

Proteolitički procesi u dimljenom pršutu nakon faze zrenja

Jurković, Karmen

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:846634>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Karmen Jurković

1256/PI

**PROTEOLITIČKI PROCESI U
DIMLJENOM PRŠUTU NAKON
FAZE ZRENJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Helge Medić, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Ivne Poljanec, mag.ing.

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

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Helgi Medić na stručnom vodstvu, savjetima i pomoći oko izrade diplomskog rada.

Također, zahvaljujem i asistentici Ivni Poljanec na strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog rada

Veliko hvala mojoj obitelji; ocu, sestri i baki kojima i posvećujem ovaj Diplomski rad. Hvala Vam što ste mi omogućili studiranje i što ste sve ove godine bili uz mene, podržavali me i vjerovali u mene u najtežim trenucima.

Želim se zahvaliti mom Anti, kolegicama i prijateljima koji su mi uveliko olakšali i uljepšali ovo studentsko doba.

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

PROTEOLITIČKI PROCESI U DIMLJENOM PRŠUTU NAKON FAZE ZRENJA

Karmen Jurković, 1256/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti promjene na proteinima i parametrima teksture nakon zrenja Dalmatinskog pršuta u periodu od 12 mjeseci na uzorcima mišića *biceps femoris* (BF) i *semimembranosus* (SM). Određen je indeks proteolize, koncentracija proteina i koncentracija karbonila, kao indikator stupnja oksidacije proteina, te parametri teksture. BF i SM dva su najznačajnija mišića u pršutu, koji su tijekom prerade podvrgnuti različitim uvjetima. Veći indeks proteolize i veći stupanj oksidacije proteina određen je u BF u odnosu na SM. To se može objasniti većim udjelom vode u ovom mišiću i time jačom proteolitičkom aktivnošću ili većim stupnjem oksidacije proteina. BF, kao unutarnji mišić, manje je izložen djelovanju zraka u odnosu na SM koji je više isušen, pa samim time i ima veću tvrdoću. SM je rezultirao većim vrijednostima za parametre tvrdoće, adhezivne sile, odgođene elastičnosti i loma, dok je BF imao veće vrijednosti kohezivnosti, adhezivnosti, gumenosti, žvackljivosti, otpornosti i vlaknastosti.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 11 slika, 4 tablice, 66 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Helga Medić

Pomoć pri izradi: dipl. ing. Ivna Poljanec

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc.dr.sc. Nives Marušić Radovčić
2. prof.dr.sc. Helga Medić
3. doc.dr.sc. Mia Kurek
4. doc.dr.sc. Katarina Lisak Jakopović

Datum obrane: 22. rujna 2020.

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

PROTEOLYTIC PROCESSES IN SMOKED DRY-CURED HAM AFTER STAGE OF RIPENING

Karmen Jurković, 1256/PI

Abstract: The aim of this work was to determine the changes in proteins and texture parameters after ripening of Dalmatian smoked dry-cured ham in a period of 12 months on muscle samples of *biceps femoris* (BF) and *semimembranosus* (SM). Proteolysis index, protein concentration and carbonyl concentration were determined, which is an indicator of protein oxidation degree and texture parameters. The BF and SM are the two most important muscles in ham that are subjected to different conditions during processing. Higher proteolysis index and the degree of protein oxidation was determined in the BF than in the SM. This can also be explained by the higher content of water in this internal muscle and stronger proteolytic activity or a higher degree of protein oxidation. BF is less exposed to the air than the SM which is more dehydrated and therefore has higher hardness. SM resulted in higher values for hardness, adhesive force, springiness and fracture, while BF had higher values of cohesiveness, adhesiveness, gumminess, chewiness, stringiness, and fibrousness.

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

Thesis contains: 46 pages, 11 figures, 4 tables, 66 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: BSc Ivna Poljanec

Reviewers:

1. PhD. Nives Marušić Radovčić, Assistant professor
2. PhD. Helga Medić, Full professor
3. PhD. Mia Kurek, Assistant professor
4. PhD. Katarina Lisak Jakopović, Assistant professor

Thesis defended: 22 September 2020

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. PRŠUT.....	3
2.2. DALMATINSKI PRŠUT.....	4
2.2.1. Tehnološki postupak proizvodnje Dalmatinskog pršuta.....	5
2.3. PROTEOLIZA.....	8
2.3.1. Čimbenici koji utječu na proteolizu.....	10
2.3.2. Indeks proteolize.....	12
2.4. TEKSTURA.....	12
2.5. OKSIDACIJA PROTEINA.....	13
2.5.1. Karbonilacija.....	15
2.5.2. Metoda DNPH.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Priprema uzoraka za analizu.....	19
3.2. METODE RADA.....	20
3.2.1. Određivanje ukupnih karbonila.....	20
3.2.2. Određivanje indeksa proteolize.....	22
3.2.3. Određivanje teksture.....	24
3.2.4. Statistička obrada podataka.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. PROTEOLIZA.....	26
4.2. OKSIDACIJA PROTEINA.....	29
4.3. TEKSTURA.....	33
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA.....	40

1. UVOD

Pršut je trajni suhomesnati proizvod dobiven od svinjskog buta te jedan od najcjenjenijih i najkvalitetnijih proizvoda od mesa. Proizvodnja pršuta tradicionalno se veže uz mediteranske zemlje; Španjolsku, Italiju, Francusku, Portugal i Hrvatsku, u kojima prevladavaju pogodni klimatski uvjeti za prirodno sušenje i zrenje pršuta. Proces prerade svinjskog buta najvećim se dijelom zasniva na iskustvu i tradiciji, koju su proizvođači prenosili generacijama. Proizvodnja se sastoji od slijedećih faza: obrada buta, soljenje (samo morska sol), prešanje, dimljenje, sušenje i zrenje. U posljednje vrijeme ovaj proces je znatno unaprijeđen čemu su pridonijeli rezultati znanstvenih istraživanja koja su pojasnila razne biokemijske procese u mesu, bitne za stvaranje karakterističkih senzorskih svojstava pršuta.

Proteini, kao glavna komponenta mišića, imaju važnu ulogu u proizvodnim, senzorskim i nutritivnim karakteristikama gotovih mesnih proizvoda. Proteoliza obuhvaća niz biokemijskih reakcija u tkivima pršuta, koje sudjeluju u stvaranju karakteristične arome, okusa i mirisa tijekom procesa prerade te izravno sudjeluje u formiranju konzistencije pršuta temeljem razgradnje miofibrilarnih proteina koji grade mišićnu strukturu (Toldrá, 2002). Nastale slobodne aminokiseline sudjeluju kao supstrat u daljnjim reakcijama, koje doprinose formiranju konačne arome i okusa pršuta. Također, utječu na promjenu teksture mišića što rezultira omekšavanjem i većom sočnošću mesa. Proteoliza je jedan od najvažnijih čimbenika kvalitete konačnog proizvoda, a njen intenzitet može se kvantificirati kroz indeks proteolize.

Uz proteolizu, proteini mesa podležu i reakcijama oksidacije. Rezultat oksidacije proteina je karbonilacija tj. ireverzibilna modifikacija proteina koja dovodi do nastanka proteinskih karbonila, aldehida i ketona (Estévez i Heinonen, 2010). Oksidacija uzrokuje fizikalno-kemijske promjene u proteinima, uključujući razgradnju aminokiselina, smanjenje topljivosti zbog polimerizacije proteina, gubitak enzimske aktivnosti i narušenu probavljivost proteina (Xiong, 2000).

Najistraživaniji mišići pršuta u znanstvenoj literaturi su *semimembranosus* (SM) i *biceps femoris* (BF). *Semimembranosus*, kao vanjski mišić, u direktnom je kontaktu sa soli i atmosferskim utjecajima. Time je podložan bržoj dehidraciji što naposljetku rezultira većim sadržajem soli i manje vode. *Biceps femoris* je unutarnji mišić, pokriven kožom i potkožnim masnim tkivom te sadrži niži udio soli, ali viši udio vode (Bermúdez i sur., 2014). Anatomski

položaj i funkcija mišića imaju utjecaj na tijek i intenzitet proteolize, zbog različite kinetike raspodjele soli i vode u mišićima (Harkouss i sur., 2015). SM zbog veće dehidracije tijekom sušenja i zrenja rezultira nižom enzimskom aktivnosti (Parreño i sur., 1994), ali postiže veću tvrdoću (Karolyi, 2009).

Provedena su mnoga istraživanja sa svrhom određivanja utjecaja anatomske lokacije mišića na intenzitet proteolize, oksidaciju proteina i parametre teksture u različitim vrstama pršuta: francuski Bayonne (Therone i sur., 2011; Harkouss i sur., 2015), talijanski Parma, San Daniele i Toscano (Lauerati i sur., 2013; Koutina i sur., 2012), španjolski Iberijski (Cava i sur., 2009) i Serrano (Riuz Ramirez i sur., 2006), slovenski Kraški (Pugliese i sur., 2015) te hrvatski Dalmatinski (Marušić Radovčić i sur., 2019).

Cilj ovog rada bio je odrediti stupanj proteolize i oksidacije proteina te promjenu teksture nakon zrenja od 12 mjeseci na uzorcima Dalmatinskog pršuta na mišićima *biceps femoris* (BF) i *semimembranosus* (SM).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PRŠUT

Prvi pisani podaci o načinu sušenja svinjskog mesa potječu iz ranog rimskog doba, tadašnje Norcie u središnjoj Italiji. Izraz “prosciutto” etimološki potječe od latinskog “*prae exuctus*” što znači prosušen, jako suh. U pučkom jeziku prelazi iz “*perexuctus*” preko “*presciutto*”, koji u toskanskom dijalektu prelazi u “*prosciuto*”. Izraz se odnosi na usoljeni, začinjeni i osušeni zreli svinjski but, koji se konzumira tanko narezan (Krvavica i Đugum, 2006).

Pršut pripada kategoriji trajnih suhomesnatih proizvoda. To su toplinski neobrađeni proizvodi od svinjskog mesa sa ili bez pripadajućih kosti, potkožnog masnog tkiva i kože, s dodanim drugim sastojcima. Osim pršuta, trajni suhomesnati proizvodi od svinjskog mesa obuhvaćaju suhu šunku, suhu lopaticu, suhu vratinu ili buđolu, suhu pečenicu, suhu slaninu i pancetu (Pravilnik, 2018).

Pršut je trajni suhomesnati proizvod od svinjskog buta s kostima, sa ili bez kože i potkožnog masnog tkiva, sa ili bez nogice, bez repa, sa ili bez zdjeličnih kostiju. Proizvodi se postupkom suhog soljenja ili salamurenja, uz mogućnost dodatka drugih začina ili začinskog bilja, nakon čega slijede procesi sušenja i zrenja, sa ili bez provedbe postupka dimljenja (Pravinik, 2018).

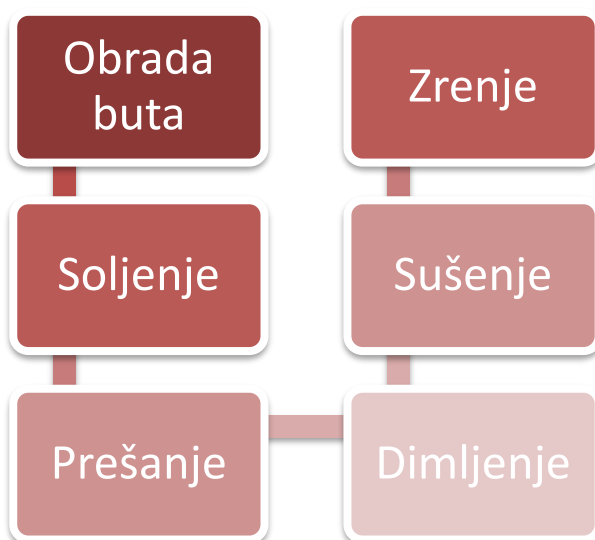
Proizvodnja pršuta tradicionalno je vezana za mediteranske zemlje poput Italije, Španjolske, Francuske i Hrvatske zbog posebne klime koja pogoduje prirodnom sušenju i zrenju pršuta. Najpoznatije talijanske vrste pršuta su Prosciutto di Parma, Prosciutto Toscano i Prosciutto di San Daniele. U Španjolskoj su to Serrano pršut, iberijski Guijuelo i Teruel pršut, a u Francuskoj Jambon de Bayonne i Corsican pršut. U predjelima Dalmacije i Istre, pršut se isprva proizvodio isključivo u seoskim domaćinstvima, uglavnom za vlastite potrebe, a dobar pršut je odavnina bio ponos svakog seljaka. Prepoznavanjem kvalitete i specifičnosti različitih vrsta pršuta počela se razvijati industrijska proizvodnja. Različitih čimbenici poput pasmine, ishrane svinja te klimatskih uvjeta, kvalitete buta i tehnologije prerade, rezultirali su pojavom velikog broja različitih vrsta pršuta (Krvavica i Đugum, 2006). Najpoznatije hrvatske vrste pršuta su Drniški, Dalmatinski, Istarski i Krčki pršut. Istrski pršut nositelj je Zaštićene oznake izvornosti (ZOI) dok su Drniški, Dalmatinski i Krčki nositelji Zaštićene oznake zemljopisnog

porijekla (ZOZP) na EU i nacionalnoj razini. Hrvatski pršuti kvalitetom mogu konkurirati najboljim svjetskim pršutima.

2.2 DALMATINSKI PRŠUT

„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 (*Fagus sp.*), hrasta (*Quercus sp.*) ili graba (*Carpinus sp.*) te podvrgnut procesu sušenja i zrenja u trajanju od najmanje godinu dana (Kos i sur., 2015).

„Dalmatinski pršut“ smije se proizvoditi od svježih butova s kosti dobivenih od svinja koje su potomci komercijalnih mesnatih pasmina, križanaca ili linija. Ne smije sadržavati nikakve dodatke (nitrite, nitrate, kalijev sorbat, askorbinsku i propionsku kiselinu) osim morske soli. Proizvodnja „Dalmatinskog pršuta“ smije se odvijati isključivo unutar administrativnih granica navedenih županija: Ličko-senjska, Zadarska, Šibensko-kninska, Splitsko-dalmatinska i Dubrovačko-neretvanska. Gotov proizvod odlikuje se osebujnom aromom, blagim slanim okusom, jednoličnom crvenom bojom mesa i poželjnom konzistencijom (Kos i sur., 2015)



Slika 1. Tehnološki postupak proizvodnje Dalmatinskog pršuta (Kos i sur., 2015)

2.2.1 Tehnološki postupak proizvodnje Dalmatinskog pršuta

Glavne faze proizvodnje dimljenog Dalmatinskog pršuta prikazane su na slici 1.

1. Odabir sirovine i obrada buta

Proizvodnja „Dalmatinskog pršuta“ započinje izborom kvalitetnih butova odgovarajućih karakteristika. Oštećeni butovi ili oni koji imaju vidljivu manju u kvaliteti mesa ili kože se odstranjuju iz daljnje prerade. 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 zdjelice kosti, odnosno bočna kost (*os ilium*), sjedna kost (*os ishii*), preponska kost (*os pubis*) i križna kost (*os sacrum*), a moraju biti odstranjeni i repni kralješci (v. *caudales*). But mora biti odvojen od zdjelice u bočnom zglobu (*articulus coxae*). Masa obrađenog buta iznosi najmanje 11 kg. Tijekom skladištenja i transporta butovi se čuvaju na temperaturi od 1 do 4 °C, a zamrzavanje butova nije dozvoljeno. Vrijeme između klanja svinja i početka soljenja buta ne smije biti kraće od 24 ni dulje od 96 sati. Meso buta mora biti crvenkasto-ružičaste boje, kompaktne strukture i suhe površine (Kos i sur., 2015).

2. Soljenje svinjskog buta

Prije soljenja istiskuje se zaostala krv iz cijelog buta. Soljenje pršuta provodi se pri temperaturi od 2 do 6 °C i relativnoj vlazi zraka višoj od 80 %. Tijekom soljenja potrebno je održavati nisku temperaturu, jer u protivnom može doći do nepovratnog smrdljivog zrenja. Ovo predstavlja najkritičniju fazu u tehnološkom procesu proizvodnje pršuta. Za kvalitetu gotovog proizvoda važno je brzo i ravnomjerno penetriranje soli u mišićje buta. Koristiti se može isključivo morska sol i ne smiju se upotrebljavati začini i konzervansi. Obradeni butovi se natrljaju po cijeloj površini sa suhom soli te se ostave ležati s medijalnom stranom okrenutom prema gore. Nakon 7 do 10 dana potrebno je butove ponovno natrljati sa soli i položiti idućih 7 do 10 dana s medijalnom stranom okrenutom prema dolje (Kos i sur., 2015).

Korištenje soli u pršutu snižava aktivitet vode (a_w) i time potiče inhibiciju razvoja mikroorganizama. Sol uzrokuje oštećenje enzima i drugih struktura bakterijskih stanica odgovornih za metaboličke procese (Dikeman i Devine, 2004), a također doprinosi povećanju osmotskog tlaka (π) na staničnim membranama mikroorganizama što posljedično može dovesti do plazmolize.

Osim konzervirajućeg djelovanja, soljenje je bitno za poboljšanje organoleptičkih svojstava mesnih proizvoda. Sol doprinosi kemijskim i biokemijskim reakcijama, poput poteolize, lipolize i oksidacije, koje sudjeluju u stvaranju tipične teksute i okusa pršuta (Lorenzo, 2014).

3. Prešanje butova

Prešanjem butova osigurava se pravilno oblikovanje pršuta. Butovi se prešaju tako da se slože u redove između ploča i opterete. Faza prešanja traje od 7 do 10 dana, nakon čega se butovi ispiru čistom vodom i cijede. Temperatura u fazi prešanja iznosi 2 do 6 °C, a relativna vlaga zraka mora biti viša od 80 % (Kos i sur., 2015).

4. Dimljenje i sušenje pršuta

Pravilno soljeni butovi, isprani i ocijeđeni vežu se špagom ili se vješaju na kuku od nehrđajućeg čelika iznad petne kvrge. Prije dimljenja potrebno je ujednačiti temperaturu buta s temperaturom komore u kojoj se dimljenje provodi. Komora mora imati otvore za zrak zaštićene mrežicom, kako kukci ili druge štetočine ne bi mogle ući. U komori se odvija hladno dimljenje uporabom dima dobivenog izgaranjem tvrdog drva ili piljevine bukve (*Fagus sp.*), hrasta (*Quercus sp.*) ili graba (*Carpinus sp.*). Porastom temperature dimljenja može doći do denaturacije bjelančevina u površinskom sloju pršuta, što može stvoriti prepreku slobodnom izlasku vode iz unutarnje muskulature buta, a time i kvarenje pršuta (Kos i sur., 2015). Dimljenje i sušenje pršuta traje do najviše 45 dana.

Konzervirajuće djelovanje dimljenja zasniva se na antioksidativnom djelovanju dima koje je posljedica aktivnosti fenola i njihova vezanja za slobodne radikale te baktericidnom i fungicidnom djelovanju. Za to su odgovorni formaldehidi, smole, masne kiseline, ugljikovodici, amonijak, octena i mravlja kiselina, alkoholi i drugi. Uloga dimljenja je od posebnog značaja za dobivanje specifičnog, ugodnog mirisa i okusa mesa po dimu te zlatnosmeđe do smeđe boje pršuta (Kovačević, 2017).

Sušenje značajno mijenja senzorska svojstva, prvenstveno zbog gubitka određenih hlapljivih spojeva arome koji otparavaju zajedno s vodenom parom te koncentriranja u vodi otopljenih tvari odgovornih za okus i miris proizvoda. Prosječni gubitak vode, odnosno proizvodni kalo pršuta iznosi 30 do 40 %. Smanjenjem aktiviteta vode stvaraju se nepovoljni uvjeti za razvitak patogenih mikroorganizama te mikroorganizama uzročnika kvarenja i u sinergiji s ostalim metodama konzerviranja, povećava se trajnost proizvoda (Kovačević, 2017). Sušenjem se

smanjuje masa i volumen pršuta, što olakšava daljnje rukovanje pri skladištenju i transportu gotovog proizvoda.

5. Zrenje pršuta

Nakon dimljenja i sušenja pršuti se premještaju na zrenje u zamračene prostorije sa stabilnom mikroklimom i s otvorima za izmjenu zraka zaštićene od ulaska kukaca i ostalih nametika. Za vrijeme trajanja zrenja temperatura ne prelazi 20 °C, a relativna vlaga zraka održava se ispod 90 %. Pravilnom temperaturom i vlagom osigurava se ravnomjeren gubitak vode i pravilno zrenje pršuta. Zrenje predstavlja proteolitičku i lipolitičku razgradnju mišićnog i masnog tkiva kataliziranu endogenim enzima (Kos i sur., 2015). Nakon godinu dana od dana početka soljenja pršut je zreo i spreman za konzumaciju.



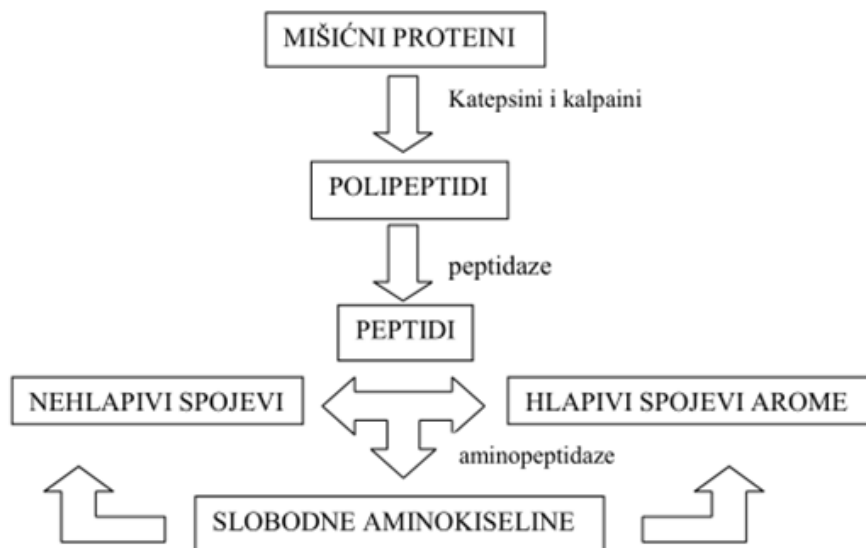
Slika 2. Dalmatinski pršut (Anonymous 1, 2020)

Proizvod dobiva oznaku zemljopisnog podrijetla „Dalmatinski pršut“ nakon što certifikacijsko tijelo utvrdi sukladnost proizvoda sa specifikacijom. Sve opisane faze proizvodnje moraju se odvijati u propisanom zemljopisnom području i proizvod treba imati sva specifikacijom propisana fizikalno-kemijska i senzorska svojstva. Zajednički znak Dalmatinskog pršuta je ovalnog oblika unutar kojeg se nalaze tri lavlje glave, a na gornjem vanjskom obodu piše „Dalmatinski pršut“. Znak se nanosi nakon zrenja kao vrući žig na kožu pršuta (Kos i sur., 2015). Proizvod se na tržište može staviti kao cijeli pršut ili u komadima. Na slici 2. prikazan je uobičajeni izgled Dalmatinskog pršuta.

2.3. PROTEOLIZA

Proteoliza izravno sudjeluje u formiranju konzistencije pršuta razgradnjom miofibrilarnih proteina koji grade mišićnu strukturu. Proteolizom nastaju peptidi i slobodne aminokiseline koje sudjeluju kao supstrat u daljnjim reakcijama i doprinose formiranju konačne arome i okusa pršuta. Tijek proteolize u pršutu razlikuje se ovisno o vrsti pršuta, količine endogenih proteolitičkih enzima i uvjeta prerade, dok se duljim trajanjem zrenja postižu izraženija senzorska svojstva.

Proteolizu kataliziraju endogeni proteolitički enzimi u tri stupnja, a intenzitet raste s produljenjem zrenja. Aktivnost mikrobnih enzima unutar pršuta je beznačajna (Molina i Toldrá, 1992). Na proteolitičku aktivnost enzima djeluju temperatura, pH, a_w i koncentracija soli. Proteolitički enzimi, katepsini i kalpaini, oslobađaju se postmortalno razgradnjom membrana stanice, npr. lisosoma ili sarkomere, čemu doprinosi niža pH vrijednost (Toldrá, 2002). Proteoliza je primarno proces hidrolize miofibrilarnih proteina koji intenzivno započinje završetkom postmortalne glikolize pri najvećim koncentracijama mliječne kiseline, odnosno najnižim pH vrijednostima (Kovačević, 2017). Tijek proteolize prikazan je na slici 3.



Slika 3. Proteoliza u mišićima post-mortem (Toldrá, 2002)

Mišićne proteaze su proteolitički enzimi koji razgrađuju mišićno tkivo postmortem, a podijeljene su na endopeptidaze (proteinaze) i egzopeptidaze. Stvaranje proteinskih ostataka i oligopeptida, rezultat je hidrolize, odnosno razgradnje strukture Z-membrane i proteina (troponin T, dezmin, nebulin i titin) te sarkoplazmatskih proteina (Toldrá, 2002).

Najvažnije mišićne proteinaze su katepsini i kalpainsi. Kalpainsi I i II su cisteinske endopeptidaze aktivne pri neutralnom pH, a aktivnost gube nakon 10 do 14 dana postmortem ili nakon faze soljenja (Rosell i Toldrá, 1996). Pretpostavka je da proteoliza započinje djelovanjem kalpaina, koji razlažu Z-membranu i regulatorne proteine, a zatim s padom pH mesa dolazi do inaktivacije kalpaina i oslobađanja katepsina koji su sposobni za razgradnju miofibrilarnih proteina (Toldrá, 2002). Proteinaze hidroliziranjem miofibrilarnih proteina i stvaranjem proteinskih ostataka i polipeptida, sudjeluju u postmortalnom omekšavanju mišićnog tkiva (Dransfield, 1994). Hidroliza miofibrilarnih proteina intenzivnija je od hidrolize sarkoplazmatskih proteina.

Katepsini pripadaju grupi cisteinskih proteinaza, aktivnih u uvjetima niske pH vrijednosti. Katepsin L, a osobito katepsin B, najvažniji su enzimi koji uzrokuju proteolizu tijekom procesa prerade pršuta (Toldrá i sur., 1993). Katepsin D može biti važan za proteolizu u prvim fazama procesa prerade pršuta, gdje je aktivan zahvaljujući niskoj koncentraciji soli i visokoj aktivnosti vode. Djelovanje kalpaina i katepsina u početnim fazama prerade vezano je s fragmentacijom miofibrila kroz Z-membranu, hidrolizom dezmina, titina i nebulina i pojavom dva polipeptida molekulske mase 95.000 i 30.000 (Zhang i sur., 2013). Rezultat toga je intenzivna proteinska razgradnja i porast mekoće mesa.

Intenzivno stvaranje slobodnih aminokiselina djelovanjem egzopeptidaza (aminopeptidaza, dipeptidaza i karboksipeptidaza) rezultira nastankom specifičnog okusa i mirisa. Aminopeptidaze su enzimi koji hidroliziraju peptidne veze u blizini amino krajeva proteina i polipeptida. Dipeptidil-peptidaze (DPP) i tripeptidil-peptidaze (TPP) sudjeluju u stvaranju dipeptida i tripeptida od proteinskih i polipeptidnih amino ostataka, a optimalnu aktivnost postižu u kiseloj sredini. Ova grupa enzima zadržava aktivnost i 15 mjeseci nakon prerade pršuta (Sentandreu i Toldrá, 2001). Karboksipeptidaza A (katepsin A) i karboksipeptidaza B (katepsin B2), smještene na lizozomima, kataliziraju hidrolizu peptidnih veza dipeptidnih i tripeptidnih amino ostataka (Toldrá, 2002).

Koncentracija slobodnih aminokiselina povećava se produljenjem zrenja, a ponajviše nastaje glutaminska i aspartatska kiselina, alanin, leucin, lizin, valin te male količine amina i

amonijaka dezaminacijom i dekarboksilacijom slobodnih aminokiselina (Kovačević, 2017). Mali peptidi, koji nastaju kao rezultat djelovanja tri- i dipeptidilpeptidaza, stvaraju se sve do kraja prerade pršuta. Nekad se kao rezultat pojačane proteolize pojavljuje pojačana produkcija peptida, koji uzrokuju stvaranje bijelog filma na reznoj površini pršuta (Toldrá, 2002) ili formiranje vidljivih bijelih kristala tirozina unutar mišićnog tkiva pršuta.

Prekomjerna proteoliza u pršutu vezana je s genetskom osnovom, hranidbom i dobi svinja. Veliki porast koncentracije slobodnih aminokiselina u pršutu povezana je s aktivnošću mišićnih aminopeptidaza u neutralnom pH (Toldrá i sur., 1992). Rezultat prekomjerne proteolize je povišena koncentracija peptida i slobodnih aminokiselina, što može uzrokovati neprijatan okus pršuta i mekšu konzistenciju.

Uloga proteolize u tehnologiji proizvodnje pršuta (Toldrá, 2002):

- povećanje pH vrijednost kao posljedica povećanja koncentracije slobodnih aminokiselina
- promjena okus stvaranjem malih peptida i slobodnih aminokiselina
- utjecaj na miris daljnjom razgradnjom slobodnih aminokiselina i njihovih razgradnih produkata (Mallardove i reakcije Streckerove razgradnje).

Slobodne aminokiseline mogu biti prekursori za sintezu nekih hlapljivih spojeva koji nastaju Mallardovim i Streckerovim reakcijama te imaju značajan utjecaj na oblikovanje specifičnog mirisa tijekom produženog zrenja (Toldrá, 2002). Što proces zrenja traje dulje, rezultira većom razgradnjom proteina i nastankom velikog broja malih peptida i slobodnih aminokiselina. Slobodne aminokiseline i biogeni amini direktno utječu na okus (Buňka i sur., 2013).

2.3.1. Čimbenici koji utječu na proteolizu

Anatomski položaj i funkcija mišića imaju velik utjecaj na tijek proteolize tijekom procesiranja, zbog različite kinetike raspodjele soli i vode u mišićima (Harkouss i sur., 2015). Mišić *semimembranosus* (SM) i *biceps femoris* (BF) smješteni su blizu površine buta, ali je kod većine tipova pršuta BF pokriven kožom i potkožnim masnim tkivom, nasuprot SM, koji se nalazi na otvorenoj površini buta. Stoga je *semimembranosus* više izložen soli tijekom prve

faze soljenja i većoj dehidraciji tijekom sušenja i zrenja što rezultira nižom enzimskom aktivnosti (Parreño i sur., 1994).

Brzina zrenja mesa povećava se povišenjem temperature. Zrenje mišića *biceps femoris* na 30 °C povećava intenzitet proteolize u odnosu na pršute kod kojih se zrenje provodi pri temperaturi od 5 °C (Ruiz-Ramírez i sur., 2006). Viša temperatura tijekom zrenja potiče formiranje spojeva ne-proteinskog dušika i utječe na tijek proteolize. Enzimska aktivnost povećava se tijekom procesa dimljenja i sušenja kada se temperature kreću u rasponu od 20 do 25 °C (Kovačević, 2017).

Soljeno i sušeno meso zbog inhibicijskog učinka soli i sniženog aktiviteta vode zrije vrlo polako. Aktivitet vode značajan je za kontrolu enzimske aktivnosti, osobito u drugom dijelu i na kraju prerade pršuta kada je a_w smanjen na vrijednosti ispod 0,90 (Toldrá, 2002), dok visok aktivitet vode povećava proteolitičku aktivnost. Najizraženije proteolitičke promjene, događaju se u fazi produženog zrenja i kod pršuta niske koncentracije soli (Toldrá i Flores, 1998). Produljenjem procesa produžava se i djelovanje enzima, odnosno javlja se intenzivnija proteoliza i lipoliza.

Prema Calkins i Hodgen (2007) sklonost prekomjernoj proteolizi pokazuju:

a) butovi s niskom vrijednosti pH; brza postmortalna dezintegracija membrana i oslobađanje enzima te smanjenje sposobnosti vezanja vode što uvjetuje povećanje proizvodnog kalam tijekom soljenja i proporcionalno povećanje masenog udjela NaCl-a.

b) butovi koji sadrže više intramuskularne masti čime se smanjuje difuzija i sadržaj NaCl-a.

Tijek i stupanj proteolize, te profil i količina nastalih produkata imaju presudan učinak na konačnu kvalitetu pršuta. Osim što proteoliza i lipoliza imaju ključnu ulogu u formiranju specifičnih senzorskih svojstava pršuta, njihovim odvijanjem nastaju spojevi s konzervirajućim djelovanjem (npr. alkoholi, terpeni, karboksilne kiseline i dr.) (Dransfield, 1994). Proteoliza je jedan od najvažnijih čimbenika kvalitete konačnog proizvoda. Skraćivanje procesa prerade, dodavanje enzima ili mijenjanje mikroklimatskih uvjeta prerade, uglavnom se negativno odražava na kvalitetu pršuta.

2.3.2. Indeks proteolize

Indeks proteolize dobar je pokazatelj intenziteta proteolize. Vrijednosti indeksa proteolize raste tijekom prerade pršuta, a veće su u mišiću *biceps femoris* nego u *semimembranosus* što se može objasniti većim udjelom vode u tom unutrašnjem mišiću pa tako i jačom proteolitičkom aktivnošću (Harkouss i sur., 2015). Prekomjerno proteolizi skloniji su pršuti s velikom proteolitičkom aktivnosti, niskim vrijednostima pH i većim gubitkom na masi tijekom soljenja (Toldrá, 2002). Prekomjerna proteoliza, s proteolitičkim indeksom većim od 29 do 30 %, u korelaciji je s povišenom razinom katepsinske aktivnosti koja je posljedica genetike, hranidbe, dobi svinja i većeg udjela vode (García-González i sur., 2013).

2.4. TEKSTURA

Tekstura pršuta određena je tvrdoćom sirovine, ali ovisi i o sadržaju intramuskularne masti (Virgili i sur., 1995) i sastavu masnih kiselina, proteolitičkom potencijalu, umrežavanju kolagena, procesu zrenja i sadržaju soli (Arnau i sur., 1998), oksidaciji masti i intenzitetu sušenja (Ruiz-Ramírez i sur., 2006).

Tijekom cijelog procesa prerade pršuta događa se niz promjena koje doprinose stvaranju konačne teksture pršuta. Proteoliza utječe na promjenu teksture mišića što rezultira omekšavanjem mesa i povećanjem ekstraktibilnosti proteina te doprinosi većoj sočnosti mesa zbog hidratacije proteina (Toldrá, 2002).

Za formiranje teksture pršuta najveći značaj ima soljenje, sušenje, zrenje te fizikalno-kemijska svojstva poput koncentracije soli, udjela vode i pH vrijednost mesa. Manji udio soli poboljšava proteolizu i doprinosi mekšoj teksturi konačnog proizvoda. Veća pH vrijednost i veći maseni udio vode potiču enzimsku aktivnost i intenziviraju proteolizu čime se povećava mekoća, pastuoznost i ljepljivost pršuta (García-Rey i sur., 2004). Prisutnost intramuskularne i intermaskularne masnoće usporava proces prodiranja soli i sušenja, dok veći sadržaj intramuskularne masti pozitivno utječe na nježnost i sočnost pršuta.

2.5. OKSIDACIJA PROTEINA

Proteini su jedni od najvažnijih makromolekula koje izgrađuju organizme svih živih bića. Uspješnosti provođenja metaboličkih funkcija određeno je kvalitetom proteina. Ono uvelike ovisi o sastavu aminokiselina, prostornom rasporedu u nativnom obliku, slijedu peptida te njihovoj koncentraciji i bioiskoristivosti (Xiong, 2000). Za aktivnost i korištenje u organizmu, bitno je zadržati kemijsku aktivnost i odgovarajuću konformaciju. Narušena struktura i stabilnost uzrokovana oksidacijskom štetom mogu rezultirati protein-protein interakcijama, polimerizaciji, formiranjem agregata ili cijepanjem na sekvence peptida (Stadtman i Levine, 2003).

Kemijske modifikacije na posebnim ograncima amino-kiselinama i/ili okosnici proteina mogu uzrokovati promjene u fizikalnim svojstvima proteina uključujući fragmentaciju, agregaciju, smanjenje topljivosti, gubitak enzimske aktivnosti te manjak osjetljivosti na proteolizu (Xiong, 2000). Probavljivost i kapacitet zadržavanja vode mišićnih proteina kao i postmortem omekšavanje mesa pod utjecajem su oksidacijskih reakcija (Xiong i Chen, 2011). Nastanak karbonila i umrežavanje proteina su identificirani kao vodeći uzročnici gubitka funkcionalnosti mišićnih proteina, modifikacije boje, teksture te okusa mesa i prerađenih mesnih proizvoda (Villaverde i sur., 2014).

Oksidacija proteina je definirana kao kovalentna modifikacija proteina inducirana direktnim reakcijama sa reaktivnim kisikovim vrstama (ROS) ili indirektnim reakcijama sa sekundarnim produktima oksidacijskog stresa (Zhang i sur., 2013). Reaktivne kisikove vrste (ROS) uključuju slobodne radikale ($\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2\bullet^-$, $\text{RS}\bullet$, i $\text{ROO}\bullet$), neradikalne vrste (H_2O_2 i ROOH) i reaktivne aldehide i ketone, koji su prepoznati kao potencijalni inicijatori oksidacije proteina (Estévez, 2011). Prirodne komponente mišićnog tkiva kao nezasićeni lipidi, hem pigmenti, prijelazni metali i oksidacijski enzimi su potencijalni prekursori ili katalizatori formiranja ROS-eva i bitni su za inicijaciju oksidacije proteina mišića (Xiong, 2000). Oksidansi mogu direktno napasti okosnicu proteina i uzrokovati fragmentaciju i konformacijske promjene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina. Disulfidne, ditirozinske i ostale intermolekularne veze zahvaćene oksidacijom mogu rezultirati agregacijom ili polimerizacijom proteina što uzrokuje promjene proteolitičkih svojstava (Morzel i sur., 2006).

Osim prisutnosti prijelaznih metala, mioglobina i oksidacijskih lipida, na oksidaciju proteina i aminokiselina utječe niz okolišnih faktora kao pH, temperatura, aktivitet vode i prisutnost ostalih promotora ili inhibitora, poput fenolnih komponenti. Tercijarna struktura proteina, njihova veličina, aminokiselinski slijed i sastav mogu utjecati na osjetljivost proteina u karbonilacijskim procesima (Xiong, 2000). Izmjene rezultiraju fizikalno-kemijskim promjenama topljivosti, hidrofobnosti, zadržavanja vode, nježnosti mesa, funkcije geliranja i enzimske aktivnosti (Rowe i sur., 2004).

Promjene uzokovane oksidacijom smanjuju bioiskoristivost aminokiselina i mijenjaju probavljivost proteina, što negativno utječe na nutritivnu vrijednost proteina mesa (Lund i sur., 2011). Karbonilacija proteina rezultira ireverzibilnim promjenama esencijalnih amino-kiselina poput lizina, treonina i arginina. Glavna oksidacijska modifikacija proteina se odvija na bočnim stranama aminokiselina, što uključuje oksidaciju tiola, aromatskih hidroksilata i formiranje karbonilnih grupa (Estévez, 2011). Određene aminokiseline u blagim uvjetima, poput cisteina i metionina, prve podliježu oksidaciji zbog visoke osjetljivosti njihovih sumpornih centara. Anion sumpora je snažan nukleofil i bogat elektronima, koji se mogu lako ukloniti (Shacter, 2000).

Mjerenje formiranih karbonila se ponajviše koristi u određivanju promjena nastalih oksidacijom proteina. Također, kao marker oksidacije proteina može se koristiti određivanje gubitaka sulfhidrilnih skupina. Cistein, baš kao i metionin, je jako osjetljiva aminokiselina na sve ROS-ove, a njihov gubitak u mesnim sustavima može biti uzrokovan oksidacijskom štetom na proteinima mesa. Umrežavanje proteina je još jedna manifestacija oksidacije proteina i procjenjuje se određivanjem disulfidnih veza, određivanjem ditirozinskih veza i procjenom umreženja teškog lanca miozina koristeći SDS elektroforezu (Estévez i sur., 2008). Ostala obilježja oksidacijskog oštećenja uključuju hidroksilaciju aromatskih i alifatskih ogranaka aminokiselina, nitraciju ostataka aromatskih aminokiselina, nitrozilaciju sulfhidrilnih grupa i kloriranje aromatskih grupa i primarnih amino skupina (Stadtman i Levine, 2003).

Mnogi mesni proizvodi izlažu se različitim procesima prerade koji pojačavaju moguće čimbenike oksidacije proteina. Sa duljim vremenom zrenja povećava se udio karbonila i smanjuje se udio sulfhidrilnih grupa. Na progresiju ovih promjena uveliko utječu oksidacijski sustavi, uvjeti skladištenja i pakiranja (Santé-Lhoutellier i sur., 2008). Oksidacija lipida može biti mehanizam koji pojačava oksidaciju proteina.

2.5.1. Karbonilacija

Karbonilacija je ireverzibilna i neenzimatska modifikacija proteina koja uključuje formiranje karbonilnih skupina inducirano oksidacijskim stresom ili drugim mehanizmima (Zhang i sur., 2013). Formiranje karbonila uglavnom derivira iz oksidacije treonina, prolina, arginina i lizina (Stadtman i Levine, 2003). Karbonili, aldehidi i ketoni, mogu nastati u proteinima na 4 različita načina (Estévez, 2011):

1. direktnom oksidacijom bočnih ogranaka lizina, treonina, arginina i prolina
2. neenzimskom glikacijom u prisutnosti reducirajućih šećera
3. oksidacijskim cijepanjem proteinske okosnice kroz α -amidacijski put ili oksidacijom glutamilskog pobočnog ogranka
4. kovalentnim vezanjem na neproteinske karbonilne čestice kao 4-hidroksi-2-nonal (HNE) ili malodialdehida (MDA)

Od navedenih načina, izravna oksidacija osjetljivih aminokiselinskih bočnih ogranaka glavni je put karbonilacije proteina i jedini za koji je dokazano da uzrokuje formiranje karbonila iz proteina mesa (Estévez, 2011). Karbonilacija proteina mesa može biti inducirana *in vitro* koristeći različite ROS sustave generiranja, uključujući prijelazne metale (engl. Metalcatalyzed Oxidation-MCO), oksidaciju posredovanu miooglobinom i lipid oksidacijske sustave (Soladoye, 2015).

Intenzivni oksidacijski uvjeti tijekom metalom katalizirane oksidacije proteina (MCO) uzrokuju nastanak velike količine proteinskih karbonila. Kao posljedica MCO, treonin je konvertiran u α -amino-3-keto-butansku kiselinu, lizin u α -amino-adipin-polialdehid (AAS) i arginin i prolin u γ -glutamin-polialdehid (GGS). AAS i GGS originalno su korišteni kao biomarkeri za oksidativna oštećenja na proteinima (Daneshvar i sur., 1997). Posljedično, analiza ovih komponenti primjenjuje se u uzorcima mišića (Timm-Heinrich i sur., 2013). AAS i GGS obuhvaćaju do 70 % ukupnih proteinskih karbonila nastalih u umjereno oksidiranim mesnim proizvodima što je u slaganju sa izvješćima iz medicinskih istraživanja (Utrera i sur., 2011). U intenzivnim uvjetima oksidacije, nastavak oksidacije AAS slijedi do formiranja stabilnog završnog produkta α -aminodipske kiseline (AAA). U daljnim

istraživanjima AAA je definiran kao oksidacijski produkt lizina u formiranju AAS u kulturi stanica i modelnim sustavima (Sell i sur., 2008).

Proteinski karbonili formirani u matriksu hrane opisuju se kao aktivne komponente u daljnjim reakcijama. Te reakcije uključuju nastavak oksidacije, formiranje produkata aldolne kondenzacije i Schiffovih baza te implikaciju u formiranju Steckerovih aldehida, ponašajući se kao učinkoviti nukleofili (Estévez, 2011).

U uvjetima visoke ionske sile povećana je osjetljivost mišićnih proteina na oksidaciju. Sol ima direktan utjecaj na konformaciju proteina, topljivost i funkcionalnost (Xiong, 2000). Promjene konformacija mogu imati indirektni utjecaj na osjetljivost miofibrilarnih proteina na oksidaciju jer su pristupačniji radikalima i drugim prooksidacijskim faktorima (Liu i sur., 2011). Vjeruje se da postupci soljenja tijekom prerade mesa pojačavaju tendenciju za oksidaciju proteina kao i za oksidaciju lipida.

Prirodne komponente mišića poput mioglobina (Mb) dokazano unaprijeđuju oksidaciju proteina, posebno proteinsku karbonilaciju i to u većoj mjeri od prijelaznih metala (Estévez i Heinonen, 2010). Mioglobin aktiviran s H_2O_2 promiče formaciju AAS i GGS iz proteina mesa u većoj mjeri nego Cu^{2+} ili Fe^{3+} , dok je analizom specifičnih karbonila utvrđeno je da je Cu^{2+} više učinkovit od Fe^{3+} . Mioglobin je dobar prediktivni marker formiranja karbonila u mesnim sustavima (Promeprat i sur., 2011). Metmioglobin (MetMb) promiče formiranje karbonila iz proteina mesa u većoj mjeri od MCO sustava (Fe^{3+} /asorbinska kiselina/ H_2O_2) (Park i sur., 2006). Aktivirani hem pigment je efektivan promotor proteinske karbonilacije i umrežavanja proteina (Lund i sur., 2011).

Utvrđeno je da su specifični karbonili α -amino adipinski polualdehid (AAS) i γ -glutaminske kiseline (GGS) potpomogli degradaciju leucina i izoleucina te su nastali Steckerovi aldehidi, 3-metilbutanal i 2-metilbutanal. Navedeni spojevi su učestale komponente arome mesnih proizvoda (Estévez i sur., 2003). Formiranje Steckerovih aldehida je obično opisano kao oksidacijska deaminacija i dekarboksilacija slobodnih aminokiselina u prisutnosti α -dikarbonilnih čestica nastalih u Maillardovim reakcijama i/ili iz oksidacije lipida kao alkaldiena i ketodiena (Zamora i Hidalgo, 2005).

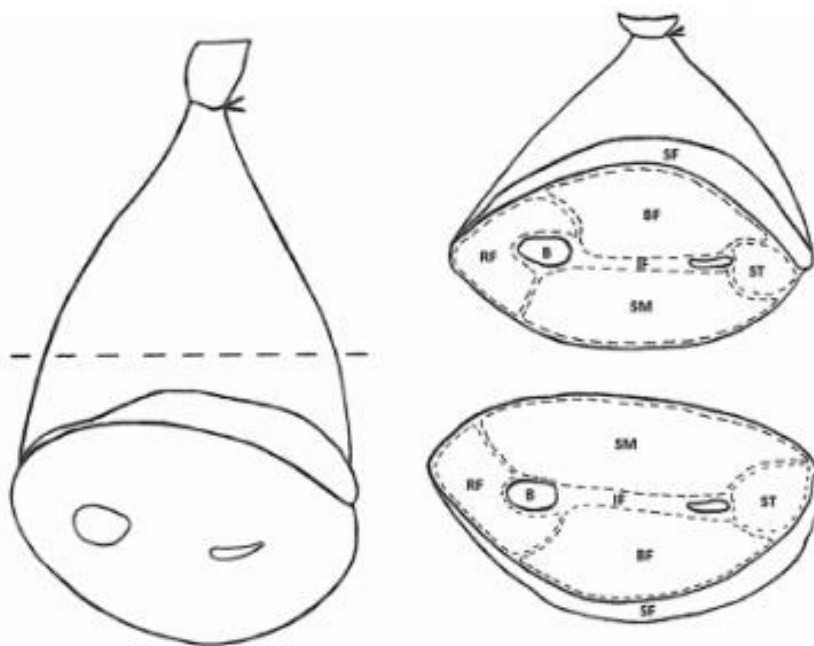
2.5.2. DNPH metoda

DNPH metoda je rutinski postupak koji omogućava kvantifikaciju ukupne količine karbonila iz uzorka proteina. Rezultati imaju široku primjenu kao općeniti indeks oksidacije proteina u mesu i mesnim proizvodima (Estévez, 2011). Postupak uključuje istovremenu determinaciju karbonilnih derivata i sadržaja proteina u uzorku. Proteinski karbonili se uveliko koriste za procjenu oksidacije proteina. Njihova detekcija preko 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) metode je jednostavna i povoljna te predstavlja jedan od najrelevantnijih načina izražavanja oksidacijske štete na proteinima u biološkim sustavima i hrani (Estévez, 2011). Karbonilni dio molekule reagira sa DNPH i nastaje derivat 2,4-dinitrofenilhidrazon, a količina nastalog hidrazina se mjeri spektrofotometrijski. Količina karbonila mjeri se pri 370 nm i izražava kao nanomol karbonila po mg proteina koristeći apsorbancijski koeficijent za hidrazin ($21,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Armenteros i sur., 2009). Koncentracija proteina računa se iz apsorbanije pri 280 nm koristeću BSA kao standard. Unatoč čestoj primjeni, nedostaci ovog postupka uključuju manjak specifičnosti i moguće prekomjerno određivanje karbonila zbog mogućih interferenata. Zbog navedenih nedostataka, razvijaju se i druge metode kao što su fluorescentna spektroskopija i LC-ESI-MS (tekućinska kromatografija-elektrosprej ionizacija-masena spektrometrija) (Armenteros i sur., 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

Za potrebu izrade diplomskog rada analizirani su uzorci Dalmatinskog pršuta nakon faze zrenja. Pasma svinja korištena u proizvodnji pršuta bio je tropasminski križanac DANBRED ((danski landras x veliki jorkšir) x durok). Uzeto je 10 presjeka butova iz kojih su izdvojena po 2 mišića: *biceps femoris* i *semimembranosus*, što čini ukupno 20 uzoraka. Na slici 4. i 5. dan je prikaz presjeka mišića buta s označenim mišićima, kostima, unutarnjim masnim dijelom i potkožnim masnim područjem.



Slika 4. Presjek buta: mišići SM-Semimembranosus i BF-Biceps femoris (Petrova i sur., 2015)



Slika 5. Presjek buta (Vlastita fotografija)

3.1.1. Priprema uzoraka za analizu

Aparatura i pribor:

- Uređaj za vakumiranje (Homevac, HV500, Status, Slovenija)
- Tehnička vaga (Kern 527, KERN & SOHN GmbH, Balingen, Njemačka)

Analiza teksture mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* je učinjena odmah po zaprimanju uzoraka. Za određivanje oksidacije proteina i indeksa proteolize izrezano je između 15 do 20 g uzorka mišića i vakuumirano pomoću uređaja za vakuumiranje. Tako pripremljeni uzorci su označeni pripadajućim brojem i oznakom mišića te pohranjeni u zamrzivaču na -18 °C do početka analize.

3.2 METODE RADA

3.2.1. Određivanje ukupnih karbonila

Aparatura i pribor:

- Analitička vaga (Kern ABJ 220-4NM, Kern & Sohn, GmbH, Balingen, Njemačka)
- Homogenizator (Ultra Turrax) (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Njemačka)
- Falcon epruvete, 50 mL
- Eppendorf epruvete, 2 mL
- Mikropipetor (Eppendorf GmbH, Hamburg, Njemačka)
- Vortex (Cole-Parmer Ltd, Staffordshire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Centrifuga (ROTINA 380 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Njemačka)
- UV-VIS Spektrofotometar Specord 50 PLUS (Analytik Jena, Njemačka)

Reagensi:

- pirofosfatni pufer (pH 7,4; 2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ($M_r=221,97 \text{ g mol}^{-1}$); 10 mM tris-maleat ($M_r=237,21 \text{ g mol}^{-1}$); 100 mM KCl ($M_r=74,56 \text{ g mol}^{-1}$), 2 mM MgCl_2 ($M_r=203,30 \text{ g mol}^{-1}$), 2 mM EGTA ($M_r=380,95 \text{ g mol}^{-1}$))
- 10 % triklorooctena kiselina (TCA)
- 2 M HCl
- 0,2 % DNPH u 2 M HCl
- etanol : etil acetat = 1 : 1
- natrijev pufer u 6 M gvanidin hidrokloиду
- Bovine serum albumin (BSA) - 2 mg mL^{-1}

Za određivanje ukupnih karbonila korišten je izmijenjeni postupak koji su opisali Armenteros i sur. (2009). Masa usitnjenog uzorka od 1 g izvagana je u falcon epruvetu, a za svaki od njih je napravljena paralela. Uzorci su homogenizirani sa 10 mL pirofosfatnog pufera (pH 7,4; 2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 10 mM trizma maleat; 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA) koristeći Ultra Turrax kroz 30 sekundi. Svaki od uzorka je podijeljen na 2 alikvota od 0,1 mL, u eppendorf epruvetu od 2 mL, te je u svaki dodano 1 mL 10 % TCA za precipitiranje proteina. Pomiješani su na Vortex-u te i centrifugirano na 10 000 rpm tijekom 5 min. Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen, a u eppendorf epruvete je dodan:

- *Pellet 1* → *kvantifikacija proteina*: dodati 1 mL HCl 2N
- *Pellet 2* → *mjerenje karbonila*: dodati 1 mL 0,2 % DNPH u HCl 2N

Uzroci su inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi u tami, uz miješanje svakih 15 min na Vortex-u. Potom je u svaku eppendorf epruvetu dodano 1 mL 10 % TCA za precipitaciju, pomiješani su na Vortex-u 30 sekundi i centrifugirani na 10 000 rpm 5 minuta. Supernatant je odbačen, a peleti isprani sa 1 mL etanol/etil acetata (1:1), promiješani na Vortex-u i centrifugirani na 10 000 rpm 5 min. Postupak ispiranja peleta je ponovljen. Nakon toga peleti su otopljeni u natrijevom fosfatnom puferu 20 mM (pH 6,5) sa 6M gvanidin hidrokloridom, promiješani na Vortex-u i centrifugirani na 10 000 rpm 5 min kako bi se uklonili netopljivi fragmenti. Dobivenom supernatantu je izmjerena apsorbancija.

- *Pellet 1* → *kvantifikacija proteina*: mjeriti na 280 nm, koristeći BSA kao standard (0,5-2 mg mL⁻¹) u natrijevom fosfatnom puferu 20 mM (pH 6,5) sa 6M gvanidin hidrokloridom.
- *Pellet 2* → *mjerenje karbonila*: izmjeriti na 370 nm, i izračunati koncentraciju karbonila koristeći formulu $A = \xi * M * l$ (1)

A označava apsorbanciju pri 370 nm, l je debljina kivete korištene prilikom mjerenja apsorbancije, M koncentracija karbonila, a ξ koeficijent adsorpcije proteina hidrazona koji iznosi 21,0 mM⁻¹ cm⁻¹. Rezultat je izražen kao nmol karbonila po mg proteina.

Baždarna krivulja priprema se otapanjem 0,02 g BSA (albumin goveđeg seruma) u 10 mL natrij fosfatnog pufera 20 mM (pH 6,5) sa 6M gvanidin hidrokloridom, te izrađuje prema podacima prikazanim u tablici 1.

Tablica 1. Podaci za izradu baždarne krivulje

BSA (mL)	Fosfatni pufer + gvanidin hidroklorid (mL)	c BSA (mg mL ⁻¹)
0	2	0 (SP)
0.5	1.5	0.5
1	1	1
1.5	0.5	1.5
2	0	2

3.2.2. Određivanje indeksa proteolize

Aparatura i pribor

- Analitička vaga (Kern ABJ 220-4NM, Kern & Sohn, GmbH, Balingen, Njemačka)
- Homogenizator (Ultra Turrax) (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Njemačka)
- Falcon epruvete, 50 mL
- Eppendorf epruvete, 3 mL
- Mikropipetor (Eppendorf GmbH, Hamburg, Njemačka)
- Vortex (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Njemačka)
- Centrifuga (ROTINA 380 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Njemačka)
- Termblok (Cole-Parmer Ltd, Staffordshire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- UV-VIS Spektrofotometar Specord 50 PLUS (Analytik Jena, Njemačka)

Reagensi:

- otopina Cd-ninhidrina
- 0,01 M HCl
- etanol
- otopina leucina

Određivanje indeksa proteolize provedeno je korištenjem metode koje su opisali Doi i sur. (1981) i Baer i sur. (1996). Reakcijom derivatizacije sa kadmij-ninhidrinom kvantificira se ukupan broj aminokiselina, izraženih na bazi leucina, prisutnih u različitim uzorcima pršuta. Mjerenje apsorbancija uzoraka vrši se na 490 nm.

Masa uzorka od 2 g je izvagana na tehničkoj vagi u falcon epruvete te je dodano dodano 20 mL hladnog 0,01 M HCl-a. Potom su uzorci homogenizirani na Ultra-Turrax-u 3 puta po 20 sekundi pri čemu su stavljeni na led. Vodilo se računa da se ne zagriju jer bi to nepovoljno utjecalo na rezultate. Prije postavljanja epruveta u centrifugu izvršeno je ekvilibriranje istih te je provedeno centrifugiranje u trajanju od 20 min na 10 000 rpm na 4 °C. Supernatant je filtriran koristeći staklenu vunu, a nakon toga je ekstrakt razrijeđen sa 0,01 M HCl-om u omjeru koje odgovara vremenu zrenja prema podacima iz tablice 2.

Tablica 2. Omjeri ekstrakta i HCl-a ovisno o vremenu zrenja

Svježi uzorak	1/3	1/5
2 mjeseca	1/5	1/10
3,5 mjeseca	1/10	1/20
5 mjeseci	1/20	1/50
6,5 mjeseca	1/20	1/50
9 mjeseci	1/50	1/100
10 mjeseci	1/50	1/100

Pipetmanom je uzeto 400 μL dobivenog razrijeđenja (ekstrakt + HCl) te zajedno sa 800 μL etanola u ependorfici, pomiješano na Vortex-u te ostavljeno na sobnoj temperaturi da precipitiraju proteini. Uzorci su nakon 30 minuta centrifugirani na 12 000 rpm 5 min. Potom je 400 μL supernatanta pomiješano s 800 μL reagensa, kadmij ninhidrin, na Vortex-u te zagrijavani u termobloku na 84 °C u trajanju od 5 minuta. Nakon isteka vremena uzorci su prebačeni u led na 15 minuta i zatim centrifugirani na 12 000 rpm 5 minuta. Tako pripremljenim uzorcima je očitana apsorbancija na 490 nm.

Za svako mjerenje je izrađena odgovarajuća kalibracijska krivulja. Pripremljena je 1 mM otopina leucina na način da se odvagalo 0,0133 g leucina i otopilo u 100 mL destilirane vode. Pripremljena otopina leucina pomiješana je s etanol/voda (2:1) u koncentracijama kao što je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Podaci za izradu baždarnе krivulje

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

*Leu- pripremljena otopina leucina

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

Pomoću kalibracijske krivulje i apsorbancije uzoraka izračunata je koncentracija aminokiselina u svakoj otopini uzorka ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Učinjena je korekcija prema otopinama uzorka: dobivena koncentracija x 10 (ekstrakcija) x 3 (deproteinizacija) x specifična otopina svakog uzorka (3, 5, 10, 20, 50, 100) dijeljeno s 1000 te je na taj način dobivena količina aminokiselina u mg po 1 g uzorka.

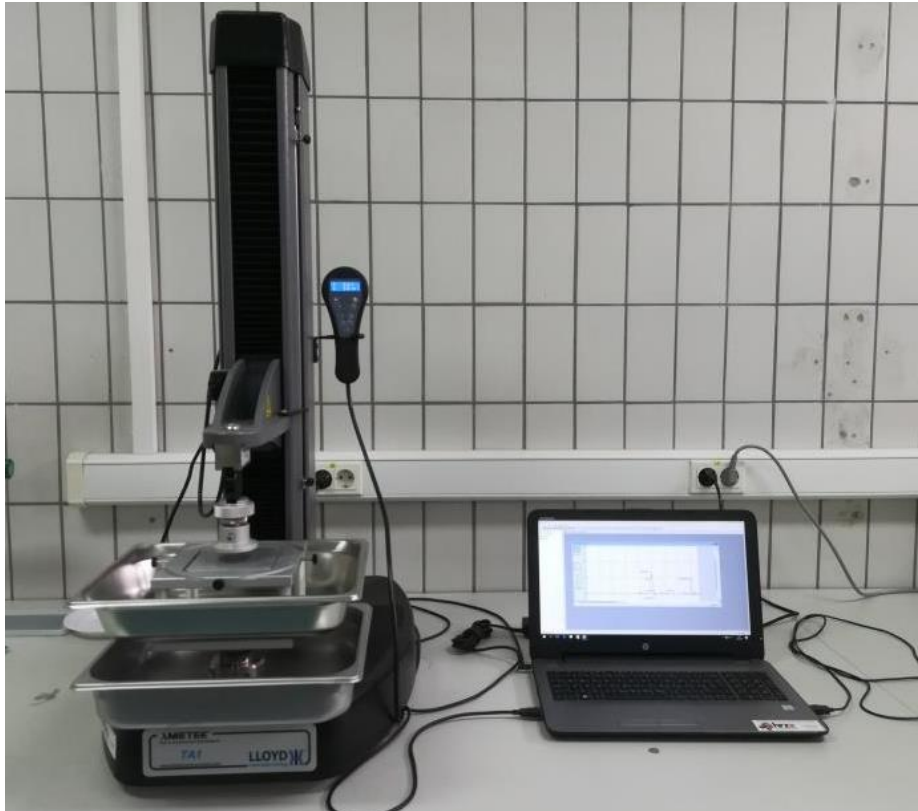
3.2.3. Određivanje teksture

Aparatura i pribor:

- Teksturometar (Ametek Lloyd Instruments Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)

Analiza:

Tekstura uzoraka analizirana je teksturometrom (Ametek Lloyd Instruments Ltd., UK) s ćelijom od 50 kg prikazanom na slici 6. Analiza teksture mišića *biceps femoris i semimembranosus* učinjena je odmah po primitku uzoraka. Od svakog uzorka izrezano je 6 kockica veličine 10x10x10 mm. Nakon pripreme, uzorci temperature 20 °C su komprimirani dva puta do 50 % deformacije brzinom od 1 mm s⁻¹ (vrijeme razmaka između 2 ciklusa 5 s). Rezultati su obrađeni softverom NexygenPlus. Određeni su navedeni parametri: tvrdoća (N), adhezivna sila (N), kohezivnost, adhezivnost (N mm), gumenost (N), odgođena elastičnost (mm), žvakljivost (N mm), otpornost (N), lom (N) i vlaknastost (mm).



Slika 6. Teksturometar Ametek Lloyd Instruments Ltd. (vlastita fotografija)

3.2.4. Statistička obrada podataka

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

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

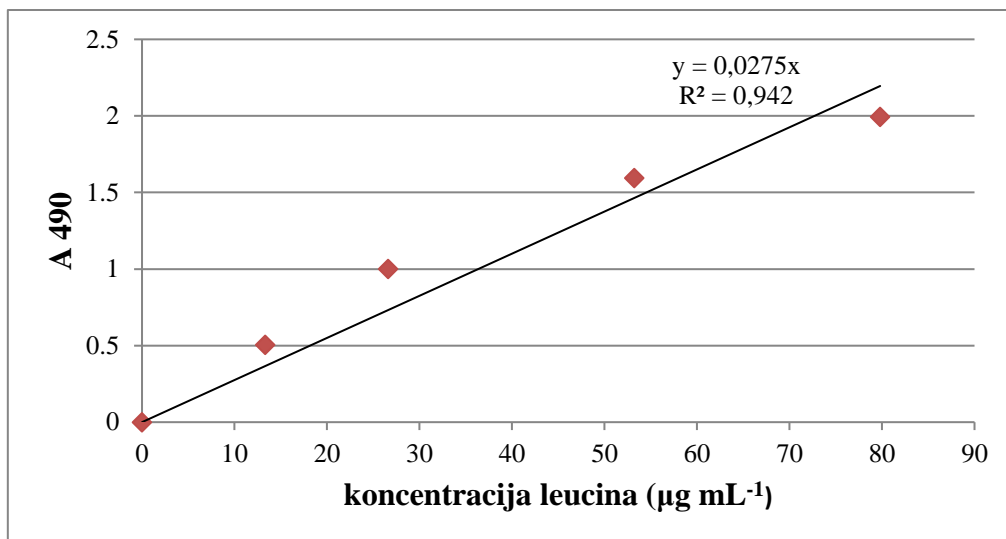
Promjene na proteinima dalmatinskog pršuta određivane su nakon faze zrenja u trajanju od 12 mjeseci. Ispitivanja su provedene su na mišićima *biceps femoris* i *semimembranosus*. Istraživanje obuhvaća određivanje količine proteina i karbonila DNPH metodom, određivanje indeksa proteolize mjerenjem koncentracije aminokiselina te određivanje teksture pršuta. Za potrebu ispitivanja teksture napravljeno je 6 paralelnih mjerenja za svaki pojedini mišić. Za određivanje koncentracije proteina i karbonila te za određivanje indeksa proteolize napravljena su 2 paralelna mjerenja za svaki uzorak mišića *biceps femoris* i *semimembranosus*.

4.1 PROTEOLIZA

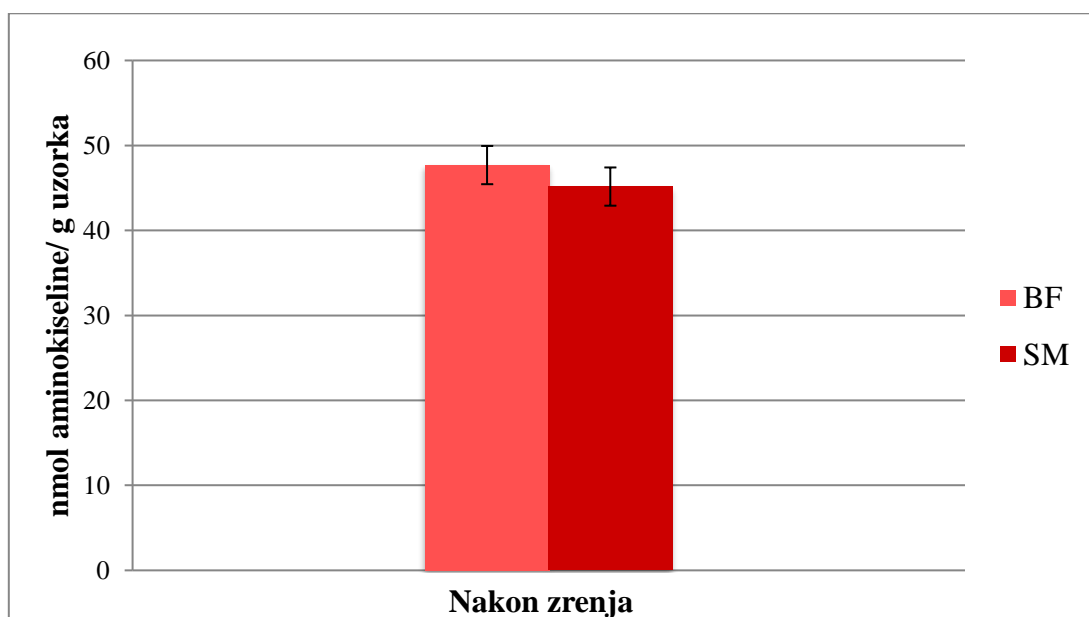
Proteoliza započinje razgradnjom osnovnih miofibrilarnih proteina i omekšavanjem strukture mesa djelovanjem najvažnijih enzima endopeptidaza katepsina i kalpaina. Oslobađaju se post mortem usljed dezintegracije intracelularnih membrana te dovode do stvaranja i nakupljanja oligopeptida, koji su pak supstrati egzopeptidazama u stvaranju manjih peptida (Kovačević, 2017). Koncentracija slobodnih aminokiselina nastalih proteolizom proporcionalna je dužini zrenja pršuta.

Biceps femoris i *semimembranosus* dva su najznačajnija mišića u pršutu, koji su tijekom prerade podvrgnuti različitim uvjetima. *Semimembranosus* je vanjski mišić koji ima visok udio soli u početnim fazama proizvodnje te se udio vode u njemu brzo smanjuje, dok je *biceps femoris* unutarnji mišić s nižim udjelom soli tijekom prvih faza proizvodnje, ali s višim udjelom vode kroz procesiranje (Bermúdez i sur., 2014).

Za potrebu određivanja indeksa proteolize korištena je reakcija derivatizacije s kadmij-ninhidrinom te je ukupan broj aminokiselina izražen na bazi leucina. Za svako određivanje koncentracije aminokiselina pripremljena je baždarna krivulja ovisnosti apsorbancije pri 490 nm o koncentraciji leucina, čiji je primjer na slici 7. Iz jednadžbe pravca očitane su vrijednosti koncentracije aminokiselina te je učinjena odgovarajuća korekcija. Rezultati su izraženi kao koncentracija aminokiselina u mg po g uzorka. Na slici 8. prikazani su rezultati određivanja indeksa proteolize.



Slika 7. Prikaz baždarne krivulje leucina korištene za određivanje koncentracije aminokiselina (izraženih na bazi leucina)



Slika 8. Grafički prikaz rezultata određivanja indeksa proteolize u uzorcima dimljenog pršuta nakon zrenja u mišićima *biceps femoris* (BF) i *semimembranosus* (SM)

Indeks proteolize u uzorcima dimljenog pršuta određen je nakon faze zrenja u mišićima *biceps femorisa* (BF) i *semimembranosus* (SM) te izražen kao mg aminokiselina po g uzorka. Koncentracija proteina u BF iznosi 47,69 mg g⁻¹, a u SM 45,19 mg g⁻¹. Nije zabilježena statistički značajna razlika u ispitivanim uzorcima ($P > 0,05$).

Tijekom proizvodnje Kraškog pršuta, također je zabilježen porast indeksa proteolize u oba mišića, s tim da je bio izraženiji u *biceps femorisu* (Andronikov i sur., 2013). Veći sadržaj vode u mišiću *biceps femoris* Kraškog pršuta povoljno djeluje na proteolitičke procese usprkos visokoj količini soli u usporedbi sa *semimembranosusom*.

Najviša koncentracija slobodnih aminokiselina u uzorcima mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* Celta pršuta zabilježena je u fazi zrenja i produljenog zrenja, pri čemu je indeks proteolize također bio veći u mišiću *biceps femoris* (Bermúdez i sur., 2014).

Pugliese i sur. (2015) određivali su indeks proteolize u mišićima *biceps femoris* i *semimembranosus* nakon zrenja Kraškog pršuta u trajanju od 12 i 16 mjeseci. Indeks proteolize u *biceps femorisu* iznosio je 24,0 nakon 12 mjeseci i 25,8 nakon 16 mjeseci, a u *semimembranosusu* 17,9 nakon 12 mjeseci i 19,1 nakon 16 mjeseci. U četiri mjeseca razlike mišići su se progresivno jako sušili. U isto vrijeme, proteolitička aktivnost se povećala i rezultirala promjenama u reološkim svojstima i sastavu hlapivih spojeva. *Biceps femoris* je osjetljiviji na proteolitičku razgradnju od *semimembranosusa* i time doprinosi većem razvoju hlapivih komponenti. To proizlazi iz anatomske pozicije mišića i transfera soli kroz but, koji se nastavlja sve do kraja sušenja i rezultira većom koncentracijom vode.

Veći sadržaj vode u mišiću *biceps femoris* Kraškog pršuta pojačava aktivnost proteolitičkih procesa unatoč većoj količini soli, uspoređujući sa mišićem *semimembranosus*, usprkos tome što proteolitička aktivnost u prštima opada sa povećanjem udjela soli (Martín i sur., 1998).

Proteomska mapa mišića *biceps femoris* zrelih Bayonne pršuta dobivena u proteomskoj analizi Thérona i sur. (2011) rezultirala je s većim udjelom proteinskih fragmenata od mape *semimembranosusa*. To ukazuje da je stupanj razgradnje proteina veći nego u *semimembranosusu*, što se može pripisati većem udjelu vode. Imajući u obziru razlike između mišića, veći indeks proteolize *biceps femorisa* od *semimembranosusa* dosljedan je i u drugim radovima; Ruiz-Ramírez i sur. (2006) također objavljuju veći indeks proteolize u *biceps femorisu* nego u *semimembranosusu* u uzorcima dimljenih pršuta.

Na kraju prerade *biceps femoris* ima veći sadržaj vode i soli od *semimembranosusa*, što je posljedica dinamike gubitka vode i difuzije soli, koja sa površine dopire u unutarnji dio buta (Gallego i sur., 2018). Uvjeti prerade i svojstva sirovine kao težina, udio masti i pH vrijednost određuju brzinu dehidracije, penetracije soli i posljedično aktivnost proteolitičkih enzima, koji imaju veliku ulogu u teksturi i senzoricima sušenih i dimljenih pršuta (Giovanelli i sur.,

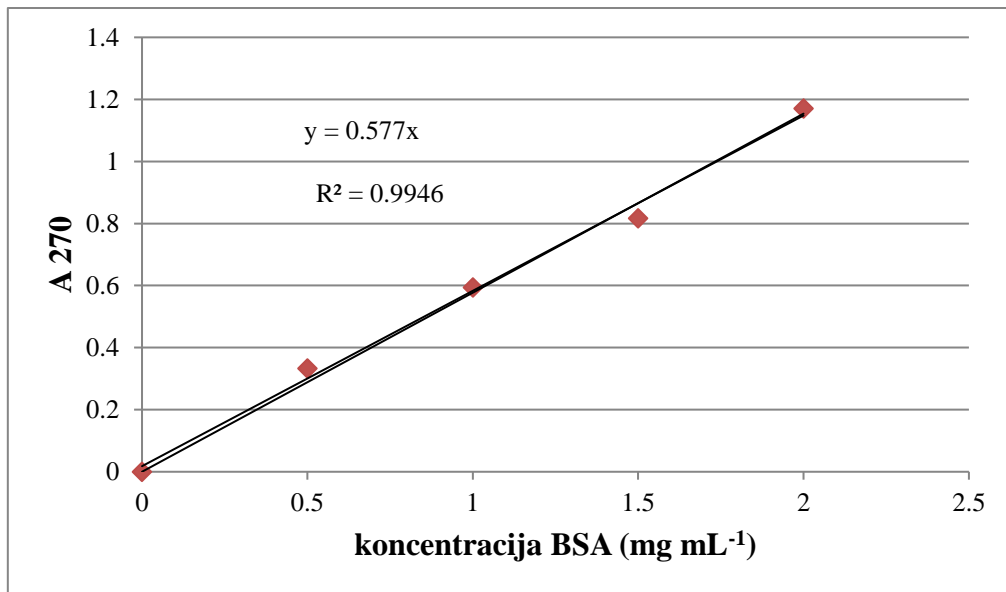
2016). Indeks proteolize ovisi i o postupku soljenja, trajanju zrenja, relativnoj vlažnosti i temperaturi koja se primjenjuje u proizvodnji pršuta. Indeks proteolize veći je u *biceps femoris* (BF) nego u *semimembranosus* (SM) što se može objasniti većim udjelom vode u tom unutrašnjem mišiću pa tako i jačom proteolitičkom aktivnošću (Harkouss i sur., 2015).

4.2. OKSIDACIJA PROTEINA

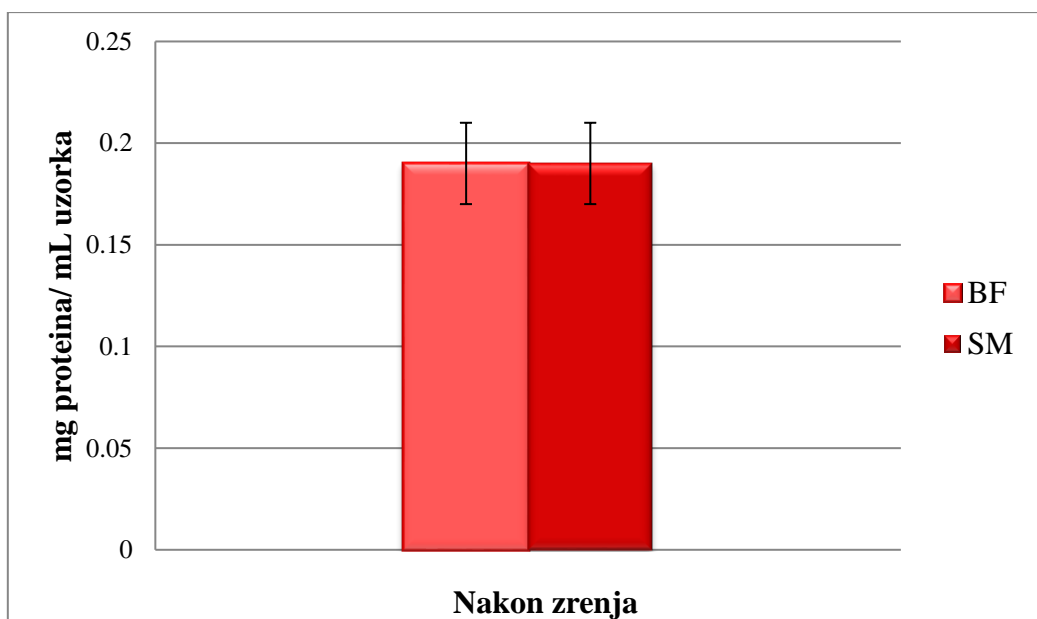
Metoda DNPH je rutinski postupak koji omogućuje kvantifikaciju ukupne količine karbonila iz uzorka proteina (Estèvez i sur., 2008). U metodi se koristi 2,4-dinitrofenilhidrazin, koji u reakciji s karbonilnom skupinom daje stabilni 2,4-dinitrofenil hidrazon, a ukupni karbonilni udio proteina određuje se spektrofotometrijom. Ova metoda poslužila je za određivanje koncentracija karbonila u uzorcima mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* nakon faze zrenja dalmatinskog pršuta. Metodom je određena i koncentracija proteina u uzorcima, ali se umjesto DNPH za kvantifikaciju proteina dodaje otopina HCl-a.

Prilikom svakog određivanja koncentracije proteina pripremljena je baždarna krivulja u ovisnosti apsorbancije pri 280 nm o koncentraciji BSA, čiji je primjer prikazan je na slici 9. Koncentracija proteina u svakom uzorku izračunata je na temelju baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja BSA (od 0,5 mg mL⁻¹ do 2 mg mL⁻¹). 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.

Iz dobivene jednadžbe pravca, prikazane na slici 9, izračunata je koncentracija proteina. Koncentracija proteina izražena je u mg po mL uzorka, a koncentracija karbonila izračunata je iz formule te izražena u nmol po mg proteina.



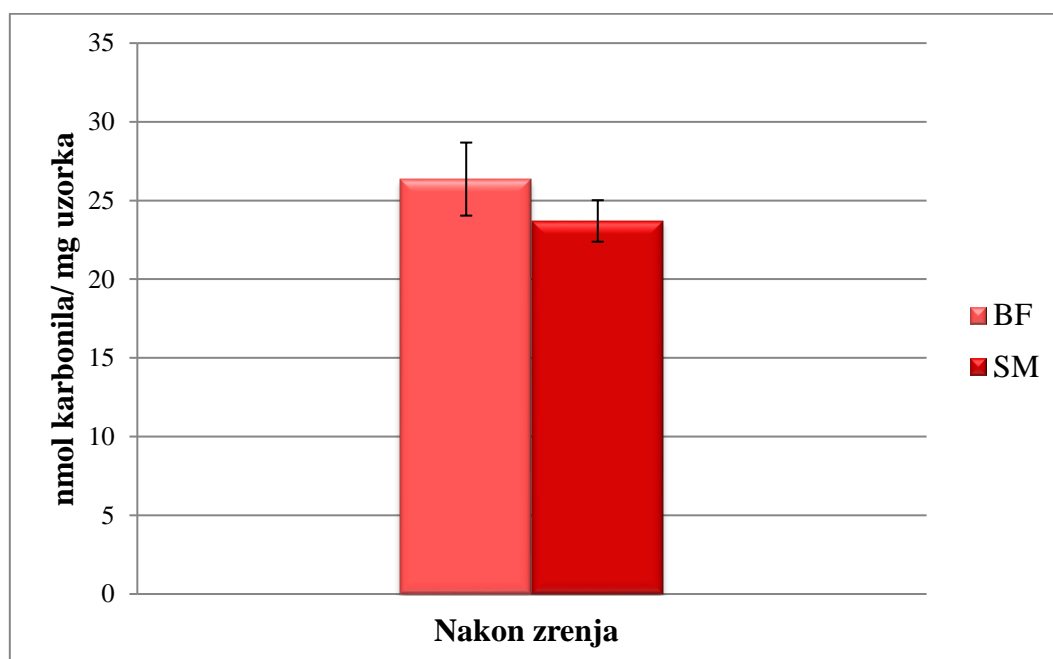
Slika 9. Prikaz baždarne krivulje BSA korištene za određivanje koncentracije proteina



Slika 10. Grafički prikaz rezultata određivanja koncentracije proteina u uzorcima dimljenog pršuta nakon zrenja u mišićima *biceps femoris* (BF) i *semimembranosus* (SM)

Koncentracija proteina (slika 10.) u *biceps femorisu* iznosila je $0,19 \text{ mg mL}^{-1}$ te je ista vrijednost od $0,19 \text{ mg mL}^{-1}$ zabilježena i u *semimembranosusu*. U ispitivanim uzorcima nije zabilježena statistički značajna vrijednost ($P > 0,05$).

Semimebranosus je kao vanjski mišić u većoj mjeri izložen isušivanju, dok je *biceps femoris* kao unutarnji mišić, obložen kožom i masnim tkivom što usporava prodiranje soli i gubitak vode. Sol korištena u fazi soljenja može povećati prooksidativni učinak na lipidima i uzrokovati oksidaciju lipida koja može potaknuti oksidaciju proteina (Soladoye i sur., 2015).



Slika 11. Grafički prikaz rezultata određivanja koncentracije karbonila u uzorcima dimljenog pršuta nakon zrenja u mišićima *biceps femoris* (BF) i *semimembranosus* (SM)

Na slici 11. prikazana je koncentracija karbonila koja je u *biceps femorisu* iznosila je $26,36 \text{ nmol mg}^{-1}$ uzorka, te $23,7 \text{ nmol mg}^{-1}$ uzorka u *semimembranosusu*. U ispitivanim uzorcima nije zabilježena statistički značajna razlika ($P > 0,05$).

Koutina i sur. (2012) proveli su istraživanje u kojem je određena koncentracija karbonila Parma pršuta nakon zrenja u mišićima *biceps femoris* i *semimembranosus*. Koncentracija karbonila određena je DNPH metodom kao i u ovome radu uz male razlike u pojedinim koracima provođenja metode. Dobiveni rezultati za koncentracija karbonila nakon zrenja

iznosili su 3 nmol mg⁻¹, što je znatno manje od rezultata dobivenih u ovom radu. Za pretpostaviti je kako se u Dalmatinskom pršutu odvija izraženija oksidacija proteina.

Malo veća koncentracija karbonila u *biceps femorisu* može se objasniti većim sadržajem vode u tom unutarnjem mišiću te većom proteolitičkom aktivnosti. Oksidacija proteina je također zamjećena u pršutima koji imaju dulje vrijeme proizvodnje (Marušić Radovčić i sur., 2019). Razlike u fizikalno-kemijskim karakteristikama poput sadržaja soli i vode u mišićima *biceps femoris* i *semimembranosus* može utjecati na oksidaciju proteina na nivou kvantitete te se intenzivnija proteoliza može očekivati u unutarnjem mišiću *biceps femoris* (Gallego i sur., 2018). Također, u dimljenim pršutima, utvrđena je veća koncentracija karbonila nego u svježim pršutima, zbog duljeg i intenzivnijeg sušenja te perioda zrenja (Ventanas i sur., 2007).

Veća oksidacija proteina u *biceps femorisu* od *semimembranosusa* zabilježena je u Bayonne pršutu (Harkouss i sur., 2015). Toldra i sur. (1992) i Ruiz-Ramírez i sur. (2006) imali su slične rezultate, sa većom vrijednosti oksidacije proteina u *biceps femorisu* nego u mišiću *semimembranosus*. Spomenuti autori navode kako se razlika proizlazi iz veće količine zaostale vlage u mišiću *biceps femoris*, koja dopušta veću enzimsku aktivnost endogenih proteaza (Harkouss i sur., 2015).

U Iberijskom pršutu, u mišiću *biceps femoris*, koncentracija karbonila bila je od 6,8 do 10,9 nmol karbonila mg⁻¹ proteina (Cava i sur., 2009) što je manje njego u ovom radu. Slični rezultati su ostvareni u radu Ventanas i sur. (2007), također u Iberijskom pršutu, gdje je izmjerena koncentracija karbonila u raspon od 6,8 do 8,87 nmol karbonila mg⁻¹ proteina. Ova razlika vjerojatno potječe zbog različitog procesa prerade. Niže vrijednosti karbonila u Iberijskom pršutu su možda posljedica dodatka nitrata i nitrita koji imaju ulogu antioksidansa.

4.3 TEKSTURA

Biceps femoris je unutarnji mišić prekriven slojem potkožne masti i kožom što navodi na to da se sadržaj soli polako povećava tijekom prerade, ima niži udio soli i veći udio vode. Posljedično, događa se intenzivnija proteoliza u *biceps femorisu*, nego u *semimembranosusu* što utječe na parametre teksture i aromatski sastav (Virgili i sur., 1995). *Semimembranosus* je vanjski mišić u direktnom kontaktu sa soli; ostvaruje veću koncentraciju soli u prvim fazama prerade zbog difuzije soli te naglo pada sadržaj vode. Također, taj mišić je bliže površini i bez zaštite potkožne masti što omogućuje brz i lagan prodor soli nakon faze soljenja i inhibiciju proteolitičkih reakcija i njihovih posljedica na teksturu i okus (Bermúdez i sur., 2014).

Indeks proteolize je pokazatelj koji najbolje objašnjava promjene u vezi sadržaja vode i parametara teksture (tvrdoća, kohezivnost i elastičnosti) mišića dimljenih pršuta i može se uzeti u obzir za predviđanje teksture pršuta tijekom različitih faza prerade. Dimljeni pršuti s nižim indeksom proteolize skloniji su tvrđoj teksturi, čvršćoj površinu tj. kori pri nižem sadržaju vode (Ruiz-Ramírez i sur., 2006). Anatomska lokacija mišića, pH i količina soli utječu na indeks proteolize na kraju proizvodnje pršuta. Uzorci sa višim indeksom proteolize pokazuju manju tvrdoću i veću kohezivnost i elastičnost, posebno u uvjetima niskog sadržaja vode, što se postiže na površini tradicionalnih pršuta.

Sa daljnjim trajanjem zrenja, zabilježen je značajan porast tvrdoće posebno u *semimembranosusu* što je povezano s promjenama u sadržaju vode. Virgili i sur. (1995) opisali su negativnu korelaciju između sadržaja vode i tvrdoće u mišićima *semimembranosus* (SM), *semitendinosus* (ST) i *biceps femoris* (BF) u uzorcima dimljenih pršuta. U tom istraživanju skoro svi parametri teksture ovisili su o vrsti mišića, većinom zbog nižeg sadržaja vode i indeksa proteolize. U tablici 4. prikazani su rezultati određivanja parametara teksturu u uzorcima Dalmatinskog pršuta.

Tablica 4. Rezultati određivanja parametra teksture pršuta nakon faze zrenja u uzorcima Dalmatinskog pršuta u mišićima *biceps femoris* (BF) i *semimembranosus* (SM)

Parametar teksture	BF	SM	p-vrijednost
Tvrdoća (N)	103,32± 7,14 ^a	126,78±6,48 ^b	0,025
Adhezivna sila (N)	-0,53±0,03	-0,51±0,04	0,759
Kohezivnost	0,48±0,012 ^b	0,43±0,01 ^a	0,001
Adhezivnost (N mm)	0,75±0,032 ^b	0,54±0,04 ^a	0,000
Gumenost (N)	60,03±5,08 ^b	40,73±2,97 ^a	0,002
Odgođena elastičnost (mm)	-3,14±0,05 ^b	-2,28±0,05 ^a	0,000
Žvkljivost (N mm)	71,11±2,86	68,34±2,68	0,502
Otpornost	0,44±0,01	0,40±0,02	0,069
Lom (N)	86,03±6,48	100,11±7,87	0,131
Vlaknastost (mm)	1,86±0,08	1,76±0,10	0,453

* Utjecaj vrste mišića (*biceps femoris* -BF; *semimembranosus* - SM) (srednja vrijednost 10 uzoraka). Različita slova (a i b) označavaju statistički značajnu razliku ($P<0,05$) (razlika između mišića).

Tvrdoća izmjerena nakon zrenja u uzorcima Dalmatinskog pršuta u mišiću *biceps femoris* iznosila je 103,32 N dok je u *semimembranosusu* iznosila 126,78 N. Zabilježena je statistički značajna razlika između uzoraka ($P < 0,05$). U istraživanju koje su proveli Laureati i sur. (2014) na talijanskim pršutima dobili su sljedeće vrijednosti za tvrdoću: u Parma pršutu je ona iznosila 6,22 N, u San Daniele 6,49 N, te u Toscano pršutu 23,91 N. Također, navode kako gubitak vode uzrokuje povećanje tvrdoće pršuta, dok s druge strane, proteoliza uzrokuje smanjenje tvrdoće i omekšavanje proizvoda. Tvrdoća zrelog Bayonne pršuta nakon 52 tjedna iznosila je 198 N za *semimembranosus* i 183 N za *biceps femoris*. Andronikov i sur. (2013) navode rezultate tvrdoće Kraškog pršuta u iznosu od 62 N za *biceps femoris* i 163 N (163) za *semimembranosus*. Pugliese i sur. (2015) uspoređivali su razliku u tvrdoći Kraškog pršuta između mišića *biceps femoris* i *semimembranosus* tijekom zrenja od 12 i 16 mjeseci. Dobivene vrijednosti za *biceps femoris* iznosile su 41,93 i 52,51 N te 70,23 i 107,22 N za *semimembranosus* nakon 12, odnosno 16 mjeseci zrenja. Navedene vrijednosti su niže od onih dobivenih u ovom istraživanju te se očekuje daljnje povećanje tvrdoće u fazi produljenog zrenja Dalmatinskog pršuta. Nakon godinu dana zrenja Čandek-Potokar i sur. (2020) odredili su tvrdoću Kraškog pršuta u *biceps femorisu* od 46 N dok je u *semimembranosusu* izmjerena tvrdoća od 128 N. Vrijednosti tvrdoće iz navedenih istraživanja se razlikuju što može biti posljedica drugačije tehnologije proizvodnje i trajanja faze sušenja.

Adhezivna sila u mišiću *biceps femoris* iznosila je -0,53 N, a u *semimembranosusu* određena u iznosu od -0,51 N te nije zabilježena statistički značajna razlika između uzoraka. Marušić Radovčić i sur. (2019) izmjerili su slične rezultate, također na uzorcima Dalmatinskog pršuta različitih proizvođača.

Izmjerena **kohezivnost** u uzorcima Dalmatinskog pršuta u mišiću *biceps femorisu* bila je 0,48 te u *semimembranosusu* 0,43 dok je zabilježena statistički značajna razlika ($P < 0,05$). Slične vrijednosti za kohezivnost određene su u *biceps femorisu* 0,56 i *semimembranosusu* 0,53 Kraškog pršuta (Andronikov i sur., 2013). Nešto više vrijednosti odredili su Rezende Costa i sur. (2008) za španjolski Serrano (0,69), talijansku pršut (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 za *biceps femoris* i 0,48 u uzorcima *semimembranosusa*, što je slično dobivenim rezultatima. Dobiveni rezultati u skladu su s kohezivnošću određenoj u talijanskom Parma (0,49), San Daniele (0,50) i Toscano (0,60) pršutu (Laureati i sur., 2014). Malo više vrijednosti kohezivnosti *semimembranosusa* (0,63), za razliku od *biceps femoris*

(0,57) dobivene su nakon 12 mjeseci proizvodnje Kraškog pršuta (Pugliese i sur., 2015), dok su u istraživanju Čandek-Potokara i sur. (2020) iznosili 0,52 za *biceps femoris* i 0,54 za *semimembranosus*.

Adhezivnost nakon zrenja od 12 mjeseci iznosila je 0,75 N mm u *biceps femorisu* i 0,54 N mm u *semimembranosusu* uz zabilježenu statistički značajnu razliku između uzoraka ($P < 0,05$). Niže rezultate dobili su Morales i sur. (2007) u istraživanju španjolskoga pršuta Serrano gdje se vrijednost za adhezivnost *biceps femorisa* kretala u rasponu 0,32-0,37 N mm te 0,376 do 0,390 N mm za *semimembranosus*. Istraživanje adhezivnosti u francuskom Bayonne pršutu rezultiralo je vrijednošću od -13,3 N mm za *biceps femoris* i -37,1 N mm za *semimembranosus* (Harkouss i sur., 2015). U talijanskim pršutima Laureati i sur. (2014) dobili su sljedeće vrijednosti za adhezivnost: Parma pršut (-0,42 N mm), pršut San Daniele (-0,52 N mm), Toscano pršut (-0,19 N mm). Niže vrijednosti zabilježene su u Kraškom pršutu gdje su za *biceps femoris* iznosile -11,41 N mm, a za *semimembranosus* 9,51 N mm (Pugliese i sur., 2015). Andronikov i sur. (2013) odredili su adhezivnost *biceps femorisa* od 0,98 N mm i 1,0 N mm za *semimembranosus*, dok je u istraživanju Čandek-Potokara i sur. (2020) adhezivnost iznosila -2,7 N mm za *biceps femoris* i -0,56 N mm za *semimembranosus*.

Izmjerena **gumenost** nakon zrenja za *biceps femoris* iznosi 60,03 N, te 40,73 N za *semimembranosus*. Zabilježena je statistički značajna razlika u gumenosti u uzorcima ($P < 0,05$). U slovenskom Kraškom pršutu, Andronikov i sur. (2013) odredili su vrijednost gumenosti pršuta u rasponu od 35 N za *biceps femoris*, dok su Pugliese i sur. (2015) dobili vrijednost od 24,52 N. U uzorcima *semimembranosusa* određena je od gumenosti od 68 N (Andronikov i sur., 2013) te 44,60 N (Pugliese i sur., 2015). U talijanskim pršutima Laureati i sur. (2014) dobili su sljedeće vrijednosti za gumenost: Parma pršut 2,99 N, pršut San Daniele 3,23 N i Toscano pršut 14,40 N, što je niže od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju. S druge strane, vrijednosti koje su zabilježili Čandek-Potokar i sur. (2020) iznosile su 24 N za *biceps femoris* i 68 N za *semimembranosus*.

Odgodena elastičnost u uzorcima *biceps femorisa* iznosila je -3,14 mm što je znatno manje od vrijednosti za odgođenu elastičnosti (0,751 mm) određenu u francuskom Bayonne pršutu (Harkouss i sur., 2015). Još veće vrijednosti dobili su Pugliese i sur. (2015) u slovenskom Kraškom pršutu (4,79 mm). Odgođena elastičnost određena u uzorcima *semimembranosusa* iznosila je -2,28 mm. U ispitivanim uzorcima Dalmatinskog pršuta zabilježena je statistički

značajna razlika u odgođenoj elastičnosti ($P < 0,05$). Dobivene vrijednosti su znatno niže u usporedbi s odgođenom elastičnosti određene u Bayonne pršutu (0,663 mm) (Harkouss i sur., 2015) i Kraškom pršutu (4,68 mm) (Puglies i sur., 2015). U talijanskim pršutima Laureati i sur. (2014) dobili su sljedeće vrijednosti za odgođenu elastičnost: Parma pršut 0,46 mm, Toscano pršut 0,57 mm, pršut San Daniele 0,49 mm, te je vidljivo da su te vrijednosti veće od odgođene elastičnosti određene u uzorcima dimljenih pršuta. Andronikov i sur. (2013) odredili su jednake vrijednosti odgođene elastičnosti u oba mišića te je ona iznosila 1 mm. Čandek-Potokar i sur. (2020) odredili su odgođenu elastičnost *biceps femorisa* od 4,3 mm i *semimembranosusa* od 4,7 mm. Harkouss i sur. (2015) navode kako se odgođena elastičnost smanjivala s povećavanjem indeks proteolize tijekom proizvodnje Bayonne pršuta.

U ispitivanim uzorcima dimljenih pršuta **žvakljivost** za *biceps femoris* iznosila je 71,11 N mm, a za *semimembranosus* 68,34 N mm te nije zabilježena statistički značajna razlika ($P > 0,05$). Dobiveni rezultati su znatno viši od vrijednosti za žvakljivost koju su Laureati i sur. (2014) izmjerili u Parma pršutu (1,44 N mm), San Daniele (1,62 N mm) te Toscano pršutu (8,68 N mm). Pugliese i sur. (2015) nakon 12 mjeseci zrenja, odredili su u Kraškom pršutu žvakljivost od 105,60 za *biceps femoris* i 206,41 za *semimembranosus*. Izmjerena žvakljivost u uzorcima *biceps femorisa* iznosila je 35 N mm i 86 N mm u *semimembranosusu* u slovenskom Kraškom pršutu (Andronikov i sur., 2013). Čandek-Potokar i sur. (2020) odredili su žvakljivost *biceps femorisa* od 108 N mm te *semimembranosusa* od 323 N mm.

Izmjerena **otpornost** u *biceps femorisu* iznosila je 0,44, a u *semimembranosusu* 0,40. Nije zabilježena statistički značajna razlika ($P > 0,05$). U slovenskom Kraškom pršutu određene su niže vrijednosti za otpornost. Za *biceps femoris* izmjerena otpornost kretala se u rasponu 0,19-0,22, a za *semimembranosus* 0,15-0,18 (Andronikov i sur., 2013).

Parametar teksture **lom** za *biceps femoris* iznosio je 86,03 N. Vrijednosti loma za *semimembranosus* iznosio je 100,11 N. **Vlaknastost** mišića u *biceps femoris* iznosila je 1,86 mm te u *semimembranosusu* 1,76 mm. Nije zabilježena statistički značajna razlika u lomu i vlaknastosti ($P > 0,05$).

Duljina zrenja utječe na navedene parametre teksture. Prolongiranje zrenja još 4 mjeseca povezano je s općenitim povećanjem tvrdoće, kohezivnosti, žvackljivosti, gumenosti i adhezivnosti. Vrsta mišića također ima utjecaj na parametre teksture. Zabilježene su veće vrijednosti koeficijenta smanjenja sile i manji rezultati tvrdoće, kohezivnosti, gumenosti i žvackljivosti u *biceps femoris* nego u *semimembranosus*. Tijekom zadnja 4 mjeseca zrenja, mišići postaju progresivno suhi i tvrdi. U isto vrijeme povećava se proteolitička aktivnost i razina topljivih komponenti (Pugliese i sur., 2015). Kao što je i očekivano, uzorci *semimembranosus* pokazali su veću tvrdoću, adhezivnu silu, odgođenu elastičnost i lom, ali nižu kohezivnost i otpornost nego *biceps femoris*, što je u skladu dobivenim rezultatima teksture u slovenskom Kraškom pršutu (Andronikov i sur., 2013). *Biceps femoris*, kao unutarnji mišić, manje je izložen djelovanju zraka u odnosu na *semimebranosus* koji je više isušen, pa samim time i ima veću tvrdoću. Velika tvrdoća pršuta može biti posljedica prekomjernog prešanja i/ili isušavanja (Karolyi, 2009). Razlika u korištenim teksturometrima i uzorcima može biti razlog različitih vrijednosti tvrdoće među navedenim rezultatima.

5. ZAKLJUČCI

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

1. **Indeks proteolize** u mišiću *biceps femoris* iznosio je $47,6 \text{ mg g}^{-1}$ dok je u *semimebranosus* zabilježen indeks proteolize od $45,19 \text{ mg g}^{-1}$.

2. **Koncentracija proteina** u uzorcima *biceps femorisa* iznosila je $0,19 \text{ mg mL}^{-1}$ kao i u *semimembranosusu* te nije postojala statistički značajna razlika između ispitivanih mišića ($P > 0,05$).

3. Koristeći DNPH metodu kao mjeru za stupanj oksidacije proteina 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* iznosila je $26,36 \text{ nmol karbonila mg}^{-1}$ proteina, dok je u uzorcima *semimebranosusa* bila $23,7 \text{ nmol karbonila mg}^{-1}$ proteina.

4. Rezultati određivanja **parametara teksture** u uzorcima Dalmatinskog pršuta, u *semimebranosusu* pokazali su veću tvrdoću, adhezivnu silu, odgođenu elastičnost te lom, ali nižu kohezivnost, adhezivnost, gumenost, žvakljivost i otpornost nego *biceps femoris*. Veća tvrdoća *semimembranosusa* posljedica je položaja mišića te intenzivnijeg gubitka vode.

6. LITERATURA

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 (2020) Slika Dalmatinskog pršuta, <<https://www.pivac.hr/hr/brands/dalmatinski-prsut-pivac>>. Pristupljeno 15. svibnja 2020.

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.

Arnau, J., Guerrero, L., Sárraga, C. (1998) The effect of green ham pH and NaCl concentration on cathepsin activities and the sensory characteristics of dry-cured hams. *J. Sci. Food Agr.* **77**(3), 387-392.

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

Bermúdez, R., Carballo, J., Franco, D., Rodríguez, J. M. L. (2014) Influence of type of muscle on volatile compounds throughout the manufacture of Celta dry-cured ham. *Food Sci. Technol. Int.* **21** (8), 582-592.

Buňka, F., Budinský, P., Zimáková, B., Merhaut, M., Flasarová, R., Pachlová, V., Kubáň, V., Buňková, L. (2013) Biogenic amines occurrence in fish meat sampled from restaurants in region of Czech Republic. *Food Control* **31**(1), 49- 52.

Calkins, C. R., Hodgen, J. M. (2007) A fresh look at meat flavor. *Meat Sci.* **77**, 63-80.

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.

- Čandek-Potokar, M., Škrlep, M., Kostyra, E., Żakowska-Biemans, S., Poklukar, K., Batorek-Lukač, N., Kress, K., Weiler, U., Stefanski, V. (2020) Quality of dry-cured ham from entire, surgically and immunocastrated males: case study on Kraški pršut. *Animals* **10**, 239-241.
- Daneshvar, B., Frandsen, H., Dragsted, L.O., Knudsen, L.E., Autrup, H. (1997) Analysis of native human plasma proteins and haemoglobin for the presence of bityrosine by high-performance liquid chromatography. *Pharm. Tox.* **81**, 205-208.
- Dikeman, M., Devine, C. (2004) Encyclopedia of meat sciences. II. edition. Academic Press, London, UK.
- Doi, E., Shibata, D., Matoba, T. (1981) Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* **118**, 173–184.
- Dransfield, E. (1994) Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Sci.* **36**, 105.
- Estévez, 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 -aminoadipic and γ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron, and myoglobin. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4448–4455.
- Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., Heinonen, M. (2008) Oxidation of Skeletal Muscle Myofibrillar Proteins in Oil-in-Water Emulsions: Interaction with Lipids and Effect of Selected Phenolic Compounds. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 10933–10940.
- Estévez, M., Morcuende, D., Ventanas, S., Cava, R. (2003) Analysis of volatiles in meat from Iberian pigs and lean pigs after refrigeration and cooking by using SPME-GC- MS. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 3429–3435.
- Gallego, M., Mora, L., Toldrá, F. (2018) Differences in peptide oxidation between muscles in 12 months Spanish dry-cured ham. *Food Res. Int.* **109**, 343-349.
- García-González, D.L., Aparicio, R., Aparicio-Ruiz, R. (2013) volatile and amino acid profiling of dry cured hams from different swine breeds and processing methods. *Molecules.* **18**, 3927-3947.

- 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.
- Giovanelli, G., Buratti, S., Laureati, M., Pagliarini, E. (2016) Evolution of physicochemical, morphological and aromatic characteristics of Italian PDO dry-cured hams during processing. *Eur. Food Res. Technol.* **242**(7), 1117–1127.
- 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.
- Karolyi, D. (2009) Najčešći problemi u proizvodnji pršuta. *Meso* **11**, 134-143.
- Kos, I., Mandir, A., Toić, U. (2015) Dalmatinski pršut-Oznaka zemljopisnog podrijetla, Specifikacija, Udruga dalmatinski pršut, Trilj.
- Koutina, G., Jongberg, S., Skibsted, L.H. (2012) Protein and lipid oxidation in parma ham during production. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 9737–9745.
- Kovačević, D. (2017) Kemija i tehnologija šunki i pršuta, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek
- Krvavica, M., Đugum, J. (2006) Proizvodnja pršuta u svijetu i kod nas, *Meso.* **8**(6), 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.
- Liu, Z., Xiong, Y.L., Chen, J. (2011) Morphological examinations of oxidatively stressed pork muscle and myofibrils upon salt marination and cooking to elucidate the water-binding potential. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 13026–13034.
- Lorenzo, J. M., Fonseca, S., Gómez, M., Domínguez, R. (2015) Influence of the salting time on physico-chemical parameters, lipolysis and proteolysis of dry-cured foal “cecina”. *LWT-Food Sci. Technol.* **60**(1), 332-338.

- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estévez, M. (2011) Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 83-95.
- Martín, L., Córdoba, J. J., Antequera, T., Timón, M. L., Ventanas, J. (1998) Effects of salt and temperature on proteolysis during ripening of Iberian ham. *Meat Sci.* **49**, 145-53.
- Marušić Radovčić, N., Mikulić, A., Turk, M., Medić, H. (2019) Differentiation of *Biceps femoris* and *Semimembranosus* muscles of smoked dry-cured ham by quality parameters. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **14**, 4-9.
- Molina, I., Toldrá, F. (1992) Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham. *J. Food Sci.* **57**, 1308-1310.
- Morales, R., Serra, X., Guerrero, L., Gou, P. (2007) Softness in dry-cured porcine biceps femoris muscles in relation to meat quality characteristics and processing conditions. *Meat Sci.* **77**(4), 662-669.
- Morzel, M., Gatellier, P. H., Sayd, T., Renerre, M., Laville, E. (2006) Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle proteins. *Meat Sci.* **73**, 536–543.
- Park, D., Xiong, Y. L., & Alderton, A. L. (2006) Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. *Food Chem.* **101**, 1239–1246.
- 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.
- Petrova, I., Aasen, I. M., Rustad, T., Eikevik, T. M. (2015) Manufacture of dry-cured ham: a review. Part 1. Biochemical changes during the technological process. *Eur. Food Res. Technol.* **241**, 587–599.
- Pravilnik o mesnim proizvodima (2018) Narodne novine **62**, Zagreb
- Promeyrat, 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 Bicep femoris and Semimembranosus muscles of the Slovenian dry-cured ham Kraški pršut. *Meat Sci.* **100**, 58-68.

Rosell, C.M., Toldrá, F. (1996) Effect of curing agents on m-calpain activity throughout the curing process. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* **203**, 320-325.

Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M., Huff-Lonergan, E. (2004) Influence of early post mortem protein oxidation on beef quality. *J. Anim. Sci.* **82**, 785–793.

Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J., Serra, X., Gou, P. (2006) Effect of pH 24, NaCl content and proteolysis index on the relationship between water content and texture parameters in biceps femoris and semimembranosus muscles in dry-cured ham. *Meat Sci.* **72**(2), 185-194.

Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., Aubry, L., & Gatellier, P. (2008) Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat Sci.* **79**, 777–783.

Sell, D. R., Strauch, C. M., Shen, W., Monnier, V. M. (2008) 2-Amino adipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: Effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochem. J.* **404**, 269–277.

Sentandreu, M. A., Toldrá, F. (2001) Importance of dipeptidyl-peptidase II in postmortem pork muscle. *Meat Sci.* **57**, 93-103.

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

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

Stadtman, E. R., Levine, R. L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **25**, 207–18.

Théron, L., Sayd, T., Pinguet, J., Chambon, C., Robert, N., Santé-Lhoutellier, V. (2011) Proteomic analysis of semimembranosus and biceps femoris muscles from Bayonne dry-cured ham. *Meat Sci.* **88**, 82-90.

- Timm-Heinrich, M., Eymard, S., Baron, C. P., Nielsen, H. H., Jacobsen, C. (2013) Oxidative changes during ice storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different ratios of marine and vegetable feed ingredients. *Food Chem.* **136**, 1220–1230.
- Toldrá, F. (2002) Manufacturing of dry-cured ham. U: Dry-cured meat products. Trumbull, Connecticut, USA: Food & Nutrition Press Inc. str. 27-62.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., Part, C., Ceveró, C., Rico, E., Motilva, M. J., Flores, J. (1992) Muscle and adipose tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. *J. Food Sci.* **57**, 816-818.
- Toldrá, F., Flores, M. (1998) The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. CRC Critical review. *Food Sci. Nutr.* **38**, 331-352.
- Toldrá, F., Rico, E., Flores, J. (1993) Cathepsin B, D, H and L activities in the processing of dry-cured ham. *J. Food Sci. Agr.* **62**, 157-161.
- Utrera, M., Morcuende, D., Rodríguez-Carpena, J.-G., Estévez, M. (2011) Fluorescent HPLC for the detection of specific protein oxidation carbonyls – α -amino adipic and γ glutamic semialdehydes – in meat systems. *Meat Sci.* **89**(4), 500–506.
- 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.
- Villaverde, A., Ventanas, J., Estévez, M. (2014) Nitrite promotes protein carbonylation and Strecker aldehyde formation in experimental fermented sausages: are both events connected? *Meat Sci.* **98**, 665–672.
- Virgili, R., Parolari, G., Schivazappa, C., Soresi Bordini, C., Borri, M. (1995) Sensory and texture quality of dry-cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *J. Food Sci.* **60** (6), 1183-1186.
- 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.

Xiong, Y. L., Chen, J. (2011) Morphological examinations of oxidatively stressed pork muscle and myofibrils upon salt marination and cooking to elucidate the water-binding potential. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 13026–13034.

Zamora, R., Hidalgo, F. J. (2005) Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. Critical Review. *Food Sci. Nutr.* **45**, 49–59.

Zhang, W., Xiao, S., Ahn, D. U. (2013) Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality, critical review. *Food Sci. Nutr.* **53**(11), 1191-1201.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Karmen Jurković