

Utjecaj stupnja oksidacije masti i proteina na boju i teksturu dimljenog pršuta

Mikulić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:344234>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018

Ana Mikulić
903/PI

**UTJECAJ STUPNJA OKSIDACIJE
MASTI I PROTEINA NA BOJU I
TEKSTURU 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. Helge Medić, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Nives Marušić Radovčić.

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).

Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Helgi Medić na podršci, ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe izradim Diplomski rad. Posebno hvala doc. dr. sc. Nives Marušić Radovčić na bezrezervnom trudu, uloženom vremenu i mnogobrojnim savjetima, koji su pomogli u izradi ovog Diplomskog rada.

Najviše hvala mojim roditeljima, Zoranu i Gordani, sestri Katarini, baki Vidi i zaručniku Zlatku, kojima i posvećujem ovaj Diplomski rad. Hvala što ste mi omogućili studiranje i što ste sve ove godine bili uz mene, podržavali me, imali razumijevanja, poticali me i vjerovali u mene i moj uspjeh i kad ni sama nisam. Hvala Vam na beskonačnom strpljenju, razumijevanju i ljubavi...

I na kraju želim se zahvaliti svim prijateljima i kolegama koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisustvom i pomogli da to vrijeme smatram najljepšim dijelom svoga života.

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

UTJECAJ STUPNJA OKSIDACIJE MASTI I PROTEINA NA BOJU I TEKSTURU DIMLJENOG PRŠUTA

Ana Mikulić 903/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj oksidacije masti i proteina na boju i teksturu mišića *Biceps femoris* (BF) i *Semimembranosus* (SM) dimljenog *Dalmatinskog pršuta*. Oksidacija masti i proteina određena je spektrofotometrijskim metodama (TBARS test i DNPH metoda). Analizirani su i parametri boje te tekstura. Uzorci BF-a pokazali su manji stupanj oksidacije masti od SM, dok BF ima veće vrijednosti karbonila od SM. SM je vanjski mišić i više je izložen djelovanju kisiku od unutarnjeg mišića BF. Kao rezultat toga SM je pokazao veće TBARS vrijednosti od BF. Veće vrijednosti karbonila u BF mogu se objasniti većim udjelom vode u ovom unutarnjem mišiću i time jačom proteolitičkom aktivnošću ili većim stupnjem oksidacije proteina. BF je imao više L *, a * i b * vrijednosti od SM. U BF-u su pronađene veće vrijednosti adhezivne sile, kohezivnosti i otpornosti te niže vrijednosti tvrdoće, adhezivnosti, gumenosti, žvakljivosti i loma u odnosu na SM.

Ključne riječi: dimljeni pršut, tekstura, boja, TBARS, karbonili

Rad sadrži: 52 stranica, 15 slika, 6 tablica, 78 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *prof. dr. sc. Helga Medić*

Pomoć pri izradi: *doc. dr. sc. Nives Marušić Radovčić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. *Nives Marušić Radovčić*
2. Prof. dr. sc. *Helga Medić*
3. Doc. dr. sc. *Sven Karlović*
4. Doc. dr. sc. *Klara Kraljić*(zamjena)

Datum obrane: 26. 09. 2018.

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

THE EFFECT OF FAT AND PROTEIN OXIDATION ON THE COLOUR AND TEXTURE OF SMOKED DRY-CURED HAM

Ana Mikulić 903/PI

Abstract: The aim of this work was to determine the effect of fat and protein oxidation on the colour and texture of *Biceps femoris* (BF) and *Semimembranosus* (SM) muscles of smoked dry-cured ham *Dalmatinski pršut*. Fat and protein oxidation was determined by spectrophotometric methods (TBARS test and DNPH method). Colour and texture profile analysis were also done. Samples of BF showed slightly lower fat oxidation than SM while BF had higher values of carbonyls than SM. SM is an external muscle and is more exposed to oxygen than BF. As a result of that SM showed higher TBARS values than BF. Higher values of carbonyls in BF can be explained by the higher water content in this muscle and thus by the stronger proteolytic activity or greater degree of protein oxidation. BF had higher L*, a* and b* values than SM. Higher values of adhesive force, cohesiveness and stringiness and lower values of hardness, adhesiveness, gumminess, chewiness and fracture were found for BF than for SM.

Keywords: smoked dry-cured ham, texture, color, TBARS, carbonyls

Thesis contains: 52 pages, 15 figures, 6 tables, 78 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. Helga Medić, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD. Nives Marušić Radovčić, Assistant professor*

Reviewers:

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

Thesis defended: September 26 2018

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. TRAJNI SUHOMESNATI PROIZVODI	3
2.2. POJAM I ZNAČENJE PRŠUTA	3
2.3. DALMATINSKI PRŠUT	4
2.3.1. Opća definicija proizvoda	4
2.3.2. Opis sirovine	5
2.3.3. Opis gotovog proizvoda	7
2.3.4. Tehnološki postupak proizvodnje	7
2.3.5. Pakiranje, način stavljanja na tržište i pravila označavanja dalmatinskog pršuta	10
2.4. OKSIDACIJA MASTI	11
2.4.1. Test tiobabiturne kiseline –TBA test	13
2.5. OKSIDACIJA PROTEINA	14
2.5.1. Proteinski karbonili	16
2.5.2. Proteoliza	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. MATERIJALI	20
3.1.1. Priprema uzoraka za analizu	20
3.2. METODE RADA	21
3.2.1. Određivanje teksture	21
3.2.2. Određivanje boje	21
3.2.3. Određivanje udjela vode	22
3.2.4. Određivanje stupnja oksidacije masti (TBA test)	23
3.2.4.1. <i>Određivanje stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Lemonu (1975)</i>	23
3.2.4.2. <i>Određivanje stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Bruna i sur. (2001)</i>	24
3.2.5. Određivanje ukupnih karbonila	25
3.2.6. Statistička obrada podataka	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. BOJA	27
4.2. TEKSTURA	30
4.3. TBA TEST	36
4.4. KARBONILI	40
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Pršut je trajni suhomesnati proizvod dobiven suhim soljenjem, ograničenom dehidracijom i postupnim kemijsko-enzimatskim transformacijama od svježeg svinjskog buta ka gotovom proizvodu koji se odlikuje izvrsnim senzornim osobinama, ugodnim mirisom i okusom te visokim sadržajem proteina.

Tradicija proizvodnje pršuta u priobalnom području Republike Hrvatske, u Istri i Dalmaciji, stara je vjerojatno isto koliko i u drugim mediteranskim državama, a tehnološki postupak proizvodnje najvećim se dijelom zasniva na iskustvu i tradiciji, koju su proizvođači prenosili iz generacije u generaciju. Posljednjih nekoliko godina, ovaj je proces znatno unaprijeđen čemu su pridonijela i znanstvena dostignuća koja su dala objašnjenja za veliki broj biokemijskih procesa u mesu, značajnih za stvaranje karakterističnog okusa i mirisa pršuta te poželjne konzistencije.

Dalmatinski pršut je trajan 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, hrasta ili graba te podvrgnut procesu sušenja i zrenja u trajanju od najmanje godinu dana. Gotov proizvod se odlikuje osebujnom aromom, blagim slanim okusom, jednoličnom crvenom bojom mesa i poželjnom konzistencijom (Kos i sur., 2015).

Tijekom proizvodnje pršuta u svinjskom se butu događaju kompleksne promjene proteina i masti te dolazi do gubitka vode i porasta koncentracije soli što značajno utječe na kakvoću gotovog proizvoda. Proteini i masti podliježu enzimskoj hidrolizi i oksidaciji koje, zajedno s dehidratacijom, pretvaraju svježi svinjski but u konzervirani proizvod visoke gastronomske i nutritivne vrijednosti.

Proteoliza je značajan niz biokemijskih reakcija u tkivima pršuta, koje sudjeluju u stvaranju karakteristične ukupne arome, okusa i mirisa tijekom procesa prerade te izravno sudjeluje u formiranju konzistencije pršuta temeljem razgradnje miofibrilarnih proteina koji grade mišićnu strukturu. Stvaranje peptida i slobodnih aminokiselina utječe na okus pršuta, a slobodne aminokiseline sudjeluju kao supstrat u budućim reakcijama, koje doprinose formiranju konačne arome i okusa pršuta, odnosno djeluju kao prekursori arome i okusa.

Najvažnije proteolitičke promjene, koje sudjeluju u stvaranju posebnog okusa i arome pršuta visoke kakvoće, događaju se jedino u produženom procesu zrenja i kod pršuta sa niskim udjelom soli (Toldrá i Flores, 1998).

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj oksidacije proteina i masti na boju i teksturu mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* dimljenog Dalmatinskog pršuta. Oksidacija proteina i masti određene su spektrofotometrijskim metodama: stupanj oksidacije masti metodom s reaktivnim spojevima tiobarbiturne kiseline (TBARS) dok stupanj oksidacije proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH). Također, određena je i boja pršuta (L^* , a^* i b^* vrijednosti) te tekstura pomoću TPA (Texture Profile Analysis) testa.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRAJNI SUHOMESNATI PROIZVODI

Trajni suhomesnati proizvodi su proizvodi od različitih vrsta mesa u komadima s pripadajućim kostima, potkožnim masnim tkivom i kožom ili bez njih i dodatnih sastojaka, koji se konzerviraju postupcima soljenja, salamurenja, sušenja i zrenja, sa ili bez dimljenja, do stupnja primjerenog za konzumaciju bez prethodne toplinske obrade te se mogu puniti u odgovarajuće ovitke. Karakteriziraju ih određena senzorska svojstva, poput površine koja treba biti suha i čista ili s mjestimičnim manjim naslagama plijesni u tankom sloju, a proizvodi s kožom moraju imati kožu svijetle do tamnosmeđe boje, bez zasjeka i drugih oštećenja. Također, moraju biti dovoljno osušeni, a vanjski izgled, izgled presjeka, miris, okus, konzistencija i tekstura moraju odgovarati zreloom proizvodu i vrsti mesa, a ako su dimljeni moraju imati miris i okus na dim. Moraju biti što pravilnijeg oblika, uredno obrezanih rubova i bez zasjeka. Mesnati dijelovi moraju biti svijetlocrvene do tamnocrvene boje, a periferni dijelovi mogu biti tamnije boje, dok masno tkivo mora biti čvrsto i bijele boje, a površinski slojevi mogu imati žućkastu nijansu (Pravilnik, 2012).

Trajni suhomesnati proizvodi od svinjskog mesa proizvode se i stavljaju na tržište pod nazivima:

- pršut,
- suha šunka,
- suha lopatica,
- suha vratina,
- kraška vratina,
- buđola,
- suha svinjska pečenica.

2.2. POJAMI I ZNAČENJE PRŠUTA

Prvi pisani podaci o načinu sušenja svinjskog mesa potječe iz ranog rimskog doba, tadašnje Norcie u središnjoj Italiji. Rimska riječ za usoljeni i osušeni cijeli svinjski but bila je *perxuctus*, a dolazi od latinske riječi *perexsuctus* – temeljito osušen, koja je u kasnijem

talijanskom jeziku modernizirana u riječ *prosciutto*, a označava usoljeni, začinjeni i osušeni zreli svinjski but, koji se konzumira narezan na tanke listove (Krvavica i Đugum, 2006).

Pršut je proizvod od svinjskog buta sa kostima, sa ili bez kože i potkožnog masnog tkiva, sa ili bez nogice, bez repa, sa ili bez zdjeličnih kostiju, sa ili bez dodatka začina, koji se konzervira postupkom suhog soljenja ili salamurenja sa ili bez dimljenja, podvrgnut procesima sušenja i zrenja u trajanju od najmanje 9 mjeseci, a koji se nakon sušenja i zrenja može stavljati na tržište otkošten (Pravilnik, 2012).

Hrvatski autohtoni pršuti su Istarski koji je nositelj Zaštićene oznake izvornosti (ZOI; engleski PDO - Protected Designation of Origin) na EU i nacionalnoj razini, te Krčki, Dalmatinski i Drniški pršut koji su nositelji Zaštićene oznake zemljopisnog porijekla (ZOZP; engleski PGI - Protected Geographical Indication) na EU i nacionalnoj razini.

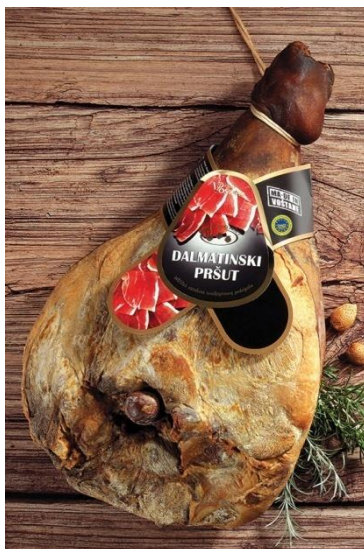
Da bi se proizvod mogao zaštititi zaštićenom oznakom izvornosti ili zaštićenom oznakom zemljopisnog podrijetla potrebno je dokazati da proizvod potječe iz određenog mjesta, regije ili zemlje, te da se kvaliteta, ugled ili ostale specifičnosti proizvoda pripisuju njegovom zemljopisnom podrijetlu. Za zaštićenu oznaku izvornosti sve faze proizvodnje moraju biti unutar definiranog zemljopisnog područja (dozvoljen je izuzetak samo s obzirom na izvor hrane za životinje), dok za zaštićenu oznaku zemljopisnog podrijetla najmanje jedna, ali i više faza proizvodnje moraju biti na definiranom zemljopisnom području te su dozvoljena su ograničenja samo s obzirom za izvor sirovine (Registracija i zaštita naziva hrvatskih autohtonih proizvoda, 2015; Pravilnik, 2012).

2.3. DALMATINSKI PRŠUT

2.3.1. Opća definicija proizvoda

Dalmatinski pršut (slika 1) je trajnisuhomesnati 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).

Proizvodnja dalmatinskog pršuta smije se odvijati isključivo unutar administrativnih granica sljedećih županija: Ličko-senjska, Zadarska, Šibensko-kninska, Splitsko-dalmatinska i Dubrovačko-neretvanska.



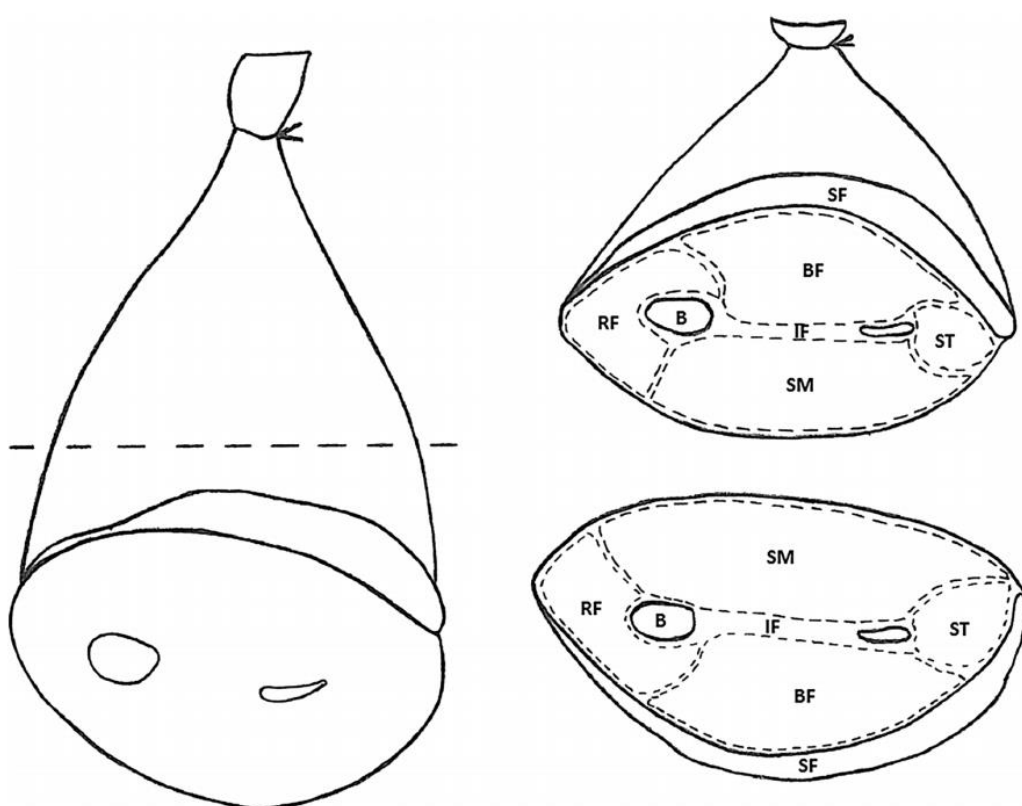
Slika 1. Dalmatinski pršut (Anonymous 1)

2.3.2. Opis sirovine

Dalmatinski pršut proizvodi se od svježih butova s kosti dobivenih od svinja koje su potomci komercijalnih mesnatih pasmina, križanaca ili linija odnosno njihovih križanaca u bilo kojoj kombinaciji. 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 zdjelčne kosti, tj. bočna kost (*os ilium*), sjedna kost (*os ishii*) i preponska kost (*os pubis*), te 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 zdjelčnu čašicu (*acetabulum*) na kukovlju. Masa obrađenog buta mora iznositi najmanje 11 kg.

Na svježem butu ne smije biti vidljivih znakova bilo kakvih traumatskih procesa. Meso buta mora biti crvenkasto-ružičaste boje, kompaktne strukture i suhe površine. Na obodu cijelog buta prekrivenost mašću mora biti takva da onemogućí odvajanje kože od mišića koji se nalaze ispod nje. Svježi butovi smiju se podvrgavati samo hlađenju pri čemu se butovi moraju čuvati na temperaturi u rasponu od 1 do 4°C u fazama skladištenja i transporta (Kos i sur., 2015).

Na slici 2 prikazani su mišići svinjskog buta, od kojih su najvažniji *biceps femoris* i *semimembranosus* s obzirom na kemijski sastav i biokemijske reakcije koje se odvijaju tijekom proizvodnje pršuta. *Semimembranosus* mišić se nalazi u blizini površine koja nije prekrivena s masti zbog čega sol tijekom soljenja brzo prodire u mišić, dok je mišić *biceps femoris* okružen masnim tkivom s jedne strane što usporava prodor soli u mišić. S obzirom da je poznato je da sol usporava aktivnost enzima, spori prodor soli u mišić omogućuje veću proteolitičku aktivnost u ovom mišiću što će utjecati na kvalitetu teksture pršuta (Parreno i sur., 1994; Virgili i sur., 1998).



Slika 2.

Najbitniji mišići buta: 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)

U tablici 1. (Petrova i sur., 2015) prikazan je kemijski sastav dvaju mišića svinjskog buta: *semimembranosus* i *biceps femoris*. Na postotak određene komponente u mišiću utječu pasmina svinja, dob, hrana, klimatski uvjeti te drugi čimbenici.

Tablica 1. Kemijski sastav mišića *semimembranosus* i *biceps femoris* (Petrova i sur., 2015)

KEMIJSKA KOMPONENTA	SADRŽAJ (g/100 g)	
	<i>semimembranosus</i>	<i>biceps femoris</i>
Voda	71-77	73-78
Proteini	17-23	18-22
Masti	1,5-8,9	1,8-7,1
Pepeo	0,7-1,5	0,9-1,8

2.3.3. Opis gotovog proizvoda

Gotov proizvod se odlikuje osebujnom aromom, blagim slanim okusom, jednoličnom crvenom bojom mesa i poželjnom konzistencijom te ne smije sadržavati nikakve dodatke (nitrite, nitrate, kalijev sorbat, askorbinsku i propionsku kiselinu) osim morske soli.

U trenutku stavljanja na tržište „Dalmatinski pršut“ mora posjedovati određena senzorska svojstva, odnosno vanjski izgled pršuta mora biti pravilno oblikovan, bez pukotina, zarezotina i visećih dijelova mišića i kože, te bez velikih nabora na koži. Što se tiče presjeka, potkožno masno tkivo mora biti bijele do ružičasto-bijele boje, a mišićno tkivo jednolične crvene do svijetlocrvene boje. Miris mora biti ugodne arome na fermentirano, usoljeno, suho i dimljeno svinjsko meso, bez stranih mirisa (katran, nafta, svježe meso, mokra ili suha trava), a miris dima blago izražen. Okus mora biti blago slankast ili slan, a preslan pršut, kiselkasto gorak ili isprepletana i nedefinirana mješavina okusa nije dozvoljena. Žvakaća konzistencija mora biti mekana, dok tvrda konzistencija nije prihvatljiva kao ni minimalna topivost. Sadržaj vode mora biti od 40 do 55 %, aktivitet vode (a_w) ispod 0,93 te sadržaj soli (NaCl) 4,5 do 7,5 %. Masa dalmatinskog pršuta u trenutku stavljanja zajedničkog vrućeg žiga (postupak kojim se odobrava stavljanje pršuta na tržište) mora iznositi najmanje 6,5 kg (Kos i sur., 2015).

2.3.4. Tehnološki postupak proizvodnje

Postupak proizvodnje „Dalmatinskog pršuta“ započinje kontrolom kvalitete sirovine, odnosno izborom samo onih svježih butova koja imaju odgovarajuća fiziklano-kemijska i senzorska svojstva. U slučaju manjih nepravilnosti u obliku buta moguće je pojedine butove dodatno obraditi radi dobivanja konačnog pravilnog oblika, dok butovi koji imaju vidljiva oštećenja ili

manjkavosti u kakvoći mesa, odnosno kože ili potkožnog masnog tkiva moraju se odstraniti iz proizvodnje.

Glavne faze kod proizvodnje dalmatinskog pršuta su:

1. **Soljenje pršuta** (temp. 2 - 6°C, RH > 80 %) prikazano na slici 3. Soljenje se provodi morskom soli, azačini i konzervansi nisu dozvoljeni. Butovi se dobro natrljaju po cijeloj površini sasuhom soli i ostave ležati s medijalnom stranom okrenutom prema gore. Nakon 7-10 dana butovi se ponovno natrljaju sa soli i polože se da leže idućih 7-10 dana s medijalnom stranom okrenutom prema dolje.



Slika 3. Soljenje pršuta (Anonymous 2)

2. **Prešanje butova** (temp. 2 - 6°C, RH > 80 %) prikazano na slici 4. Butovi se prešaju tako da se slože uredove između ploča i opterete. Faza prešanja traje 7-10 dana, a potom se butovi isperu čistom vodom i ocijede. Cilj ove dodatne faze jest pravilno oblikovanje pršuta. Pravilno soljeni butovi vežu se špagom ili se vješaju na kuku od nehrđajućeg čelika iznad petne kvrge (*tuber calcanei*) te se prenašaju u drugu komoru radi ujednačavanja temperature prije dimljenja.



Slika 4. Prešanje pršuta (Anonymous 3)

3. **Dimljenje i sušenje** (temp. $\leq 22^{\circ}\text{C}$) (prikazano na slici 5) se vrši uporabom dima dobivenog izgaranjem tvrdog drva ili piljevine bukve (*Fagus sp.*), hrasta (*Quercus sp.*) ili graba (*Carpinus sp.*). Proces traje do najviše 45 dana.



Slika 5. Sušenje i dimljenje pršuta (Anonymous 4)

4. **Zrenje pršuta** (temp. $\leq 20^{\circ}\text{C}$, RH $< 90\%$) provodi se u komori gdje se u optimalnim uvjetima odvijaju biokemijski procesi, postiže lijepa boja i optimalna harmonija mirisa i okusa (slika 6). Faza se odvija u zamračenim prostorima uz blagu izmjenu zraka. Nakon godinu dana od početka soljenja, pršut je zreo i spreman za konzumaciju (Kos i sur., 2015).



Slika 6. Zrenje pršuta (Anonymous 5)

2.3.5. Pakiranje, način stavljanja na tržište pravila označavanja dalmatinskog pršuta

Zajednički znak „Dalmatinskog pršuta“ se po završetku faze zrenja nanosi kao vrući žig na kožu onih pršuta za koje je ovlašteno tijelo utvrdilo da su proizvedeni u skladu s ovom specifikacijom i posjeduju sva propisana fizikalno-kemijska i senzorska svojstva.

Proizvod se na tržište smije stavlјati kao cijeli pršut ili u komadima. U slučaju kada se proizvod stavlјa na tržište u komadima ili narezan, tj. već porcioniran u zatvorenim pakovinama namijenjenim daljnjoj prodaji, svaka pakovina mora biti označena u skladu s odredbama.

Znak ima ovalni oblik pečata unutar kojeg se nalaze tri lavlje glave, a na gornjem vanjskom obodu piše „Dalmatinski pršut“ (slika 7).



Slika 7. Grafički prikaz zajedničkog znaka dalmatinskog pršuta (Kos i sur., 2015)

Osim zajedničkog znaka, vrući žig sadrži i šifru proizvođača koja je istovjetna kontrolnom veterinarskom broju objekta. Svi primjerci vrućeg žiga čuvaju se pri Udruzi dalmatinski pršut. Natpis "Dalmatinski pršut" mora biti jasno čitljiv i neizbrisiv te mora veličinom, vrstom i bojom slova (tipografijom) biti jasnije istaknut od bilo kojeg drugog natpisa uključujući zajednički znak, broj proizvodne šarže (serije) te zaštitni znak, slike i natpise proizvođača (Kos i sur., 2015).

2.4. OKSIDACIJA MASTI

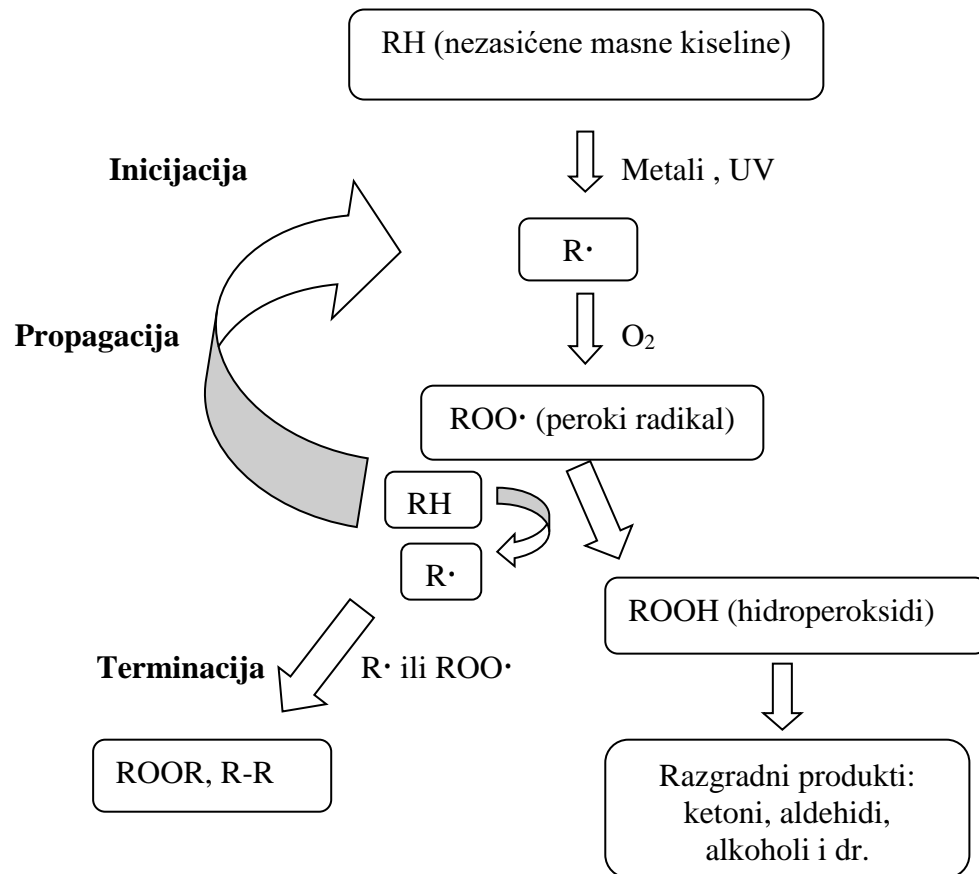
Masti su primarno odgovorni za poželjnu i nepoželjnu aromu te utječu na teksturu mesa. U većini slučajeva, oksidacija masti, pogoršava kvalitetu mesa i uzrokuje neprihvatljiv okus. Povećanje oksidacije masti može uzrokovati promjenu okusa, boje, teksture i prehrambene vrijednosti u mesu. Također, može utjecati i na smanjenje roka trajanja, povećavanje neugodnog okusa, promjene funkcionalnih i senzorskih karakteristika te ponekad stvaranje kancerogenih tvari. Malondialdehid je jedan od razgradnih produkata oksidacije masti.

Faktori koji utječu na oksidaciju masti u mesu su: toplina i svjetlo, kataliza, sadržaj kisika, fosfolipidi, nezasićene masne kiseline, stanje prije klanja, procesi koji uništavaju membrane mišića, i pH. Fosfolipidi koji se nalaze u stanicama membrane vrlo su osjetljivi na oksidaciju u mesu zbog toga što sadrže više nezasićenih masnih kiselina u usporedbi sa drugim lipidima. Nemasno meso sadrži veliki postotak fosfolipida što ga čini osjetljivim na oksidaciju, zbog toga fosfolipidi najviše doprinose užeglosti nemasnog mesa uzrokovanj oksidacijom. Na oksidaciju masti utječe i stupanj nezasićenosti masnih kiselina u fosfolipidima i frakcijama triglicerida.

Oksidacija masti događa se enzimskim i neenzimskim reakcijama te kompleksne reakcije u mesu objašnjavaju se nizom reakcija. Najvažniji mehanizam oksidacije masti u mesu je autooksidacija, kontinuirani niz reakcija slobodnih radikala, te je prikazana na slici 8. U fazi inicijacije kisik iz zraka napada nezasićene masne kiseline i pri tome se stvaraju slobodni radikali, nastali slobodni radikali dalje reagiraju s masnim kiselinama stvarajući nove radikale i tako uz ubrzanje dolazi do lančane reakcije. U drugoj fazi, fazi propagacije, iz slobodnih radikala stvaraju se hidroperoksidi i slobodni radikali peroksida, vezanjem kisika na slobodne radikale masnih kiselina. Hidroperoksidi su primarni produkti oksidacije, bez mirisa i okusa, nestabilni su pa se dalje razgrađuju na slobodne radikale i razgradne produkte oksidacije koji uzrokuju neugodan okus i miris masti. Reakcije koje uzrokuju raspad hidroperoksida i stvaranje sekundarnih oksidacijskih produkata su vrlo složene. Oksidacija se nastavlja lančano sve dok slobodni radikali ne reagiraju međusobno (faza terminacije) stvarajući polimere koji su inaktivni i time se završava autooksidacija.

Stupanj oksidacije masti ovisi o vrsti mesa te procesima mljevenja, sjeckanja, ljuštenja, emulgiranja i kuhanja jer oni ubrzavaju oksidaciju masti. Dolazi do oslobađanja membranske veze fosfolipida te se mogu brže oksidirati. Procesiranje uništava strukturu mišića što

uzrokuje reakciju nezasićenih masnih kiselina sa kisikom iz zraka te se povećava kontakt sa enzimima i hem pigmentima koji sadrže metalne ione te dolazi do autooksidacije. Kontrola tih faktora najbolji je način zaustavljanja oksidacije masti i neugodnih okusa u mesnim proizvodima (Cheng, 2016).



Slika 8. Autooksidacija u mesu (Cheng, 2016)

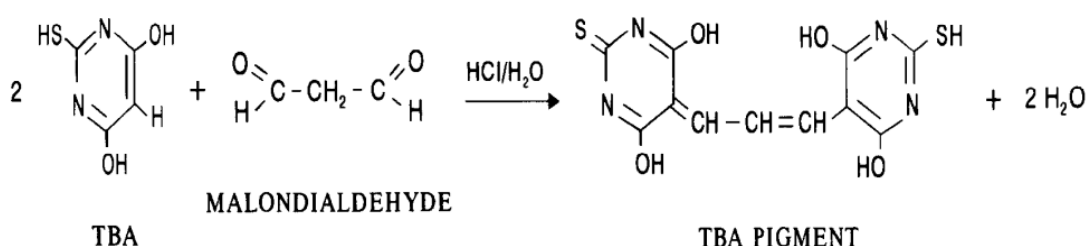
Metode koje se koriste za određivanje oksidacije masti u mesu tradicionalno se dijele na one koje određuju primarne promjene te one koje određuju sekundarne promjene.

Metode koje određuju primarne promjene mogu se podijeliti na one koje određuju gubitak reaktanata (nezasićene masne kiseline ili kisik), na one koje prate nastajanje primarnih produkata oksidacije masti (hidroperoksida) te na one koje određuju apsorpciju kisika.

Razgradnjom primarnih produkata nastaju stabilniji sekundarni produkti kao što su pentanal, heksanal, 4-hidroksinonenal i malondialdehid (MDA) (Gray i Monahan, 1992).

2.4.1. Test tiobarbiturne kiseline –TBA test

Jedna od najstarijih i najkorištenijih metoda za određivanje sekundarnih produkata u mesu je test 2-tiobarbiturne kiseline (TBA). Stupanj oksidacije masti se definira kao TBA vrijednost i izražava se kao miligrami malondialdehida po kilogramu uzorka. Malondialdehid je relativno manji produkt oksidacije masti koji nastaje tijekom oksidacije polinezasićenih masnih kiselina i reagira sa TBA kako bi nastao obojeni kompleks (slika 9) sa apsorpcijskim maksimumom pri 530-532 nm (Ganhão i sur, 2011). Prema metodi po Lemon i sur. (1975) obojenje se mjeri i na 538 nm.



Slika 9. Reakcija tiobarbiturne kiseline i malondialdehida (Fernández i sur, 1997)

Brzina reakcije TBA s MDA ovisi o koncentraciji TBA otopine, temperaturi i pH.

TBA test određuje i druge TBA aktivne spojeve kao na primjer 2-alkane i 2,4-alkadienale te se zbog toga uz naziv TBA koristi i naziv TBARS (TBA reaktivni spoj). TBA reaktivni spojevi reagiraju s TBA čime nastaje adukt čiji spektar je identičan onome dobivenom reakcijom s MDA standardom te je njihov UV spektar identičan onome MDA standarda pri pH 7,0 i pH 2,0 (Fernández i sur, 1997).

TBA test ima široku primjenu kao mjera oksidativne užeglosti masne hrane, osobito u mesnim proizvodima. Uspoređuje se apsorpcija MDA-TBA kompleksa sa standardom 1,1,3,3-tetraetoksiopropan (TEP) ili 1,1,3,3-tetrametoksiopropan (TMP), budući da se MDA može dobiti kiselom hidrolizom iz TMP ili TEP u ekvimolekularnoj reakciji.

Napravljene su brojne usporedbe provedbe TBA testa za različite vrste hrane, ali bez preferencije metoda. Argumenti za odabir specifičnog modela reakcije za analizu u mesu su prikazali Fernández i sur. (1997). Za kvantifikaciju apsorpcija uzoraka nakon reakcije je

uspoređivana sa standardnim krivuljama pripremljenima od 1,1,3,3-tetraetoksiopropan (TEP), koji hidrolizira u kiselinu dajući malonaldehid. Za točne rezultate slijepe probe TEP „recovery-a“ moraju se odrediti u svakoj metodi da bi se odredio postotak analita koji ostane nakon reakcije, te je taj „recovery“ faktor uračunat u konačni TBA broj. Ne uključivanje „recovery“ faktora povećava varijabilnost rezultata, unosi pogrešku u direktnu usporedbu apsorpcije i ograničava mogućnost da se evaluiira razina relativne oksidacije u različitim materijalima ili laboratorijima. Rezultati TBA analiza obično se prikazuju kao $\mu\text{mol TBARS/g}$ uzorka da bi se pokrili svi reaktanti ili $\text{mg malonaldehida/kg}$ uzorka ako je definiran molekularni reaktant.

2.5. OKSIDACIJA PROTEINA

Oksidacija proteina je jedan od glavnih uzroka za pogoršanje kvalitete tijekom prerade i skladištenja prehrambenog proizvoda. Oksidacija proteina rezultira proizvodnjom raznih oksidacijskih derivata. Glavne oksidacijske modifikacije se nalaze na bočnim lancima aminokiselina koje uključuju tiol oksidaciju, aromatsku hidroksilaciju i formiranje skupine karbonila (Stadman, 1990).

Kemijske modifikacije nanosene specifičnim bočnim lancima aminokiseline i/ili okosnici peptida mogu dovesti do promjene fizičkih svojstava proteina, uključujući fragmentacije, agregacije, gubitak topljivosti i funkcionalnosti te smanjenu osjetljivost na proteolizu (Xiong, 2000).

Oksidativna modifikacija proteina je promjena izazvana reaktivnim intermedijatima slobodnih radikala ili njihovim krajnjim produktima. U procesu oksidativne modifikacije proteina mijenja se njihova struktura, što dovodi do izmjene funkcionalne aktivnosti. Reakcije modifikacije strukture proteina pod djelovanjem slobodnih radikala odvijaju se u *in vivo* uvjetima i odgovorne su za fiziološki proces starenja, degradacije i obnavljanja proteina, kao i za regulaciju aerobnog i anaerobnog metabolizma.

Tijekom oksidativne modifikacije proteini mijenjaju primarnu strukturu, kao posljedicu modifikacije pojedinih aminokiselina, ili kompletnog gubitka neke aminokiseline. Stupanj i tip efekata na proteinima u velikoj mjeri ovisi o vrsti radikala koji se u reakcijama oslobađaju kao i od dužine ekspozicije. Na temelju toga izvršena je podjela mogućih modifikacija:

(1) modifikacija primarne strukture proteina kao posljedica: modifikacije pojedinih aminokiselina, gubitka pojedinih aminokiselina, agregacije proteina i fragmentacije proteina, (2) modifikacija sekundarne i tercijarne strukture proteina koja dovodi do promjene rastvorljivosti (jača hidrofobnost ili hidrofilnost) i promjena naelektriziranosti (ka pozitivnijem ili ka negativnijem).

Promjene fizikalno-kemijskih svojstava proteina ogledaju se i u smanjenju termičke stabilnosti, promjeni viskoznosti i promjeni fluorescencije.

Među svim bočnim lancima aminokiselina, cistein i metionin su najosjetljiviji na oksidaciju jer sadrže reaktivne atome sumpora. Sumporni anion je najmoćniji nukleofil i bogat je elektronima. Reaktivne oksidacijske vrste uključuju slobodne radikale (OH i O₂) i neradikle (H₂O₂ i ROOH) i reaktivne aldehide. Oksidanti mogu direktno napadati proteine i na taj način uzrokovati fragmentaciju i konformacijske promjene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina. Disulfid, ditionrozini mogu rezultirati agregacijom proteina i polimerizacije mijenjajući njihova proteolitička svojstva. To je uglavnom posljedica na proces oksidacije inducirano odvijanja. Ove promjene mogu proizvesti fizikalna i kemijska svojstva proteina uključujući topljivost, hidrofobnost, sposobnost zadržavanja vode. Druge promjene koje izaziva oksidacija proteina mogu smanjiti bioraspoloživost aminokiselinskih ostataka i modificirati probavljivost proteina, što negativno utječe na prehrambene vrijednosti proteina mesa.

Brojni tehnološki čimbenici, poput temperature, aktiviteta vode i pH vrijednosti, utječu na oksidaciju proteina i aminokiselina (Estévez i Heinonen, 2010). Hidrolitička razgradnja proteina tijekom proizvodnje suhomesnatih proizvoda igra važnu ulogu u tehnološkim i senzorskim aspektima kvalitete gotovog proizvoda (Ventanas i sur., 2007). Oksidacija proteina može negativno utjecati na teksturu i nutritivnu vrijednost proizvoda od mesa. Parametri teksture kao mekoća, sočnost i tvrdoća mogu biti promijenjeni oksidacijom proteina uslijed inaktivacije proteolitičkih enzima uključenih u mekšanje mesa i oksidativnih promjena miofibrilnih proteina i posljedično, njihove smanjene podložnosti proteolizi. Nutritivna vrijednost proizvoda s oksidiranim proteinima je smanjena uslijed promjene aminokiselinskog profila, budući da formiranje proteinskih karbonila uključuje ireverzibilnu oksidativnu modifikaciju esencijalnih aminokiselina kao što su lizin, arginin i treonin (Huff-Lonergan i sur., 2010).

Stadtman i Levine (2003) navode formiranje karbonilnih spojeva kao jednu od najistaknutijih modifikacija oksidiranih proteina.

2.5.1. Proteinski karbonili

Prema rezultatima istraživanja Esteveza (2011) proteinski karbonili su reaktivni. Utvrđeno je da su specifični karbonili α -amino adipinski polualdehid (AAS) i γ -glutaminske kiseline (GGS) potpomogli degradaciju leucina i izoleucina te su nastali aldehidi 3-metilbutanal i 2-metilbutanal kao uobičajene komponente arome mesnih proizvoda.

Polualdehidi AAS i GGS se smatraju podobnim pokazateljima oksidacije proteina jer predstavljaju do 60% ukupnih karbonilnih spojeva u sustavima hrane (Utrera i Estevez, 2013).

Karbonilacija je ireverzibilna modifikacija proteina koja dovodi do nastanka proteinskih karbonila, aldehida i ketona, koji najčešće nastaju direktnom oksidacijom podložnih bočnih lanaca amino kiselina (Estevez i Heinonen, 2010).

Karbonili (aldehidi i ketoni) mogu biti formirani u proteinima različitim načinima: (1) direktnom oksidacijom lanaca iz lizina, treonina, arginina i prolina (Requena i sur., 2001), (2) neenzimskom glikacijom u prisutnosti reducirajućih šećera (Akagawa i sur., 2006), (3) oksidativnim raspadom peptidne veze putem alfa amidiranja ili putem oksidacije lanaca glutamila (Berlett i Stadtman, 1997, Garrison, 1987) i (4) kovalentnom vezom za neproteinske karbonile poput 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ili malondialdehid (MDA) (Soladoye i sur., 2015).

Od svih navedenih načina, direktna oksidacija lanaca osjetljive aminokiseline koristi se kao glavni način za proteinsku karbonilaciju i kao glavni izvor direktnog oksidativnog napada na proteine (Shacter, 2000; Stadtman, 1990; Stadtman i Levine, 2003) te je upravo taj mehanizam jedini mehanizam koji dokazano doprinosi karbonilima iz mesnih proteina (Estévez i sur., 2009; Estévez i Heinonen, 2010). Ostala tri mehanizma primjenjiva su na složene sustave prehrane, a relativni doprinos takvih načina karbonilacije mesnih proteina ostaje nepoznat.

Karboniliranje proteina mesa može biti inducirano koristeći nekoliko ROS sustava generiranja, uključujući prijelazne metale (engl. *Metalcatalyzed Oxidation* - MCO), mioglobinsku oksidaciju i lipid oksidacijske sustave (Decker i sur., 1993; Estévez i sur., 2009; Estévez i Heinonen, 2010; Park i sur., 2007; Soladoye, 2015).

Decker i sur. (1993) otkrili su da je kombinacija metalnih iona ($\text{Fe}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$) s askorbinskom kiselinom učinkovita u poticanju oksidacije proteina i formiranju proteinskih karbonila. Također, utvrdili su da je Fe^{3+} učinkovitiji u poticanju oksidacije proteina i formiranju proteinskih karbonila nego Cu^{2+} . Prirodne komponente mišića poput mioglobina (Mb) dokazano unaprjeđuju oksidaciju proteina, posebno proteinsku karbonilaciju to u većoj mjeri od prijelaznih metala (Estévez i Heinonen, 2010). Promeprat i sur. (2011) pokazali su da je mioglobin dobar prediktivni marker formiranja karbonila u mesnim sustavima, u kojima se ističe svojom ulogom učinkovitog unaprjeđivača karbonilacije proteina. Dok relativni doprinos svakog oblika željeza u oksidaciji proteina u mesu i mesnim proizvodima može ostati nedefiniran, hem i ne-hem željezo, kao i bakar, potencijalni su inicijatori formiranja karbonila u mesnim sustavima.

Prema Estevezu i sur. (2008) karbonilacija proteina se može dogoditi u odsutnosti lipida, ali prateća pojava oksidacije proteina i lipida u mesu sugerira interakciju između te dvije reakcije pa je upravo zato važno odrediti i oksidaciju lipida tijekom istraživanja oksidacije proteina.

Uz proteolizu, proteini i oksidiraju pa je tako u pršutima, koji prolaze dugi proces proizvodnje određena veća koncentracija karbonila nego u suhoj plećki, zbog duljeg i intenzivnijeg sušenja (Ventanas i sur., 2007).

Kvantifikacija ukupnog iznosa proteinskih karbonila, koristeći dinitrofenilhidrazin (DNPH) tehnike vjerojatno je najčešća metoda za procjenu oksidacije proteina u mesu i biološkim sustavima (Estévez, 2011).

U ovoj metodi, DNPH reagira s karbonilnim grupama proteina kako bi generirala hidrazone i apsorbancija se čita na 370 nm (Levine i sur., 1990). Sadržaj karbonila izračunat je kao nmol/mg proteina korištenjem koeficijenta apsorpcije od $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Levine i sur., 1994).

U sustavima hrane, karbonilne skupine mogu se generirati i drugim putovima uključujući oksidaciju specifičnih bočnih lanaca aminokiselina kataliziranim metalima i dodavanjem šećera ili proizvoda za oksidaciju lipida kao što su 4-hidroksinonenal i malondialdehid (Stadtman i Berlett, 1998), koji mogu dovesti do precijenjenosti oksidacije proteina (Estevez i sur., 2008). Međutim, metoda DNPH derivatizacije korištena je kao koristan i značajan marker za nakupljanje oksidiranih proteina u živim tkivima ljudskih i drugih vrsta, dijelom zbog jednostavnosti i praktičnosti ove metode. Ova metoda uspješno se primjenjuje u mesnim sustavima uključujući sirovo svježe meso, mesne emulzije i mesne proizvode za procjenu stupnja oksidacije proteina u proizvodima (Zhang i sur., 2011).

2.5.2. Proteoliza

Proteoliza je značajan niz biokemijskih reakcija u tkivima pršuta, koje sudjeluju u stvaranju karakteristične ukupne arome, okusa i mirisa tijekom procesa prerade. Proteolitička aktivnost glavna je značajka endogenih enzimskih sustava u tkivima pršuta. Oni uz limitirajuće čimbenike (pH, koncentracija soli i vlage itd.), stvaraju nepovoljne uvjete za rast mikroorganizama, te je i aktivnost mikrobnih enzima unutar pršuta beznačajna.

Najvažnije proteolitičke promjene, koje sudjeluju u stvaranju posebnog okusa i arome pršuta visoke kakvoće, događaju se jedino u produženom procesu zrenja i kod pršuta sa niskim udjelom soli. Proteoliza izravno sudjeluje u formiranju konzistencije pršuta temeljem razgradnje miofibrilarnih proteina koji grade mišićnu strukturu. Stvaranje peptida i slobodnih aminokiselina utječe na okus pršuta, a slobodne aminokiseline sudjeluju kao supstrat u budućim reakcijama, koje doprinose formiranju konačne arome i okusa pršuta, odnosno djeluju kao prekursori arome i okusa (Toldrá i Flores, 1998).

Proteolitički enzimi koji razgrađuju mišićno tkivo *post mortem* su mišićne proteaze te se dijele na endopeptidaze (proteinaze) i egzopeptidaze. Egzopeptidaze su mikrobnog podrijetla, a dokazano je da je njihova aktivnost slabija od endopeptidaza prirodno prisutnih u pršutu (Toldrá, 2002). Endopeptidaze hidroliziranjem miofibrilarnih proteina i stvaranjem proteinskih ostataka polipeptida, sudjeluju u postmortalnom omekšavanju mišićnog tkiva (Dransfield, 1994). Egzopeptidaze stvaranjem slobodnih aminokiselina, sudjeluju u formiranju okusa i arome pršuta (Nishimura i sur., 1990). Najvažnije mišićne egzopeptidaze

podijeljene na amino-, karboksi-, di-, tri-, dipeptidil- i tripeptidil-peptidaze, dok su najvažnije mišićne endopeptidaze katepsini i kalpaini.

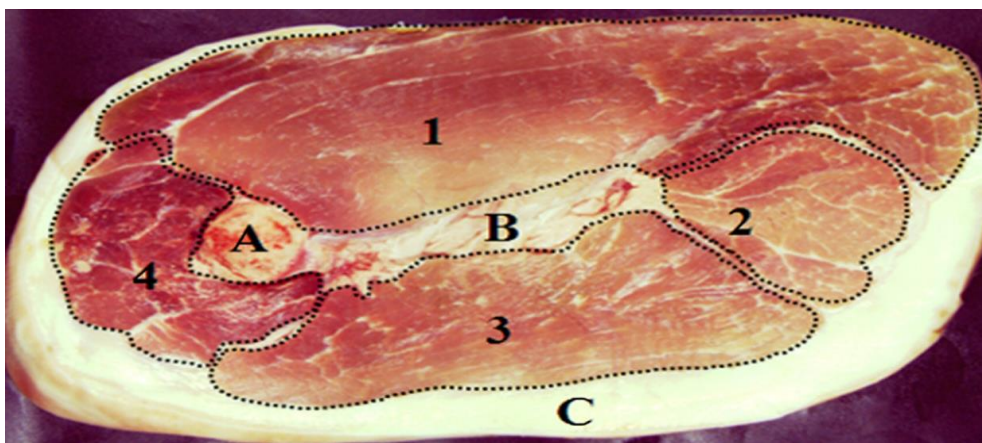
Prekomjerna proteoliza u pršutu vezana je s genetskom osnovom, hranidbom i dobi svinja, što može značajno utjecati na aktivnost nekih enzima, osobito viša razina katepsinske aktivnosti. Posljedica je mekša konzistencija pršuta i lošija ocjena organoleptičkih osobina pršuta. Mekša konzistencija pršuta u pozitivnoj je korelaciji s povišenom rezidualnom aktivnošću katepsina B i nižom razinom soli (Parolari i sur., 1994) te povišenom rezidualnom aktivnošću katepsina B+L (García-Rey i sur., 2004). Povišena koncentracija peptida i slobodnih aminokiselina, kao rezultat prekomjerne proteolize, može uzrokovati neprijatan okus pršuta.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom radu ispitivani su uzorci dimljenog Dalmatinskog pršuta od tri različita proizvođača (N=6), proizvedeni tradicionalnim postupkom proizvodnje. Tehnologija i vrijeme prerađivanja butova od sirovine do gotovog proizvoda opisana je u teorijskom dijelu ovog rada.

Kao eksperimentalni materijali za istraživanja u ovom radu koristila su se dva mišića svinjskog buta, *biceps femoris* (označen brojem 3 na slici 10) i *semimembranosus* (označen brojem 1 na slici 10).



Slika 10. Presjek mišića svinjskog buta (Laureati i sur., 2014)

3.1.1. Priprema uzoraka za analizu

Aparatura i pribor:

- Uređaj za vakumiranje
- Analitička vaga

Boja i tekstura na svim uzorcima odmah je određena na mišiću *biceps femoris* i *semimembranosus*, a nakon toga svaki uzorak je izrezan na manje komadiće, homogeniziran komercijalnim blenderom, pakiran u male sterilne vrećice, vakumiran pomoću uređaja za vakumiranje, označen odgovarajućom oznakom i pohranjen u hladnjaku na 4°C do daljnjih analiza.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje teksture

Aparaturai pribor:

- Teksturometar (Ametek Lloyd Instruments Ltd., UK)

Postupak rada:

Tekstura pršuta određena je pomoću teksturometra (Ametek Lloyd Instruments Ltd., UK) s ćelijom od 50 kg. Uzorci pršuta, točnije *biceps femoris* i *semimebranosus* izrezani su na kockice veličine 10 x 10 x 10 mm te su ostavljeni 2 h na temperaturi od 20°C prije samog mjerenja. 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 slijedeći parametri: tvrdoća (N), adhezivna sila (N), kohezivnost, adhezivnost (Nmm), gumenost (N), odgođena elastičnost (mm), žvakljivost (Nmm), otpornost (N), lom (N) i vlaknastost (mm).

3.2.2. Određivanje boje

Određivanje boje provedeno je na površini uzorka *biceps femoris* i *semimembranosus* odmah nakon otvaranja uzorka kako bi se spriječila degradacija boje uzrokovana utjecajem svjetla i kisika iz zraka. Referentna metoda mjerenja boje mesa (Honikel, 1998) je ona koja koristi L*, a*, b* spektar boja. Parametar L* je mjera svjetlosti mesa iskazana vrijednostima od 0 do 100 (0 = crno; 100 = bijelo). Vrijednost parametra a* je mjera crvenila mesa iskazana vrijednostima od - 60 do 60, a iskazuje spektar od crvene do zelene boje pri čemu veća vrijednost a* parametra karakterizira crvenije meso. Vrijednost b* parametra ukazuje na spektar nijansi između plave i žute boje, a njegova veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra (Yiu i sur., 2001).

Za određivanje boje pršuta korišten je sprektrofotometar Konica Minolta CM-700d (slika 11). Vrijednosti za L*, a* i b* izračunate su kao srednja vrijednost 8 mjerenja uz napomenu da su se kod mjerenja izbjegavala područja s većom količinom masnoće zbog što točnijih i ujednačenijih mjerenja.



Slika 11. Konica Minolta CM-700d (Anonymous 6, 2018)

3.2.3. Određivanje udjela vode

Udio vode odredio se gravimetrijskom metodom (ISO 1442:1997). Količina vode u različitim namirnicama podrazumijeva gubitak na težini uzoraka sušenjem do konstantne mase.

U niske aluminijske posudice stavljen je kvarcni pijesak (oko 5 g) i postavljen stakleni štapić te je sve zajedno postavljeno u sušionik na zadanu temperaturu. Posudice su sušene oko 30 minuta bez poklopca (poklopac je naslonjen za zdjelicu). Zatim su posudice poklopljene dok su još u sušioniku, hladene u eksikatoru do sobne temperature (30 min.), nakon čega su vagane na vazi (m_0) te je ta masa upisana u tablicu, a moguće je da budu osušene dan prije i čuvane u eksikatoru do upotrebe. U izvagane i osušene aluminijske posudice dodano je oko 3 g homogeniziranog uzorka, lagano pomiješanog s kvarcnim pijeskom pomoću staklenog štapića te su posudice poklopljene i izvagane (m_1). Posudice s uzorkom su otklopljene i postavljene u sušionik na 2,5 h na zadanu temperaturu nakon čega su opet poklopljene i hladene u eksikatoru do sobne temperature (30 min.) te vagane (m_2). Postupak je ponavljan sve dok dva uzastopna mjerenja (nakon 1 sat sušenja) ne budu razlikovana više od 0,1%. Obično su dovoljna 2 ciklusa.

Udio vode (%) računa se prema formuli 1:

$$\text{udio vode (\%)} = \frac{m1-m2}{m1-m0} \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

m0 - odvaga aluminijske posudice, pijeska i staklenog štapića (g)

m1- odvaga aluminijske posudice, uzorka, pijeska i staklenog štapića prije sušenja (g)

m2 - odvaga aluminijske posudice, uzorka, pijeska i staklenog štapića nakon sušenja (g)

3.2.4. Određivanje stupnja oksidacije masti (TBA test)

Lipidna oksidacija je uzrok kvarenja mesa i mesnih proizvoda. Odvija se na masnim kiselinama, posebice na polinezasićenim masnim kiselinama, gdje nastaju razni produkti koji mijenjaju kvalitetu proizvoda (mijenja se boja, aroma, okus, tekstura i nutritivna vrijednost). Primarni produkti autoksidacije su hidroperoksidi. Njihovom rezgradnjom nastaju sekundarni produkti kao pentanal, heksanal, 4-hidroksinonenal i malondialdehid (MDA).

Test tiobarbiturne kiseline (TBA test) se koristi za detekciju oksidacije nezasićenih masnih kiselina i masti. Ovisi o razvoju crvenog pigmenta koji nastaje reakcijom TBA s MDA. Uz naziv TBA koristi se i naziv TBARS (TBA reaktivni spoj).

3.2.4.1. Određivanje stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Lemonu (1975)

Postupak određivanja stupnja oksidacije započet je vaganjem 10 g (\pm 0,001 g) uzorka te je u epruvetu s uzorkom odpipetirano 20 mL 7,5% otopine TCA. Nakon toga sve zajedno homogenizirano je na Ultraturaxu. Homogenizirani uzorak ostavljen je da miruje 30 min te je profiltriran. 5 mL filtrata je odpipetirano u tubu, dodano je 5 mL TBA, tuba je zatim zatvorena i stavljena u vodenu kupelj na 100°C. Nakon 40 min tube su ohlađene pod mlazom hladne vode te je očitana apsorbancija na spektrofotometru na 538 nm. Standardne kalibracijske otopine pripremljene su iz 1 μ mol otopine primarnog standarda TEP (1, 1, 3, 3-tetraetoksipropil). Konstrukcija najbolje linearne aproksimacije rađena je na temelju 5 točaka radnih kalibracijskih otopina koncentracija 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 i 0,05 μ mol/ml. Radne standardne otopine podvrgnute su kolorimetrijskoj reakciji pod istim uvjetima kao i uzorci.

Pomoću očitane apsorbancije i baždarnog pravca izračunata je koncentracija malondialdehida (MDA).

Izražavanje rezultata

Koncentracija mg malondialdehida/kg uzorka izračunata je prema formuli 2:

$$\text{mg MDA /kg uzorka} = \mu\text{molMA} * (\text{V}_{\text{TCA}} + \text{V}_{\text{H}_2\text{O}}) / \text{V}_{\text{E}} * 72 / \text{m}_{\text{u}} \quad [2]$$

gdje su:

μmolMA - μmol malondialdehida dobivenog mjerenjem apsorbance u uzorku

V_{TCA} - volumen TCA korišten za ekstrakciju uzorka

$\text{V}_{\text{H}_2\text{O}}$ - sadržaj vode u uzorku

V_{E} - volumen ekstrakta za kolorimetrijsku reakciju

72 - faktor konverzije $\mu\text{molMA/g}$ u mgMA/kg

m_{u} - masa uzorka [g]

3.2.4.2. Određivanje stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Bruna i sur. (2001)

5 g uzorka homogenizirano je sa 5%-tnom otopinom TCA i 10 mg BHT. Centrifugirano je 10 min na 12000 rpm pri 4°C te potom profiltrirano preko filter papira Watman ($n^\circ = 54$).

4 mL filtrata je odpipetirano u tubu, dodano je 4 mL 0,02M otopine TBA (za slijepu probu umjesto filtrata staljena otopina TCA). Tuba je zatim zatvorena i stavljena 1 h u sušionik na 100°C i nakon toga ohlađena pod mlazom hladne vode. Nakon toga na spektrofotometru (Helios β , Spectronic Unicam, Cambridge, UK) je očitana apsorbancija (532 nm). Standardne kalibracijske otopine pripremljene su iz 25 μmol otopine primarnog standarda TMP (1, 1, 3, 3-tetrametoksiopropan). Konstrukcija najbolje linearne aproksimacije rađena je na temelju 5 točaka radnih kalibracijskih otopina koncentracija 12,5; 6,25; 3,13; 1,56 i 0,75 $\mu\text{mol/ml}$. Radne standardne otopine podvrgnute su kolorimetrijskoj reakciji pod istim uvjetima kao i uzorci. Pomoću očitane apsorbancije i baždarnog pravca izračunata je koncentracija malondialdehida (MDA). Rezultati su izraženi kao mg MDA/kg pršuta.

Izražavanje rezultata

Koncentracija mg malondialdehida/kg uzorka izračunata je prema formuli 3:

$$\text{mg MDA /kg uzorka} = \mu\text{M MDA} * 0,2888 \quad [3]$$

3.2.5. Određivanje ukupnih karbonila

Priprema uzorka za određivanje ukupnih karbonila provedena je prema izmijenjenom postupku koji su opisali Armenteros i sur. (2009). Izvagan je 1 g uzorka u falconicu (u duplikatu) i homogeniziran s 10 mL pirofosfatnog pufera (pH 7.4; 2 mM Na₄P₂O₇; 10 mM tris-maleat; 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) na Ultra Turrax 30 sekundi (uzorci stavljeni u led). Uzorak je podijeljen na dva alikvota od 0,1 mL (u eppendorficu od 2 mL), u svaki je dodano 1 mL 10% TCA da perticipiraju proteini, izmiješano na Vortex-u i centrifugirano na 10000 rpm tijekom 5 min (2°C). Sljedeći korak bilo je izbacivanje supernatanta i to za:

Pelet 1 → kvantifikacija proteina: dodano 1 mL HCl 2N

Pelet 2 → mjerenje karbonila: dodano 1 mL 0,2% DNPH u HCl 2N

Dobiveni uzorci inkubirani su 1 h na sobnoj temperaturi u tami, uz miješanje svakih 15 min na Vortex-u. Nakon toga precipitirani su sa 1 mL TCA 10%, promiješani na Vortex-u 30 sekundi i centrifugirani 10000 rpm tijekom 5 min (2°C). Zatim je izdvojen supernatant, a pelet isprana s 1 mL etanol/etil acetata (1:1), promiješana na Vortex-u i centrifugirana na 10000 rpm tijekom 5 min (2 puta). U sljedećem koraku pelet je otopljena u 1,5 mL natrijevog fosfatnog pufera 20 mM (pH 6.5) koji sadrži 6M guanidin hidroklorida, promiješana i centrifugirana na 10000 rpm tijekom 5 min da se uklone netopljivi fragmenti. Na ostavljenom supernatantu mjerena je absorbancija na sljedeći način:

Pelet 1 → kvantifikacija proteina: mjeri se na 280 nm, koristeći BSA kao standard (0.5-2 mg/mL) u natrijevom fosfatnom puferu 20 mM (pH 6.5) koji sadrži 6M guanidin hidroklorid.

Pelet 2 → mjerenje karbonila: mjeri se na 370 nm i izračunava koncentracija karbonila koristeći jednadžbu 4: $A = \xi * M * I$ [4]

Rezultat je izražen kao nmol karbonila po mg proteina korištenjem adsorpcijskog koeficijenta za proteinske hidrazone $\xi = 21.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Priprema baždarne krivulje:

Otopina standardnog proteina BSA 2 mg/mL - otopljeno je 20 mg (0,02 g) u 10 mL fosfatnog pufera + gvanidin hidroklorida.

Baždarna krivulja napravljena je prema podacima prikazanim u tablici 2.

Tablica 2. Podaci za izradu baždarne krivulje

BSA (mL)	Fosfatni pufer + gvanidin hidroklorid (mL)	c (BSA) (mg/mL)
0	2	0 (SP)
0,5	1,5	0,5
1	1	1
1,5	0,5	1,5
2	0	2

3.2.6. 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

Ispitivanje fizikalno-kemijskih parametara, boje i teksture, provedeno je na 6 uzoraka dalmatinskog pršuta od 3 različita proizvođača. Za svaki uzorak napravljene su 4 paralelne probe na mišiću *biceps femoris* te *semimembranosus*. Dok su za stupanj oksidacije lipida i koncentraciju karbonila napravljene 2 paralelne probe za svaki uzorak na mišiću *biceps femoris* i *semimembranosus*.

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

4.1. BOJA

Boja je vrlo važna karakteristika mesa i jedan je od najvažnijih senzorskih pokazatelja tržišne kvalitete mesa i mesnih proizvoda (Huff-Lonergan i sur., 2010). Od strane potrošača, boja je najvažnija značajka za izbor mesa. Tipična crvena boja pršuta potječe od formiranja nitrozomioglobina, koji nastaje reakcijom dušikovog oksida s mioglobinom. Intenzitet boje se povećava s koncentracijom mioglobina, veći je u mišićima starijih životinja (Rosell i Toldrá, 1998). Boja pršuta uglavnom ovisi o koncentraciji i kemijskom stanju pigmenata u mesu te o mišićnoj strukturi (Pérez-Alvarez i sur., 1998). Kada je pršut dimljen mogu se na pršutu pojaviti tamnije boje zbog pirolitičke razgradnje drva.

Određivanje boje provedeno je mjereći vrijednosti koordinata svjetloće (L^*), spektra od zelene do crvene boje (a^*), te spektra od plave do žute boje (b^*).

Rezultati određivanja boje (L^* , a^* i b^* parametri) u uzorcima Dalmatinskog pršuta od tri različita proizvođača, u dva različita mišića, prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati određivanja parametra boje pršuta u uzorcima dimljenog Dalmatinskog pršuta u dva različita mišića

<i>Biceps femoris</i>	Proizvođač 1	Proizvođač 2	Proizvođač 3	P-vrijednost
L*	50,87 ± 0,22 ^{abA}	50,39 ± 0,37 ^{aA}	51,40 ± 0,18 ^{bA}	0,049
a*	5,46 ± 0,16 ^{bA}	5,40 ± 0,28 ^{bA}	4,37 ± 0,22 ^{aA}	0,004
b*	5,72 ± 0,26 ^{bA}	5,02 ± 0,34 ^{abA}	4,35 ± 0,16 ^{aA}	0,005
<i>Semimembranosus</i>	Proizvođač 1	Proizvođač 2	Proizvođač 3	P-vrijednost
L*	47,32 ± 0,16 ^B	47,16 ± 0,10 ^B	47,06 ± 0,18 ^B	0,484
a*	3,99 ± 0,17 ^{bB}	3,29 ± 0,14 ^{aB}	2,99 ± 0,10 ^{aB}	0,000
b*	4,14 ± 0,15 ^{cB}	3,18 ± 0,07 ^{bB}	2,72 ± 0,09 ^{aB}	0,000
p-vrijednost	0,000	0,000	0,000	

* Različita slova (a, b) u istome stupcu znače statistički značajnu razliku (P < 0,05).

** Različita slova (A, B) u istome retku znače statistički značajnu razliku (P < 0,05).

U ispitivanim uzorcima dimljenih pršuta različitih proizvođača dobivene vrijednosti za L* parametar *biceps femoris* kretale su se u rasponu 50,39-51,40, što je znatno veće od L* vrijednosti određene u dalmatinskom pršutu (33,7-41,6) (Marušić Radovčić i sur., 2016), u istarskom pršutu (34,64-35,27) (Marušić i sur., 2011), španjolskom Iberijskom pršutu (38,28) (Carrapisco i Garcia, 2008), drugim španjolskim vrstama pršuta (34,8-38,8) (Perez-Alvarez i sur., 1998) te talijanskim vrstama pršuta (37,9-38,0) (Laureati i sur., 2014).

L* vrijednosti za *semimebranosus* nisu pokazale statistički značajnu razliku (P > 0,05) između proizvođača.

García-Esteban i sur. (2003) u svome su istraživanju, španjolskog Serrano pršuta, za *semimebranosus* dobili L* vrijednost 31,16-38,17 što je znatno niže od L* vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju (47,06-47,36). Cilla i sur. (2006), u španjolskom Teruel pršutu, su također dobili niže L* vrijednosti u odnosu na ovo istraživanje (31,75).

L* vrijednosti pokazale su statistički značajnu razliku (P < 0,05) između *biceps femoris* i *semimebranosus*. Kod svih ispitivanih uzoraka dobivene vrijednosti za L* parametar

semimebranosus bile su znatno niže u usporedbi s *biceps femoris*. Dobiveni rezultati su se kretali u rasponu 47,06-47,36. Što je niža L* vrijednost, to su pršuti tamniji.

Razlike u ovom parametru, između dva mišića, povezane su s udjelom vode, pH, dehidraciji prema površini te samoj strukturi mišića (García-Esteban i sur., 2003). *Semimebranosus* je vanjski mišić i podložan je površinskoj dehidraciji, dok je *biceps femoris* prekriven kožom i potkožnim masnim tkivom. *Semimebranosus*, kao vanjski mišić, jedini dolazi u izravni kontakt sa soli i to regulira difuziju soli prema drugim unutrašnjim mišićima, *biceps femorisu*, a paralelno time, voda izlazi iz *biceps femoris* i kreće prema površini (Pérez-Alvarez i sur., 1998).

Dobivene vrijednosti u *biceps femorisu* za parametar a* bile su se u rasponu 4,37-5,46, što je znatno manje od a* vrijednosti *biceps femoris* određene u dalmatinskom pršutu (7,3-9,8), španjolskom Iberijskom i Serrano pršutu (16.6–18.9) i talijanskom Parma i San Daniele pršutu (15.9–17.7) (Marušić Radovčić i sur., 2016). Cilla i sur. (2006) u španjolskom Teruel pršutu su, između ostalog, odredili i vrijednost za a* parametar od 10,68, što je također znatno veće od vrijednosti dobivene u ovom radu. Razlog većeg parametra a* kod španjolskih vrsta pršuta je upotreba nitrata i nitrita tijekom proizvodnje koji utječu na intenzitet crvene boje gotovog proizvoda.

Vrijednosti parametra a*, za *semimebranosus*, bile su se u rasponu 2,99-3,99 te su opet bile znatno niže od a* vrijednosti *semimebranosus* određene u španjolskom Serrano pršutu (15,06-18,83) (García-Esteban i sur., 2003). Nešto manja razlika je u usporedbi sa španjolskom Teruel pršutom (8,72) (Cilla i sur., 2006).

a* i b* vrijednosti pokazale su statistički značajnu razliku ($P < 0,05$) između *biceps femoris* i *semimebranosus*.

Biceps femoris je kod svih ispitivanih uzoraka imao veće vrijednosti za a* i b* parametre u usporedbi sa *semimebranosus*.

b* vrijednosti u *biceps femorisu* bile su se u vrijednosti od 4,35 do 5,72, dok za *semimebranosus* od 2,72 do 4,14. U talijanskom Parma pršutu Rezende Costa i sur. (2008) odredili su b* parametar za *biceps femoris* od 2,38 što je manje od vrijednosti za b* određene

u ovom radu u uzorcima dimljenih pršuta. Marušić Radovčić i sur. (2016) dolili su nešto niže b^* vrijednosti u dalmatinskome pršutu (7,3-10,4). Dobivene vrijednosti *semimebranosusa* za parametar b^* kretale su se u rasponu 2,72-4,14, što je znatno manje od b^* vrijednosti *semimebranosusa* određene u španjolskom Serrano pršutu (16,02) (García-Esteban i sur., 2003) i španjolskom Teruel pršutu (6,16) (Cilla i sur., 2006).

4.2. TEKSTURA

Tekstura proizvoda ne ovisi samo o razgradnji miofibrilalnih proteina već i o drugim čimbenicima kao što su duljina sušenja, razgradnja vezivnog tkiva, sadržaj intramuskularne masti. Razgradnja proteina je razlog omekšavanja mesa. Intenzivna razgradnja miofibrilarnih proteina je zamijećena tijekom sušenja pršuta. Proteolizi su podložni strukturni proteini, kao što su titin, nebulin i troponin T, miozin i aktinin (Toldrá i sur., 1993). Produkti proteolitičke razgradnje aktina i titina su otkriveni u novijim istraživanjima (Sentandreu i sur., 2007c; Mora i sur., 2009). Za razliku od navedenog, pršuti proizvedeni od blijedog, mekanog i vedenastog mesa (PSE) nemaju navedene peptide. Primjenom analize teksture proizlazi da PSE pršuti imaju manju tvrdoću, elastičnost, kohezivnost i žvakljivost (Tabilo i sur., 1999).

U uzorcima dalmatinskih pršuta tekstura je određena pomoću teksturometra u mišićima *biceps femoris* i *semimebranosus*. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4., a određeni su sljedeći parametri teksture: tvrdoća, adhezivna sila, kohezivnost, adhezivnost, gumenost, odgođena elastičnost, žvakljivost, otpornost, lom i vlaknastost.

Tablica 4. Rezultati određivanja parametra teksture pršuta (TPA metoda) u uzorcima dimljenog pršuta u dva različita mišića

Uzorak	Proizvođač 1	Proizvođač 2	Proizvođač 3	P-vrijednost
<i>Biceps femoris</i>				
Tvrdoća 1 (N)	42,82 ± 7,48	32,93 ± 3,69	27,42 ± 2,14	0,109
Tvrdoća 2 (N)	37,85 ± 6,73	27,05 ± 3,56	22,10 ± 1,51	0,06
Adhezivna sila (N)	-0,87 ± 0,12 ^a	-0,77 ± 0,13 ^{ab}	-0,48 ± 0,05 ^b	0,041
Kohezivnost	0,54 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,869
Adhezivnost (Nmm)	0,53 ± 0,05 ^{ab}	0,70 ± 0,10 ^b	0,33 ± 0,05 ^a	0,007
Gumenost (N)	23,56 ± 4,56	16,57 ± 2,93	14,59 ± 1,27	0,142
Odgođena elastičnost (mm)	-2,52 ± 0,14	-2,30 ± 0,22	-2,30 ± 0,12	0,559
Žvakljivost (Nmm)	20,83 ± 1,20	37,30 ± 8,59	33,88 ± 3,70	0,102
Otpornost	0,42 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,204
Lom (N)	23,56 ± 7,40	35,46 ± 1,82	20,87 ± 3,61	0,102
Vlaknastost (mm)	4,71 ± 0,87	5,14 ± 0,80	3,93 ± 0,96	0,617
<i>Semimembranosus</i>				
Tvrdoća 1 (N)	86,14 ± 16,86 ^b	64,58 ± 8,55 ^b	28,57 ± 1,74 ^a	0,005
Tvrdoća 2 (N)	76,70 ± 14,76 ^b	57,14 ± 7,68 ^b	24,83 ± 1,49 ^a	0,004
Adhezivna sila (N)	-1,39 ± 0,39 ^a	-1,00 ± 0,15 ^{ab}	-0,49 ± 0,07 ^b	0,051
Kohezivnost	0,47 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,03 ^a	0,56 ± 0,01 ^b	0,008
Adhezivnost (Nmm)	0,69 ± 0,08 ^b	0,38 ± 0,08 ^a	0,65 ± 0,10 ^{ab}	0,038
Gumenost (N)	41,98 ± 9,39 ^b	29,81 ± 2,59 ^{ab}	16,17 ± 1,29 ^a	0,015
Odgođena elastičnost (mm)	-2,78 ± 0,22	-2,53 ± 0,23	-2,34 ± 0,16	0,328
Žvakljivost (Nmm)	95,96 ± 26,32 ^b	69,50 ± 3,13 ^{ab}	39,39 ± 4,55 ^a	0,056
Otpornost	0,35 ± 0,03 ^a	0,37 ± 0,04 ^{ab}	0,47 ± 0,03 ^b	0,031
Lom (N)	72,53 ± 21,41 ^b	44,27 ± 2,53 ^{ab}	21,31 ± 2,67 ^a	0,030
Vlaknastost (mm)	2,44 ± 0,30 ^a	4,58 ± 0,92 ^{ab}	5,35 ± 0,94 ^b	0,041

* Različita slova (a, b) u istome retku znače statistički značajnu razliku (P < 0,05).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da postoji statistički značajna razlika u *biceps femorisu* u adhezivnoj sili i adhezivnosti između proizvođača dimljenih pršuta ($P < 0,05$). Kod *semimembranosusa* statistički značajna razlika nije vidljiva samo kod odgođene elastičnosti, dok kod svih ostalih parametara postoji.

Uzorci su komprimirani dva puta do 50 % deformacije brzinom od 1 mm/s (vrijeme razmaka između 2 ciklusa 5 s). U ispitivanim uzorcima *biceps femorisa* **tvrdóća 1**, nakon prve kompresije, kretala se u rasponu 27,42-42,82 N. Dok su se rezultati za **tvrdóću 2**, nakon druge kompresije, kretali u vrijednostima od 22,10 do 37,85, što je u skladu s tvrdóćom (21,39 N) određenom u španjolskom Teruel pršutu (Cilla i sur., 2006) i s tvrdóćom (21,36-26,17 N) određenom u španjolskom Serrano pršutu (García-Esteban i sur., 2004). Harkouss i sur. (2015) su u francuskom Bayonne pršutu odredili tvrdóću od 183 N što je puno više od vrijednosti dobivene u ovom radu. Nešto veće vrijednosti određene su u slovenskom Kraškom pršutu (62 N) (Andronikov i sur., 2013). Pugliese i sur. (2015) su također dobili više rezultate za istraživanje Kraškoga pršuta (52,51 N).

U ispitivanim uzorcima *semimembranosusa* **tvrdóća 1** i **tvrdóća 2** su imale statistički značajnu razliku ($P < 0,05$) između sva tri proizvođača. **Tvrdóća 1** se kretala u rasponu 28,57-86,14, dok **tvrdóća 2** od 24,83 do 76,70. Dobivene vrijednosti su u skladu s tvrdóćom (84,48 N) određenom u Teruel pršutu (Cilla i sur., 2006). Prema istraživanju Harkosuss i sur. (2015) vrijednost tvrdóće u *semimembranosusu* (122 N) bila je znatno viša od vrijednosti dobivene u ovom radu. U istraživanju Kraškoga pršuta, Pugliese i sur. (2015) isto su dobili više vrijednosti za tvrdóću (107,22 N).

Za **adhezivnu silu**, u *biceps femorisu* u ispitivanim uzorcima dimljenih pršuta, dobivena vrijednost kretala se u rasponu (-0,48) – (-0,87) N. Dok je kod *semimembranosusa* bila u rasponu (-0,49) – (-1,39) N.

Izmjerena **kohezivnost** u ispitivanim uzorcima dimljenih pršuta, kod *biceps femorisa*, kretala se u rasponu 0,53-0,54, što je u skladu s kohezivnošću određenoj u Teruel pršutu (0,53) (Cilla i sur., 2006), a slične vrijednosti za kohezivnost određene u Kraškom pršutu (Andronikov i sur., 2013). Pugliese i sur. (2015) dobili su nešto višu vrijednost za kohezivnost (0,63) u Kraškom pršutu. Slične vrijednosti dobili su i Rezende Costa i sur. (2008) za španjolski Serrano (0,69), talijansku vrstu pršuta (0,63), brazilski Parma (0,65) i brazilski Serrano pršut

(0,69). U francuskom Bayonne pršutu, Harkouss i sur. (2015) izmjerili su kohezivnost od 0,49 što je nešto niže od vrijednosti dobivene u ovome radu.

U uzorcima *semimembranosusa* dobivena vrijednost za **kohezivnost** kretala se u rasponu 0,47-0,56, što je u skladu s kohezivnošću dobivenoj u francuskom Bayonne pršutu (0,49) (Harkouss i sur., 2015) i u Kraškom pršutu (0,53) (Andronikov i sur., 2013).

Cilla i sur. (2006) dobili su malo nižu vrijednost za kohezivnost (0,439) u španjolskom Teruel pršutu. Još manju vrijednost za kohezivnost, u rasponu 0,376-0,390 dobili su Morales i sur. (2007) u španjolskom Serrano pršutu.

U ispitivanim uzorcima, kod *biceps femorisa*, **adhezivnost** se kretala u rasponu 0,33-0,70 Nmm. Slične rezultate u svome istraživanju španjolskoga pršuta Serrano su dobili Morales i sur. (2007) gdje se vrijednost za adhezivnost kretala u rasponu 0,322-0,369 Nmm. Istraživanje adhezivnosti u francuskom Bayonne pršutu rezultiralo je vrijednošću od -13,3 Nmm (Harkouss i sur., 2015), što je dosta niže od vrijednosti dobivenih u ovome radu. Slične, niske vrijednosti za adhezivnost (-51,72 Nmm), dobili su i Cilla i sur. (2006) u španjolskom Teruel pršutu te Laureati i sur. (2014) u talijanskom Parma pršutu (-0,42 Nmm).

Izmjerena **adhezivnost** kod *semimembranosusa* u ispitivanim uzorcima dimljenih pršuta kretala se u rasponu 0,38-0,69 Nmm, što je znatno više od adhezivnosti (-55,28 Nmm) određene u španjolskom Teruel pršutu (Cilla i sur., 2006). Pugliese i sur. (2015) su također dobili niže vrijednosti za adhezivnost (-5,12) u slovenskom Kraškom pršutu. Morales i sur. (2007) proveli su istraživanje na španjolskom Serrano pršutu u kojem su odredili adhezivnost u rasponu 0,376-0,390 Nmm što je u skladu s adhezivnošću dobivenoj u ovom radu.

U ispitivanim uzorcima dimljenih pršuta **gumenost** za *biceps femoris* se kretala od 14,59 do 23,56 N, što je u skladu s vrijednostima za gumenost određene u španjolskom Serrano pršutu (12,66-16,04 N) (García-Esteban i sur., 2004) i u Toscano pršutu (14,40 N) (Laureati i sur., 2014). U slovenskom Kraškom pršutu, Andronikov i sur. (2013) su odredili vrijednost gumenosti pršuta u rasponu od 35 do 51 N, dok su Pugliese i sur. (2015) dobili vrijednost od 33,54 N. Laureati i sur. (2014) dobili su vrijednost za gumenost u Parma pršutu (2,99 N) i u San Daniele (3,23 N) što je puno manje od vrijednosti za gumenost određene u ovom radu.

U uzorcima *semimembranosus* dobivena vrijednost za **gumenost** kretala se u rasponu 16,17-41,98 N, što je znatno niže od gumenosti (68-110 N) određene u Kraškom pršutu (Andronikov i sur., 2013). Također, u Kraškom pršutu, višu vrijednost za gumenost su dobili i Pugliese i sur. (2015) (70,91 N).

Izmjerena **odgođena elastičnost** uzorcima *biceps femorisa* kretala se u rasponu (-2,30)-(-2,52) mm, što je znatno manje od vrijednosti za odgođenu elastičnosti (0,751 mm) određene u francuskom Bayonn pršutu (Harkouss i sur., 2015). Vrijednosti znatno veće od odgođene elastičnosti određene u ovome istraživanju dobili su i Pugliese i sur. (2015) u slovenskom Kraškom pršutu (4,79 mm), Cilla i sur. (2006) u španjolskom Teruel pršutu (0,516 mm), García-Esteban i sur. (2004) u španjolskom Serrano pršutu (0,802-0,850 mm).

Odgođena elastičnost određena u uzorcima *semimembranosus* kretala se u rasponu (-2,34)-(2,78) mm. Dobivene vrijednosti su znatno niže u usporedbi s odgođenom elastičnosti određene u Bayonn pršutu (0,663 mm) (Harkouss i sur., 2015), u Kraškom pršutu (4,68 mm) (Pugliese i sur., 2015), u španjolskom Serrano pršutu (0,351-0,360 mm) (Morales i sur., 2007) i u španjolskom Teruel pršutu (0,454 mm) (Cilla i sur., 2006).

U ispitivanim uzorcima dimljenih pršuta **žvakljivost** za *biceps femoris* se kretala u rasponu 20,83-37,30 Nmm, što je više od dobivenih vrijednosti za žvakljivost koju su Laureati i sur. (2014) izmjerili u Parma pršutu (1,44 Nmm), San Daniele (1,62 Nmm) te Toscano pršutu (8,68 Nmm). Pugliese i sur. (2015) u Kraškom pršutu su odredili žvakljivost od 160,57 Nmm.

Izmjerena **žvakljivost** u uzorcima *semimembranosus* kretala se u rasponu 39,39-95,96 Nmm, što je u skladu s vrijednostima koje su dobili Andronikov i sur. (2013) u slovenskom Kraškom pršutu (68-110 Nmm). U španjolskom Teruel pršutu, Cilla i sur. (2006) su izmjerili manju žvakljivost (17,8 Nmm), dok su Pugliese i sur. (2015) u Kraškom pršutu odredili veću žvakljivost od 334,25 Nmm.

U uzorcima *biceps femorisa* **otpornost** se kretala 0,42-0,48, dok je za *semimembranosus* bila 0,35-0,47. U slovenskom Kraškom pršutu su određene niže vrijednosti. Za *biceps femoris* izmjerena **otpornost** se kretala u rasponu 0,19-0,22, a za *semimembranosus* 0,15-0,18 (Andronikov i sur., 2013).

U uzorcima *biceps femorisa* **lom** se kretao u vrijednosti 20,87-35,46 N, dok se **vlaknastost** kretala 3,93-5,14 mm. Dok je za *semimembranosus* vrijednost **loma** bila u rasponu 21,31-72,53 N, a **vlaknastost** 2,44-5,35 mm.

Kao što je i očekivano, uzorci *semimembranosusa* pokazali su veću tvrdoću, adhezivnost, lom, žvkljivost i gumenost, ali nižu kohezivnost i otpornost nego *biceps femoris*, što je i u skladu s ispitivanjem i dobivenim rezultatima teksture u slovenskom Kraškom pršutu Andronikova i sur. (2013). *Biceps femoris*, kao unutarnji mišić, manje je izložen djelovanju atmosfere u odnosu na *semimebranosus* koji je više isušen, pa samim time i ima veću tvrdoću, žvkljivost i gumenost. U vodi djeluju jake kohezivne sile jer je voda jako polarna molekula, a *biceps femoris* sadrži veći udio vode u odnosu na *semimembranosus* te sukladno tome, *biceps femoris* pokazuje višu kohezivnost.

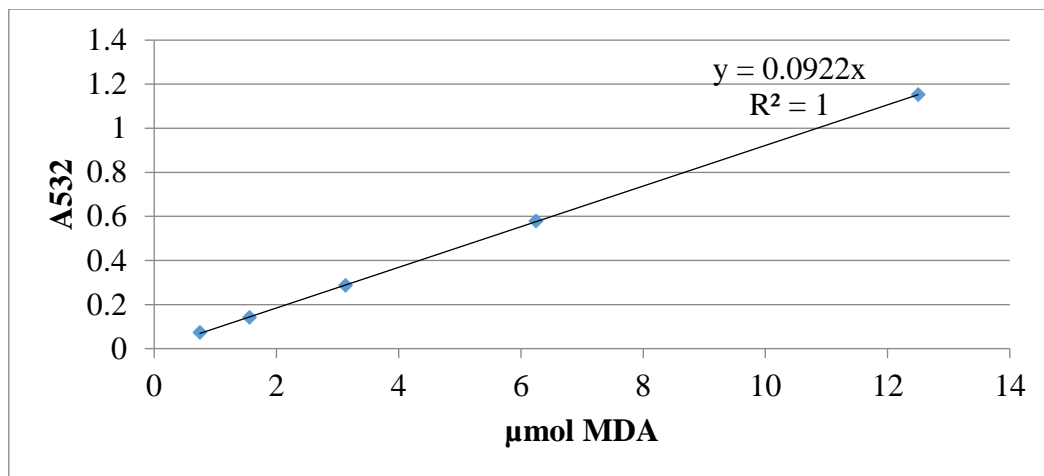
Mišići *biceps femoris* i *semimebranosus* podvrgavaju se različitim uvjetima tijekom procesa proizvodnje dimljenog pršuta. *Semimebranosus* je vanjski mišić koji ima visok udio NaCl-a u prvim fazama procesa i brzo smanjuje udio vode, dok je *biceps femoris* unutarnji mišić s nižim udjelom NaCl-a tijekom prvih faza postupka i sa većim udjelom vode tijekom procesa. To podrazumijeva veću aktivnost proteolize u *biceps femoris* mišiću, što utječe na teksturu. Nasuprot tome, u *semimebranosus* mišiću, manji udio vode se može postići na površini, što utječe na tvrdoću proizvoda (Morales i sur., 2007).

Velika tvrdoća pršuta nastaje kao posljedica prekomjernog prešanja i/ili isušenja. Preveliko opterećenje butova tijekom prešanja umanjuje mekoću i sočnost pršuta (Károlyi, 2009).

4.3. TBA TEST

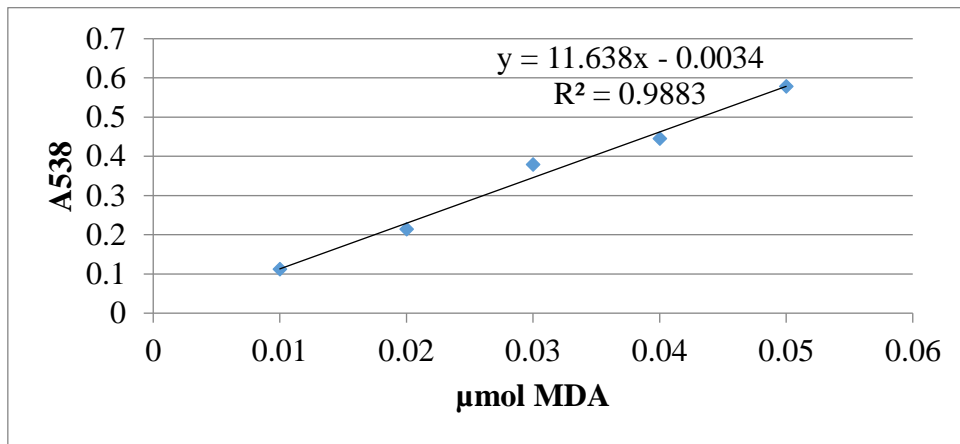
Uzrok kvarenja mesa i mesnih proizvoda je lipidna oksidacija. Lipidna oksidacija odvija se na masnim kiselinama, posebice na polinezasićenim masnim kiselinama. Tada nastaju razni produkti koji mijenjaju kvalitetu proizvoda (mijenja se boja, aroma, okus, tekstura, a čak i nutritivna vrijednost). Primarni produkti autoksidacije su hidroperoksidi. Njihovom rezgradnjom nastaju sekundarni produkti kao pentanal, heksanal, 4-hidroksinonenal i malondialdehid (MDA). Test tiobarbiturne kiseline (TBARS test) se koristi za detekciju oksidacije nezasićenih masnih kiselina i masti. Ovisi o razvoju crvenog pigmenta koji nastaje reakcijom TBA s MDA. Koncentracija MDA određena je metodom po Lemon i sur. (1975) i metodom po Bruna i sur. (2001).

Prema TBARS metodi po Bruni i sur. (2001), koncentracija MDA u uzorcima izračunata je pomoću kalibracijske krivulje prikazane na slici 12.



Slika 12. Kalibracijska krivulja za određivanje stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Bruna i sur. (2001)

Prema TBARS metodi po Lemonu (1975), koncentracija MDA u uzorcima izračunata je na temelju baždarnog pravca prikazanog na slici 13.



Slika 13. Kalibracijska krivulja za određivanje stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Lemonu (1975)

Tablica 5. Rezultati određivanja stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Bruna i sur. (2001) u uzorcima dimljenog pršuta u dva različita mišića

mg MDA/kg uzorka	<i>Biceps femoris</i>	<i>Semimebranosus</i>	p-vrijednost
Proizvođač 1	0,48 ± 0,02 ^b	0,53 ± 0,02 ^b	0,185
Proizvođač 2	0,43 ± 0,02 ^b	0,50 ± 0,03 ^b	0,090
Proizvođač 3	0,31 ± 0,01 ^a	0,35 ± 0,01 ^a	0,093
p-vrijednost	0,000	0,005	

* Različita slova (a, b) u istome stupcu znače statistički značajnu razliku (P < 0,05).

Tablica 6. Rezultati određivanja stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Lemonu (1975) u uzorcima dimljenog pršuta u dva različita mišića

mg MDA/kg uzorka	<i>Biceps femoris</i>	<i>Semimebranosus</i>	p-vrijednost
Proizvođač 1	0,30 ± 0,03 ^b	0,39 ± 0,04 ^b	0,085
Proizvođač 2	0,32 ± 0,00 ^{bA}	0,37 ± 0,02 ^{Bb}	0,018
Proizvođač 3	0,19 ± 0,01 ^{aA}	0,25 ± 0,01 ^{aB}	0,003
p-vrijednost	0,001	0,004	

* Različita slova (a, b) u istome stupcu znače statistički značajnu razliku (P< 0,05).

** Različita slova (A, B) u istome retku znače statistički značajnu razliku (P< 0,05).

Vrijednosti dobivene određivanjem stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Bruna i sur. (2001) prikazane u tablici 5. pokazuju statistički značajnu razliku (P<0,05) u uzorcima dimljenog Dalmatinskog pršuta između različitih proizvođača. Statistički nije postojala razlika (P >0,05) između mišića *biceps femoris* i *semimembranosus*. Vrijednosti za *biceps femoris* dobivene mjerenjem stupanja oksidacije lipida iznosile su 0,31-0,48 mg MDA/kg uzorka, dok su za *semimembranosus* kretale se u rasponu 0,35-0,53 mg MDA/ kg uzorka.

Niže vrijednosti (prikazane u tablici 6.) su određene TBARS metodom po Lemonu (1975) u usporedbi s vrijednostima dobivenim određivanjem stupnja oksidacije masti TBARS metodom po Bruni i suradnicima (2001). Statistički je postojala razlika (P<0,05) u uzorcima između proizvođača te između mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* kod proizvođača 2 i 3. Vrijednosti za *biceps femoris* dobivene mjerenjem stupanja oksidacije lipida iznosile su 0,19-0,32 mg MDA/kg uzorka, dok su za *semimembranosus* kretale se u rasponu 0,25-0,39 mg MDA/kg uzorka.

U istraživanju dalmatinskoga pršuta, Marušić Radovčić i sur. (2016), su dobili vrijednosti 0,2-0,8mg MDA/kg uzorka za *biceps femoris* što je u skladu s vrijednostima dobivenim u ovome radu u obje TBARS metode. Marušić i sur. (2011), su dobili vrijednosti 0,42- 0,44 mg MDA/kg uzorka za *biceps femoris* pri istraživanju Istarskog pršuta, što se podudara s rezultatima ovoga istraživanja za TBARS metodu po Bruni i sur (2001), dok su prema Lemonu (1975) te vrijednosti malo više.

Dobivene vrijednosti za oksidaciju masti u Iberijskom pršutu iznosile su 0,38 – 0,48 mg MDA/kg uzorka (Andrés i sur., 2004) što je u skladu s vrijednostima dobivenim u TBARS metodi po Bruni i sur. (2001), dok su te vrijednosti više u usporedbi s metodom po Lemonu (1975). Fuentes i sur. (2014) su dobili vrijednost 0,34 mg MDA/kg uzorka za *biceps femoris* što je opet u skladu s vrijednostima dobivenim u ovome radu u obje TBARS metode.

Kęska i sur. (2016), u istraživanju poljskog pršuta u uzorcima *semimembranosus*, su dobili TBA vrijednost 0,19 mg MDA/kg uzorka, što je znatno niže od vrijednosti dobivenih u ovome istraživanju u obje TBARS metode.

Istarski pršut je imao nešto višu koncentraciju MDA zbog proizvodnje pršuta bez kože i potkožnog masnog tkiva pa je tako veći dio površine buta izložen djelovanju kisika i svjetla te je bila nešto veća oksidacija masti za razliku od dalmatinskog kojem je *biceps femoris* ipak bio zaštićen od djelovanja kisika i svjetla jer je mišić bio zaštićen sa kožom i potkožnim masnim tkivom, dok *semimembranosus* se nalazi u blizini površine te je više izložen djelovanju atmosfere. To je ujedino i razlog veće TBA vrijednosti u uzorcima *semimembranosusa* u odnosu na uzorke *biceps femorisa*.

Dio MDA nastaje procesom oksidacije, no valja istaknuti da nastaje i raspadom lipidnih peroksida dodatkom kiseline i zagrijavanjem tijekom samog postupka određivanja koncentracije MDA (Guillén-Sans i Guzmán-Chozas, 1998).

Prema dobivenim rezultatima, uspoređujući obje TBARS metode možemo zaključiti da su metodom po Bruna i sur. (2001) zabilježene veće vrijednosti za TBARS test od metode po Lemonu (1975) te su se te dobivene vrijednosti poklapale s drugim TBA vrijednostima dobivenima u drugim istraživanjima, u znanstvenim radovima, što znači da je metoda po Bruna i sur. (2001) preciznija za određivanje stupnja oksidacije masti u pršutima.

4.4. KARBONILI

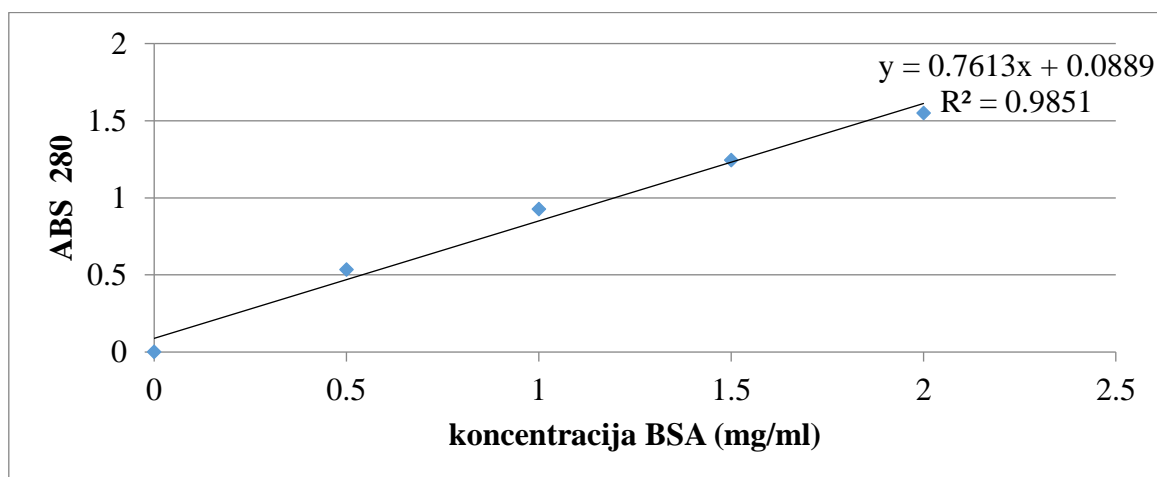
Metoda DNPH je rutinski postupak koji omogućuje kvantifikaciju ukupne količine karbonila iz uzorka proteina (Estèvez i sur., 2008).

Najčešće korištena metoda koristi 2,4-dinitrofenilhidrazin, koji u reakciji s karbonilnom skupinom daje stabilni 2,4-dinitrofenil hidrazon. Ta skupina apsorbira ultraljubičastu svjetlost, tako da se ukupni karbonilni udio proteina može odrediti spektrofotometrijom (Dalle-Donne i sur., 2003).

Sadržaj karbonila određen je spektrofotometrijski na 370 nm ($\epsilon = 21.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a sadržaj proteina procijenjen mjerenjem apsorbancije uzorka na 280 nm.

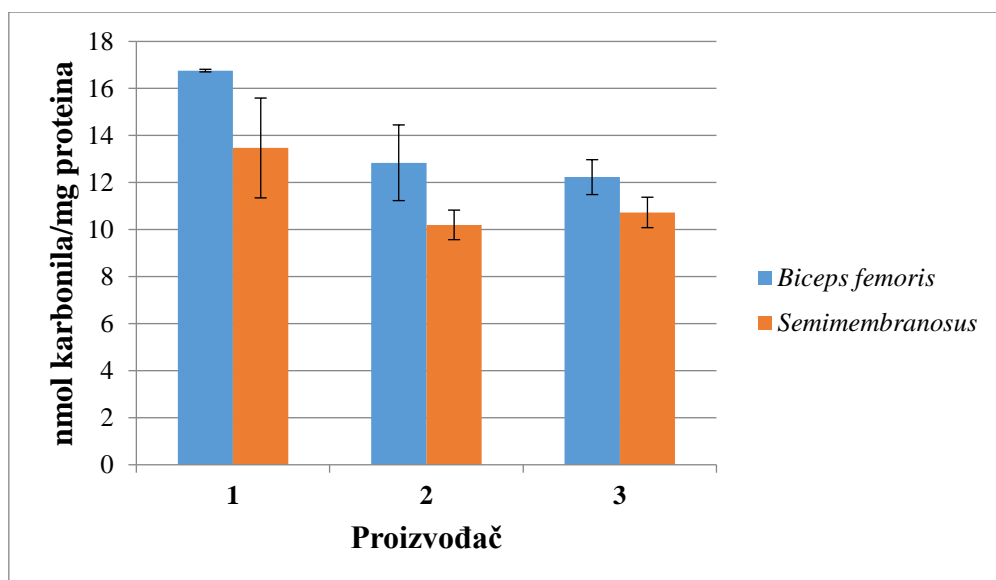
Koncentracija proteina u svakom uzorku izračunata je na temelju baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja BSA (od 0,5 mg/mL do 2 mg/mL).

Baždarnom pravcu BSA pridružena je odgovarajuća jednadžba pravca te je izračunat i koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,985 (slika 14).



Slika 14. Baždarni pravac BSA

Koncentracija karbonila određena je prema formuli, a rezultati su izraženi kao nmol karbonila po mg proteina korištenjem adsorpcijskog koeficijenta za proteinske hidrazone $\xi=21.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



Slika 15. Grafički prikaz koncentracije karbonila određenih DNPH metodom u uzorcima dimljenog pršuta u dva različita mišića

Koncentracija karbonila u *biceps femorisu* kretala se u rasponu od 10,57-16,84 nmol karbonila/mg proteina, dok je u uzorcima *semimebranosusa* bila u rasponu od 9,31-16,47 nmol karbonila/mg proteina (slika 15). Prema dobivenim vrijednostima, nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) u stupnju oksidacije proteina između mišića *biceps femoris* i *semimebranosus*.

U istraživanju Wanga i sur. (2011) na kineskom Xuanwei pršutu, koncentracija karbonila u *semimebranosusu* bila je 1,57 nmol karbonila/mg proteina, a u *biceps femorisu* 0,94 nmol karbonila/mg proteina, što je znatno manje od koncentracije karbonila određenih u ovom radu.

Koncentracija karbonila u *semimebranosusu* je znatno veća od koncentracije karbonila u *biceps femorisu* zato što je *semimebranosus* bliži površini i više je izložen djelovanju kisika.

U istraživanju koje su proveli Cava i sur. (2009) na španjolskom Iberijskom pršutu, u uzorcima *biceps femoris*, koncentracija karbonila se kretala u rasponu 6,8-10,9 nmol karbonila/mg proteina što je znatno manje od koncentracije karbonila dobivenog u ovom radu. Slične rezultate su dobili i Ventanas i sur. (2007) u svome istraživanju Iberijskoga pršuta, gdje se koncentracija karbonila u *biceps femorisu* kretala u rasponu 6,84-8,87 nmol karbonila/mg proteina.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i postignutih rezultata te provedene rasprave mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Boja je određena L^* , a^* i b^* vrijednostima te su one u svim ispitivanim uzorcima dimljenih dalmatinskih pršutabile veće u *biceps femorisu* nego u *semimebranosusu*. *Biceps femoris* je unutarnji mišić te je manje izložen djelovanju atmosfere, prekriven je kožom i potkožnim masnim tkivom te ima veći udio vode u odnosu na vanjski mišić, *semimebranosus* koji je podložan površinskoj dehidraciji.
2. Rezultati određivanja parametara teksture TPA metodom u uzorcima Dalmatinskog pršuta, u *semimebranosusu* pokazali su veću tvrdoću, adhezivnost, lom, žvakljivost i gumenost, ali nižu kohezivnost i otpornost nego *biceps femoris*.
3. Uzorci *biceps femorisa* pokazali su manji stupanj oksidacije masti u odnosu na *semimebranosus* zbog toga što je *semimebranosus* vanjski mišić i više je izložen djelovanju kisika od unutarnjeg mišića *biceps femorisa*. Kao rezultat toga, *semimebranosus* je pokazao veće TBARS vrijednosti od *biceps femorisa*.
4. Pomoću DNPH metode određene su koncentracije karbonila u mišićima *biceps femorisu* i *semimebranosusu* te prema dobivenim vrijednostima nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) u stupnju oksidacije proteina. Koncentracija karbonila u *biceps femorisu* kretala se u rasponu 10,57-16,84 nmol karbonila/mg proteina, dok je u uzorcima *semimebranosusa* bila u rasponu 9,31-16,47 nmol karbonila/ mg proteina.

6. LITERATURA

Akagawa, M., Sasaki, D., Ishii, Y., Kurota, Y. Yotsu-Yamashita, M., Uchida, K., Suyama, K. (2006) New method for the quantitative determination of major protein carbonyls, α -aminoadipic and γ -glutamic semialdehydes: investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1059-65.

Andrés, A.I., Cava, R., Ventanas, J., Thovar, V., Ruiz, J. (2004) Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of salt content and processing conditions. *Meat Sci.* **68**, 45–51.

Andronikov, D., Gašperlin, L., Polak, T., Žlender, B. (2013) Texture and quality parameters of Slovenian Dry-Cured Ham Kraski prsut according to mass and salt levels. *Food Technol. Biotechnol.* **51**(1), 112-122.

Anonymous 1 (2014) slika Dalmatinskog pršuta, <http://www.prsut-vostane.hr/hr/dalmatinski_prsut.html>. Pristupljeno 25 lipnja 2018.

Anonymus 2 (2014) Faza soljenja u proizvodnji pršuta, <http://www.prsut-vostane.hr/hr/faze_proizvodnje_prsuta.html>. Pristupljeno 26 lipnja 2018.

Anonymus 3 (2014) Faza prešanja butova u proizvodnji pršuta, <http://www.prsut-vostane.hr/hr/faze_proizvodnje_prsuta.html>. Pristupljeno 26 lipnja 2018.

Anonymus 4 (2014) Faza dimljenja i sušenja u proizvodnji pršuta, <http://www.prsut-vostane.hr/hr/faze_proizvodnje_prsuta.html>. Pristupljeno 26 lipnja 2018.

Anonymus 5 (2014) Faza zrenja u proizvodnji pršuta, <http://www.prsut-vostane.hr/hr/faze_proizvodnje_prsuta.html>. Pristupljeno 26 lipnja 2018.

Anonymous 6 (2018) Spektrofotometar Konica Minolta CM-700d, <<https://sensing.konicaminolta.asia/product/spectrophotometer-cm-700d/>>. Pristupljeno 14 srpnja 2018.

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.

Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 20313-20316.

Bruna, J. M., J. A. Ordóñez, M. Fernández, B. Herranz, and L. de la Hoz. (2001) Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. *Meat Sci.* **59**(1), 87-96.

Carrapiso, I.A., García, C. (2008) Effect of the Iberian pig line on dry-cured ham characteristics. *Meat Sci.* **80**, 529–534.

Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., Rosario Ramírez, M. (2009) Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innov. Food Sci. Emerg.* **10**, 76–81.

Cheng J. H. (2016) Lipid Oxidation in Meat. *J Nutr Food Sci.* **6**, 494.

Cilla, I., Martínez, L., Beltrán, J. A., Roncalés, P. (2006) Dry-cured ham quality and acceptability as affected by the preservation system used for retail sale. *Meat Sci.* **73**(4), 581–589.

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* **9**, 169-76.

Dransfield, E. (1994) Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Sci.* **36**, 105.

Decker, E.A., Xiong, Y.L., Calvert J.T., Crum, A.D., Blanchard, S.P. (1993) Chemical, physical, and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 186-9.

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

Estévez, M., Heinonen, M. (2010) Effect of phenolic compounds on the formation of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron and myoglobin. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4448–4455.

Estévez, M., Ollilainen, V., Heinonen, M. (2009) Analysis of protein oxidation markers α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC) electrospray ionization (ESI)-multistage tandem mass spectrometry (MS). *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3901-3910.

Estévez, M., Morcuende, D., Ventanas, S. (2008) Determination of oxidation. In: Handbook of Processed Meat and Poultry Analysis, (Mollet, L. M. L., Toldra, F., ured.), CRC Press: Boca Raton, FL, 141-162.

Fernández J., Pérez-Álvarez J. A., Fernández-López J. A. (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.* **59**(3), 345-353.

Fuentes, V., Ventanas, S., Ventanas, J., Estévez, M. (2014) The genetic background affects composition, oxidative stability and quality traits of Iberian dry-cured hams: Purebred Iberian versus reciprocal Iberian×Duroc crossbred pigs. *Meat Sci.* **96**(2), 737–743.

Ganhão R., Estévez M., Morcuende D. (2011) Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials. *Food Chem.* **126**(2), 772-778.

García-Esteban, M., Ansorena, D., Astiasarán, I. (2004) Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Sci.* **67**(1), 57–63.

García-Esteban, M., Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I. (2003) Optimization of instrumental colour analysis in dry-cured ham. *Meat Sci.* **63**(3), 287–292.

García-Rey, R. M., García-Garrido, J. A., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J., Luque de Castro, M. D. (2004) Relationship between pH before salting and dry-cured ham quality. *Meat Sci.* **67**, 625–632.

Garrison, W.M. (1987) Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.* **87**, 381-98.

Gray I. J., Monahan F. J. (1992) Measurement of lipid oxidation in meat and meat products, *Trends Food Sci. Technol.* **3**, 315-319.

Guillén-Sans, R., Guzmán-Chozas, M. (1998) The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38**, 315–330.

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.

Honikel, K.O. (1998) Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Sci.* **49**, 447–457.

Huff-Lonergan, E., Zhang, W., Lonergan, S.M. (2010) Biochemistry of postmortem muscle-lessons on mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.* **86**, 184-195.

Karolyi, D. (2009) Najčešći problemi u proizvodnji pršuta. *Meso.* **11**, 134-143.

Kęska, P., Libera, J., Stadnik, J. (2016) Comparison of Antioxidant Activity of Protein Isolates Derived from Selected Dry-Cured Meat Products. *J. Food Process. Preserv.* **41**(3), 12933.

Kos I., Madir A., Toić U. (2015): Dalmatinski pršut - oznaka zemljopisnog porijekla, Specifikacija proizvoda, Udruga Dalmatinski pršut.

Krvavica, M., Đugum, J. (2006) Proizvodnja pršuta u svijetu i kod nas. *Meso*, **7**, 355-365.

Laureati, M., Buratti, S., Giovanelli, G., Corazzin, M., P. Lo Fiego, D., 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.

Lemon, D.W. (1975) An improved TBA test for rancidity. New Series Circular No.51. Environment Canada Fisheries and Marine Service, Halifax Laboratory, Canada.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E. R. (1990) Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol.* **186**, 464–478.

Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., Schacter, E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Method Enzymol.* **233**, 346–357.

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 Technol.* **53**(11), 4093-4105.

Marušić, N., Petrović, M., Vidaček, S., Petrak, T., Medić, H. (2011) Characterization of traditional Istrian dry-cured ham by means of physical and chemical analyses and volatile compounds. *Meat Sci.* **88**, 786–790.

Mora, L., Sentandreu, M.A., Koistinen, K.M., Fraser, P.D., Toldrá, F., Bramley, P.M. (2009) Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in serrano dry - cured ham. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3228 – 3234.

Morales, R., Guerrero, L., Serra, X., Gou, P. (2007) Instrumental evaluation of defective texture in dry-cured hams. *Meat Sci.* **76**(3), 536–542.

Nishimura, T., Okitani, A., Rhue, M.R., Kato, H. (1990) Survey of neutral amino peptidases in bovine, porcine and chicken skeletal muscles. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2769-2775.

Park, D., Xiong, Y.L. (2007). Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Food Chem.* **103**, 607-616.

Parolari, G., Virgili, R., Schivazappa, C. (1994) Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Sci.* **38**, 117-122.

Parreño, M., Cussó, R., Gil, M., Sárraga, C. (1994) Development of cathepsin B, L and H activities and cystatin-like activity during two different manufacturing processes for Spanish dry-cured ham. *Food Chem.* **49**(1), 15-21.

Pérez-Alvarez, J.A., Sayas-Barberá, M.E., Fernández-López, J., Gago-Gago, M.A., Pagán-Moreno, M.J., Aranda-Catalá, V. (1998) Chemical and color characteristics of Spanish dry-cured ham at the end of the aging process. *J. Muscle Foods.* **10**, 195–201.

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 oznakama izvornosti i oznakama zemljopisnog podrijetla poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda (2012) *Narodne novine*, **102**, Zagreb.

Pravilnik o proizvodima od mesa (2012) *Narodne novine*, **131**, Zagreb.

Promeprat, A., Le Louët, L., Kondjoyan, A., Astruc, T., Santé-Lhoutellier, V., Gatellier, P., Daudin, J.D. (2011) Combined effect of meat composition and heating parameters on the physicochemical state of proteins. *Procedia Food Sci.* **1**, 1118-1125.

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.

Requena, J.R., Groth, D., Legname, G., Stadtman, E.R., Prusiner, S.B., Levine, R.L. (2001) Copper-catalyzed oxidation of the recombinant sha (29-231) prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(13), 7170-7175.

Registracija i zaštita naziva hrvatskih autohtonih proizvoda (2015), <<https://izvoz.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/Registracija%20i%20za%20zaštita%20naziva%20hrvatskih%20autohtonih%20proizvoda.pdf>>. Pristupljeno 15 lipnja 2018.

Rezende Costa, M., Filho, W.B., Silveira, E., Felício P.E. (2008) Colour and texture profiles of boneless restructured dry-cured hams compared to traditional hams. *Food Sci. Technol.* **65**, 169-173.

Rosell, C.M., Toldrá, F. (1998) Comparison of muscle proteolytic and lipolytic enzyme levels in raw hams from Iberian and White pigs. *J. Sci. Food Agric.* **76**, 117-122.

Sentandreu, M.A., Armenteros, M., Calvete, J.J., Ouali, A., Aristoy, M.C., Toldrá, F. (2007c) Proteomic identification of actin - derived oligopeptides in dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3613 – 3619.

Shacter, E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Met Rev.* **32**, 307-326.

Soladoye, O.P., Juarez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P., Estévez, M. (2015) Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. *Comp. Rev. Food Sci. & Food Safety.* **14**, 106-122.

Stadtman, E. R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biol. Med.* **9**, 315–325.

Stadtman, E. R., Berlett, B. S. (1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab. Rev.* **30**, 225–243.

Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *AminoAcids*, **25**, 207-218.

Tabilo, G., Flores, M., Fiszman, S., Toldrá, F. (1999) Postmortem meat quality and sex affect textural properties and protein breakdown of dry-cured ham. *Meat Sci.* **51**, 255 – 260.

Toldrà, F. (2002) Manufacturing of dry-cured ham. U: Dry-cured meat products. Trumbull, Connecticut, USA: Food & Nutrition Press Inc. str. 27-62.

Toldrá, F., Flores, M. (1998) The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38**, 331 – 352.

Toldrá, F., Rico, E., Flores, J. (1993) Cathepsin B, D, H and L activity in the processing of dry - cured ham. *J. Sci. Food Agr.* **62**, 157 – 161.

Utrera M., Estevez M. (2013) Impact of trolox, quercetin, genistein and gallic acid on the oxidative damage to myofibrillar proteins: The carbonylation pathway. *Food Chem.* **141**, 4000–4009.

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.

Virgili, R., Schivazappa, C., Parolari, G., Bordini, C. S., Degni, M. (1998) Proteases in fresh pork muscle and their influence on bitter taste formation in dry-cured ham. *J. Food Biochem.* **22**(1), 53-63.

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**(7), 1370–1377.

Xiong, Y.L. (2000) Protein oxidation and implications for muscle foods quality. U: Antioxidants in muscle foods, (Decker, E. A., Faustman, C., Lopez-Bote, C. J., ured.) Wiley, New York, str. 85-111.

Yiu, H., Wai-Kit, N., Rogers, R. (2001) Meat Science and Application. CRC Press.

Zhang, W. G., Xiao, S., Lee, E. J., Ahn, D. U. (2011) Consumption of oxidized oil increases oxidative stress in broilers and affects the quality of breast meat. *J. Agric. Food Chem.* **59**(3), 969–974.

