soljenja 5,27 i 5,07 mg g^{-1} , nakon dimljenja 6,97 i 6,94 mg g^{-1} te nakon sušenja 13,41 i 13,50 mg g^{-1} u mišićima *biceps femoris* i *semimebranosus*.
2. Koncentracija proteina u sirovim, soljenim i dimljenim uzorcima *biceps femorisa* iznosila je 0,20-0,36 mg mL^{-1} i 0,23-0,41 mg mL^{-1} u *semimembranosusu*. Nakon faze sušenja, došlo je do porasta koncentracije proteina na $2,67 \pm 0,20 \text{ mg mL}^{-1}$ za *biceps femoris* i $3,94 \pm 0,26 \text{ mg mL}^{-1}$ za *semimembranosus*. Veća koncentracija proteina u mišiću *semimembranosus* rezultat je nižeg udjela vode od *biceps femorisa*.
3. Koncentracija karbonila, koja je pokazatelj stupnja oksidacije proteina, tijekom prve 4 faze proizvodnje dimljenog pršuta nije se statistički značajno mijenjala ($P > 0,05$). Vrijednosti u *biceps femorisu* iznosile su između 10,22 i 11,56 nmol mg^{-1} , a u *semimembranosusu* između 9,88 i 10,78 nmol mg^{-1} .
4. Promjene na parametrima teksture izraženije su nakon procesa sušenja u oba mišića u odnosu na prethodne faze, odnosno gubitak vode je utjecao na teksturu pršuta. Statistički značajna razlika između mišića ($P < 0,05$) postojala je u parametrima kohezivnosti, adhezivnosti i odgođenoj elastičnosti.
5. Tvrdoća u oba mišića smanjila se nakon faze sušenja, zbog intenzivne proteolize. Također, nakon faze sušenja došlo je do statistički značajnog ($P < 0,05$) povećanja kohezivnosti i odgođene elastičnosti, te smanjenja adhezivnosti, što se također povezuje s razgradnjom proteina, odnosno proteolizom.

6. LITERATURA

Andronikov, D., Gašperlin, L., Polak, T., Žlender, B. (2013) Texture and Quality Parameters of Slovenian Dry-Cured Ham Kraški pršut According to Mass and Salt Levels. *Food Technol. Biotechnol.* **51**, 112–122.

Anonymous (2014) slika Dalmatinskog pršuta, <http://www.prsut-vostane.hr/hr/dalmatinski_prsut.html>. Pristupljeno 29. svibnja 2019.

Armenteros, M., Heinonen, M., Ollilainen, V., Toldrá, F., Estévez, M. (2009) Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS). *Meat Sci.* **83**, 104-112.

Baer, A., Ryba, I., Meyer, J., Bütikofer, U. (1996) Microplate Assay of Free Amino Acids in Swiss Cheeses. *Food Sci. Technol.* **29**, 58-62.

Bermúdez, R., Franco, D., Carballo, J., Sentandreu, M.A., Lorenzo, J.M. (2014) Influence of muscle type on the evolution of free amino acids and sarcoplasmic and myofibrillar proteins through the manufacturing process of Celta dry-cured ham. *Food Res. Int.* **56**, 226-235.

del Olmo, A., Calzada, J., Gaya, P., Nuñez, M. (2015) Proteolysis and Flavor Characteristics of Serrano Ham Processed under Different Ripening Temperature Conditions. *J. Food Sci.* **80**, 404-412.

Doi, E., Shibata, D., Matoba, T. (1981) Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* **118**, 173–184.

Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., Heinonen, M. (2008) Oxidation of Skeletal Muscle Myofibrillar Proteins in Oil-in-Water Emulsions: Interaction with Lipids and Effect of Selected Phenolic Compounds. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 10933–10940.

Estévez, M. (2011) Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci.* **89**, 259-279.

- Gallego, M., Mora, L., Toldrá, F. (2018) Differences in peptide oxidation between muscles in 12 months Spanish dry-cured ham. *Food Res. Int.* **109**, 343-349.
- Harkouss, R., Astruc, T., Lebert, A., Gatellier, P., Loison, O., Safa, H., Portanguen, S., Parafita, E., Mirade, P.S. (2015) Quantitative study of the relationships among proteolysis, lipid oxidation, structure and texture throughout the dry-cured ham process. *Food Chem.* **166**, 522-530.
- Harkouss, R., Mirade, P.S., Gatellier, P. (2012) Development of a rapid, specific and efficient procedure for the determination of proteolytic activity in dry-cured ham: Definition of a new proteolysis index. *Meat Sci.* **92**, 84-88.
- Hu, M., Jacobsen, C. (2016) *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. Elsevier Inc., Amsterdam.
- Jiménez-Colmenero, F., Ventanas, J., Toldrá, F. (2010) Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Sci.* **84**, 585–593.
- Karolyi, D. (2009) Najčešći problemi u proizvodnji pršuta. *Meso* **11**, 134-143.
- Kos, I., Mandir, A., Toić, U. (2015) Dalmatinski pršut-Oznaka zemljopisnog podrijetla, Specifikacija, Udruga dalmatinski pršut, Trilj.
- Kovačević, D. (2017) *Kemija i tehnologija šunki i pršuta*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Koutina, G., Jongberg, S., Skibsted, L.H. (2012) Protein and Lipid Oxidation in Parma Ham during Production. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 9737–9745.
- Krvavica, M. (2006) Čimbenici kakvoće pršuta. *Meso* **6**, 279-290.
- Laureati, M., Buratti, S., Giovanelli, G., Corazzin, M., Lo Fiego, D.P., Pagliarini, E. (2014) Characterization and differentiation of Italian Parma, San Daniele and Toscano dry-cured hams: A multi-disciplinary approach. *Meat Sci.* **96**, 288–294.
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estévez, M. (2011) Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 83-95.
- Marušić Radovčić, N., Vidaček, S., Janči, T., Medić, H. (2016) Characterization of volatile compounds, physico-chemical and sensory characteristics of smoked dry-cured ham. *J. Food Sci. Tech.* **53**, 4093–4105.

- Mora, L., Escudero, E., Toldrá, F. (2016) Characterization of the peptide profile in Spanish Teruel, Italian Parma and Belgian dry-cured hams and its potential bioactivity. *Food Res. Int.* **89**, 638-646.
- Pérez-Santaescolástica, C., Carballo, J., Fulladosa, E., Garcia-Perez, J.V., Benedito, J., Lorenzo, J.M. (2018) Effect of proteolysis index level on instrumental adhesiveness, free amino acids content and volatile compounds profile of dry-cured ham. *Food Res. Int.* **107**, 559-566.
- Petrova, I., Aasen, I.M., Rustad, T., Eikevik, T.M. (2015) Manufacture of dry-cured ham: a review. Part 1. Biochemical changes during the technological process. *Eur. Food Res. Technol.* **241**, 587–599.
- Pravilnik o mesnim proizvodima (2018) *Narodne novine* **62**, Zagreb.
- Pugliese, C., Sirtori, F., Škrlep, M., Piasentier, E., Calamai, L., Franci, O., Čandek-Potokar, M. (2015) The effect of ripening time on the chemical, textural, volatile and sensorial traits of *Biceps femoris* and *Semimembranosus* muscles of the Slovenian dry-cured ham Kraški pršut. *Meat Sci.* **100**, 58-68.
- Rezende Costa, M., Filho, W.B., Silveira, E.T.F., Felício, P.E. (2008) Colour and texture profiles of boneless restructured dry-cured hams compared to traditional hams. *Sci. Agr.* **65**, 169-173.
- Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J., Serra, X., Gou, P. (2006) Effect of pH₂₄, NaCl content and proteolysis index on the relationship between water content and texture parameters in *biceps femoris* and *semimembranosus* muscles in dry-cured ham. *Meat Sci.* **72**, 185-194.
- Soglia, F., Petracci, M., Ertbjerg, P. (2016) Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. *Food Chem.* **197**, 670-675.
- Soladoye, O.P., Juárez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P., Estévez, M. (2015) Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **14**, 106-122.
- Théron, L., Sayd, T., Pinguet, J., Chambon, C., Robert, N., Santé-Lhoutellier, V. (2011) Proteomic analysis of *semimembranosus* and *biceps femoris* muscles from Bayonne dry-cured ham. *Meat Sci.* **88**, 82-90.

Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., Estévez, M. (2007) Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Sci.* **77**, 246-256.

Wang, Z., Xu, Y., Zhang, J., Li, X., Lin, Z., Ma, C. (2011) Proteolysis, protein oxidation and protease activity in dry-cured Xuanwei ham during the salting stages. *Int. J. Food Sci. Tech.* **46**, 1370-1377.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Petra Badenić